

## Utvärdering av säkerhet och toxikologi vid läkemedelsutveckling

Martin Billger  
Safety Assessment  
AstraZeneca R&D Mölndal

2006

---

---

---

---

---

---

---

---

## Uppläggnig

- Toxstudier vid läkemedelsutveckling
  - Historik
  - Varför, vad, när, hur
  - Några exempel
- Prediktionsvärdet av djurstudier och toxicitet på människa

---

---

---

---

---

---

---

---

## Historik

- Tidigt arbete:
  - Läkemedel från växtpreparationer *extempore*. Förändring mot kemi-syntes slutet av 1800-talet
- USA:
  - 1937: 100-tals fatala fall av pat som använt sulfanilamid förorenad med etylenglykol
  - 1938: Food, Drugs and Cosmetics act: Quality and Safety
- Talidomid
  - 1958--: försäljning i >50 länder, i Västtyskland uppläcktes fall av missbildningar
    - Retrospektivt ca 10 000 fall i flera länder
    - FDA godkände aldrig läkemedlet
- 1962 Sverige lag om läkemedel
- 1963: WHO (svensk initiativ) inrättar biverkansregistret
- FDA riktlinjer för toxikologisk utvärdering
- 1968 UK Medicines Act, EC direktiv
- 2001 USA lagstiftar om att alla nyregistrerade läkemedel skall genomgå utvärdering för pediatrik användning. EU följer efter.

---

---

---

---

---

---

---

---

## Regulatory guidances

Useful links:

- International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH)
- ICH M3 guidance applies to the situations usually encountered during the conventional development of pharmaceuticals and should be viewed as providing general guidance for drug development.




---

---

---

---

---

---

---

---

## Hur maximera säkerheten för patienter?

- Data från djur i tidig utveckling för att stödja:
  - Första dos till människa (vanligen friska frivilliga)
  - Ökande dosering och duration
  - Första dos till kvinnor i fertil ålder
  - Första dos till barn
  - Kombinationsbehandling
- Klinisk säkerhetsdata ökar under utveckling
  - '14 day rule'
- Övervakning av biverkningar (inkl registrerade produkter)
- Bryggningsstudier av vissa populationer (kinetik, metabolism, dosättning)
- Epidemiologiska data (fas III – efter registrering)

---

---

---

---

---

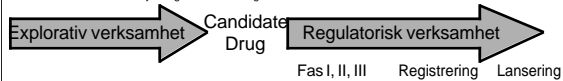
---

---

---

## Tidig och sen fas i läkemedelsutveckling

- Många substanser/ Små mängder (mg)
- Begränsade försöksomöjligheter
- Tidig identifiering av potentiell toxicitet
- Söka sammanhang mellan struktur och aktivitet (SAR)
- Studier *in vitro/in vivo*
- Mekanismstudier
- Fastställa relevanta djurslag för utvärdering



- Läkemiddelskandidat – Enstaka substans
- Uppskalad tillverkning (kg)
- Dokumenterande studier (GLP, GMP, GCP)
- Ökande åtaganden (pengar, djur, människor)
- Toxikologisk dokumentation för att stödja kliniska prövningar
- Riktade studier från fall till fall

---

---

---

---

---

---

---

---



## Akut toxicitet singeldos, råtta & mus

- Tänkt klinisk administreringsväg och iv
  - för att säkerställa exponering
- 14 dagars återhämtning under observation efter behandling
- Kliniska symptom, tid, varaktighet, viktändringar

10

## Upprepad dosering MTD och DF

- Maximum Tolerable Dose
  - Stegvis ökad singeldos med washout
  - Kliniska symptom och plasmaprofil efter varje dos
  - Fortsätter till dosbegränsande effekt
- Dose Finding
  - Ofta 7 dagars upprepad dosering
  - Idealfall: lågdos, mellandos, högdos
  - Baseras på MTD
  - Vägleda dosättning i längre studier

11

## Upprepad dosering

Längd på toxstudie som krävs för viss klinisk prövning

Längd på klinisk prövning	Minsta längd på toxstudie inför fas I/II	Minsta längd på toxstudie inför fas III/registrering*
<2 veckor	2 veckor	1 mån
<1 mån	1 mån	3 mån
<3 mån	3 mån	6 mån
<6 mån	6 mån	6 mån
>6 mån	6/9 mån*	6/12 mån**

\* FasIII kräver längre tid jämf med fasII, då antalet pat i regel är mycket stort → ökad sannolikhet för sällsynta biverkningar  
\*\* 6 mån gnagare, 9/12 mån icke-gnagare

12

### Mål för studier av toxicitet efter upprepad dosering

- Etablera doser
  - Terapeutisk upp till 'Max Tolerable Dose' (MTD)
  - Toxikokinetik: exponering viktigare än dosering
- Identifiera
  - Målorgan för toxicitet
  - Dosberoende
  - Tidsberoende
  - Artberoende
  - Övergående effekter (recovery)
  - Säkerhetsmarginaler
  - Initial säker klinisk dos
- Typ av toxicitet
  - ospecifik (kemisk)
  - farmakologiskt relaterad toxicitet?

13

---

---

---

---

---

---

---

---

### Upplägg av studier av toxicitet efter upprepad dosering

- Företsättningar
  - Relevant administreringsväg
  - Gnagare och icke-gnagare
- Kliniska symptom
  - Kroppsvikt
  - Födo/vätskeintag
  - Oftalmoskopi
  - EKG
- Klinisk patologi
  - hematologi
- Blodkemi
  - urinalys
- Patologi
  - Allmän patologi
  - Organvikter (ca 12)
  - Mikroskopisk patologi (ca 40 olika v ävnader)
  - Återhämtning (recovery)
  - Övrigt, texhormonnivåer i plasma
  - Toxikokinetik
    - Exponering viktigare än dos!

14

---

---

---

---

---

---

---

---

### Exempel: Substans X

- Allmänna toxstudier genomförda inför FTIM
  - Observation: Minskad hematokrit (markör)
  - Indikerar möjlig anemi (effekt)
  - Möjlig orsak: histopatologisk förändring i benmärg (målorgan)
- Bedömning
  - Benmärgsförändringar är troligen inte acceptabla vid kronisk behandling av patienter
- Åtgärder
  - Mekanistisk utvärdering och riskbedömning

15

FTIM, First time in man

---

---

---

---

---

---

---

---



# Farmakokinetik och toxikokinetik

## Säkerhetsmarginaler

19

---

---

---

---

---

---

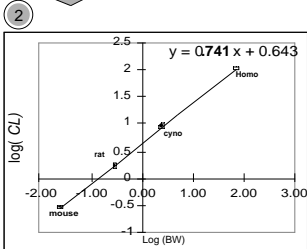
---

---

### Farmakokinetiska modeller – allometrisk skaling – prediktion till människa

1 Primary PK parameters in animals (CV%)

	CL mL/min/kg	VDss mL/kg	t <sub>1/2,z</sub> (h)
Cynomolgus monkey	3.6 (45)	87 (24)	19.4 (47)
Mouse	12 (8)	138 (13)	10.2 (12)
Rat	5.6 (5.4)	73 (9.4)	11 (16)
Rat <sup>sp</sup>	5.7 (13)	77 (22)	11 (40)



3 Predicted human PK

	CL (mL/h/kg)	V <sub>ss</sub> (mL/kg)	t <sub>1/2,z</sub> (h)
Human*	1.5	53	29

\*Predicted from allometric scaling

20

---

---

---

---

---

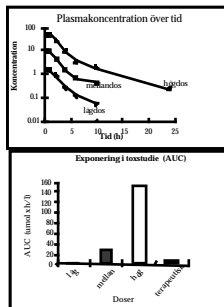
---

---

---

### Toxikokinetik ("idealfall")

- gnagare + icke-gnagare
- exponering
  - AUC, C<sub>max</sub>, t<sub>1/2</sub>,
  - könsskillnad
  - dos- och tidsberoenden
  - enzyminduktion



21

---

---

---

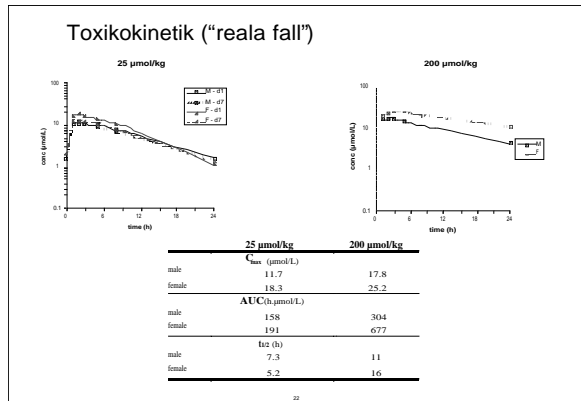
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Bindningsgrad till plasmaproteiner

- Plasmaproteinbindning och fri plasmakoncentration
  - Jämvikt fritt – bundet
  - Påverkar effekt vid receptorn
- Jämförelser mellan arter
  - Värdera prediktionen från djurdata
- Uppskatta mellanarts- och individvariation

---

---

---

---

---

---

---

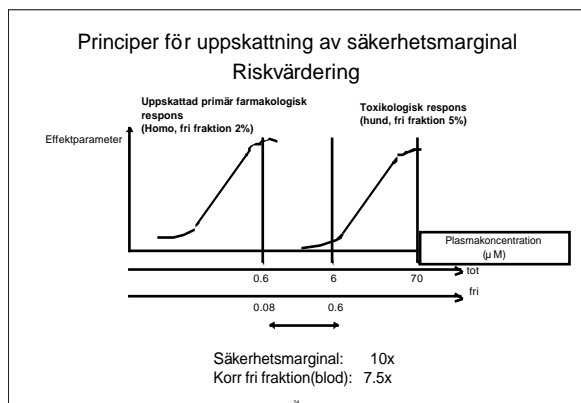
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Autoradiografi



Intravenös administration, 1 h efter dos

25

---

---

---

---

---

---

---

---

### Autoradiografi (forts)



Intravenös administration 5 h efter dos

26

---

---

---

---

---

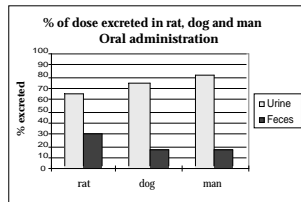
---

---

---

### Massbalans

- Karakterisera absorption och exkretion av substans och metaboliter i djur friska frivilliga
  - Isotopmärkt substans ( $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$ )
  - Po, iv administration
  - Samla urin, faeces och plasma
- Räkna på massbalans
  - in = ut



27

---

---

---

---

---

---

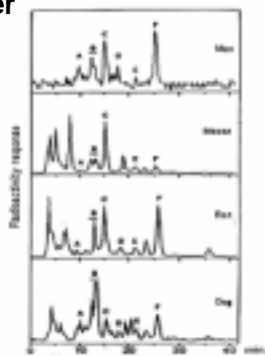
---

---

## Metabolitmönster

Mönster och strukturer för huvudsakliga metaboliter i plasma och sekret med hjälp av kromatografisk analys

Vid behov separat säkerhetsvärdering av unika metaboliter



---

---

---

---

---

---

---

---

## Läkemedelsinteraktioner

- Identifiera essentiella enzym som ingår i metabolismen av läkemedlet
  - Cytokrom p450 (3A4, 2D6 etc.)
    - Hämmning, induktion?
- Interaktionsstudier
  - *in vitro* med human vävnad (tex lever)

29

---

---

---

---

---

---

---

---

## Reproduktionstoxikologi

30

---

---

---

---

---

---

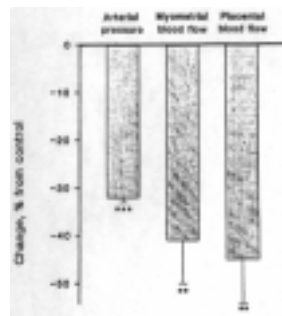
---

---



## Exempel: Felodipine

Dräktiga kaniner,  
12 µmol/kg i 3 dagar



En preparat som sänker blodtryck. I normotensiva situationer leder behandling till hypotension, med lokal ischemi som extrem påförd, här med effekter på å ontogenin av falanger

Från Lundgren et al. (1992), *Pharmacology & Toxicology* 71, 361-364

34

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Genotoxisk potential

- In silico
  - MCASE, DEREK; prediktera Ames test
- In vitro
  - Ames Test (bakterier) genmutation
  - Mouse Lymphoma TK locus test (däggdjursceller) kromosomskada
  - +/- metabol aktivering (S9-fraktion från lever)
  -
- In vivo
  - Mouse Micronucleus (benmärg, råttor & mus)
  - Unscheduled DNA Synthesis (lever, råttor)
  - Single Cell Gel (olika organ, råttor & mus)

35

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Cancerstudier

- Nästan livslång (2 år) exponering
  - Vanligen i gnagare (råttor & mus)
  - Bättre prediktion en enbart genotoxtester
  - Risk för övertolkning
- Studiedesign efter samråd med myndigheter
  - CAC; carcinogenicity approval committee
- Noggrann monitorering för att säkerställa tillräcklig överlevnad och exponering
  - Dosfindning-studier
  - Dosjustering, tidigare avslut etc
- Rapport klar vid registrering
- Forskning pågår med KO/transgener för att möjliggöra kortare studier

36

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Exempel: PTH1-34

- Paratyroidhormon-analog
  - Stimulerar blä omsättning/tillväxt av osteoblaster
  - Indikation osteoporos
- 6 mån rätta: inga relevanta fynd
- 12 mån primat: inga relevanta fynd
- 2 år rätta: dosrelaterad malign metastatisk osteosarcom
  
- Bedömning
  - Behandlingstid motsvarar >2/3 av förväntad normal livslängd
  - Antalet benomsättningscykler stort
  - Artspecifik effekt
  
- Slutsats
  - Troligen ingen relevans för människa

27

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Immuntoxikologi

- Mälorgan
  - Tymus
  - Mjälte
  - Lymfkörtlar
  
- Mälceller
  - Medfött immunförsvaret
    - Fagocyterande celler makrofager, granulocyter
    - NK-celler mot tumörer
  
  - Förvärvat immunförsvaret
    - Bildar minnesceller
    - B-lymfocyter tillverkar antikroppar
  
    - T-lymfocyter hjälper till med akproduktion eller utför cytotox mot främmande celler

28

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### 'Omics' – teknologier: alternativ eller komplement till djurförsök?

- Utveckling inom molekylärbiologi, analysteknik, databashantering, instrumentteknik
  - Kvantitativa mätningar ger stora komplexa datamängder
  - Analys ger 'fingerprints' som speglar processer i celler och vävnader på molekylär nivå
  - toxicogenomics, proteomics, metabonomics...
  
- Kräver validering med djurförsök
- Ökad betydelse i framtiden
  
- Kan inte helt ersätta djurförsök

29

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Efter registrering

- 'Pharmacovigilance'
  - Övervakning av läkemedlets säkerhet på marknaden
  - Kan ge upphov till nya studier
- Nya indikationer, doser, administreringsvägar
- Nya tillverkningsprocesser, formuleringar
  - Nya nedbrytningsmönster
- Yrkeshygien
- Utvärdering av biverkningar
- Uppdateringar till myndigheter

40

---

---

---

---

---

---

---

---

## Bioteknologiska produkter, ett specialfall?

- Nej,
  - Samma regulatoriska regelverk gäller
- Men,
  - Avvikelser möjliga på vetenskaplig grund
  - Trend: case-by-case → nya guidelines
- Återkommande fråga: relevant djurslag
  - Tex rekombinant antikropp riktad mot humant antigen
- Speciella problem
  - Neutraliserande antikroppar kan förhindra exponering i längre studier

41

---

---

---

---

---

---

---

---

## Exempel: Epoetin alfa-fallet

- rh-Epo ges till kroniskt njursjuka
  - stimulerar bildandet av erythrocyter
- Plötslig ökning av antalet fall PRCA (pure red cell aplasia)
  - Före 1998 sällsynt, 1-2 fall/år
  - 1998-2002: ökning, kulminerar med 83 fall/år
- Sammanföll med
  - Övergång från iv till sc, ökad självadministrering
  - Ökande fall av felaktig förvaring (dvs utanför +2-+8 °C)
  - Excipientbyte 1998: humant serumalbumin (HSA) till polysorbat-80
- Utredning
  - Aggregerat rh-Epo mer immunogent än nativt dito
  - sc mer immunogent in iv
  - Antikroppar korsreagerar med kroppsegna Epo-producerande celler i njuren
- Avregistrering av sc användning
  - Incidens PRCA gått ner på låga nivåer 2003

42

---

---

---

---

---

---

---

---

## Pediatrika läkemedel

- Hur dokumentera läkemedel i barn?
- Tillgänglig dokumentation idag är oftast begränsad
- Barn är inte små vuxna
  - Riktade studier krävs för att etablera effekt, säkerhet och dos.
- Studier svåra att genomföra
  - Stort relativt span i kroppsvikt, utvecklingsgrad...
  - Etik: vem bestämmer över barnets kropp?
  - Fölsamhet (compliance) troligen ett problem
  - Kommersiella värdet kan vara begränsat
- Myndigheter (USA ligger före) tillämpar lagstiftning enligt "the stick and the carrot"
  - Krav på viss dokumentation vid registrering
  - Erbjuder utökad/förlängd exklusivitet

43

---

---

---

---

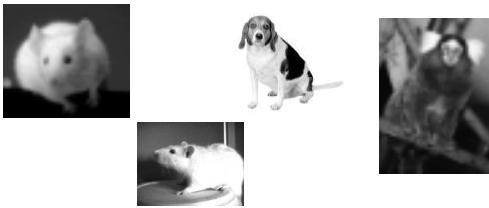
---

---

---

---

## Prediktionsvärdet av djurstudier och toxicitet inför studier på människa



44

---

---

---

---

---

---

---

---

## Några aspekter på djurslag använda inom toxicologi

- Råta, mus
  - små → större antal möjligt
  - "snabbare" livsförlopp
  - Välkänd bakgrund
- Hund
  - "lagom" stort → flera provtagningar möjliga
  - Välkänd bakgrund (normal histologi)
  - Känd individ
- "minigris"
  - Lik Homo i många avseenden (tex GI)
  - Lever inte upptill epitetet mini
  - Överkänslig map CV-parametrar?
- Primat (Cynomolgus, marmoset)
  - Lik Homo i många avseenden
  - Tillgång kan variera
  - Nervösa djur
  - Många länder kräver särskilda tillstånd

45

---

---

---

---

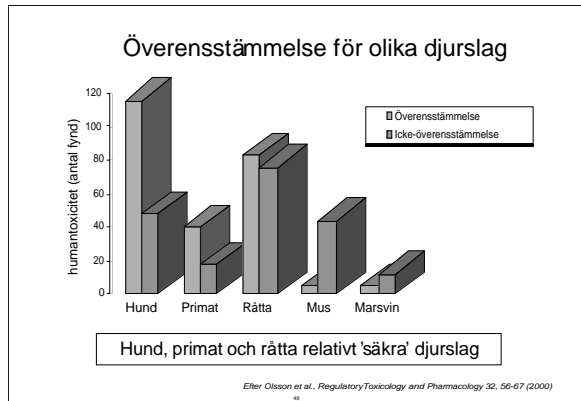
---

---

---

---






---

---

---

---

---

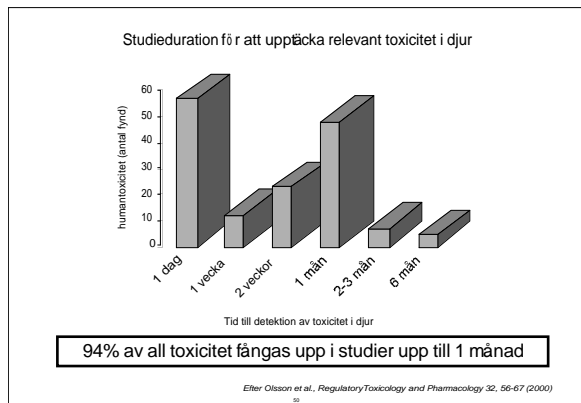
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

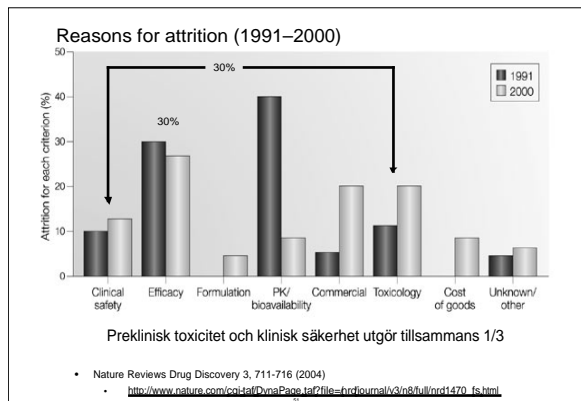
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

<http://www.djurforsok.info/>



---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Slutsatser

- Ett genomreglerat område
  - Historiska exempel
  - Vetenskap och beprövad erfarenhet
  - Ökande grad av harmonisering mellan länder
- Patienters säkerhet i centrum
- Överensstämmelse djur – människa
  - Relativt goda förutsägelse
  - Sant positiva överväger 'falskt negativa' resultat
  - Helt avstå från djurstudier – oacceptabel risk för människa
- Toxikologin får en fortsatt ökande betydelse

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

Sola dosis facit venenum



- Paracelsus, eg. Theophrastus von Hohenheim, 1493–1541, schweizisk läkare och naturfilosof,

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---