

Farmacologia

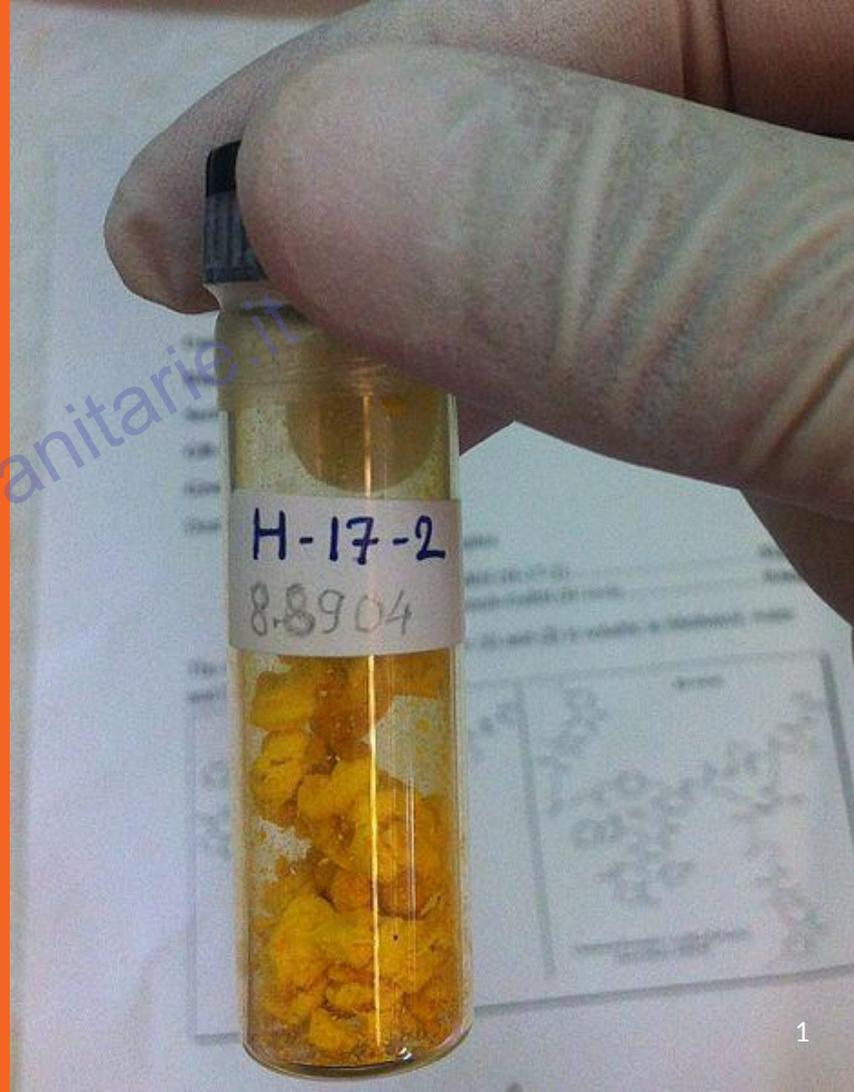
Drug discovery

Ricerca preclinica

Sperimentazione clinica

Richiesta di autorizzazioni

Farmacovigilanza



Indice

In copertina

Nuovo farmaco anti cancro scoperto in Grecia (2015)

By Oargyros (Own work) [CC BY-SA 4.0
(<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0>)], via Wikimedia Commons

Introduzione

Drug discovery: prova e sbaglia, il bersaglio farmacologico, hit to lead

Ricerca preclinica

Trials clinici: fase I (studio preliminare), fase II (studio terapeutico pilota), fase III (studio terapeutico su larga scala)

Registrazione del farmaco e commercializzazione

Farmacovigilanza

Photo credits

INTRODUZIONE

BioTecnologieSanitarie.it

Introduzione

La **nascita di un nuovo farmaco** è una lunga, rischiosa e costosa avventura di cui in genere si occupa un'azienda farmaceutica o un centro di ricerca universitario.

Richiede il contributo di esperti in campi diversi: il chimico, il biochimico, il medico, il biologo, il patologo, il fisiologo, l'informatico, l'ingegnere ...

Un grande dispendio di tempo e di energia per un prodotto da commercializzare, sempre che superi tutte le prove. Uno solo ce la fa, a partire spesso da milioni di molecole, e non sempre.

Introduzione

La commercializzazione ha un grosso impatto sociale per tanti motivi.

La nuova medicina rappresenterà una speranza di cura e/o di guarigione per tantissimi pazienti ma avrà anche un costo che deve tenere conto della necessità da parte dell'azienda di rientrare di quella parte di capitali investiti ma necessariamente immobilizzati da tempo.

Tutto ciò comporta il fatto che la ricerca di nuovi farmaci si muove verso obiettivi di largo respiro, patologie diffuse in altre parole. Le malattie rare rimangono così spesso “al palo”.

Introduzione

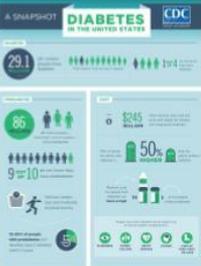
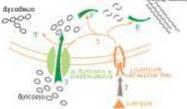
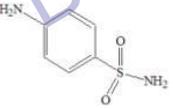
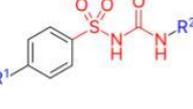
Vari sono gli step che portano alla formulazione e commercializzazione di un nuovo farmaco: ricerca e sviluppo (drug discovery) precedono le fasi di sperimentazione preclinica e clinica. Dopo l'immissione sul mercato segue la farmacovigilanza.

Una cosa è chiara: ognuna di queste fasi prima di essere avviata ha bisogno di una **decisione di investimento**, possibilmente condivisa, perché non vengono impegnati solo capitali ma anche e soprattutto il personale.

Introduzione

Ecco un breve riepilogo di tutte le fasi della nascita di un farmaco. C'è da precisare che si tratta di un esempio reale ma più semplice di quanto avviene di solito.

SVILUPPO DI UN NUOVO FARMACO

DRUG DISCOVERY				RICERCA PRECLINICA	SPERIMENTAZIONE CLINICA
<p>Studio della malattia</p>  <p>1</p>	<p>Selezione del target</p> <p>Aumento della produzione di insulina</p>  <p>2</p>	<p>Generazione o individuazione dei composti guida</p> <p>Individuati i sulfamidici come agenti ipoglicemizzanti</p>  <p>Solfanillamide</p> <p>3</p>	<p>Ottimizzazione dei composti guida</p> <p>Ottenute le sulfaniluree</p>  <p>Sulfaniluree</p> <p>4</p>	<p>Test in vitro e poi in vivo</p> <p>Viene testata l'efficacia potenziale del farmaco</p>  <p>5</p>  <p>6</p>	<p>Clinical trials</p> <p>Fase 1 - Farmacologia clinica 60 - 80 volontari Avviati gli studi ADME (Assorbimento, Distribuzione, Metabolismo, Escrezione)</p> <p>Fase 2 - Studio di efficacia 100 - 500 pazienti affetti da patologia Si ricerca la dose per l'effetto terapeutico desiderato</p> <p>Fase 3 - Studio multicentrico Fino a 3000 - 5000 pazienti coinvolti Tra i tanti parametri da confermare e affinare si valutano soprattutto la sicurezza a lungo termine e la variabilità individuale</p>

**A
P
P
R
O
V
V
A
Z
I
O
N
E**

**F
A
R
M
A
C
O
V
I
G
I
L
A
N
Z
A**

CIRCA 3 ANNI

CIRCA 3 ANNI

CIRCA 6-7 ANNI

DRUG DISCOVERY

BioTechnology Sanitarie.it



**PROVA E
SBAGLIA**

BioTechnologies Sanitarie.

Drug discovery

Storicamente si può far risalire la ricerca di nuovi farmaci al XIX secolo con la sintesi dell'aspirina e l'estrazione sistematica dei principi attivi di molte piante.

Basta ricordare gli alcaloidi dall'oppio o la cocaina dalla *Erythroxylum coca*.



Papaver somniferum e la sua capsula immatura da cui stilla il lattice

Drug discovery

Altri esempi sono la digitalina e la digitossina che sono glucosidi estratti dalla *Digitalis lutea* e utilizzati come principi attivi nella regolazione del battito cardiaco e della pressione sanguigna.



Digitalis lutea

Drug discovery

Anche l'**atropina** deriva da piante che appartengono alle Solanacee tra cui la *Datura stramonium* (nella foto). Viene utilizzata come spasmolitico nell'asma, per frenare i conati di vomito e la nausea, per dilatare la pupilla in oftalmologia.



Datura stramonium

Drug discovery

Inoltre l'atropina è utilizzata come antidoto negli avvelenamenti da digitalis o da cicuta. È poi il trattamento migliore contro il gas nervino. Insomma l'elenco è lungo ma bisogna anche tenere conto che superando la dose di 3 mg inizia la fase di stimolazione del Sistema Nervoso con progressiva paralisi, a volte anche mortale. Il farmaco è antagonista dell'acetilcolina per i recettori muscarinici.



Atropa belladonna, altra pianta da cui si estrae l'atropina

Drug discovery

L'aumento progressivo delle conoscenze di anatomia, fisiologia, patologia, citologia e istologia aiutò successivamente i ricercatori a identificare sempre meglio i bersagli terapeutici. Una cosa è sicura. La scoperta casuale di un farmaco è un evento rarissimo.

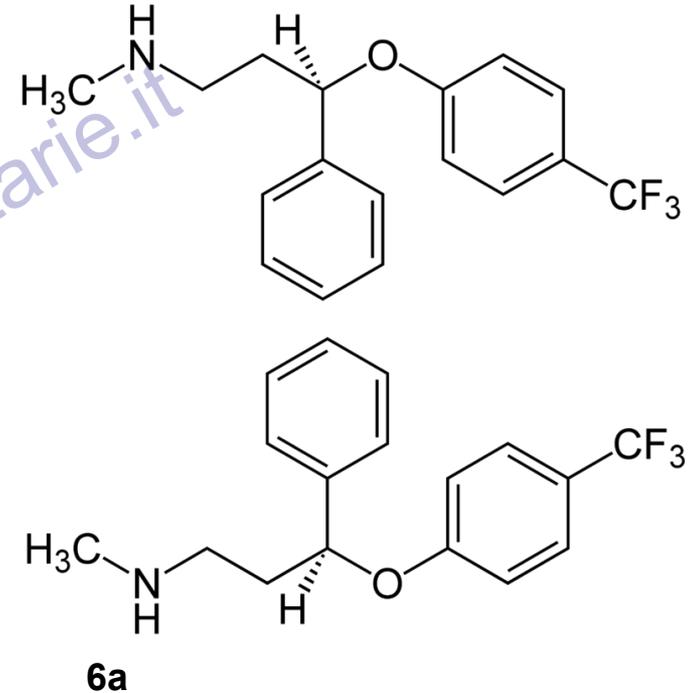


La scoperta della penicillina da parte di A. Fleming fu un evento casuale ma passarono molti anni prima che venisse riconosciuta come il farmaco del miracolo

Drug discovery

L'immagine della slide precedente è dedicata alla penicillina, l'antibiotico che rivoluzionò la terapia delle malattie infettive di origine batterica.

Di lato viene riprodotta la formula di struttura dei due enantiomeri della fluoxetina.



Drug discovery

La fluoxetina, nota commercialmente come *Prozac*, è un farmaco antidepressivo scoperto casualmente dal farmacologo David Wong nel 1976. Rientra nella categoria degli inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina e viene prescritta nella terapia della depressione maggiore, dei disturbi ossessivo compulsivi, degli attacchi di panico, della bulimia ...



Drug discovery

Parlare del Prozac è l'occasione giusta per evidenziare il fenomeno off-label. Infatti il farmaco, nel tempo, si è dimostrato efficace in altre patologie come l'eiaculazione precoce. Quindi i medici lo prescrivono anche per indicazioni diverse da quelle che compaiono nel “bugiardino” e per cui il farmaco ha ottenuto l'autorizzazione alla vendita.

La fortuita scoperta di farmaci come di qualsiasi altra cosa trovata mentre se ne sta cercando un'altra si chiama [serendipità](#) o serendipity.

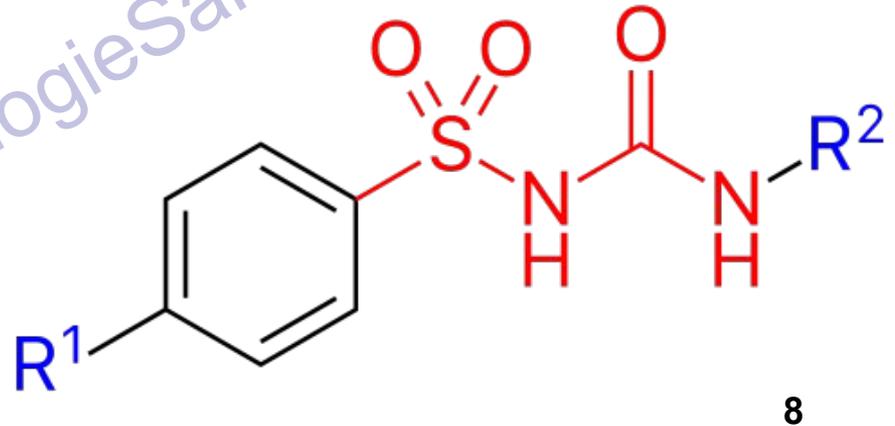
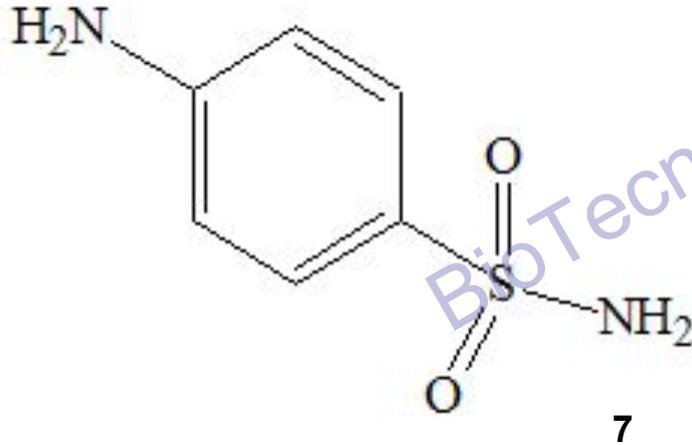
Drug discovery

In qualche caso è stato utile ed è ancora utile la conoscenza di un farmaco già in commercio di cui sono stati studiati attentamente gli effetti collaterali.

È il caso delle **sulfaniluree**, ipoglicemizzanti orali, che sono state create a partire dai sulfamidici dopo che era stato osservato come i pazienti diabetici a cui venivano somministrati evidenziassero un calo glicemico interessante.

Drug discovery

Da notare la somiglianza tra la solfanillamide (sulfamidico sulla sinistra) e le sulfoniluree (sulla destra)



Drug discovery

In tutto questo primo periodo gli studi farmacologici partivano da erbe e sostanze naturali in uso fin dai secoli passati.

Quindi il primo obiettivo è stato isolare e purificare i principi attivi e produrre molecole analoghe attraverso la sintesi chimica. È la storia di successi e insuccessi. Molti tentativi all'inizio sono stati infruttuosi. Ma nel tempo, in questo modo, si sono ottenuti migliaia di omologhi.



**IL BERSAGLIO
FARMACOLOGICO**

bioTechnologieSanitarie.

Drug discovery

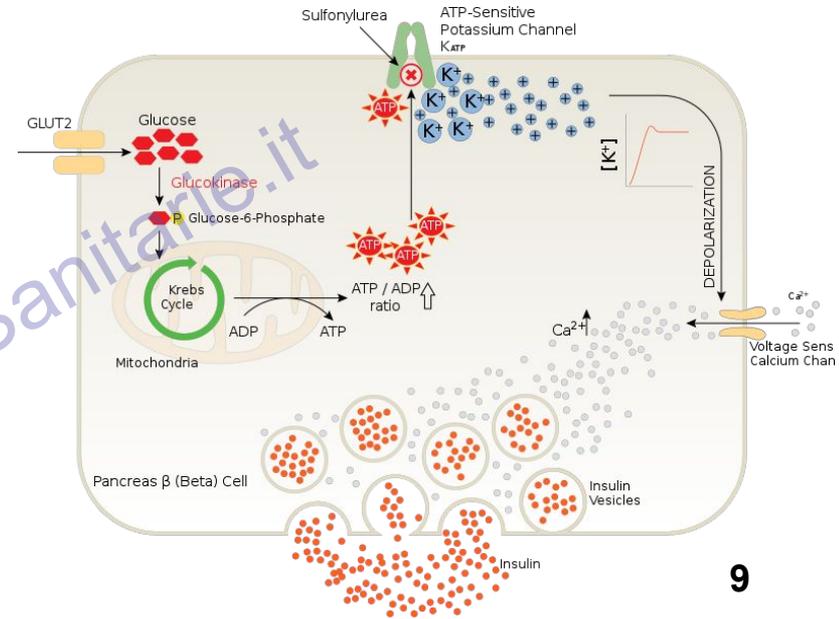
Nel tempo le conoscenze anatomiche e fisiologiche sono aumentate. La ricerca farmacologica ha preso più correttamente il nome di drug discovery e si parte ormai dalla malattia.

Una volta stabilita la malattia su cui lavorare a scopo terapeutico, diventa necessario determinare un bersaglio farmacologico.

Il bersaglio farmacologico è così il target su cui orientare tutti gli sforzi sia di natura economica che di energie umane. E non solo umane. Tra poco vedremo perché. Il bersaglio farmacologico può essere un processo metabolico o una singola molecola.

Drug discovery

Per esempio nel caso del **diabete** se l'intento è quello di aumentare la produzione di insulina si dovrà incidere sul processo biologico che porta alla liberazione in circolo di questo ormone sempre che sia prodotto e segregato nelle vescicole citoplasmatiche delle cellule β del pancreas (sulfaniluree).



9

Il farmaco blocca i canali del potassio, causando la depolarizzazione della membrana plasmatica che fa attivare i canali ionici del calcio. L'ingresso del calcio nella cellula fa liberare l'insulina verso l'esterno.

Drug discovery

Ma il bersaglio farmacologico potrebbe anche non essere l'ormone o la ghiandola endocrina che lo produce cioè il pancreas.

Per esempio si può incidere sulla gluconeogenesi, cioè la trasformazione di altre sostanze in glucosio che avviene ad esempio nel fegato e contribuisce ad aumentare il glucosio circolante. I biguanidi sono stati creati con questo obiettivo.

Drug discovery

Un altro punto su cui si può intervenire nel complesso metabolismo del glucosio è la digestione, ritardando l'assorbimento degli zuccheri.

Gli inibitori delle α -glucosidasi intestinali svolgono un ottimo compito in questo caso.

Oppure l'esigenza è somministrare l'insulina; in questo caso si è studiato un sostituto dell'ormone umano. In aiuto della ricerca è intervenuta la tecnologia del DNA ricombinante. Oggi l'insulina è un farmaco biotecnologico prodotto da un batterio ingegnerizzato a cui è stato aggiunto il gene umano per l'insulina.

Drug discovery

Il **bersaglio farmacologico** nel tempo è stato, quindi, selezionato con sempre maggiore precisione, soprattutto con l'avanzamento degli studi di genetica, del genoma umano e del proteoma. Se è nota la disfunzione responsabile della malattia (ad esempio eccesso o limitata produzione di una sostanza ... soprattutto proteine) e si conosce la via metabolica con precisione si può agire su quella che ormai si chiama **macromolecola bersaglio**. Può essere un enzima, un recettore di membrana, un canale ionico. I nuovi farmaci possono mirare per esempio all'individuazione di un nuovo inibitore enzimatico.

Drug discovery

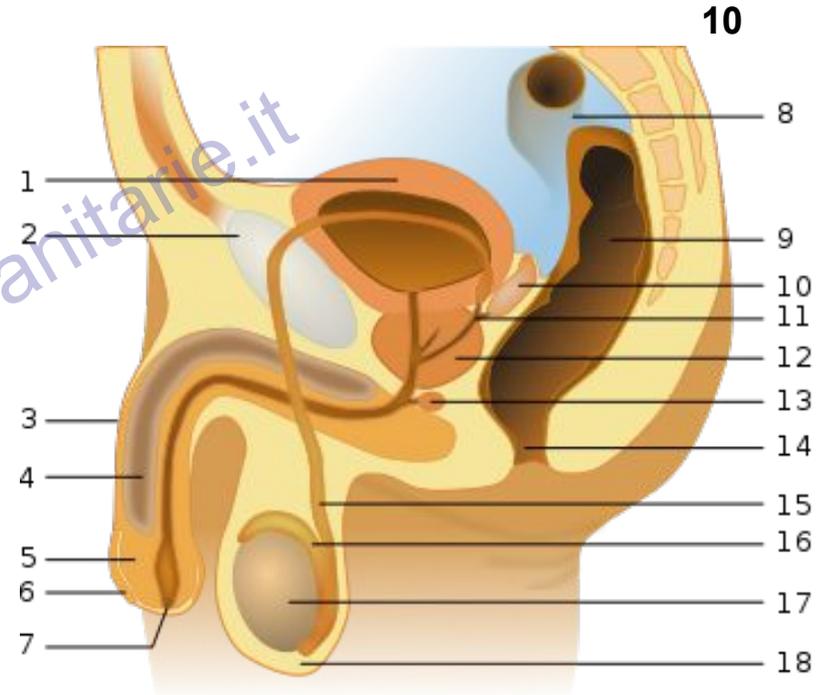
Un inibitore enzimatico può causare la morte selettiva di un microrganismo oppure correggere uno sbilanciamento metabolico. Per questi motivi molti farmaci nuovi sono molecole di questo tipo.

Per individuarli si parte dalla **struttura tridimensionale del sito attivo enzimatico** andando alla ricerca di potenziali candidati che possano adattarsi ad esso e funzionare da inibitori.

Tra i farmaci individuati in questo modo va ricordato il **Viagra**. 27

Drug discovery

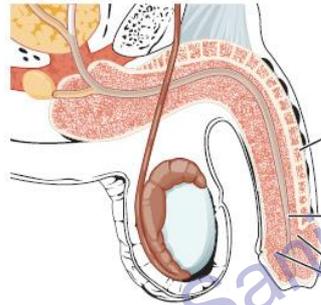
Il **Viagra** è uno dei tanti farmaci utilizzati nei casi di *disfunzione erettile*. L'*erezione del pene* avviene grazie all'aumento del flusso arterioso nei corpi cavernosi (4). Questi tendono ad inturgidirsi per la guaina fibrosa che li avvolge (albuginea). In questo modo si comprimono le vene riducendo il deflusso.



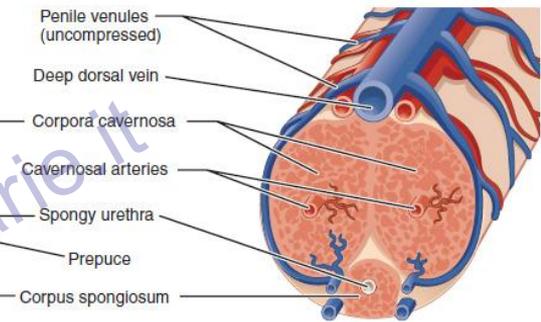
Drug discovery

L'immagine mostra la vista di lato e trasversale del pene a riposo e in erezione ed evidenzia come l'afflusso di sangue arterioso comprime le vene e quindi diminuisca il deflusso.

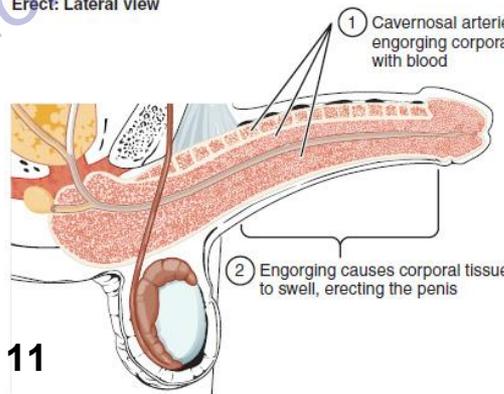
Flaccid: Lateral view



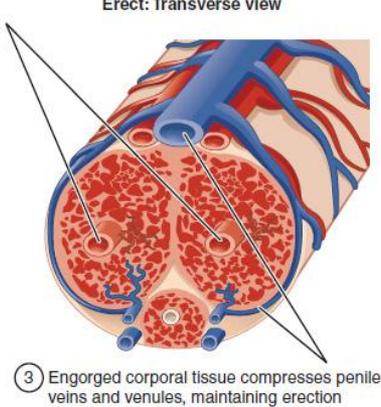
Flaccid: Transverse view



Erect: Lateral view



Erect: Transverse view



Drug discovery

L'intero processo che provoca l'inturgidimento e l'aumento delle dimensioni del pene è sotto controllo neurologico, psicologico, ormonale e vascolare. E, ovviamente, non dobbiamo dimenticare i controlli molecolari.

Infatti per capire meglio il meccanismo d'azione della molecola di **sildenafil**, più nota con il nome commerciale di Viagra, dobbiamo entrare nei dettagli di quanto già esposto nella slide precedente. L'afflusso di sangue arterioso nei corpi cavernosi è legato prima al rilassamento della sua muscolatura liscia a cui segue la vasodilatazione arteriosa. Il fenomeno è mediato dal monossido di azoto (NO).

Drug discovery

Il monossido di azoto attiva l'enzima guanilato ciclasasi che a sua volta catalizza la trasformazione della guanosina trifosfato (GTP) in guanosina monofosfato ciclica (cGMP).

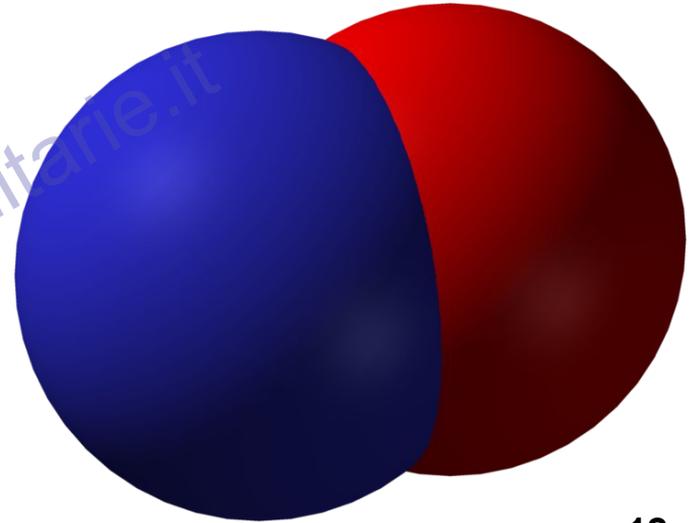
È la guanosina monofosfato ciclica la vera responsabile del rilassamento della muscolatura liscia dei corpi cavernosi.

Ma anche questa spiegazione non ci porta a capire quale sia la farmacodinamica del **sildenafil**.

Facciamo ancora un passo indietro e cerchiamo di capire meglio. Incominciamo da tutti i protagonisti.

Drug discovery

Il **monossido di azoto** è presente in tutti gli organismi viventi. Passa facilmente attraverso la membrana cellulare degli eucarioti date le dimensioni e l'assenza di cariche. Svolge numerose funzioni nell'organismo umano tra cui la vasodilatazione, agendo sulla muscolatura liscia dei vasi sanguigni.



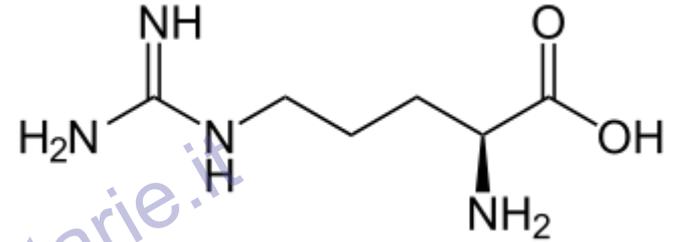
12

Monossido di azoto: struttura 3D

Drug discovery

Il monossido di azoto è prodotto a partire dall'arginina.

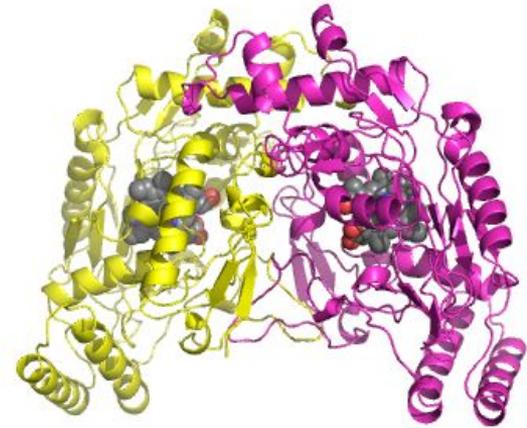
L'arginina è un amminoacido che per i bambini è essenziale e quindi deve essere introdotto con l'alimentazione mentre gli adulti la ricavano dal metabolismo dell'urea. L'enzima che interviene in questa fase è la NO sintasi



Arginina: formula di struttura

13

14

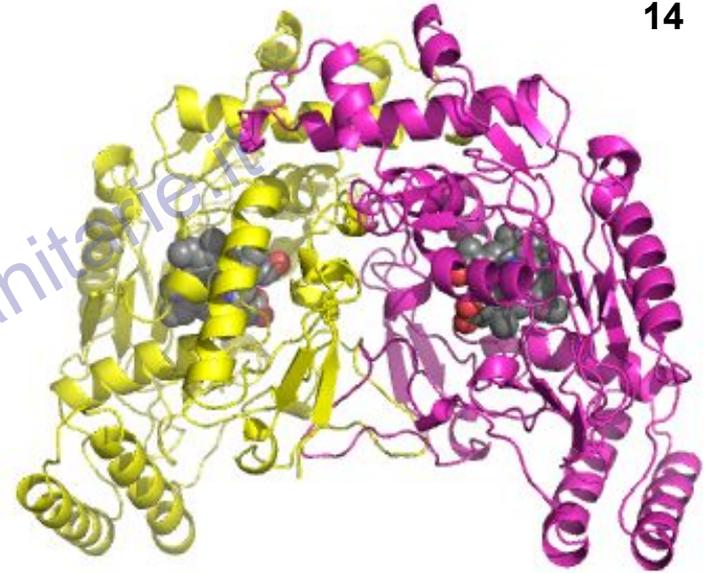


NO sintasi: struttura tridimensionale

33

Drug discovery

La **NO sintasi** o monossido nitrico sintetasi è un enzima presente in due isoforme: inducibile e costitutiva. La seconda è localizzata nell'endotelio dei capillari e nel cervello. La prima nei macrofagi e viene attivata durante l'infiammazione ma anche nella lotta ai batteri.

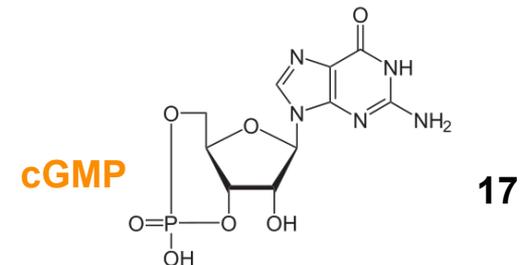
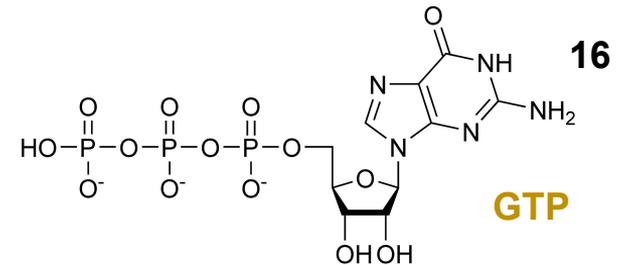
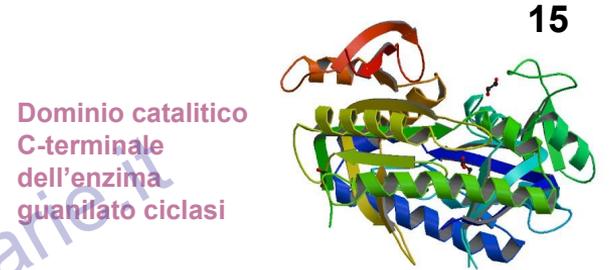


14

NO sintasi: struttura tridimensionale

Drug discovery

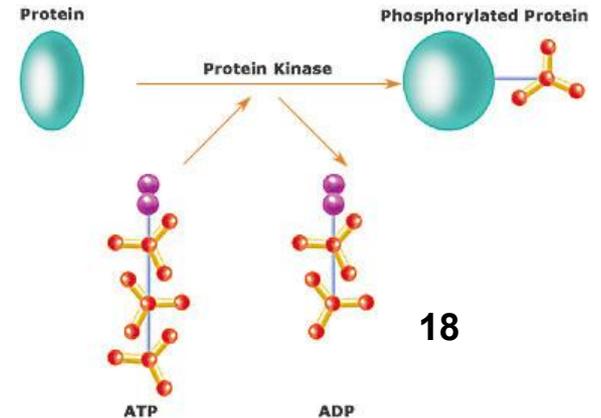
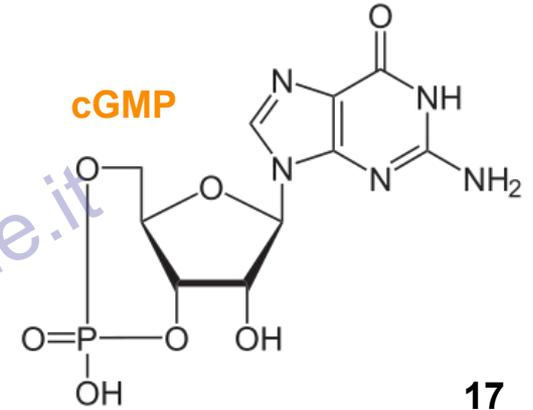
Il monossido di azoto è un neurotrasmettitore ed agisce direttamente sull'enzima **guanilato ciclasi**. La funzione di questo enzima è di amplificare un messaggio. Lo mette in atto catalizzando la trasformazione della **GTP** (guanosina trifosfato) in **cGMP** (guanosina monofosfato ciclica) come risposta al monossido di azoto.



Drug discovery

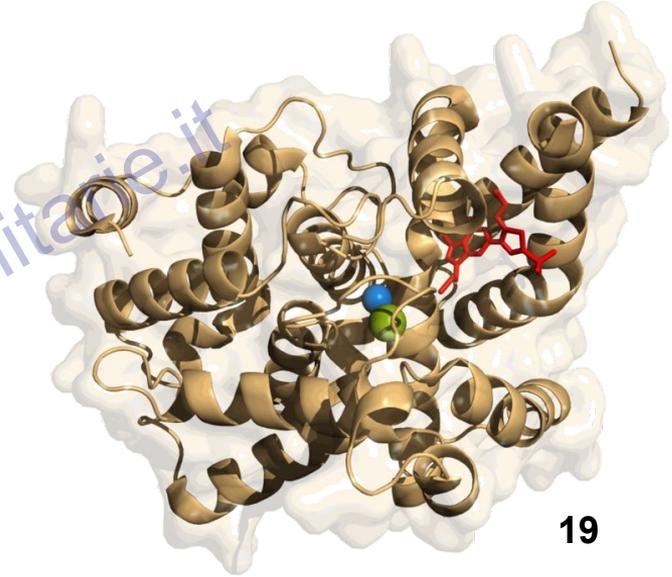
La **cGMP** (guanosina monofosfato ciclica) è il secondo messaggero ed attiva le protein-chinasi.

Le protein-chinasi aggiungono un gruppo fosfato ad altre proteine (immagine 18). In questo caso agiscono su proteine contrattili che si riorganizzano e modificano la loro sensibilità agli ioni calcio. In pratica alla cGMP si deve la vasodilatazione e quindi l'erezione.



Drug discovery

La cGMP viene poi degradata grazie ad una fosfodiesterasi di cui si conoscono 6 isoenzimi. Quella che agisce in questo caso, nei corpi cavernosi, è la **fosfodiesterasi 5** (5PDE). Il sildenafil agisce inibendo la 5PDE. Quindi la concentrazione di cGMP si mantiene alta e l'erezione migliora.

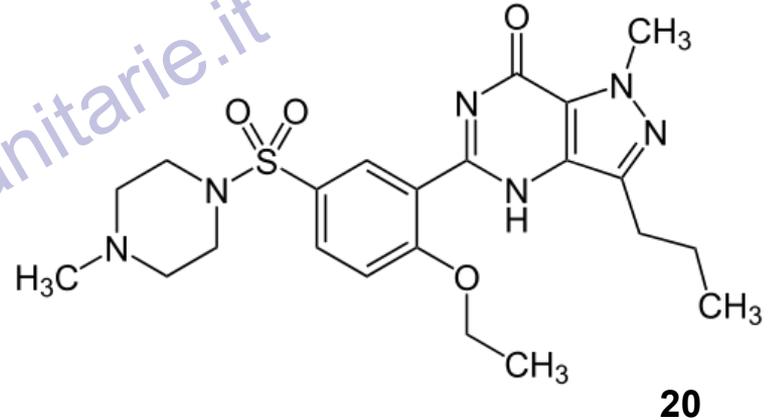


5PDE - in blu lo ione zinco, in verde lo ione magnesio, in rosso il composto inibitore

Drug discovery

Alle dosi raccomandate la molecola di sildenafil agisce solo dietro impulso sessuale.

La molecola è stata brevettata dalla Pfizer nel 1996 e nel 1998 ha ottenuto l'autorizzazione alla commercializzazione da parte della FDA (Food and Drug Administration) che è l'ente preposto per l'approvazione in USA.



Sildenafil - nome commerciale
Viagra

Drug discovery

In Italia il brevetto è scaduto nel 2013 e da quel momento sono in commercio gli equivalenti del Viagra.

Fin dall'inizio della sua commercializzazione il Viagra è stato oggetto di molte polemiche a causa di una campagna pubblicitaria che evidenziava la disfunzione erettile come un problema grave e diffuso ma che poteva essere guarito.

Questo atteggiamento rientra in quello che si chiama “**disease mongering**”, cioè la mercificazione della malattia.

Drug discovery

Non bisogna credere che ci sia sempre un interesse reale delle aziende farmaceutiche a sensibilizzare l'opinione pubblica verso una patologia e la sua terapia e di amplificare la situazione con il solo scopo di vendere un prodotto. Altrimenti dovremmo dare ragione ai "No Vax" che sono convinti dell'inutilità delle vaccinazioni.

Esistono però dei casi reali e documentati in cui il mercato è stato manipolato. Ma da questo a dire che è la prassi c'è una bella differenza.

Drug discovery

Altro argomento legato al Viagra è la storia di come è stato scoperto e la sua ulteriore utilizzazione.

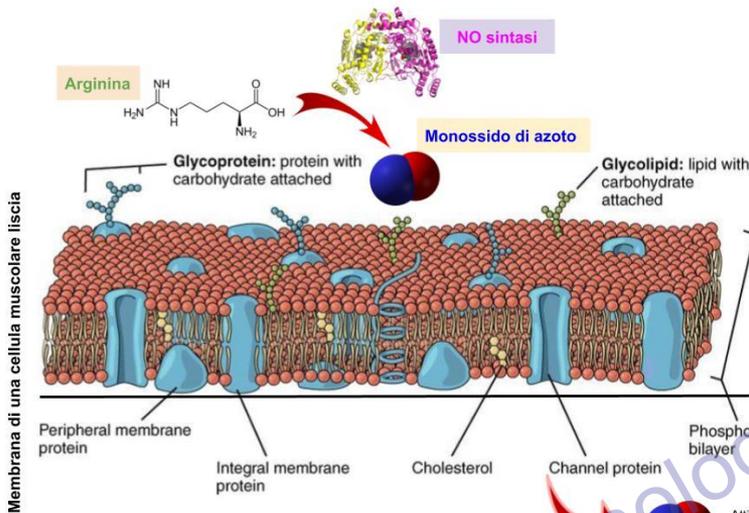
All'inizio era stato pensato per curare l'*angina pectoris* (dolore al torace, detto anche retrosternale, dovuto ad una transitoria scarsa ossigenazione del muscolo cardiaco per diminuito afflusso di sangue attraverso le coronarie). Durante i test clinici però risultò poco efficace ma catturò l'interesse dei ricercatori per il suo effetto collaterale sul miglioramento dell'erezione del pene.

Drug discovery

Attualmente è stato approvato dalla FDA e dalla Agenzia Europea per i Medicinali (EMA) per il trattamento della ipertensione polmonare. Quindi il farmaco ha due diverse indicazioni terapeutiche anche se il suo uso più comune rimane quello della disfunzione erettile che purtroppo vede anche molte decisioni “fai-da-te” al di fuori del parere medico con conseguenze a volte molto serie. Basti pensare all’associazione del viagra o di farmaci equivalenti facilmente recuperabili in Rete, con alcol o droghe.

Torniamo alla farmacodinamica del Viagra con una scheda.

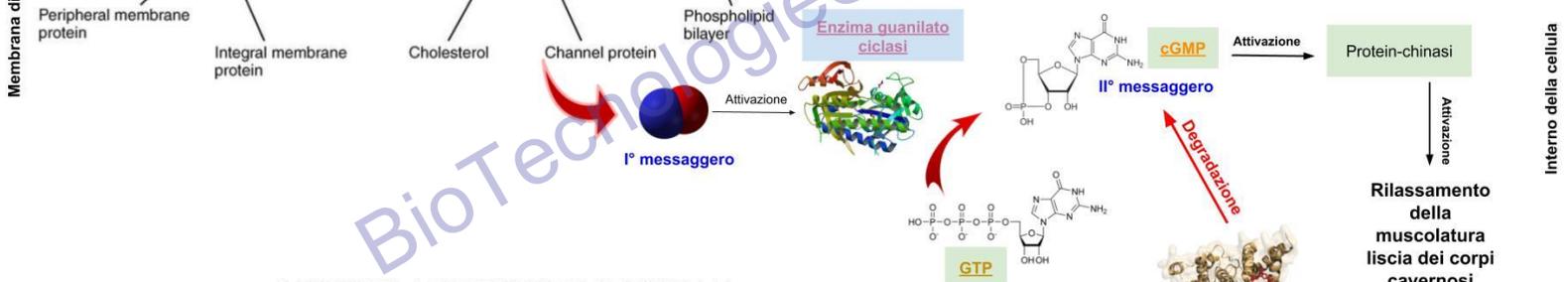
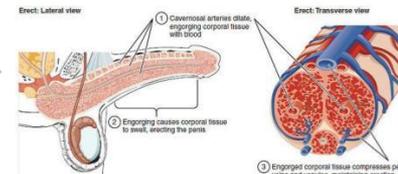
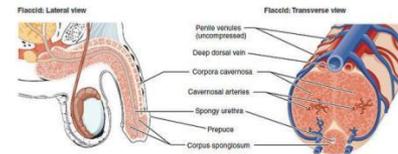
LA FARMACODINAMICA DEL VIAGRA



L'erezione del pene è dovuta al rilassamento della muscolatura liscia dei corpi cavernosi che si traduce nella vasodilatazione arteriosa.

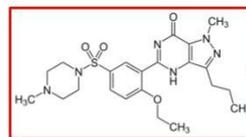
Il fenomeno è mediato dal monossido di azoto (NO), un neurotrasmettitore.

I corpi cavernosi tendono ad inturgidirsi per la guaina fibrosa che li avvolge (albuginea). In questo modo si comprimono le vene riducendo il deflusso.



IL SILDENAFIL AGISCE INIBENDO L'AZIONE DELLA 5 FOSFODIESTERASI. IN QUESTO MODO PERDURA IL RILASSAMENTO DELLA MUSCOLATURA LISCIA DEI CORPI CAVERNOSI E L'EREZIONE MIGLIORA.

V
I
A
G
R
A



Drug discovery

Chiudiamo l'argomento Viagra con i punti essenziali della sua farmacocinetica.

Viene assunto per via orale e assorbito per via intestinale. Il che significa che prima di essere disponibile viene intercettato dal fegato. Le reazioni di detossificazione portano la sua biodisponibilità al 40%. Ma la notizia positiva è che un suo metabolita intermedio mantiene ancora la capacità di inibire la 5-fosfodiesterasi.

Drug discovery

La sua concentrazione ematica massima si registra dopo un'ora e risulta per lo più legato alle proteine plasmatiche per il 95%.

L'emivita del farmaco è di circa 3 ore e mezzo.

In genere viene eliminato attraverso la bile e le feci e in minima parte con l'urina.

Bisogna prestare particolare attenzione ai numerosi effetti collaterali a carico di vari organi.

Drug discovery

Siamo approdati all'analisi del Viagra grazie ad uno dei metodi per la ricerca di nuovi principi attivi, cioè l'inibizione enzimatica.

Sempre a proposito di inibizione ma questa volta legata alla sintesi proteica devono essere ricordati gli **oligonucleotidi**. Si tratta di sequenze di 20 - 30 basi azotate di DNA monocatenario corrispondenti ad una specifica sequenza genica o di RNA messaggero.

Drug discovery

Gli oligonucleotidi sono in grado di riconoscerla ed impedire la sintesi proteica.

Presentano lati positivi e lati negativi.

Infatti da un lato sono facili da sintetizzare purché si conosca la sequenza.

Però sono poco efficaci per il momento e presentano diversi problemi nella somministrazione.

D'altra parte si tratta di molecole ancora ampiamente da studiare e sperimentare.

HIT TO LEAD

BioTecnologie Sanitarie.

Drug discovery

Nelle slide precedenti, specificando in che cosa consiste il bersaglio farmacologico, sono stati presentati alcuni principi attivi dei relativi farmaci; ma il passaggio dal target alla ideazione e sperimentazione della nuova molecola è molto lungo e passa attraverso la scelta di **composti guida** (**Lead Compounds**) che sono preceduti da **Hit Compounds**, cioè una serie di candidati che sono piccole molecole da testare sotto molteplici punti di vista.

Ma procediamo con ordine.

Drug discovery

A partire dal secolo passato le aziende farmaceutiche e i centri di ricerca hanno accumulato centinaia di migliaia se non addirittura milioni di sostanze ottenute da studi di diverso tipo. Queste sostanze attualmente vengono immagazzinate in poco spazio attraverso un processo di miniaturizzazione.

Sono sempre state un ottimo “tesoretto” da cui partire alla ricerca di Hit Compounds con tecniche di screening. Ma c'è anche da sottolineare che recuperare sostanze farmacologicamente giuste poteva e può essere considerato un evento fortunato.

Drug discovery

Attualmente questo “tesoretto” è incrementato dalla **chimica combinatoriale** che si occupa della sintesi rapida e della simulazione al computer di un gran numero di molecole organiche accomunate da un’analogia strutturale.

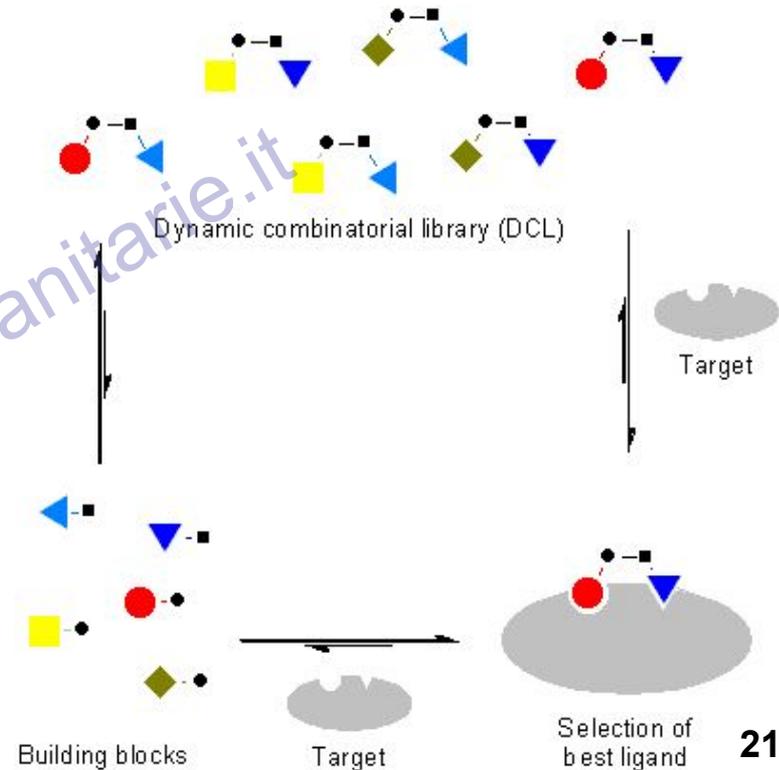
Durante la fase di ricerca di un farmaco si può individuare una molecola che promette bene ma che da sola non è sufficiente a garantire il successo sia clinico che commerciale.

Si procede allora a preparare con metodi moderni tutte le possibili sostanze che pur mantenendo l’analogia strutturale con il nucleo fondamentale ne differiscono per i sostituenti collegati.

Drug discovery

Chimica combinatoriale In questo modo si possono creare delle vere e proprie librerie che possono essere “consultate” quando ce n'è bisogno.

Si tratta comunque sempre di piccole molecole o peptidi che in pratica possono essere milioni di composti. Ci sono poi anche le librerie virtuali che contengono elenchi computerizzati che possono essere trasformati in vere molecole.



Drug discovery

Chimica combinatoriale

Il seguente video realizzato dallo studente Alex Togni del liceo di Bellinzona nell'ambito del Lavoro di Maturità interdisciplinare di Chimica e Arti Visive dei docenti Giuseppe Laffranchi e Lucia Peduzzi-Bordoni approfondisce l'argomento.



Drug discovery

Chimica combinatoriale

Questo video invece, girato nello stabilimento della Glaxo, presenta un quadro completo nello sviluppo di un nuovo farmaco con le tecniche moderne ed evidenzia il ruolo giocato dalla chimica combinatoriale nei primissimi stadi della drug discovery.



Drug discovery

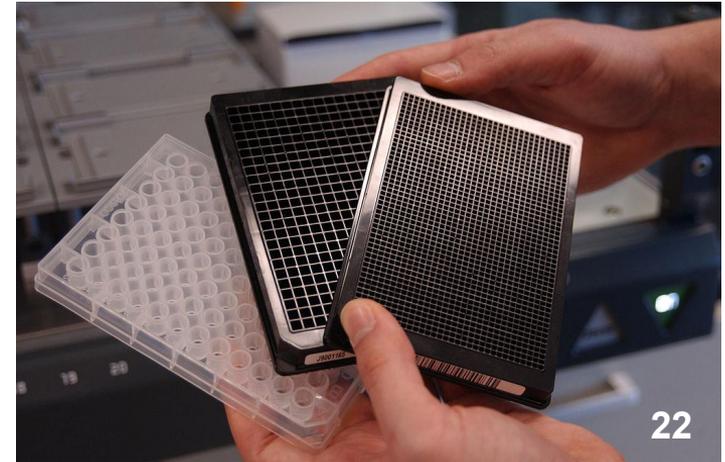
Al giorno d'oggi il “tesoretto” rimane e, come abbiamo visto, si è anche ampliato grazie alla chimica combinatoriale. Inoltre la tecnologia ci dà una mano. Ormai si adotta uno **screening ad alto rendimento** (HTS - High Throughput Screening) che si avvale di un sistema completamente automatizzato. Si tratta di un metodo per la sperimentazione scientifica che, usando robotica, software di elaborazione dati, dispositivi per la manipolazione di liquidi e rilevatori sensibili, consente di condurre rapidamente milioni di test chimici, genetici o farmacologici.

Siamo sempre nelle prime fasi della drug discovery.

Drug discovery

Il cuore di questo metodo sono le piastre di microtitolazione che abbiamo visto nel video girato alla Glaxo. Nelle mani dell'operatore se ne vedono alcune a 96, 384 e 1536 pozzetti. Ma ce ne sono anche da 3456 pozzetti e oltre.

Ognuno di quei pozzetti rappresenta la classica provetta o il vetrino da microscopio, a seconda del tipo di test che si vuole fare. In questo modo si possono realizzare test biochimici o su cellule vive.



Drug discovery

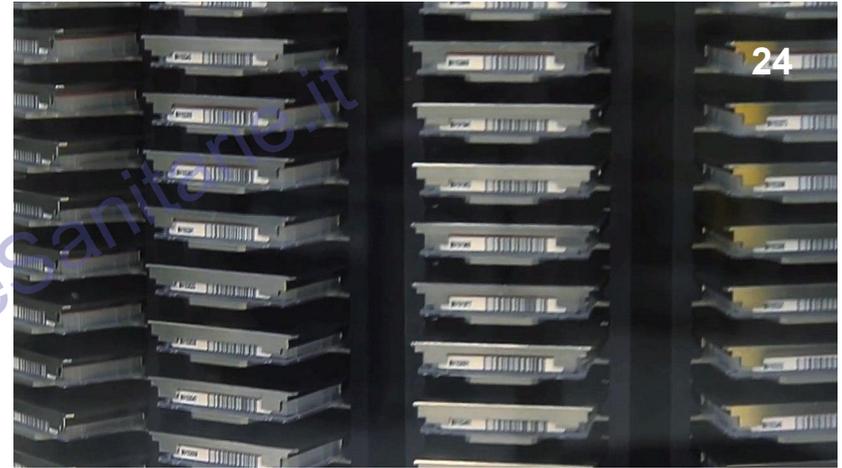
La maggior parte dei pozzetti contiene le sostanze necessarie per i test.

Gli altri pozzetti possono essere vuoti o contenere solvente puro o campioni non trattati destinati all'uso come controlli.



Drug discovery

Un impianto destinato a questa tipologia di screening contiene tipicamente una libreria di piastre di stoccaggio, i cui contenuti sono attentamente catalogati. Ognuna di queste piastre può essere stata creata dal laboratorio o ottenuta da una fonte commerciale.



Un sistema a carosello per immagazzinare piastre da microtitolazione. Sistema ad elevata capacità di stoccaggio e di facile accesso

Drug discovery

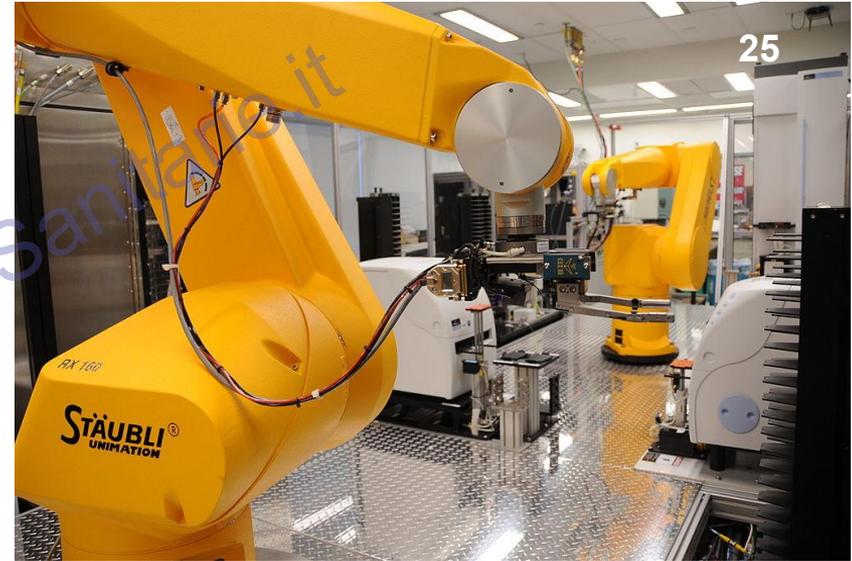
Le piastre di stoccaggio non sono direttamente utilizzate negli esperimenti; infatti le piastre per un test vengono create secondo necessità.

Una piastra da utilizzare nell'analisi programmata è semplicemente una copia di una piastra di stoccaggio, creata pipettando una piccola quantità di liquido (spesso misurata in nanolitri) dai pozzetti di una piastra dello stock ai corrispondenti pozzetti di una piastra completamente vuota.

Drug discovery

Tutta la sequenza delle operazioni successive è automatizzata. La gestione avviene attraverso la programmazione di software specifici.

Di lato un tipico robot destinato al processo High Throughput Screening.



Drug discovery

Cominciamo a vedere una piccola dimostrazione: un robot in azione.

Il video è stato pubblicato nel 2013 dalla fondazione APBDRF (Adult Polyglucosan Body Disease Research Foundation)



Drug discovery

Per un ulteriore approfondimento ecco un video tutorial girato presso l'università Abu Dhabi di New York.



Drug discovery

Un altro video per capire sempre meglio in che cosa consiste questo metodo. È stato girato al Vanderbilt Institute of Chemical Biology e mostra tutte le opportunità di un sistema automatizzato quando si è alle prese con un numero elevato di test di natura diversa.



Drug discovery

Ricapitolando, la chimica combinatoriale produce rapidamente un gran numero di composti che vanno ad arricchire le librerie. Il metodo HTS è in grado di monitorare molto più velocemente di uno o più operatori umani questi composti alla ricerca delle molecole giuste per gli scopi prefissati.

Gli Hit Compounds, da cui si parte come molecole promettenti, vengono selezionati per arrivare ai Lead Compounds.

Drug discovery

Gli **Hit Compounds**, da cui si parte come molecole promettenti, devono avere caratteristiche e funzionalità ben precise.

- Purezza elevata
- Originalità, cioè non essere mai stati già utilizzati per altri impieghi
- Alta specificità per la molecola bersaglio

Drug discovery

Inoltre gli **Hit Compounds** devono garantire la riproducibilità nei test in vitro con cui si comincia a studiarli (evidenziati in diversi passaggi dei video precedenti).

Quindi vengono attentamente selezionati.

Sono scelti solo quelli più potenti e meno tossici per arrivare ai Lead Compounds.

Vediamo nel dettaglio quali sono altri parametri della selezione.

Drug discovery

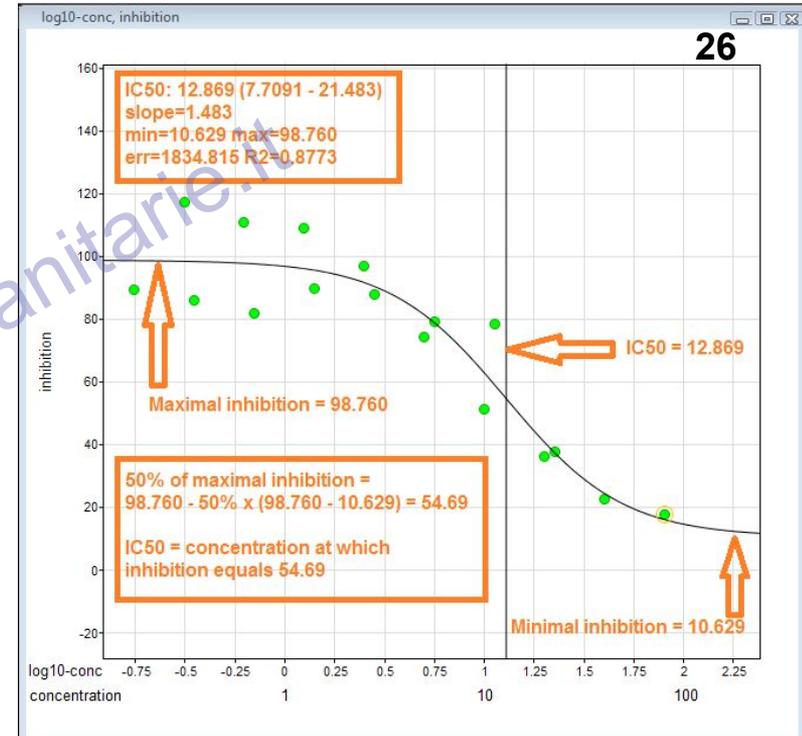
Test di conferma

I composti che sono stati trovati attivi contro il bersaglio selezionato vengono esaminati di nuovo utilizzando le stesse condizioni di analisi sfruttate durante l'HTS per assicurarsi che l'attività sia riproducibile

Drug discovery

Curva dose-risposta. Vengono valutati l'IC50 e l'EC50.

L'IC50 è la concentrazione inibente, cioè la concentrazione alla quale viene inibito il 50% del bersaglio (recettore, enzima, microorganismo ...)

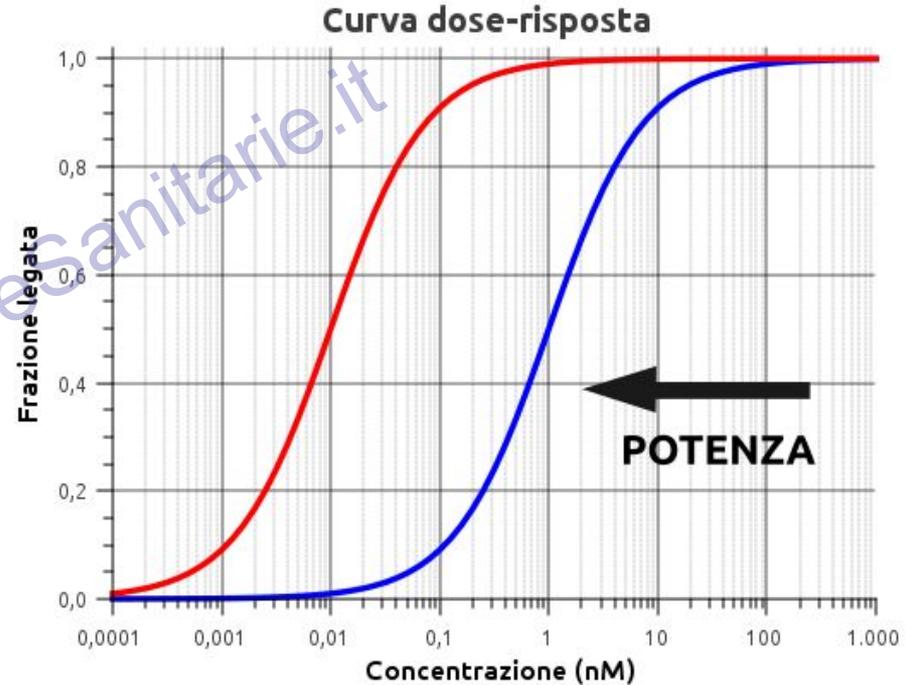


Drug discovery

27

Curva dose-risposta.

L'EC50 è invece la concentrazione in cui dimostra il 50% della sua efficacia, vale a dire la sua potenza.



Drug discovery

Test diversificati

Gli hit confermati vengono ulteriormente testati in condizioni fisiologiche vicine al bersaglio o con tecnologie diverse.

Screening secondario

Gli hit confermati sono testati sulle cellule per determinare l'efficacia.

Drug discovery

Trattabilità di sintesi

I chimici valutano i composti in base alla fattibilità di sintesi e ad altri parametri come l'upscaling o il costo delle merci.

Test biofisici

Risonanza magnetica nucleare (NMR), calorimetria di titolazione isoterma (ITC), diffusione dinamica della luce (DLS), risonanza plasmonica di superficie (SPR), interferometria a doppia polarizzazione (DPI), termoforesi su microscala (MST) comunemente usata per valutare se il composto lega efficacemente il bersaglio, la cinetica, la termodinamica e la stechiometria del legame, qualsiasi cambiamento conformazionale associato ed escludere ogni legame promiscuo.

Drug discovery

Classificazione e raggruppamento

Gli hit confermati vengono quindi classificati in base al risultato dei vari esperimenti.

Libertà di operare la valutazione

Gli hit che hanno superato i test vengono controllati in database specializzati per determinare se sono brevettabili

Drug discovery

Successivamente gli hit confermati (il numero è già sceso vistosamente) vengono suddivisi in serie a seconda delle caratteristiche dimostrate nei test precedenti. Ogni serie deve possedere i seguenti requisiti:

- alta affinità verso l'obiettivo
- selettività contro altri bersagli
- efficacia significativa nei test su cellula
- “druglikeness”, concetto qualitativo che misura quanto la molecola è affine ad un farmaco in termini per esempio di biodisponibilità ...

Drug discovery

- capacità di legarsi all'albumina sierica umana, da bassa a moderata
- bassa interferenza con gli enzimi P450 e le P-glicoproteine
- bassa citotossicità
- stabilità metabolica
- alta permeabilità per la membrana cellulare
- solubilità in acqua
- stabilità chimica
- trattabilità di sintesi
- brevettabilità

Drug discovery

Il team impegnato nel progetto a questo punto seleziona solitamente da tre a sei serie di composti che dovranno essere ulteriormente indagate. Il passo successivo comporta il test di composti analoghi per determinare una relazione quantitativa struttura-attività (QSAR) di cui parleremo tra breve insieme alla SAR. Gli analoghi possono essere selezionati rapidamente da una libreria interna o acquistati da fonti disponibili in commercio ("SAR by catalog"). Possono essere creati composti analoghi usando la classica sintesi chimica, la chimica ad alto rendimento o la chimica combinatoriale.

Drug discovery

Ottimizzazione dei lead compound.

L'obiettivo di questa fase della drug discovery è quello di sintetizzare i lead compound, nuovi analoghi con potenza aumentata, attività off-target ridotte e proprietà fisico-chimiche e metaboliche che suggeriscono una ragionevole farmacocinetica in vivo. Questa ottimizzazione si ottiene attraverso la modifica chimica degli hit; le modifiche sono scelte utilizzando la conoscenza della relazione struttura-attività (SAR) e la progettazione basata sulla struttura se sono disponibili informazioni strutturali sull'obiettivo, ovviamente..

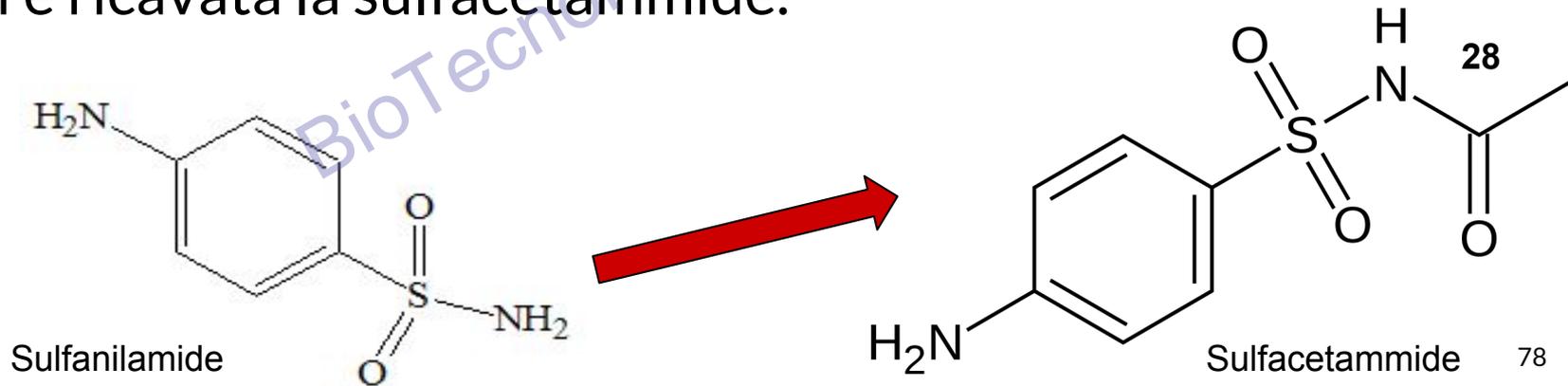
Drug discovery

È rimasta in sospeso la **SAR**; di che cosa si tratta? In inglese è **Structure-Activity Relationship**. In italiano significa **relazione struttura-attività**.

Facile intuire che si tratta della relazione tra la struttura tridimensionale di una molecola e la sua bioattività ovvero il suo effetto su un organismo vivente o un tessuto. Una volta individuato il gruppo o i gruppi chimici che provocano un effetto sul bersaglio, si possono tentare modifiche per variare tale effetto e la sua potenza.

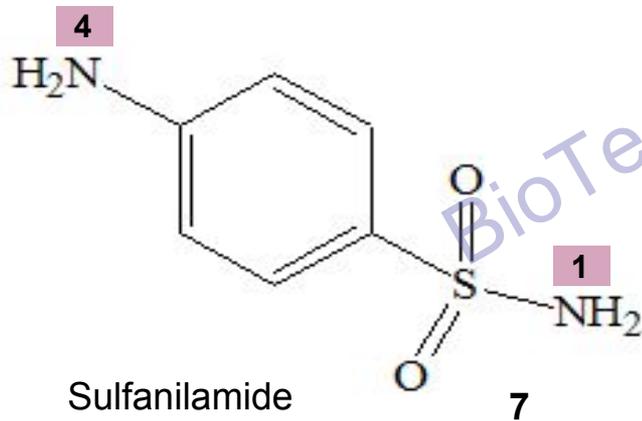
Drug discovery

Non solo, si possono anche inserire nuovi gruppi chimici attraverso processi di sintesi chimica e testare poi gli effetti di tali variazioni. Si può fare un esempio partendo da una molecola già conosciuta, la sulfanilamide o solfanilammide da cui si è ricavata la sulfacetammide.



Drug discovery

I passaggi che stiamo per esaminare sono ormai un percorso storico ma assolutamente utili per capire il metodo. In questo caso la sulfanilamide è già il lead compound su cui vengono attuati a livello di azoto 1 (solfonamidico) e azoto 4 (anilिनico) degli inserimenti.



Stiamo parlando di funzioni aciliche e alchiliche.

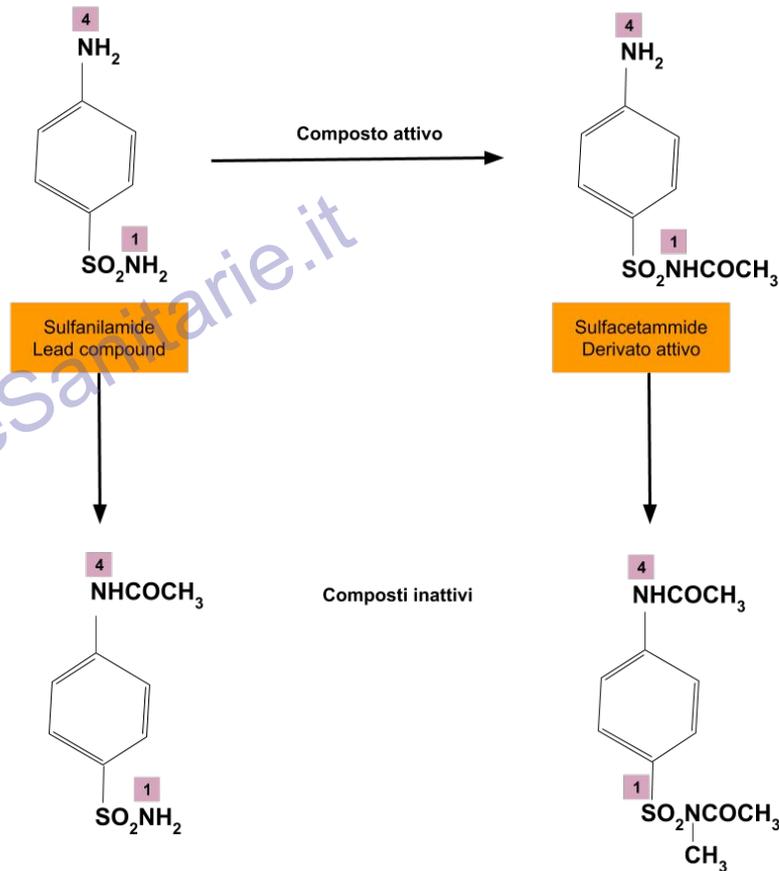
Lo step successivo è stato poi testare i derivati (le prime SAR) per verificare se avevano qualche funzionalità antibatterica. Cioè se erano attivi o inattivi.

Drug discovery

Per esempio si è dedotto che l'azoto 4 non "desidera" sostituenti. Mentre l'azoto 1 "accetta" sostituenti ma uno alla volta. In qualche caso sono risultati molto efficaci come la sulfacetammide.

-COCH₃ è il gruppo acetile.

Il composto inattivo sulla sinistra deriva dal precursore della sulfanilamide. Mentre la molecola inattiva sulla destra deriva dalla sulfacetammide.



Drug discovery

In un secondo tempo il metodo SAR è stato reso più preciso introducendo la relazione matematica tra la struttura chimica e la sua bioattività. Si è passati al **QSAR** (**Quantitative Structure-Activity Relationship**). In italiano **relazione quantitativa struttura-attività**. La relazione matematica tiene conto delle caratteristiche chimico-fisiche della molecola nonché della sua struttura. Queste proprietà influenzano sicuramente come abbiamo visto il passaggio attraverso la membrana cellulare, l'interazione con il recettore ...

Quindi i nuovi farmaci possono essere elaborati al computer con appositi software.

Drug discovery

Prima di chiudere il capitolo drug discovery vale la pena fare il punto della situazione a livello mondiale circa i nuovi farmaci.

Attualmente il numero di nuovi principi attivi è in rapida discesa, in tutto il mondo.

Contemporaneamente sono aumentati i costi (da 0,8 miliardi di dollari nel 2003 a 2,6 miliardi nel 2014) per farmaco.

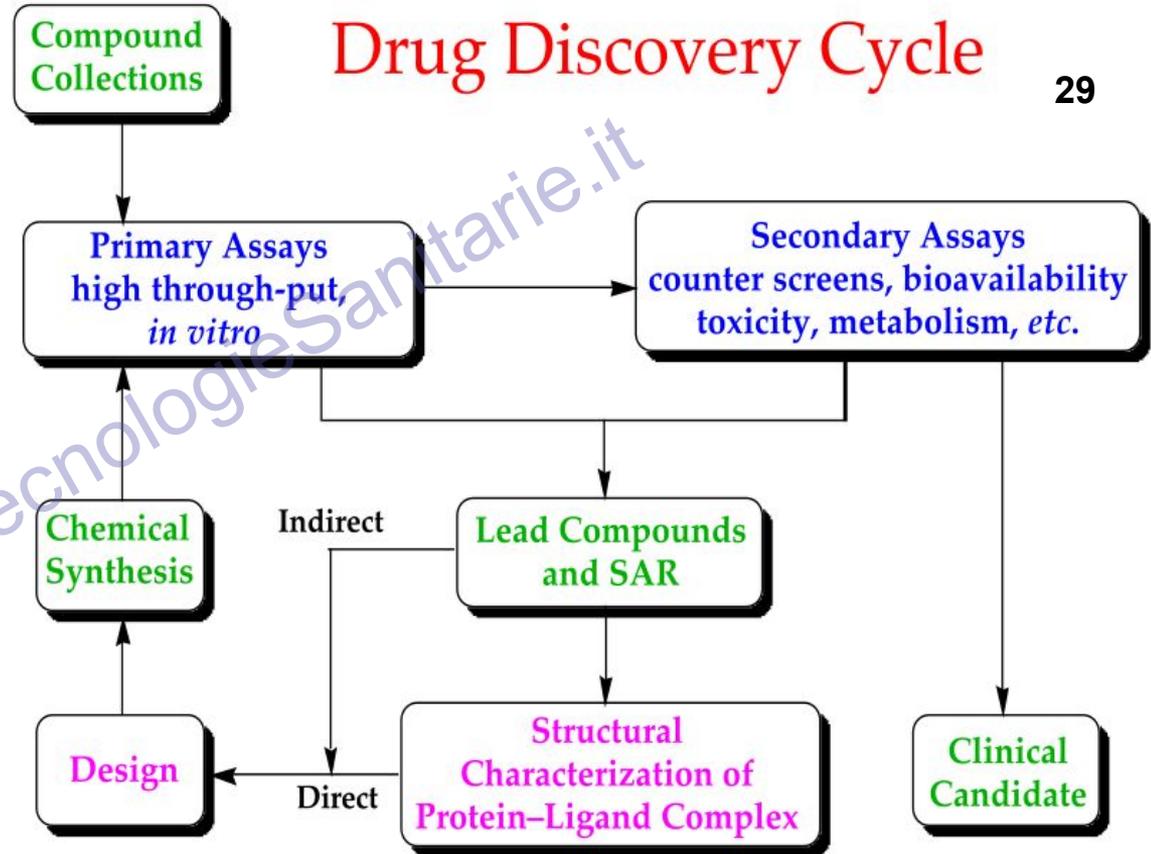
Drug discovery

Gli effetti indesiderati, la tossicità riscontrata, l'efficacia limitata riscontrati durante i test di fattibilità possono far abbandonare progetti di ricerca con danni economici sempre più evidenti. La gestione di numerosissime molecole fa lievitare i costi.

Per tutta questa serie di motivi, quindi, se il lead compound o i suoi analoghi non rispondono adeguatamente è preferibile bloccare il tutto ad uno stadio precoce. Il danno economico è sicuramente minore.

Drug discovery

Lo schema di lato ricapitola le principali metodiche utilizzate per arrivare ai candidati finali cioè le molecole destinate ad entrare nella fase preclinica e clinica.



Drug discovery

Un'ultima occhiata ad un tipico laboratorio dove vengono svolte le attività sperimentali esaminate. La foto è stata scattata il 16 novembre 2016 a San Pietroburgo - Russia. (High-Throughput Biotechnology Laboratory of BIOCAD)



RICERCA PRECLINICA

BioTechnologySanitarie.it

Ricerca preclinica

Anche in questa fase si assiste ad una scansione ben precisa di tappe.

Bisogna valutare diversi parametri: efficacia, potenza, profilo tossicologico, e inoltre modalità di somministrazione, assorbimento, distribuzione, metabolismo, escrezione (studi ADME).

E di conseguenza formulazione del farmaco a seconda dei risultati ottenuti. L'ADME (assorbimento, distribuzione, metabolismo, escrezione) è di grande importanza ai fini della formulazione.

Ricerca preclinica

In media solo uno ogni 5000 - 10.000 composti individuati nella drug discovery e che entrano in questa fase viene selezionato e solo 1 su 10 che entrerà nella fase degli studi clinici è destinato a diventare un farmaco.

La ricerca preclinica si basa su:

- ★ modelli teorici (in silico)
- ★ la sperimentazione in vitro
- ★ la sperimentazione in vivo

L'uno non esclude l'altro perché in realtà sono complementari. Vediamoli nei dettagli.

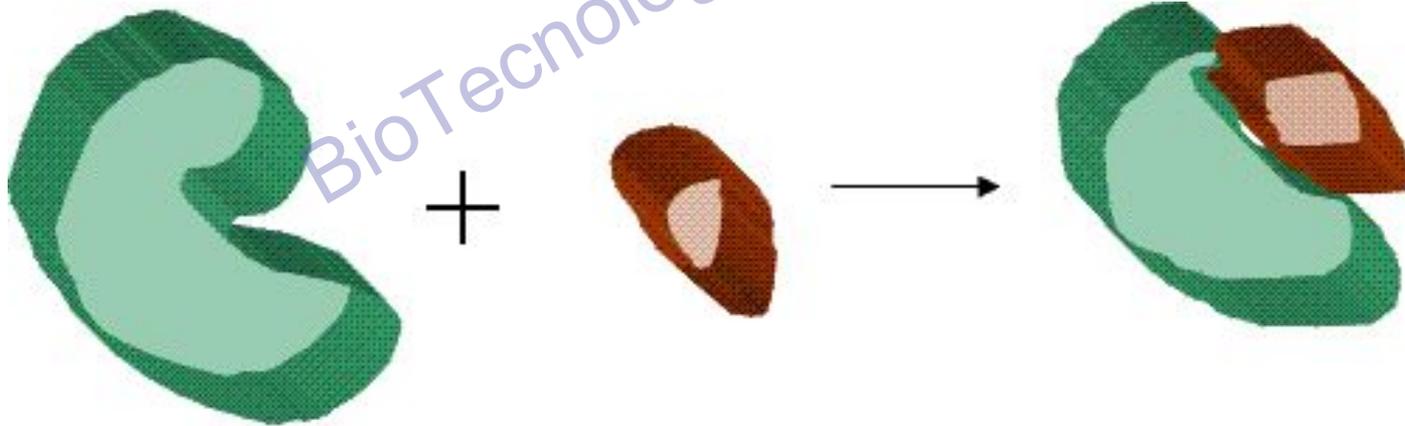
Ricerca preclinica

Il primo approccio è teorico. Il cosiddetto **modello in silico**. Intanto cosa vuol dire modello in-silico? si riferisce all'utilizzo del computer e dell'informatica, il cosiddetto *dry lab*. In Rete sono ormai disponibili banche dati a cui poter attingere. In ambito farmacologico sono interessanti per esempio le strutture tridimensionali delle proteine ottenute dopo cristallografia a raggi X. Questi modelli tridimensionali consentono di effettuare vari tipi di esperimenti di interazione molecolare sia dinamici che statici.

Ricerca preclinica

Modello in silico

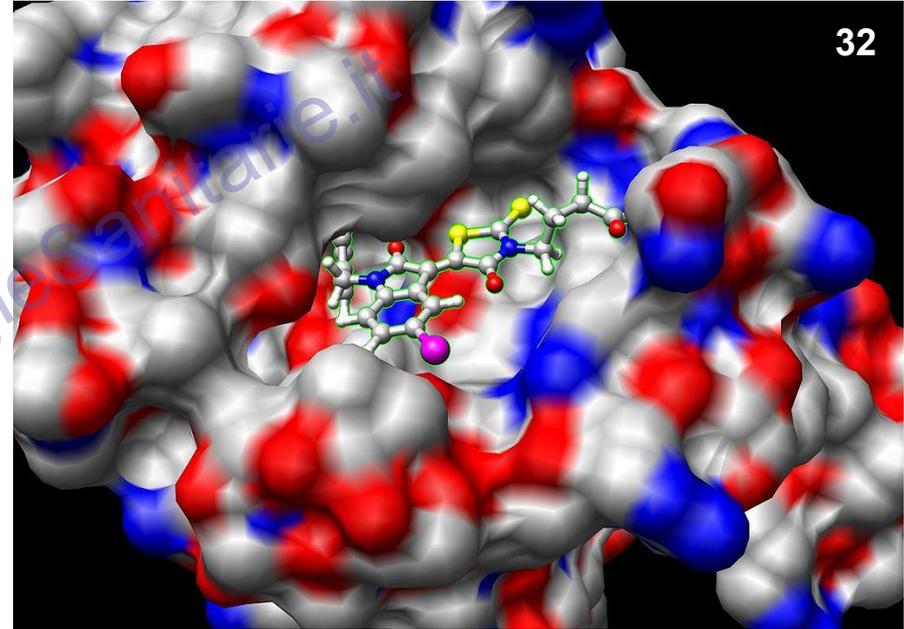
Stiamo parlando del **docking molecolare**. Nello schema viene riportato il docking di una piccola molecola ligando (marrone) ad una proteina recettore (verde) per produrre un complesso.



Ricerca preclinica

Modello in silico

Il docking molecolare consente di disegnare molecole organiche in grado di interagire con il sito attivo di un enzima ed è quindi possibile utilizzarlo nella nascita di un nuovo farmaco che ha come macromolecola bersaglio per esempio una proteina.



Piccola molecola legata ad una proteina dopo docking

Ricerca preclinica

Modello in silico

Nel 2010, ad esempio, alcuni ricercatori con questo metodo hanno sviluppato potenziali inibitori di un enzima associato all'attività del cancro. In seguito, il 50% delle molecole è risultato essere inibitore attivo in vitro.

E poi bisogna registrare lo sviluppo di alcuni inibitori delle proteasi utilizzate nella terapia anti HIV.

Quindi questo approccio potrebbe avere notevoli vantaggi rispetto all'uso di costosi laboratori robotizzati per lo screening ad alto rendimento (HTS).

Ricerca preclinica

Modello in silico

Inoltre il [docking molecolare](#) potrebbe affiancare efficacemente i vari test in vitro ed in vivo per migliorare le caratteristiche chimiche dei composti attivi (farmacofori, ovvero potenziali farmaci) che si stanno studiando.

I bioinformatici sono i principali protagonisti di questo settore in grande sviluppo.

Ricerca preclinica

Passiamo ai **test in vitro**. In genere i possibili candidati molecolari sono messi in provetta o in piastre a contatto diretto con cellule umane, animali o di microrganismi. Anche questa fase è molto delicata e richiede impegno ed attenzione oltre a ripetuti controlli. Sono sempre da seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (in inglese *GLP - Good Laboratory Practice*). Infatti di tutti i passaggi deve essere fatta un'attenta rendicontazione che si trasforma nel tempo nel voluminoso dossier che affianca la domanda di approvazione per l'avvio della commercializzazione.

Ricerca preclinica

Test in vitro. Fermiamo l'attenzione sulle cellule da utilizzare. Possono essere cellule di pazienti, quindi cellule malate ottenute con un prelievo di sangue o una biopsia. Il problema in questo caso è che non c'è la garanzia assoluta che possano attecchire e moltiplicarsi in vitro. In alternativa possono essere scelte cellule affini. Se si sta testando un probabile farmaco antitumorale, ciò che si vuole osservare in primis è se le cellule muoiono o almeno smettono di moltiplicarsi.

Ricerca preclinica

Test in vitro.

Si possono seguire gli sviluppi della situazione con osservazione al microscopio oppure con tecniche genetiche o molecolari più sofisticate.

Ovviamente tutti i test devono essere affiancati da opportuni controlli.



33

Ricerca preclinica

Test in vitro.

Queste prove sperimentali hanno dei limiti. Non è detto che le cellule fatte crescere esternamente all'organismo umano rappresentino sempre un modello ideale. Manca ad esempio l'insieme dei segnali di comunicazione piuttosto complesso che caratterizza un organismo vivente.

Un altro aspetto di cui tenere conto è che se si usano cellule tumorali che da anni vengono coltivate artificialmente, le cosiddette *cellule immortalizzate*, queste possono aver subito delle modificazioni.

Ricerca preclinica

Test in vitro. Sono tutti fattori di cui bisogna tener conto per cui i risultati sono sempre indicativi e mai assoluti. Vanno sempre valutati insieme a tutti gli altri test. Da qui la necessità di sperimentazioni in vivo. C'è anche un altro fattore. Un farmaco deve essere testato anche rispetto all'ADME. Un sistema in vitro non consente di ottenere risultati affidabili. Basti pensare alle reazioni di detossificazione che in un organismo vivente coinvolgono fegato e più raramente polmoni e reni e che si ripercuotono sulla biodisponibilità e su altri fattori.

Ricerca preclinica

Test in vivo Le informazioni raccolte in questo modo sono vitali per poter passare alla sperimentazione diretta sull'uomo.

Alcuni aspetti li abbiamo già esaminati nelle slide precedenti a proposito delle colture cellulari.

Qui vogliamo ricordare che solo su un essere vivente possono essere rilevati alcuni parametri come i livelli pressori arteriosi e venosi, il comportamento, il coordinamento tra sistema nervoso centrale e periferico e molto altro.

Ricerca preclinica

Test in vivo Un aspetto molto delicato è la scelta dell'animale da laboratorio su cui agire fermo restando che gli animali devono essere rispettati.

Per esempio nella Comunità Europea ci sono regole (**la regola delle 3R**) molto severe che tutelano il benessere degli animali. Ecco.

- ★ Replacement: non utilizzare animali se esistono metodi alternativi equivalenti
- ★ Reduction: usare il minor numero possibile di animali
- ★ Refinement: assicurare la migliore qualità di vita e la minore sofferenza possibile

Ricerca preclinica

Test in vivo

Va anche ricordato che per legge bisogna effettuare i test in vivo sugli animali.

Ma quali sono gli animali più idonei?

I topi e i ratti sono i più somiglianti per caratteristiche genetiche e per lo sviluppo di malattie.



Ricerca preclinica

Test in vivo

Per esempio nei ratti si possono rimuovere selettivamente le isole di Langerhans dal tessuto pancreatico in seguito al trattamento con streptozotocina. Si induce così il diabete di tipo sperimentale e si creano modelli viventi su cui sperimentare i farmaci antidiabetici.

Legando specifici vasi arteriosi si possono creare episodi ischemici nei settori di interesse dell'organismo e valutare l'azione terapeutica di vari principi attivi. In questo modo si è registrata recentemente l'azione cardioprotettiva dell'eritropoietina ricombinante e dei derivati non eritropoietici.¹⁰²

Ricerca preclinica

Test in vivo

Sempre tra i topi dobbiamo ricordare i **topi knock out**. Categoria di animali ingegnerizzati in modo da perdere la funzione di un singolo gene. Sono modelli preclinici di grande interesse per lo studio delle malattie genetiche e di eventuali interventi terapeutici.

E non dobbiamo dimenticare gli **animali transgenici** che al contrario dei precedenti sono stati ingegnerizzati introducendo uno o più geni estranei al loro genoma. Vengono utilizzati come modelli sperimentali per studiare il cancro e testare nuove molecole farmacologiche.

Ricerca preclinica

Test in vivo

A proposito di cancro va ricordata un'altra possibilità offerta dai test in vivo: lo *xenotrapianto*.

In pratica si tratta di trapiantare nell'animale da laboratorio un pezzo di cancro estratto dal paziente. Il trapianto ha sempre successo perché nell'ospite viene prioritariamente inibito il sistema immunitario. A questo punto si può testare il composto in esame e registrare un eventuale riduzione o meno.

Anche nel caso dei test in vivo bisogna tenere presente i punti deboli e i punti di forza.

Ricerca preclinica

Test in vivo

Perché questi test siano efficaci lo sviluppo della malattia deve essere quanto più possibile simile a quella umana. E non tutte le malattie sono riproducibili anche perché noi stessi non conosciamo l'eziopatogenesi di tutte. Basti pensare all'autismo o all'Alzheimer che tra l'altro sono poco candidabili all'osservazione perché nell'animale mancano alcune funzioni peculiari dell'uomo.

Ricerca preclinica

Test in vivo

Gli animali sono molto utili negli studi tossicologici. I test sono ormai standardizzati e regolati dalla legge. Si possono così monitorare i dosaggi, i tempi di somministrazione e se eventuali accumuli in organi specifici sono transitori o meno.

Sempre l'animale è il modello sperimentale migliore per valutare la farmacocinetica, la farmacodinamica e l'indice terapeutico.

Ricerca preclinica

A questo punto quante sono le molecole candidate ad aver superato tutti questi test ? e quanto tempo occorre per portare a compimento tutta la ricerca preclinica e passare alla sperimentazione sull'uomo?

Le molecole si sono ridotte a poche unità e per la selezione occorrono almeno 2 o 3 anni.

È arrivato il momento di pensare al brevetto e ad un processo di produzione visto che le quantità necessarie saranno sempre maggiori.

TRIALS CLINICI

BioTecnologieSanitarie.it

Trials clinici

Si arriva finalmente alla sperimentazione sull'uomo che è divisa in tre fasi.

Prima di entrare nei dettagli delle singole fasi è bene chiarire quali sono le regole della "Buona Pratica Clinica".

Il GCP (Good Clinical Practice) è stato recepito in Italia con il D.M. 15/7/1997 ed è affiancato dal complesso delle Buone Pratiche di Laboratorio di cui abbiamo già parlato (GLP - Good Laboratory Practice) e dalle Buone Pratiche Produttive (GMP - Good Manufacturing Practice) per la produzione.

Trials clinici

La “Buona Pratica Clinica” prevede di:

- perseguire il benessere e la sicurezza dei pazienti che partecipano alla sperimentazione;
- garantire l’attendibilità dei dati che devono essere trasmessi in modo trasparente e riferiti integralmente;
- garantire la riservatezza delle informazioni.

Trials clinici

Inoltre prima di poter effettuare qualsiasi sperimentazione sull'uomo è necessario chiedere l'autorizzazione al Comitato etico del Centro di Coordinamento (Parere Unico) o all'Istituto Superiore di Sanità se sono coinvolti nuovi farmaci.

I **Comitati Etici** sono strutture indipendenti e **multidisciplinari** che valutano come viene portato avanti il processo per tutelare i diritti dei soggetti su cui viene sperimentato il farmaco.

Trials clinici

Innanzitutto ogni soggetto deve essere adeguatamente informato e deve dare il suo **consenso informato**. Quindi deve essere consapevole di tutto il processo e in maniera precisa delle conseguenze e dei rischi a cui va incontro. C'è una precisa normativa a cui si fa riferimento che è la **dichiarazione di Helsinki** recepita dalla World Medical Association (WMA) del 1964 e che è stata aggiornata nel 2000.

Vi sono poi le regole della FDA statunitense che fanno testo.

Trials clinici

In conclusione a livello internazionale si fa riferimento a questi principi base:

- i soggetti vanno scelti **random** tra persone sane o malate;
- il principio attivo a cui si viene sottoposti deve essere confrontato con un **placebo** o con un prodotto farmaceutico simile;
- bisogna simulare l'andamento di una vera malattia con i periodi di remissione e di riacutizzazione e quindi si devono alternare la somministrazione del farmaco a quella del solo placebo o farmaco noto (**cross-over**)

Trials clinici

- la modalità di studio può essere **in aperto** quando il somministratore e il soggetto sono entrambi informati sulla natura del prodotto oppure a **singolo cieco** quando la conosce il solo somministratore o ancora a **doppio cieco** quando entrambi ignorano qualsiasi cosa rispetto al farmaco in sperimentazione.

Trials clinici

Le slide successive si riferiscono alle fasi specifiche dei clinical trials.

I dati sono stati recuperati dal sito dell'**AIFA** (Agenzia Italiana del Farmaco).



FASE I
Studio
preliminare

Studio preliminare

Viene scelto un numero esiguo di persone sane (20 -80).
Volontari scelti in una fascia di età non avanzata per cui è stata:

- documentata l'assenza di malattie
- accertata anche la non predisposizione alle malattie

Obiettivo: valutazione degli eventuali effetti negativi tenuto conto di tutti i risultati ottenuti nelle fasi precedenti, ovvero *la sicurezza e la tollerabilità del farmaco*

Studio preliminare

Metodo:

- ★ i soggetti vengono suddivisi in gruppi
- ★ a ciascun gruppo viene somministrata una dose di farmaco in genere crescente ma partendo sempre da una quantità minima, ben al di sotto del dosaggio tossico nell'animale fissato negli step precedenti e proporzionata al peso dell'uomo; ci si ispira alla successione di Fibonacci

Studio preliminare

- ★ se viene registrato un effetto tossico anche in un solo volontario, quel dosaggio è stimato come la *dose massima tollerata*; si scende di una dose e se non ci sono conseguenze si decide che quella è la *dose raccomandabile*
- ★ ovviamente devono essere ripetuti più cicli di trattamento per essere sicuri di questi valori soglia

Studio preliminare

- ★ viene tenuta una registrazione fedele
 - dell'assorbimento,
 - della concentrazione nel sangue
 - della distribuzione
 - dell'eliminazione
 - di tutti gli effetti collaterali

Studio preliminare

Eventuali modifiche: in caso di patologie gravi come AIDS o tumori possono essere coinvolti fin da questa prima fase soggetti malati.

Conclusioni: se il profilo beneficio-rischio cioè il rapporto tra il livello di tossicità e l'effetto benefico del farmaco è favorevole si passa allo step successivo

Studio preliminare

Limiti: la scelta di orientarsi verso una fascia di età media potrebbe avere conseguenze sulla bontà dei risultati. Basti pensare che la maggior parte delle medicine viene assunta nella terza età. È altrettanto ovvio che sperimentare nuovi farmaci direttamente negli ultrasessantacinquenni, considerati fascia debole della società insieme a bambini e alle donne in gravidanza, potrebbe provocare conseguenze non desiderate.

Studio preliminare

Limiti

Altro punto su cui riflettere è relativo ai farmaci per l'età pediatrica. Vengono testati per lo più negli adulti ma è ovvio che non si tratta solo di peso corporeo diverso e quindi di proporzionare matematicamente il dosaggio.

Nei bambini e nei giovanissimi è il metabolismo ad essere diverso.



FASE II
Studio
terapeutico pilota

Studio terapeutico pilota

Viene definito anche terapeutico-esplorativo.

Il farmaco su cui si indaga viene somministrato ad un numero di soggetti maggiore della fase precedente (80 - 400) ed affetti dalla patologia in esame.

Obiettivi su cui indagare:

- ★ capacità del farmaco di produrre gli effetti curativi desiderati, cioè se è attivo
- ★ dose migliore da somministrare
- ★ effetti del farmaco in relazione ad alcuni parametri tra cui la pressione sanguigna

Studio terapeutico pilota

Metodo:

- ★ i soggetti vengono suddivisi in gruppi distinti
- ★ a ciascun gruppo viene somministrata una dose diversa di farmaco e, se possibile dal punto di vista etico, un placebo (studio *a singolo cieco* e *a doppio cieco*)
- ★ vengono registrati tutti gli effetti collaterali
- ★ la sperimentazione prosegue per due anni

Studio terapeutico pilota

Conclusioni: se l'attività del principio attivo e la sua non tossicità vengono confermate il farmaco passa alla fase successiva

BioTechnologySanitarie.it



FASE III
Studio
terapeutico su
larga scala

Studio terapeutico su larga scala

Viene definito anche terapeutico-confermatório.

Il farmaco su cui si indaga viene somministrato ad un numero di soggetti maggiore della fase precedente (centinaia o migliaia, da 1000 a 10.000) ed affetti dalla patologia in esame, sempre volontari.

Obiettivi su cui indagare:

- ★ efficacia del farmaco rispetto anche ad altri farmaci analoghi
- ★ qualità della vita o sopravvivenza (endpoint)

Studio terapeutico su larga scala

Metodo:

- ★ ad ogni soggetto viene somministrato random il nuovo principio attivo oppure un farmaco di riferimento che viene utilizzato comunemente nel trattamento standard della patologia in esame
- ★ in questo modo tutti i volontari vengono suddivisi in due gruppi uniformi che differiscono solo per il trattamento

Studio terapeutico su larga scala

- ★ il farmaco viene somministrato per diversi mesi
- ★ vengono valutati attentamente tutti gli effetti negativi e il monitoraggio può durare anche qualche anno

BioTechnologieSanitarie.it

Studio terapeutico su larga scala

La fase 3 è molto dispendiosa e lunga e può farsene carico solo un'industria farmaceutica che deve essere ben convinta della positività dei precedenti step prima di imbarcarsi in un'impresa del genere.

REGISTRAZIONE DEL FARMACO E COMMERCIALIZZAZIONE

Registrazione del farmaco

Se il rapporto rischio/beneficio è a favore di quest'ultimo l'industria farmaceutica raccoglie tutto l'incartamento e fa una richiesta precisa di commercializzazione all'**AIFA** (**Agenzia Italiana del Farmaco**) che è l'autorità competente per l'Italia per dare l'approvazione. Segue il Decreto del Ministero della Salute. La procedura è valida per il nostro Stato. Durante i Clinical Trials il farmaco non può essere venduto. Può essere utilizzato solo all'interno degli ospedali per la somministrazione ai volontari.

Registrazione del farmaco

Se si vuole commercializzare il farmaco nel territorio europeo l'ente preposto a dare l'autorizzazione è l'**EMA** (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products).

Gli enti a cui si richiede l'autorizzazione hanno un massimo di 210 giorni per dare una risposta.

Tale autorizzazione ha validità per 5 anni. Scaduto il tempo la richiesta deve essere rinnovata. Nel caso di risposta positiva che segue ad un attento e ulteriore controllo del rapporto rischio/beneficio, la durata è illimitata.

Registrazione del farmaco

Inoltre se il farmaco non viene commercializzato entro tre anni dal parere positivo o non risulta presente nel mercato da tre anni l'autorizzazione viene ritirata.

In commercio il principio attivo ha un nome di fantasia che spesso è diverso nei vari Paesi.

Risulta sempre accompagnato da un foglietto illustrativo che deve contenere tutte le indicazioni precise per il suo uso, le avvertenze, gli effetti collaterali e la composizione.

FARMACOVIGILANZA

BioTechnologySanitarie.it

Farmacovigilanza

La **farmacovigilanza** è l'insieme delle attività finalizzate all'identificazione, valutazione, comprensione e prevenzione degli effetti avversi o di qualsiasi altro problema correlato all'uso dei medicinali, al fine di assicurare un rapporto beneficio/rischio favorevole per la popolazione.

Questa è la definizione che viene riportata nel sito dell'AIFA, l'agenzia italiana per il farmaco già citata numerose volte in questa presentazione.

Farmacovigilanza

È come se fosse una quarta fase del programma di sperimentazione sul farmaco compiuta, però, su una platea molto più vasta rispetto alla fase dello studio terapeutico su larga scala.



Farmacovigilanza

Infatti i Clinical Trials hanno il **limite** di lavorare su una popolazione ristretta e selezionata.

Inoltre la durata della sperimentazione non è mai del tutto sufficiente per vagliare completamente le reazioni avverse.



Farmacovigilanza

Il termine è nato negli anni '70 in Francia in seguito alla iniziativa di un gruppo di tossicologi e farmacologi che hanno deciso di controllare nel tempo efficacia e sicurezza dei farmaci immessi nel mercato.

Era ancora fresca nella memoria la vicenda del **thalidomide**.



Farmacovigilanza

La molecola della talidomide creata dalla ditta tedesca Chemie Grünenthal e appartenente al gruppo dei barbiturici fu venduta in molti paesi europei a partire dagli anni '50 e '60 del XX secolo.



Uno dei tanti prodotti commerciali **38**
a base di talidomide

Farmacovigilanza

In realtà l'uso iniziale risaliva alla II Guerra Mondiale.

Funzionava molto bene negli stati d'ansia come sedativo e quindi era utilissima per i militari.

Successivamente fu venduta come anti-nausea alle donne in gravidanza.

Farmacovigilanza

All'epoca non erano richiesti i Clinical Trials. I nuovi farmaci venivano autorizzati dopo una serie di esperimenti condotti sugli animali. In questo caso bastarono tre anni. Mano a mano che il farmaco si diffondeva dalla Germania all'Inghilterra, alla Svizzera ... si moltiplicarono i test sugli animali. Tutti diedero esito positivo. Ma nessun test fu eseguito su animali in stato gravidico e oltretutto non furono neanche eseguiti bene.

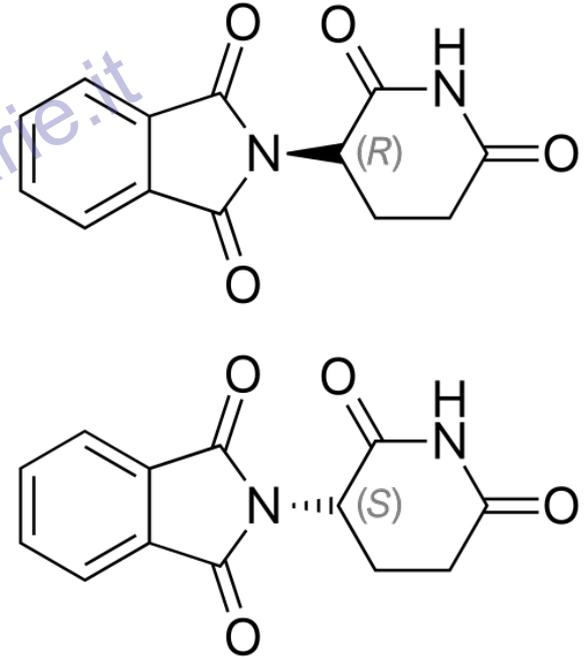
Farmacovigilanza

Nel 1957 si manifestarono i primi casi di teratogenicità ma la consapevolezza di quanto stava accadendo si ebbe dopo il 1961. Nel frattempo, negli USA, la farmacologa Kensley per nulla convinta della sicurezza del farmaco negò fermamente l'autorizzazione alla commercializzazione. Per questo fu premiata nel 1962 dal Presidente J. F. Kennedy.



Farmacovigilanza

Solo in Germania si calcola che siano nati dai 5000 ai 7000 neonati affetti da *focomelia* a seguito dell'assunzione del farmaco. La focomelia è una grave malformazione degli arti superiori e/o inferiori che non riescono a svilupparsi regolarmente.



Farmacovigilanza

L'anomalia può essere bilaterale o meno e nei casi più gravi si sviluppano solo abbozzi di dita a livello delle spalle.

Il feto risulta particolarmente sensibile alla talidomide tra il 34° e il 40° giorno di gravidanza. Uno dei suoi due enantiomeri colpisce le creste gangliari e impedisce lo sviluppo dei gangli spinali i cui neuroni sono responsabili del normale sviluppo delle ossa lunghe.

Effetti diversi si possono avere se agisce in altri giorni. Non è più teratogena dopo il 42° giorno di gestazione.

Farmacovigilanza



Foto scattata nel 2013 al Museo della Scienza di Londra a ricordo dei casi di focomelia da talidomide



Malformations due to maternal ingestion of thalidomide (Schardein 1982 and Moore 1993).

Farmacovigilanza

Obiettivi:

- riconoscere, il più rapidamente possibile, nuove reazioni avverse ai farmaci (**ADR**, dall'inglese *Adverse Drug Reaction*);
- migliorare ed allargare le informazioni su ADR sospette o già note;

Farmacovigilanza

Obiettivi:

- valutare i vantaggi di un farmaco su altri o su altri tipi di terapia;
- monitorare l'interazione con altri farmaci;
- comunicare l'informazione in modo da migliorare la pratica terapeutica.

Farmacovigilanza

Il principale protagonista della farmacovigilanza è il medico curante che deve segnalare ai **Dipartimenti per la farmacovigilanza** se il farmaco mantiene le promesse terapeutiche e l'eventuale presenza di reazioni avverse ed effetti collaterali sia già segnalati nel foglietto illustrativo che non conosciuti.

Farmacovigilanza

Gli **effetti collaterali** sono tutte le reazioni non desiderate, più o meno già previste all'atto della commercializzazione che si manifestano alle normali dosi di utilizzo.

Per esempio gli antinfiammatori possono provocare gastrite. Bisogna abituarcisi perché la patologia di cui si soffre ha la priorità e alcuni effetti collaterali devono essere messi in conto.

Il caso più eclatante è quello dei farmaci usati nella chemioterapia antitumorale.

Farmacovigilanza

Le **reazioni avverse (ADR)** sono gli effetti nocivi e non voluti legati all'azione del farmaco. Si possono verificare per avvenute modificazioni fisiologiche, per esempio la gravidanza, l'allattamento, la senescenza... Oppure perché il medicinale si comporta da antigene inducendo una risposta immunitaria. O ancora perché la molecola interferisce con il metabolismo del paziente che può essere così interessato da una nuova patologia detta iatrogena, a volte con la morte del soggetto.

Farmacovigilanza

Da quanto evidenziato è ovvio che non si conoscono nel momento in cui si ottiene l'autorizzazione alla vendita. Per questo motivo quando vengono segnalate reazioni avverse bisogna fare subito una studio di causalità per capire se è davvero il farmaco la causa. E quindi:

- indagare sul nesso temporale tra assunzione del farmaco ed insorgenza dei sintomi;
- controllare se, sospendendo il farmaco, la reazione regredisce;

Farmacovigilanza

- verificare la relazione dose/risposta, cioè se all'aumentare della dose aumenta la gravità della reazione;
- controllare se somministrando il farmaco una seconda volta la reazione avversa si verifica di nuovo (questo si può fare solo nel caso che non si sia verificato uno shock anafilattico);
- capire se la reazione avversa è compatibile con il principio attivo del medicinale e se si sono verificati episodi analoghi con farmaci della stessa classe;

Farmacovigilanza

- escludere la possibilità che la reazione avversa sia dovuta ad altri farmaci assunti contemporaneamente.

I risultati possono essere certi, probabili, possibili e dubbi.

Sono i medici, sia di famiglia che gli specialisti, che devono inviare una segnalazione al Ministero della Salute.

Dopo l'indagine di cui sopra o il farmaco viene ritirato oppure vengono aggiunte le opportune segnalazioni sul foglietto illustrativo.

Farmacovigilanza

In ogni caso effetti collaterali o reazioni avverse sono effetti secondari.

Questi possono essere **rari** e a loro volta da differenziare tra *specifici* e *aspecifici*.

I primi sono da ricondurre senza dubbi al principio attivo.

I secondi sono legati a patologie diffuse e qui subentra la difficoltà a valutare se sono da attribuire effettivamente al farmaco in uso o meno.

Farmacovigilanza

Poi ci sono effetti secondari **successivi a trattamenti prolungati**.

La difficoltà in questo caso sta nel fatto che possono insorgere dopo periodi davvero molto lunghi.

Anche quelli a **lunga latenza** pongono diversi quesiti. Se il periodo di tempo è lunghissimo bisogna trovare il modo giusto per stabilire il nesso in modo rigoroso tra la somministrazione del farmaco e l'insorgenza di tali effetti.

Farmacovigilanza

Come già evidenziato tra gli obiettivi non bisogna dimenticare di segnalare le **interazioni con farmaci assunti contemporaneamente**.

Da ultimo ma non meno importante è segnalare **anomalie nel confronto tra il comportamento verso una molecola attiva da parte di fasce della popolazione a rischio** (per esempio anziani, bambini, donne in gravidanza) **rispetto a soggetti scelti a caso tra la popolazione**.

Farmacovigilanza

È ovvio quindi che non può essere il solo medico curante ad operare le segnalazioni spontaneamente o per conto del paziente.

Le stesse istituzioni pubbliche devono e possono provvedere a programmare ed effettuare nel territorio vari tipi di indagine.

Sono le **indagini senza controllo parallelo** in cui non è previsto un campione di controllo. Possono essere *registrate* quando deve essere rinnovata l'autorizzazione alla commercializzazione.

Farmacovigilanza

Oppure *limitate* ai ricoveri ospedalieri. O ancora ai decessi.

Controllate, mediante somministrazione di questionari ai pazienti.

Ristrette se viene coinvolto solo un numero controllato di medici.

C'è però da aggiungere un altro studio descrittivo che è il

monitoraggio dei registri nazionali soprattutto quelli ospedalieri

dove si possono ricavare numerosi dati significativi.

Photo credits

Sviluppo di un nuovo farmaco - di proprietà di R&D Studio Associato

1 A snapshot on diabetes - courtesy of CDC

2 Meccanismo d'azione dell'insulina - Di Original uploader was XcepticZP at en.wikipedia - Italian version of Image:Insulin glucose metabolism ZP.svg., Pubblico dominio, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=5213479>

3 Solfanillamide - <https://it.wikipedia.org/w/index.php?curid=155812>

4 Sulfaniluree - Di Fvasconcellos (discussione · contributi) - Opera propria, Pubblico dominio, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=15506919>

5 In vitro test - https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/48/RHE_topical_exposure_2.JPG

6 Lab mouse - By Rama (Own work) [CeCILL (http://www.cecill.info/licences/Licence_CeCILL_V2-en.html) or CC BY-SA 2.0 fr (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/2.0/fr/deed.en>)], via Wikimedia Commons

Farmacodinamica del Viagra - di proprietà di R&D Studio Associato

La maggior parte delle immagini sono state usate nella presentazione e quindi è già stato attribuito l'autore tranne

la freccia rossa - CCO Creative Commons (da pixabay.com)

lipid bilayer with various components - By OpenStax [CC BY 4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>)], via Wikimedia Commons

Photo credits

- 1** Di Louise Joly, one half of AtelierJoly - Opera propria, CC BY-SA 1.0,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=205994>
- 2** By Me - I took this photo in Den Haag. I cut the seedbox and a white milk dripped out. I am not aware of the laws on this topic, to err on the safe side I didnt harvest it., Public Domain, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=948377>
- 3** Digitalis lutea - Di Teun Spaans - I took this photo near Salvan, CC BY 2.5, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2907807>
- 4** Datura stramonium - Di bdk, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=16717>
- 5** Atropa belladonna - By Tom Oates at the English language Wikipedia, CC BY-SA 3.0,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=7658610>
- 6** La penicillina, il farmaco del miracolo - By Unknown - <https://ihm.nlm.nih.gov/images/A20824>, Public Domain,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1819576>
- 6a** Formula di struttura dei 2 enantiomeri della fluoexitina - Di Jü - Opera propria, Pubblico dominio,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=6273790>
- 6b** Blister di fluoxetina - By Lanfear's Bane at English Wikipedia, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=5222497>
- 7** Solfanillamide - <https://it.wikipedia.org/w/index.php?curid=155812>
- 8** Sulfaniluree - Di Fvasconcellos (discussione · contributi) - Opera propria, Pubblico dominio,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=15506919>
- 9** Schema del meccanismo d'azione delle sulfoniluree - By Aydintay (Own work) [Public domain], via Wikimedia Commons
- 10** Apparato genitale maschile - Di Male_anatomy.png: alt.sex FAQderivative work: Tsaitgaist (talk) - Male_anatomy.png, CC BY-SA 3.0,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=6570530>

Photo credits

- 11** Sezione longitudinale e trasversale dell'erezione del pene - By OpenStax College - Anatomy & Physiology, Connexions Web site. <http://cnx.org/content/col11496/1.6/>, Jun 19, 2013., CC BY 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=30132981>
- 12** Monossido di azoto (struttura 3D - Di Benjah-bmm27 - Opera propria, Pubblico dominio, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1031591>
- 13** Arginina (formula di struttura) - Di NEUROtiker - Opera propria, Pubblico dominio, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1637088>
- 14** Modello tridimensionale della NO sintasi - Di A2-33 - Opera propria, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=18286910>
- 15** Enzima guanilato ciclasi - <http://www.rcsb.org/structure/3UVJ>
- 16** GTP - CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=106138>
- 17** cGMP - By NEUROtiker [Public domain], from Wikimedia Commons
- 18** Meccanismo d'azione delle protein-chinasi - Di NIGMS - http://publications.nigms.nih.gov/medbydesign/images/ch4_kinases.jpg, Medicines by Design, National Institute of General Medical Sciences, Pubblico dominio, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=7335378>
- 19** Struttura tridimensionale della 5PDE - Di Yikrazuul - Opera propria, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=7996966>
- 20** Viagra (formula di struttura) - Di Yikrazuul, (Pypaertv) - Opera propria, Pubblico dominio, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2383838>
- 21** DCC (dynamic combinatorial chemistry) - By Protein_DCC - Own work, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=25131808>
- 22** Piastre per microtitolazione - By S.D. Hamilton (<http://www.labautopedia.org/mw/index.php/User:S.d.hamilton>) - <http://www.labautopedia.org/mw/index.php/Image:Microplates.jpg>, GFDL 1.2, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=6085654>

Photo credits

- 23** Piastra da microtitolazione a 396 pozzetti - By real name: Nadina Wiórkiewicz pl.wiki: Nadine90 commons: Nadine90 [CC BY-SA 3.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>)], from Wikimedia Commons
- 24** Sistema di stoccaggio per le micropiastre da screening - By National Institute of Allergy and Infectious Diseases - <http://www.niaid.nih.gov/news/newsreleases/2014/Pages/3DPrintExchange.aspx>, Public Domain, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=37410720>
- 25** Robot per HST - By Maggie Bartlett, National Human Genome Research Institute - <http://www.genome.gov/dmd/img.cfm?node=Photos/Technology/Research%20laboratory&id=79299>, Public Domain, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=37410189>
- 26** Curva dose-risposta per IC50 - By JesseAlanGordon - Own work, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=25052308>
- 27** Grafico semilogaritmico di due agonisti - Di Potency_pharmacology.svg: Radio89 (Dario Cambié) derivative work: Radio89 - Questo file deriva da Potency pharmacology.svg, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=18894757>
- 28** Sulfacetammide - Di Fvasconcellos - Opera propria, Pubblico dominio, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1332023>
- 29** Drug discovery cycle - By Boghog [CC BY-SA 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>)], from Wikimedia Commons
- 30** High-Throughput Biotechnology Laboratory of BIOCAD - Foto regolarmente acquistata da 123RF
- 31** Docking molecolare - Di ArvindRamanathan at the English language Wikipedia, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=37679615>

Photo credits

- 32** Piccola molecola legata ad una proteina dopo docking - Di Chaos - Opera propria, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=4675081>
- 33** Fiasche per colture cellulari - By Unknown photographer/artist (National Cancer Institute, AV Number: AV-8307-3705) [Public domain], via Wikimedia Commons
- 34** Topo da laboratorio - By Rama [CeCILL (http://www.cecill.info/licences/Licence_CeCILL_V2-en.html) or CC BY-SA 2.0 fr (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/2.0/fr/deed.en>)], from Wikimedia Commons
- 35** Farmaco in compresse - Di Ragesoss - Opera propria, CC BY-SA 4.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=3605923>
- 36** Manifesto per conferenza su farmacovigilanza - By pharmacovigilance [CC BY-SA 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0>)], via Wikimedia Commons
- 37** Blister di talidomide - By Stephencdickson [CC BY-SA 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0>)], from Wikimedia Commons
- 38** Contergan - Von Ich, der Urheber dieses Werkes, veröffentliche es unter der folgenden Lizenz: derivative work Lämpel - Ich, der Urheber dieses Werkes, veröffentliche es unter der folgenden Lizenz:, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=61804193>
- 39** Kelsey riceve il premio da JohnKennedy nel 1962 - By Unknown - <https://ihm.nlm.nih.gov/images/A18057>http://lhncbc.nlm.nih.gov/apdb/phsHistory/resources/safe_klsy.htm l, Public Domain, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=6424741>
- 40** Enantiomeri della talidomide - By Vaccinationist - (R)-(+)-Thalidomide on PubChem(S)-(-)-Thalidomide on PubChem, Public Domain, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=50750574>
- 41** Foto scattata al Science Museum London - 2013 - <https://www.flickr.com/photos/59633635@N08/8661062608>
- 42** Casi di focomelia da talidomide - Public Domain, <https://en.wikipedia.org/w/index.php?curid=14692817>