

# Metodologie di farmacologia sperimentale

a cura di ROSALINDA SORRENTINO

UNIVERSITÀ

# Indice

- p. 9 Premessa. Sperimentazione nel campo biomedico  
11 Introduzione. Sperimentazione preclinica
- 15 Capitolo 1  
*Metodiche in vitro. Impiego di colture cellulari, organi on-chip, organoidi*  
di Michela Terlizzi
- 37 Capitolo 2  
*Metodiche ex vivo e in vivo. Utilizzo di animali da laboratorio: legislazione e criteri; variabilità biologica*  
di Chiara Colarusso
- 61 Capitolo 3  
*Saggi per la valutazione dello schema ADME dei farmaci durante la fase preclinica*  
di Raffaella Sorrentino
- 75 Capitolo 4  
*Il dosaggio dei farmaci nelle matrici biologiche. Applicazioni nella sperimentazione preclinica e clinica e nella medicina pratica*  
di Mauro Cataldi, Federica Manco, Marinella Ferraro, Ciro Magelli, Carlo Miccio
- 93 Capitolo 5  
*Saggi per la valutazione degli effetti tossici dei farmaci durante la fase preclinica*  
di Raffaella Sorrentino
- 125 Capitolo 6  
*Saggi per la valutazione dell'attività di farmaci antipertensivi*  
di Rosalinda Sorrentino
- 147 Capitolo 7  
*Saggi per la valutazione dell'attività di farmaci ipolipidizzanti*  
di Rosalinda Sorrentino

- p. 155 Capitolo 8  
*Saggi per la valutazione dell'attività di farmaci ipoglicemizzanti*  
di Ciriana Orabona, Maria Teresa Pallotta, Giada Mondanelli
- 209 Capitolo 9  
*Saggi per la valutazione dell'attività di farmaci cardiaci*  
di Aldo Pinto
- 257 Capitolo 10  
*Saggi per la valutazione dell'attività di farmaci antinfiammatori*  
di Rosalinda Sorrentino
- 275 Capitolo 11  
*Saggi per la valutazione dell'attività di farmaci immunomodulatori*  
di Ursula Grohmann, Giada Mondanelli, Claudia Volpi
- 309 Capitolo 12  
*Saggi per la valutazione dell'attività di farmaci dell'apparato respiratorio*  
di Chiara Colarusso
- 367 Capitolo 13  
*Saggi per la valutazione dell'attività di farmaci nelle patologie intestinali*  
di Ester Pagano
- 391 Capitolo 14  
*Saggi per la valutazione dell'attività di farmaci emostatici*  
di Michela Terlizzi
- 411 Capitolo 15  
*Metodiche per lo studio della barriera ematoencefalica*  
di Mauro Cataldi, Vincenzo Barrese
- 429 Capitolo 16  
*Modelli sperimentali per lo studio di farmaci analgesici*  
di Francesca Boscia, Luigi Formisano
- 447 Capitolo 17  
*Modelli sperimentali per la valutazione di farmaci nelle malattie del motoneurone*  
di Agnese Secondo, Valeria Valsecchi
- 465 Capitolo 18  
*Saggi per la valutazione dell'attività dei farmaci nell'ischemia cerebrale*  
di Giuseppe Pignataro, Ornella Cuomo, Antonella Scorziello

- p. 495 Capitolo 19  
*Saggi per la valutazione dell'attività dei farmaci su apprendimento e memoria*  
di Anna Pannaccione, Pasquale Molinaro
- 523 Capitolo 20  
*Saggi per la valutazione dell'attività di farmaci anti-Parkinsoniani*  
di Antonella Scorziello, Maria José Sisalli
- 543 Capitolo 21  
*Saggi per la valutazione dell'attività di farmaci per il trattamento dei disturbi del sonno*  
di Carmela Matrone, Ornella Cuomo, Mariajosé Sisalli
- 555 Capitolo 22  
*Saggi per la valutazione dell'attività di farmaci anticonvulsivanti*  
di Maurizio Tagliatalata, Francesco Miceli, Giulia Baroli
- 579 Capitolo 23  
*Saggi per la valutazione dell'attività di farmaci antidepressivi*  
di Carmela Matrone, Francesco Miceli
- 595 Capitolo 24  
*Saggi per la valutazione dell'attività dei farmaci antipsicotici*  
di Maurizio Tagliatalata, Vincenzo Barrese
- 613 Capitolo 25  
*Saggi per la valutazione del potenziale d'abuso di sostanze farmacologicamente attive*  
di Giuseppe Pignataro, Valeria Valsecchi
- 635 Capitolo 26  
*Saggi per la valutazione dell'attività di farmaci antitumorali*  
di Chiara Colarusso
- 683 Capitolo 27  
*La farmacogenetica come strumento di studio per l'attività e la tossicità di farmaci antitumorali*  
di Roberta Arici, Stefania Crucitta, Federico Cucchiara, Romano Danesi, Marzia Del Re
- 723 Autori

# Premessa

## Sperimentazione nel campo biomedico

L'uomo fin dai tempi della preistoria ha mostrato il suo istinto innato a voler scoprire il mondo che lo circondava, assumendo prodotti vegetali che gli davano benessere. Col trascorrere del tempo l'empirica farmacologia preistorica comincia a fondare le sue radici, passando dal mondo arabo a quello greco e romano, in cui il *φάρμακον* (*pharmakon*, farmaco) viene riconosciuta come una sostanza in grado di curare in modo dose-dipendente, ma anche di promuovere effetti tossici, che possono verificarsi in concomitanza al raggiungimento dell'efficacia farmacologica. Pertanto, dal farmacologo inglese Osler alla medicina moderna si è compreso che la somministrazione di una "droga", termine tuttora utilizzato nel mondo anglosassone per definire un farmaco, può essere benefico, curativo per gli stati patologici, ma è associato ad eventi avversi da ricercarsi nello stesso meccanismo d'azione del farmaco e/o in eventi fisiologici modulati dalla presenza del farmaco nell'organismo.

La farmacologia empirica e osservazionale viene sostituita dalla Farmacologia moderna nel XIX secolo, quando l'osservazione comincia ad essere basata su fondamenti razionali che trovano riscontro nella sperimentazione. Da Claude Bernard (1813-1878) a Giovanni e Mariano Semmola, da Paul Ehrlich (che elaborò la teoria recettoriale) a Felix Hoffmann (che sintetizzò l'acido acetilsalicilico), da Alexander Fleming (che scoprì la penicillina) a Daniel Bovet (premio Nobel per i suoi studi sugli agenti attivi sul sistema nervoso), a James Black (Nobel per i suoi studi nell'individuazione di farmaci nelle patologie cardiovascolari), la sperimentazione nel campo biomedico si è evoluta fino ad arrivare ai giorni nostri, al raggiungimento di importanti traguardi, come l'introduzione dei farmaci biotecnologici, la terapia genica e la medicina personalizzata, grazie alla messa a punto di tecnologie innovative all'avanguardia.

La farmacologia è una scienza che ha come obiettivo:

- lo studio e l'individuazione degli effetti di un farmaco, sia esso estrattivo o di sintesi o di natura biotecnologica;

- determinare l'attività farmacologica del farmaco in funzione della dose somministrata;
- identificare e comprendere i processi fisiopatologici che sono modulati dall'attività del farmaco, distinguendo gli effetti benefici da quelli tossici.

Per raggiungere questi obiettivi, la farmacologia sperimentale utilizza approcci che integrano diverse discipline per comprendere l'attività biologica di una sostanza a livello molecolare, cellulare e nel complesso organismo, definendo l'efficacia, la potenza e l'attività tossicologica della sostanza stessa. La sperimentazione biomedica si avvale di almeno tre livelli sperimentali che vanno dallo studio *in vitro*, *ex vivo* fino allo studio delle sostanze *in vivo*. Tali modelli sono caratterizzati da vantaggi e limitazioni, di cui lo sperimentatore deve tener conto prima di procedere dalla sperimentazione preclinica a quella clinica. Allo stesso tempo, però, la sperimentazione preclinica è una *conditio sine qua non* per definire un potenziale *tool* farmacologico da sperimentare clinicamente.

Questo testo ha come interlocutori gli studenti universitari di medicina, farmacia, biotecnologia, scienze biologiche e medicina veterinaria e si pone come obiettivo quello di definire i fondamenti della farmacologia sperimentale, fornendo le basi per affrontare uno studio preclinico. I modelli sperimentali illustrati sono complementari fra di loro e possono essere utilizzati in virtù delle esigenze dello sperimentatore. Il concetto di complementarità nella sperimentazione preclinica è di fondamentale importanza in una discussione obiettiva e razionale che si pone come obiettivo quello di definire l'attività farmacologica di una sostanza sia a livello preclinico che clinico.

Rosalinda Sorrentino

# Introduzione

## Sperimentazione preclinica

La sperimentazione preclinica rappresenta la prima fase delle attività di ricerca al quale un prodotto farmaceutico deve essere sottoposto al fine di poter poi essere testato sull'uomo (sperimentazione clinica) e infine commercializzato. Dopo una preliminare analisi/studio *in vitro*, in cui ci si assicura che la molecola in esame possiede potenziali effetti terapeutici, tale molecola viene testata su organismi più complessi, gli animali, nella fase di sperimentazione preclinica, *in vivo*. Secondo l'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA), «rappresenta una fase della sperimentazione utile per osservare come si comporta e qual è il livello di tossicità della molecola su un organismo vivente complesso: qual è la via di somministrazione, come viene assorbita e successivamente eliminata».

La sperimentazione preclinica di un farmaco prevede tre fasi principali:

1. identificazione del bersaglio molecolare/cellulare;
2. identificazione di un *lead compound* candidato alla sperimentazione clinica;
3. valutazione della sicurezza/maneggevolezza del *clinical candidate*.

L'identificazione di un bersaglio molecolare/cellulare è alla base di diverse discipline, come la fisiologia, la patologia e la farmacologia. Tutte queste discipline hanno come obiettivo quello di identificare una proteina, un acido nucleico, una cellula, coinvolti sia nella normale omeostasi cellulare e tissutale, sia nella generazione/progressione di una patologia. Il farmacologo sperimentatore ha il compito di conoscere, identificare la/e *pathway* coinvolte in una condizione patologica e valutare l'attività di un *lead compound* di interferire (in positivo o in negativo) con il destino molecolare della *pathway* identificata, al fine di migliorare l'andamento patologico, curando non solo i sintomi, ma colpendo alla base le cause scatenanti della patologia (Figura 1). A tutto questo si aggiunge la valutazione della sicurezza del farmaco, che potrebbe avere un indice terapeutico ristretto (Figura 1). Si comprende quindi che per giungere ad un *clinical candidate* è necessario effettuare diverse speri-

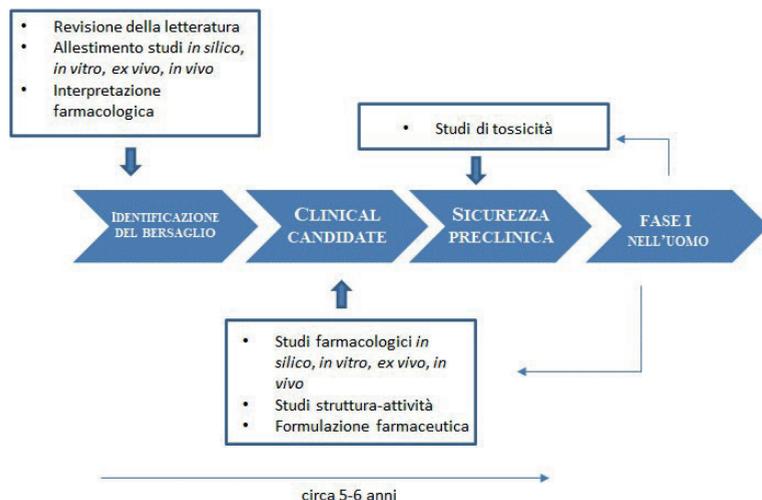


Figura 1. Sperimentazione preclinica nella drug discovery. Fonte: elaborazione dell'autrice.

mentazioni, che tengano conto della farmacodinamica, della farmacocinetica e della sicurezza del farmaco. Per poter effettuare questi studi, lo sperimentatore ha oggi a disposizione diversi *tool* che vanno dalle analisi *in silico* alle scienze omiche (proteomica, genomica, metabolomica, lipidomica) fino agli screening *high-throughput*, che permettono attraverso un sistema automatizzato di testare fino a 100.000 composti identificando il/i composti attivi. Una volta identificati, questi composti vanno valutati in modelli *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo* che riescono a mimare sia una condizione fisiologica che patologica. Un grosso traguardo nella sperimentazione preclinica è stato la generazione di animali geneticamente modificati (*knock-out* e transgenici), che, sebbene siano ancora oggi oggetto di discordie per gli studi farmacologici, rappresentano validi strumenti sperimentali per definire la funzione di specifici geni nella condizione patologica, per verificare la specificità d'azione di un farmaco e la potenziale tossicità, per identificare farmaci innovativi (vedi terapia genica) in patologie rare o patologie che sono trattate solo sintomaticamente non colpendo il/i bersagli principali causa della malattia.

Eseguite tutte le prove di attività farmacologica e tossicologica di un farmaco, questo può essere sottoposto all'esame delle autorità regolatorie per un giudizio di ammissibilità alla sperimentazione clinica, a partire dalla fase I. Tuttavia, le sperimentazioni precliniche possono accompagnare quelle cliniche, soprattutto laddove i risultati in fase I nell'uomo evidenzino ulteriori criticità, soprattutto di natura tossicologica, non evidenziate precedentemente a livello preclinico. Un esempio è il caso di metaboliti di un farmaco che possono essere diversi nell'uomo rispetto all'animale. In tal caso, la sperimentazione preclinica sui metaboliti può dare risposte maggiori, utilizzando i composti adeguati (es. metaboliti del farma-

co prodotti in laboratorio) per identificare eventuali effetti tossici. Dunque, si comprende l'importanza della sperimentazione clinica sia dal punto di vista della identificazione dell'attività farmacologica che della tossicità del farmaco. A tale riguardo, i test per la tossicità del farmaco si suddividono in:

- tossicità acuta: una sola somministrazione del farmaco, per identificare clinicamente la tossicità negli organi bersaglio, e l'eventuale risposta dell'organismo;
- tossicità subacuta: somministrazioni ripetute di farmaci per verificare se vi siano effetti tossici non manifestatisi negli studi di tossicità acuta;
- tossicità subcronica: il trattamento viene prolungato a 40 giorni per identificare gli organi bersaglio di questo tipo di tossicità;
- tossicità cronica: studi da 2 mesi a 2 anni per stabilire la tossicità del farmaco.

A corredo di tutti gli studi sperimentali affrontati, lo sperimentatore deve avere nozioni di biostatistica, al fine di verificare se la ipotesi sperimentale risulta nulla o non nulla (a tale riguardo si rimanda ai testi di statistica medica). Questo testo affronta le metodiche *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* per studiare, identificare, validare un potenziale target farmacologico a livello preclinico.

Rosalinda Sorrentino