

**MASTER UNIVERSITARIO DI SECONDO LIVELLO
SPERIMENTAZIONE CLINICA DEI FARMACI**

***Farmacogenetica quale strumento della
farmacovigilanza per la predittività delle reazioni
avverse da farmaci***

Dott.ssa Barbara Barnini

PISA, 17 dicembre 2010

La terapia farmacologica presenta due problemi fondamentali: il primo è che i farmaci non hanno sempre l'effetto auspicato in tutti i pazienti (si ha la risposta attesa solo nel 50% dei casi, (1) e il secondo è che spesso i farmaci possono avere effetti collaterali di varia entità, fino ad esiti fatali.

Durante tutte le fasi della sperimentazione preclinica e clinica è valutata scrupolosamente la safety, cioè la non tossicità e tollerabilità di un farmaco, ma è quando questo viene messo in commercio che viene veramente usato su larga scala e per questo motivo talvolta le industrie farmaceutiche devono ritirare dal mercato farmaci che provocano effetti collaterali in una minoranza della popolazione, identificabile solo dopo l'immissione in commercio. In questo modo però l'accesso alla terapia viene negato anche a quanti ne potrebbero beneficiare.

Risulta pertanto quanto sia di fondamentale importanza la **farmacovigilanza** cioè quella porzione della sperimentazione clinica che si occupa della osservazione, controllo e sorveglianza dei farmaci dopo che essi, stabilita l'efficacia e quindi ottenuta l'autorizzazione di immissione al commercio (AIC), vengono utilizzati su larga scala. Le fasi sperimentali cliniche precedenti, infatti, vengono eseguite su gruppi selezionati di pazienti, in condizioni ottimali e quindi, nel momento in cui il nuovo medicinale viene somministrato alla popolazione generale, potrebbero manifestarsi alcuni effetti indesiderati non riscontrati in fase sperimentale. La farmacovigilanza può considerarsi, dunque, un sistema di monitoraggio permanente, e costituisce propriamente la Fase IV della sperimentazione farmaceutica (post - marketing).

Farmacovigilanza

Il termine **Farmacovigilanza** è stato coniato alla metà degli anni settanta ma sono stati necessari altri quindici anni, prima fosse accettata e praticata dagli organismi sanitari europei e mondiali.

La prima definizione di farmacovigilanza, formulata nel 1964 dall'Organizzazione Mondiale della Sanità è risultata limitativa in quanto prendeva in considerazione il "monitoraggio dei farmaci relativamente agli effetti collaterali", cioè il controllo e la ricerca solo delle reazioni avverse dei farmaci posti in commercio per verificarne la sicurezza. La farmacovigilanza nella sua interezza ha la finalità di controllare costantemente il farmaco, già registrato ed in commercio, durante il suo impiego nella pratica medica con lo scopo di:

- accertare la comparsa di eventuali effetti indesiderati non previsti.
- verificare gli effetti terapeutici osservati nella sperimentazione clinica, confermandoli e/o individuandone nuovi.

La Farmacovigilanza in Italia fa capo alla Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) si attiene a regole e metodi concordati con gli organismi sanitari dell'Unione Europea e definiti dall'Agenzia Europea per i Medicinali (EMA)

L'obiettivo è raccogliere informazioni sui farmaci, sulla loro efficacia e, in particolare, sulle eventuali reazioni avverse. La farmacovigilanza monitorizza anche i consumi dei medicinali. Ne promuove lo scambio dei flussi di dati tra Operatori sanitari, Aziende Farmaceutiche, Ministero della

Salute le reg. PS in contatto con l'EMA e collabora con la rete telematica europea che connette gli Stati Membri e i loro relativi organismi sanitari.

L'attività di monitoraggio delle reazioni avverse si basa sia su sistemi di segnalazioni spontanee sia sugli studi epidemiologici che sono studi osservazionali di coorte e caso-controllo.

Segnalazione spontanea

La legislazione Italiana regola la segnalazione spontanea. Dal Dicembre 1987 la segnalazione spontanea è obbligatoria per legge ed è demandato alle ASL il compito di raccogliere le apposite schede, che sono state compilate e spedite loro dai medici, ed inviarle al Ministero della Sanità. Solo con un numero adeguato di segnalazioni sarà possibile cogliere un segnale d'allarme tempestivo.

Il responsabile del servizio di Farmacovigilanza delle ASL, sovrintende la parte di controllo della segnalazione, per eventuali errori, ed è in contatto con il Ministero della Salute. L'informatizzazione del Servizio per le segnalazioni di reazione avversa ha reso il sistema semplice e rapido: può sorvegliare tutti i farmaci e coinvolgere tutti i pazienti.

I medici, i farmacisti e le aziende farmaceutiche sono tenute a segnalare ogni presunta reazione avversa della quale vengano a conoscenza nell'esercizio dell'attività professionale; la mancata segnalazione è punibile con sanzioni pecuniarie e con l'arresto fino a sei mesi. I tempi da rispettare per la comunicazione sono di tre giorni lavorativi per reazioni gravi e di sei per tutte le altre dal momento dell'avvenuta conoscenza, che si intende come il momento in cui il medico pone il dubbio diagnostico che quell'evento clinico sia una Reazione Avversa da Farmaco.

Nel compilare la scheda, il medico non deve chiedersi se la reazione sospettata può o meno essere verificata, poiché il sistema è stato creato per integrare le diverse segnalazioni e generare allarmi dalla valutazione di più rapporti provenienti da differenti fonti.

Pertanto si chiede di notificare una sospetta reazione avversa ben sapendo che il sospetto non è certezza.

Studi di coorte e caso-controllo

Gli studi post-marketing di fase IV che meglio si prestano ad essere utilizzati quali fonti di informazione per la farmacovigilanza sono studi epidemiologici di Coorte e/o Caso-Controllo.

Gli studi di coorte mirano a fare un confronto tra la frequenza di eventi nei soggetti esposti al farmaco e quella dei soggetti non esposti o esposti a un farmaco diverso mentre gli studi caso-controllo determinano nei soggetti che manifestano l'evento (casi), l'esposizione ad una serie di fattori, il confronto viene eseguito con un campione di soggetti appartenente alla stessa popolazione ma non esposti (controlli).

Quindi gli studi di coorte danno informazioni sui vari eventi di un farmaco mentre gli studi caso-controllo sono utili per confermare il rischio di un evento associato all'uso di un farmaco.

Possono essere prospettici, se gli eventi vengono registrati quando si verificano, oppure retrospettivi se gli eventi che si registrano sono già avvenuti.

Il metodo per l'identificazione precoce dei potenziali rischi correlati alle terapie farmacologiche, è il Prescription Event Monitoring (PEM). Fu ideato da William Inman, uno dei primi sostenitori della sorveglianza post-marketing dei farmaci, che nel 1980 fondò in Gran Bretagna la Drug Surveillance Research Unit.

Si tratta di una metodica di coorte osservazionale non interventistica in quanto non interferisce in alcun modo con la scelta terapeutica del medico al momento della prescrizione.

Il metodo PEM si avvale di diverse caratteristiche del sistema sanitario inglese, che comprende la registrazione di quasi tutti i pazienti insieme al loro medico di famiglia in un archivio centralizzato

L'accertamento delle reazioni avverse avviene tramite la notificazione alle Autorità Sanitarie di tutte le segnalazioni spontanee e dei **case reports**.

Un case report è una descrizione di una situazione clinica osservata in un singolo soggetto al fine di fornire informazioni per riconoscere e descrivere uno o più eventi indesiderati insorti nel paziente dopo la somministrazione del farmaco, accompagnata da una discussione sulle evidenze disponibili a sostegno o contro una eventuale relazione causale.

Benché si differenzino dalle segnalazioni spontanee di sospette reazioni avverse, proprio per la narrazione degli eventi e la discussione che ne segue, anche i case reports, da un punto di vista regolatorio sono considerati allo stesso modo e sono soggetti a obbligo di notifica .

Sulla base di tutte queste segnalazioni e dei risultati degli studi di fase IV post-marketing le Autorità sanitarie preposte alla regolamentazione dei farmaci devono provvedere a modificare adeguatamente il foglietto illustrativo inserendo nuove avvertenze ed **eventualmente escludere dall'impiego pratico un farmaco con reazioni avverse particolarmente gravi**.

La farmacovigilanza non ha limiti temporali, il periodo di osservazione di un farmaco è pari alla sua commercializzazione ed interessa tutti i soggetti coinvolti nel suo impiego. Il compito di effettuare le attività di farmacovigilanza, pertanto, spetta a tutti :medici farmacisti ed industrie farmaceutiche.

Fasi della sperimentazione clinica

Lo sviluppo clinico dei farmaci è uno dei processi più regolamentati del mondo, per il quale esistono norme che vengono stilate, in Italia, dal Ministero della Salute.

Si articola in più fasi una **preclinica** che è una fase di ricerca applicata di base, che può durare da 2 a 10 anni, durante la quale i chimici e i farmacologi sintetizzano in laboratorio molecole che poi testano sugli animali. Delle circa 10 mila molecole che vengono sintetizzate in questa fase circa 250 vengono provate sugli animali e di queste ne restano circa 5 che passano alla sperimentazione clinica vera e propria. (sinistra fig.1)

Questa inizia con la **fase I**, durante la quale si eseguono gli studi su 20-30 volontari sani con piccole dosi della nuova molecola che vengono via via aumentate fino a trovare quella di tolleranza.

A questo punto si passa alla **fase II**, durante la quale il farmaco viene somministrato a 100-400 pazienti per verificare se c'è attività ed efficacia, se queste ultime vengono verificate si passa alla

Fase III che coinvolge 1000-3000 pazienti e può durare 3-4 anni.

Se i risultati sono positivi si avvia la richiesta di autorizzazione per l'immissione in commercio, per la quale occorrono 1-2 anni, e si può passare alla commercializzazione

cui segue la **fase IV** per la valutazione, tra l'altro, degli effetti indesiderati a lungo termine.

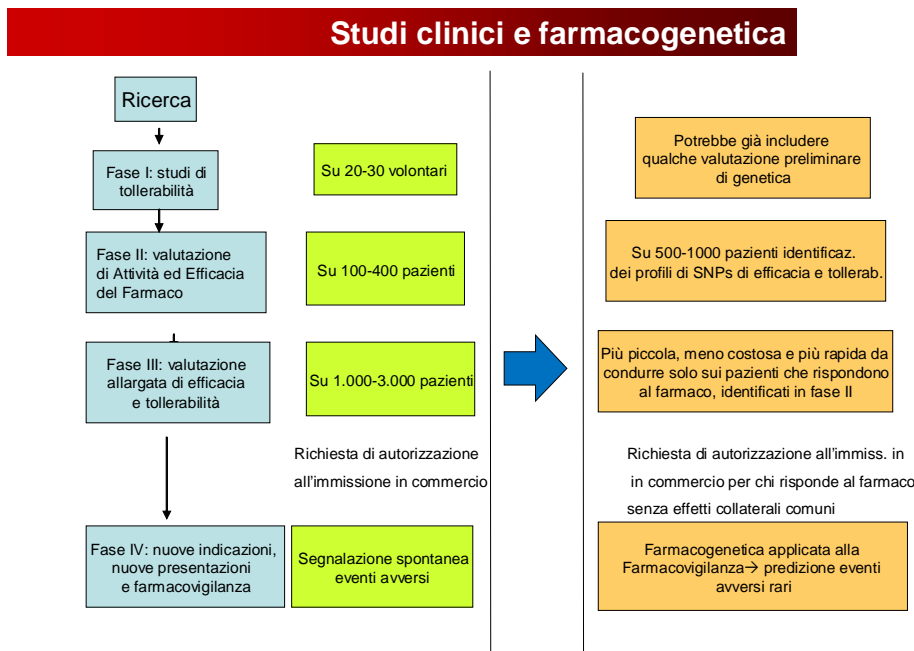


Fig 1

In totale i tempi di realizzazione di un farmaco si aggirano quindi intorno ai 12-14 anni e i costi intorno ai 500 milioni di dollari, cifra che include anche i costi sostenuti per tutte quelle molecole che sono state sintetizzate ma che non arriveranno mai ad essere testate sull'uomo oppure che cadono durante la sperimentazione clinica per non aver dimostrato un buon profilo di attività ,efficacia ,tollerabilità o rischio beneficio in termini anche di economicità e non arriveranno mai in commercio.

Ebbene nonostante tutto questo possiamo dire che ancora oggi la sperimentazione clinica è un sistema non completamente efficiente per i lunghi tempi di realizzazione, i costi elevati, la bassa percentuale di successo e le numerose questioni che lascia ancora aperte tra cui importantissima quella anticipata sulla problematica delle reazioni avverse che i farmaci possono provocare quando, messi in commercio, vengono utilizzati su larga scala e che causano il ritiro dal commercio del suddetto farmaco nonostante che spesso riguardino un numero molto limitato di persone .

Oserei dire che la necessità di togliere il farmaco dal commercio è un metodo di intervento piuttosto grossolano in quanto si toglie la terapia anche

a quei pazienti, la maggioranza, che invece ne trae tutti quei benefici comprovati durante tutte le fasi della sperimentazione.

Direi che fondamentale a questo proposito sia la necessità di trovare un metodo che ci permetta di predire queste reazioni avverse che è quasi impossibile identificare durante lo sviluppo clinico del farmaco in quanto sono rare, e spesso le più gravi, perché riguardano meno di un individuo su 1000.

Premessa genetica

Il Professor Roberto Barale, Direttore del Dipartimento di Scienza dell'Ambiente e del Territorio dell'Università di Pisa ritiene di dover cercare nei geni la risposta individuale ai farmaci e ricercare nel DNA il segreto di una terapia farmacologica personalizzata.

Il Professor Barale mi concede una premessa genetica necessaria a capire il meccanismo per il quale si possono avere in due individui diversi differenti risposte ad uno stesso farmaco.

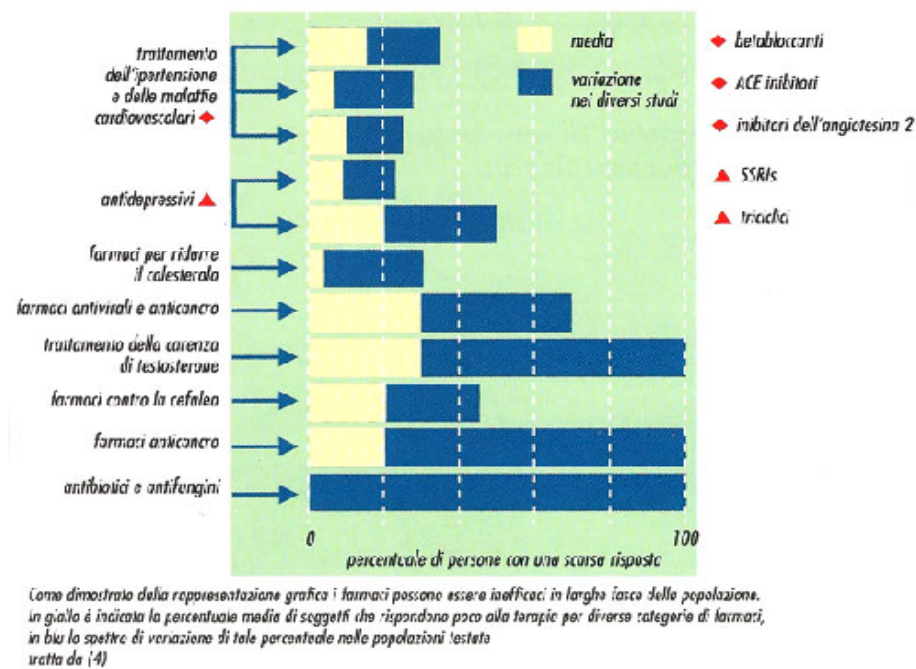


Fig.2

Osservando il grafico della figura 2 si capisce che non sempre la terapia dà la risposta desiderata, per esempio un 25% dei soggetti non risponde agli antivirali e antitumorali, un 20% non risponde ai farmaci contro la cefalea, un 5% non risponde ai farmaci che riducono il colesterolo.

Da questo stesso grafico emerge anche la grande variabilità dei risultati, dovuta al fatto che le ricerche sono state condotte su popolazioni diverse.

A questo proposito la Genetica di popolazioni dimostra infatti che le varie etnie, oltre a presentare una grande eterogeneità al loro interno, possono essere molto diverse le une dalle altre.

Per capire meglio i motivi di questa situazione si ricordi che ogni organismo umano ha 23 coppie di cromosomi e che un elemento della coppia viene ereditato dal padre e l'altro dalla madre. Su ogni cromosoma ci sono geni diversi, ognuno dei quali svolge una funzione specifica; se si suppone di prendere in considerazione un ipotetico gene A, ogni individuo ne possiede quindi due copie (alleli), una per ogni cromosoma della coppia su cui si trova il gene (per ogni gene ci possono essere più di due varianti alleliche).

Se le due copie o alleli sono identiche allora l'individuo è omozigote per il gene A,

se le due copie o alleli sono diverse allora l'individuo è eterozigote per il gene A e la **funzione di uno dei due alleli può essere anche completamente diversa da quella dell'altro.**

Quando le varianti genetiche o alleli sono presenti in una popolazione con una frequenza che varia dall'1 al 5 %, allora si parla di **Polimorfismo** e si dice che il gene in questione è polimorfico.

In particolare, se un allele è presente con una frequenza dell'1%, ci si attende un individuo omozigote per quell'allele con una probabilità di 1 su 10.000.

Oggi grazie al Progetto Genoma Umano sappiamo che nel genoma ci sono dai 30 ai 40 mila geni, per la legge del caso ogni volta che nasce un individuo c'è una combinazione diversa di alleli e la probabilità che nascano due soggetti uguali è estremamente bassa. Ne risulta che, in tutta la storia dell'umanità è quasi impossibile che ci siano stati due soggetti geneticamente identici e quindi non deve stupire che ognuno possa reagire in maniera diversa a qualsiasi stimolo esterno, farmaci compresi.

L'unica eccezione a questa osservazione è rappresentata dai gemelli monozigoti che proprio per la loro identità genetica sono stati oggetto di numerosi studi per comprendere l'ereditarietà di alcuni caratteri, compresa la reazione ai farmaci.

Questo tipo di studi ha dimostrato fin dagli anni sessanta, che il metabolismo di farmaci come il Litio, il Fenibutazone, il Dipumarolo ed altri, è strettamente correlato al genotipo dei pazienti. (11)

Ma quale può essere la base genetica della risposta a un farmaco in termini di efficacia terapeutica e di tossicità?

Per rispondere a questa domanda è utile ricordare che un farmaco, quando entra in un organismo, si distribuisce al suo interno e a questo punto può essere metabolizzato, attivato, coniugato ed infine escreto.

Facciamo il caso di un farmaco che deve essere metabolizzato e poi trasportato tramite un recettore, all'interno della cellula. Per semplificare supponiamo che tali processi siano controllati solo da due geni diversi che possono essere polimorfici.

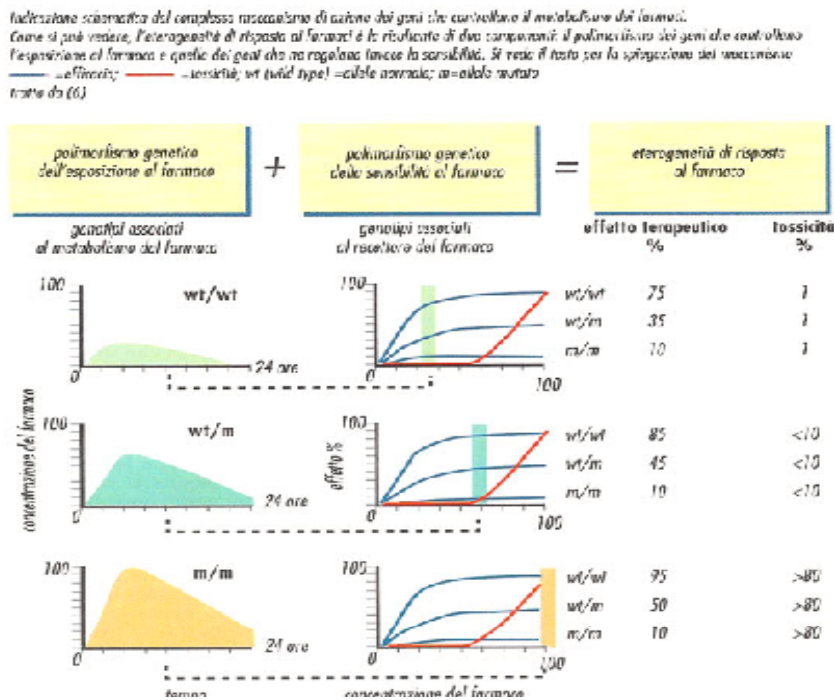


Fig.3

In questo caso la variabilità di risposta sarà determinata dalle diverse interazioni delle varianti di questi due geni. (fig.3)

Si consideri il gene polimorfico che controlla il metabolismo del farmaco (prima colonna fig. 3) :

Si possono avere individui con entrambi gli alleli normali (wt/wt= wild type selvatico) che metabolizzano rapidamente e che hanno una concentrazione media di farmaco nel sangue piuttosto bassa, poi individui con un allele mutato e quindi eterozigoti (wt/m) che metabolizzano più lentamente e che hanno una concentrazione media di farmaco nel sangue più alta ed infine individui con entrambi gli alleli mutati (m/m) che hanno elevate concentrazioni di farmaco nel sangue.

Si consideri ora il gene polimorfico che controlla il recettore del farmaco (seconda colonna fig.3):

Anche qui si possono avere individui omozigoti (wt/wt) che trasportano il farmaco in maniera efficace e con rapidità, individui eterozigoti (wt/m) che hanno capacità intermedia di trasportare il farmaco nella cellula e individui omozigoti per la mutazione (m/m) che non hanno il recettore o che lo hanno difettoso e quindi non sono capaci di trasportare il farmaco all'interno della cellula.

L'efficacia terapeutica del farmaco dipenderà quindi dall'interazione tra i due geni polimorfici.

Dalla figura 3 si osserva per esempio che in una persona che metabolizza velocemente anche se possiede i recettori funzionanti in maniera ottimale (wt/wt) l'efficacia terapeutica è del 75%. Se invece l'attività del recettore è in qualche modo inferiore (wt/m) allora l'efficacia del farmaco è intermedia (35%) se il soggetto è omozigote per la mutazione (m/m) l'efficacia del farmaco è quasi inesistente (10%).

Se si considera anche la tossicità del farmaco questa dipende in modo lineare dalla concentrazione del farmaco nel sangue, nel caso dell'individuo che metabolizza normalmente ma che ha il recettore non perfettamente funzionante, l'efficacia è bassa ma la sua concentrazione nel sangue è in ogni caso più bassa di quella necessaria a produrre una reazione tossica.

Diversa è la situazione degli altri profili genetici: nel caso intermedio essendoci più farmaco nel sangue per più tempo, l'effetto terapeutico aumenta (85%) ma si sfiora l'effetto tossico (<10%).

Infine per l'individuo che non metabolizza il farmaco e non lo trasporta all'interno della cellula, la situazione precipita perché si hanno concentrazioni elevatissime di farmaco per lungo tempo con il massimo

della tossicità(>80%), pur essendo questa situazione associata alla massima attività terapeutica(95%).Coloro che poi hanno i recettori che non funzionano subiscono solo gli effetti tossici.(7)

Quindi conoscere la frequenza degli alleli normali e mutati di questi geni, ci permette di calcolare in anticipo quanti individui avranno una determinata reazione ad un farmaco specifico.

Da questo punto di vista il fatto che le frequenze alleliche siano diverse nelle varie popolazioni spiega perché se per esempio si sperimenta un farmaco in Svezia, i risultati del trial possono essere diversi da quelli che si ottengono in un paese dell'Europa meridionale o in un altro paese del mondo.

Dopo questa necessaria premessa genetica vediamo ora di entrare più nel merito e soprattutto nello scopo di questa mia tesi cercando il modo di traslare queste conoscenze genetiche alla fase IV della sperimentazione clinica cioè alla farmacovigilanza attiva.

Molti sono gli autori, tra cui Allen Roses, che ritengono che per risolvere, o almeno ridurre in maniera significativa, la questione delle reazioni avverse ci si possa avvalere dell'ausilio della farmacogenetica, **sviluppando un profilo genetico di risposta ai farmaci che permetta di predire non solo l'efficacia ma anche la tollerabilità individuale.**

Il profilo genetico di risposta ad un farmaco può essere definito come la relazione esistente tra un certo assetto del DNA e la risposta ad una molecola specifica. Conoscere questa relazione significa poter predire se un certo paziente che ha un assetto genetico di tipo A risponderà o meno al farmaco B.

Per sviluppare il profilo genetico di risposta al farmaco, Roses presenta due strade:

Geni Candidati e Single Nucleotide Polimorphisms (SNPs).

Analizziamole entrambe .

Geni Candidati: si formula l'ipotesi che vi sia una associazione tra alcuni polimorfismi -in geni che metabolizzano il farmaco o che sono coinvolti nella azione del farmaco-e la risposta al trattamento farmacologico in esame; si verifica l'ipotesi nei trials clinici e quindi si ottiene un profilo di risposta.

SNPs: polimorfismi che colpiscono singoli nucleotidi della sequenza di DNA e che funzionano **come marcatori della differenza tra un individuo e l'altro.**

Grazie al Progetto Genoma Umano abbiamo scoperto che il 99,9% del genoma umano_ costituito da circa 3 miliardi di basi_ è identico in tutti gli individui. Il resto del patrimonio genetico_ circa 3 milioni di basi_ invece sono SNPs.

Questo significa che ogni 300 nucleotidi si verifica un SNP cioè in totale approssimativamente ci sono 10 milioni di SNPs, circa l'1 % di questi sono giudicati di importanza biologica.

Alcune società farmaceutiche e biotecnologiche, insieme a cinque istituti accademici ed a un gruppo no profit, hanno fondato lo SNP Consortium, allo scopo di creare una mappa degli SNPs umani. Con questo tipo di approccio si crea una correlazione tra gli SNPs- che normalmente non hanno un significato funzionale- e la risposta ai farmaci, e si può arrivare a identificare i profili degli SNPs che sono predittivi di efficacia e non di un farmaco (figura 4). La medesima cosa può essere fatta per le reazioni avverse.

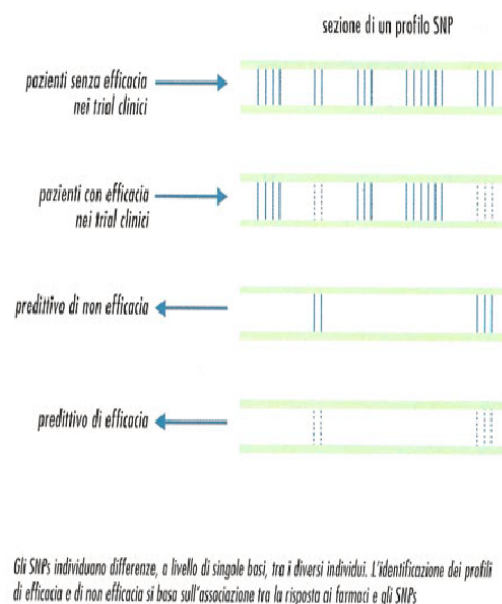


Fig.4

Il vantaggio di questa tecnica rispetto a quella dei geni candidati è principalmente il fatto che non si debbono fare ipotesi sul meccanismo e sui geni coinvolti ma ci si basa su dati reali di una indagine a tappeto volta solo a trovare differenze del DNA associate a diversi comportamenti verso i farmaci.

Sulla scia di queste considerazioni Roses propone una nuova modalità di sviluppo dei farmaci che permetterebbe di accorciarne i tempi e i costi, aprendo la via a più farmaci messi in commercio in tempi più brevi.

Secondo questo nuovo approccio il profilo genetico di risposta verrebbe tracciato già nella fase II dello sviluppo clinico, che verrebbe eseguita su un campione di 500-1000 pazienti anziché 100-400 come prima e applicando la tecnica degli SNPs. (destra figura 1)

A questo livello si potrebbe già definire il profilo di risposta per l'efficacia e per gli eventi avversi comuni.

Sulla base di questi risultati si potrebbe quindi condurre una fase III ridotta più rapida e meno costosa, perché si selezionerebbero sulla base del profilo di risposta, solo quei pazienti che rispondono alla terapia con il farmaco e che verosimilmente non avranno effetti collaterali comuni.

In questo modo si otterrebbe una approvazione dell'autorità regolatoria limitata ai pazienti identificati dal profilo genetico come adatti a ricevere il farmaco (destra figura 1).

Tali proposte di Allen Roses risalgono all'anno 2001, già allora emergevano difficoltà potenziali insite in quest'approccio che ancora oggi non sono risolte:

Innanzitutto, se complessivamente si studiano meno persone -2-3000 anziché 5000-la capacità di identificare reazioni avverse è inferiore.

I farmaci così sviluppati inoltre potrebbero nelle normali condizioni di impiego dare origine ad un uso più ampio di quello previsto, e venire assunti di fatto da persone di cui non si sa niente in termini di profilo genetico.

Inoltre resta aperta la questione della totale incapacità di predire le reazioni avverse rare.

Per dare una soluzione a questi problemi Roses propone di inserire un approccio genetico anche nel processo di farmacovigilanza dopo la commercializzazione.

Occorre prelevare il sangue di tutti i pazienti che assumono il nuovo farmaco, dai campioni prelevati si estrae il DNA che deve essere conservato in una banca .

Al verificarsi di reazioni avverse gravi si confrontano i profili genetici di coloro che le hanno avute con quelli di coloro che non le hanno avute.

In questo modo si potrebbe arrivare a predire a livello individuale l'evento avverso raro.

Integrando i profili di risposta così acquisiti si potrebbe arrivare a sviluppare un profilo genetico completo capace di predire sia l'efficacia ,sia gli effetti collaterali ,comuni o rari che siano.

Ossidazione dei farmaci e polimorfismo genetico

Reazioni di Fase I: isoforme CYP

CYP3A4: 50%	CYP2D6: polimorfici
CYP1A2: carcinogenesi	CYP2C9: polimorfici
CYP2C9: polimorfici	CYP2E1: carcinogenesi, effetti tossici

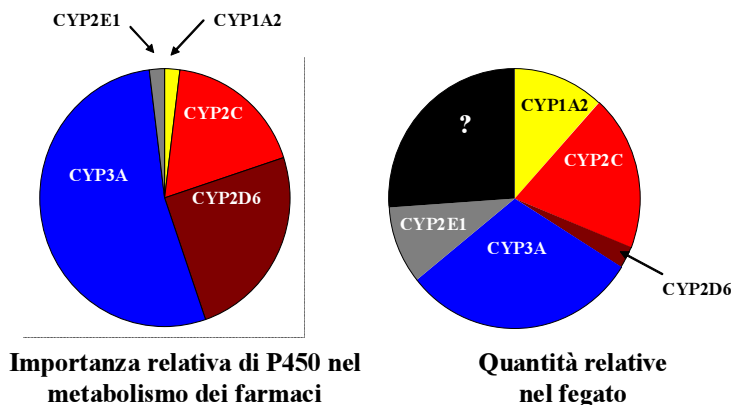


Fig 5

L'ossidazione è la più importante via metabolica dei farmaci. E' catalizzata dal sistema enzimatico epatico citocromo P450(CYP). Nell'uomo vi sono 40-50 differenti citocromi ed alcuni di essi sono coinvolti nella sintesi di composti endogeni come le prostaglandine, gli steroidi e le vitamine. Da 8 a 10 CYP sono attivi nei confronti dei farmaci e 3 di questi mostrano polimorfismi: CYP2C9, CYP2C19 e CYP2D6 (figura 5).

Il polimorfismo genetico riguardante il CYP2D6 fu scoperto intorno al 1977 usando come farmaci la debrisoquina e la sparteina. Nessuno di questi è utilizzato clinicamente, ma sono ancora importanti come modelli d'indagine farmacologica.

Circa il 7% della popolazione bianca è costituita da metabolizzatori deboli di questi due farmaci e di circa altri 40 farmaci di uso clinico.

La lista dei substrati per il CYP2D6 include tutti gli antidepressivi triciclici, alcuni inibitori del reuptake della serotonina (paroxetina e fluoxetina), parecchi antipsicotici (perfenazina, tioridazina, zuclopentixolo, aloperidolo, risperidone) qualche betabloccante (metoprololo), alcuni antiaritmici (flecainide, propafenone),

alcuni oppioidi (codeina, destrometorfano, tramadolo), e altre sostanze (ecstasy).

Per molti di questi farmaci, nei metabolizzatori deboli si raggiungono concentrazioni plasmatiche 2-5 volte più elevate rispetto ai metabolizzatori normali.

Per farmaci con ristretto range terapeutico, come gli antidepressivi triciclici, questo implica che i metabolizzatori deboli, a cui sono state date dosi standard, svilupperanno concentrazioni plasmatiche tossiche.

Case-Report

Una donna di 42 anni affetta da depressione in trattamento con 100 mg/die di nortriptilina sviluppò livelli sierici tossici di farmaco (circa 2100 nM). Il trattamento fu sospeso in seguito alle gravi reazioni avverse: difficoltà nell'accomodazione, ritenzione urinaria, grave costipazione prolungato intervallo PQ e allargamento del QRS.

Durante il periodo libero da farmaci fu effettuato un test con la sparteina che dimostrò che la paziente era un metabolizzatore debole. Appena due mesi dopo l'ospedalizzazione fu ripreso il trattamento con 25 gr/die di nortriptilina, con scomparsa completa della depressione e senza effetti collaterali degni di nota.

A livello enzimatico il metabolismo debole è causato dalla assenza del CYP2D6 epatico.

A livello genetico molecolare sono state descritte più di 20 mutazioni associate a metabolismo debole.

Analizzare il genotipo prima di un trattamento farmacologico è importante perché ci permette di predire la reazione avversa: se troviamo un polimorfismo sul gene per il CYP2D6 di un individuo che deve assumere un farmaco metabolizzato da questo enzima sapremo che quel soggetto sarà un metabolizzatore debole e quindi dovremo non dargli il farmaco oppure

darglielo ad un dosaggio più basso ed in questo modo avremo predetto e quindi evitato la reazione avversa.

La semplice lettura di questo case-report ci fa capire che se noi siamo in grado di conoscere il significato farmacologico dei singoli geni e degli SNPs saremo anche in grado di prevenire le reazioni avverse.

Oggi abbiamo a disposizione test semplici e veloci per individuare ,per ogni paziente le varianti dei geni coinvolti nel metabolismo del farmaco da somministrare.

Con la tecnologia del microarray di DNA (insieme di microscopiche sonde di DNA attaccate ad una superficie solida vetro,plastica o silicio,formanti un array cioè un raggruppamento), sfruttando una tecnica di ibridazione inversa è possibile esaminare il profilo di espressione di un gene e mettere in luce la presenza di varianti polimorfiche significative nelle sequenze di DNA che controllano il metabolismo dei farmaci.

In questo modo si è scoperto che per nei polimorfismi associati alla risposta ai farmaci esiste una grande variabilità con differenza nella frequenza degli alleli non solo a livello mondiale ma anche di ogni singolo paese .

La farmacogenetica delle reazioni avverse

Senza dubbio le reazioni avverse rappresentano un problema clinico rilevante, circa il 6,5% dei ricoveri ospedalieri è correlato con una reazione avversa. Le reazioni avverse non solo possono prolungare la permanenza in ospedale ma, in quasi il 20% dei pazienti, possono anche manifestarsi dopo il ricovero. Quante di queste si potranno prevenire attraverso la previsione genetica?

Molti sono i fattori che determinano la comparsa delle reazioni avverse e sono sia ambientali che genetici. Scarsa “compliance” e prescrizione non corretta, incidono per due terzi in quanto due terzi dei ricoveri ospedalieri sono correlati con queste .Allora la genetica è importante in un terzo di tutte le reazioni avverse ? Questa può essere una sottostima perchè molti dei farmaci coinvolti nelle reazioni avverse dovute a pratica prescrittiva non adeguata hanno un indice terapeutico basso e il margine tra sicurezza e rischio è molto ristretto. Un esempio tipico è il warfarin la cui dose terapeutica può variare da un individuo all'altro fino a 20 volte, e sia un

aumento che una diminuzione dell'attività anticoagulante sono associati ad effetti avversi potenzialmente letali. Sappiamo che due fattori genetici (CYP2C9 e VKORC1) sono determinanti, almeno parzialmente, nel definire la sua dose di mantenimento. Considerare tali fattori nella pratica prescrittiva potrebbe portare a ridurre i problemi associati all'aggiustamento del dosaggio del warfarin. In definitiva è difficile, in questo momento, stabilire con precisione il contributo dei fattori genetici nella predisposizione alle reazioni avverse. **Tuttavia l'obiettivo essenziale dovrebbe essere identificare, per tutti i farmaci, i fattori genetici associati alle reazioni avverse, incorporando la farmacogenetica nella farmacovigilanza.**

L'impatto clinico della farmacogenetica

Per alcuni farmaci è già stata stabilita la suscettibilità genetica alle reazioni avverse. Recentemente, sono state individuate forti associazioni genetiche nel complesso maggiore di istocompatibilità sul cromosoma 6 con le reazioni avverse da carbamazepina, abacavir, nevirapina e allopurinolo. L'associazione genetica tra l'ipersensibilità ad abacavir e HLA-B*5701 è stata già trasferita nella pratica clinica, portando a una riduzione clinicamente significativa nella frequenza della ipersensibilità. Tuttavia nel complesso l'impatto clinico della farmacogenetica è ancora relativamente scarso, come evidenziato dal piccolo numero di test in uso (Tabella 1).

Vediamo di analizzare le ragioni per cui la farmacogenetica ha ancora un piccolo impatto nella pratica clinica:

- **Studi di piccole dimensioni** comprensibili in quanto le reazioni avverse rare in quanto tali non sono numerose da qui la difficoltà a identificare i pazienti e nel raccogliere campioni. Nella maggior parte degli studi è stata utilizzata la metodologia caso-controllo, appropriata per gli eventi avversi rari, ma quando le reazioni avverse sono più comuni si dovrebbero utilizzare studi di coorte che consentono una miglior valutazione dei fattori ambientali.

- **Fenotipo Clinico** spesso definito in modo vago. E' chiaro che le manifestazioni e la gravità di una reazione avversa possono variare anche molto tra un individuo e un altro allora dovremmo usare fenotipi intermedi o endofenotipi che ci possono dare una misura più accurata delle reazioni avverse.
- **Valutazione dell'effetto della sostanza farmacologica** che non sempre è possibile imputare solo al farmaco e quindi alla sua concentrazione nel sito di azione,ma anche a fattori ambientali quali l'adesione alla terapia o la formulazione farmaceutica
- **Inadeguate strategie di genotipizzazione** la maggior parte degli studi ha perseguito il concetto di gene singolo che influenza la risposta al farmaco e questo adesso è troppo semplicistico. Oggi abbiamo a disposizione tecnologie relativamente economiche che ci permettono di valutare SNPs multipli e aplotipi(indica la precisa sequenza di polimorfismi a un locus genico)

Tabella 1. Test genetici pre-trattamento già disponibili nella pratica clinica.			
Farmaci		ADR	Gene/allele implicato
Azatioprina 6mercaptopurina	e	Tossicità ematologica	Tiopurina metiltransferasi S-
Abacavir		Reazione ipersensibilità	di HLA-B*5701
Primachina		Anemia emolitica	Glucosio-6-fosfato deidrogenasi
Irinotecan		Diarrea leucopenia	e UDP-glucuronittransferasi 1A1

Tab.1

Ora che abbiamo analizzato le ragioni per cui la farmacogenetica ha ancora un insufficiente impatto nella pratica clinica proviamo anche a trovare le soluzioni che ci porteranno prima alla sufficienza e poi puntare all'eccellenza.

Ritengo che il primo problema sia quello più difficilmente risolvibile e quindi è qui che dobbiamo concentrare i nostri sforzi, mentre gli altri si risolveranno automaticamente via via che le procedure tecnologiche (genotipizzazione, proteomica, metabolomica, informatica e statistica) verranno affinate.

Per superare il primo problema degli studi di piccole dimensioni è necessaria una collaborazione internazionale ed il PROGETTO EUDRAGENE è un esempio di questa collaborazione. È stato avviato in Europa ed è tuttora in corso con l'obiettivo di stabilire una raccolta, liberamente condivisibile, caso-controllo di campioni di DNA provenienti da pazienti con reazioni avverse e da pazienti di controllo.

La raccolta riguarderà inizialmente alcune reazioni avverse gravi che hanno recentemente richiamato l'attenzione e limitato l'uso di alcuni farmaci come l'agranulocitosi, l'allungamento del tratto QT, l'epatotossicità e la rabdomiolisi.

Il progetto è coordinato dalla Unità di Epidemiologia della London School of Hygiene and Tropical Medicine e vi partecipano nove paesi europei tra cui l'Italia.

Per l'Italia il coordinamento è affidato alla Unità di Farmacovigilanza del Centro Regionale Veneto di Informazione sul farmaco, con sede a Verona.

In ogni paese partecipante dopo approvazione dei comitati etici, i casi saranno identificati attraverso le segnalazioni di reazioni avverse inviate dai medici ai centri nazionali e/o regionali di farmacovigilanza, verrà eseguita la raccolta del campione di sangue che sarà inviato al centro coordinatore che

gestirà il database e renderà i campioni di DNA liberamente disponibili ai ricercatori in base a regole decise in tutti i centri partecipanti.

Più recentemente è stato costituito anche il Serious Adverse Event Consortium, una collaborazione tra industria, organismi regolatori e università per raccogliere pazienti con reazioni avverse gravi e poi intraprendere la scansione dell'intero genoma per identificare nuovi determinanti genetici..

Queste raccolte utilizzano la metodologia caso-controllo ma esiste anche la necessità di studiare coorti di pazienti ben fenotipizzati i cui dati vengano collegati con appropriatezza a biobanche che includono campioni di DNA, siero e urina.

Questo consentirà ai ricercatori di indagare su marker statici (DNA) e dinamici (proteine e metaboliti)

Aspetti etici

Oggi grazie alle prospettive offerte dalla genetica nel settore farmaceutico ,si riesce a conoscere la diversità individuale così che la medicina tende a diventare sempre più una scienza anziché un arte.

Quindi anche l'informazione fornita ai medici deve essere adattata alle nuove esigenze.

Il programma ELSI –Ethical ,Legal and Social Implications- fin dalle prime battute del Progetto Genoma Umano si è occupato dei problemi etici corrispondenti alla genetica applicata alla ricerca sui farmaci.

Il progetto ELSI ,finanziato con fondi federali statunitensi, procede parallelamente ai risultati del programma man mano che questi si inseriscono nella pratica medica,nella identificazione delle questioni etiche,giuridiche e sociali presenti ,ma anche quelle che si devono ancora presentare.

La riflessione etica in questo campo parte dal preambolo della Dichiarazione universale sul genoma umano e i diritti dell'uomo dell'UNESCO, del 1997, nella quale si riconosce che “le ricerche sul genoma umano e le loro

applicazioni aprono immense prospettive di miglioramento della salute degli individui e dell'umanità tutta".

Questa dichiarazione mette quindi in primo piano l'aspetto terapeutico di tali applicazioni.

E' necessario distinguere tra i test diagnostici di malattia e il profilo farmacogenetico .

Il test genetico diagnostico entra in ambito della privacy con conseguenze in campo assicurativo e lavorativo e con rischi di discriminazione per i soggetti coinvolti.

Inoltre ha un forte impatto psicologico sul soggetto e sulla famiglia. Questi temi confluiscono nell'ambito del principio dell'autodeterminazione e dell'autonomia del soggetto (il consenso al test il diritto a sapere o a non sapere).

Ma quando si parla di profilo farmacogenetico non ci si trova di fronte alla diagnosi o alla predizione di una malattia ma alla predizione di una risposta a un farmaco specifico.

Il soggetto ha già quindi una malattia o è portatore di un fattore di rischio e l'attuazione del profilo avviene quando esiste già un farmaco per quella malattia si tratta di stabilire se è meglio darglielo o non darglielo e ad un dosaggio più che ad un altro.

Prevale quindi il dovere da parte del medico di offrire qualcosa in più sulla base delle sue competenze in materia.

Quindi da un punto di vista etico l'obiettivo del profilo farmacogenetico è quello di ovviare l'insufficiente conoscenza dei fattori che determinano la risposta ai farmaci.

Il medico prima di prescrivere un farmaco che sa essere metabolizzato da enzimi di cui si conoscono i polimorfismi ed il loro significato ,dovrebbe sempre più preoccuparsi di capire se è possibile predire l'effetto avverso su quel paziente al fine di evitarlo.

In questo senso l'ELSI propone di reimpostare i programmi di formazione farmacologica per gli studenti di medicina.

Per quanto riguarda i comitati etici ci si deve domandare se sia etico approvare sperimentazioni tradizionali senza associarvi valutazioni del profilo farmacogenetico, credo che in futuro sarà considerato non etico ignorare il profilo genetico dei pazienti prima di sottoporli ad un farmaco.

Conclusioni e prospettive future

La farmacogenetica classica parte dalla conoscenza approfondita di un farmaco a cui segue una ricerca sistematica di una proteina responsabile del suo funzionamento risale al gene che la ha codificata fino a quando non viene individuato un polimorfismo.

Con il Progetto Genoma Umano e la tecnologia del microarray del DNA questo approccio è capovolto Ora partiamo con lo screening del DNA dei singoli soggetti e successivamente cerchiamo di trovare il significato farmacologico dei singoli geni e dei polimorfismi.

Questa procedura applicata a soggetti che utilizzano un nuovo farmaco ci permetterà di predire le reazioni avverse rare.

La farmacogenetica oltre ad essere la disciplina che porterà a personalizzare la terapia farmacologica fino al punto di prescriverla solo a chi potrà solo beneficiarne ha altri potenziali vantaggi come dare impulso al processo di ricerca e sviluppo di un farmaco inserendo valutazioni di farmacogenetica sin dalle prime fasi della sperimentazione ed inoltre, trovando applicazione nella farmacovigilanza, permetterà di predire gli effetti collaterali gravi comuni e rari che siano.

Tuttavia è cruciale la dimostrazione dell'utilità clinica dei test genetici prima che possano essere raccomandati per l'uso.

Sembra così che l'era della farmacogenetica delle reazioni avverse sia solo agli inizi della sua storia.

Indice

-Farmacovigilanza	pag.3
-Fasi della sperimentazione clinica	pag.6
-Premessa genetica	pag.8
-Proposta di Allen Roses	pag.13
-Ossidazione dei farmaci e polimorfismi	pag.17
- Farmacogenetica delle reazioni avverse	pag.19
-Aspetti etici	pag.23

Bibliografia:

Focus Notizie di farmacovigilanza Maggio 1994 Anno I n°1

Focus bollettino di farmacovigilanza Novembre 2000 Anno VII n°24

Focus bollettino di farmacovigilanza Agosto 2003 Anno X n°35

Focus bollettino di farmacovigilanza Agosto 2007 AnnoXIV n°50

Incontri Glaxosmithkline Società Italiana di Genetica Umana.

“Farmaci e genoma” Luglio 2001 n°2