

3.1.5 Epatite virale

Il progetto "Epatite virale" è stato avviato dall'Istituto Superiore di Sanità nel 1995, in relazione all'applicazione del DM 4/11/1994, secondo le procedure dettate dal DLvo del 30 dicembre 1992 n. 502, con la finalità di promuovere e coordinare, a livello nazionale, le ricerche nel campo dei virus dell'epatite e delle infezioni ad esse correlate.

L'opportunità dell'attuazione di questo progetto è stata dettata dall'importanza che le patologie correlate alle infezioni dai differenti virus dell'epatite rivestono in Italia sia in termini di morbilità che di mortalità. Infatti, ogni anno vengono notificati circa 10 000 casi di infezioni acute e si stima che vi sia un uguale numero di morti per cirrosi ed epatocarcinoma. Ciò comporta un notevole impatto a livello sanitario che si esplica con il coinvolgimento dei settori relativi alla clinica e terapia e dei settori relativi alla profilassi.

Sebbene la diminuzione di incidenza nelle infezioni acute potrà avere in futuro effetti anche sulla presenza di epatopatie croniche, permangono oggi elevati valori di prevalenza e un vasto serbatoio di individui "carriers" per quelle infezioni da virus epatitici che danno luogo a persistenza virale, quali le infezioni da virus dell'epatite B e da virus dell'epatite C.

Particolare importanza riveste, pertanto, l'individuazione di specifici programmi di ricerca e un fondamentale ruolo, nell'ambito dei settori impegnati, spetta sia alla ricerca virologica ed epidemiologica di base che a quella applicata in campo diagnostico. Tali ricerche costituiscono gli elementi di fondamento e i punti di partenza per i successivi studi ed interventi di tipo profilattico e terapeutico.

Un notevole incremento delle conoscenze è stato ottenuto negli ultimi anni grazie al

positivo apporto di varie discipline, quali la biologia molecolare e l'immunologia e grazie all'apporto dei settori biotecnologici. Tale sviluppo ha portato alla caratterizzazione di nuovi agenti virali.

Il progetto è stato basato sull'attuale stato delle acquisizioni scientifiche e tecnologiche che lasciano non definiti alcuni settori delle conoscenze. È stato in particolare considerato che: a) una quota di infezioni epatitiche di tipo sporadico non sono ancora definibili eziologicamente; b) i virus epatitici di recente identificazione, quali il virus dell'epatite C, dell'epatite E e dell'epatite G non sono a tutt'oggi caratterizzati biologicamente; c) per i virus di antica caratterizzazione (HBV, HDV), nuove problematiche sono emergenti anche in relazione all'identificazione di varianti virali con possibile diverso significato patogenetico; d) i processi patogenetici correlati alle infezioni da virus dell'epatite e alle sindromi ad esse associate sono argomento di attiva ricerca; e) nuovi problemi metodologici e di interpretazione diagnostica si sono aperti in relazione al progresso tecnologico in corso nel settore del rilevamento virale e anticorpale a scopo diagnostico.

In particolare, in questo ambito, l'inserimento di competenze da parte dei gruppi di ricerca biotecnologici, frequentemente connessi alle industrie produttrici di diagnostici e di reagenti biologici, ha portato ad uno sviluppo applicativo che necessita tuttavia di valutazioni controllate.

Pertanto nel progetto sono stati presi in considerazione i differenti aspetti epidemiologici, virologici e patogenetici attualmente rilevanti ai fini della diagnosi, della profilassi e della terapia di tali infezioni con i seguenti obiettivi specifici: 1) migliorare le conoscenze sulle modalità di trasmissione per i virus a trasmissione parenterale; 2)

individuare specifiche misure di prevenzione non immunitaria; 3) migliorare la copertura vaccinale anti-HBV dei gruppi a rischio; 4) migliorare le conoscenze sulla struttura e la biologia di nuovi virus epatitici; 5) migliorare le conoscenze sulla patogenesi dell'infezione virale; 6) sviluppare e controllare metodi di identificazione e caratterizzazione dei marcatori di infezione virale, la loro evoluzione e il significato diagnostico e prognostico.

Il progetto è stato articolato in:

a) Una sezione di epidemiologia, sviluppata presso il Reparto "Epidemiologia clinica" del Laboratorio di Epidemiologia e biostatistica dell'ISS, che comprende:

i) attività di sorveglianza epidemiologica delle epatiti virali acute (SEIEVA);

ii) studi coordinati sull'epidemiologia e prevenzione delle infezioni a trasmissione parenterale e sul controllo delle vaccinazioni anti-epatite B.

b) Una sezione relativa allo studio dell'eziopatogenesi e diagnosi virale sviluppata presso il Reparto "Infezioni da virus epatitici" del Laboratorio di Virologia dell'ISS che comprende:

i) attività di ricerca in relazione allo studio degli aspetti strutturali, biologici e patogenetici dei virus dell'epatite. Tale attività ha sviluppi applicativi e di controllo inerenti: la standardizzazione e il controllo di metodologie specifiche particolarmente applicabili nella diagnosi delle infezioni, la consulenza al Ministero della Sanità e alle strutture del Servizio sanitario nazionale in tali settori e nel settore della profilassi delle infezioni da virus epatitici;

ii) attuazione di "Call for proposals" a livello nazionale con lo scopo di aggregare specifiche competenze e di identificare centri preferenzialmente operanti nel campo della ricerca biologica e clinica sui virus epatitici.

Per l'intero progetto sono stati finora stanziati ed impegnati in relazione ai fondi del 1993 - 2400 milioni, per il 1994-1995 - 1600 milioni e per il 1996 - 500 milioni.

Attività svolta

Il programma è stato sviluppato, con l'utilizzazione dei fondi relativi al 1993 e al 1994-1995, mediante lo svolgimento di attività intramurali e di attività coordinate con centri esterni (azioni coordinate, bando di ricerca).

Sezione di epidemiologia. - Nell'ambito delle attività intramurali, è proseguito il programma di sorveglianza delle epatiti virali acute a cui aderiscono 129 aziende sanitarie che comprendono il 46% della popolazione nazionale. Tale sistema di sorveglianza ha dato la possibilità di seguire l'andamento nel tempo dei diversi tipi di epatiti virali e di studiare il ruolo che giocano, nella realtà italiana, i singoli fattori di rischio. Tali elementi sono stati utilizzati per formulare strategie di prevenzione. Il SEIEVA ha fornito, inoltre, dati utili anche per capire l'andamento della vaccinazione anti-epatite B nei soggetti conviventi di portatori cronici di HBsAg, nel personale sanitario, e negli adolescenti. Sul problema specifico delle vaccinazioni è stata attivata un'azione coordinata.

Sono stati condotti studi sieroepidemiologici sulla diffusione del virus HCV tra le reclute dell'aviazione e in gruppi di popolazione.

Dal 1995 ad oggi sono apparsi 18 contributi (14 su riviste a livello internazionale e 1 a livello nazionale e 3 rapporti tecnici).

Nell'ambito delle azioni coordinate di epidemiologia, sono state avviate le azioni coordinate che seguono:

- valutazione del rischio di infezione da HBV e HCV in ambienti odontoiatrici,

valutazione e promozione della vaccinazione anti-epatite B nei gruppi a rischio;

- valutazione del rischio di infezione da virus dell'epatite di tipo B e di tipo C a seguito di interventi chirurgici;

- studio dell'infezione da HCV nei centri di dialisi;

- trial clinico controllato sull'efficacia del vaccino anti-epatite A, nella trasmissione secondaria dell'infezione dopo esposizione a contatti con conviventi affetti da epatite acuta.

Nell'ambito degli studi effettuati per la valutazione dell'applicazione delle procedure standard per la prevenzione delle infezioni da manovre invasive in ambiente odontoiatrico nelle regioni Emilia-Romagna e Campania, è stato visitato un campione di strutture odontoiatriche in tali regioni. I risultati attualmente disponibili si riferiscono all'Emilia-Romagna. Le prove di sterilità eseguite in 89 studi hanno mostrato che il 26% dei ferri sottoposti a trattamento di "sterilizzazione" non era in realtà sterile. Gli operatori dei servizi di igiene pubblica hanno unanimemente riferito che la realizzazione dello studio ha indotto un miglioramento nella corretta conduzione igienico-sanitaria delle strutture odontoiatriche, con l'adozione di attrezzature più adeguate (autoclavi a vapore con pre-vuoto, indicatori di sterilizzazione, ecc.), e il consolidamento di un rapporto sinergico tra i servizi di prevenzione e professionisti.

In base agli studi effettuati in alcuni ospedali della Campania sul rischio di infezione da virus dell'epatite di tipo B e di tipo C a seguito di interventi chirurgici, nessuna sierconversione è stata messa in evidenza durante il periodo di osservazione e si ritiene necessaria l'applicazione di studi di tipo caso-controllo per una esatta valutazione del rischio.

Lo studio multicentrico sull'infezione da virus dell'epatite C in dialisi è stato condotto presso 32 centri di dialisi delle regioni Emilia-Romagna, Puglia e Basilicata. La prevalenza di pazienti con anticorpi anti-HCV è risultata del 33%. I risultati preliminari dello studio hanno mostrato che la politica di isolamento in stanze separate dei pazienti anti-HCV positivi non risulta associata a minori prevalenze di positività per l'HCV. Attualmente non sono ancora disponibili i dati di incidenza di tale infezione.

Il trial clinico controllato sull'efficacia del vaccino anti-epatite A nella trasmissione secondaria dell'infezione dopo esposizione al contatto con un convivente con epatite acuta ha incluso al momento attuale 191 soggetti vaccinati e 196 controlli (su oltre 650 individui eleggibili, di cui però circa il 35% è risultato immune). Di essi, rispettivamente 148 e 151 hanno concluso il periodo di follow-up. L'analisi dei dati verrà eseguita alla fine dello studio.

Gli studi messi in atto per la valutazione della copertura vaccinale anti-epatite B dopo somministrazione del vaccino sono stati finalizzati alla raccolta dei dati sulle vaccinazioni effettuate. In particolare, è stato messo in evidenza che: a) oltre il 90% delle donne in gravidanza effettua lo screening per HBsAg; b) solo il 55% dei nati da madri HBsAg positive ha seguito una corretta applicazione della schedula vaccinale (immunoglobuline alla nascita e vaccino entro la prima settimana di vita); c) oltre l'80% dei dodicenni esaminati aveva effettuato la vaccinazione e in alcune aree nelle regioni meridionali la copertura vaccinale risulta inferiore a tale valore (65%); d) bassi valori di copertura vaccinale sono presenti nel personale sanitario (66% al nord e 33% al sud).

Sezione di virologia. - Nell'ambito delle attività intramurali è stata svolta:

a) Attività di ricerca nel campo dell'eziopatogenesi e diagnosi delle infezioni da virus epatitici. Tale attività è stata riferita allo studio delle caratteristiche strutturali, replicative e di variabilità genetica virale che presentano implicazioni con la patogenesi e diagnosi delle infezioni da virus delle epatiti di tipo A, B e C.

In particolare le ricerche hanno riguardato:

- lo studio dei meccanismi di epatocarcinogenesi correlati all'infezione da virus dell'epatite B mediante l'applicazione del modello animale WHV/*Marmota monax*;

- lo studio, in modelli animali, della variabilità del virus dell'epatite di tipo B e la valutazione dell'attività di composti antivirali;

- la caratterizzazione genomica e lo studio della variabilità del virus HCV e delle relative implicazioni epidemiologiche e diagnostiche;

- lo sviluppo di sistemi di espressione *in vitro* per lo studio delle funzioni di proteine di HCV ed HAV e del loro ruolo nella citopatogenesi virale.

Tali attività hanno dato luogo dal 1995 ad oggi a 45 contributi (29 apparsi su riviste internazionali, 12 comunicazioni presentate a congressi e 4 rapporti tecnici).

b) Attività di coordinamento e supporto tecnico-scientifico, aggiornamento tecnico-scientifico e supporto diagnostico per il Ministero della Sanità e per le strutture dell'SSN nel campo della diagnosi delle infezioni da virus dell'epatite A, B, C, D, E, ecc.

Tali attività hanno riguardato:

- l'effettuazione di saggi specializzati, per cui non sono disponibili kit commerciali, quali: saggi di amplificazione genica per

particolari regioni del genoma virale e/o dotati di elevata sensibilità, saggi di caratterizzazione virale mediante clonaggio e analisi filogenetica delle sequenze; tali saggi devono essere applicati in alcuni casi specifici, ivi incluse l'identificazione della positività nei casi di bassa concentrazione virale e l'identificazione della sorgente di infezione mediante valutazione di campioni patologici e/o ambientali;

- standardizzazione di metodi e preparazione di campioni di riferimento;

- sviluppo di metodologie diagnostiche;
- pareri nel campo delle metodologie e dei protocolli diagnostici (definizioni di linee guida);

- organizzazione di "Seminari di aggiornamento sull'epatite da HCV: diagnosi, epidemiologia e terapia" (nel 1995 e nel 1997); tali seminari sono rivolti a medici e biologi che operano in qualità di responsabili presso le strutture dell'SSN deputate alla diagnostica, terapia e prevenzione delle epatiti virali; in particolare, vengono riportate le recenti acquisizioni disciplinari per quanto concerne gli aspetti virologici e patogenetici dell'HCV.

Nell'ambito delle attività di coordinamento di gruppi di ricerca esterni è stata data attuazione ad un bando di ricerca sul tema: "Eziopatogenesi e diagnosi delle infezioni da virus dell'epatite". Tale bando ha incluso i seguenti obiettivi di ricerca:

- 1) caratterizzazione strutturale e biologica di virus di recente identificazione e di varianti virali;

- 2) patogenesi dell'infezione virale persistente da virus epatitici;

- 3) marcatori di infezione da virus epatitici in particolari categorie di pazienti.

Il bando è stato pubblicato sul *Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità* del mese di settembre 1995 (con scadenza 11 dicembre

1995). Le proposte pervenute (82) sono state valutate da tutti i componenti del Comitato scientifico e sono state inviate a 53 referee italiani e stranieri (5 referee per ogni proposta). Il Comitato scientifico si è riunito per la valutazione il 13 febbraio 1996. Sono state prese in esame le 402 schede anonime inviate dai referee, e sono stati espressi i giudizi definitivi con l'applicazione di criteri "ad hoc definiti" e comunque analoghi a quelli già adottati in altri progetti dell'ISS.

L'attuazione del bando "Epatiti virali: eziopatogenesi e diagnosi" ha globalmente messo in evidenza un elevato livello tecnico-scientifico delle proposte pervenute che hanno avuto un buon parere da parte dei referee italiani e stranieri nel 78% dei casi. La Commissione ha espletato un'ulteriore selezione delle proposte, basate sulle caratteristiche di originalità e rispondenza agli obiettivi specifici del progetto. Sono state approvate il 36% delle proposte tenendo, inoltre, in considerazione il grado di fattibilità, nei tempi previsti dal progetto, e l'elevata e pluriennale esperienza sull'argomento, dei proponenti.

Sono state approvate 30 proposte (pubblicate in un rapporto) ripartite nei vari sottoprogetti secondo la Tabella 11.

Per la valutazione dei risultati delle ricerche è stato organizzato presso l'ISS, in data 29 settembre - 1 ottobre 1997, un convegno specifico che ha visto la partecipazione di tutti i gruppi finanziati. Sono state effettuate le relazioni orali inerenti all'attività dei progetti sotto forma di presentazione tecnica dettagliata dei risultati delle singole linee (1-3 presentazioni per progetto). Gli abstract di tali relazioni sono stati oggetto di un rapporto dell'ISS.

I principali risultati ottenuti nel corso del 1996-1997 sono di seguito riassunti per sottoprogetto.

Caratterizzazione strutturale e biologica di virus di recente identificazione e di varianti virali. - Lo studio di varianti virali ha costituito una delle principali tematiche affrontate. L'analisi della eterogeneità genomica dell'HBV in pazienti con epatite fulminante (FH) ha messo in evidenza una frequente associazione di una particolare

Tabella 11. - Proposte pervenute e finanziate per sottoprogetto

Sottoprogetto	Proposte pervenute N.	Stanziamiento proposto (ML)	Proposte finanziate N.
1 Caratterizzazione strutturale e biologica di virus di recente identificazione e di varianti virali	30	450	10
2 Patogenesi dell'infezione virale persistente di virus epatitici	35	420	12
3 Marcatori di infezione da virus epatitici in particolari categorie di pazienti	17	330	8
Totale	82	1200	30

variante virale, difettiva della regione pre-S2, con questo tipo di epatite, suggerendo un suo possibile ruolo patogenetico.

Lo studio di 175 soggetti infettati con HBV e sottoposti a trapianto di fegato ha suggerito che la somministrazione periodica di immunoglobulina anti-HBV (HBIg), stabilita per ridurre il rischio di reinfezione post-trapianto, può portare alla selezione di mutanti nella regione S che, sfuggendo alla neutralizzazione da parte dell'HBIg, possono causare epatite acuta.

L'espressione delle proteine strutturali dell'HCV in sistemi eucariotici e procariotici ha messo in evidenza un possibile ruolo patogenetico della proteina "core" e della glicoproteina E1 nel corso dell'infezione. In particolare, i risultati ottenuti suggeriscono che l'espressione intracellulare della proteina "core" rende le cellule sensibili alla apoptosi Fas-mediata. Inoltre è stato osservato che l'interazione della proteina E1 con le membrane cellulari è in grado di produrre modificazioni della permeabilità, suggerendo che tale proteina possa funzionare come canale ionico e influenzare l'omeostasi della cellula infetta.

Una serie di risultati sono stati ottenuti nell'ambito delle infezioni da HAV e HEV. Lo studio della sieroprevalenza di HAV e HEV (in un paese endemico quale l'Egitto) ha rilevato un differente pattern di distribuzione relativamente all'età, che causa un alto tasso di infezioni primarie durante le fasi precoci della vita per entrambi i virus. Inoltre, l'allestimento di vari sistemi cellulari per la coltivazione dell'HEV ha dimostrato la possibilità di replicare questo virus in almeno una delle colture esaminate.

L'analisi molecolare della replicazione di HAV ha messo in evidenza che mutazioni nella regione 5'-non codificante possono essere responsabili di una *down-regulation*

della traduzione e possibilmente spiegare la maggiore "lentezza" del ciclo replicativo. Inoltre, studi di espressione della proteina 3A di HAV hanno dimostrato una relazione tra la sequenza aminoacidica e la capacità di formare pori nelle membrane cellulari.

Patogenesi dell'infezione virale persistente di virus epatitici. - La comprensione dei meccanismi patogenetici che operano nelle infezioni persistenti da virus epatitici ha focalizzato l'interesse di varie discipline con rilevanti prospettive. Importanti risultati sono stati ottenuti in studi sulla caratterizzazione funzionale della proteina pX di HBV. La pX è un transattivatore della trascrizione possibilmente coinvolto nello sviluppo di epatocarcinoma. Nel corso degli studi condotti è stata dimostrata l'induzione da una fase di arresto cellulare di una fase di sintesi. Inoltre, dopo l'espressione prolungata di pX, è stata osservata l'apoptosi p53-mediata.

Gli studi immunologici hanno suggerito una serie di informazioni riguardanti le caratteristiche funzionali delle cellule T epatiche nel corso dell'infezione da HBV e HCV, visto che il pattern di citochine presente al sito di infezione può profondamente influenzare l'andamento finale della malattia epatica.

L'emergenza di un nuovo filone di ricerca ha messo in evidenza un'associazione significativa tra infezione da HCV e malattie linfoproliferative, suggerendo che l'infezione di sedi extraepatiche da parte dell'HCV può innescare meccanismi di trasformazione cellulare.

L'analisi dei mutanti HBV, difettivi per l'antigene E (HBeAg), ha suggerito che la patogenesi dell'infezione HBV è strettamente correlata al rapporto quantitativo tra virus selvaggio e virus mutato, la cui varia-

zione modifica il livello di espressione dell'HBsAg.

Gli studi sulla variabilità genomica dell'HCV all'interno della regione ipervariabile 1 (HRV1) hanno ribadito l'importanza di questa regione per lo sviluppo della persistenza. I dati presentati hanno infatti suggerito che la variabilità dell'HRV1 ha un significato adattativo, di risposta alla pressione del sistema immunitario. Inoltre la regione è altamente immunogenica e mantiene specifiche cellule della memoria. La presenza di cellule della memoria associate ad un andamento benigno dell'infezione in pazienti trattati con α -IFN suggerisce che la risposta immunitaria verso questa regione potrebbe contribuire alla limitazione del danno epatico.

Marcatore di infezione da virus epatitici in particolari categorie di pazienti. - La valutazione dei marker di infezione da virus epatitici in particolari categorie di pazienti rappresenta una delle tematiche affrontate nell'ambito del progetto "Epatiti virali".

I risultati di ricerche condotte da più di un gruppo dimostrano chiaramente che il trapianto di fegato costituisce un modello sperimentale prezioso per lo studio dell'infezione da HCV. I dati presentati hanno infatti dimostrato che la reinfezione del fegato è un evento comune nei pazienti HCV positivi. La valutazione di parametri virologici e clinici post-trapianto apre la possibilità di esplorare i meccanismi responsabili del danno epatico nelle fasi iniziali dell'infezione, oltre a fornire indicazioni prognostiche e strategie di trattamento da adottare. Da uno studio preliminare su questa categoria di pazienti sono emersi inoltre risultati interessanti sulla risposta anticorpale anti-HCV nel periodo post-trapianto, ribadendo l'unicità del modello a disposizione per studiare l'instaurarsi della persistenza virale.

L'esame dei marcatori virologici in particolari categorie di pazienti a rischio di infezione da HCV (e/o HGV), quali emodializzati, politrasfusi e riceventi trapianto di rene e midollo osseo, ha fornito indicazioni sulla prevalenza dell'infezione, i fattori di rischio e il contributo di differenti genotipi.

I pattern virologici analizzati in pazienti con infezione multipla HBV/HCV hanno indicato una maggiore severità della manifestazione clinica in questo tipo di infezioni. La raccolta dei dati, ancora in corso, permetterà di valutare il decorso della malattia in rapporto ai pattern virologici esaminati.

In base alla valutazione dei dati ottenuti dalle ricerche finanziate nell'ambito dei tre sottoprogetti, e in considerazione del fatto che il bando ha richiesto l'inserimento della ricerca in una proiezione pluriennale e che gli obiettivi specifici possono essere proficuamente raggiunti solo con una prosecuzione del finanziamento per almeno due anni successivi, si è ritenuto di dover assegnare, per il proseguimento delle ricerche selezionate nell'ambito del "Call for proposals", 1000 milioni, dai fondi del progetto previsti per il 1994-1995 (Totale: 1600 milioni).

La proposta di assegnazione di questi fondi è stata effettuata dopo la valutazione del Comitato scientifico di progetto (riunione del 1° ottobre 1997), tenendo in considerazione i resoconti dell'attività relativa al primo anno.

È stato proposto di rifinanziare 28 gruppi di ricerca ripartiti secondo la Tabella 12.

Per alcune tematiche è stata proposta l'aggregazione dei gruppi operanti nel settore e in particolare: 1) per gli studi sull'evoluzione patogenetica delle infezioni da virus dell'epatite in pazienti sottoposti a trapianto di fegato. Tali pazienti possono costituire un modello per la definizione del

Tabella 12. - Proposte pervenute e finanziate per il secondo anno di attività del progetto

Sottoprogetto	Proposte pervenute N.	Finanziamento richiesto (ML)	Proposte finanziate N.	Stanziamiento proposto (ML)
1 Caratterizzazione strutturale e biologica di virus di recente identificazione e di varianti virali	10	720	10	410
2 Patogenesi dell'infezione virale persistente di virus epatitici	12	832	11	360
3 Marcatori di infezione da virus epatitici in particolari categorie di pazienti	7	440	7	230
Totale	29	1992	28	1000

ruolo della risposta immune nell'eziopatogenesi dell'epatite di tipo C; 2) per gli studi sulla caratterizzazione di varianti virali allo scopo di raggiungere numerosità significative; 3) per lo sviluppo di tecnologie avanza-

te nell'ambito del rilevamento e della diagnosi delle infezioni da virus dell'epatite anche allo scopo del mantenimento di strutture in grado di operare in eventuali situazioni di emergenza.

3.1.6 Proprietà chimico-fisiche dei medicinali e loro sicurezza d'uso

Il progetto ha avuto inizio a partire dalla metà dell'anno 1996 con il finanziamento, mediante convenzioni, di dodici specifici progetti di ricerca scelti tra quelli presentati a seguito di bando nazionale. Nel febbraio 1997 si è svolto, presso l'ISS, il primo Convegno nazionale delle unità operative impegnate nelle specifiche ricerche; oltre alla esposizione dei primi risultati ottenuti, l'incontro ha avuto anche lo scopo di valutare possibili interazioni tra le varie unità operative per un approccio multidisciplinare a quelle ricerche che hanno evidenziato i risultati più interessanti. Alcune collaborazioni sono così emerse nelle proposte di ricerca presentate nel luglio 1997 a seguito del nuovo bando relativo al "Secondo progetto" che prevede di finanziare, entro il 1997, quindici proposte (su 27 pervenute). La formulazione dei giudizi di priorità per il finanziamento del secondo progetto, oltre alla prosecuzione dei lavori relativi alla ricerca in corso, ha permesso anche l'inserimento di alcune nuove unità operative.

Vengono riportati in maniera concisa i risultati emersi nel primo anno di attività, suddivisi per sottoprogetto.

Aspetti chimico-fisici e profili analitici connessi alla qualità di farmaci per uso umano e veterinario

Farmaci chirali. - In questa linea di ricerca, finalizzata ad evidenziare dati scientifici idonei per promuovere il "passaggio" dall'uso di farmaci in forma racemica al singolo enantiomero o da miscele diastereoisomeriche al singolo diastereoisomero, è stata data la precedenza a quei farmaci presenti sul mercato da diversi anni in forma racemica

e per i quali potrebbe non esistere un particolare interesse a migliorare la qualità da parte delle industrie produttrici.

Nell'ambito di derivati diidropiridinici (nitrendipina, manidipina) e di farmaci attivi sui recettori alfa-adrenergici (midodrina) sono emersi risultati che, per la prima volta, evidenziano l'inattività, ovvero la non efficacia, di un enantiomero rispetto all'altro.

E' stata anche messa a punto una "banca dati" specialistica e aggiornata per poter individuare classi di farmaci chirali da sottoporre ad ulteriori studi, sia per quanto riguarda l'aspetto analitico che quello farmacologico e/o clinico sulla base di criteri oggettivi, peraltro non ancora perfettamente definiti.

Fotostabilità e fotoreattività. - Per diverse classi di farmaci largamente usati è nota la loro fotostabilità *in vitro* e *in vivo* e il loro effetto fototossico; mancano però indicazioni sufficienti sui meccanismi molecolari la cui conoscenza è la premessa per la progettazione di sistemi in grado di rallentare o bloccare sia i processi di fotodegradazione che quelli di fotosensibilizzazione. Sono stati così intrapresi studi su alcuni farmaci (come fluorochinaloni, nifedipina, clorpromazina, antiinfiammatori, nicardipina, labetalolo) con obiettivi specifici come: a) chiarire il processo di degradazione sotto irraggiamento (in particolare con UVA e UVB), individuare i prodotti formati; chiarire i meccanismi operanti sia in assenza che in presenza di biosubstrati quali membrane cellulari o DNA; b) rilevare e quantificare il danno ossidativo prodotto su membrane biologiche isolate e su membrane di cellule attivamente metabolizzanti.

Proprietà di stato solido. - Alcune proprietà dello stato solido, come il polimor-

fismo e lo pseudopolimorfismo (un esempio di quest'ultimo è la trasformazione di un composto anidro in idrato e viceversa), conferiscono alle materie prime di interesse farmaceutico e conseguentemente ai prodotti finiti, diverse proprietà fisico-chimiche (densità, solubilità, velocità di dissoluzione, stabilità) e farmaco-tecnologiche (sospensibilità, reologia, comportamento nei processi di mescolamento, polverizzazione e compressione). Tali proprietà influenzano lo sviluppo di un medicinale *per os* potendo rivelarsi parametri di formulazione critica ai fini dell'efficacia e della sicurezza del prodotto; esse costituiscono pertanto punti critici delle forme farmaceutiche per via orale.

Le ricerche effettuate e rivolte al complesso sulfadimidina-trimethoprim, alla picotamide anidra e monoidrata e ad alcune ciclodestrine e maltodestrine hanno evidenziato, per tali farmaci, chiare differenze di comportamento delle loro diverse forme polimorfe o pseudopolimorfe.

Processi di sterilizzazione e loro influenza sulle proprietà del principio attivo. - Il trattamento di materie prime e di forme farmaceutiche finite con radiazioni ionizzanti può essere utilizzato per l'abbattimento della carica microbica purché tale trattamento non induca alterazioni strutturali o fenomeni di decomposizione nel materiale esposto. La conoscenza degli eventuali processi indotti da tale trattamento è pertanto importante per le autorità di controllo dei farmaci, anche alla luce del fatto che l'irraggiamento può essere effettuato e non dichiarato su prodotti rivelatisi difettosi nei confronti della loro carica batterica.

Oltre alla messa a punto di procedure utili (risonanza paramagnetica elettronica) per verificare se un dato substrato è stato sottoposto ad irraggiamento gamma o elet-

tronico, lo studio intrapreso è stato rivolto a sistemi terapeutici microparticellari a rilascio modificato; in particolare sono stati studiati gli effetti indotti da irraggiamento gamma su microsfele di copolimeri polilattidici-co-glicolidi contenenti bupivacaina.

Farmaci e loro metaboliti in campioni biologici

Fattore di variabilità in farmacocinetica. -

L'uso sicuro dei farmaci nella popolazione anziana rappresenta uno dei problemi di maggiore complessità per il medico pratico. Infatti le attuali conoscenze riguardanti la farmacocinetica e il metabolismo dei farmaci nel soggetto anziano risultano carenti e l'approccio terapeutico è difficile per le caratteristiche estremamente variabili della terza età.

In questo contesto sono stati intrapresi due studi relativi a: 1) l'uso di modelli matematici derivati da indagini con soggetti giovani e convalidati su anziani per prevedere il comportamento farmacocinetico, in anziani, dei farmaci più importanti; 2) la caratterizzazione dei fattori che possono modificare il profilo cinetico-metabolico (con particolare riferimento al ruolo dell'età) dei farmaci chirali.

Per quanto riguarda il primo argomento sono stati esplorati e messi a punto alcuni modelli matematici per la previsione del comportamento cinetico, in soggetti anziani, della digossina e tobramicina.

Il farmaco chirale sul quale è stata focalizzata l'attenzione in relazione al secondo argomento è la fluoxetina, uno degli psicofarmaci più frequentemente prescritti; l'obiettivo di questo studio è anche quello di valutare la correlazione tra livelli plasmatici degli enantiomeri in esame e la loro risposta clinica.

3.1.7 Terapia genica: ricerca di base, aspetti bioetici e proiezioni cliniche

Le unità operative afferenti al progetto "Terapia genica" hanno condotto ricerche di base pre-cliniche e cliniche in tre settori chiave: la terapia genica delle cellule staminali ematopoietiche [con proiezione terapeutica in malattie emato-immunologiche ereditarie (ad es. β -talassemia) o acquisite (ad es. AIDS) e nelle leucemie], dei tumori solidi (utilizzo di vaccini antitumorali) e delle malattie cardiovascolari (terapia genica della ristenosi arteriosa, in particolare coronarica). A livello internazionale, queste aree di ricerca hanno una elevatissima priorità biomedica: di conseguenza, ad esse viene attribuita una quota ingente delle risorse scientifiche e finanziarie.

Il consuntivo scientifico del progetto è assai incoraggiante. Tra i diversi risultati, sono da segnalare due aspetti di particolare rilievo.

a) E' stato messo a punto un sistema innovativo di trasduzione genica retrovirale potenzialmente in grado di superare molte delle limitazioni insite nei sistemi di "gene delivery" sinora disponibili.

Utilizzando questo sistema, è stato possibile inserire in cellule progenitrici ematopoietiche normali un gene di fusione (PML-RAR α o AML-1-ETO) associato, rispettivamente, alla leucemia acuta promielocitica o mielomonocitica. Le cellule trasdotte hanno acquisito il fenotipo di cellule leucemiche promielocitiche o mielomonocitiche: è stato in tal modo ottenuto, per la prima volta, un modello di leucemogenesi umana *in vitro*. Questo approccio sperimentale assume una valenza a carattere generale: infatti, fornisce una metodologia per l'identificazione di geni leucemogeni e per lo studio dei relativi meccanismi oncogenetici; inol-

tre, rappresenta un modello innovativo per studi *in vitro* sulla terapia delle leucemie, in particolare la terapia genica. Sarà inoltre possibile estendere tale approccio ai tumori solidi, tentando di ottenere modelli di oncogenesi *in vitro* mediante trasduzione di oncogeni in cellule umane normali.

D'altra parte, questo sistema di trasduzione genica retrovirale potrà essere di prezioso ausilio nella terapia genica di cellule staminali in numerose malattie emato-immunologiche ereditarie (ad es. β -talassemia, immunodeficienza combinata di tipo SCID) o acquisite (ad es. AIDS).

b) La malattia coronarica, uno dei maggiori capitoli di spesa nella sanità dei paesi occidentali, viene spesso trattata con angioplastica percutanea transluminale (PTCA): i benefici di tale procedura sono tuttavia limitati, poiché in ~30-50% dei pazienti si assiste ad una ristenosi del segmento di vaso dilatato.

La ristenosi è causata da una proliferazione delle cellule muscolari lisce arteriose, mediata da una complessa catena di fenomeni: due anelli della catena sono l'attivazione del proto-oncogene *ras* e della proteinkinasi A cAMP-dipendente (PKA). E' stato dimostrato che, in modelli sperimentali, l'inibizione di *ras* [mediante trasduzione genica di dominanti negativi (dn) di *ras*] o di PKA (mediante terapia farmacologica locale) blocca la proliferazione delle cellule muscolari arteriose: risultati particolarmente incoraggianti sono stati ottenuti dopo terapia genica con *ras* dn.

In futuro, è realistico prospettare l'uso di "stent" ingegnerizzati con resine a rilascio lento, che contengono cDNA di *ras* dn (o forse attivatori di PKA, come il cAMP): in effetti lo stent "stainless steel" può essere ricoperto con uno strato di imina polietilenica e destran solfato per rilasciare local-

mente *ras dn* (o, in alternativa secondaria, cAMP). Si propone che la prossima fase di ricerca sia uno studio clinico che validi la fattibilità di quest'approccio terapeutico per la cura della ristenosi dopo angioplastica.

Il progetto "Terapia genica", supportato dai fondi 1% (art. 12, DLvo 502/1992) per gli anni finanziari 1993-1996, è attualmente in pieno svolgimento. Ad esso afferiscono 11 unità operative extra- e intra-murali, articolate in due sottoprogetti: 1) Terapia genica delle cellule staminali ematopoietiche; 2) Terapia genica nei tumori solidi e nelle malattie cardiovascolari.

I due sottoprogetti sono così suddivisi:

1) *Terapia genica delle cellule staminali ematopoietiche:*

- Trasferimento genico nelle cellule staminali ematopoietiche umane.

- Fattori trascrizionali nell'ematopoiesi umana normale e neoplastica: nuove strategie per la terapia genica delle cellule staminali/progenitrici.

2) *Terapia genica nei tumori solidi e nelle malattie cardiovascolari:*

- Caratterizzazione e ottimizzazione funzionale di un elemento IRES di un trascritto bicistronico umano: potenziale utilizzo nella terapia genica retrovirale.

- Terapia genica nei tumori umani: vaccinazione con cellule antigeniche geneticamente modificate e potenziamento da proteine di fusione anticorpo-interleuchina 2.

- Basi sperimentali per vaccini antitumorali geneticamente modificati.

- Vaccini umani tumorali geneticamente modificati esprimenti IFN- α , associato o meno a timidinchinasi di virus *Herpes simplex*.

- Terapia genica nel trattamento della ristenosi dopo angioplastica coronarica percutanea.

- Terapia genica della ristenosi: trasferimento genico in loco della Apo A-*IMILANO* in un modello di danno vascolare nel coniglio.

- Terapia genica diretta intramuscolare nelle malattie cardiovascolari.

Consuntivo scientifico e prospettive di sviluppo

Le unità operative hanno condotto ricerche di base a proiezione clinica, o ricerche pre-cliniche e cliniche in tre settori chiave: la terapia genica delle cellule staminali ematopoietiche (con proiezione terapeutica in malattie ereditarie o acquisite emato-immunologiche), dei tumori solidi (utilizzo di vaccini antitumorali) e delle malattie cardiovascolari (terapia genica della ristenosi arteriosa, in particolare coronarica).

A livello internazionale, queste aree di ricerca dimostrano uno sviluppo esponenziale: in effetti, ad esse viene attribuita una elevatissima priorità biomedica, e di conseguenza una quota ingente delle risorse scientifiche e finanziarie.

I risultati finora ottenuti dal progetto "Terapia genica" sono quanto mai incoraggianti, in linea con il quadro generale di progresso internazionale.

Vengono presentati in dettaglio due studi di particolare rilievo scientifico (paragrafi a e b), che sono oggetto di pubblicazioni in riviste di eccellenza internazionale; gli altri risultati ottenuti vengono esposti sinteticamente nel paragrafo c.

a) La terapia genica di malattie emato-immunologiche ereditarie (ad es. β -talassemia, immunodeficienza ereditaria combinata di tipo SCID) o acquisite (ad es. AIDS) mira alla trasduzione di geni terapeutici nelle cellule staminali ematopoietiche (ad es. trasduzione del gene ADA nella immu-

nodeficienza SCID). Questo obiettivo è reso difficoltoso dalla estrema rarità delle cellule staminali e dalla relativa inefficienza della trasduzione genica ottenuta mediante le metodologie sinora disponibili. Su questi due aspetti il progetto (ricerche sul trasferimento genico nelle cellule staminali emopoietiche umane) ha conseguito progressi rilevanti, sia attraverso lo sviluppo della tecnologia di purificazione delle cellule progenitrici/staminali ematopoietiche, ma soprattutto con la messa a punto di sistemi innovativi di trasduzione genica, in collaborazione tra l'ISS, l'Istituto Oncologico Europeo, Milano e la Stanford University, S. Francisco, USA.

Caratteristiche tecnologiche del sistema retrovirale di trasduzione genica. - Questo sistema ha una serie di caratteristiche innovative: 1) è basato su vettori retrovirali chimerici (contenenti il sito di replicazione e il gene EBNA-1 di EBV, al fine di mantenere episomale il plasmide retrovirale MFG), nei quali è stato inserito sia il gene "reporter" ("green fluorescence protein", GFP) sia il gene esogeno da trasdurre; 2) il livello di produzione delle particelle retrovirali è elevato (il titolo virale è superiore di ≥ 1 log rispetto ai sistemi tradizionali); la linea cellulare produttrice ("Phoenix", costituita di fibroblasti di rene di scimmia) viene allestita in tempi assai brevi, mediante transfezione transiente; 3) la trasduzione genica delle cellule progenitrici/staminali è elevata (l'efficienza di trasduzione è pari a ~40-50%); 4) le cellule trasdotte possono essere sorate in base all'espressione della GFP, in modo da ottenere una popolazione cellulare contenente il 100% di cellule esprimenti la GFP e il gene esogeno; infine 5) il numero di copie di vettore retrovirale integrato varia da 1 a 4 (aspetto metodo-

logico del tutto innovativo) e il livello di espressione del gene GFP e del gene esogeno sono direttamente correlati: si possono quindi separare popolazioni di cellule progenitrici/staminali con espressione modesta o elevata dei geni trasdotti (in quanto contenenti una o più copie del vettore retrovirale), con un effetto di "dosaggio genico" (aspetto anch'esso del tutto innovativo).

Questo sistema di trasduzione genica è potenzialmente applicabile ad uno spettro assai vasto di patologie cliniche emato-immunologiche, come detto, con prospettive del massimo interesse scientifico-biomedico.

Utilizzando tale sistema, è stato possibile inserire in cellule progenitrici/staminali normali il gene codificante la proteina di fusione PMLRAR α , associata alla leucemia acuta promielocitica. Le cellule trasdotte hanno acquisito il fenotipo di cellule leucemiche promielocitiche (stimolo proliferativo, blocco differenziativo a livello promielocitico e inibizione dell'apoptosi) in tutte le condizioni di coltura utilizzate (in particolare, in assenza o in presenza di fattori di crescita ematopoietici). È stato in tal modo ottenuto, per la prima volta, un modello di leucemogenesi umana *in vitro*: questo modello ha potenzialmente un'importanza fondamentale nello studio delle patogenesi e della terapia di questa forma leucemica.

Risultati analoghi sono stati ottenuti trasducendo il gene della proteina di fusione AML-1-ETO, associata a talune leucemie acute mielomonocitiche: in tal caso le cellule progenitrici/staminali trasdotte venivano indotte a proliferazione e differenziazione monocitica, associata a inibizione dell'apoptosi e caratteristiche morfologiche evidenti di atipia leucemica.

Questo approccio sperimentale assume quindi una valenza a carattere generale, e si configura come una nuova metodologia per l'identificazione di geni leucemogenetici e per lo studio dei relativi meccanismi oncogenetici, oltre che come modello innovativo per studi *in vitro* sulla terapia delle leucemie, in particolare sulla terapia genica. Inoltre, questi vettori retrovirali di nuova generazione potranno essere applicati vantaggiosamente alla terapia genica di cellule staminali purificate in numerose malattie emato-immunologiche, ereditarie (ad es. β -talassemia, immunodeficienza combinata di tipo SCID) o acquisite (ad es. AIDS).

b) La malattia coronarica rappresenta uno dei maggiori capitoli di spesa nella sanità dei paesi occidentali. Una delle terapie selettive per la malattia coronarica è rappresentata dall'angioplastica percutanea transluminale (PTCA): circa un milione di PTCA vengono eseguite ogni anno. D'altra parte, i benefici di tale procedura sono limitati, poiché in ~30-50% dei pazienti si assiste ad una ristenosi del segmento di vaso dilatato. Non vi sono trattamenti efficaci della ristenosi (riduzione della formazione della neointima dopo danno endoteliale, osservata a livello sperimentale e confermata nei "trial" clinici). Con la possibile eccezione dell'eparina, non sono ancora disponibili agenti terapeutici in grado di inibire la proliferazione delle cellule muscolari da mitogeni (ad es. da PDGF ed EGF). L'interazione di vari fattori coinvolti nella crescita con i loro recettori induce una serie complessa di reazioni biochimiche, che attivano il protooncogene *ras* o la proteinchinasi A cAMP-dipendente (PKA): di conseguenza, l'approccio utilizzato nelle ricerche sulla terapia genica nel trattamento della ristenosi dopo angioplastica coro-

narica percutanea ha mirato ad inibire le proteine *ras* o PKA con due tipi diversi di molecole: 1) plasmidi esprimenti cDNA dominanti-negativi (dn) di *ras* e 2) agenti farmacologici che incrementano i livelli di cAMP in modo da mantenere elevata l'attività di PKA. E' stato dimostrato che questi due approcci sperimentali consentono di bloccare sperimentalmente la proliferazione delle cellule muscolari arteriose *in vivo*: risultati particolarmente incoraggianti sono stati ottenuti dopo terapia genica con *ras* dn.

E' di conseguenza realistico immaginare che, nell'immediato futuro, si possa far uso di "stent" ingegnerizzati con resine a rilascio lento che contengono cDNA di *ras* dn (o attivatori di PKA come il cAMP), in modo simile a come si sta sperimentando oggi con "stent" ricoperti con poliaminaeparina: in effetti lo stent "stainless steel" può essere ricoperto con uno strato di imina polietilenica e destran solfato per rilasciare localmente *ras* dn (o, in alternativa secondaria, cAMP). Si propone che la prossima tappa sperimentale sia uno studio clinico che validi la fattibilità di quest'approccio terapeutico per la cura della ristenosi dopo angioplastica.

c) Le altre linee di ricerca afferenti al sottoprogetto 1 ("Terapia genica delle cellule staminali ematopoietiche") hanno prodotto risultati di rilievo. In particolare, l'Istituto "S. Raffaele" di Milano ha sviluppato sistemi di trasduzione genica con caratteristiche linea-specifiche, di notevole interesse per la terapia genica di malattie ematologiche ereditarie di una singola linea ematopoietica (ad es. la β -talassemia e altre malattie ereditarie eritropoietiche). L'ISS, in collaborazione con il Dipartimento Biopatologia umana dell'Università "La Sa-

pienza" di Roma e il Dipartimento di Scienze biomediche ed oncologia umana dell'Università di Torino, ha caratterizzato una larga casistica di leucemie acute mieloidi e linfoidei, per quanto attiene l'espressione sia di recettori di fattori di crescita (ad es. IL-3) sia di fattori di trascrizione (ad es., GATA-1 e TAL-1), che svolgono una funzione chiave sulla regolazione della proliferazione-differenziazione ematopoietica normale. I risultati hanno una notevole importanza per valutare l'eventuale funzione di questi recettori e fattori trascrizionali nella leucemogenesi, e aprire quindi la possibilità ad approcci terapeutici molecolari al livello dei blasti leucemici. In parallelo, è stato dimostrato che la trasduzione del gene TNF- α o IL-2 in cellule di T linfoma linfoblastico induce rispettivamente apoptosi, associata ad un effetto "killing" sulle cellule viciniori e riconoscimento specifico delle cellule tumorali, associato ad espressione del recettore CD3.

Oltre ai risultati sulla ristenosi arteriosa sopracitati, il sottoprogetto 2 ("Terapia genica nei tumori solidi e nelle malattie cardiovascolari") ha condotto ricerche di sicuro interesse.

Nel settore di ricerca di base, è stata identificata e caratterizzata funzionalmente una sequenza IRES umana nel "cluster" D dei geni homeobox, potenzialmente in grado di ottimizzare la traduzione combinata di due geni nella cellula "target".

Nel settore di terapia genica nei tumori solidi, le ricerche dell'Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura dei Tumori di Milano hanno dimostrato sperimentalmente l'efficacia terapeutica di vaccini anti-

tumorali ottenuti mediante trasduzione genica di IL-12, comparativamente a IL-2 o IL-4; a livello clinico, linee di melanoma trasdotte con i geni per IL-2 e/o B7.1 hanno dimostrato un'aumentata immunogenicità e sono quindi di potenziale utilizzo clinico in pazienti affetti da melanoma. Nell'ambito delle ricerche, condotte presso l'Università di Torino, sulle basi sperimentali per vaccini antitumorali geneticamente modificati, è stata svolta una serie di indagini sull'effetto antitumorale *in vivo* di numerose citochine (iniettate come tali e/o trasducendo i geni relativi in cellule neoplastiche), in particolare IL-12 e IL-2, ma anche IL-4, -6, -7, -10, GM-CSF, IFN- α e - γ , TNF- α , valutando comparativamente l'efficacia antitumorale dei diversi approcci bioterapici. La ricerca condotta in Istituto nell'ambito dei vaccini umani tumorali geneticamente modificati esprime IFN- α ha brillantemente documentato la possibilità di cura radicale di topi trattati con cellule eritroleucemiche di Friend trasdotte con i geni per IFN- α 1 e timidinchinasi di virus *Herpes simplex* dopo trattamento con ganciclovir.

Nel settore cardiologico la ricerca sulla terapia genica della ristenosi, condotta dall'Istituto di Scienze Farmacologiche dell'Università di Milano, ha dimostrato: 1) l'inibizione dell'ispessimento dell'intima dopo manipolazione perivascolare mediante trasduzione del gene dell'apolipoproteina A-1 MILANO, 2) la parziale correzione dell'iperlipoproteinemia nel topo "knock-out" per apolipoproteina E (apoE) dopo trattamento con plasmidi contenenti il gene apoE4 diretto da promotori virali.

3.1.8 Sviluppo dell'uso di protoni in terapia oncologica

Nel 1995 è stato costituito il Comitato scientifico di progetto e sono state analizzate le varie opzioni possibili sul tipo di macchina acceleratrice da impiegare. Queste possono essere raggruppate in tre classi: a) ciclotroni isocroni superconduttori, ad alto campo magnetico; b) sincrotroni non superconduttori pulsati, ad alto campo magnetico; c) acceleratori lineari per protoni ad alto gradiente.

Dai primi studi effettuati è apparso, inoltre, importante scegliere di "iniettare" nell'acceleratore principale protoni già portati ad un'energia relativamente elevata, in modo da permettere anche la produzione di isotopi radioattivi utili per la PET (positron emission tomography), che diverrebbe una importantissima ulteriore metodica (diagnostica) a disposizione.

La definizione del tipo di macchina acceleratrice ha costituito il momento cruciale dell'intero progetto, poiché ha permesso di effettuare le scelte tecnologiche più opportune e di progettare l'acceleratore in modo da ottenere il massimo grado di affidabilità.

Dopo sei mesi di studi e diverse riunioni del Comitato scientifico di progetto, è stata esclusa l'opzione sincrotrone, focalizzando l'attenzione su due macchine, l'acceleratore lineare e il ciclotrone superconduttivo.

Successivamente alla decisione finale del Comitato scientifico di progetto che, nel corso del 1995, aveva selezionato il progetto di acceleratore lineare (TOP Linac), ci si è attivati, in collaborazione con l'ENEA, per definire in modo più preciso i parametri della macchina in funzione delle varie utenze, quali la protonterapia, la produzione di radioisotopi per PET e gli esperimenti di radiobiologia e dosimetria.

Per quanto riguarda la protonterapia, che è l'applicazione principale del TOP linac, sono stati effettuati studi per comprendere l'incidenza di alcuni parametri della macchina sulle caratteristiche dell'irraggiamento, elencando le principali specifiche cliniche e, conseguentemente, fisiche che un fascio di protoni dedicato alla protonterapia deve soddisfare per essere efficacemente usato nella maggior parte delle patologie.

Si è deciso di progettare il TOP Linac con tre uscite di fascio. La prima (Beam-1) con fascio a 65 MeV, adatto unicamente per la terapia dell'occhio, la seconda (Beam-2) con fascio ad energia variabile tra 65 e 200 MeV ma a posizione fissa con direzione orizzontale, e la terza (Beam-3) con fascio ad energia variabile tra 65 e 200 MeV, distribuito da una testata isocentrica rotante.

La Tabella 13 riassume le specifiche di protonterapia, così come offerti dal TOP Linac sulla base del lavoro svolto negli ultimi tre anni.

Per integrare il sistema di produzione di radioisotopi per la diagnostica PET nel TOP Linac si è individuato un iniettore (Linac iniziale che costituirà la prima parte del TOP Linac) in grado di generare un fascio di 7 MeV in due modalità di funzionamento, a bassa (10 nA) o ad alta (20 μ A) corrente, a seconda che l'uso sia la protonterapia o la produzione di radioisotopi.

Per le esperienze di radiobiologia, importanti per una corretta valutazione degli effetti biologici dei protoni, che possono essere diversi da quelli, già noti, indotti da radiazioni X e gamma, si è ritenuto di deviare parte del fascio di protoni da 7 MeV destinato alla produzione di radioisotopi e di indirizzarlo in una sala attigua, destinata alla sperimentazione radiobiologica.

Tabella 13. - Specifiche di protonterapia

Parametri	Valori del TOP Linac
Valori operativi dell'energia	65 MeV (Beam-1) 82 MeV (Beam-2/3) 100 MeV (Beam-2/3) 100-200 MeV (variabile) (Beam-2/3)
Spread di energia	< 0,75 % tra 65 e 200 MeV
Precisione dell'energia	< 0,4 MeV
Emittanza trasversa	< 1,2 p mm mrad
Intensità di corrente media	0,1 - 5 nA a tutte le energie
Valori impulsivi della corrente (max)	10 mA, 5 ms
Numero di protoni per impulso (max)	3 10 ⁶ - 3 10 ⁸
Frequenza di ripetizione	10 - 400 Hz
Numero di impulsi in 1 min a 400 Hz	24 000
Rateo di dose massimo	2 Gy/min in un vol. 20x20x10 cm ³

Il progetto preliminare effettuato in questi anni ha riguardato anche l'impianto nella sua globalità. Il sito individuato per l'installazione corrisponde all'area dell'Istituto Superiore di Sanità contigua all'Istituto Regina Elena, con lo scopo di permettere la gestione dell'apparato e l'uso diretto del fascio al personale dell'Istituto oncologico per la ricerca e l'applicazione clinica, mentre si potrà utilizzare contemporaneamente lo stesso fascio per la ricerca fisica e radiobiologica e per la produzione di radioisotopi.

Le attività di dosimetria e microdosimetria hanno riguardato: 1) lo sviluppo di un calorimetro ad acqua per la misura assoluta di dose; 2) lo studio della risposta del sistema dosimetrico alanina/EPR a fasci di protoni; 3) la caratterizzazione del sistema dosimetrico gel-Fricke/NMR; 4) la valutazione dell'utilizzo di camere a ionizzazione multisetto per il monitoraggio del fascio dell'acceleratore TOP Linac.

Le attività in biofisica e radiobiologia dei protoni hanno riguardato tre principali linee di ricerca: a) caratteristiche biofisiche e radiobiologiche dei protoni; b) metodi di valutazione dell'efficacia biologica di pro-

toni nelle condizioni di interesse terapeutico; c) sviluppo di test predittivi della risposta tumorale alla radioterapia con protoni.

L'attività relativa alla rete multimediale per la terapia con protoni ha avuto come scopo lo sviluppo di strumenti hardware e software in grado di consentire l'acquisizione, la trasmissione via rete e l'analisi dell'insieme di informazioni rilevanti per la terapia con fasci di protoni.

Costituiscono obiettivi della linea di ricerca: a) la definizione, in termini informatici, di una cartella clinica oncologica; b) il confronto di soluzioni tecnologicamente avanzate per la trasmissione di dati; c) la valutazione di metodi per l'analisi, la gestione e la compressione delle immagini.

L'implementazione di un sistema avanzato per piani di trattamento radioterapici ha richiesto l'individuazione e la collaborazione di specialisti che hanno consentito di pianificare lo sviluppo del progetto.

Tra i risultati già ottenuti si ricordano l'implementazione del software in ambiente UNIX. E' importante sottolineare che la versione definitiva del programma completo dovrà essere compilata ed eseguita su

stazioni di lavoro DEC, il cui sistema operativo è UNIX. Ciò comporta che tutti i programmi, o porzioni di essi, da integrare in quello definitivo, non essendo stati concepiti per lavorare in tale ambiente, debbano essere opportunamente modificati per essere resi compatibili.

Questo lavoro è stato avviato da tempo e ciò di cui attualmente si dispone è:

a) L'algoritmo di calcolo delle distribuzioni di dose per i fasci di fotoni ed elettroni "tradotto" in FORTRAN per UNIX e compilato.

b) Il modulo DDIS di visualizzazione dei dati anatomici (set di immagini CT), dei volumi di interesse e delle curve isodose attualmente in uso al PSI (sviluppato in ambiente PV-Wave).

c) L'algoritmo di calcolo delle distribuzioni di dose per i fasci di protoni solo parzialmente sottoposto al processo di "traduzione". Ciò è legato in parte alla complessità dell'algoritmo stesso, che richiede in questa fase una collaborazione costante con gli interlocutori del PSI.

d) Messa a punto in ambiente AVS di una routine per la visualizzazione 3D dell'anatomia del paziente (parte del programma sviluppata *ex novo*). Essa consente di immagazzinare e gestire in modo molto accurato le informazioni dello studio diagnostico del paziente, prevede inoltre la possibilità di realizzare il "contouring" dei volumi d'interesse, a differenza del modulo DDIS del PSI.

L'unico problema di delicata soluzione al momento sembra essere legato alla velocità di esecuzione, che diventa immediatamente insoddisfacente quando la mole di dati da gestire dinamicamente comincia a crescere. E' stata comunque attivata una collaborazione con un gruppo statunitense per lo studio delle applicazioni in ambito medico dell'AVS per l'analisi della questione.

In definitiva, l'attività svolta nel triennio ha fornito le indicazioni di base per l'attività di realizzazione effettiva del prototipo, che vedrà impegnati i ricercatori ancora per diversi anni, nell'ipotesi che il flusso dei finanziamenti continui al livello necessario.