



# MODELES EXPERIMENTAUX DE TOXICITE JUVENILE





# PLAN

- Les bases réglementaires
- Les différentes espèces animales utilisables
- Les périodes de traitement
- Les paramètres à mesurer



# LES BASES REGLEMENTAIRES



# ASPECTS REGLEMENTAIRES

**ICH**, E11 Clinical Investigation of Medicinal Products in the Pediatric Population, 2000

**ICH** M3(R2) Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and marketing authorization for Pharmaceuticals (June 2009)

**FDA** Guidance for industry: Nonclinical Safety evaluation of Pediatric Drug Products, Feb 2006

**EMEA/CHMP/SWP/169215/2005**: Guideline on the need for non clinical testing in juvenile animals on human pharmaceuticals for paediatric indications, Jan 2008





---

# **Guidance for Industry Nonclinical Safety Evaluation of Pediatric Drug Products**

U.S. Department of Health and Human Services  
Food and Drug Administration  
Center for Drug Evaluation and Research (CDER)

February 2006  
Pharmacology and Toxicology

---



## 5. *Selection of Study Models*

In addition to consideration of models and endpoint assessments based on the intended pediatric human use, target organs for toxicological and pharmacological activity identified in adults need special consideration. It is important that organ systems identified as specific targets of drug toxicity in adults and that undergo significant postnatal development be studied in juvenile animals for those specific effects, even when the primary postnatal developmental period in humans does not coincide with the intended treatment phase. This is based on the observation that development is generally a continuous event. Additionally, a therapeutic target tissue may be developmentally regulated by other tissues or organ systems. In such cases, it may be advisable to examine the effects of the drug during the stages of development relevant to all of those tissues/organs in a test species.



## **B. Animals**

### *1. Species*

The species of the juvenile animal tested should be appropriate for evaluating toxicity endpoints important for the intended pediatric population. Traditionally, rats and dogs have been the rodent and nonrodent species of choice. In some circumstances, however, other species may be more appropriate. For example, when drug metabolism in a particular species differs significantly from humans, an alternative species (e.g., minipigs, pigs, monkeys) may be more appropriate for testing. When determining an appropriate species, sponsors are encouraged to consider certain factors, such as the following:

- Pharmacology, pharmacokinetics, and toxicology of the therapeutic agent
- Comparative developmental status of the major organs of concern between juvenile animals and pediatric patients
- Sensitivity of the selected species to a particular toxicity



### *Contains Nonbinding Recommendations*

A study in juveniles from one animal species may be sufficient to evaluate toxicity endpoints for therapeutics that are well characterized in both adult humans and animals. It is anticipated that this evaluation often can be accomplished in the rodent using modified perinatal and postnatal developmental studies, although other approaches can be used.

#### *2. Age*

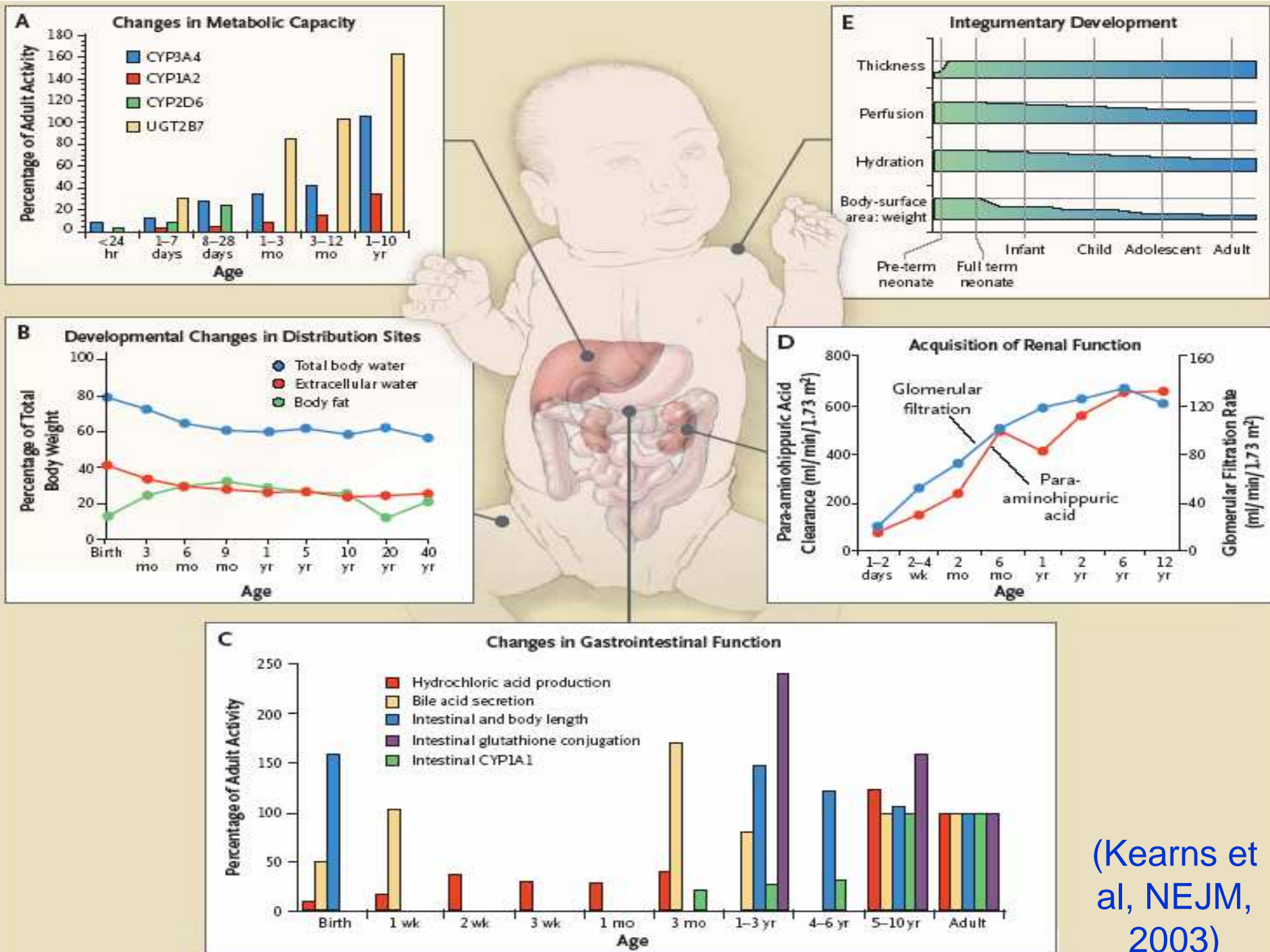
The age of the animals at initiation of dosing should be determined by the postnatal development parameters of interest. It is important that the stage of development in the animals being studied be comparable to that in the intended pediatric population.

#### *3. Sex and Sample Size*

We recommend including both male and female animals in these studies. It is important that adequate numbers of animals are used to demonstrate the presence or absence of effects of the test substance. When determining the sample size, consideration of the magnitude of the biologic effect that is of concern is also important. The particular study design used (e.g., a screening study or one designed to address an identified concern, modification of a standard design, composite or split litter design) will influence the number of animals it takes for an adequate evaluation.

# Definitions

Pre-term newborn infants	-	Immature renal and hepatic function, incomplete blood-brain barrier, unique susceptibilities. Requires expert know-how
Term newborn infants	0 to 27 days	Change from placental alimentation and excretion to autonomy; adaptation to lung breathing; rapid maturation. High bodywater content.
Infants and toddlers	28 days to 2 years	Rapid maturation of CNS, immune system development and total body growth.
Children	2 to 11 years	Developing cognitive and motor skills.
Adolescents	12 to 16/18 years	Period of sexual maturation, commencing with puberty. Increased in muscular strength, acceptance of delayed gratification



(Kearns et al, NEJM, 2003)



- **LES DIFFERENTES ESPECES ANIMALES UTILISABLES**

# Comparaison Poids à la naissance

- Souris 2g
- Rat 20g
- Singe 300-500g
- Chien 400g
- Mini porc 600-800g



# Choice of species

- Rodents, dogs “are considered appropriate models”
- Choice of species should take into account the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicology of the therapeutic agent, and the comparative developmental status of the major organs of concern between juvenile animals and pediatric patients
- “A study...in one species can be sufficient to evaluate toxicity endpoints for therapeutics that are well characterised in both adult humans and animals”.

## Le rat = souvent l'espèce de choix

+

- **Disponibilité** de femelles gestantes ou de portées
- Nombre important d'animaux par portée
- Pas de problème de **perception éthique**
- **Hébergement** facile
- Administration **orale dès J-1**
- Durée maturation sexuelle **courte**
- **économique**: coût faible (ex: addition de 20 rats pour évaluer fertilité)
- **indicateurs de développements** validés dans études de toxicologie de la reproduction

-

- Animaux très **immatures** à la naissance (Attention aux extrapolations /homme)
- Volume d'administration limité
- Administration **IV dès S-4**
- Volume sanguin **très** faible: volume de prélèvement très limité
- Faible capacité de thermorégulation





## La souris= Avantages du rat mais peu de recul

+

- **Disponibilité** de femelles gestantes ou de portées
- Nombre important d'animaux par portée
- Pas de problème de **perception éthique**
- **Hébergement** facile
- **économique**: coût faible
- durée maturation sexuelle **courte**
- Souris transgénique utilisable en théorie pour les produits de biotechnologies (Incertitude sur le phénotype)

-

- Animaux très **immatures** à la naissance
- Volume sanguin **très faible** (**Pb Prélèvements**)
- Pas d'administration orale avant J-6
- Pas d'administration IV avant S-4

## Le chien reste l'espèce non rongeur la plus utilisée malgré ses nombreux inconvénients

+

- Nombre important d'animaux par portée **adoption** possible (fostering)
- Hébergement adapté et **socialisation**
- Toutes les **voies** possibles dès la naissance
- Prélèvements sanguins dès la naissance, **ECG** dans hamac
- Espèce non rongeur la plus utilisée en **toxicologie**
- Tests de **comportement** disponibles

-

- Disponibilité **variable** de femelles gestantes ou allaitantes avec portées
  - Logistique d'approvisionnement
  - Taille des portées
  - Equipe entraînée pour mise bas et suivis
  - Longue période de développement
  - Très **immatures** à la naissance, maturation sexuelle lente
  
  - Problèmes de **perception éthique**
- Difficultés pratiques:**
- Contacts fréquents avec Hommes nécessaires au bon développement neurocomportemental
  - Chiots doivent être adaptés à la **manipulation**

# Le miniporc

= bonne alternative pour l'espèce non rongeur

+

- Disponibilité de femelles gestantes, **synchronisation** accouplement et mise bas possibles
- Nombre important d'animaux par portée (N = 5), **adoption** possible (fostering)
- Toutes voies administration dès la naissance, IV perf dès PND 7
- Volume sanguin **important**
- Marchent dès la naissance
- Nourriture solide possible dès la naissance
- Pas de problème de **perception éthique**
- Durée maturation sexuelle **courte**

-

- Administration IV nécessite un personnel entraîné
- Moins utilisé que le chien en toxicologie
- Peu de données historiques
- Pas/peu de tests standardisés **neuro-comportementaux** (Open field)



## Le singe

(Cynomolgus) = Particulièrement utile pour les produits de biotechnologies

+

- Souvent espèce de choix pour les molécules « biotech »
- Quelques petites molécules (ex PPAR)
- Possibilité d'effectuer des études avec imagerie
- Paramètres biologiques d'immunotoxicologie, d'hormonologie disponibles en routine
- Observations comportementales disponibles

-

- Disponibilité espèce
- Taille de la portée : un bébé
- Equipe entraînée pour mise bas et suivis
- Très longue période de développement
- Données historiques peu nombreuses
- Aspect éthique
- Prix



## Le lapin = Cité dans l'ancienne guidance FDA 2003

+

- **Disponibilité** de femelles gestantes ou de portées
- Nombre important d'animaux par portée **adoption** possible (fostering)
- Pas de problème de **perception éthique**
- **Hébergement** facile
- **économique**: coût faible
- durée maturité sexuelle **courte**

-

- Espèce très bien documentée pour les études de tératogenèse mais très peu de données sur animaux juvéniles.
- Tendance au cannibalisme mère/petit.
- Utilité limité



- LES PERIODES DE TRAITEMENT



## Mise en pratique : Fenêtre de sensibilité

- Le choix de l'espèce et de la période de traitement doit permettre de couvrir toutes les fenêtres de sensibilité pertinentes à l'exposition anticipée chez l'enfant (même en cas d'administration clinique unique)
  - Pour tous les organes cibles potentiels
  - Pour les stades morphologiques et fonctionnels du développement
  - En tenant compte des différences entre l'Homme et l'animal
- La période de traitement s'exprime de façon plus pertinente en terme d'étape clés du développement (naissance, sevrage, puberté ...)
- La fréquence de traitement peut être adaptée pour tenir compte des variations de la clairance métabolique en fonction de l'âge
- Période de suivi (réversibilité et effets retardés)

# Le temps de maturation des organes varie en fonction des espèces !

Morphological and functional maturation of different organs and tissues proceeds at different rates in different animal species.

Example: completion of nephrogenesis

	Gestation	Nephrogenesis	Nephrogenesis
Mouse	20 days	GD11 to PDN 5 – 7	Before birth
Rat	21 days	GD12 to PND 7 – 10	Postnatal week 4-6
Pig	16 weeks	GD20 to PND 21-28	Postnatal week 3
Human	38 weeks	Gest Weeks 5 to 35-38	Gestation Week 35
		(Guron et al 2000)	(Zoetis et al 2003)

# L'immaturation rénale avant J 21 contre indique l'utilisation du rat

Exemple 1: Lésions rénales induites par les inhibiteurs de l'enzyme de conversion chez le rat nouveau né:

- Le traitement de rats nouveau né par un inhibiteur de l'enzyme de conversion (enalapril) depuis la naissance jusqu'à J13 entraîne lésions rénales (atrophie papillaire) et anomalie fonctionnelle (perte de la capacité de concentration des urines)
- A partir de J 14 le traitement est bien toléré par les animaux
- Cette période sensible correspond à la néphrogénèse pendant laquelle un fonctionnement correct du système renine angiotensine est indispensable pour le bon développement du rein(Guron et al. 1999, )



# L'imaturité de la BHE chez le rat entraîne des lésions non pertinentes chez l'enfant

## Exemple 2: Tamiflu

While Tamiflu has been demonstrated to be effective and well tolerated in treating patients as young as 1-year-old, preclinical findings in juvenile rats have raised possible concerns regarding the use of Tamiflu in infants less than 1 year of age. A single dose of 1000 mg/kg oseltamivir phosphate (about 250 times the recommended dose in children) in 7-day-old rats resulted in deaths associated with unusually high exposure to both oseltamivir and oseltamivir phosphate. Further studies showed levels of oseltamivir phosphate in the brain to be approximately 1500 times those seen in adult animals. It is likely that these high exposures are related to an immature blood-brain barrier.

Information Roche 2003



- LES PARAMETRES A MESURER



## Mise en garde: **attention aux variations avec l'âge**

- Fortes variations des **paramètres hématologiques**
    - Expansion du volume plasmatique très forte et rapide après la naissance
    - Remplacement des hématies fœtales
  - Variations des **paramètres biochimiques**
    - ALP diminuent en fonction de l'âge en parallèle avec le ralentissement de la croissance osseuse
- => Nécessité de constituer **des bases de données** des paramètres en fonction des différentes tranches d'âge.

## Attention aux biais !

- **Effet portée**
  - Effet maternel
  - **Contaminations**
- Le **groupe contrôle** doit être approprié
  - Temps de séparation des mères
  - Volume d'administration pouvant interférer avec la prise alimentaire
  - Effet stress
- **Pharmacocinétique** à différentes périodes de l'étude à comparer avec les données humaines
- **Fenêtres de sensibilité**

## Paramètres spécifiques : la croissance

- Poids **corporel**
  - Le meilleur indice d'effet sur la croissance
  - Fréquence des pesées adaptée (poids du rat double entre PND1 et PND7, PND7 et PND14, et avant PND24)
  - Pesée des mères (effet mère en cas d'étude par portées entières)
- Croissance **osseuse**
  - Mesure de la longueur du tibia jusqu'à 7-8 semaines
  - DEXA, pQCT

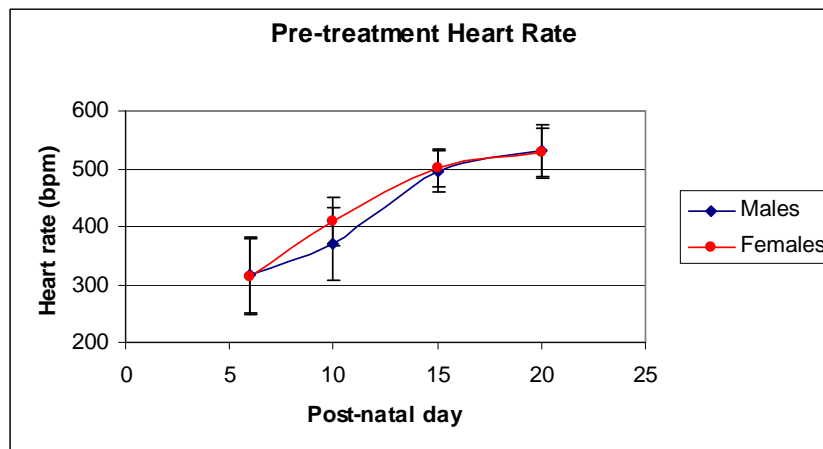


# Mesures ECG chez le rat

- Precautions:

Variation non linéaire de la fréquence cardiaque avec l'âge.

# Mesures ECG chez le rat



## Paramètres spécifiques : **neuro-comportement**

- Ontogénie des **réflexes**
- Fonction **sensori-motrice**
- Activité **locomotrice**
- **Réactivité**
- **Apprentissage et mémoire**

Inter-relations entre les paramètres  
Extrapolation à l'humain ?  
Besoin de données de référence



Réflexe auditif



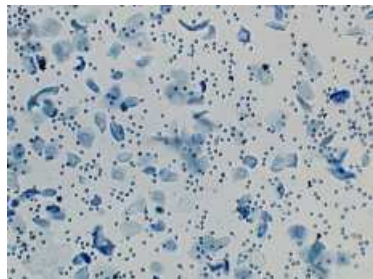
Actimétrie



Labyrinthe de Cincinnati

## Paramètres spécifiques : **Reproduction**

- **Histopathologie** des organes reproducteurs
- Accouplement pour détecter les **effets fonctionnels**
  - Attention aux accouplements entre nouveaux nés d'une même portée
- **Maturité sexuelle**
  - Clivage balano-préputial et ouverture vaginale
  - Enregistrer le poids corporel pour évaluer un effet indirect par retard de croissance
- Frottis vaginaux pour évaluer **les effets sur le cycle**





# conclusion

- Aucune espèce n'est pertinente à elle seule vis-à-vis de tous les paramètres à étudier et des stades de développement.
- Nécessité de tenir compte du développement de chaque espèce pour l'interprétation des résultats et l'extrapolation à l'homme.
- Utilité d'utiliser deux espèces pour l'évaluation du risque chez l'homme ?