RACCOMANDAZIONE DEL CONSIGLIO

del 26 ottobre 1983

relativa alle prove per l'immissione sul mercato delle specialità medicinali

(83/571/CEE)

IL CONSIGLIO DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità economica europea, in particolare l'articolo 235,

vista la proposta della Commissione,

visto il parere del Parlamento europeo (1),

visto il parere del Comitato economico e sociale (2),

considerando che la direttiva 65/65/CEE (3) ha avviato il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari e amministrative in materia di specialità medicinali degli Stati membri e che le direttive 75/318/CEE (4) e 75/319/CEE (5) hanno proseguito detto ravvicinamento e sviluppato i principi posti dalla direttiva 65/65/CEE;

considerando in particolare che la direttiva 75/318 CEE definisce un quadro generale della sperimentazione delle specialità medicinali, elenca i vari tipi di prove che devono essere effettuate e precisa taluni principi per l'istruzione delle domande di autorizzazione all'immissione sul mercato;

considerando che, in base all'esperienza acquisita, l'esecuzione ed il contenuto delle prove devono essere meglio precisati, in modo da consentire una identica interpretazione delle direttive comunitarie al momento dell'esecuzione delle prove e dell'esame delle domande da parte delle autorità nazionali;

considerando, di conseguenza, che, per prevenire divergenze di valutazione nell'applicare le norme e protocolli di cui alla direttiva 75/318/CEE, sono necessarie note esplicative che favoriscano la libera circolazione delle specialità medicinali;

considerando che le prove intese a valutare la qualità, la sicurezza e l'efficacia delle specialità medicinali devono essere costantemente adeguate al grado di sviluppo della scienza e della tecnica, senza però comportare uno spreco di risorse né un impiego di animali da laboratorio oltre lo stretto necessario;

considerando che è quindi estremamente utile riesaminare periodicamente le note esplicative per tener conto dell'evoluzione della tecnica, e, di comune accordo con le autorità nazionali, elaborarne nuove in base alle priorità che si presentano;

considerando che siffatto progresso in materia di armonizzazione, necessario a livello comunitario, agevolerà anche il riconoscimento, a livello internazionale, delle prove sui medicinali eseguite conformemente a dette norme, evitando quindi che gli esperimenti vengano ripetuti prima dell'esportazione nei paesi terzi;

considerando che il comitato farmaceutico e il comitato delle specialità medicinali sono stati consultati sulle misure che formano oggetto della presente raccomandazione,

RACCOMANDA AGLI STATI MEMBRI:

1. di controllare che i richiedenti di autorizzazioni di immissione sul mercato delle specialità medicinali rispettino, nel corso delle prove e nella presentazione dei risultati, i principi e la metodologia esposti nelle note esplicative figuranti in allegato;

2. d'istruire e di valutare, in base alle stesse note esplicative, le domande di autorizzazione di immissione sul mercato.

Fatto a Lussemburgo, addì 26 ottobre 1983.

Per il Consiglio

Il Presidente

G. MORAITIS

---

(1) GU n. C 287 del 9. 11. 1981, pag. 127.
(2) GU n. C 189 del 30. 7. 1981, pag. 39.
(3) GU n. 22 del 9. 2. 1965, pag. 369/65.
(4) GU n. L 147 del 9. 6. 1975, pag. 1.
(5) GU n. L 147 del 9. 6. 1975, pag. 13.

ALLEGATO I

STUDIO DELLA TOSSICITÀ PER SOMMINISTRAZIONI RIPETUTE

Nota esplicativa per l'applicazione dell'allegato della direttiva 75/318/CEE, parte seconda, capitolo I, lettera B, punto 2, ai fini dell'autorizzazione all'immissione sul mercato di un nuovo medicinale

1. INTRODUZIONE

Scopo di questi studi è di ottenere informazioni sulla tossicità di un prodotto medicinale prevedibilmente destinato ad essere somministrato ripetutamente, al fine di permettere di valutare i rischi connessi con l'impiego terapeutico del prodotto stesso, tenendo anche conto dei suoi prodotti di biotrasformazione.

La durata di questi studi dipende dall'impiego proposto nell'uomo o della durata prevista per la somministrazione all'uomo. Al fine di mettere in correlazione la durata proposta per la somministrazione del farmaco nell'uomo, si propongono i seguenti periodi:

Durata proposta per il trattamento nell'uomo	*Durata suggerita per gli studi di tossicità per somministrazioni ripetute*
Una o più dosi in un giorno unico	2 settimane
Somministrazioni ripetute fino a 7 giorni	4 settimane
Somministrazioni ripetute fino a 30 giorni	3 mesi
Somministrazioni ripetute oltre 30 giorni	6 mesi

Quando è probabile che si abbia un'esposizione dell'uomo al prodotto per periodi più lunghi, ad esempio quando somministrazioni frequenti e discontinue lungo l'arco dell'anno comportino un periodo totale di esposizione uguale o superiore a un mese, ovvero quando la ritenzione nell'organismo di una singola dose del farmaco sia prolungata, la durata dello studio di tossicità per somministrazioni ripetute sarà di sei mesi.

Qualora sia necessario effettuare studi tossicologici della durata di tre o sei mesi, si potrebbe condurre uno studio di tossicità subacuta della durata di due o quattro settimane, in modo da individuare l'ordine di grandezza del dosaggio da applicare nella ricerca a più lungo termine (vedi punto 2.5).

Ciò è giustificato dal fatto che la somministrazione di dosi troppo elevate comporterebbe la sopravvivenza di un numero troppo scarso di animali nello studio a tre o più mesi, mentre la somministrazione di dosi troppo basse non darebbe luogo alla comparsa di alterazioni indotte dall'intossicazione.

1.1. **Specificazioni di carattere generale e concernenti lo studio sulla tossicità per somministrazioni ripetute**

Nell'allegato della direttiva 75/318/CEE è precisato, nella parte seconda relativa alle prove tossicologiche e farmacologiche, che gli studi sulla tossicità per somministrazioni ripetute devono fra l'altro evidenziare le soglie di tossicità. Il relativo testo recita:

«Le prove di tossicità per somministrazioni ripetute servono a mettere in evidenza le alterazioni funzionali e/o anatomo-patologiche consecutive alla somministrazione ripetuta della sostanza o dell'associazione delle sostanze attive e a stabilire le condizioni della comparsa di tali alterazioni in funzione della posologia.

In linea generale è utile che vengano fatte due prove: una a breve termine, di durata compresa tra due e quattro settimane, e una a lungo termine, di durata dipendente dalle condizioni di applicazione clinica. Quest'ultima prova serve a stabilire i limiti di innocuità sperimentale del prodotto esaminato e dura per lo più da tre a sei mesi».

Poiché l'unico modo per identificare dette soglie è quello di superarle, lo studio sulla tossicità a dosi ripetute deve essere concepito in modo da porre in risalto i sintomi di intossicazione. Ciò implica quanto segue:

1.1.1. Ai fini degli studi a lungo termine che devono precedere la commercializzazione, è opportuno scegliere, nell'ambito della consueta gamma di animali da laboratorio usati negli studi di tossicità per somministrazioni ripetute, le specie che si avvicinano di più all'uomo per quanto riguarda il metabolismo e la farmacocinetica del farmaco in esame. Se si hanno notevoli differenze nel metabolismo, è necessario tenerne conto nella valutazione dei risultati.

1.1.2. Sempre che le conoscenze e le possibilità pratiche lo permettano, è auspicabile che, nelle specie utilizzate, gli organi bersaglio degli effetti farmacologici del prodotto siano gli stessi previsti per la terapia umana.

1.1.3. Il dosaggio, la via e la frequenza di somministrazione devono essere previsti in modo da favorire l'accumulo nell'organismo animale di una quantità del prodotto e dei suoi metaboliti sufficiente ad evidenziare gli effetti nocivi secondari sull'organo, o sugli organi, che ne costituiscono il bersaglio. Nello stabilire il protocollo di sperimentazione si terrà conto della farmacocinetica del farmaco.

La somministrazione continua di un farmaco a dosi sufficientemente elevate può condurre a raggiungere i seguenti stadi principali:

a) accumulo del farmaco nell'organismo, fino all'instaurazione di uno stato di regime;

b) adattamento dell'organismo all'accumulo, relativamente agli organi bersaglio dell'attività farmacologica, agli enzimi di biotrasformazione e ai meccanismi di escrezione;

c) in taluni casi, attivazione di una via metabolica secondaria a seguito di un sovraccarico della via primaria di disintossicazione con conseguente possibile nuovo metabolita tossico;

d) manifestazioni tossiche a carico dell'organo bersaglio, che possono andare dall'insufficienza funzionale fisiologica alle alterazioni patologiche.

Nel corso delle prove di tossicità per somministrazioni ripetute, la dose e la durata di somministrazione del farmaco dovranno essere insufficienti a raggiungere lo stadio finale d), in modo che si possa determinare il tipo di intossicazione provocata da un dosaggio eccessivo e il multiplo della dose terapeutica capace di provocare tale intossicazione. In pratica, non tutti i farmaci possono essere somministrati a dosaggio da produrre una tossicità d'organo: in questo caso, occorre dimostrare che è stata somministrata la massima dose possibile e che vi è stato assorbimento sistemico del farmaco.

2. SPECIFICHE RELATIVE AL FARMACO E ALLA SUA SOMMINISTRAZIONE

2.1. **Qualità del farmaco**

Se è possibile, le impurezze contenute nel principio attivo devono essere identiche a quelle presenti nel prodotto da commercializzare. Qualora risultasse che il farmaco impiegato nella preparazione destinata alla somministrazione finale contiene impurezze notevolmente diverse per quantità o qualità da quelle della partita di medicinali di prova, andranno prese ulteriori iniziative per accertarsi della loro eventuale tossicità. Se il farmaco deve essere somministrato per via orale, possono essere importanti le sue caratteristiche fisiche, come ad esempio la dimensione delle particelle; di conseguenza, nello studio sulla tossicità per somministrazioni ripetute devono essere specificate in ciascun caso le caratteristiche fisiche e la stabilità della sostanza in esame. Ogni qualvolta in uno studio di tossicità per somministrazioni ripetute si fa uso di più di un lotto di principio attivo, ciò dev'essere precisato. Il lotto o i lotti utilizzati nello studio di tossicità non devono avere un grado di purezza superiore a quello dei lotti destinati al prodotto finito. Quando il farmaco è somministrato con il cibo o l'acqua potabile, deve essere accertata la sua stabilità in questi veicoli.

Quando si impiega per la prima volta un nuovo eccipiente, esso dev'essere studiato con gli stessi criteri di un nuovo principio attivo.

2.2. **Durata della somministrazione**

La durata di questi studi dev'essere in relazione con quella dell'impiego terapeutico proposto per l'uomo (vedi punto 1).

2.3. **Via di somministrazione**

Ogni qual volta ciò sia tecnicamente realizzabile, il prodotto deve essere somministrato attraverso la via prevista per l'uomo ed è auspicabile che questa consenta di dimostrare il suo effetto farmacologico. Qualora ciò sia impossibile, si devono prendere in esame altre vie di somministrazione (la somministrazione per inalazione è trattata nell'appendice).

La quantità di farmaco assorbito dalla sede della somministrazione dovrebbe essere nota dagli studi di farmacocinetica. Se il prodotto viene somministrato con il cibo o con l'acqua potabile, deve essere garantito l'assorbimento di una quantità ragionevole e nota del farmaco ingerito. Il dosaggio previa incorporazione della sostanza in esame nella dieta e nell'acqua potabile richiede una regolare correzione della sua quantità negli alimenti o nell'acqua, tale da tener conto della crescita dell'animale e della variabilità dei consumi.

Oltre alla tossicità generale, la possibilità di una tossicità locale nel luogo stesso d'applicazione deve essere oggetto di grande attenzione, come ad esempio nei casi di applicazione cutanea, vaginale, endovenosa, intramuscolare, rettale, sottocutanea, intrarticolare, endorachidea, congiuntivale, endonasale ed auricolare, oppure quando si ha una somministrazione per inalazioni.

2.4. **Frequenza di somministrazione**

Per alcuni prodotti, lo stato di regime dell'accumulo nell'organismo si raggiunge soltanto quando essi vengono somministrati sette giorni alla settimana. Di norma, qualsiasi farmaco deve essere somministrato agli animali su questa base. Se ciò non è possibile, il fatto deve essere giustificato. Se la velocità di eliminazione è lenta, si può ricorrere a una somministrazione meno frequente. Se invece l'eliminazione è rapida, o se vi è intolleranza gastrica, può rivelarsi necessario somministrare il prodotto più volte al giorno.

2.5. **Dosi**

Il trattamento deve comprendere:

a) una dose elevata, tale da provocare, se possibile, una tossicità d'organo, ovvero, dove questa non si manifesti, altri fenomeni tossici aspecifici, oppure sino al limite costituito dal volume.

   Per uno studio tossicologico a tre od a sei mesi, la dose da somministrare deve essere desunta da una sperimentazione di tossicità subacuta a due o quattro settimane, concepita al fine di individuare il campo di dosaggio;

b) una dose bassa, sufficiente a produrre un effetto farmacodinamico o l'effetto terapeutico ricercato, oppure a determinare livelli ematici paragonabili a quelli presumibilmente capaci di produrre tali effetti nell'uomo;

c) una dose intermedia, pari ad esempio alla media geometrica tra la dose maggiore e quella minore;

d) uno o più gruppi di controllo: in casi speciali, può essere necessario un gruppo di controllo positivo.

In ogni modo, le considerazioni di cui sopra non si applicano quando l'effetto farmacodinamico è in sé stesso causa di tossicità (valga quale esempio l'effetto ipoglicemizzante degli antidiabetici).

Il ricercatore deve indicare il criterio da lui prescelto quale base dei livelli di dose.

2.6. **Pro-farmaci**

Quando il prodotto somministrato è un pro-farmaco, occorre dimostrare che nella specie animale in esperimento esso si trasforma nel principio attivo.

3. SPECIFICHE INERENTI AGLI ANIMALI DA ESPERIMENTO

3.1. Specie animali: scelta e caratterizzazione

Nei limiti del possibile, le specie devono essere scelte sulla base della loro similitudine all'uomo dal punto di vista della farmacodinamica, compresa la biotrasformazione del prodotto (vedi punto 1.1.1). Se possibile, l'effetto farmacodinamico del medicamento dovrebbe essere dimostrato su almeno una delle specie, in modo da fornire informazioni sul margine tra effetti terapeutici ed effetti tossici. Il ricercatore deve giustificare la scelta delle specie e del ceppo. Di solito, l'impiego di animali SPF (esenti da germi patogeni specifici) aumenta il valore dello studio.

3.2. Sesso

Normalmente si dovranno usare un numero uguale di animali dei due sessi.

3.3. Dimensione dei gruppi da esperimento

Quando si prende in considerazione la dimensione dei gruppi di esperimento va tenuto presente quanto segue:

a) la consistenza numerica dei gruppi trattati deve essere tale da permettere di rivelare tutti gli effetti tossicologicamente significativi del trattamento;

b) la consistenza numerica dei gruppi trattati deve essere tale da consentire il sacrificio di animali a determinati intervalli prima della fine del trattamento senza che ciò interferisca non l'analisi statistica finale;

c) la consistenza numerica dei gruppi trattati deve essere tale da permettere la conservazione di un certo numero di animali al termine del trattamento, in modo da determinare la reversibilità delle alterazioni tossiche;

d) nei riguardi delle dimensioni dei gruppi è altresì importante una buona conoscenza del campo di variazioni dei parametri studiati nelle specie e nei ceppi impiegati.

Tuttavia la consistenza dei gruppi campione e dei gruppi trattati sarà sempre limitata da fattori pratici e finanziari nonché da considerazioni umanitarie.

3.4. Numero delle specie

Lo studio di tossicità a dosi ripetute deve mirare a fornire un modello animale per la somministrazione reiterata del prodotto all'uomo. Il valore del modello nei riguardi dell'estrapolabilità all'uomo dipende in ampia misura dall'analogia qualitativa tra il modello animale e l'uomo; di solito, tale analogia costituisce un'incognita. Per ridurre il rischio di errori nell'estrapolazione, dovuti a determinati effetti tossici, o alla loro mancanza, caratteristica di una data specie, è necessario ricorrere ad almeno due specie, una delle quali non appartenente ai roditori. La scelta deve essere giustificata (vedi punto 1.1.1).

4. STABULAZIONE DEGLI ANIMALI

La stabulazione degli animali deve avvenire in condizioni ottimali; le condizioni ambientali devono essere controllate e la dieta deve avere composizione costante e nota durante tutta la durata dell'esperimento. La relazione deve menzionare le misure adottate per realizzare queste condizioni.

5. OSSERVAZIONI

5.1. Dati di controllo e pre-trattamento

Per i mammiferi di piccola taglia è necessario disporre di dati di controllo della colonia, concernenti tutte le variabili morfologiche, biochimiche e fisiologiche. Nel caso degli animali più grossi si deve poter disporre dei dati pre-trattamento per gli individui utilizzati nella sperimentazione.

5.2. **Controlli in corso di studio**

5.2.1. *Controllo generale*

Durante lo studio è necessario procedere ad un controllo generale che comprenda il consumo del cibo, il peso corporeo, l'ematologia, la chimica clinica, l'analisi delle urine, l'oftalmologia, l'elettrocardiogramma e il comportamento generale. La scelta delle tecniche e delle prove di altro genere devono adeguarsi al livello delle conoscenze al momento della sperimentazione e alla specie animale usata. Qualora nel caso dei roditori siano richiesti l'elettrocardiogramma ed esami oftalmologici od altri esami specialistici, questi possono essere effettuati su un numero limitato di animali per ciascuna dose.

5.2.2. *Frequenza dei controlli*

La frequenza dei controlli compresi fra quello iniziale e quello finale deve essere adattata alle manifestazioni tossiche nonché alla farmacocinetica del farmaco.

Le varie prove (compresa la raccolta di sangue) eseguite durante lo studio devono essere effettuate anche sugli animali di controllo e non comportare, negli animali da esperimento, influenze rispetto all'interpretazione finale dei risultati della prova di tossicità.

5.2.3. *Consumo di cibo*

Se i prodotti sono somministrati nel cibo, è necessario rivolgere particolare attenzione al loro effetto sul relativo consumo. Occorre tener conto degli effetti che ne derivano sull'assorbimento del farmaco.

5.3. **Controlli finali**

I rilievi finali devono essere completi il più possibile. Tutti gli animali devono essere sottoposti ad autopsia. Occorre effettuare esami istopatologici su tutti gli organi e i tessuti degli animali appartenenti al gruppo a dosaggio più elevato e al gruppo di controllo elencati nella tabella. Sui roditori, l'esame dei gruppi che hanno ricevuto le dosi minori può essere limitato agli organi ed ai tessuti che all'autopsia mostrano alterazioni di carattere patologico. In altre specie, se si impiega un numero limitato di animali, gli esami istopatologici sui tessuti elencati devono essere effettuati su tutti gli individui e a tutte le dosi.

Se gli organi non sono stati sottoposti ad un esame microscopico, si procederà alla preparazione di inclusioni in paraffina o di vetrini, da conservarsi per la durata di cinque anni a partire dalla data di immissione sul mercato, ai fini di eventuali esami. Particolarità riscontrate nella distribuzione del farmaco possono richiedere esami istopatologici speciali.

6. INTERFERENZA IMMUNOLOGICA

Il rapido sviluppo dell'immunologia e il riconoscimento della sua importanza ha reso necessario rivolgere attenzione all'interferenza dei farmaci sul sistema immunitario, anche se questa non rientra nell'ambito delle attività previste. Siffatta interferenza può provocare effetti collaterali indesiderati (interferenza con infezioni; carcinomi). Pertanto è particolarmente importante, al termine dello studio tossicologico, esaminare macroscopicamente la milza, il timo e alcuni linfonodi. Questo esame potrebbe evidenziare eventuali effetti sul sistema immunitario e quindi la necessità di ulteriori prove.

Tenuto conto dei continui progressi delle conoscenze in questo settore, qualsiasi prova intesa ad evidenziare gli effetti immunologici di un farmaco deve fondarsi sullo stato delle conoscenze scientifiche al momento della sperimentazione.

7. CONCLUSIONI

È compito del ricercatore trarre le conclusioni da questi studi.

Appendice A

Elenco dei tessuti da studiare istologicamente nello studio di tossicità per somministrazioni ripetute

— Lesioni macroscopiche

— Masse di tessuti o di tumori (compresi i linfonodi regionali)

— Strisci di sangue (in caso di anemia, di ingrossamento del timo, di linfadenopatia)

— Gangli linfatici

— Ghiandole mammarie

— Ghiandole salivari

— Costole, femore o vertebre (compreso il midollo osseo)

— Ipofisi

— Timo

— Trachea

— Polmoni

— Cuore

— Tiroide

— Esofago

— Stomaco

— Intestino tenue (metodo «Swiss roll»)

— Colon

— Fegato

— Cistifellea

— Pancreas

— Milza

— Reni

— Surreni

— Vescica

— Prostata

— Testicoli

— Ovaie

— Utero

— Cervello (sezione coronale a tre livelli)

— Occhi

— Midollo spinale

Appendice B

Esecuzione di studi sulla tossicità per inalazione

1. INTRODUZIONE

I farmaci destinati ad essere somministrati all'uomo mediante inalazione possono essere sotto forma di aerosol contenenti la sostanza attiva allo stato liquido o solido oppure essere sotto forma di vapori o di gas. Questi ultimi vengono usati come anestetici per inalazione, mentre gli aerosol contengono in genere un farmaco sotto forma di particelle presenti in un propellente che, in linea di massima, dovrebbe essere biologicamente inattivo.

Gli studi di tossicità per inalazione sono necessari quando:

a) la farmacocinetica di una sostanza somministrata per inalazione può differire qualitativamente o quantitativamente da quella corrispondente ad altre vie di somministrazione;

oppure:

b) il farmaco ed il propellente possono interagire nell'organismo;

oppure:

c) il prodotto inalato può esercitare un effetto locale sulle vie aeree, sia a breve termine (effetto sulla funzione ciliare o altri sintomi di irritazione locale), oppure a lungo termine (enfisema, bronchite, tumori).

Gli aerosol vengono utilizzati per la somministrazione di farmaci destinati i) ad esercitare un effetto topico nell'apparato respiratorio, oppure ii) effetti sistemici utilizzando la superficie delle vie respiratorie per l'assorbimento del farmaco attivo, oppure iii) per evitare le eventuali alterazioni prodotte dall'apparato gastrointestinale.

In taluni casi, gli studi tossicologici sul farmaco in questione possono essere eseguiti utilizzando altre vie di somministrazione; di conseguenza un ampio esame tossicologico in base ad altre vie di somministrazione può già essere stato effettuato quando si prevedono studi relativi all'inalazione. In altri casi, ad esempio per quanto riguarda farmaci ad effetto topico come i mucolitici, l'esame tossicologico per altre vie di somministrazione può rivelarsi superfluo o non essere disponibile. Nella programmazione degli studi tossicologici per inalazione è opportuno tener conto dei dati esistenti sulla tossicologia o farmacologia del prodotto.

2. PROPRIETÀ FISICO-CHIMICHE

I dati relativi alle proprietà fisico-chimiche del farmaco debbono essere forniti come per ogni altro studio tossicologico. È necessaria un'informazione supplementare sulle caratteristiche dell'aerosol, che indichi la distribuzione delle particelle o la dimensione delle goccioline della sostanza attiva, nonché le caratteristiche fisico-chimiche del o dei prodotti utilizzati come propellenti.

Il propellente utilizzato in questi studi dovrà essere quello proposto per il prodotto finale. Nel caso sia utilizzato un nuovo propellente, questo deve essere studiato come un nuovo farmaco.

3. DOSAGGIO

3.1. **Somministrazione**

Il metodo di somministrazione dipende dalla natura del farmaco e dall'uso previsto nell'uomo. Nel corso di studi di tossicità acuta può rivelarsi opportuno somministrare il farmaco direttamente nelle vie respiratorie mediante sonda nasotracheale oppure tracheotomia. In tal modo è possibile determinare direttamente la quantità somministrata.

Nel caso di studi di esposizione a lungo termine sarà necessario, di norma, utilizzare sia camere o maschere di esposizione per la «sola testa» o il «solo naso». Se si ricorre all'esposizione del corpo intero, si dovrà tener conto, nella determinazione della dose somministrata,

di quanto farmaco si deposita sulla pelle, nel pelo, nelle vie respiratorie superiori e della quantità ingoiata.

È opportuno dimostrare che il metodo di somministrazione garantisce che il farmaco raggiunge la sede desiderata.

3.2. **Dosi**

Dovrebbero essere utilizzati di norma tre dosi e uno o più gruppi di controllo negli studi con dose singola e con dosi ripetute. Si possono raggiungere livelli di esposizione differenti variando la concentrazione della sostanza inalata oppure la durata dell'esposizione stessa. Nel limite del possibile, la scelta delle dosi dovrebbe seguire gli stessi criteri applicati negli studi di tossicità relativi ad altre vie di somministrazione.

La scelta di particolari dosi dovrebbe essere giustificata.

3.3. **Durata dello studio**

La durata dello studio dovrebbe essere connessa, almeno in una certa misura, all'esposizione umana prevista.

4. FARMACOCINETICA E METABOLISMO

Il quadro metabolico del farmaco somministrato per inalazione può differire da quello osservato con altre vie di somministrazione. Il ricercatore dovrebbe determinare se esistono differenze farmacocinetiche e metaboliche di rilievo per l'interpretazione degli studi di tossicologia per inalazione.

Quando si hanno biotrasformazioni nel polmone stesso, è opportuno tener conto della possibilità di una induzione enzimatica a questo livello.

5. ANIMALI

Gli animali da esperimento utilizzati in questi studi dovrebbero essere privi di infezioni polmonari e presentare una bassa incidenza di altre patologie polmonari.

Il numero di animali sperimentali da utilizzare in ciascun gruppo dovrebbe essere sufficiente per un'analisi statistica e verrà determinato dalla durata dell'esperimento e dal numero delle osservazioni, delle misurazioni e dei sacrifici ad interim durante il periodo di esposizione. Per tutti gli studi di esposizione ripetuta dovrebbe utilizzarsi almeno una specie di roditori e una specie di non roditori.

6. OSSERVAZIONI

Il controllo intermedio e gli studi finali debbono essere eseguiti come indicato per gli altri studi di tossicità. Particolare attenzione sarà rivolta a qualsiasi effetto locale. Se il farmaco deve essere somministrato ripetutamente, possono essere necessari studi particolari sulla funzione ciliare e sulla microflora.

Il controllo del livello ematico e del propellente o altri metodi per valutare la quantità assorbita di farmaco e di propellente dovranno essere eseguiti ad intervalli di tempo negli studi per somministrazioni ripetute.

Esame finale

A conclusione dello studio tutti gli animali dovranno essere sottoposti ad autopsia e ad esami istopatologici come in altri studi di tossicologia.

Negli studi di somministrazione per inalazione è opportuno pesare i polmoni di tutti gli animali e procedere ad un esame istopatologico dei tessuti prelevati ad ogni livello di esposizione dell'apparato respiratorio e del corrispondente tessuto linfatico.

7. PRESENTAZIONE DEI RISULTATI E CONCLUSIONI

Le conclusioni ed i risultati dovranno essere redatti come per altri studi di tossicità. È compito del ricercatore trarre le opportune conclusioni.

ALLEGATO II

ESAME DELLA FUNZIONE RIPRODUTTIVA

Nota esplicativa per l'applicazione dell'allegato della direttiva 75/318/CEE, parte seconda, capitolo I, lettere C e D, ai fini dell'autorizzazione all'immissione sul mercato di un nuovo medicinale

GENERALITÀ

Lo studio degli effetti dei farmaci sulla riproduzione deve essere condotto su tutti i nuovi farmaci in modo da mettere in rilievo eventuali effetti sull'accoppiamento, nonché effetti che possano tradursi nella perdita del feto, in una anormalità dello stesso o della discendenza in un periodo ulteriore, come ad esempio:

i) modifiche della fertilità o procreazione anormale dovuta a danni dei gameti maschili e/o femminili;
ii) interferenza con le fasi di preimpianto e di impianto dello sviluppo fetale;
iii) effetti tossici sull'embrione;
iv) effetti tossici sul feto;
v) modifiche della fisiologia materna con conseguenti effetti tossici secondari sull'embrione o sul feto;
vi) effetti sulla crescita o sullo sviluppo dell'utero o della placenta;
vii) interferenza col parto;
viii) effetti sullo sviluppo postnatale, sull'allattamento e sulla capacità di prendere il latte da parte dei nati;
ix) effetti tardivi sulla discendenza.

ISTRUZIONI SPECIFICHE

Nell'interpretazione delle seguenti linee direttrici è necessario tenere presente che non si tratta di criteri rigidi, né di principi d'applicazione universale. Pertanto l'interpretazione deve restare elastica e connessa con l'uso proposto per il farmaco. È necessario motivare la scelta degli studi.

1. SELEZIONE DELLE SPECIE

È opportuno che gli studi sulla tossicità embrionale siano effettuati su due specie di mammiferi, una delle quali non roditrice. Gli studi sulla fertilità e quelli perinatali dovrebbero essere effettuati su almeno una specie. Quando sia noto che il metabolismo di un farmaco in una determinata specie è simile a quello nell'uomo, è consigliabile includere questa specie. È auspicabile che una di queste specie sia già stata scelta per studi di tossicità a lungo termine. Studi effettuati su una terza specie potranno essere utili qualora gli studi condotti sulle due specie iniziali abbiano dato risultati contrastanti. Dovranno essere specificate le specie ed i ceppi usati negli studi.

2. DOSI

Di regola il dosaggio verrà effettuato a tre livelli: la dose maggiore dovrebbe essere tale da mettere in evidenza una qualche tossicità nella madre, per esempio una diminuzione dell'accrescimento ponderale; la dose minore dovrebbe essere sufficiente a produrre un effetto farmacodinamico analogo all'effetto terapeutico auspicato o a determinare livelli ematici paragonabili a quelli necessari a produrre l'effetto stesso (ciò non vale se l'effetto farmacodinamico è di per sé stesso tossico). La dose intermedia sarà la media geometrica tra la dose maggiore e quella minore.

Le dosi saranno somministrate per la via o per le vie previste per la somministrazione clinica.

Gli schemi di somministrazione delle dosi per l'esame degli effetti di un farmaco sulla riproduzione devono comprendere, di norma, quanto segue:

a) studi di embriotossicità: somministrazione delle dosi per tutta la durata dell'embriogenesi (organogenesi) in due specie di cui una non roditrice;

b) lo studio sulla fertilità deve essere condotto su almeno una specie. La somministrazione del farmaco avrà inizio nei maschi e nelle femmine con un anticipo sull'accoppiamento previsto sufficiente per poter mettere in evidenza gli eventuali effetti del farmaco sulla gametogenesi. Animali «trattati» possono essere accoppiati con partner «trattati» ma, nel caso di risultati positivi di un difetto di riproduzione, si ripeterà l'esperimento facendo accoppiare animali «trattati» con partner «non trattati».

   La metà delle femmine verrà sacrificata durante la gestazione, preferibilmente qualche giorno prima della data prevista per il parto; i feti saranno rimossi con taglio cesareo ed esaminati. Le femmine restanti dovranno essere lasciate figliare normalmente ed allattare la prole;

c) saranno effettuati studi perinatali su almeno una specie. La somministrazione del farmaco deve coprire il periodo di gestazione compreso tra la fine dell'organogenesi ed il parto ed essere proseguita per tutta la durata del periodo di lattazione fino allo svezzamento.

3. NUMERO DI ANIMALI

Per ciascuna dose verrà impiegato un numero di animali adeguato per una corretta valutazione dei risultati. Fatta eccezione per i primati, si suggerisce il seguente numero minimo per ogni dose:

a) studi di embriotossicità: 20 femmine gravide dell'ordine dei roditori, 12 femmine gravide di specie non roditrice;

b) studi sulla fertilità: 24 femmine e 24 maschi;

c) studi perinatali: 12 femmine gravide.

Se si usa una terza specie, si suggerisce di impiegare un congruo numero di animali «trattati» e di animali di controllo, al fine di poter trarre dallo studio risultati validi.

4. STABULAZIONE DEGLI ANIMALI E DIETA

Devono essere specificate tutte le condizioni relative alla stabulazione e alle gabbie degli animali, nonché alla dieta (compresi gli additivi).

5. FARMACOCINETICA

Nell'effettuare studi sulla riproduzione si dovrà tener conto della farmacocinetica del farmaco negli animali gravidi. Nei limiti tecnicamente possibili, si dovrà determinare il livello di esposizione del feto al farmaco.

6. VALUTAZIONI

a) Dovranno essere sottoposti ad esame i feti degli animali «trattati» durante il periodo dell'embriogenesi: gli animali pertanto saranno sacrificati ed i feti rimossi mediante taglio cesareo. Per questi animali verrà registrato il numero dei corpi lutei, dei punti di impianto (quelli visibili e quelli evidenziati con un metodo specifico, per esempio con il metodo di Salewsky), i riassorbimenti, il peso ed il sesso di ciascun feto. Di ogni feto si osserveranno le anomalie esterne, o si esaminerà lo scheletro o i visceri, oppure entrambi. Qualora venissero rivelate evidenti anomalie, sarà opportuno procedere ad altri esami del caso. Si dovrà rivolgere particolare attenzione nel caso si riscontri un numero eccessivo di riassorbimenti; questo dato potrebbe suggerire la necessità di ulteriori studi sugli effetti teratogeni nelle prime fasi di gravidanza.

b) Negli studi sulla fertilità, i feti delle madri sacrificate nel periodo di gestazione saranno estratti mediante taglio cesareo. Verranno effettuati i seguenti rilievi: numero di corpi lutei, punti di impianto, riassorbimenti, peso e sesso di ciascun feto; verranno inoltre ricercate le eventuali anomalie dello scheletro e/o dei visceri in ogni feto.

Per quel che riguarda gli animali «trattati» per lo studio della fertilità, lasciati figliare normalmente e nutrire la loro prole fino allo svezzamento, è opportuno lasciar vivere e giungere a maturità un numero abbastanza elevato di detta prole, in modo da consentire ulteriori esami. Si esamineranno eventuali effetti tardivi del farmaco sulla prole in relazione a possibili alterazioni dell'udito, della vista e del comportamento. Sarà determinata nella discendenza la funzione riproduttiva, consentendo al almeno un maschio ed una femmina di ciascuna nidiata di animali di accoppiarsi ed avere un'altra nidiata (non è previsto l'accoppiamento fratello-sorella).

c) Le femmine «trattate» nel periodo prenatale e postnatale devono essere lasciate figliare spontaneamente e la loro prole sarà esaminata al momento dello svezzamento. Tutti gli animali sacrificati alla fine della lattazione saranno sottoposti ad accurata autopsia. In certi casi, parte della prole sarà lasciata vivere e raggiungere la maturità, in modo da poterne valutare la capacità riproduttiva, e determinare altresì gli effetti tardivi del farmaco sulla prole dal punto di vista delle alterazioni del comportamento, della vista e dell'udito.

7. CONCLUSIONI

Si chiede che il ricercatore tragga conclusioni globali dai risultati di questi studi indicando:

a) che non si sono manifestati effetti negativi del farmaco sulla funzione riproduttiva; oppure

b) che si sono manifestati effetti negativi, da specificare, sulla funzione riproduttiva; oppure

c) che i dati non sono sufficienti a trarre conclusioni.

Se particolari indagini sono state omesse, il ricercatore deve giustificare tale omissione.

Appendice

Durata della gametogenesi

Negli studi effettuati su animali dell'ordine dei roditori, il trattamento dei maschi sia almeno di 60 giorni e quello delle femmine di almeno 14 giorni prima dell'accoppiamento. Gli animali dovrebbero avere circa 40 giorni di età all'inizio del trattamento. Tali dati sono considerati adeguati allo stadio attuale delle conoscenze scientifiche.

ALLEGATO III

POTERE CANCEROGENO

Nota esplicativa per l'applicazione dell'allegato della direttiva 75/318/CEE, parte seconda, capitolo 1, lettera E, ai fini dell'autorizzazione all'immissione sul mercato di un nuovo medicinale

La prova più evidente che un composto possa essere cancerogeno per l'uomo è di ordine epidemiologico; si può però dire che la maggior parte delle sostanze notoriamente cancerogene per l'uomo si sono rivelate tali anche per gli animali da laboratorio. Non esiste invece prova sicura che tutte le sostanze cancerogene per gli animali lo siano anche per l'uomo, pur essendo difficile affermare che un farmaco non sia cancerogeno per l'uomo quando sia stata provata la sua carcinogenicità negli studi sugli animali.

L'estrapolazione all'uomo è una procedura difficile e talvolta arbitraria; l'ideale sarebbe di analizzare i meccanismi che fanno aumentare l'incidenza dei tumori sperimentali e di determinare se tali meccanismi, implicanti vie biochimiche specifiche e portanti alla formazione del composto cancerogeno terminale, siano applicabili all'uomo. I criteri di estrapolazione variano a seconda della sostanza considerata, dell'uso cui è destinata, della dose e del metodo di somministrazione, nonché della specie, della localizzazione, dell'incidenza dei tumori e della dose necessaria.

La probabilità del rischio di carcinogenicità per l'uomo aumenta se esiste un'elevata produzione di tumori maligni in un tessuto specifico allorché si somministra la sostanza in esame all'animale da laboratorio per la stessa via prevista per la sua somministrazione all'uomo e ad una dose pari o inferiore a quella che determina una tossicità minima. Tuttavia, in mancanza di un sicuro livello di soglia, l'aumento del numero dei tumori benigni o di tumori maligni a seguito di dosi più elevate, oppure la riduzione della latenza, vanno interpretati come elementi di un possibile rischio per l'uomo. In queste circostanze l'agente è generalmente considerato meno attivo e diventa quindi più facile confrontare il rischio con i vantaggi offerti dall'uso terapeutico del farmaco.

1. NECESSITÀ DI STUDI DI CARCINOGENICITÀ

Gli studi di carcinogenicità sono di norma indispensabili nei casi seguenti:

a) quando appare possibile che un farmaco sia somministrato con regolarità per un periodo abbastanza lungo (per almeno 6 mesi in modo continuo oppure in modo frequente e discontinuo, in modo da dare un'esposizione globale analoga);

b) quando la struttura chimica del farmaco fa sospettare una carcinogenicità potenziale;

c) quando il farmaco può provocare dubbi a causa di:

   i) taluni aspetti specifici della sua azione biologica (ad esempio, appartenenza a una categoria terapeutica in cui vari membri hanno dato risultati positivi sul piano della carcinogenicità);

   ii) il suo quadro di tossicità o una ritenzione a lungo termine (del farmaco o dei metaboliti) rilevati nel corso di studi precendenti;

   iii) la positività in prove di mutagenicità e/o in prove di carcinogenicità a breve termine.

Le prove di carcinogenicità possono essere ritenute superflue quando il farmaco in oggetto viene usato soltanto in pazienti la cui vita attesa sia inferiore al periodo nel corso del quale una sostanza chimica può rivelarsi cancerogena per l'uomo. Se le circostanze cambiassero e se uno di questi farmaci venisse usato in condizioni meno gravi, le prove di carcinogenicità diventerebbero necessarie. Le sostanze insolubili che non vengono assorbite possono non necessitare di studi formali di carcinogenicità.

2. SCELTA DELLE SPECIE E DEI CEPPI

Gli studi di carcinogenicità, quando necessari, dovrebbero essere effettuati di norma su due specie. È opportuno conoscere il comportamento metabolico del farmaco nelle specie in esame e questo dovrebbe preferibilmente avere una certa analogia con il metabolismo umano. È bene tener conto delle reazioni delle specie e di ceppi usati nei riguardi di prodotti chimici analoghi. Di norma, è bene evitare specie e ceppi caratterizzati da elevata incidenza di tumori spontanei. Chi conduce questi studi dovrebbe scegliere specie e ceppi la cui sensibilità a uno o più agenti carcinogeni sia nota. Non è indispensabile effettuare controlli positivi regolarmente, ma l'incidenza di tumori spontanei nei ceppi in esame deve essere rilevata.

3. DOSI

a) *Via e frequenza di somministrazione*

Se possibile, le dosi debbono essere somministrate per la stessa via proposta nell'uomo. Se importante, dovrà essere dimostrato l'assorbimento del farmaco. La frequenza di somministrazione dovrà essere di norma giornaliera.

b) *Livelli di dose*

Le prove di carcinogenicità devono normalmente effettuarsi a tre livelli di dose. La dose massima deve esercitare un effetto tossico minimo, per esempio una perdita di peso del 10 %, un cattivo accrescimento, oppure una tossicità minima nell'organo bersaglio. La tossicità nell'organo bersaglio risulterà dimostrata dal venir meno di talune funzioni fisiologiche e, alla fine, dalla presenza di alcune alterazioni di tipo patologico. La dose minima deve essere pari al doppio o al triplo della dose terapeutica massima per l'uomo o della dose che produce un effetto farmacologico sull'animale. La dose intermedia rappresenterà la media geometrica delle dosi massima e minima.

Possono manifestarsi eccezioni a questi principi, per esempio quando la dose tossica del farmaco è molto più grande della dose terapeutica; in questi casi, dove sia tecnicamente possibile, la dose massima può essere fissata a 100 volte la dose terapeutica per l'uomo.

4. ASPETTI PRATICI

Gli animali devono essere in buona salute all'inizio e durante tutta la durata dell'esperimento. Quest'ultimo deve essere effettuato in condizioni di stabulazione di livello elevato. Verranno prese speciali precauzioni se le prove vertono su prodotti cancerogeni da inalare oppure volatili.

Deve essere chiaramente specificata la qualità farmaceutica della partita e delle partite usate.

a) *Età degli animali all'inizio dell'esperimento*

Gli studi di carcinogenicità devono iniziare al più presto dopo lo svezzamento, cioè non appena gli animali sono abituati al regime alimentare e all'ambiente.

b) *Durata degli studi*

Si suggerisce una durata di 24 mesi per il ratto e di 18 mesi per il topo e il criceto. Quando il tasso di sopravvivenza è elevato, può essere utile prolungare gli studi per 30 mesi nel ratto e per 24 mesi nel topo, oppure per tutta la durata della vita degli animali, ossia sino ad una sopravvivenza del 20 % degli animali di controllo.

c) *Numero di animali per gruppo*

Per le comuni prove con i topi, i ratti e i criceti si consiglia di usare 50 maschi e 50 femmine per ciascun gruppo trattato e due gruppi di controllo di 50 animali per ciascun sesso, ai quali si somministra il veicolo per la stessa via (nella maggior parte dei casi viene aggiunto al cibo).

d) *Composizione della dieta*

Le diete ideali in commercio per gli animali variano ed occorre provvedere affinché la dieta sia della massima uniformità durante tutto il periodo degli studi di carcinogenicità. Sarà opportuno fornire tutte le indicazioni relative alla dieta.

5. ULTERIORI CONTROLLI

Gli studi di carcinogenicità debbono essere programmati in modo da fornire il massimo di informazioni ottenibili dagli animali impiegati; tuttavia gli esami destinati alla raccolta di dati tossicologici supplementari non devono compromettere l'obiettivo principale, che consiste nella valutazione della potenziale carcinogenicità di un farmaco. I dati riguardanti l'assorbimento, la distribuzione e il metabolismo del farmaco, come pure le informazioni sulla capacità del prodotto di accumularsi o di dare induzione enzimatica debbono essere ottenuti in altri studi di tossicità.

6. PIANO STATISTICO DELLO STUDIO

Occorre scegliere uno schema sperimentale adeguato, in particolare:

i) Le gabbie che contengono gli animali in trattamento e quelli di controllo devono essere distribuite in modo da evitare alterazioni dei risultati imputabili a fattori ambientali.

ii) Gli animali devono essere ripartiti a caso nelle varie unità sperimentali (per esempio, le gabbie) e deve essere chiaramente descritto il criterio di questa distribuzione casuale.

iii) Qualora per ragioni di ordine pratico, dovute alla utilizzazione di un numero elevato di animali, si decida di scaglionare l'inizio dello studio, è oppurtuno che tutti i gruppi comprendano un numero uguale di animali per ogni inizio di studio. Se lo studio viene effettuato con uno scaglionamento di questo tipo, va precisato il momento in cui è cominciato l'esame dei vari gruppi di animali.

7. INDAGINI TERMINALI

7.1. **Autopsia**

Si procederà ad un'analisi completa di tutti gli animali morti durante l'esperimento o sacrificati per via della loro precaria salute. A conclusione dello studio, tutti gli animali sopravvissuti verranno sacrificati e ciascuno di essi sarà oggetto di un'autopsia completa. Gli effetti tossici constatati in precedenza possono comportare l'esame di particolari problemi. Analisi ematologiche e biochimiche possono essere utili per l'interpretazione delle lesioni rilevate.

7.2. **Istopatologia**

7.2.1. *Esami relativi alla carcinogenicità:*

i) Saranno esaminati microscopicamente tutti i tessuti e tutti gli organi che figurano nell'elenco, prelevati da tutti gli animali di controllo:

ii) i tessuti di ogni animale appartenente a ogni gruppo nel quale siano state riscontrate durante l'autopsia lesioni di qualsiasi genere;

se i risultati di i) indicano la presenza di tumori in più organi e tessuti, allora saranno esaminati;

iii) quegli organi e tessuti anche per i gruppi di animali trattati con dosi medie e basse, anche se macroscopicamente normali.

Per tutti gli animali morti o sacrificati nel corso dell'esperimento, tutti i tessuti in elenco saranno esaminati microscopicamente.

7.2.2. *Esami di tossicità*

Effetti tossici dimostrati in precedenza possono indicare la necessità di particolari indagini.

Analisi ematologiche e biochimiche che possono essere utili per l'interpretazione delle varie lesioni riscontrate. Se la somministrazione del farmaco avviene per vie diverse da quella orale, la parte dell'organismo in cui essa ha luogo sarà oggetto di esame particolarmente accurato.

8. PRINCIPI DA SEGUIRE PER LA STESURA DELLA RELAZIONE SUGLI STUDI DI CARCINOGENESI

8.1. **Definizioni**

Un neoplasma (tumore) è costituito da una popolazione di cellule anomale, caratterizzata da una moltiplicazione incontrollata ed in genere più rapida, nonché da altri aspetti morfologici e funzionali meno ben definiti. Un neoplasma maligno è un neoplasma che invade i tessuti circostanti o da metastasi. Generalmente, un tumore viene definito benigno o maligno sulla base delle sue caratteristiche istopatologiche e della correlazione stabilita dal patologo tra tali caratteristiche e il comportamento biologico che, in precedenti esperienze, è stato osservato in tumori che presentavano caratteristiche analoghe.

Per descrivere i tumori si ricorre alla terminologia istopatologica convenzionale, secondo classificazioni ben definite (per esempio, OMS).

8.2. **Presentazione dei dati**

In primo luogo sarà opportuno riassumere i risultati per ciascun gruppo di controllo, tenendo separati i sessi. Dovrà essere indicato:

1. il numero di animali esaminati ed i risultati del loro esame individuale, macro e microscopico;

2. i numeri (e le percentuali) di animali che presentano tumori di ciascun tipo identificato in un dato tessuto, distinguendo, se possibile, i tumori maligni da quelli benigni;

3. la frequenza di distribuzione del numero totale di tumori trovati nell'animale, per quegli animali con uno o più tumori, dello stesso tipo o di tipo diverso e inoltre il numero complessivo di tumori maligni riscontrati nell'animale. Se i tumori non possono essere enumerati, si procederà ad una certa qual valutazione della loro molteplicità;

4. la data di morte di ciascun animale;

5. il momento della comparsa di qualsiasi massa (a partire da una palpazione clinica) ed il suo sviluppo, nonché la sua istopatologia.

9. ANALISI DEI DATI

Il metodo di analisi e i tests di significatività statistica cui si è fatto ricorso debbono essere appropriati al tipo di dati e al disegno sperimentale. Devono essere chiaramente esposti i metodi statistici.

Le risposte debbono essere formulate come segue:

i) l'incidenza di animali presentanti tumori;

ii) l'incidenza di tumori;

iii) l'incidenza di tumori che colpiscono un dato tessuto;

iv) l'incidenza di tumori ritenuti maligni;

v) il periodo di latenza sino al manifestarsi del tumore (mediante metodi attuariali).

L'analisi verterà su quanto segue:

a) valutazione di qualsiasi effetto della sostanza in esame sulla base delle differenze riscontrate tra le risposte dei tre gruppi trattati e quelle dei due gruppi di controllo;

b) valutazione della possibilità che un qualsiasi effetto dipenda dalla dose, sulla base dell'andamento delle risposte nei tre gruppi trattati rispettivamente con la dose bassa, media ed alta. Questa valutazione è statisticamente indipendente da quella riportata al punto a).

Sarebbe opportuna una consulenza statistica professionale per valutare l'influenza di altri fattori, quali la morte degli animali in esperimento a seguito di altre malattie, nonché il sacrificio anticipato di taluni animali a seguito della presenza clinica di tumore. Vengono intenzionalmente omessi i particolari tests di significatività statistica da usare per accertare la presenza di un determinato effetto o la sua relazione con la dose somministrata. Infatti, i dati ottenuti in un esperimento possono richiedere un approccio diverso da quello dei dati ottenuti in un altro esperimento.

Si considererà che il farmaco in esame è potenzialmente capace di aumentare il rischio neoplastico non appena uno qualsiasi dei dati di cui sopra aumenti sensibilmente (o in caso di riduzione notevole del periodo di latenza). Si può ritenere che la sostanza agisca con maggiore efficacia sull'animale quando essa interferisce con parecchie delle risposte sopra riportate e si constata l'esistenza di un effetto e di un rapporto tra esso e la dose somministrata. Un aumento della frequenza dei tumori negli animali trattati rispetto ai controlli è significativo, a prescindere dai meccanismi ammessi e definiti per lo sviluppo di tali tumori, ma qualsiasi circostanza particolare dovrà essere identificata o rilevata. Si può trattare, per esempio, di meccanismi caratteristici di una specie (metabolismo della griseofulvina e della porfirina nei topi), di una intensa stimolazione delle ghiandole endocrine (in particolare per il cane) o dello sviluppo di caratteristiche fisiche peculiari della specie in esame (calcoli della vescica nel ratto).

Le varie circostanze possono comportare:

i) un aumento della frequenza oppure una riduzione della latenza dei tumori maligni;

ii) un aumento della frequenza dei tumori benigni;

iii) una induzione locale di tumori sulla zona di iniezione.

10. IMPIEGO DI STUDI DI CARCINOGENICITÀ A BREVE TERMINE

È auspicabile procedere ad una valutazione di nuove sostanze con prove di mutagenicità. Tuttavia, le tecniche disponibili che implicano prove a breve termine di prodotti chimici per l'esame della mutagenicità/carcinogenicità non sono in grado di sostituire le pove formali di carcinogenicità negli animali quali mezzi di valutazione della potenziale carcinogenicità di un farmaco. Indagini a breve termine che forniscono risultati positivi indicheranno sempre la necessità di procedere a studi formali di carcinogenicità, qualora si intenda proseguire nello sviluppo del farmaco; prove che forniscano risultati negativi non escludono la necessità di studi formali quando questi ultimi siano auspicabili per i motivi riportati al precedente paragrafo 1.

11. CONCLUSIONI

È compito del ricercatore trarre le conclusioni di questi studi.

Appendice

Elenco dei tessuti da studiare istologicamente negli studi di carcinogenicità

— Lesioni macroscopiche
— Masse di tessuti o di tumori (compresi in linfonodi regionali)
— Strisci di sangue (in caso di anemia, di ingrandimento del timo, di linfadenopatia)
— Gangli linfatici
— Ghiandole mammarie
— Ghiandole salivari
— Costole e sterno, femore o vertebre (compreso il midollo osseo)
— Ipofisi
— Timo
— Trachea
— Polmoni
— Cuore
— Tiroide
— Esofago
— Stomaco
— Intestino tenue (metodo «Swiss roll»)
— Colon
— Fegato
— Cistifellea
— Pancreas
— Milza
— Reni
— Surreni
— Vescica
— Prostata
— Testicoli
— Ovaie
— Utero
— Cervello (sezioni coronali a tre livelli)
— Occhi
— Midollo spinale

ALLEGATO IV

STUDIO DELLA FARMACOCINETICA O DEL METABOLISMO NEGLI ANIMALI SOTTO IL PROFILO DELLA SICUREZZA

Nota esplicativa per l'applicazione dell'allegato della direttiva 75/318/CEE, parte seconda, capitolo I, lettere F e G, ai fini dell'autorizzazione all'immissione sul mercato di un nuovo medicinale

1. INTRODUZIONE

Queste note riguardano l'andamento temporale dell'assorbimento, della distribuzione e dell'escrezione, nonché il metabolismo di nuovi farmaci in rapporto alla loro sicurezza. Detti dati sono necessari in numerose fasi della valutazione di un farmaco e in particolare:

a) per determinare i livelli del farmaco e dei suoi metaboliti e la loro cinetica nel sangue, nei liquidi organici e negli organi;

b) per ottenere informazioni sul rapporto tra la tossicità sull'organo bersaglio e la concentrazione del farmaco nel sangue, nei liquidi organici e negli organi;

c) per valutare la possibilità di induzione enzimatica e di accumulo del farmaco in seguito a somministrazione ripetuta;

d) per scegliere, per quanto possibile, le specie animali da impiegare negli studi tossicologici sulla base della somiglianza della loro farmacocinetica con quella dell'uomo, e per determinare l'applicabilità di detti studi tossicologici all'uomo.

2. CARATTERI DEL FARMACO

Devono essere fornite informazioni dettagliate sulle proprietà fisiche e chimiche del farmaco, nonché sulla stabilità del preparato.

Quando viene impiegato un farmaco marcato deve essere precisata la posizione della marcatura nella molecola e l'attività specifica della sostanza. Nella scelta della posizione della marcatura occorre considerare il suo probabile metabolismo.

3. METODI

I dati relativi ai livelli del farmaco e dei suoi metaboliti nel sangue, nei liquidi organici, negli organi e negli escreti possono essere ottenuti con metodi fisici, chimici o biologici. Il ricercatore deve giustificare il metodo impiegato, la sua esattezza e riproducibilità, compresa la specificità, la precisione e l'accuratezza. (Lo studio dell'andamento nel tempo degli effetti farmaco-dinamici può fornire informazioni utili addizionali).

Se si usano farmaci marcati, occorre tenere presente che il tracciante misurato nei liquidi organici può non corrispondere a quello del farmaco immodificato, ma può comprendere metaboliti e prodotti di coniugazione marcati. Occorre considerare la possibilità di uno scambio di isotopi con composti endogeni.

4. SPECIE

Le specie animali impiegate in questi studi sono, di norma, quelle usate in laboratorio per le ricerche farmacologiche e tossicologiche. La scelta di eventuali altre specie deve essere motivata. Uno studio preliminare sulla cinetica e sul metabolismo del farmaco in alcuni soggetti umani può dare informazioni utili per la scelta delle specie animali da impiegare negli studi di tossicità per somministrazione ripetuta.

5. SOMMINISTRAZIONE DEL FARMACO

Per quanto possibile, le dosi e le vie di somministrazione devono essere correlate all'impiego clinico proposto del farmaco. Una delle vie scelte deve assicurare l'assorbimento del farmaco, se ciò è importante per l'impiego umano.

6. PRESENTAZIONE DEI RISULTATI

Sui punti seguenti devono essere fornite informazioni:

i) assorbimento (assorbimento frazionale, cinetica);

ii) distribuzione negli organi e nei tessuti principali ed andamento nel tempo nei liquidi organici;

iii) semivita biologica nel sangue o nel plasma o nel siero;

iv) legame alle proteine plasmatiche;

v) caratterizzazione dei metaboliti negli escreti, e, dove possibile, identificazione dei metaboliti principali;

vi) la via di somministrazione e l'evoluzione nel tempo dell'eliminazione del medicamento e dei suoi metaboliti;

vii) se la via biliare rappresenta la via principale di escrezione, deve essere studiato l'eventuale ricircolo enteroepatico;

viii) un bilancio qualitativo della dose somministrata deve essere tentato;

ix) devono essere esaminate le possibilità di induzione enzimatica. Se quest'ultima viene dimostrata, deve essere esaminata la sua importanza nel contesto dell'impiego proposto del farmaco.

7. CONCLUSIONI

Da questi studi si devono trarre conclusioni adeguate, nell'ambito degli obiettivi di cui al punto 1.

ALLEGATO V

ASSOCIAZIONI DI SOSTANZE MEDICINALI SPECIALIZZATE

Nota esplicativa per l'applicazione dell'allegato della direttiva 75/318/CEE, parte terza, capitolo II, lettera C, punto 2, ai fini dell'autorizzazione di immissione sul mercato di un nuovo medicinale

1. MOTIVAZIONE

I richiedenti dovranno giustificare lo scopo dell'associazione di elementi attivi che si propongono. Tali farmaci verranno accettati soltanto se l'associazione proposta è razionale e basata su validi principi terapeutici.

Sarà necessario valutare i potenziali vantaggi clinici di qualunque associazione fissa come anche gli eventuali inconvenienti per stabilire se il prodotto corrisponde ai requisiti delle norme e dei protocolli sull'efficacia e sull'innocuità.

I potenziali vantaggi delle associazioni fisse sono:

1. un migliore rapporto terapeutico/tossico, per esempio come risultato di un potenziamento degli effetti terapeutici;
2. una semplificazione della terapia e quindi una maggiore collaborazione da parte del paziente.

Fra gli svantaggi delle associazioni fisse ricordiamo:

1. anche se una associazione corrisponde alle esigenze del paziente medio non può corrispondere alle esigenze di ogni singolo paziente;
2. l'accumulazione di effetti negativi.

Le associazioni possono in linea di massima non essere considerate razionali se il periodo di dimezzamento e/o la durata della loro azione differiscono notevolmente; questo principio tuttavia non si applica necessariamente quando si provi che la preparazione è terapeuticamente valida nonostante le differenze esistenti da questo punto di vista, ad esempio se un componente è destinato a facilitare l'assorbimento di un altro o se i diversi componenti esercitano i loro effetti in tempi successivi.

L'aggiunta di un ingrediente destinato a neutralizzare un effetto collaterale negativo di uno dei componenti può essere considerata accettabile soltanto se l'effetto ricorre abitualmente.

L'aggiunta di un componente che produce effetti spiacevoli con l'intento di impedire un abuso è giudicata sfavorevolmente.

Le sostanze aventi una gamma posologica critica o un indice terapeutico debole non si prestano generalmente all'aggiunta nelle associazioni di sostanze medicinali specializzate.

2. INDICAZIONI

Le indicazioni necessarie per le associazioni di sostanze medicinali specializzate devono essere tali da giustificare la presenza di ogni componente per ognuna delle indicazioni stesse. La preparazione deve essere formulata in modo che la quantità e la proporzione di ciascuno dei suoi componenti siano appropriate a tutti gli usi raccomandati.

Una «indicazione» si riferirà a una malattia riconosciuta, a una disfunzione, a una sindrome o a una entità patologica. I singoli componenti di un'associazione fissa possono servire ad attenuare contemporaneamente diversi sintomi di uno stato patologico, ma non conviene considerare ogni sintomo come un caso per il quale il composto è indicato perché esso può accompagnare altre malattie e gli altri ingredienti possono essere del tutto inutili.

3. INNOCUITÀ ED EFFICACIA

Si può distinguere tra la portata degli studi richiesti nel caso delle associazioni fisse che corrispondono strettamente alle combinazioni di elementi di uso corrente, a condizione che esse siano documentate in modo completo e attendibile, e gli studi richiesti nel caso delle associazioni che sono sostanzialmente nuove (sia perché i farmaci in questione non vengono abitualmente associati perché la composizione quantitativa è insolita, sia perché uno dei componenti è del tutto nuovo).

In linea di massima l'innocuità delle associazioni fisse dovrà essere stata studiata sugli animali con i componenti attivi nelle proporzioni presenti nel farmaco. Questa sperimentazione non sarà necessaria quando i componenti siano stati usati largamente senza danni nell'uomo, in condizioni identiche o molto simili per un lungo periodo di tempo e quando l'innocuità di tali associazioni sia stata ben documentata.

Tanto l'efficacia quanto l'innocuità di ogni associazione fissa di farmaci dovranno essere state studiate nell'uomo. In certi casi per le associazioni di farmaci già note saranno sufficienti dei dati bibliografici ben documentati. Sarà necessario procedere ad un esame clinico di una nuova associazione rispetto a uno o più dei suoi componenti allo scopo di determinare in che modo ciascuno di essi concorre al risultato finale.

4. INTERAZIONI

Si dovrebbe sempre tener conto delle possibili interazioni fra i componenti. Quando esiste la possibilità di un'interazione farmaceutica, farmacocinetica o farmacodinamica, il richiedente dovrebbe presentare i dati per comprovare che tale interazione manca oppure che la si conosce nei minimi particolari.

5. EFFETTI NEGATIVI

Qualora vi sia motivo di temere che un'associazione fissa di farmaci possa essere più nociva che utile o possa produrre effetti negativi più frequenti che non i singoli componenti, il richiedente sarà invitato a fornire le prove che ciò non si verifica nell'uso terapeutico oppure che i vantaggi dell'associazione, vale a dire la sua aumentata efficacia, sono superiori a tali inconvenienti.

6. DOSAGGIO

Tale prodotto d'associazione deve essere efficace ed innocuo in tutta la gamma delle dosi raccomandate.

7. CURE COMBINATE

I principi che si applicano ai prodotti d'associazione fissa valgono anche per la valutazione di preparati costituiti da diversi medicinali presentati congiuntamente in uno stesso imballaggio da somministrare simultaneamente o successivamente.

8. ASSOCIAZIONE E COMPLESSI CHIMICI

Agli effetti dell'applicazione delle sostanze di questo tipo che si dissociano in due o più principi attivi prima dell'assorbimento possono essere considerate delle associazioni fisse piuttosto che singole entità chimiche.