

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Obiettivi e interpretazione
degli studi pre-clinici richiesti per avviare
la sperimentazione clinica di fase I**

**A cura di
Marino Massotti e Annarita Meneguz**

Laboratorio di Farmacologia

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

01/22

Istituto Superiore di Sanità

Obiettivi e interpretazione degli studi pre-clinici richiesti per avviare la sperimentazione clinica di fase I.

A cura di Marino Massotti e Annarita Meneguz

2001, iv, 84 p. Rapporti ISTISAN 01/22

Questo volume raccoglie le relazioni, aggiornate, degli interventi al Workshop “Studi clinici di fase I: aspetti tecnico-scientifici e regolatori. Incontro fra istituzioni e mondo della ricerca” svoltosi presso l’Istituto Superiore di Sanità il 21 dicembre 1999. Oltre ad una *overview* dell’attività svolta nel periodo 1977-1999 dalla Commissione dell’Istituto per l’accertamento della composizione e dell’innocuità dei prodotti farmaceutici di nuova istituzione da avviare alla sperimentazione clinica di fase I, sono riportate le relazioni dei vari esperti dell’Istituto, ciascuno per i settori di propria competenza, che illustrano le finalità degli studi richiesti, le modalità con cui vengono valutati i loro risultati ed i principi in base ai quali è formulato il parere finale. Un rappresentante della Società Italiana Affari Regolatori è stato invitato ad illustrare il punto di vista della controparte sull’attività dell’Istituto in questo settore. I vari capitoli riguardano gli aspetti di qualità, sicurezza e farmacodinamica dei prodotti chimici, biologici, biotecnologici, nonché di prodotti per terapia genica e cellulare somatica. Inoltre sono riportati capitoli specifici riguardanti i metodi di inattivazione/rimozione virale, la mutagenesi e i problemi di interpretazione dei dati della sperimentazione animale, in generale e per i farmaci antitumorali ed antimicrobici. L’appendice riporta la struttura del dossier da presentare a corredo della domanda. L’obiettivo di questo volume è di diffondere fra gli utenti le informazioni sui criteri di valutazione del dossier pre-clinico per contribuire a favorire lo sviluppo della sperimentazione clinica in Italia per facilitare il processo istruttorio riducendone i tempi, mantenendo elevato il livello scientifico della valutazione.

Parole chiave: Sperimentazioni cliniche di fase I, Documentazione pre-clinica di qualità, sicurezza, attività

Istituto Superiore di Sanità

Pre-clinical studies requested for phase I clinical trials: goals and interpretation.

Edited by Marino Massotti and Annarita Meneguz

2001, iv, 84 p. Rapporti ISTISAN 01/22 (in Italian)

This volume collects the updated contributions to the workshop “Phase I clinical trials: scientific and regulatory aspects: meeting between health authorities and scientists”, held in Rome on 21 December, 1999 at the Istituto Superiore di Sanità (ISS). The Director General of the ISS illustrates the activity of the Committee for evaluation of safety and quality of new drugs for phase I clinical trials. Then the various experts of the ISS illustrate the aims of the pre-clinical studies requested, how the results are evaluated and the final opinions released. A representative of the SIAR (Società Italiana Affari Regolatori, Italian Society for Regulatory Affairs) reports the point of view of the industry on the activity of the ISS. The contributions of the experts of the ISS concern the quality, safety and efficacy of chemicals and biologics, with particular emphasis for products intended for gene therapy and somatic cell therapy. Additional papers concern viral validation, mutagenesis, the interpretation of animal data with particular emphasis for anticancer and antimicrobial drugs. The Appendix shows the structure of the dossier to be submitted with the application. The aim of the volume is to spread information among future applicants to facilitate the preparation of the dossier. This will improve the process of evaluation and will reduce the time spent to evaluate the documentation.

Key words: Phase I clinical trials, Pre-clinical studies: quality, safety and activity

Il rapporto è disponibile online nel sito di questo Istituto: www.iss.it/pubblicazioni.

INDICE

Premessa	iii
L'attività dell'Istituto Superiore di Sanità nella formulazione del parere per l'avvio degli studi clinici di fase I <i>Giuseppe Benagiano</i>	1
Problemi connessi alle autorizzazioni di prodotti di nuova istituzione: risultati di una indagine <i>Walter Bianchi, Eutiziana Alessi, Cinzia Bascarin, Gabriele Brunetti, Emanuela Turla, Patrizia Villa</i>	10
Analisi della documentazione sulla qualità dei prodotti "chimici" <i>Elena Ciranni</i>	16
Analisi della documentazione sulla qualità dei prodotti biologici e biotecnologici <i>Carlo Pini</i>	19
Analisi della documentazione sulla qualità dei prodotti per terapia genica <i>Maria Cristina Galli</i>	22
Valutazione di qualità dei prodotti per terapia cellulare <i>Giovanni Migliaccio</i>	26
Analisi della documentazione sulla validazione virale <i>Maria Rapicetta</i>	37
Analisi della documentazione farmaco-tossicologica pre-clinica necessaria per l'avvio della sperimentazione clinica di fase I <i>Annarita Meneguz, Giuseppe Marano, Patrizia Popoli, Marino Massotti</i>	42
Analisi della documentazione sulla mutagenesi dei farmaci <i>Angelo Carere</i>	54
Lo sviluppo di nuovi farmaci anti-tumorali: aspetti scientifici e normativi <i>Ugo Testa</i>	60
Analisi della documentazione farmacologica dei prodotti antimicrobici <i>Antonio Cassone</i>	74
Appendice Struttura del dossier da presentare all'Istituto Superiore di Sanità a corredo delle domande di autorizzazione all'avvio degli studi clinici che ricadono nel DPR 754/1994, articolo 1, lettera c)	79

PREMESSA

Il processo di autorizzazione all'avvio della sperimentazione clinica di un nuovo farmaco è finalizzato a definire le condizioni di sicurezza entro le quali la sperimentazione stessa può essere effettuata. Nel caso di sperimentazioni cliniche di fase I, tali condizioni vengono stabilite per estrapolazione dai risultati degli studi pre-clinici volti a dimostrare la tollerabilità sull'animale di laboratorio di una preparazione, con determinate caratteristiche di purezza. Per la complessità del processo di valutazione, la normativa italiana ha attribuito sin dal 1974 all'organo tecnico-scientifico del Servizio Sanitario Nazionale, l'Istituto Superiore di Sanità, il compito di formulare un parere sull'ammissibilità dei nuovi farmaci alla sperimentazione clinica di fase I. Tale compito è stato svolto dall'Istituto nel rispetto della cultura scientifica, che da sempre ha caratterizzato i suoi interventi nei vari settori di sanità pubblica. Ciò è stato possibile in quanto gli esperti chiamati ad esprimere il parere, svolgono quotidianamente attività di ricerca scientifica nei settori della qualità e della sicurezza e farmacologia pre-clinica.

La sperimentazione clinica di fase I ha una notevole importanza sul piano scientifico, in quanto rappresenta la prima verifica dell'applicabilità sull'uomo di ipotesi formulate nei laboratori di ricerca. Inoltre, per le sue finalità (principalmente la definizione dei livelli di sicurezza d'uso) e per le sue modalità di esecuzione (in un numero ridotto di soggetti studiati in modo molto approfondito), essa ha un notevole impatto sullo sviluppo della ricerca clinica, sulla formazione dei farmacologi clinici e, più in generale, sulla cultura del farmaco nella classe medica. Per questi motivi, l'Autorità Sanitaria deve stabilire condizioni favorevoli per incentivare questi studi clinici in Italia.

Lo scopo di questo volume è offrire al lettore le indicazioni fondamentali sul razionale scientifico e sugli obiettivi degli studi pre-clinici richiesti per autorizzare l'avvio della sperimentazione clinica di fase I in Italia. In esso sono raccolte le relazioni degli interventi al workshop *Studi clinici di fase I: aspetti tecnico scientifici e regolatori. Incontro fra istituzioni e mondo della ricerca*, che si è svolto presso l'Istituto Superiore di Sanità il 21 dicembre 1999.

All'inizio del workshop, l'allora Direttore dell'Istituto ha presentato i risultati dell'attività svolta negli oltre due decenni di attività dalla Commissione per l'accertamento della composizione e dell'innocuità dei prodotti farmaceutici di nuova istituzione. Successivamente, gli esperti dell'Istituto hanno illustrato, ciascuno per il settore di propria competenza, la tipologia e le finalità degli studi richiesti, le modalità con cui vengono valutati i loro risultati ed i principi in base ai quali viene formulato il parere finale. Un rappresentante della Società Italiana Affari Regolatori è stato invitato ad illustrare il punto di vista dell'Industria sull'attività svolta dall'Istituto. Infine, nell'Appendice si riporta una razionale suddivisione del dossier e dei suoi contenuti, il cui rispetto consentirà una verifica della completezza della documentazione da allegare ed una esemplificazione del processo di valutazione con conseguente ulteriore contenimento dei tempi di istruttoria.

Le nuove frontiere della scienza medica hanno consentito di identificare nuovi farmaci preparati con le biotecnologie, prodotti per terapia genica e prodotti per terapia cellulare, da sperimentare in malattie a prognosi grave o infausta. La sperimentazione di questi prodotti ha aumentato la complessità del processo di valutazione, soprattutto per ciò che concerne gli aspetti di qualità e sicurezza d'uso. Questo processo richiede non solamente specifiche competenze scientifiche ma anche la necessaria flessibilità interpretativa dei risultati pre-clinici per la corretta definizione dei rischi ipotizzabili sull'uomo. Gli articoli di questo volume dedicati a tali prodotti, sottolineano gli aspetti scientifici e regolatori più significativi, da tenere in considerazione nella preparazione del dossier da sottoporre all'Istituto.

Visto il numero crescente di richieste di prodotti per terapia genica e per terapia cellulare somatica da parte dei ricercatori di istituzioni di ricerca pubblica, che hanno poca dimestichezza con i problemi regolatori, l'Istituto ha avviato una serie di iniziative per facilitare la preparazione del dossier. Le più significative sono rappresentate: i) dalla pubblicazione sul *Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità* di alcune linee guida per i prodotti per terapia genica (volume 9, n.10, p. 1-8, 1996) e cellulare somatica (volume 10, n.5, p. 1-8, 1997), reperibili anche sul sito web dell'Istituto (www.iss.it); e ii) dalla programmazione di audizioni con i richiedenti ed i loro esperti per discutere gli aspetti tecnico-scientifici della proposta prima della presentazione della domanda.

La diffusione fra gli utenti dei criteri di valutazione utilizzati dagli esperti dell'Istituto consentirà di migliorare il confronto scientifico anche per superare alcune disparità di vedute. Questo aspetto è di particolare rilevanza, per le seguenti ragioni: i) il processo di sviluppo di una nuova terapia ha oggi una dimensione internazionale, quindi già nei primi studi clinici debbono essere rispettati gli standard riconosciuti dalla comunità scientifica internazionale; ii) tale processo può essere accompagnato da un confronto costruttivo con gli organi tecnico-scientifici dell'Autorità Sanitaria nazionale; ed infine iii) occorre offrire ai ricercatori italiani le stesse opportunità dei colleghi stranieri di verificare la potenzialità terapeutica delle loro scoperte, anche per aumentare la competitività italiana in questo settore.

Prof. Enrico Garaci
Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità

L'ATTIVITÀ DELL'ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ NELLA FORMULAZIONE DEL PARERE PER L'AVVIO DEGLI STUDI CLINICI DI FASE I

Giuseppe Benagiano
*Direttore * dell'Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Introduzione

Le procedure di autorizzazione alla sperimentazione clinica di fase I in Italia prevedono, fin dal 1973, l'acquisizione di un parere dell'Istituto Superiore di Sanità su qualità, farmacodinamica e sicurezza dei farmaci da studiare. Gli esperti dell'Istituto effettuano un vero e proprio "referaggio" dei dati sperimentali ottenuti dai richiedenti – se necessario anche con un confronto diretto con i loro esperti – che garantisce l'alto profilo scientifico del processo di valutazione. Tale procedimento è giustificato dalla complessità del processo di interpretazione dei risultati degli studi animali al fine di stabilire i potenziali vantaggi terapeutici e le condizioni di sicurezza di impiego sull'uomo di un nuovo farmaco.

Già nella prima fase di applicazione della normativa iniziò un dibattito sull'indispensabilità o meno di sottoporre alle valutazioni dell'Istituto tutti i farmaci proposti per la sperimentazione clinica in Italia. Maturò così la decisione di separare i percorsi autorizzativi fra i farmaci per i quali erano già disponibili studi clinici, anche se eseguiti in altri Paesi, e quelli per nulla o non ancora sufficientemente studiati sull'uomo. L'espressione "giudizio di delibazione" sulla "notorietà" del nuovo composto, mutuata dal linguaggio legale, fu utilizzata per definire la procedura attraverso la quale distinguere le due categorie. L'obiettivo già da allora era di stabilire l'esistenza di dati sull'uomo sufficienti per stabilire la sicurezza del nuovo composto nelle condizioni previste dal protocollo clinico proposto per la sperimentazione in Italia, a salvaguardia dei soggetti da arruolare.

Una serie di decreti emanati nel 1998 ha esemplificato le procedure, attribuendo ai Comitati Etici locali il compito di formulare il parere sulla "notorietà" del farmaco da avviare alla sperimentazione clinica, con l'eccezione di alcune categorie di prodotti, per i quali la competenza rimane al Ministero della Sanità.

Quadro di riferimento normativo

Con la legge 519/1973, l'Italia, dopo gli USA, si è dotata di una normativa per il controllo della sperimentazione clinica dei nuovi farmaci. I decreti di attuazione del 1977 hanno poi stabilito le documentazioni da presentare a corredo della domanda. Gli studi da eseguire sono stati definiti sulla base delle indicazioni della comunità scientifica internazionale; ciascuno di essi ha specifiche finalità per l'inquadramento farmacologico e tossicologico del nuovo composto.

Le recenti richieste di sperimentazione clinica con prodotti per terapia genica e cellulare somatica, ha spinto l'Istituto ad emanare linee guida riguardanti gli studi sulla qualità di questi

* Fino al 24 aprile 2001.

prodotti, pubblicate sul *Notiziario* dell'Istituto e disponibili per consultazione sul sito Internet dell'Istituto stesso. Inoltre, sempre al fine di facilitare la preparazione della documentazione e di rendere quindi più agevole e rapido lo svolgimento dell'istruttoria, l'Istituto ha avviato un programma di audizioni con i richiedenti per un esame sulla completezza e sulla qualità della documentazione che questi ultimi intendono presentare. Questa esigenza è derivata soprattutto dalla preponderante richiesta di sperimentare questi prodotti da parte di istituzioni di ricerca clinica, che hanno una scarsa dimestichezza con i problemi regolatori in questo settore. Fino ad ora ne sono state fatte una diecina ed altrettante sono state programmate.

Fino ad ora il quadro normativo di riferimento per gli espletamenti dell'Istituto nelle procedure di autorizzazione alla sperimentazione clinica di fase I può essere considerato esauriente, anche se frammentato in vari atti (Tabella 1).

Tabella 1. Principali normative riguardanti l'attività regolatoria dell'Istituto Superiore di Sanità nelle procedure di autorizzazione per la sperimentazione clinica di fase I

Norma	Disposizioni di competenza dell'ISS
1. DL.vo n. 267 del 30 giugno 1993 <i>Art. 1, comma 2), lettera e)</i>	L'ISS "effettua controlli su vaccini, farmaci e dispositivi medici, alimenti, presidi chimici e diagnostici previsti dalle norme interne e comunitarie"
2. DPR n. 754 del 21 settembre 1994 <i>Art 1, comma 1), lettera c)</i>	L'ISS "provvede all'accertamento della composizione e della innocuità dei prodotti farmaceutici di nuova istituzione prima della sperimentazione sull'uomo"
3. DM 28 luglio 1977 e DM 25 agosto 1977 Decreti attuativi dell'art. 1 lettera l) della legge 519/1973	<ul style="list-style-type: none"> – Procedure interne per l'istruttoria – Istituzione di una Commissione mista Istituto-Ministero – Documentazione a corredo della domanda
4. Circolare n. 8 del 10 luglio 1997:	
– <i>Capitolo 2, lettera c)</i>	Per i medicinali di nuova istituzione, la domanda deve essere inviata, oltre che al Ministero, all'ISS corredata degli allegati
– <i>Capitolo 7, lettera b)</i> <i>Terapia genica</i>	Conformità della documentazione sulla qualità alle linee guida dell'ISS (pubblicate sul <i>Notiziario</i> dell'ISS: 9, n.10, 1996)
– <i>Capitolo 7, lettera c)</i> <i>Terapia cellulare somatica</i>	Conformità della documentazione sulla qualità alle linee guida dell'ISS (pubblicate sul <i>Notiziario</i> dell'ISS: 10, n.5, 1997)
5. Decreto 9 maggio 1995, n.331	Termine previsto per l'istruttoria: 60 giorni
6. Decreti 18 marzo 1998	Parere "negativo" sulla notorietà del composto da parte del Comitato Etico locale o nazionale, comporta la richiesta delle procedure di valutazione dell'Istituto per avviare la sperimentazione clinica sull'uomo
7. Decreto 1 giugno 1998 (Tabella, punto 12)	Ammontare della cifra da versare all'erario per l'istruttoria

Queste normative prevedono la preparazione di una relazione di valutazione da parte gli esperti dell'Istituto sulle documentazioni presentate a corredo della domanda, in base alla quale

la Commissione mista fra Istituto e Ministero formula il parere finale. Questo parere forma la base per l'autorizzazione, che viene rilasciata successivamente dal Ministero della Sanità. E' in corso un processo di revisione delle attuali norme per snellire le procedure ed aggiornare gli allegati tecnici.

Ricognizione dell'attività svolta dalla Commissione dell'Istituto Superiore di Sanità

L'esame dei dati sull'attività della Commissione dell'Istituto mostra che nel periodo 1977-1999 sono state valutate richieste per oltre 600 principi attivi, e di questi ne sono stati approvati poco più di 500 (Figura 1).

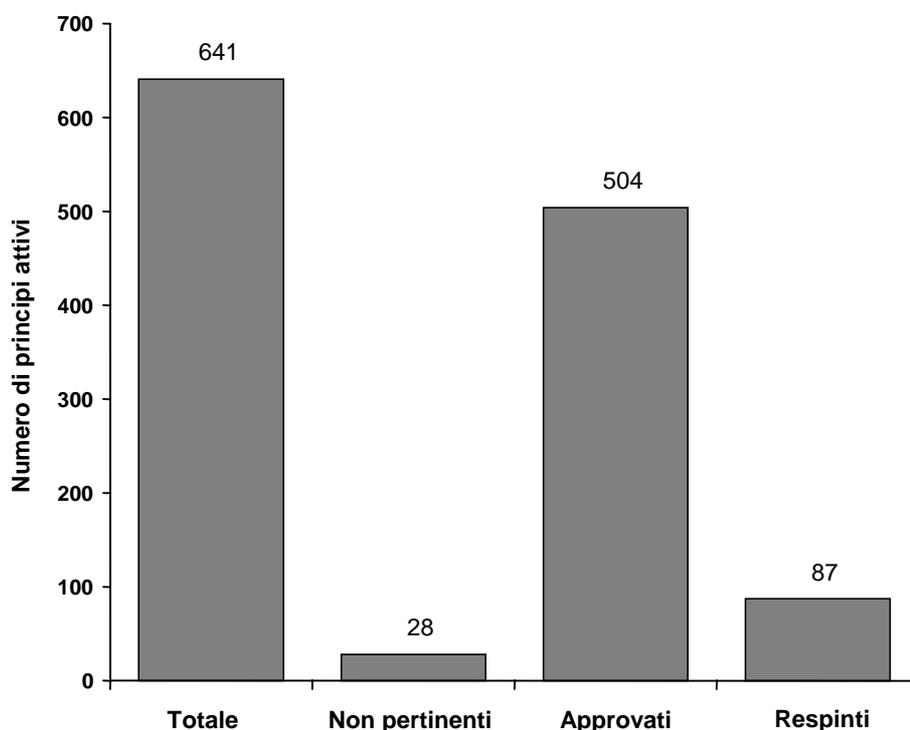


Figura 1. Attività svolta dalla Commissione *ad hoc* dell'Istituto Superiore di Sanità per la ammissibilità dei prodotti farmaceutici di nuova istituzione alla sperimentazione clinica preliminare nel periodo 1977-1999

Occorre considerare tuttavia che circa il 60% delle domande approvate hanno avuto un iter istruttorio laborioso a causa delle carenze nella documentazione rilevate dagli esperti dell'Istituto all'atto delle prime verifiche della domanda o nel corso dell'istruttoria.

Una analisi dell'andamento temporale delle richieste mostra che negli ultimi anni il loro numero è andato progressivamente diminuendo. Infatti si è passati da una media di 20-30 per anno negli anni '80, con un massimo di circa 50, a 5 nel 1999 (Figura 2).

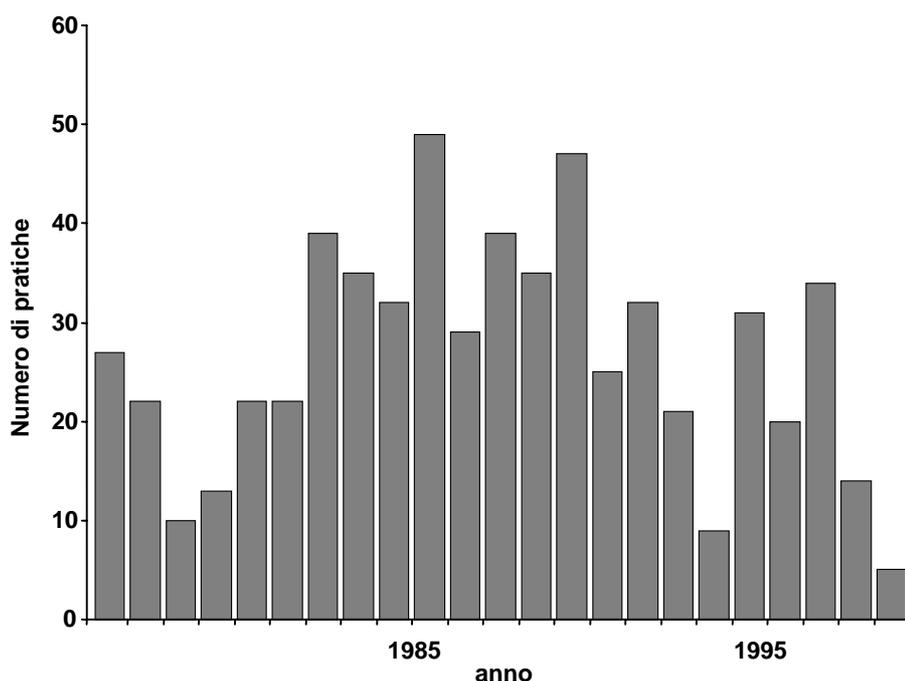


Figura 2. Numero di domande per anno presentate nel periodo 1977-1999 per gli accertamenti istruttori dell'Istituto Superiore di Sanità sui farmaci di nuova istituzione da avviare alla sperimentazione clinica pilota in Italia

Questi dati meritano una attenta riflessione da parte dei responsabili dell'autorità sanitaria che deve favorire lo sviluppo della sperimentazione clinica di fase I in Italia. Infatti, in ragione delle finalità (prima verifica sull'uomo delle ipotesi formulate con gli studi animali) e delle modalità con cui sono svolti (studio approfondito su un numero limitato di soggetti), questi studi hanno un significativo impatto sulla formazione del farmacologo clinico con riflessi positivi anche sulla cultura del farmaco nella classe medica. Inoltre, occorre ricordare l'importanza che i risultati di questi studi rivestono per la validazione dei modelli pre-clinici, soprattutto quelli di tossicità e di farmacologia molecolare, utilizzati nella selezione dei nuovi farmaci. Infatti la presenza di effetti avversi non accettabili e/o l'assenza dell'efficacia attesa del nuovo composto, se da una parte ne impedisce l'ulteriore sviluppo dall'altra può fornire indicazioni importanti per la selezione di nuovi derivati.

Il tempo impiegato dagli esperti dell'Istituto per il completamento dell'istruttoria tecnica è da alcuni anni stabilmente intorno ai 60 giorni, tempo competitivo con quello dei Paesi della Unione Europea, ed allorché la documentazione è risultata completa e scientificamente adeguata è di circa 30 giorni. Sicuramente un elemento che aiuterebbe a contenere questo intervallo di tempo è l'esigenza manifestata dai ricercatori dell'Istituto di confrontarsi con interlocutori esperti dei richiedenti per discutere eventuali aspetti controversi della documentazione tecnica.

La distribuzione dei composti valutati dalla Commissione dell'Istituto fra le varie categorie terapeutiche, mostra che le domande più numerose appartengono alle categorie dei farmaci cardiovascolari, di quelli per patologie del sistema nervoso centrale, degli antimicrobici e degli antitumorali. Negli ultimi anni sono state presentate richieste per la terapia genica e cellulare

somatica, anche se al momento in numero limitato, soprattutto da parte di istituzioni di ricerca clinica (Figura 3).

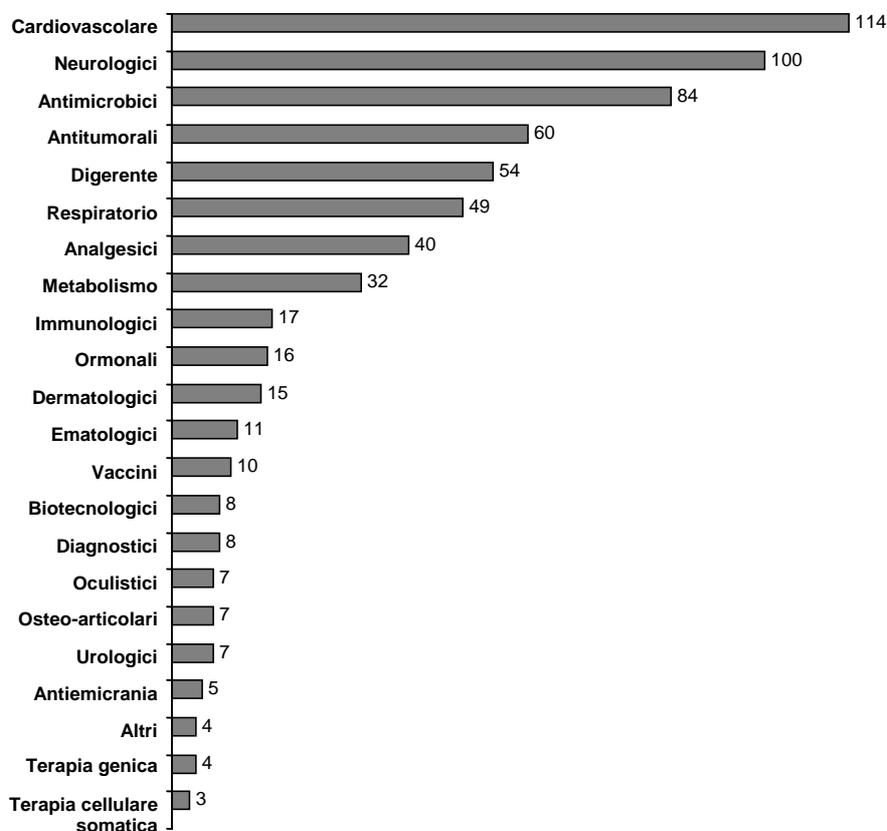


Figura 3. Distribuzione per categorie farmaco-terapeutiche dei prodotti farmaceutici di nuova istituzione valutati dalla Commissione *ad hoc* dell'Istituto Superiore di Sanità nel periodo 1977-1999

L'andamento temporale delle richieste per le varie categorie ha mostrato una incidenza massima negli anni '80, con una progressiva riduzione nel corso degli anni '90 per quasi tutte le classi di farmaci. Solo per gli antitumorali è stato osservato un aumento nel tempo (Figura 4), recentemente a carico soprattutto di prodotti per la terapia genica e cellulare somatica. Questi dati dimostrano che le sperimentazioni cliniche che si sono svolte in Italia hanno riguardato nel tempo gli argomenti più significativi al centro del dibattito scientifico internazionale, smentendo almeno in parte l'ipotizzata marginalizzazione dell'Italia nella ricerca clinica in settori di avanguardia.

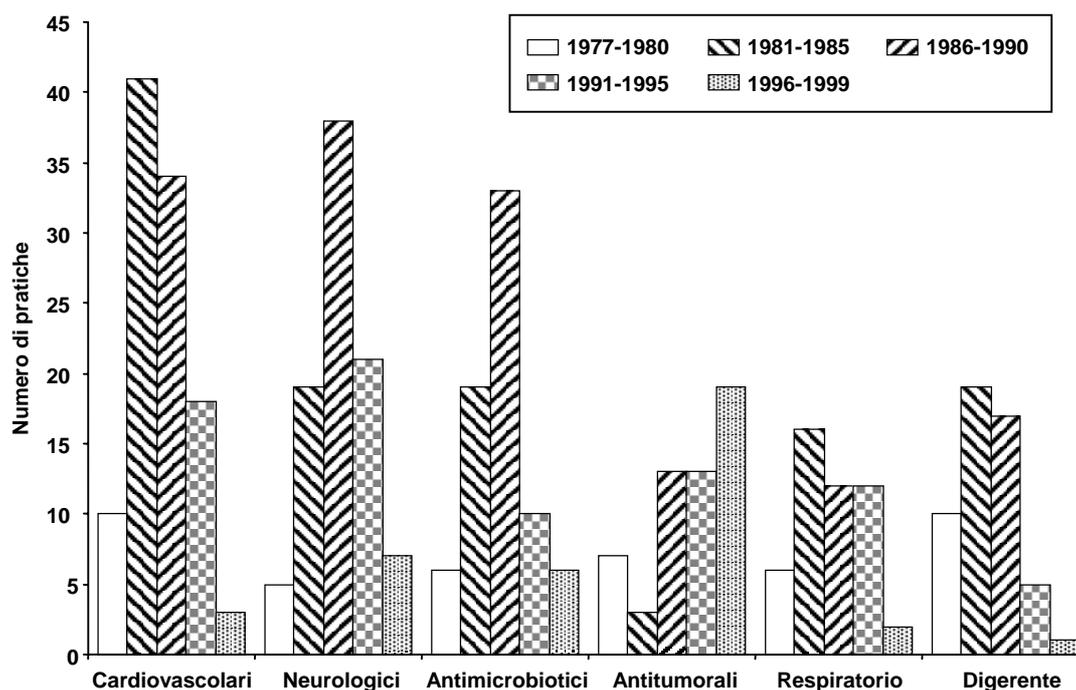


Figura 4. Distribuzione nel tempo delle domande valutate dalla Commissione *ad hoc* dell'Istituto Superiore di Sanità nel periodo 1977-1999 dei prodotti farmaceutici di nuova istituzione per alcune categorie farmacoterapeutiche

Follow-up dei prodotti approvati dalla Commissione dell'Istituto Superiore di Sanità

L'esperienza maturata in questi 22 anni di lavoro della Commissione (1977-1999), ci ha spinto ad avviare una serie di iniziative per un riesame critico del parere espresso al momento della valutazione, non solamente per rivedere il giudizio espresso dagli esperti sulle strategie e sulle modalità di conduzione degli studi, ma anche per una valutazione della capacità predittiva dei modelli sperimentali (singolarmente e nel loro insieme), utilizzati in tossicologia e farmacodinamica.

Occorre infatti ricordare che lo studio delle capacità predittive dei modelli sperimentali pre-clinici rientra fra le attività scientifiche svolte dai laboratori dell'Istituto che si occupano del farmaco. La moderna strategia di selezione dei nuovi farmaci inizia con la definizione dei modelli di farmacologia molecolare utili per costruire molecole sempre più selettive, da sottoporre dapprima a studi per valutarne l'attività biologica e successivamente a studi di farmacologia su modelli sperimentali animali che tentano di riprodurre la patologia umana cui vogliono fare riferimento. In presenza di risultati incoraggianti si avviano gli studi di tossicologia.

In questo contesto si inseriscono due interessanti iniziative dell'Istituto volte principalmente ad una verifica puntuale della validità scientifica dei pareri emessi a suo tempo dagli esperti dell'Istituto.

La prima riguarda l'organizzazione di tavole rotonde che, con cadenza annuale, affrontano il problema dei farmaci innovativi nelle varie categorie farmaco-terapeutiche. Oltre a definire la reale innovatività dei nuovi composti, attraverso il confronto fra i dati consolidati nella pratica clinica e quelli ottenuti nei modelli animali, si cerca di fare il punto sulla capacità predittiva di questi ultimi soprattutto nel caso di composti innovativi. Quest'anno si è parlato dei farmaci antiipertensivi e l'argomento del prossimo anno riguarderà i farmaci antipsicotici.

La seconda consiste in una indagine conoscitiva che l'Istituto effettua ogni tre anni presso i richiedenti sul destino dei farmaci approvati dalla Commissione. Le risposte ad un questionario inviato ai richiedenti hanno così consentito di acquisire informazioni sull'85% di questi prodotti.

I risultati dell'indagine appena completata hanno mostrato che più del 30% dei prodotti autorizzati sono stati approvati per la commercializzazione, anche se 3 di loro sono stati successivamente revocati. Questo risultato è superiore a quello registrato in una analoga indagine effettuata nel 1995, allorché la percentuale era assestata intorno al 25%. Rispetto a quest'ultima sono state osservate analoghe percentuali per i prodotti il cui sviluppo è stato sospeso nel corso degli studi di fase I (circa il 25%), verosimilmente a causa di effetti indesiderati, e di quelli sospesi nel corso degli studi di fase II e III, verosimilmente a causa della mancanza della efficacia attesa (Figura 5).

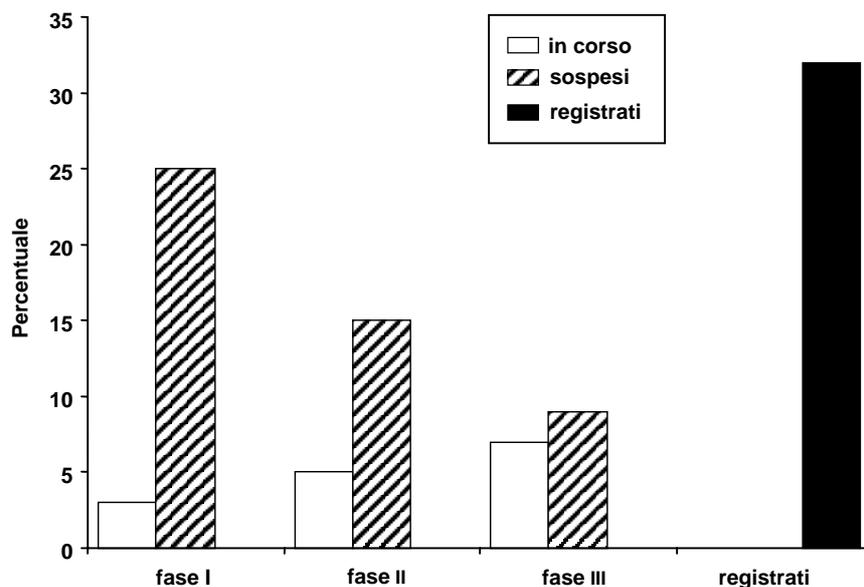


Figura 5. Destino dei prodotti farmaceutici di nuova istituzione approvati dalla Commissione *ad hoc* dell'Istituto Superiore di Sanità nel periodo 1977-1999

Indirizzi futuri

La ricerca clinica in Italia ha avuto un notevole impulso dopo l'emanazione dei decreti del marzo 1998, a seguito dei quali si è verificato un significativo aumento delle sperimentazioni di fase II e III in Italia.

Questi risultati positivi hanno richiamato l'attenzione degli esperti delle varie parti interessate sulla necessità di predisporre una nuova regolamentazione delle procedure di approvazione degli studi di fase I e di fase IV.

Per quanto concerne gli studi di fase I, l'Istituto ha sottoposto agli organi competenti per il parere di competenza un nuovo schema di decreto in sostituzione di quelli ormai obsoleti del 1977, preparato in collaborazione con esperti del Ministero della Sanità e del mondo accademico ed industriale.

Fra le proposte che dovrebbero maggiormente esemplificare la procedura, vale la pena ricordare:

- l'estensione dell'autorizzazione a tutta la sperimentazione di fase I, mentre i decreti del 1977 consentivano l'autorizzazione di uno studio preliminare limitato a pochi pazienti;
- l'invio del parere dell'Istituto direttamente al richiedente, che lo alleggerà alla documentazione da inviare ai Comitati etici locali, e per conoscenza al Ministero delle Sanità;
- la certificazione al richiedente dell'avvio dell'istruttoria, che deve essere completata entro 60 giorni;
- l'introduzione di una procedura abbreviata per modificazioni minori di pareri precedenti;
- l'adeguamento degli allegati tecnici alle raccomandazioni degli organismi nazionali ed internazionali, che possono essere modificati successivamente con un decreto del Direttore dell'Istituto dopo aver acquisito il parere del Consiglio Superiore di Sanità.

Inoltre, sempre ai fini di una verifica puntuale dei contenuti del parere espresso, viene richiesto l'invio all'Istituto ed al Ministero di un rapporto completo dei risultati degli studi di fase I entro un anno dal termine del loro completamento.

Conclusioni

La procedura "autorizzativa" attualmente in vigore è stata più volte ritenuta penalizzante rispetto a quella esclusivamente "informativa" vigente nella maggior parte degli altri Paesi industrializzati.

A nostro parere il percorso per autorizzare la prima sperimentazione sull'uomo deve passare attraverso una "certificazione" da parte dell'autorità sanitaria delle condizioni di sicurezza d'uso del nuovo prodotto, così come avviene per la definizione delle modalità di utilizzo di un farmaco in una determinata malattia nel caso dell'autorizzazione alla immissione in commercio di una nuova specialità medicinale. Infatti, la previsione dell'effetto sull'uomo si basa sulla interpretazione dei risultati rispettivamente di studi animali e di studi clinici ancora insufficienti per una stima definitiva del rapporto beneficio/rischio del nuovo composto. Si tratta quindi di un processo che non può non passare attraverso una valutazione collegiale da parte di esperti di varie discipline.

D'altra parte, il cambiamento negli anni del concetto di salute e di accettabilità dei rischi individuali connessi con l'utilizzo dei farmaci, ha fatto sì che ogni nuova scoperta potenzialmente utile per la salute richieda verifiche e validazioni accurate secondo standard via

via adeguati al progresso delle conoscenze scientifiche, prima di applicarla sull'uomo. E ciò appare più vero per l'avvio degli studi clinici di fase I, allorché, come già detto in precedenza, l'autorizzazione è basata sull'interpretazione dei dati pre-clinici, e non esiste un potenziale benefico ad esempio per il volontario sano.

Ora non ci resta che aspettare con fiducia il completamento dell'iter di approvazione e di emanazione di un nuovo decreto che possa avere risultati altrettanto positivi sullo sviluppo della sperimentazione clinica di fase I in Italia, così come è avvenuto per le fasi II e III con i decreti del marzo 1998.

PROBLEMI CONNESSI ALLE AUTORIZZAZIONI DI PRODOTTI DI NUOVA ISTITUZIONE: RISULTATI DI UNA INDAGINE

Walter Bianchi, Eutiziana Alessi, Cinzia Bascarin, Gabriele Brunetti, Emanuela Turla, Patrizia Villa
Società Italiana Attività Regolatorie, Pavia

Introduzione

La Società Italiana di Attività Regolatorie ha accolto con entusiasmo l'invito del Professor Massotti a contribuire a questo Workshop che costituisce una importante e concreta conferma, non solo dell'attenzione e dell'interesse delle Autorità regolatorie per la sperimentazione clinica, ma anche della volontà di affrontare e risolvere i problemi che ancora restano dopo i fondamentali progressi realizzatisi per la fase II e III con i decreti 18 e 19 marzo 1998.

Per la realizzazione dell'indagine è stato costituito un gruppo di lavoro al quale hanno partecipato i co-autori di questa relazione.

Per la raccolta dei dati è stato approntato un questionario (Figura 1) che con una lettera di accompagnamento è stato inviato tramite fax ai Regulatory Affairs Manager delle prime 50 Aziende in termini di fatturato ed ai Direttori Scientifici degli Istituti di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (IRCCS).

Nella lettera (Figura 2) sono state illustrate le finalità dell'indagine intesa ad evidenziare i problemi incontrati nell'allestimento della documentazione o nelle valutazioni dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS), comprese eventuali richieste ritenute non giustificate..

Il questionario è stato approntato in modo da rilevare:

- i) se l'Azienda/IRCCS ha presentato in passato domande di autorizzazione alla sperimentazione clinica per prodotti di nuova istituzione e, in caso di risposta affermativa, quante;
- ii) se, in quanti casi e quali ragioni tecnico regolatorie hanno indotto a decidere di non presentare domande di autorizzazione;
- iii) se sono stati incontrati problemi tecnico regolatori (specificando quali) nell'allestimento della documentazione pertinente all'accertamento della composizione e della innocuità;
- iv) se sono stati incontrati – e, in caso di risposta affermativa, quali – problemi tecnico regolatori nelle valutazioni elaborate dall'ISS relativamente alla composizione, alla innocuità ed al piano di sperimentazione clinica.

E' stato poi chiesto se sono stati incontrati problemi tecnico regolatori nell'allestimento della documentazione per le categorie particolari di farmaci elencati nell'allegato 2 del DM del 18 marzo 1998.

E' stato inoltre chiarito che le informazioni trasmesse sarebbero state presentate in modo anonimo. Infine sono stati sollecitati dei suggerimenti per la soluzione dei problemi tecnico regolatori connessi alla fase I.

Barrare la voce che interessa. Scrivere a stampatello con biro nera

Cognome e nome del compilatore

Ruolo

Azienda/Istituto

A) La sua azienda/istituto ha presentato in passato domande per ottenere l'autorizzazione alla sperimentazione clinica di prodotti di nuova istituzione?

sì, in caso affermativo specificare quante domande

no, in tal caso esistevano ragioni di tipo tecnico-regolatorio? sì no

In caso affermativo specificare quali: In caso affermativo specificare quali:

Avete incontrato problemi tecnico-regolatori nell'allestimento della documentazione destinata ad essere valutata dall'Istituto Superiore di Sanità?

no sì

Da compilare solo in caso di risposta affermativa:

I problemi erano connessi all'allestimento della documentazione pertinente all'accertamento della composizione?

no sì

In caso affermativo specificare il/i problema/i

I problemi erano connessi all'allestimento della documentazione pertinente all'accertamento della innocuità?

no sì

In caso affermativo specificare il/i problema/i

B) Avete incontrato problemi tecnico-regolatori nelle valutazioni elaborate dall'Istituto Superiore di Sanità relativamente ai prodotti di nuova istituzione?

no sì

Da compilare solo in caso di risposta affermativa:

I problemi erano connessi alla valutazione pertinente all'accertamento della composizione?

no sì

In caso affermativo specificare il/i problema/i

I problemi erano connessi alla valutazione pertinente all'accertamento della innocuità?

no sì

In caso affermativo specificare il/i problema/i

I problemi erano connessi alla valutazione pertinente al piano di sperimentazione clinica?

no sì

In caso affermativo specificare il/i problema/i

C) Avete incontrato problemi tecnico-regolatori nell'allestimento di documentazione per le categorie di farmaci di cui all'allegato 2 del DM del 18 marzo 1998 (medicinali per terapia genica e vaccini genici, oligonucleotidi antisense e ribozimi, medicinali per terapie cellulari somatiche, ecc.)?

no sì

In caso affermativo specificare il/i problema/i

D) Considerate le problematiche tecnico-regolatorie connesse alla fase I quali sarebbero a suo avviso i suggerimenti utili per la loro risoluzione?

Data Firma

Da restituire entro il 30/11/99 indirizzando a:

Fax Fax

In ottemperanza alla legge 675/96 i dati individuali (cognome, nome, ruolo, azienda/istituto) di coloro che forniranno le informazioni non saranno rivelati a terzi e i dati forniti saranno presentati in modo anonimo senza rivelare le singole fonti delle singole informazioni.

Figura 1. Questionario inviato alle Aziende

Carissimo Professore,
Egregio Dottore, Egregio Dottore,
Gentile Dottoressa, Gentile Dottoressa,

il prossimo 21 dicembre presso l'Istituto Superiore di Sanità si terrà un Congresso, organizzato dallo stesso Istituto Superiore di Sanità, relativo agli studi clinici di fase I.

Il contesto ci sembra ideale per segnalare quali sono gli eventuali problemi di tipo tecnico-regolatorio incontrati nell'allestimento della documentazione sulla quale l'Istituto Superiore di Sanità esegue gli accertamenti di sua competenza e quali le eventuali problematiche sempre di tipo tecnico regolatorio, comprese anche eventuali richieste ritenute non giustificate dagli esperti del richiedente, rilevate nelle valutazioni elaborate dall'Istituto. Abbiamo quindi l'opportunità di segnalare gli eventuali problemi incontrati, problemi che le Autorità appaiono interessate a conoscere per poterli affrontare e risolvere.

A tale scopo abbiamo bisogno della Sua collaborazione. La preghiamo di compilare e di restituirci il breve questionario che le trasmettiamo in allegato entro il 30-11-99.

I risultati dell'indagine, estesa a 50 Aziende e agli IRCCS, saranno presentati in una relazione nel corso del Congresso. Non sarà indicata la singola fonte delle informazioni ma solo il settore di provenienza (Azienda farmaceutica o IRCCS).

Nel ringraziarLa anticipatamente per la preziosa collaborazione Le inviamo distinti saluti.

W. Bianchi, T. Alessi, C. Bascarin, G. Brunetti, E. Turla, P. Villa
SOCI SIAR SOCI SIAR

Figura 2. Lettera inviata alle Aziende

Risultati

Le risposte ricevute dalle Aziende sono state 20 su 50 questionari inviati, mentre hanno risposto 5 IRCCS dei 32 coinvolti.

Otto Aziende hanno presentato in passato un totale di 28 domande per ottenere l'autorizzazione alla sperimentazione clinica per prodotti di nuova istituzione. Fra le 8 Aziende è compresa una Azienda che aveva presentato domande di delibazione al Ministero della Sanità e da questo inviate all'ISS per gli accertamenti relativi ai prodotti di nuova istituzione. Nessuna domanda è stata segnalata da parte degli IRCCS.

Delle 12 Aziende che non hanno presentato domande di autorizzazione 7 lo hanno fatto per ragioni tecnico-regolatorie.

Le ragioni che hanno indotto le Aziende a non presentare domande sono state:

- 1) i tempi autorizzativi troppo lunghi (3 risposte);
- 2) l'effettuazione degli studi di fase I da parte della Casa Madre (2 risposte);
- 3) l'incertezza sui tempi autorizzativi;
- 4) l'incertezza sui criteri in base ai quali vengono chieste modifiche al protocollo;
- 5) la poca esperienza che c'è in Italia per ragioni storiche nella conduzione di studi di fase I;
- 6) ragioni pratiche non meglio specificate.

Delle 8 Aziende che hanno presentato domande, 4 hanno riportato problemi incontrati nell'allestimento della documentazione destinata ad essere valutata dall'ISS.

I problemi connessi all'allestimento della documentazione per l'accertamento della composizione erano relativi alla descrizione tecnico farmaceutica ed ai metodi di controllo. Nel caso della documentazione relativa all'innocuità, i problemi che sono stati segnalati si riferivano ai dati di tossicità riproduttiva, alla durata degli studi di tossicità ed alla mutagenesi.

Passando ai problemi tecnico-regolatori rilevati nelle valutazioni dell'ISS, questi sono stati riferiti da 4 Aziende. Per quanto attiene alla valutazione pertinente all'accertamento della composizione, la problematica segnalata era relativa alla valutazione delle impurezze ed a campioni di impurezze del principio attivo. In merito all'accertamento dell'innocuità le richieste di documentazione relativa a mutagenesi, carcinogenesi e tossicità a lungo termine sono state ritenute eccessive rispetto alla fase di sviluppo. Infine i dosaggi e il numero di somministrazioni autorizzati sono stati ritenuti troppo ridotti (3 risposte).

Non è pervenuta nessuna segnalazione, né da Aziende né da IRCCS, di problemi tecnico-regolatori nell'allestimento della documentazione destinata ad essere valutata dall'ISS per le categorie di farmaci di cui all'allegato 2 del DM del 18 marzo 1998. A questo proposito le informazioni pervenute indicano che per le domande relative a questi prodotti sono state valutate dall'ISS in maniera tempestiva, ma che gli studi non hanno potuto essere avviati mancando il Comitato Etico Nazionale.

Suggerimenti per la soluzione dei problemi tecnico regolatori connessi con la fase I sono pervenuti da 8 aziende e da un IRCCS.

I suggerimenti delle Aziende sono stati:

- 1) tempi autorizzativi più brevi e definiti (4 risposte);
- 2) adeguarsi al più presto alla futura direttiva europea sulla sperimentazione clinica (3 risposte);
- 3) ridefinire i requisiti documentativi (2 risposte);
- 4) istituire dei *pre-submission meeting* (2 risposte);
- 5) decentralizzare le autorizzazioni (2 risposte);
- 6) eliminare di norma gli accertamenti tecnici di laboratorio sulla composizione (2 risposte);
- 7) migliorare e sinergizzare l'interazione ISS - Ministero della Sanità ai fini di una riduzione dei tempi;
- 8) rendere disponibile lo scientific advice;
- 9) maggiore flessibilità nella valutazione del dossier farmaco-tossicologico;
- 10) nuove norme.

I suggerimenti pervenuti da un IRCCS sono stati:

- 1) abilitare le Istituzioni con documentata capacità in termini di esperienza e di disponibilità logistica, a condurre tali sperimentazioni;
- 2) dare all'ISS una funzione di coordinatore assicurando i criteri di efficienza e di rapidità richiesti dall'industria privata, fonte prevalente di nuove molecole;
- 3) rivedere i requisiti tossicologici richiesti per i prodotti biologici.

Discussione e conclusioni

L'indagine condotta presenta dei limiti: il questionario è stato inviato ad un ridotto numero di Aziende, il tempo a disposizione per la compilazione del questionario è stato limitato e non è stato richiesto di specificare il periodo a cui si riferivano le risposte. Inoltre la casistica non è risultata numerosa per la non elevata percentuale di risposte da parte delle Aziende e la bassa percentuale di risposte degli IRCCS, probabilmente motivata quest'ultima dalla non disponibilità di propri prodotti per cui dover richiedere l'autorizzazione.

La numerosità del campione di Aziende a cui è stato inviato il questionario e il numero di risposte pervenute inducono a ritenere che i problemi segnalati possano dipingere un quadro

solo parziale dei problemi effettivamente esistenti. Inoltre verosimilmente gran parte dei problemi segnalati sono problemi riferiti al passato e non più attuali.

Sulla base dei risultati della nostra indagine riteniamo comunque che si possano formulare le considerazioni che seguono.

Il dato del cospicuo numero di Aziende che non hanno presentato domande di autorizzazione alla sperimentazione clinica per prodotti di nuova istituzione ed il fatto che verosimilmente buona parte di quelle che hanno presentato domanda lo hanno fatto in tempi non recenti inducono a ritenere che in Italia si conducano pochi studi clinici di fase I.

Le ragioni di ciò sono sicuramente molteplici:

- 1) la maggior parte delle Aziende hanno la loro casa madre all'estero e preferiscono gestire direttamente e in modo unitario questa delicata fase dello sviluppo del farmaco (il numero di studi di fase I e il numero di soggetti coinvolti non sono elevati e i volontari sani sono relativamente facili da reperire);
- 2) alcune Aziende multinazionali effettuano gli studi di fase I nelle strutture di farmacologia clinica esistenti all'interno delle Aziende stesse e situate salvo rarissime eccezioni all'estero;
- 3) esistono all'estero CRO (Contract Research Organisation) cui affidare *in toto* la conduzione della fase I che si sono dimostrate in grado di garantire certezza dei tempi pur rispettando la qualità dei risultati;
- 4) la quantità di documentazione richiesta per l'autorizzazione in Italia appare maggiore che in altri Paesi;
- 5) il tempo di autorizzazione alla sperimentazione clinica di nuovi farmaci e quello di conduzione degli studi rappresentano un fattore decisivo nella scelta di dove effettuare gli studi;
- 6) la tipologia degli studi di fase I si è evoluta e la normativa attuale non appare adeguata.

I suggerimenti che abbiamo raccolto si possono riassumere nelle seguenti richieste:

- 1) armonizzazione della normativa con quella degli altri Paesi;
- 2) riduzione dei tempi di autorizzazione;
- 3) *pre-submission meeting*;
- 4) consulenza scientifica.

La prima e la seconda richiesta erano scontate, la normativa vigente risale al 1977, dopo di allora ci sono stati la globalizzazione dello sviluppo dei farmaci, l'ICH (International Conference on Harmonisation), l'EMA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products), la legislazione europea si è arricchita di regolamenti e direttive che pongono molta attenzione non solo a quality, safety ed efficacy ma anche ai tempi fissati per le valutazioni da parte delle autorità che sono ora più contenuti e certi.

Ogni ritardo nell'autorizzazione della fase I comporta corrispondenti ritardi nelle fasi successive e di conseguenza nella commercializzazione della specialità medicinale in tutto il mondo con da un lato l'impossibilità di mettere tempestivamente a disposizione dei pazienti farmaci potenzialmente molto importanti e dall'altro possibili danni di miliardi in termini di fatturato per ogni giorno di ritardo.

La richiesta di prevedere la possibilità di *pre-submission meeting* ci sembra oltre che un chiaro segnale di fiducia nei confronti dell'ISS anche una testimonianza del desiderio, a nostro avviso positivo, di aumentare il confronto tra proponente e Autorità preposte alla valutazione. In proposito possiamo affermare peraltro che gli Esperti dell'ISS sono da sempre disponibili ad incontri per confrontarsi e fornire chiarimenti, consigli e suggerimenti a quanti siano interessati a presentare domande di autorizzazione.

La richiesta di poter attingere alle grandi competenze dell'ISS, del Ministero della Sanità e dei loro Esperti attraverso una consulenza scientifica codificata e procedurizzata (ci riferiamo

allo scientific advice previsto dall'EMA) per indirizzare lo sviluppo di nuovi farmaci ci sembra legittima, costituirebbe infatti il logico corrispondente per i farmaci destinati a seguire la procedura di mutuo riconoscimento di quanto già reso disponibile con successo dall'EMA per i prodotti che seguono la procedura centralizzata. A beneficiarne in tale eventualità sarebbero non solamente le Aziende maggiormente interessate a svolgere studi in Italia e gli IRCCS che volessero sviluppare fino alla registrazione i frutti delle loro ricerche, ma anche l'immagine ed il ruolo dell'Italia in questo settore.

Infine le prospettive future per la fase I in Italia sembrano comunque positive. Il pragmatico e costruttivo atteggiamento assunto dalle Autorità a partire dai decreti ministeriali del 18 e 19 marzo 1998 e lo stesso incontro di oggi fugano ogni dubbio circa il proposito e la determinazione di risolvere i problemi che ancora esistono. Inoltre l'uniformarsi dei tempi autorizzativi che auspichiamo possa presto realizzarsi in Europa non potrà che conferire un impulso positivo alla effettuazione di studi clinici di fase I nel nostro paese e ciò sarà a nostro avviso particolarmente vero per quegli studi che per le caratteristiche dei prodotti da indagare devono essere effettuati non in volontari sani ma nei pazienti. Addirittura ricercata, oltre che eticamente imperativa, sarà la partecipazione dell'Italia a studi di fase I da svolgersi in pazienti affetti da patologie rare o comunque non di comune riscontro.

In conclusione l'Italia è diventata un paese molto più attraente che in passato per la effettuazione di studi clinici di fase II e III ed anche per la fase I il futuro sembra offrire delle importanti opportunità che dopo aver sentito la relazione del professor Benagiano sembrano ormai reali ed imminenti.

ANALISI DELLA DOCUMENTAZIONE SULLA QUALITÀ DEI PRODOTTI “CHIMICI”

Elena Ciranni

Laboratorio di Chimica del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma

La documentazione che il proponente dovrà presentare all’Istituto Superiore di Sanità per l’accertamento della composizione dei prodotti farmaceutici di nuova istituzione, al fine della formulazione del relativo parere per l’avvio degli studi clinici di fase I, dovrà essenzialmente essere conforme, nella forma di presentazione, alle linee guida redatte dall’EMA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) e dovrà tener conto, per i contenuti, a quanto riportato nelle linee guida emanate da organismi nazionali e internazionali.

Per quanto concerne la documentazione, relativa alla qualità dei farmaci prodotti per sintesi chimica, il citato riferimento alle linee guida va applicato con un rigore diverso a seconda dell’argomento di cui trattasi.

Ad esempio, per quanto riguarda la qualità delle *materie prime*, la documentazione che dovrà essere presentata nel caso di un prodotto farmaceutico di nuova istituzione, prima dell’avvio alla sperimentazione clinica, non potrà differire da quella richiesta per una autorizzazione all’immissione in commercio. Infatti, i requisiti di qualità dei principi attivi e degli eccipienti, definiti preliminarmente a garanzia della sicurezza d’uso del prodotto, non subiscono di norma variazioni nel corso degli studi che portano alla sua registrazione e quindi non si giustificano eventuali deviazioni rispetto a quanto richiesto dalle norme. Va fatta invece eccezione per quanto concerne la documentazione contenente i dati di stabilità che ovviamente si riferiranno al solo periodo di sperimentazione e potranno essere limitati al lotto oggetto di studio.

Diverso è l’approccio che dovrà essere seguito per quanto concerne il *prodotto finito*. In tal caso infatti, a differenza di quanto detto per le materie prime, è giustificato un minor rigore nell’applicazione delle norme richieste per la registrazione, considerata l’eventualità che si possa verificare una evoluzione nella definizione delle caratteristiche della formulazione nel corso della sperimentazione. Inoltre, va tenuto in debito conto il fatto che il processo di produzione potrebbe, in questa fase preliminare, non essere ancora completamente convalidato o standardizzato.

Ciò premesso, verranno elencati sommariamente i principali requisiti a cui dovrà soddisfare la documentazione, e sui quali l’Istituto Superiore di Sanità focalizzerà l’attenzione nel corso della valutazione della stessa.

Per quanto concerne le *materie prime*, come già detto in precedenza, è necessaria una loro precisa caratterizzazione, che dovrà essere ampiamente documentata per quanto riguarda gli accertamenti eseguiti, essenzialmente per i punti riportati nello schema seguente:

Materie prime

- Caratteristiche chimiche, fisiche e di stabilità (per il periodo di sperimentazione) di principio attivo ed eccipienti, qualora non riportati nelle farmacopee; purezza (natura e limiti delle impurezze, metodi per la loro valutazione).
- Metodo di produzione del principio attivo (descrizione abbreviata).
- Metodo analitico per la determinazione quali-quantitativa del principio attivo e degli eccipienti (se rilevante).
- Certificati analitici del principio attivo e degli eccipienti.

In particolare, dovranno, pertanto, essere dettagliatamente riportate le loro caratteristiche fisiche, chimiche e di stabilità (queste ultime con le semplificazioni precedentemente menzionate).

Le caratteristiche di purezza delle sostanze dovranno essere supportate da una dettagliata documentazione inerente sia la natura delle impurezze che i metodi per la loro determinazione, puntualmente descritti e convalidati.

Nel caso in cui la materia prima sia costituita da un solo enantiomero di un prodotto chirale, particolare attenzione dovrà essere focalizzata sulla caratterizzazione del principio attivo (enantiomero), nonché sulla specificità e selettività del metodo per la determinazione analitica della purezza enantiomerica. L'eventuale utilizzo di una sostanza in cui si riscontrino più polimorfi dovrà essere supportato da apposita documentazione, a dimostrazione che il prodotto utilizzato abbia quelle caratteristiche descritte, idonee all'uso proposto. Nel caso in cui le materie prime siano riportate in una farmacoepa, dovrà essere fatto riferimento a quest'ultima.

La rispondenza delle caratteristiche della sostanza alle specifiche di qualità indicate dovrà essere documentata mediante i relativi certificati analitici degli accertamenti eseguiti. Ciò dovrà essere attuato sia per i principi attivi che per gli eccipienti.

Per quanto concerne il metodo di produzione del principio attivo, esso potrà essere riportato in modo anche abbreviato, con la descrizione delle sole fasi più significative e critiche.

Per quanto riguarda il *prodotto finito*, come accennato precedentemente, tenuto conto che nel corso della sperimentazione esso potrebbe subire qualche modifica, è prevista una maggiore flessibilità rispetto a quanto richiesto per le materie prime. Ciò non esime però dalla presentazione della documentazione comprovante tutti gli accertamenti eseguiti a garanzia della qualità del prodotto, che deve comprendere anche i relativi certificati analitici, secondo quanto riportato nello schema seguente:

Prodotto finito

- Composizione.
- Descrizione caratteristiche tecnologiche.
- Stabilità per il periodo di sperimentazione.
- Descrizione abbreviata del metodo di produzione.
- Metodo analitico quali-quantitativo per principio attivo e, se rilevante, per eccipienti.
- Certificati analitici.

Quando necessario, particolare attenzione dovrà essere rivolta alla accuratezza della dose terapeutica o unitaria ed al profilo di rilascio del principio attivo dalla forma farmaceutica.

In particolare, il prodotto dovrà essere definito mediante la descrizione della sua esatta composizione e dovrà essere caratterizzato per quanto concerne le sue caratteristiche tecnologiche. A tale proposito, nel caso di preparazioni a rilascio modificato, particolare attenzione dovrà essere rivolta al profilo di rilascio del principio attivo dal prodotto finito, e conseguentemente all'accertamento dell'idoneità dei metodi analitici per la verifica delle caratteristiche di tale rilascio.

Quando opportuno, dovrà essere accertata e documentata l'uniformità di contenuto delle forme farmaceutiche a dose unica nel rispetto dei limiti definiti in farmacoepa.

Metodi analitici appropriati e convalidati dovranno essere presentati per la determinazione quantitativa del principio attivo, ed anche degli eccipienti, nel caso di formulazioni in cui questi ultimi rappresentino un parametro rilevante ai fini dell'idoneità d'uso del prodotto.

La documentazione dovrà prevedere infine i dati di stabilità per il periodo di sperimentazione della preparazione.

Analogamente a quanto richiesto per le materie prime, anche per il prodotto finito dovrà essere presentata una descrizione sommaria del metodo di produzione.

Si sottolinea che, a differenza di quanto finora effettuato, il parere dell'Istituto Superiore di Sanità verrà formulato esclusivamente sulla base della documentazione presentata e non dei risultati di accertamenti sperimentali eseguiti in Istituto. Ciò comporta di conseguenza, da parte di questa istituzione, un esame molto approfondito di quanto presentato.

Qualora però se ne ravvisi la necessità, l'Istituto Superiore di Sanità procederà ad accertamenti sperimentali per la verifica della qualità del prodotto. In tale caso richiederà *campioni* del prodotto finito, del principio attivo, degli standard di riferimento, degli eccipienti e delle impurezze. Tali campioni, dovranno quindi essere inviati all'Istituto, solo se richiesti. Essi potranno anche provenire dall'estero, purché ne sia dichiarato il luogo di produzione, e purché siano stati prodotti e controllati così come descritto nella documentazione.

ANALISI DELLA DOCUMENTAZIONE SULLA QUALITÀ DEI PRODOTTI BIOLOGICI E BIOTECNOLOGICI

Carlo Pini

Laboratorio di Immunologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Tra le varie tipologie di farmaci, i prodotti biologici e biotecnologici costituiscono una categoria caratterizzata da una serie di peculiarità. In particolare, essi sono spesso poco definibili in maniera semplice utilizzando procedure di analisi chimica, ma piuttosto richiedono l'utilizzo combinato di varie metodologie che mirano sia alla caratterizzazione biochimica che alla misurazione della attività biologica del farmaco stesso. Esempi di farmaci biologici sono i vaccini batterici e virali, gli emoderivati, gli allergeni, le citochine naturali non ottenute da linee continue, ecc. Esempi di farmaci biotecnologici, come identificato dalla Normativa della Unione Europea n. 2309, sono costituiti da prodotti da DNA ricombinante, anticorpi monoclonali o citochine ottenute da linee cellulari continue.

La valutazione della idoneità di un prodotto biologico o biotecnologico agli studi di fase I è complessa e richiede una conoscenza completa ed estesa dei dati di qualità. In tal senso, la semplice analisi del principio attivo e del prodotto finito non può essere ritenuta sufficiente. Infatti, la qualità dei prodotti biologici e biotecnologici è definita da una serie di parametri quali il controllo del materiale di partenza, il controllo del processo di produzione e il controllo del prodotto finito.

Il controllo del materiale di partenza utilizzato per la preparazione di prodotti biologici si effettua secondo criteri che sono funzione della tipologia del prodotto stesso. Ad esempio, emoderivati (non ricombinanti) e citochine naturali vedono, di valenza critica, aspetti quali la selezione dei donatori, il sistema di Quality Assurance per la raccolta del plasma, il Plasma Master File, il plasma pool testing, ecc. Per quanto riguarda i vaccini sia batterici che virali, di particolare rilievo è la purezza e stabilità del ceppo, nonché l'assenza di elementi di rischio quali CJD e BSE come potenziali contaminanti eventualmente presenti nel mezzo di coltura. Per gli allergeni, infine, di grande importanza è che nella documentazione di qualità sia presente la certificazione della fonte dalla quale è stato ottenuto il materiale per la preparazione dell'estratto.

Il controllo del materiale di partenza utilizzato per la preparazione di prodotti biotecnologici è articolato in analoghi aspetti. Ad esempio, la qualità dei mezzi di coltura (BSE), un'analisi dettagliata del costrutto e la valutazione del suo stato (integrato, extracromosomale, numero di copie) ove pertinente, l'analisi delle banche di cellule (MCB e WCB) e la valutazione della loro stabilità sono aspetti di primaria importanza. Nel caso di anticorpi monoclonali, la valutazione delle cellule parentali, delle cellule partner della fusione e di eventuali *feeder* deve essere disponibile, specie in considerazione della frequente frammentarietà delle notizie normalmente disponibili per questa tipologia di farmaci spesso sviluppati a livello di ricerca e solo successivamente rivalutati per le loro potenzialità diagnostiche o terapeutiche.

Criterio generale è poi rappresentato dalla disponibilità di una analisi delle banche di cellule MCB e WCB. Una loro completa analisi costituisce elemento fondamentale per la valutazione della sicurezza pre-clinica di prodotti ottenuti da tali banche. È importante che tale caratterizzazione venga effettuata sulla/e banca/he che originano il prodotto in esame, e non su banche sperimentali che possono successivamente venire cambiate per l'introduzione di miglioramenti produttivi.

Il controllo del processo di produzione rappresenta il secondo aspetto fondamentale da considerare. In particolare, il processo di produzione deve essere sufficientemente convalidato, e opportune specifiche *in process* devono consentire di ben definire anche la qualità dei vari intermedi. Il processo di produzione deve essere conseguenza di un opportuno *scaling up* di un analogo procedimento pilota completamente convalidato.

I processi utilizzati nella preparazione di prodotti biologici quali i vaccini e gli estratti allergenici non mostrano aspetti peculiari differenti dalla normale convalida. Per contro, i processi impiegati nel settore degli emoderivati e nella produzione di citochine naturali richiedono una convalida della rimozione/inattivazione dei virus eventualmente presenti, secondo quanto stabilito dalle relative linee guida dell'EMA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products).

Più complessa appare la valutazione della produzione di prodotti biotecnologici, ove risulta fondamentale definire i processi di fermentazione (*single harvest*, *multiple harvest* e *extended population*) e il procedimento di purificazione con le convalide di processo e le specifiche per le impurezze quali proteine e acidi nucleici dell'ospite. Come già accennato, grande importanza riveste l'aspetto della inattivazione/rimozione virale. Infatti, questi farmaci per i quali è ipotizzabile un ipotetico rischio infettivologico, devono essere prodotti utilizzando un processo per il quale sia stato effettuato uno studio atto a dimostrare la capacità del processo stesso di rimuovere eventuali microrganismi presenti. La convalida della rimozione/inattivazione virale deve avvenire in maniera idonea secondo un opportuno *scaling down*.

Nell'ambito del processo di produzione, possono generarsi prodotti intermedi che devono essere opportunamente controllati per tutti gli aspetti rilevanti, inclusa la loro stabilità. Infatti, in un prodotto da avviare allo studio di fase I, non necessariamente sono noti tutti gli aspetti relativi alla stabilità degli intermedi di produzione, e gli effetti della conservazione degli intermedi per vari periodi di tempo sulla qualità e il contenuto delle impurezze deve essere tuttavia opportunamente valutata.

Il controllo del prodotto biologico finito richiede grande attenzione. In particolare, una caratterizzazione chimico-fisica è necessaria per gli emoderivati, per alcuni vaccini e per alcuni allergeni, mentre una caratterizzazione immunologica e biologica è importante per i vaccini e per gli allergeni. Il controllo del prodotto biotecnologico finito richiede spesso la valutazione della attività biologica, unitamente ad una caratterizzazione fisico chimica (peso molecolare, punto isoelettrico), un'analisi strutturale ed una valutazione delle modifiche post traduzionali. In questo senso, la valutazione della glicosilazione, acetilazione, idrossilazione, deaminazione, ossidazione della molecola andrebbe compiuta con una certa attenzione. Dati conformazionali ottenuti mediante *light scattering*, spettroscopia UV, CD e spettrometria di massa sono anche importanti.

Specie per il prodotto finito risulta di primaria importanza disporre di dati di stabilità. Infatti, al fine di conferire un opportuno significato agli studi pre-clinici, i dati di stabilità del prodotto finito devono mostrare riproducibilità da lotto a lotto sia delle caratteristiche del principio attivo che delle impurezze. Occorre precisare che cambiamenti della formulazione in corso di sviluppo del prodotto, spesso introdotti a fini migliorativi, potrebbero rendere inutili i dati di stabilità già disponibili per il precedente prodotto e potrebbero anche inficiare i dati di sicurezza pre-clinica. Nella valutazione della qualità del prodotto finito deve essere sottolineata l'importanza di una dimostrata riproducibilità delle caratteristiche evidenziate dai parametri che ne definiscono il rilascio. Infatti, la riproducibilità dei lotti di prodotto finito supportano la convinzione che il processo è accettabilmente convalidato, e che il prodotto può pertanto essere avviato alla fase I. Tale riproducibilità deve essere vista anche in funzione della dimostrata adeguata capacità di rimozione/inattivazione di agenti infettanti eventualmente presenti. Pertanto, si può in tal senso

affermare che per tali prodotti, la *consistency* è elemento fondamentale a garanzia della sicurezza pre-clinica.

Poiché i prodotti che devono essere sottoposti ad una fase I possono comunque essere soggetti a modifiche anche significative introdotte nel processo di produzione a fini migliorativi, è opportuno menzionare il concetto di “comparabilità” che di recente è in fase di valutazione, ovviamente per farmaci giunti ad un differente livello di sviluppo, presso l’EMA. Appare evidente che nel caso di prodotti in fase di sviluppo per la fase I che afferiscono alla categoria dei farmaci classici, cambiamenti in fase di sviluppo possono essere accettati purché adeguatamente documentati. Per i prodotti biologici e biotecnologici, la immediatezza di tale accettabilità è meno evidente e devono essere tenuti in debita considerazione i seguenti aspetti. Intanto i prodotti biologici sono comparabili con difficoltà perché sono costituiti da miscele o principi attivi poco caratterizzati. Di contro, i prodotti biotecnologici possono essere, in linea teorica, confrontati, purché estesamente analizzati mediante un vasto pannello di approcci tecnologici atti ad evidenziare tutte le varie caratteristiche chimico-fisiche della molecola. L’aspetto della “comparabilità” deve essere tenuto in debito conto nella fase di sviluppo del prodotto sia afferendo alla fase I che successivamente.

Alcuni aspetti di qualità possono infine influenzare parametri di farmacotossicologia. In particolare, l’immunogenicità del principio attivo ma anche di eventuali impurezze deve essere considerata, così come la potenziale cross-reattività degli anticorpi eventualmente indotti o contenuti quale principio attivo nel prodotto biotecnologico. In tal senso deve essere valutata la eventuale azione farmacologica non specie specifica del prodotto stesso influenzata dalla sua eventuale immunogenicità in funzione della sua potenziale azione specie-specifica. Superfluo concludere che per molti prodotti biologici ma soprattutto biotecnologici il modello ideale per la valutazione della farmacotossicologia è rappresentato dai primati non umani.

In conclusione, per i prodotti biologici e biotecnologici, un processo di produzione largamente definito appare indispensabile al fine di poter avviare studi di fase I. Cambiamenti a vario livello possono infatti introdurre elementi di rischio (impurezze, mancata rimozione/inattivazione virale, ecc.) non individuabili semplicemente dall’analisi dei prodotti finiti e/o degli intermedi. Sebbene concepite per la fase di registrazione, le linee guida europee del CPMP (Committee for Proprietary Medicinal Products dell’EMA) relative alla qualità dei prodotti biologici e biotecnologici dovrebbero essere largamente seguite nella preparazione della documentazione afferente alla richiesta di una fase I, così come dovrebbero essere inoltre tenute in considerazione tutte le linee guida relative ad aspetti che fortemente influenzano la sicurezza dei prodotti in questione.

ANALISI DELLA DOCUMENTAZIONE SULLA QUALITÀ DEI PRODOTTI PER TERAPIA GENICA

Maria Cristina Galli

Laboratorio di Biologia Cellulare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

I prodotti per terapia genica sono prodotti medicinali biotecnologici.

La richiesta per l'autorizzazione alla sperimentazione clinica di fase I di un prodotto per terapia genica deve uniformarsi alle linee guida che l'Istituto ha emesso nel 1996.

Le linee guida dell'Istituto Superiore di Sanità per la terapia genica descrivono che cosa deve contenere la documentazione da presentare allo scopo di dimostrare:

- 1) che il prodotto medicinale proposto per la sperimentazione ha le caratteristiche di qualità necessarie;
- 2) che gli studi su modelli animali pre-clinici fanno ipotizzare con sufficiente approssimazione la tollerabilità e danno indicazioni sull'attività;
- 3) che il protocollo clinico include un accettabile piano di controlli di sicurezza sui pazienti e sui loro contatti.

Campo di applicazione delle linee guida

I prodotti medicinali proposti per la terapia genica possono appartenere alle seguenti categorie:

- 1) acidi nucleici (liberi o anche complessati); i vaccini a DNA, essendo in generale costituiti da plasmidi, rientrano in questa categoria; sono invece esclusi oligonucleotidi brevi;
- 2) vettori virali deficienti per la replicazione: possono essere vettori derivati da adenovirus, da retrovirus o da altri virus;
- 3) cellule geneticamente modificate.

Questi prodotti possono essere proposti sia per la terapia sia per la profilassi ma sempre escludendo la possibilità di modificazione del patrimonio genetico delle cellule della linea germinale. Si tratta quindi sempre di terapia genica somatica.

Formato della documentazione

Le linee guida dell'Istituto Superiore di Sanità per la terapia genica prevedono un approccio di valutazione scientifica univoco. Tuttavia i prodotti medicinali che possono essere usati per effettuare terapia genica hanno caratteristiche biologiche, chimiche e molecolari diverse tra loro e possono quindi richiedere delle documentazioni specifiche caso per caso. Anche la valutazione del rapporto rischio-beneficio dipende non solo dalle caratteristiche del prodotto ma anche dal protocollo clinico nel quale viene inserito.

Il metodo di valutazione scientifica è univoco in quanto per ciascun prodotto essa si basa sull'esame dei dati sperimentali di qualità e di sicurezza e sul protocollo clinico. I dati sperimentali devono essere documentati, robusti e riproducibili. La documentazione deve quindi essere fornita sotto forma di dossier diviso nelle tre parti corrispondenti: qualità, sicurezza, protocollo clinico.

Contenuto del dossier

In una prima parte introduttiva, il proponente deve descrivere se le finalità della sperimentazione clinica proposta sono terapeutiche o non terapeutiche, quali sono le basi razionali della sperimentazione, quali sono i benefici attesi dall'approccio innovativo di terapia genica rispetto ad un trattamento standard, quali sono gli indicatori di malattia disponibili per verificare l'efficacia terapeutica, quali sono i livelli di espressione del gene terapeutico attesi e/o necessari per ottenere questi effetti e infine quali possono essere le possibili conseguenze dell'eccessiva espressione del o dei geni terapeutici inclusi nel vettore.

Qualità

Nella parte che riguarda la qualità del prodotto, devono essere descritti il costrutto genico, il metodo di produzione e quello di purificazione, la caratterizzazione ed il prodotto finale.

Nella descrizione del costrutto genico si forniranno dettagli sul sistema di trasferimento genico e su quali sono i passaggi con cui il vettore o il plasmide o le cellule geneticamente modificate vengono costruiti. Devono essere fornite descrizione e risultati dei controlli di qualità effettuati sulle banche cellulari delle cellule produttrici (per esempio le cellule di *packaging*) e sui lotti di semenza virale e lotti di lavoro del virus nel caso di vettori virali. Le banche cellulari devono essere caratterizzate per assenza di contaminanti virali e microbiche (batteri, funghi, micoplasmi). Importanti sono le informazioni sulla verifica dell'identità mediante sequenziamento almeno del gene terapeutico nel prodotto finale, e della stabilità sia del gene terapeutico sia del costrutto completo durante la produzione. Nel caso il prodotto sia costituito da vettori virali, molto importanti sono i dati sulla presenza di vettori virali competenti per la replicazione. Infatti, la presenza di virus replicativo come contaminante può diminuire la sicurezza del prodotto anche se le altre caratteristiche di qualità sono soddisfacenti. Il limite superiore accettabile nel prodotto per la presenza di virus competente per la replicazione dipende dal virus vettore. In generale, la presenza di retrovirus replicativi è motivo sufficiente per il rifiuto del lotto di prodotto. La contaminazione da adenovirus replicativi dovrebbe essere tenuta entro limiti molto stretti. Nella valutazione dei risultati di tali controlli di qualità sui lotti di prodotto si tiene anche conto del metodo usato e del suo limite inferiore di sensibilità, anche in relazione alla dose clinica proposta. Ne deriva quindi che tale metodo deve essere descritto nel dossier in modo dettagliato e devono essere presentati i risultati della sua convalida.

Il processo di produzione deve essere descritto in maniera completa, possibilmente fornendo anche un diagramma di flusso che illustri i passaggi ed eventuali controlli nei punti critici.

Tutti i reagenti di tipo chimico ma soprattutto di tipo biologico, usati sia per le colture cellulari sia per i passaggi di purificazione, devono essere descritti e se ne devono dettagliare le caratteristiche di qualità, soprattutto per l'eventuale contaminazione microbica e virale. I reagenti biologici (come siero, anticorpi, fattori di crescita, enzimi) possono rappresentare la porta di entrata di contaminanti virali anche in presenza di un sistema di banche cellulari molto ben caratterizzato. Per essi è quindi richiesta la presentazione di un certificato di qualità che

indichi a quali saggi di controllo sono stati sottoposti, con quali metodi e con quali risultati. Per i reagenti di origine bovina-ovina-caprina, si applicano anche i requisiti relativi alla prevenzione del rischio della TSE.

Devono essere descritti gli eventuali controlli effettuati ai passaggi critici durante la produzione e purificazione, compresi i relativi limiti di accettabilità, giustificandoli sulla base dei dati sperimentali documentati nel dossier.

Per il rilascio del prodotto finale per l'uso clinico, si deve instaurare fin dove possibile un sistema di lotti sui quali effettuare i controlli di qualità. Questi comprenderanno saggi di identità, quantità, purezza biochimica e microbiologica, contaminazione da virus competente per la replicazione, sterilità, endotossine. Di ciascun controllo vanno stabilite specifiche con opportuni limiti di accettabilità ai fini del rilascio del lotto prima dell'uso clinico. I metodi usati devono essere descritti e devono essere forniti i risultati sperimentali su un certo numero di lotti sotto forma di certificati di qualità.

Si devono fornire anche dati sulla stabilità e la conservazione del prodotto, con una data di scadenza indicativa tale però da coprire l'utilizzazione nella sperimentazione clinica.

La caratterizzazione di un prodotto per terapia genica in sperimentazione di fase I non sarà altrettanto completa di quanto lo potrebbe essere in fase di registrazione. Ciò nonostante, deve essere il più possibile accurata e avvalersi di metodi sia molecolari che biologici. Si deve stabilire l'identità e la stabilità della sequenza del gene terapeutico, devono essere definite la purezza biochimica e microbiologica del prodotto, la presenza o meno di virus replicativi. Si deve anche determinare l'attività biologica, seppure almeno in modo preliminare come espressione del gene terapeutico. Se non viene condotto uno studio di caratterizzazione apposito, l'insieme di tutti questi risultati può derivare dall'analisi completa dei singoli lotti del prodotto medicinale.

Nel caso in cui cellule geneticamente modificate siano il prodotto per la terapia genica, il prodotto finale è costituito dalla preparazione cellulare pronta per l'uso clinico. Esso deve essere caratterizzato su ogni lotto con saggi di identità (che comprenderanno anche il transgene), quantità, purezza biochimica e microbiologica, sterilità, endotossine. Deve essere anche determinata l'assenza o presenza come contaminante dei vettori virali usati per la trasduzione, e se si tratti di forme competenti per la replicazione. Si devono usare a questo scopo metodi di saggio sufficientemente sensibili e i controlli devono essere condotti su quantità di cellule paragonabili alle dosi cliniche proposte.

Nella convalida del processo di produzione, particolare attenzione deve essere data all'assenza di agenti avventizi.

I metodi di saggio devono essere descritti in maniera completa. Per quei metodi che hanno impatto sulla determinazione della sicurezza del prodotto, come per esempio quello per i virus competenti per la replicazione, la convalida deve essere completa; per altri metodi la convalida può essere limitata a specificità e limite di sensibilità.

Sicurezza pre-clinica

La documentazione pre-clinica dovrà fornire dati sia sulla tollerabilità sia sull'efficacia.

Molto importante è la scelta del modello animale ma si possono prevedere studi sia *in vivo* che *in vitro*.

Oltre a studi di tossicologia classica (curva dose-risposta, dose singola e dosi ripetute), bisognerà presentare dati sulla localizzazione del gene terapeutico e sulla sua integrazione nei tessuti bersaglio ed in tessuti non bersaglio. Se la costruzione del vettore è fatta in modo da avere espressione tessuto-specifica del gene terapeutico, questa dovrà essere dimostrata. Negli studi di localizzazione ed espressione si dovrà avere particolare riguardo all'eventuale

trasferimento di geni o del DNA del vettore anche nelle cellule della linea germinale, studiando quindi le gonadi.

Si deve studiare la persistenza del gene terapeutico e del suo prodotto nei vari tessuti e organi. Si deve anche studiare la mobilitazione del vettore utilizzato e la sua eventuale disseminazione, così come la possibile ricomparsa di virus competente per la replicazione. Questi dati forniscono la base per formulare il piano di monitoraggio dei pazienti.

Dovranno essere presentati dati che dimostrino un iniziale effetto *in vivo*. Si dovrà dimostrare una efficienza di trasferimento accettabile del vettore nelle cellule bersaglio, che devono essere identificate ed eventualmente caratterizzate. Si dovrà studiare il livello di espressione del gene terapeutico, la sua regolazione fisiologica o anche farmacologica, identificare e valutare l'attività biologica del prodotto genico e per quanto possibile dimostrare una eventuale correzione del fenotipo patologico da parte del gene terapeutico. Nel caso dei vettori virali, si devono presentare dati sul rapporto tra particelle virali e infettività.

Aspetti di sicurezza del protocollo clinico

Si devono descrivere in modo dettagliato le probabilità di rischio a cui sono esposti i pazienti e le persone con cui essi vengono a contatto (personale sanitario, familiari). In base alla analisi del rischio, devono essere previste e dettagliate idonee misure di contenimento e di controllo per i pazienti, durante ed eventualmente anche dopo il trattamento, e sui loro contatti. Si dovrà pertanto studiare nei pazienti, ed eventualmente nei loro contatti, la mobilitazione e la disseminazione del vettore virale e/o del virus competente per la replicazione, la possibile riattivazione di virus latenti eventualmente presenti, la possibile mobilitazione a tessuti non bersaglio sia del vettore sia di virus competenti per la replicazione e una eventuale attivazione immunitaria indesiderata.

Devono essere descritti i metodi da usare per i controlli e le misure da prendere in seguito ai risultati. I metodi dovrebbero essere convalidati, almeno quelli per il saggio dei virus competenti per la replicazione.

VALUTAZIONE DI QUALITÀ DEI PRODOTTI PER TERAPIA CELLULARE

Giovanni Migliaccio

Laboratorio di Biologia Cellulare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

L'uso empirico di sostanze od organismi viventi come agenti terapeutici risale alla notte dei tempi. Negli ultimi due secoli, con l'avvento della chimica, come scienza, si è assistito ad una esplosione delle composti chimicamente definiti utilizzati nella terapia o nella diagnostica. Il puro numero dei composti chimici utilizzati ha offuscato l'uso di organismi viventi nella pratica clinica, al punto che "medicinale" è divenuto un sinonimo di sostanza chimica. Tuttavia procedure che usano cellule per ottenere un effetto terapeutico, come la trasfusione di sangue e i trapianti d'organo o di tessuti, sono parte della pratica clinica consolidata.

Negli ultimi dieci anni, grazie all'identificazione e alla produzione come proteine ricombinanti di un numero crescente di fattori di crescita, è avvenuta una crescita esponenziale dei tessuti primari che si possono coltivare ed espandere *in vitro* (1-5).

Il processo di trasferimento di queste tecnologie dalla ricerca alla clinica è in corso, ed ormai esiste un gruppo crescente di procedure sperimentali che richiedono una "manipolazione estensiva" di cellule, siano esse autologhe o eterologhe, prima di un uso terapeutico o diagnostico.

Definizione di prodotto per terapia cellulare

Queste terapie innovative, in cui il principio attivo è costituito da cellule manipolate in laboratorio allo scopo di ottenere una specifica attività biologica, sono conosciute come ingegneria tissutale o terapia cellulare. In questa sede ed in generale nei loro aspetti regolamentativi sono state raggruppate sotto la denominazione "terapie cellulari".

Come Prodotti per Terapia Cellulare (PTC) si intendono cellule, autologhe, eterologhe o xenologhe che siano state "manipolate estensivamente" *in vitro*, per essere utilizzate a scopo preventivo, terapeutico o diagnostico, nella clinica.

A sua volta, per "manipolazione estensiva" si intende una procedura intesa a modificare volontariamente le caratteristiche fisiologiche o genetiche di cellule. Mentre la modificazione del genoma effettuata durante le terapie geniche, sia pure temporanea, rappresenta una ovvia "manipolazione estensiva", la definizione di una modificazione dello stato fisiologico è più difficile. Come esempi, si possono prendere l'induzione di proliferazione cellulare, la trasfezione con proteine purificate allo scopo di indurre l'espressione di complessi immunogeni, l'attivazione della capacità citotossica di cellule linfocitarie mediante fattori di crescita.

Popolazioni cellulari ottenute mediante separazione fisica, basata sull'uso di gradienti di densità o di anticorpi contro specifici antigeni, secondo questa definizione vengono escluse dal novero dei PTC, in quanto la procedura utilizzata non intende indurre una modificazione dello stato fisiologico.

Ad esempio, la preparazione di sospensioni monocellulari per trapianto, sia da sangue periferico (afèresi) o da midollo osseo, non rientra nel novero delle terapie cellulari.

Regolamentazione dell'uso clinico dei PTC

Le procedure di coltura cellulare non sono prive di rischi, siano essi legati alla presenza di agenti infettivi (6) o alla induzione di una risposta biologica non desiderata (7). L'uso nella terapia genica di vettori retrovirali per inserire sequenze geniche nel genoma o per effettuare una vaccinazione e/o terapia antivirale ha aperto la strada a possibili effetti indesiderati con la possibilità di riarrangiamenti dei geni inseriti con sequenze sconosciute presenti nel genoma (8, 9).

Il trasferimento di agenti infettivi da una popolazione animale all'uomo è già avvenuto più volte nel corso di secoli, con risultati a volte catastrofici. La possibilità di provocare in laboratorio l'insorgere di nuove patologie infettive esponendo cellule umane ad agenti biologici artificiali o xenobiotici in condizioni permissive all'infezione è stata sollevata più volte (6). Si comprende quindi la riluttanza delle autorità preposte alla sicurezza sanitaria ad autorizzare, per un uso clinico, l'esposizione di cellule umane a materiali xenobiotici in condizioni di cui è estremamente difficile valutare il rischio sanitario.

Per garantire la sicurezza, sia dei pazienti che della popolazione in generale, l'attuale orientamento delle organizzazioni preposte alla autorizzazione di nuovi prodotti con finalità terapeutiche o diagnostiche è di considerare i PTC alla stregua di classici "prodotti farmaceutici". Questo richiede che la preparazione del prodotto sia effettuata seguendo le regole delle Buone Pratiche di Manifattura (GMP) e delle Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) preparate ed aggiornate dall'OCSE (Organizzazione per la cooperazione e lo sviluppo economico). Si richiede inoltre che l'efficacia e la sicurezza di questi prodotti sia comprovata da dati di laboratorio, da sperimentazioni in modelli animali ove possibili, da studi di tossicità e da protocolli clinici sperimentali su volontari umani. Questi ultimi studi devono essere eseguiti seguendo le norme di Buona Pratica Clinica e nel rispetto dei diritti del paziente come definito dalla Conferenza di Helsinki.

L'Istituto Superiore di Sanità ha preparato due successive linee guida sulla terapia cellulare, entrambe pubblicate nel *Notiziario* dell'ISS (10, 11), il cui testo può essere ottenuto dal sito Internet dell'Istituto Superiore di Sanità (www.iss.it). Una ulteriore documentazione che verte sulle cautele e precauzioni necessarie sia durante la manipolazione che l'uso di prodotti per terapie cellulari è ottenibile dal sito Internet del Center for Biologics Evaluation and Research della Food and Drug Administration (www.fda.gov/cber) mentre sul sito Internet dell'EMA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) (www.emea.eu.int) si può trovare dal dicembre 1999 il documento *Point to consider on human somatic cell therapy* che presenta la posizione dell'agenzia europea sull'argomento. Infine la US Pharmacopeia (www.usp.org) ha recentemente pubblicato una analisi in dettaglio dei Prodotti per Terapia Genica e Cellulare (USP Family - Progress Report n. 1046 Cell and Gene Therapy, 2000), che elenca le caratteristiche richieste per la loro autorizzazione.

In Italia una Circolare del Ministero della Sanità (12) elenca i prodotti per le Terapie Cellulari fra i medicinali innovativi per la cui sperimentazione è richiesto un parere dall'Istituto Superiore di Sanità.

Analisi del processo di produzione o del PTC

La documentazione da presentare all'Istituto Superiore di Sanità deve contenere tutte le informazioni necessarie per poter effettuare una valutazione dei rischi per il paziente e la popolazione che la procedura comporta. A differenza dei prodotti farmaceutici tradizionali, una delle caratteristiche atipiche dei PTC è la labilità del principio attivo (le cellule). Quindi la prima decisione riguarda la necessità di analizzare il prodotto finale o il processo di produzione.

È frequente che il PTC sia caratterizzato da una scarsa abbondanza, da non essere rimpiazzabile e dalla necessità di essere utilizzato entro un lasso di tempo che varia da ore ad alcuni giorni dalla preparazione. Ad esempio, l'uso di cellule autologhe da soggetti con malattie aggressive impone dei limiti temporali ben definiti, il cui prolungamento comporta un aumento dei rischi per il paziente. L'uso di preparati cellulari per singoli pazienti e quindi di lotti di produzione ristretti ad una unità, e i brevi tempi d'uso limitano il numero di test di sicurezza che si possono ragionevolmente effettuare. Ad esempio, il test ufficiale di sterilità della Farmacopea europea ed italiana richiede 14 giorni per la sua esecuzione. La bassa emivita del prodotto finale può impedire che i risultati del test di sterilità relativo siano disponibili prima del suo uso.

Se questa è la situazione del PTC oggetto della domanda di autorizzazione è necessario che il relativo processo di produzione sia analizzato e validato in dettaglio e che tutte le misure necessarie per garantirne la sicurezza ed affidabilità siano messe in atto. Una possibile articolazione della documentazione è presentata in Tabella 1.

Tabella 1. Sommario delle informazioni richieste per l'analisi della qualità nei PTC

-
- 1) **PROCESSO DI PRODUZIONE**
Descrizione del processo e delle "manipolazioni estensive" che si intendono effettuare
 - 2) **TEMPI DI ESECUZIONE**
Diagramma di flusso con i tempi di esecuzione delle singole operazioni e le indicazioni dei tempi e degli stadi che vengono sottoposti ai controlli di qualità e di sicurezza. (Vedi punto 6)
 - 3) **FASI DEL PROCESSO DI PRODUZIONE**
 - a. **Materiale di partenza.**
Raccolta e valutazione.
Indicare:
 - i. Selezione dei Donatori;
 - ii. Metodiche di Prelievo;
 - iii. Metodiche di trasporto al sito delle manipolazioni estensive;
 - iv. Criteri di ricevimento ed accettazione del materiale prelevato
 - b. **Luogo di produzione.**
Sistema di controllo della qualità (QAU) Cartografia dei locali (facoltativa), misure di sicurezza e quant'altro predisposto per rispettare gli standard di qualità proposti.
 - c. **Manipolazioni.**
Introduzione con la descrizione degli stadi del processo e delle singole manipolazioni:
 - i. Descrizione di eventuali prodotti intermedi
 - ii. Banche di tessuti e cellule. Descrizione (se presenti)
 - iii. Prodotto finale. Stabilità nel tempo e condizioni di conservazione. Criteri di rilascio del prodotto finito.
 - d. **Modalità d'uso del prodotto.**
Indicare:
 - i. Modalità di ricevimento e criteri di accettazione del prodotto finale;
 - ii. Procedure di utilizzazione e loro validazione.
-

segue

4) **MATERIALI AUSILIARI O ADDITIVI**

(Sono quei materiali utilizzati durante il processo di produzione ma non presenti nel prodotto finale in concentrazioni biologicamente attive).

a. **Tessuti e cellule.**

Indicare: a) Origine, fornitore, caratteristiche, b) Giustificazione per l'uso; c) Identificazione, criteri e metodi.

b. **Sostanze di origine animale o vegetale.**

Indicare: a) Origine, fornitore, caratteristiche, b) Giustificazione per l'uso; c) Identificazione, criteri e metodi.

c. **Composti chimici.**

Indicare: a) Origine, fornitore, caratteristiche, b) Giustificazione per l'uso; c) Identificazione, criteri e metodi.

d. **Eventuali materiali di supporto** contenuti nel prodotto finale.

Indicare: a) Fornitore, caratteristiche; b) Validazione del funzionamento; c) Tossicità dei componenti *in vivo*.

5) **APPARATI**

a. **Apparati rilevanti** per la produzione e/o la conservazione del prodotto.

Indicare: a) Fornitore, caratteristiche; b) Validazione del funzionamento

6) **VALIDAZIONE DEL PROCESSO DI PRODUZIONE**

Sono richiesti i risultati grezzi per almeno tre preparazioni (cinque se con tre preparazioni si registra una dispersione dei dati), utilizzando differenti donatori e stock di materiali.

Includere i dati di sicurezza e qualità per tutti i punti di analisi indicati nel diagramma di flusso sotto forma di valori singoli e media con deviazione standard. In particolare sono richiesti:

- a. Risultati dei test sui tessuti primari e sui donatori,
- b. Risultati dei test dei materiali ausiliari utilizzati
- c. Risultati dei test sulle banche cellulari o di tessuti, se presenti
- d. Risultati dei test eseguiti durante la preparazione del prodotto finale e degli intermedi
- e. Risultati dei test effettuati per il rilascio del prodotto finale

7) **CONTROLLI DI QUALITÀ E DI SICUREZZA**

Allegare le SOP rilevanti che includano:

- a. Criteri e limiti per **sterilità, identità, purezza, quantità ed attività biologica**
 - b. Protocolli dei Controlli di Qualità da effettuare durante la produzione
 - c. Protocolli dei test di Sicurezza (infettiva e/o tossicologica)
 - d. Descrizione dei limiti dei test effettuati e della loro validazione.
-

Informazioni necessarie alla valutazione della qualità e dei rischi per un PTC

Descrizione del PTC

La descrizione dell'obiettivo terapeutico che si intende raggiungere mediante la manipolazione estensiva proposta deve essere presente con una descrizione concisa ma esauriente del rationale scientifico del protocollo clinico presentato.

Componenti del prodotto finale e materiali ausiliari

Il primo punto della documentazione riguarda l'identificazione del PTC nella sua composizione finale in quanto complesso di elementi cellulari, materiali con funzione di sostegno o di mantenimento della una struttura tridimensionale, contenitori e terreni di coltura con funzioni di mantenere la vitalità cellulare e la funzionalità del prodotto stesso. Ogni singolo componente facente parte del prodotto finale deve essere chiaramente identificato come tale.

La definizione del prodotto finale deve essere accurata e distinguere fra i componenti che saranno somministrati al paziente e quelli con funzione di contenitore o di mantenimento dell'attività biologica del prodotto stesso. Da questa divisione dipende l'estensione dei test di sicurezza che devono essere presentati per i singoli componenti.

Per i materiali che sono stati utilizzati durante il processo di produzione ma che vengono rimossi o consumati prima della formulazione finale viene adottata la terminologia di "materiali ausiliari". Per questo particolare gruppo di materiali si richiedono le prove di sterilità, di non tumorigenicità (sul campione cellulare trattato) ma non quelle di innocuità *in vivo* in quanto il processo di produzione provvede ad eliminarli dal prodotto finale. Questo punto in particolare deve essere validato da prove sperimentali che includano la misurazione dei residui nel prodotto finale e i risultati di esperimenti in cui l'aggiunta volontaria di quantità note in eccesso nel processo di produzione permette di misurarne la capacità di rimozione.

Fattori rilevanti per l'analisi della qualità e del rischio in PTC

I fattori che vengono presi in considerazione per valutare sicurezza e qualità di un PTC rimangono, come per i prodotti farmaceutici in generale: *identità, attività biologica, purezza e quantità*. Una particolare menzione, per questi particolari prodotti, deve essere effettuata per la *sterilità* e la *non tumorigenicità* del prodotto finale.

Analisi dell'identità

L'analisi dell'identità in questo tipo di prodotti è differente da quella chimica dei classici prodotti farmaceutici. Oltre alla identificazione del principio attivo, inteso come attività biologica, si richiede l'identificazione delle cellule che, a causa della specificità antigenica di ogni singolo individuo, può includere l'identificazione del singolo donatore e/o paziente a cui il PTC è destinato. Per questo motivo la qualificazione dell'elemento cellulare costituente il principio attivo dovrebbe essere effettuata sia a livello fenotipico (antigeni di superficie, proteine citoplasmatiche, attività enzimatiche, ecc., che genotipico per l'identificazione individuale (analisi di polimorfismi o degli antigeni HLA). In alternativa ad una identificazione individuale a livello genomico, può essere utilizzato un sistema di marcatura del campione cellulare o di delimitazione temporale / fisica durante il processo di lavorazione tali da garantire l'impossibilità di mescolare PTC destinati ad individui diversi.

Attività biologica

In analogia con i prodotti farmaceutici classici, è necessario quantificare la dose che viene somministrata. Nel caso dei PTC, in funzione della azione terapeutica, diagnostica o preventiva

che si intende ottenere con la manipolazione estensiva proposta, è necessario definire un metodo di valutazione della attività biologica terapeutica del prodotto finale. Il metodo deve essere quantitativo e validabile anche se si tratta di preparazioni e lotti per un singolo individuo. L'uso di indicatori secondari della funzione desiderata, come ad esempio il numero totale di cellule somministrato o la quantificazione di popolazioni cellulari mediante antigeni di superficie, può essere accettabile se viene dimostrato, e validato, che il fenotipo cellulare indicato corrisponde alla azione biologica desiderata.

Il mantenimento di caratteristiche secondarie (come capacità proliferativa, attecchimento, capacità di migrare negli organi bersaglio, emivita, ecc.) possono far parte dei requisiti necessari al mantenimento dell'attività biologica desiderata. In ogni caso alterazioni funzionali, non richieste per l'attività terapeutica perseguita dalla manipolazione estensiva, non devono essere tali da danneggiare o mettere a rischio inutilmente la salute del paziente o della popolazione.

Il razionale scientifico seguito nella scelta degli indicatori dell'attività biologica, unitamente ai valori limite accettabili, deve essere presentato e discusso.

Analisi della purezza e quantità

La purezza di una popolazione cellulare, viene definita non solo in base alla attività biologica finale desiderata ma anche come modificazione della popolazione di partenza. L'assenza o la presenza di popolazioni cellulari non direttamente coinvolte nell'attività biologica richiesta non può essere trascurata in rapporto alla qualità e alla sicurezza del prodotto stesso. Quindi, come contaminanti nel caso dei PTC non si intende solo i residui dei materiali di coltura utilizzati per la manipolazione /preparazione del prodotto, ma anche le popolazioni cellulari non coinvolte direttamente nell'attività biologica del prodotto stesso.

Il tipo di cellule presenti, il loro stato fisiologico, la possibile attività biologica *in vivo* ed *in vitro* durante la preparazione e l'uso del prodotto devono essere esaminati, e le possibili complicazioni prese in esame e discusse.

Il prodotto finale deve essere identificato in termini quantitativi tali da permettere il dosaggio del PTC da parte del medico curante a seconda del protocollo presentato. Come per i prodotti farmaceutici in generale, dopo l'identificazione dei componenti del prodotto finale, bisogna chiaramente indicare i componenti che rappresentano il principio attivo, e qual è l'attività biologica del prodotto finale. La definizione di una popolazione cellulare come contaminante o come parte attiva del prodotto finale deve essere giustificata. La descrizione dei parametri scelti con l'identificazione di valori minimi/massimi accettabili e i metodi di misura relativi fanno parte integrante del processo di identificazione del prodotto finale e quindi dei test di sicurezza necessari.

A seconda dei casi può trattarsi sia di una frazione cellulare identificata da uno specifico fenotipo che della popolazione complessiva.

Nel caso non sia possibile identificare e/o quantificare la presenza del principio attivo (ad esempio nel caso di vaccinazione genica o di selezione di cloni linfocitari antitumorali), è necessario ricorrere a parametri alternativi che permettano la valutazione dei risultati del processo di produzione.

Uno dei principi fondamentali della valutazione della documentazione è che le condizioni del prodotto finale, al momento dell'uso, siano tali che la desiderata attività biologica sia possibile. In tal senso, mentre la valutazione dell'attività biologica, purezza e quantità del PTC vengono effettuati sul luogo di preparazione, i contenitori, le condizioni di trasporto del prodotto, le procedure di ricevimento / accettazione da parte dell'utilizzatore devono essere tali da garantirne il mantenimento inalterato fino al momento dell'uso e adeguatamente validate. Queste precauzioni, pur essendo comuni a tutti i prodotti farmaceutici sono particolarmente

importanti per i PTC contenenti tessuti viventi o frazioni cellulari, e quindi soggetti a rapido decadimento in assenza di condizioni di mantenimento adeguate.

Valutazione della sterilità

Il concetto di sterilità in un campione contenente cellule viventi viene inteso come assenza di organismi contaminanti (la cui presenza non sia intenzionale) siano essi patogeni o meno. La presenza di organismi (cellule, micoplasmi, batteri e virus) in concentrazioni tali da mettere a rischio la salute del paziente o il successo della terapia proposta non è accettabile. È quindi vitale che il processo di produzione sia stato validato e sia in grado di garantire l'assenza di organismi contaminanti. La presenza di agenti patogeni (ad esempio il citomegalovirus ma anche cellule tumorali) non è obbligatoriamente una causa di esclusione. Il rilascio di campioni contaminati da agenti patogeni noti deve essere giustificato (ad esempio l'uso autologo di cellule contenenti l'agente patogeno all'origine) ed adeguatamente segnalato sul prodotto finale stesso. La riservatezza dei dati personali deve essere rispettata (13) ma non deve mettere a rischio l'efficacia della cura e la salute del paziente.

Valutazione della non tumorigenicità

Nei prodotti farmaceutici di tipo tradizionale, l'assenza di tumorigenicità viene comprovata mediante l'esposizione *in vivo* a concentrazioni del composto terapeutico spesso molto alte rispetto a quelle d'uso. Questo tipo di analisi è praticamente impossibile nei prodotti per terapia cellulare ed erranea dal punto di vista teorico.

Nei casi in cui il prodotto finale è costituito da cellule, la valutazione della tumorigenicità diviene la valutazione della possibile trasformazione tumorale durante o dopo la manipolazione. Una analisi dei rischi connessi alla terapia proposta è necessaria, specie nel caso che oltre ad una manipolazione cellulare ci si trovi di fronte ad una terapia genica. Il possibile effetto tumorale delle sostanze impiegate durante il processo di produzione deve essere analizzato e testato. La scelta dei test deve essere giustificata e validata. In alcuni casi sarà impossibile effettuare una sperimentazione *in vivo*, in modelli animali, del PTC ma l'analisi dei prodotti utilizzati durante le manipolazioni dovrebbe essere presente o come dati sperimentali o come sommario delle informazioni pertinenti nella letteratura scientifica o nella farmacopea.

Fasi del processo di produzione

La documentazione riguardante il processo di produzione deve essere tale da permettere di ricostruirne dal testo presentato tutti gli aspetti, dalla raccolta del campione cellulare alla sua somministrazione. Le fasi che costituiscono il processo di produzione possono essere riassunte nell'ordine come: 1) prelievo; 2) accettazione; 3) conservazione; 4) manipolazione; 5) conservazione; 6) rilascio per l'uso.

Prelievo

La fase di prelievo richiede l'identificazione del materiale cellulare raccolto, dell'individuo donatore e delle informazioni rilevanti per l'uso che se ne intende fare. L'identificazione dei

luoghi di raccolta, dei criteri di accettazione dei singoli donatori, il metodo e il personale autorizzato ad effettuare la raccolta sono esempi delle possibili informazioni rilevanti.

Considerata l'unicità del prodotto in termini di antigeni di istocompatibilità o di reazioni immunitarie, la riservatezza dei dati personali raccolti deve essere bilanciata contro la necessità di ridurre il rischio di una errata identificazione della coppia prodotto/paziente al momento dell'uso.

Accettazione

Dopo il prelievo, il campione cellulare viene trasportato nel sito che effettuerà la manipolazione e la produzione del prodotto. I criteri che vengono utilizzati per accettare o rifiutare per la manipolazione un determinato campione devono essere chiaramente identificati insieme alla persona responsabile per la loro applicazione.

Conservazione

Nel caso il campione venga conservato a lungo prima di essere sottoposto alla manipolazione, le condizioni ed il luogo di conservazione (banche cellulari) devono essere identificate e validate. Inoltre la probabile presenza di più campioni contemporaneamente richiede che i metodi di identificazione dei campioni e le precauzioni prese, per evitare contaminazioni crociate, siano chiaramente descritti.

Manipolazione

Lo scopo e le fasi della manipolazione estensiva sono l'informazione principale che deve essere fornita. Schemi sinottici con base temporale sono fortemente suggeriti allo scopo di permettere una rapida valutazione dei tempi necessari e della copertura offerta dai test di sicurezza effettuati.

In caso vi siano prodotti intermedi che possono essere validati, dal punto di vista della sicurezza e della qualità, indipendentemente dal prodotto finale si suggerisce la presentazione di una documentazione separata allo scopo di semplificare l'analisi di quelle parti la cui valutazione non possa essere completa sia per motivi strutturali (assenza di modelli sperimentali adeguati) che per limiti temporali.

I test di sicurezza e qualità effettuati vanno elencati a parte, con l'indicazione della metodologia e dei limiti di accettabilità scelti.

Conservazione del PTC

Il tempo limite per l'uso del PTC deve essere chiaramente indicato, includendo il tempo necessario per il trasporto. Le condizioni di conservazione devono essere tali da garantirne l'efficacia al momento dell'uso clinico, senza che vi sia la possibilità di una alterazione rispetto al prodotto finale come definito ai fini della qualità e della sicurezza nella documentazione presentata per l'autorizzazione.

Ad esempio se le analisi di sterilità vengono effettuate alla fine delle manipolazioni, non sono accettabili modifiche o aggiunte prima dell'uso che non siano espressamente indicate nel protocollo presentato, in quanto la presenza di contaminanti o additivi non giustificabili nei

materiali usati passerebbe inosservata. Si raccomanda quindi una scelta attenta della definizione di “prodotto finale”.

Rilascio per l'uso

I criteri per il rilascio del prodotto finale sia esso per un singolo individuo che per più individui devono essere indicati. La persona responsabile per il rilascio del prodotto finale per l'uso clinico deve essere indicata. Le condizioni di trasporto e le indicazioni per le procedure da seguire all'arrivo del prodotto sul luogo d'uso devono essere allegate al prodotto. L'utente deve essere in grado di stabilire se le condizioni di trasporto sono state soddisfacenti o meno. Indicatori di temperatura, indicatori di pH nei terreni di trasporto, contenitori che permettano l'ispezione visuale del prodotto finito sono utilizzabili per aumentare la sicurezza del PTC.

Dati bruti

Allo scopo di poter valutare la consistenza del processo di produzione e la adeguatezza degli standard e test utilizzati, è necessario che tutti i risultati dei test effettuati vengano presentati per un numero adeguato (non meno di tre) di processi di produzione per campioni cellulari di origine diversa.

La consistenza del processo di produzione permette di valutare se i test scelti per la sicurezza e per il controllo di qualità sono adeguati o insufficienti. L'uso di tabelle e di diagrammi di flusso indicanti i risultati dei singoli test e del momento in cui sono stati effettuati durante il processo aiuta l'analisi e abbrevia i tempi richiesti per la valutazione.

Una lista dei test, con i relativi protocolli se non appartenenti alla Farmacopea Italiana o Europea, i limiti di sensibilità e la loro validazione, deve essere presentata insieme con i dati bruti.

Aspetti logistici

La decisione se esistano o meno le condizioni fisiche (apparecchiature, locali, ecc.) per effettuare il processo di produzione e l'uso clinico è di pertinenza del Comitato Etico locale. Tuttavia, una descrizione dei locali adibiti alle varie fasi e delle apparecchiature disponibili permette di valutare i rischi connessi alle procedure e suggerire eventuali modifiche o correzioni. L'assenza di tali dati si riflette sulla necessità di valutare un numero di processi di produzione maggiore e comunque tale da garantire che le condizioni di produzione non siano soggette ad effetti temporali come la presenza casuale di individui più o meno esperti o sbalzi di temperatura stagionali.

Analisi del rischio

Una analisi dei rischi connessi all'uso del PTC nel protocollo clinico è fortemente suggerita. I possibili rischi per il paziente, come per il personale e la popolazione in generale devono essere presi in considerazione e valutati contro il possibile beneficio.

Questa operazione permette di identificare quali sono i fattori di rischio e quindi di porvi rimedio nella fase di progettazione del processo di produzione. La presenza di organismi viventi possibilmente infettivi che vengono esposti a condizioni non usuali deve essere analizzata ed i possibili rischi valutati in qualche modello sperimentale o facendo riferimento a dati della letteratura scientifica accettata.

Aspetti come il rischio di infezioni retrovirali da parte di virus animali presenti nei terreni di coltura o come possibili rischi carcinogenici per il prodotto coltivato *in vitro* devono essere analizzati. È chiaro che il rapporto rischio beneficio deve essere valutato, con rischi maggiori accettabili in presenza di malattie terminali o a rapida evoluzione. Tuttavia, recenti ipotesi sulla diffusione di nuovi agenti patogeni, sollecitano ad una particolare attenzione ai rischi per la popolazione e non solo per il paziente.⁽⁶⁾

Conclusioni

Nei protocolli clinici che richiedono l'uso di PTC pervenuti fino ad oggi le carenze più comunemente riscontrate sono state: scarsità o assenza di modelli sperimentali pre-clinici *in vitro* o *in vivo*, mancanza di comprensione dei principi ispiratori delle buone pratiche sia di produzione (GMP) che di analisi (GLP), assenza di personale addestrato per il Controllo di Qualità, assenza di materiali approvati per uso farmaceutico, assenza di dati bruti per un numero sufficiente di prove.

La presenza di personale con esperienza di Controllo di Qualità è fortemente suggerita, in particolare sia nella fase di gestione del processo di produzione che nella fase di progettazione del protocollo di manipolazione estensiva delle cellule.

La preparazione della documentazione da presentare per l'autorizzazione richiede una particolare attenzione in quanto l'Istituto Superiore di Sanità non effettua ispezioni ma rilascia il parere richiesto sulla sola base della documentazione presentata. L'assenza di informazioni pertinenti sospende il processo di autorizzazione rallentando il rilascio del parere finale.

La presenza di vari esperti dell'Istituto Superiore di Sanità nella commissione incaricata di vagliare le documentazioni presentate, suggerisce la presentazione separata in fascicoli per quanto riguarda la sicurezza infettiva, il protocollo clinico e gli aspetti di controllo di qualità del processo di produzione (vedi Appendice).

Bibliografia

1. Atala A. Engineering tissues and organs. *Current Opinion in Urology* 1999;9:517-26.
2. Bordignon C, Carlo-Stella C, Colombo MP, De Vincentiis A, Lanata L, Lemoli RM, Locatelli F, Olivieri A, Rondelli D, Zanon P, Tura S. Cell therapy: achievements and perspectives. *Haematologica* 1999;84:1110-49.
3. Edge AS, Gosse ME, Dinsmore J. Xenogeneic cell therapy: current progress and future developments in porcine cell transplantation. *Cell Transplantation* 1998;7:525-39.
4. Humes HD. Application of gene and cell therapies in the tissue engineering of a bioartificial kidney *International Journal of Artificial Organs* 1996;19:215-7.
5. Shihabuddin LS, Palmer TD, Gage FH. The search for neural progenitor cells: prospects for the therapy of neurodegenerative disease. *Molecular Medicine Today* 1999;5:474-80.
6. van Der Laan LJ, *et al.* Infection by porcine retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice. *Nature* 2000;407:90-4.

7. Selvaggi TA, Walker RE, Fleisher TA. Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in Human Immunodeficiency Virus-infected patients given syngeneic lymphocyte infusions. *Blood* 1997;89:776-9.
8. Romano G, Michell P, Pacilio C, Giordano A. Latest developments in gene transfer technology: achievements, perspectives, and controversies over therapeutic applications. *Stem Cells* 2000;18:19-39.
9. Barbour V. The balance of risk and benefit in gene-therapy trials *Lancet* 2000;355:384, 2000.
10. Massotti M. Linea guida per l'avvio di studi clinici di fase I/II con cellule umane viventi per la terapia cellulare somatica. *Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità* 1997;10:1-8.
11. Cancedda R, Chistolini P, Cossu G, De Luca M, Marazzi M, Mavilio F, Migliaccio G, Pini C, Sargentini A. Linee guida per l'ingegneria dei tessuti e la terapia cellulare. *Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità* 1999;12:1-8.
12. Circolare sulla Sperimentazione Clinica dei Medicinali. *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana*. Vol. 168, 16-33, 1997.
13. Provvedimento. Autorizzazione al trattamento dei dati idonei a rivelare lo stato di salute e la vita sessuale. *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana* n. 2, vol. 229, 16-20, 1998.

ANALISI DELLA DOCUMENTAZIONE SULLA VALIDAZIONE VIRALE

Maria Rapicetta

Laboratorio di Virologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Lo sviluppo dei metodi di produzione e dei protocolli di validazione virale ai fini della sicurezza dei prodotti biologici per uso umano è relativamente recente. La correlazione tra l'evenienza di infezioni virali e la somministrazione di alcuni prodotti ed in particolare di vaccini preparati a partire da culture di cellule primarie è stata per la prima volta dimostrata negli anni '40. Le problematiche relative all'identificazione di metodi specifici per l'inattivazione e la rimozione virale e per la valutazione della loro efficienza, sono state più estesamente affrontate, a partire dalla fine degli anni '80, a seguito della dimostrazione della trasmissione di virus HIV e di virus dell'epatite di tipo A (HAV), B (HBV) e C (HCV) dopo somministrazione di prodotti derivati dal sangue. Per questi virus ed anche per altri virus quali: Citomegalovirus, Virus di Epstein Barr e Parvovirus umano B19, il rischio di infezione post-trasfusionale è stato chiaramente definito. Inoltre rischio potenziale sussiste per tutti quei virus che presentino fasi di viremia durante il loro ciclo patogenetico.

Tale rischio, per i virus HIV, HBV ed HCV, è legato al mancato rilevamento diagnostico nella fase dello screening delle donazioni di sangue. Ciò può verificarsi per la non corretta applicazione dei saggi di rilevamento o per la diminuita sensibilità dei saggi stessi nel caso di infezioni derivate da varianti virali. Con l'utilizzazione degli attuali metodi, è comunque presente una fase di "finestra diagnostica" durante il ciclo naturale di queste infezioni. L'intervallo è particolarmente ampio nel caso dell'infezione da HCV (56-189 giorni) (1-6).

Da studi effettuati negli USA nel 1996 il rischio residuo di infezione a seguito di somministrazione di sangue è stato calcolato di 1:493:000 donazioni per l'HIV, 1:103.000 per l'HCV e di 1:63.000 per l'HBV (7). Dagli studi effettuati in Europa il rischio residuo è risultato, per quello che riguarda l'infezione da HCV, di circa 1:50.000.

Gli approcci principalmente seguiti al fine di garantire la sicurezza da contaminazione virale dei prodotti biologici sono principalmente basati sulla selezione del materiale di partenza e sul controllo del prodotto nelle varie fasi del ciclo produttivo. Quest'ultimo aspetto viene affrontato attraverso la valutazione dell'efficienza dei metodi utilizzati, durante il processo di produzione, per la rimozione/inattivazione di virus potenzialmente contaminanti.

Le metodologie standardizzate per tali valutazioni sono contenute nelle linee guida del CPMP (8115/89 aggiornate nel 1996) che rappresentano lo strumento attualmente disponibile, sia per la valutazione tecnica dei protocolli sperimentali riportati nella documentazione allegata alla domanda di registrazione dei prodotti biologici per uso umano, sia per la valutazione dei prodotti farmacologici da sottoporre a sperimentazione clinica.

Le varie linee guida sui metodi di inattivazione e rimozione virale sono riferite ai prodotti derivati dal sangue, ai prodotti derivati da culture di cellule di origine umana o animale ed ai prodotti derivati da organi o da fluidi biologici. Particolarmente dettagliate sono le linee guida per i derivati del sangue prodotti in scala industriale quali: l'albumina, le immunoglobuline ed i fattori plasmatici della coagulazione.

Il controllo dei metodi di validazione e dei metodi utilizzati nei processi di produzione per la inattivazione/rimozione virale deve tener conto delle possibili sorgenti di contaminazione

proprie di ciascun prodotto. I possibili virus contaminanti sono quelli in grado di causare infezione o infezione persistente nella specie animale da cui è originata la materia di partenza.

I principali virus contaminanti per i prodotti del sangue sono i virus HBV, HCV, HIV e Parvovirus B19; per i prodotti derivati da ibridomi quelli derivati dalle linee cellulari di partenza (virus murini) per i prodotti derivati da linee cellulari i virus avventizi delle singole linee cellulari. Devono inoltre essere tenute in considerazione le altre possibili fonti di contaminazione derivate dall'ambiente.

Prendendo a modello i prodotti derivati dal sangue possono essere distinte le seguenti le fasi di controllo: 1) controllo del plasma di partenza; 2) controllo del processo di produzione; 3) controllo del prodotto finale. Il controllo del plasma di partenza si basa sulla selezione dei donatori di sangue e delle singole donazioni. In quest'ultimo ambito ha particolare rilevanza il tipo di marcatori diagnostici valutati ed il controllo dell'efficienza degli specifici metodi utilizzati per lo screening.

Le principali regolamentazioni in materia sono: le direttive CEE, recepite in Italia dell'89 e del '91 (89/381, 91/507, 75/319); le linee guida del CPMP (8115/89) aggiornate nel '96, e la direttiva Europea sui diagnostici *in vitro* di prossimo recepimento in Italia (98/79/CE). Tali direttive rispecchiano l'attuale regolamentazione nazionale sui diagnostici utilizzati per il rilevamento di infezione da HIV, HBV ed HCV (anti-HIV, 3 marzo 1987; HBsAg ed anti-HCV, 12 dicembre 1991). Tutti i kit diagnostici relativi devono essere stati sottoposti a procedure autorizzative e/o di validazione.

La valutazione dei metodi di inattivazione/rimozione deve essere effettuata con prove allestite *ad hoc*. I contenuti delle linee guida che si riferiscono alla validazione virale dei processi di produzione di emoderivati sono basati sulla valutazione delle metodologie utilizzate per l'inattivazione/rimozione sia dei virus noti come possibili contaminanti del prodotto sia di virus non noti. Pertanto tali metodologie devono essere calibrate per un ampio range di virus con differenti caratteristiche chimico-fisiche. Due o più stadi di inattivazione/rimozione devono essere inclusi nel processo di produzione ed i metodi utilizzati devono essere aggiornati in corrispondenza dei progressi in campo tecnico/scientifico.

Le principali procedure applicate per l'inattivazione virale sono basate su metodi fisici quali il calore e l'irraggiamento, o su metodi chimici quali il trattamento con detergenti, con solventi, con betapropiolattone.

Le principali procedure applicate per la rimozione virale sono basate su metodi di frazionamento attraverso precipitazione e/o su metodi di filtrazione.

Le prove *ad hoc* di validazione di queste fasi (prove di *spiking*) consistono nell'aggiunta di quantità note di virus modello nelle varie fasi del processo riprodotto in scala e controllato per i principali parametri critici. I virus modello devono essere confrontabili per caratteristiche fisico-chimiche con i virus che potenzialmente contaminano il prodotto. Devono comunque essere presenti virus che coprano l'intero range di tali caratteristiche e per cui siano disponibili saggi di infettività sensibili ed efficienti. Devono essere pertanto inclusi sia virus a RNA che virus a DNA, provvisti e sprovvisti di envelope, un modello per il virus HCV ed un modello per il virus HIV. Nel controllo dei processi di produzione di fattori della coagulazione devono essere inclusi un modello per l'HAV ed un modello per il Parvovirus B19. Per la validazione di un processo devono essere utilizzati almeno quattro modelli virali. Nella Tabella 1 sono riportati alcuni virus modello usualmente utilizzati e per cui sono disponibili saggi standardizzati di relativamente semplice esecuzione.

Il disegno di queste prove sperimentali o di "spiking" deve comprendere la valutazione di tutti gli stadi di inattivazione/rimozione presenti nel processo anche attraverso l'elaborazione di una cinetica di inattivazione e la dimostrazione, nel caso dei metodi di rimozione, della presenza

del virus nel filtro o nel sedimento. I parametri critici relativi a ciascuna fase devono essere noti e caratterizzati.

Tabella 1. Esempi di virus applicati negli studi di validazione virale

Virus	Famiglia	Genere	Ospite naturale	Genoma	I*	Dim.	Forma	Resistenza ad agenti fisico-chimici
Virus della stomatite vescicolare	Rhabdo	Vesiculovirus	Equino, Bovino	RNA	Si	70x175 nm	Proiettile	Bassa
Virus parainfluenzale	Paramyxo	Paramyxovirus	Vari	RNA	Si	100-200 nm	Pleiomorfica-sferica	Bassa
Virus dell'Immuno-deficienza	Retro	Lentivirus	Uomo	RNA	Si	80-100 nm	Sferica	Bassa
Virus della leucemia Murine	Retro	Oncovirus tipo C	Topo	RNA	Si	80-110 nm	Sferica	Bassa
Virus Sindbis	Toga	Alphavirus	Uomo(?)	RNA	Si	60-70 nm	Sferica	Bassa
Virus della diarrea bovina	Toga	Pestivirus	Bovino	RNA	Si	50-70 nm	Pleiomorfica-sferica	Bassa
Virus della Pseudorabbia	Herpes		Suino	DNA	Si	120-200 nm	Sferica	Media
Poliovirus, Sabin tipo1	Picorna	Enterovirus	Uomo	RNA	No	25-30 nm	Icosaedrica	Media
Virus (EMC) dell'Encefalomiocardite	Picorna	Cardiovirus	Topo	RNA	No	25-30 nm	Icosaedrica	Media
Reovirus tipo 3	Reo	Orthoreovirus	Vari	RNA	No	60-80 nm	Sferica	Media
Virus dell'epatite A	Picorna	Hepatovirus	Uomo	RNA	No	25-30 nm	Icosaedrica	Alta
SV40	Papova	Polyomavirus	Scimmia	DNA	No	40-50 nm	Icosaedrica	Alta
Parvovirus (canino, porcino)	Parvo	Parvovirus	Canino, Porcino	DNA	No	18-24 nm	Icosaedrica	Alta

* I: involucro

I requisiti minimi di riduzione del titolo virale per i virus provvisti e sprovvisti di *envelope* sono riportati nella Tabella 2 (8). Per l'ottenimento di significativi valori di riduzione totale è usualmente necessaria la valutazione di più di uno stadio del processo.

Nella valutazione dei protocolli sperimentali riportati nella documentazione per la registrazione dei prodotti vengono presi in considerazione e valutati anche l'appropriatezza e l'efficienza dei saggi utilizzati, la significatività statistica degli esperimenti ed i metodi di calcolo. Viene considerato significativo il valore ottenuto mediante il calcolo del Fattore di Riduzione basato sui controlli del titolo virale effettivamente valutato durante l'esperimento. Tale valore può non essere corrispondente a quello del Fattore di "Clearance" basato sul titolo originario della semenza virale.

Tabella 2. Requisiti minimi richiesti

Fattore di riduzione	Rimozione/inattivazione virale durante i vari stadi del processo di produzione	
	<i>Virus provvisti di envelope</i>	<i>Virus sprovvisti di envelope</i>
individuale (R_i)	Almeno due stadi $R_i > 4 \log_{10}$	Almeno uno stadio $R_i > 4 \log_{10}$
totale (R)	$R_i > 10 \log_{10}$	$R_i > 6 \log_{10}$

Per quello che riguarda l'attuale fase di standardizzazione di questi metodi, alcuni aspetti sono tuttora in valutazione quali, ad esempio, quello della scelta di un modello idoneo per il virus HBV e quello della definizione dei prodotti per cui è necessaria l'utilizzazione aggiuntiva di modelli per l'HAV e per il Parvovirus B19. Per quanto concerne i modelli validi per il virus HCV, il virus BVDV (Bovine Diarrhea Virus) è da considerarsi, per l'identità delle caratteristiche chimico-fisiche, il modello di elezione.

Un altro aspetto che necessita di ulteriore valutazione è quello della scelta dei parametri critici da valutare singolarmente nelle singole fasi per l'effettuazione degli studi di robustezza. Tali parametri sono comunque strettamente legati ai singoli processi e la loro valutazione deve essere effettuata in esperimenti che siano controllati in relazione alla significatività della riduzione in scala del processo. La necessità di rivalutazione dei processi di produzione è principalmente legata a cambiamenti di scala del processo o di parametri significativi o a cambiamenti dei siti di produzione.

Un punto cruciale per la valutazione dei processi di produzione degli emoderivati ai fini della sicurezza virale è inoltre rappresentato dalla valutazione della documentazione relativa al plasma di partenza per quanto concerne l'origine e le successive manipolazioni. Il documento tecnico relativo prende il nome di "Plasma Master File". Alcuni punti fondamentali che devono essere inclusi si riferiscono oltre che alla valutazione dei criteri utilizzati per la selezione del plasma e per l'esclusione dei donatori anche quelli relativi all'efficienza dello screening sierologico, sia per il tipo di marcatori virali valutati che per l'idoneità delle metodologie. Devono essere specificamente valutati i kit diagnostici che sono stati utilizzati e la loro conformità alle specifiche e ai requisiti minimi richiesti dalle vigenti regolamentazioni.

Inoltre, a partire dal luglio del '99 è stata resa obbligatoria l'applicazione di saggi di rilevamento di HCV-RNA con l'utilizzazione di kit diagnostici e metodologie anch'esse da sottoporre a procedimenti autorizzativi e di validazione.

Per quanto concerne i prodotti biologici per uso umano derivati da linee cellulari, la validazione dei metodi di inattivazione e rimozione virale è tuttora oggetto di studio e valutazione. Le metodologie ed i modelli devono comunque essere corrispondenti ai principi enunciati per i prodotti emoderivati. Per quanto riguarda il controllo della materia prima devono essere applicati sistemi basati sull'utilizzazione di Master Cell Banks e Working Cell Banks. Tali sistemi devono essere controllati con metodologie analoghe a quelle applicate per il controllo della produzione di vaccini virali.

Bibliografia

1. Petersen LR, Satten GA, Dodd R, Busch M, Kleinman S, Grindon A, Lenos B. Duration of time from onset of human immunodeficiency virus type 1 infectiousness to development of detectable antibody. The HIV Seroconversion Study Group. *Transfusion* 1994;34(4):283-9.

2. Busch MP, Lee LL, Satten GA, Henrard DR, Farzadegan H, Nelson KE, Read S, Dodd RY, Petersen LR. Time course of detection of viral and serologic markers preceding human immunodeficiency virus type 1 seroconversion: implications for screening of blood and tissue donors. *Transfusion* 1995;35(2):91-7.
3. Lelie PN, Cuypers HT, Reesink HW, van der Poel CL, Winkel I, Bakker E, van Exel-Oehlers PJ, Vallari D, Allain JP, Mimms L. Patterns of serological markers in transfusion-transmitted hepatitis C virus infection using second-generation HCV assays. *J Med Virol* 1992;37(3):203-9.
4. Couroucé AM, Le Marrec N, Girault A, Ducamp S, Simon N. Anti-hepatitis C virus (anti-HCV) seroconversion in patients undergoing hemodialysis: comparison of second- and third-generation anti-HCV assays. *Transfusion* 1994;34(9):790-5.
5. Mimms LT, Mosley JW, Hollinger FB, Aach RD, Stevens CE, Cunningham M, Vallari DV, Barbosa LH, Nemo GJ. Effect of concurrent acute infection with hepatitis C virus on acute hepatitis B virus infection. *BMJ* 1993;307(6913):1095-7.
6. Tabor E, Purcell RH, London WT, Gerety RJ. Use of and interpretation of results using inocula of hepatitis B virus with known infectivity titers. *J Infect Dis* 1983;147(3):531-4.
7. Schreiber GB, Busch MP, Kleinman SH, Korelitz JJ. The risk of transfusion-transmitted viral infections. The Retrovirus Epidemiology Donor Study. *N Engl J Med* 1996;334(26):1685-90.
8. Paul Ehrlich Institute; Banz. Nr. 161, 26 August 1994.

ANALISI DELLA DOCUMENTAZIONE FARMACO-TOSSICOLOGICA PRE-CLINICA NECESSARIA PER L'AVVIO DELLA SPERIMENTAZIONE CLINICA DI FASE I

Annarita Meneguz, Giuseppe Marano, Patrizia Popoli, Marino Massotti
Laboratorio di Farmacologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Lo sviluppo di un nuovo farmaco comprende una serie di studi in successione (pre-clinici, clinici pre-registrazione e post-registrazione) volti a definirne in maniera sempre più accurata il rapporto rischio-beneficio. Per autorizzare l'avvio della sperimentazione clinica è necessario disporre di informazioni sulla tollerabilità del nuovo composto, sufficienti per assicurare, nelle condizioni previste dal protocollo, la sua sicurezza d'uso nei soggetti da arruolare. Le informazioni necessarie per l'avvio degli studi clinici di fase II, III e IV derivano dai risultati degli studi clinici precedenti.

Al contrario, per consentire l'avvio della sperimentazione clinica di fase I, le ipotesi sulla sicurezza d'uso del nuovo farmaco sono formulate attraverso una estrapolazione dai risultati ottenuti in una serie di studi pre-clinici (Tabella 1). Questi ultimi, oltre a consentire una prima stima del profilo di sicurezza del nuovo composto, rendono disponibili informazioni scientifiche utili anche per progettare gli studi clinici successivi. Tali obiettivi sono raggiungibili attraverso: i) l'inquadramento del nuovo composto in una determinata categoria farmacoterapeutica; ii) l'identificazione dei segni di tossicità; e iii) la definizione dell'arco delle dosi tossiche e del loro rapporto con quelle efficaci nei test di farmacodinamica.

Tabella 1. Sommario degli studi pre-clinici necessari per l'avvio della sperimentazione clinica di fase I

STUDI di:	Documentazione da presentare
Qualità	- Processo di produzione - Purezza
Farmacodinamica	- Studi <i>in vitro</i> - Studi <i>in vivo</i> su modelli animali
Sicurezza d'uso	
<i>a. Tossicologia</i>	- Studi dopo somministrazione acuta - Studi dopo somministrazione ripetuta a breve termine - Studi di tossicocinetica - Studi di mutagenesi
<i>b. "Safety" farmacologica</i>	- Studi <i>in vivo</i> su modelli animali
Farmacocinetica	- Studi <i>in vitro</i> su microsomi da epatociti

L'accettabilità dei limiti di sicurezza di un nuovo farmaco per consentire l'avvio della sperimentazione clinica di fase I varia in base alla categoria farmacoterapeutica di appartenenza del prodotto per motivazioni sia scientifiche che etiche. Nella maggior parte dei casi, la potenziale tossicità dei nuovi composti non deve essere superiore a quella degli altri farmaci appartenenti alla medesima categoria. Solamente l'ipotesi di sostanziali vantaggi terapeutici può giustificare la sperimentazione di un nuovo composto con tossicità maggiore. In assenza poi di terapie di riferimento occorre una approfondita valutazione caso per caso.

Nel caso di prodotti da utilizzare in malattie a prognosi grave ed infausta, quali gli antitumorali e gran parte di quelli per terapia genica e cellulare somatica, l'elevata tossicità dei primi e l'obiettivo di produrre alterazioni permanenti con i secondi, comportano l'accettazione di rischi maggiori rispetto a quelli delle altre categorie. Da ciò deriva l'opportunità di eseguire anche gli studi clinici di fase I sul volontario malato. Infatti, in questi casi, dal punto di vista etico, è lecito arruolare solamente quei soggetti che potrebbero avere un ipotetico beneficio dalla somministrazione del prodotto.

L'interpretazione dei dati di tossicità deve tenere conto anche dei risultati degli studi sulla qualità della preparazione; infatti, è possibile la comparsa di effetti tossici causati da impurezze, non eliminabili, formatesi nel corso del processo di produzione. E' necessario quindi disporre di preparazioni altamente purificate, e le modalità di conduzione di questi studi per le differenti tipologie di prodotti sono argomento di specifiche trattazioni in questo volume.

Tabella 2. Modelli sperimentali utilizzati per la selezione di alcune classi di farmaci di interesse cardiovascolare

Malattia umana	Modelli sperimentali	Effetto farmacologico valutabile
Aritmia	<ul style="list-style-type: none"> - Atrio isolato - Cuore isolato - Colture di cellule di Purkinije - Ischemia-riperfusion arteria coronaria (ratto, cane) - Ouabaina (cavia) - Aconitina (ratto) 	<ul style="list-style-type: none"> - effetto bradicardizzante - effetto bradicardizzante - effetto sul potenziale d'azione - effetto su extrasistoli ventricolari - effetto su fibrillazione atriale, extrasistoli ventricolari - effetto su fibrillazione atriale
Insufficienza cardiaca	<ul style="list-style-type: none"> - Legatura arteria coronaria sinistra (topo, ratto, cane) - Coartazione aorta (topo, ratto) - Fistola aorto-cavale (ratto) - Tireotossicosi (ratto) - Adriamicina (ratto, coniglio, cane) - Miocardite virale (ratto) - Insufficienza valvolare (ratto) - Ratti SHHF - Topi transgenici - Hamster cardiopatici BIO 16 - Tachicardia da stimolazione elettrica del ventricolo dx nel coniglio 	<ul style="list-style-type: none"> - effetto sulla disfunzione ventricolare da infarto del miocardio - effetto da sovraccarico pressorio - effetto da sovraccarico di volume - metabolismo energetico - capacità contrattile - capacità contrattile - effetto da sovraccarico di volume - capacità contrattile e danno da sovraccarico pressorio - contrattilità cardiaca - contrattilità cardiaca - contrattilità cardiaca conseguente ad alterazione del metabolismo energetico
Ipertensione	<ul style="list-style-type: none"> - Vasi isolati - Rene Goldblatt - Ratti SHR - Letto vascolare mesenterico 	<ul style="list-style-type: none"> - effetti vasoattivi - effetto sul sistema renina-angiotensina - effetto sulla funzionalità glomerulare (danno d'organo) - effetto sulle arteriole

In questo articolo verranno analizzati i principali obiettivi dei vari studi pre-clinici di farmaco-tossicologia e le linee generali per l'interpretazione dei loro risultati. Va sottolineato che questi studi debbono essere eseguiti in conformità con quanto riportato nelle linee guida emanate da organismi nazionali ed internazionali.

Tabella 3. Modelli sperimentali utilizzati per la selezione dei farmaci antidepressivi

Modello sperimentale	Effetti degli antidepressivi
<i>In vivo</i>	
Comportamento libero	<ul style="list-style-type: none"> - Aumento attività motoria - Riduzione attività esplorativa - Antagonismo ptosi palpebrale e ipotermia da reserpina - Antagonismo ptosi palpebrale, scialorrea e tremore da oxotremorina - Antagonismo tremori, convulsioni e sedazione da nicotina - Potenziamento "head twitches" da 5-HTP - Potenziamento triptamina - Antagonismo catalessia da neurolettici - Potenziamento letalità da yoimbina - Potenziamento motilità e stereotipie da anfetamina - Antagonismo ipotermia da apomorfina
Comportamento condizionato	<ul style="list-style-type: none"> - Antagonismo "behavioral despair" - Antagonismo "learned helplessness" - Antagonismo effetto muricida nel ratto - Antagonismo deficit apprendimento nel ratto bulbectomizzato
Elettroencefalografia/elettrofisiologia	<ul style="list-style-type: none"> - Effetto sincronizzante - Ipnogramma: <ul style="list-style-type: none"> - aumento fasi di veglia - invariato SWS - riduzione sonno REM: - totale - inizio ritardato - Antagonismo punte PGO da reserpina - "Firing rate" nel nucleo dorsale del rafe
<i>Ex vivo</i>	
Trattamento singolo	<ul style="list-style-type: none"> - Riduzione turnover: DA, NE, 5-HT - Riduzione captazione: NE, 5-HT
Trattamento ripetuto	<ul style="list-style-type: none"> - Riduzione adenilciclastasi - Subsensibilità binding: 5-HT₂, α_1, β_2 (centrale) - Supersensibilità binding: α_1, GABA_B
<i>In vitro</i>	
	<ul style="list-style-type: none"> - Riduzione captazione presinaptica: NE, 5-HT (DA) - Binding: antidepressivi (imipramina, mianserina) - Binding neurotrasmettitori: <ul style="list-style-type: none"> - 5-HT - α_1, muscarinici, istaminici (per effetti indesiderati)

Studi di farmacodinamica

Questi studi consentono l'inquadramento farmacologico di un nuovo composto e non debbono essere necessariamente eseguiti in conformità con le Buone Pratiche di Laboratorio (BPL).

Studi di farmacologia molecolare

La moderna strategia di selezione di nuovi farmaci di sintesi e di estrazione, prevede inizialmente la definizione di un modello (definito "farmacoforo" o "modello farmacoforico"), che riproduce la struttura del substrato biologico (ad esempio un recettore, un enzima, ecc.) su cui deve agire il composto. In questo modo è possibile sintetizzare, o reperire nelle chemiotecche, composti con una struttura che si adatta al meglio a questo substrato.

Questi studi non hanno rilevanza sul piano regolatorio, ma è utile citarli in quanto consentono, con la sintesi mirata di un'ampia gamma di composti e loro derivati, l'avvio del processo di selezione di nuovi farmaci.

Studi *in vitro*

Questi studi rappresentano il primo screening per riconoscere l'attività biologica del nuovo composto e definirne l'attività intrinseca. I loro risultati forniscono le prime informazioni di ritorno utili per guidare la preparazione mirata di derivati sempre più selettivi e le indicazioni sul possibile meccanismo d'azione del composto; essi, inoltre, indirizzano la scelta dei modelli sperimentali *in vivo* da utilizzare negli studi di farmacodinamica e di "safety" farmacologia.

Ai fini della ammissibilità alla sperimentazione clinica di fase I, i risultati di questi studi possono essere considerati sufficienti per l'inquadramento dell'attività farmacologica di particolari prodotti biologici e di farmaci proposti per il trattamento di patologie per le quali non sono disponibili modelli *in vivo*.

Studi *in vivo*

Questi studi consentono l'inquadramento del nuovo composto in una determinata categoria farmaco-terapeutica, in funzione della quale, come accennato in precedenza, è possibile definire il livello di tollerabilità accettabile sull'uomo. I loro risultati sono poi fondamentali per formulare l'ipotesi terapeutica che si intende sviluppare nella successiva sperimentazione clinica.

Essi si avvalgono di modelli di patologia sperimentale animale, che intendono riprodurre specifiche malattie umane e consentono di acquisire risultati quantificabili sotto forma di effetti dose-risposta e tempo-risposta.

La disponibilità di modelli sperimentali è diversa per le varie patologie. Numerosi sono, ad esempio, quelli per lo studio dei farmaci destinati alle malattie cardiovascolari (vedi Tabella 2), dei farmaci antinfiammatori non steroidei, antiulcera ed antidepressivi (vedi Tabella 3). Al contrario, non ne sono disponibili per la maggior parte delle malattie rare, e notevoli difficoltà si possono presentare per lo studio di numerosi prodotti biologici.

In presenza di una specie-specificità di prodotti di origine biologica, può essere considerata sufficiente una documentazione che ne evidenzia l'efficacia nel modello sperimentale in condizioni ritenute favorevoli (ad esempio utilizzando l'omologo della specie animale impiegata).

Predittività dei modelli sperimentali in farmacologia previsionale

La capacità predittiva dei modelli animali attualmente disponibili, deve essere tenuta in considerazione all'atto della scelta di quelli da utilizzare per la dimostrazione sperimentale dell'effetto farmacologico di un nuovo composto.

La maggior parte dei modelli attualmente utilizzati in farmacologia previsionale è rappresentato da quelli *in vivo*. Essi sono stati selezionati nel tempo in base alla presenza di alcuni parametri comuni con la patologia umana che si intende riprodurre, le cui variazioni sono misurabili nell'animale e nell'uomo. Un elemento di sicura convergenza fra il modello animale e la patologia umana di riferimento è la comune risposta a farmaci ad attività clinica ben nota. In ambedue i casi, l'effetto deve essere dose-dipendente e la potenza relativa dei vari farmaci sovrapponibile. Inoltre, occorre dimostrare l'assenza di attività nel modello di composti non efficaci in clinica nella patologia di riferimento. Altri criteri di selezione sono rappresentati dalla possibilità di riprodurre alterazioni dei parametri critici della malattia (ad esempio ipertensione, iperglicemia, ecc.) e/o momenti eziopatogenetici (ad esempio patologie infettive) della malattia umana.

Nella maggior parte dei casi, tuttavia, le condizioni sperimentali sono state ottimizzate a suo tempo per determinati composti e quindi i modelli sperimentali disponibili soddisfano solo in parte i quesiti posti dalla farmacologia previsionale. Ciascuno di essi, infatti, è in grado di riprodurre solo parzialmente la dinamica della malattia umana, e nel loro insieme tendono a selezionare farmaci con gli stessi limiti terapeutici ed effetti indesiderati di quelli già disponibili in clinica, e spesso non rispondono a composti dotati di maggiore selettività.

Recentemente, è stato introdotto in farmacologia previsionale l'utilizzo di animali transgenici, nei quali sono state realizzate con tecniche di ingegneria genetica modificazioni selettive di determinati meccanismi biochimici. Essi consentono di esaminare l'effetto specifico dei farmaci su questi meccanismi (ad esempio nel caso dell'ipertensione, di dismetabolismi, ecc.) oppure di creare le condizioni per realizzare determinati modelli sperimentali (ad esempio patologie tumorali nei topi immunodeficienti SCID). Un limite di questi modelli è rappresentato dalla mancanza di informazioni sulla eventuale attivazione di meccanismi compensatori della modificazione indotta, ai fini di mantenere l'omeostasi.

Se si considerano, quindi, le potenzialità ed i limiti dei modelli sperimentali fin'ora disponibili, ne deriva che l'inquadramento farmacologico di un nuovo composto può essere considerato soddisfacente solamente dopo averne valutato la risposta in più modelli, verificando le aree di sovrapposizione e le differenze con farmaci ad attività clinica già nota. E' preferibile il confronto con i farmaci sui quali il modello è stato ottimizzato.

Il livello di predittività è tanto maggiore quanto più il modello è in grado di mostrare a livello sperimentale effetti del farmaco qualitativamente simili a quelli osservati in clinica. Così, oggi, sono disponibili modelli di farmacologia previsionale soprattutto per farmaci di utilizzo clinico consolidato e per patologie con un ampio armamentario terapeutico, per i quali una serie di verifiche nel tempo ne hanno validato la capacità predittiva. Un esempio è rappresentato dai farmaci antiipertensivi che normalizzano i livelli pressori sia nei modelli animali di ipertensione (vedi Tabella 2) che nei pazienti ipertesi. Mancano, al contrario, modelli sufficientemente predittivi per selezionare farmaci innovativi in grado di trattare numerose malattie degenerative o per riconoscere la validità terapeutica a lungo termine del controllo di determinati fattori di rischio. Infatti, non disponiamo oggi di modelli predittivi da impiegare per lo studio di farmaci efficaci contro malattie gravi ed invalidanti (ad esempio la sclerosi multipla e la malattia di Alzheimer) o per capire se, e in quale misura, ad esempio, la riduzione dell'osteoporosi possa in qualche modo favorire la riduzione dell'incidenza di fratture spontanee nell'anziano.

Infine può essere interessante riportare alcuni esempi di correlazioni consolidate fra i dati clinici ed i risultati della sperimentazione animale per alcuni psicofarmaci. Nel caso degli

antidepressivi, è stato dimostrato che la potenza nell'inibire la catalessia da tetrabenazina nell'animale di laboratorio è direttamente correlata con l'effetto risolvente dell'inibizione psicomotoria nei soggetti depressi, così come l'azione sincronizzante sull'elettroencefalogramma nell'animale di laboratorio ben si correla con l'effetto calmante in clinica, rilevato mediante la scomparsa dell'agitazione psicomotoria nei depressi (1).

Un altro esempio interessante è rappresentato dalle benzodiazepine. Tutti i derivati benzodiazepinici possiedono in diversa misura proprietà anticonflitto, anticonvulsivanti, sedative e potenzianti gli effetti dei farmaci depressivi, cui corrispondono in clinica effetti rispettivamente ansiolitici, antiepilettici ed ipnotico-sedativi (2). La scelta della indicazione terapeutica per ciascun composto è basata sul profilo farmacocinetico e sulla potenza relativa del composto nell'indurre i vari effetti farmacologici sopra riferiti. Così, l'indicazione di ansiolitico è riservata ai derivati con maggiore potenza relativa nei test anticonflitto, bassa potenza nei test per la sedazione e con lunga durata d'azione (è necessaria infatti una azione terapeutica prolungata), mentre come ipnotico è preferibile disporre di un derivato con maggiore potenza relativa come sedativo e con breve durata d'azione (è preferibile soprattutto favorire l'induzione del sonno ed evitare effetti del composto al risveglio).

Gli studi tossicologici

Questi studi sono mirati a formulare le prime ipotesi sulla sicurezza d'uso della nuova preparazione, al fine di predisporre interventi mirati alla prevenzione o al contenimento di possibili effetti avversi all'atto della prima somministrazione sull'uomo. Essi debbono essere condotti in conformità con le BPL. Tuttavia, per l'unicità e la specificità di alcuni studi di "safety" farmacologica -ad esempio quelli che prevedono l'impiego dei modelli sperimentali utilizzati in farmacodinamica (vedi apposita sezione)- per i quali emerga l'impossibilità pratica di eseguirli in conformità alle BPL, i loro protocolli e la strategia del singolo studio andranno valutati caso per caso, e deve essere comunque assicurata l'integrità e la qualità dei dati.

Studi di tossicità dopo somministrazione singola (cosiddetta acuta)

L'obiettivo primario di questi studi è formulare ipotesi sulla sintomatologia da sovradosaggio acuto del nuovo prodotto; tali informazioni sono di fondamentale importanza all'atto della prima somministrazione sull'uomo. A questo scopo, occorre una accurata definizione dei segni di tossicità, con eventuali approfondimenti diagnostici e anatomo-patologici, laddove ritenuti necessari. Occorre tuttavia saperli distinguere da quelli dovuti ad una tossicità aspecifica (di tipo marcatamente depressivo centrale), osservabili a dosi vicine a quelle letali. Per questa finalità il calcolo delle DL50 ha mostrato, nella maggior parte dei casi, una serie di limiti ed è stato abbandonato. Oggi le Autorità Regolatorie richiedono il calcolo della Minima Dose Tossica o della DL10.

Un obiettivo secondario è rappresentato dall'acquisizione di indicazioni utili per stabilire i dosaggi da utilizzare negli studi di tossicità dopo somministrazione ripetuta (vedi apposita sezione).

Somministrazione ripetuta a breve termine

Questi studi sono mirati a definire la tossicità d'organo dei nuovi farmaci, e la reversibilità di eventuali alterazioni, al fine di introdurre nei protocolli di fase I il monitoraggio della funzionalità di determinati organi e sistemi, che gli studi animali hanno identificato come

possibili bersagli di tossicità del composto. L'attuale strategia è di provocare nell'organismo animale un accumulo del farmaco sufficiente ad evidenziare nei vari organi eventuali alterazioni funzionali ed anatomo-istologiche nonché processi di adattamento funzionale e/o metabolico. A questo scopo, si impiegano dosi elevate del farmaco per ottenere un accumulo rapido del composto e, conseguentemente, l'attivazione di vie metaboliche secondarie (che al contrario potrebbero rimanere silenti alle dosi inferiori) con produzione di metaboliti secondari in quantità sufficiente per evidenziarne possibili effetti tossici. La riduzione della durata del trattamento si è resa necessaria per evitare che periodi più prolungati portino al decesso dell'animale, in ragione di effetti tossici aspecifici.

Tossicocinetica

La correlazione del quadro tossicologico (osservato negli studi di tossicità ripetuta) con i livelli ematici del composto, svincolati dalle modalità di somministrazione, consente una migliore e più adeguata trasferibilità sull'uomo dei dati animali. Questi studi, unitamente a quelli di farmacocinetica, consentono di stabilire nei protocolli clinici di fase I la concentrazione massima accettabile sull'uomo all'atto della prima somministrazione del nuovo farmaco e gli intervalli fra le varie somministrazioni.

L'obiettivo secondario è di consentire la scelta sia delle specie più idonee che del regime di trattamento per gli studi pre-clinici.

“Safety” farmacologica e farmacologia generale

Al fine di completare l'inquadramento tossicologico del nuovo composto, è indispensabile esaminare gli effetti dei nuovi farmaci sulle funzioni degli organi vitali, quali i sistemi cardiovascolare, respiratorio e nervoso. Questi studi rappresentano la batteria fondamentale dei test di “safety” farmacologica richiesti per l'avvio della sperimentazione clinica di fase I con i nuovi farmaci.

Tuttavia fra la fine degli anni '70 e l'inizio degli anni '80 sono emersi i limiti degli studi classici di tossicologia per il corretto inquadramento tossicologico degli autacoidi. Infatti, con l'aumento delle dosi si poteva evidenziare solamente un esagerato effetto fisiologico del composto. Per esaminare gli effetti tossici su determinati organi e sistemi, differenti da quello bersaglio dell'azione terapeutica, si è così ricorsi all'impiego dei modelli sperimentali utilizzati negli studi di farmacodinamica.

Questa strategia è stata poi estesa allo studio di altri farmaci. Il ricorso a questi studi riguarda soprattutto composti per i quali la comparsa di determinati effetti avversi è ipotizzabile in base sia alla segnalazione della loro osservazione in clinica con prodotti analoghi sia ai meccanismi biochimici su cui interferiscono. Per questi composti, oggi, la valutazione della sicurezza d'uso si basa soprattutto sui risultati degli studi di “safety” farmacologica (Tabella 4).

Gli effetti rilevabili possono essere o non essere correlati al meccanismo d'azione responsabile dell'effetto farmacologico principale (3). Alcuni di questi effetti osservati in clinica hanno poi acquisito rilevanza terapeutica (Tabella 5).

Un esempio interessante è rappresentato dal captopril, la cui interferenza sul metabolismo delle bradichinine suggerì a suo tempo una possibile influenza del farmaco sulla reattività bronchiale. Questa ipotesi è stata successivamente confermata dalla comparsa di tosse nell'uomo e dalla dimostrazione della capacità di questo composto di potenziare il broncospasmo da bradichinina nella cavia. Quest'ultimo test venne quindi richiesto dalle

autorità regolatorie nell'ambito delle valutazioni tossicologiche necessarie per autorizzare la sperimentazione clinica di fase I con altri ACE-inibitori.

Tabella 4. Esempi di test utilizzati negli studi di "safety" farmacologica

Classe farmacologica	Effetto secondario in clinica	Test pre-clinico
ACE-inibitori	Tosse	Broncospasmo nella cavia
Statine	Miotossicità	Dosaggio creatin fosfochinasi Biopsia muscolare
Clozapina ed affini	Agranulocitosi	Esame della crasi ematica
Acido salicilico	Antiaggregante	Test di aggregazione piastrinica
FANS	Gastrolesività	Ulcere sperimentali nel ratto
Antiparkinson	Attività anticolinergica	Test comportamentali
Ansiolitici benzodiazepinici	Effetti endocrini	Dosaggi prolattina
	Tolleranza	Tolleranza crociata
	Dipendenza	Self-stimulation
	Sedazione	Potenziamento degli effetti dell'etanolo
Mezzi di contrasto	Amnesia	Test del labirinto ad acqua
	Ipertensione	Pressione arteriosa

Tabella 5. Effetti indesiderati che hanno acquisito rilevanza terapeutica in clinica

Farmaco	Indicazione iniziale	Nuova indicazione
Aspirina	Dolore, febbre, infiammazione	Prevenzione infarto miocardio
Buspirone	Psicosi	Ansia
5-HT ₃ antagonisti	Vomito	Ansia
Mianserina	Depressione	Ipertensione
Propranololo	Aritmie	Ipertensione
Lidocaina	Anestesia locale	Aritmie
Minoxidil	Ipertensione	Calvizie

Farmacocinetica

La conoscenza dell'assorbimento, distribuzione, metabolismo ed eliminazione di un farmaco e l'andamento nel tempo delle sue concentrazioni plasmatiche, sono importanti per l'interpretazione degli studi di farmacodinamica e tossicologia nonché per la scelta delle condizioni ottimali di somministrazione (forma farmaceutica, dose e via di somministrazione, intervalli fra le dosi). La misura delle concentrazioni nei vari tessuti è essenziale per conoscere la distribuzione e l'accumulo del composto o dei suoi metaboliti, specialmente in relazione ai potenziali siti d'azione; informazioni che possono essere utili per disegnare gli studi tossicologici e farmacologici oltre che per interpretarne i risultati. Occorre ricordare che non sembrano esistere differenze significative fra le varie specie per ciò che riguarda l'assorbimento, la distribuzione, l'accumulo e l'escrezione dei composti, mentre possono esistere differenze per quanto riguarda i metaboliti e la loro velocità di formazione.

Per l'autorizzazione agli studi clinici di fase I, le recenti linee guida internazionali indicano l'utilità di eseguire studi *in vitro* su epatociti umani o di altre specie per valutare l'effetto dei nuovi farmaci sugli isoenzimi microsomiali del citocromo P450 (CYP). L'obiettivo è di individuare l'isomorfa attiva sull'uomo nel metabolizzare il nuovo composto e di identificare eventuali interferenze reciproche nel metabolismo del composto in esame con quello di altri farmaci (CYP: 3A4, 2C19, 2D6) ed eventualmente di alimenti (CYP: 1A2, 2E1).

Definizione dei dosaggi consentiti per gli studi di fase I

In base all'esperienza, si è potuto stabilire che le dosi potenzialmente tossiche dei composti sull'uomo possono essere definite con buona approssimazione, riducendo le dosi che si sono dimostrate tossiche sugli animali di un fattore, che varia secondo la specie animale impiegata (ad esempio di un fattore 10 nel caso dei roditori) (4).

In generale, negli studi di fase I si suggerisce di iniziare con una dose che è una frazione (1/20-1/50) della DE50 ottenuta nei test di farmacodinamica. Successivamente, essa potrà essere aumentata ad intervalli di dose e di tempo, definiti in base ad alcuni algoritmi ed alle caratteristiche farmacocinetiche del composto. Il trattamento è sospeso con la comparsa di effetti indesiderati, non accettabili in funzione della categoria di appartenenza del composto in esame.

Le Figure 1 e 2 riportano alcuni esempi delle dosi approvate per gli studi sull'uomo dalla commissione *ad hoc* dell'Istituto Superiore di Sanità, in confronto ai dosaggi attivi nei test pre-clinici.

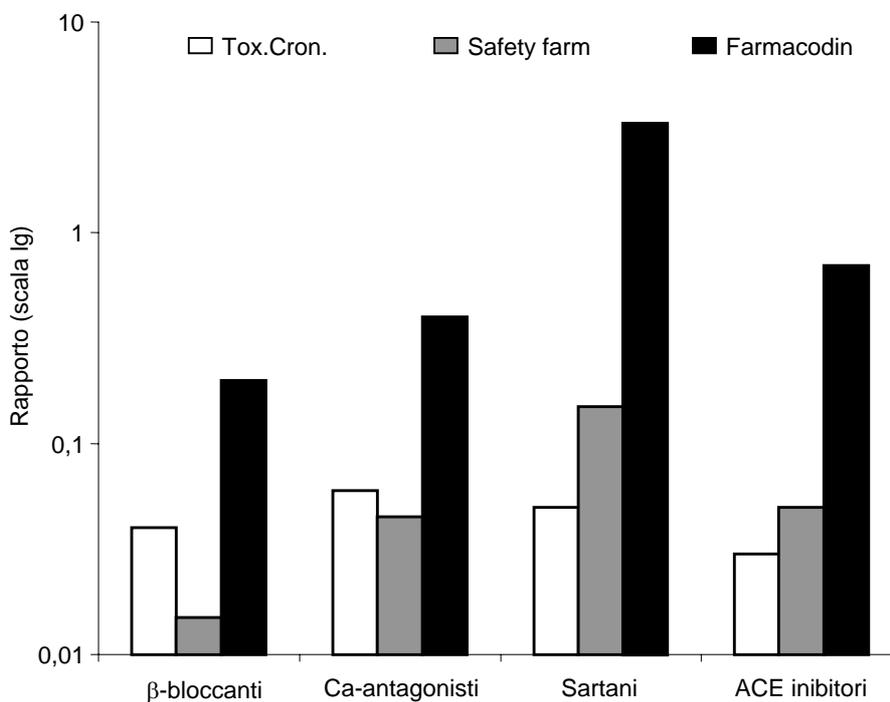


Figura 1. Rapporto fra i dosaggi autorizzati dalla Commissione *ad hoc* dell'Istituto Superiore di Sanità e quelli attivi nei test pre-clinici di alcune classi di farmaci cardiovascolari

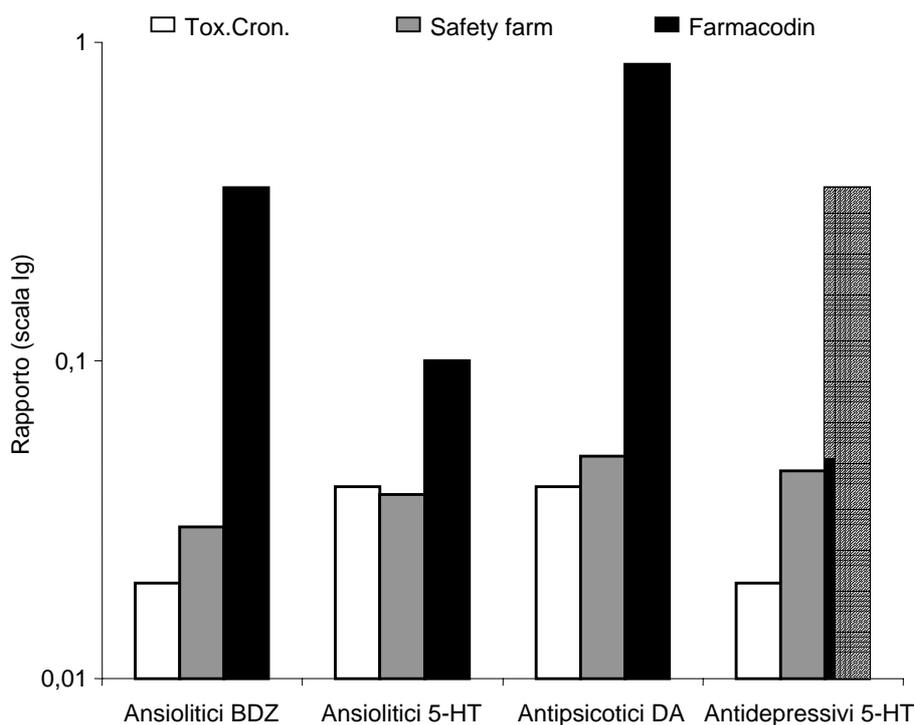


Figura 2. Rapporto fra i dosaggi autorizzati dalla Commissione *ad hoc* dell'Istituto Superiore di Sanità sull'uomo e quelli attivi nei test pre-clinici per alcune classi di psicofarmaci

Gli esempi riportati riguardano alcune classi di farmaci appartenenti alle due categorie con il maggior numero di richieste valutate dalla commissione. In generale, la dose è stata 20-50 volte inferiore a quella attiva nel provocare effetti tossici, e pari o inferiore fino a 10 volte rispetto a quella efficace nei test di farmacodinamica.

Concetto di innovatività pre-clinica

L'innovatività di un nuovo farmaco è dimostrata dalla sua capacità di ottenere significativi vantaggi terapeutici e/o riduzione dei potenziali rischi (4). In ambedue i casi essa deve essere dimostrata in studi clinici di potenza statistica e follow-up adeguati, utilizzando end-point reali e confronti con terapie di riferimento adeguate.

Prodotti costituiti da molecole nuove, con un nuovo meccanismo d'azione, oppure dotati di maggiore efficacia e tollerabilità nei test animali possono essere considerati anch'essi potenzialmente innovativi. Tuttavia, in molti casi il vantaggio clinico ipotizzato non è stato sempre confermato o non ha avuto una adeguata dimostrazione in clinica (Tabella 6).

Tabella 6. Confronto fra innovatività pre-clinica ed innovatività clinica di alcuni farmaci per malattie del sistema nervoso centrale, valutati dalla commissione *ad hoc* dell'Istituto Superiore di Sanità

Farmaco	Innovatività pre-clinica				Innovatività clinica	
	Molecola	Meccanismo d'azione	Efficacia	Tossicità	Efficacia	Tollerabilità
Fluoxetina	nuova	>selettività	sì	sì	no	sì
Gabapentin	analogo GABA	non noto (GABA?)	no	no	no	sì(a)
Olanzapina	nuova	>selettività	no	sì	no	sì(a)
Risperidone	nuova	>selettività	no	sì	no	sì(b)
Talipexolo(c)	nuova	noto	no	no	no	no
Ropirinolo	nuova	noto	no	sì	no	no
Tolcapone	nuova	nuovo	no	sì	no	no(d)
Gavestiniil	nuova	innovativo	sì	sì	inefficace	-
Zolpidem	nuova	>selettività	sì	sì	modesta	modesta

(a) mancano studi di potenza adeguata in confronto con terapie standard

(b) i vantaggi debbono essere confermati in studi di potenza adeguata

(c) parere sfavorevole da parte della commissione dell'ISS, registrato in Giappone

(d) ritirato dal commercio a seguito di segnalazioni di casi di epatite fulminante

Conclusioni

L'Istituto Superiore di Sanità formula il parere sulla qualità e sicurezza d'uso dei farmaci da avviare alla sperimentazione clinica di fase I, dopo un esame della documentazione inviata dai richiedenti. Per una rapida istruttoria, è necessario quindi disporre di una documentazione completa e dettagliata nonché conforme per ciò che concerne la conduzione degli studi alle linee guida emanate dagli organismi scientifici e regolatori nazionali e, in loro assenza, internazionali. L'assenza di una parte della documentazione deve essere adeguatamente giustificata.

Per quanto concerne gli studi farmaco-tossicologici, occorre ricordare che i loro risultati consentono esclusivamente di formulare ipotesi che, tuttavia, non garantiscono la correttezza della predizione. Infatti, il trasferimento dei risultati degli studi animali sull'uomo è un processo complesso che presenta una serie di difficoltà. Zbinden nel 1991 ha richiamato l'attenzione su alcune differenze fondamentali, così riassumibili: la sperimentazione animale avviene in condizioni di omogeneità (per la base genetica, l'età e lo stato di salute individuale), le circostanze di esposizione sono ottimali (ambiente, assenza di terapie concomitanti) e la verifica degli effetti per alcuni aspetti è completa (esami di laboratorio ed anatomo-patologici) mentre per altri è insoddisfacente (assenza di contatto verbale, esame obiettivo assai limitato) (4). A ciò si aggiungano poi i limiti nella capacità predittiva dei modelli sperimentali menzionati in precedenza.

Per queste motivazioni, si ribadisce che l'inquadramento farmaco-tossicologico di un nuovo composto deve passare attraverso una serie di studi su più modelli sperimentali in confronto con

farmaci la cui attività in clinica è ormai consolidata. I risultati così ottenuti consentono di formulare ipotesi terapeutiche che saranno successivamente oggetto di verifica in clinica, in condizioni di sicurezza per i soggetti da arruolare. Uno degli obiettivi della sperimentazione clinica di fase I è quello di verificare la tollerabilità del nuovo composto sull'uomo, ed è per questo che i protocolli prevedono l'arruolamento di un numero limitato di soggetti, da studiare in modo assai approfondito e con un monitoraggio accurato delle funzioni vitali e di tutte le altre funzioni che, sulla base degli studi clinici, potrebbero essere modificate negativamente dal trattamento.

Infine, va rilevata l'importanza sul piano scientifico della sperimentazione clinica di fase I. Essa, infatti, rappresenta la prima verifica sull'uomo delle ipotesi formulate in laboratorio, sulla sicurezza d'uso ed in alcuni casi sui possibili benefici di un nuovo trattamento. Infatti, nonostante i suoi obiettivi siano limitati alla definizione della tollerabilità e della farmacocinetica del nuovo composto, gli studi consentono anche di acquisire informazioni preliminari sulla sua attività farmacodinamica. Inoltre, i risultati ottenuti sono utili per una verifica della strategia messa in opera a livello pre-clinico e della capacità predittiva dei modelli sperimentali utilizzati.

Bibliografia

1. Poldinger W, Stille G. Concerning the possibility of correlating pharmacological and clinical data of psychotropic drugs. In: Cerletti A, Bovè FL (Ed.). *The present status of psychotropic drugs*. Amsterdam: Excerpta Medica ICS; 1968. p. 529-36.
2. Haefely W, Polc P, Pieri L, Schaffner R, Laurent JP. Neuropharmacology of benzodiazepines: synaptic mechanisms and neural basis of action. In: Costa E (Ed.). *The benzodiazepines: from molecular biology to clinical practice*. New York: Raven Press; 1983. p. 21-66.
3. Popoli P, Massotti M. Pharmacological safety studies as a tool for risk/benefit assessment of new drugs. *Eur Bull Drug Res* 1992;1:5-8.
4. Zbinden G. Predictive value of animal studies in toxicology. *Reg Toxicol Pharmacol* 1991;14:167-77.
5. Benzi G, Garattini S. *Criteria for the evaluation of new pharmaceutical substances*. Documento presentato al CPMP; 1993.

ANALISI DELLA DOCUMENTAZIONE SULLA MUTAGENESI DEI FARMACI

Angelo Carere

Laboratorio di Tossicologia Comparata ed Ecotossicologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Nella valutazione della tossicità degli agenti chimici, comprese le specialità medicinali, è necessario valutare il loro potenziale mutageno/genotossico. Si ritiene utile, al riguardo, ricordare alcune definizioni e gli obiettivi della mutagenesi.

Definizioni

Il termine “mutagenesi” o “mutagenicità” si riferisce all’induzione di cambiamenti permanenti trasmissibili nella “quantità” o “struttura” del materiale genetico di cellule od organismi, a livello somatico o germinale. Questi cambiamenti possono avvenire a livello genico (mutazioni geniche), cromosomico (mutazioni o aberrazioni cromosomiche strutturali) o genomico (mutazioni o aberrazioni cromosomiche numeriche, quali ad esempio aneuploidia e poliploidia). “Genotossicità” è un termine operativo più ampio e comprende, oltre alle mutazioni, effetti diversi sul materiale genetico, quali ad esempio: danni al DNA come rotture a singola o doppia elica, addotti al DNA, sintesi non programmata del DNA (UDS), scambi tra cromatidi fratelli (SCE), ricombinazione mitotica (“crossing-over” e conversione genica).

Il termine “cancerogeno genotossico” è generalmente usato per distinguere gli agenti cancerogeni per i quali il meccanismo di azione più plausibile è di tipo stocastico, senza soglia, da quelli “epigenetici”, il cui meccanismo di azione è conseguente ad effetti secondari con soglia.

Obiettivi

Gli obiettivi principali generalmente accettati dei test di mutagenesi applicati alle sostanze chimiche sono due: i) identificazione di *agenti mutageni germinali*, a causa del loro possibile coinvolgimento nella eziologia di difetti genetici ereditabili; ii) identificazione di *agenti mutageni somatici*, per il loro possibile coinvolgimento nella trasformazione neoplastica.

Oggi è riconosciuto che ognuno dei tre livelli di mutazioni – *gene*, *cromosoma* e *genoma* (es. cambiamenti numerici che portano ad aneuploidie) – possono svolgere un ruolo importante nella induzione di difetti ereditari e di tumori. Nel caso dei tumori si ritiene che anche altre modificazioni del materiale genetico (es. ricombinazione, amplificazione, ipometilazione) possano svolgere un ruolo.

Nonostante l’enorme numero di dati di genotossicità prodotti negli ultimi venti anni ed i recenti progressi ottenuti nella conoscenza dei meccanismi di mutagenesi e cancerogenesi, la situazione riguardo ai test ed alle strategie per la valutazione della genotossicità delle sostanze

chimiche non è cambiata sostanzialmente negli ultimi anni. Data la varietà di lesioni molecolari potenzialmente rilevanti nella eziologia dei difetti genetici trasmissibili e del cancro (1-4), l'analisi di diversi eventi genetici è ritenuta necessaria nello screening di agenti chimici per il loro potenziale genotossico. Attualmente non esiste un unico test capace di dare informazione sui tre diversi tipi di mutazioni: geniche, cromosomiche strutturali e cromosomiche numeriche (es. aneuploidie).

In generale si ritiene che il dossier minimo di base, per sostanze di cui si preveda un'esposizione limitata, debba consistere di almeno due tipi di test *in vitro*: uno a livello genico in cellule batteriche ed uno a livello cromosomico in cellule di mammifero. Negli anni '80 c'era un consenso generale nel ritenere necessaria, nel caso di agenti chimici con ampia e/o diretta esposizione umana (es. additivi alimentari, farmaci), una batteria di quattro test (a livello genico in cellule batteriche e di mammifero, ed a livello cromosomico *in vitro* e *in vivo*) (5, 6).

Nel campo della mutagenesi l'Italia è stata molto attiva sin dalla nascita di questa disciplina tossicologica. Nel caso dei farmaci, sin dalla fine degli anni '70, due successivi decreti ministeriali (DM 28 luglio 1977 e DM 25 agosto 1977) richiedevano tre diverse tipologie di saggi di mutagenesi. Nel 1988 la richiesta (Tabella 1) veniva articolata in due fasi: prima della sperimentazione clinica pilota (un test *in vitro* di mutazioni geniche in cellule batteriche ed un test *in vitro* di aberrazioni cromosomiche in cellule di mammifero) e prima della sperimentazione clinica allargata (un test *in vitro* di mutazioni geniche in cellule di mammifero e un test *in vivo* del micronucleo).

Tabella 1. Test di mutagenesi proposti per l'accesso alla sperimentazione clinica dei prodotti farmaceutici di nuova istituzione (1988)

Sperimentazione clinica	Test di mutagenesi proposto
A) Prima della "fase pilota"	
2 saggi <i>in vitro</i> con e senza attivazione metabolica	- test batterico di mutazioni geniche - test di aberrazioni cromosomiche in cellule di mammifero
B) Prima della "fase allargata"	
altri 2 tipi di saggi (a completamento delle prove di mutagenesi previste prima della sperimentazione clinica pilota)	- test di mutazioni geniche in un sistema eucariotico - test del micronucleo e/o test di danno/riparazione del DNA ("UDS" oppure "SCE")

Gli studi di mutagenesi vanno eseguiti secondo protocolli sperimentali accettati internazionalmente (es. CEE/OCSE) e secondo le "Buone Pratiche di Laboratorio" ("GLP"). Strategie e linee guida

Una batteria simile (quattro test di cui uno *in vivo*) veniva raccomandata nel 1989 dalla Unione Europea (Tabella 2) (7), senza distinzione tra fase clinica pilota e fase allargata.

Tabella 2. Principi di valutazione della mutagenesi dei farmaci

Principi di valutazione
1) Induzione di mutazioni geniche in batteri
2) Aberrazioni cromosomiche in cellule di mammifero <i>in vitro</i>
3) Mutazioni geniche in un sistema eucariotico
4) Test <i>in vivo</i> di danno genetico (i più convalidati sono quelli a livello cromosomico, es.: analisi metafasica in cellule di midollo osseo o micronuclei in cellule di midollo osseo o in eritrociti periferici del sangue; il test "mouse spot" è un test <i>in vivo</i> di mutazioni geniche che ha raggiunto un sufficiente grado di convalida)

Recentemente sono state pubblicate le linee guida della “International Conference on Harmonisation” (ICH), risultate dallo sforzo di armonizzazione tra Unione Europea, Giappone e USA (7). L’ICH raccomanda una batteria di tre test, come riportato nella Tabella 3.

Tabella 3. Batteria standard dell’ICH

Test
i) un test per le mutazioni geniche in cellule batteriche
ii) un test <i>in vitro</i> per le aberrazioni cromosomiche in cellule di mammifero oppure un test <i>in vitro</i> in cellule di linfoma <i>tk</i> di topo
iii) un test <i>in vivo</i> per le aberrazioni cromosomiche in cellule di midollo osseo di roditori

Nella Tabella 4 sono riportate eventuali eccezioni all’applicazione della batteria dei tre test sopra riportati. In particolare, tali eccezioni riguardano la necessità di ulteriori saggi non convenzionali o convenzionali/modificati nel caso di sostanze con particolari strutture chimiche sospette di genotossicità, sostanze risultate cancerogene in roditori o sostanze sospette di essere aneuploidizzanti.

Tabella 4. Eccezioni alla batteria standard dell’ICH

Eccezioni	
1) Composti con “structural alerts” (9)	Test addizionali (convenzionali o non convenzionali, modifiche di protocolli)
2) Composti risultati cancerogeni in roditori	Test addizionali possono essere richiesti per composti cancerogeni risultati negativi nella batteria standard (es.: danno al DNA e test di riparazione; ³² P-postlabelling, spettri di mutazioni in oncogeni, modelli transgenici, ecc.)
3) Composti aneugenici compounds	Test addizionali non convenzionali possono essere richiesti per sospetti agenti aneuploidizzanti (es. CREST, FISH, ecc.)

Test e protocolli sperimentali

Nel 1998 l’OCSE (Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico) (10) ha aggiornato 6 linee guida precedenti ed ha introdotto una nuova. Queste linee guida riguardano test *in vitro* (es. mutazioni geniche in cellule batteriche ed in cellule di mammifero) e test *in vivo* (es. aberrazioni cromosomiche e micronuclei in cellule di midollo osseo di roditori, test *in vitro/in vivo* di sintesi non programmata del DNA “Rat liver UDS”, aberrazioni cromosomiche in spermatozoni di roditori). Attualmente un test *in vitro* del micronucleo è in corso di valutazione per essere incluso tra le linee guida dell’OCSE. Nel prossimo futuro questo test potrebbe essere considerato alternativo al test *in vitro* di aberrazioni cromosomiche, essendo capace di rivelare sia sostanze clastogene che aneuploidizzanti.

Prodotti bio-tecnologici

Considerazioni speciali devono essere fatte per i prodotti delle bio-tecnologie, compresi i prodotti derivanti dall'ingegneria genetica (es. proteine ricombinanti, preparazioni enzimatiche derivate da microorganismi geneticamente modificati, ecc.). Per alcuni di questi prodotti (es. proteine) interazioni elettrofiliche con il DNA sono altamente improbabili. Reazioni indirette con il metabolismo del DNA o con la proliferazione cellulare oppure attraverso la formazione di specie reattive dell'Ossigeno ("ROS") sembrano possibili solo per proteine molto specifiche come nucleasi, fattori di crescita e citochine; poco si sa su altri tipi di prodotti derivati dalle bio-tecnologie come ad esempio: ribozimi, oligonucleotidi "anti-senso", vaccini a DNA. Un possibile problema è quello relativo alla cosiddetta "insertional mutagenesis", cioè mutagenesi da inserimento di frammenti di DNA all'interno di geni (es. un oncogene soppressore, con conseguente inattivazione) o con l'attivazione di un proto-oncogene. Determinazioni sperimentali delle frequenze d'inserzione di frammenti di DNA in particolari sequenze sono oggi possibili con tecniche di biologia molecolare come quella nota sotto il nome di Polynucleotide Cross Reaction (PCR). In particolare si ritiene che la batteria standard di mutagenesi non sia applicabile ai "gene transfer products". Più in generale, la strategia da seguire (batteria standard, batteria ridotta, non richiesta di test di mutagenesi, altri test convenzionali, test non convenzionali) dovrebbe essere decisa caso per caso (11, 12). Se necessario, il test di mutazioni geniche batteriche, molto sensibile e rapido, può essere usato in caso di impurezze derivanti dal processo di produzione.

Agenti antiblastici

Sia pure con un approccio flessibile caso per caso, e senza porre ostacoli all'iter procedurale, l'approccio sinora seguito dall'Istituto è stato quello di raccomandare test di mutagenesi (un test *in vitro* di mutazioni geniche in cellule batteriche ed un test *in vitro* di aberrazioni cromosomiche in cellule di mammifero) anche per prodotti antiblastici.

Come riportato nelle Tabella 5 e 6 diversi agenti antiblastici risultati dotati, in vario grado, di proprietà genotossiche, cancerogene o embriotossiche.

Tabella 5. Evidenze tossicologiche degli antiblastici

-
- 1) Agenti antiblastici possono causare cancro in animali sperimentali; alcuni di essi possono causarlo anche nell'uomo (IARC, 26, 1981).
 - 2) Molti di essi sono dotati di attività genotossica a livello genico e/o cromosomico (IARC, 26, 1981) in diversi sistemi sperimentali *in vitro* o *in vivo*.
 - 3) Alcuni di essi provocano effetti embriotossici o teratogeni in animali da laboratori (IARC, 26, 1981).
 - 4) Pazienti trattati con antiblastici hanno urine mutagene ed aumentate frequenze di aberrazioni cromosomiche e/o scambi tra cromatidi fratelli (SCE) in linfociti periferici.
 - 5) Personale infermieristico manipolante antiblastici può avere urine mutagene e/o alterazioni citogenetiche (scambi tra cromatidi fratelli e/o aberrazioni cromosomiche) in linfociti periferici.
-

Tabella 6. Aggiornamento della “Lista Cancerogeni: chemioterapici antitumorali”*

Sostanza	Categoria di cancerogenesi
Bleomicina	3b
Busulfan	1
Carboplatino	3b
Ciclofosfamide	1
Cisplatino	1
Clorambucil	1
Dacarbazina	3b
Daunorubicina	3b
Doxorubicina	2
Epirubicina	4a
Etoposide	2
5-Fluorouracile	3b
Ifosfamide	2
Lomustina (CCNU)	2
Lonidamina	4a
Mercaptopurina	3a
Methotrexate	4a
Mitomicina	3b
Procarbazine	2
Vincristina	4a

* Allocations approvate in data 13 febbraio 1997 e 8 maggio 1997 dalla Commissione Consultiva Tossicologica Nazionale (CCTN): *Rapporto dell'attività svolta dalla CCTN nel 1997*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 1997. (Serie Rapporti Interni 97/4). Per la definizione delle categorie riferimento vedi Serie Relazioni 96/2.

Conoscere il potenziale cancerogeno, genotossico ed embriotossico di tali agenti è importante nella valutazione del rapporto tra rischio e beneficio da parte dell'oncologo.

L'esposizione (Tabella 7) a tali agenti può riguardare gli operai nelle industrie produttrici, il personale infermieristico negli ospedali ed il personale di laboratori di ricerca.

Tabella 7. Casi di possibile esposizione umana ad agenti citostatici

1) Pazienti affetti da cancro
2) Operai di industrie produttrici di citostatici*
3) Personale infermieristico di ospedali oncologici*
4) Personale di laboratori o Istituti di ricerca*

* Nei casi 2), 3) e 4) è doveroso ridurre al minimo l'esposizione

Bibliografia

1. Vainio H, et al. (Ed.). *Mechanisms of carcinogenesis in risk identification*. IARC Sci. Publ. 116, Lyon: International Agency for Research on Cancer; 1992.
2. Loeb KR, Loeb LA. Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis* 2000;21:379-85.

3. Aardema MJ, Albertini S, Arni P, Henderson LM, Kirsch-Volders M, Mackay JM, Sarrif AM, Stringer DA, Taalman RD. Aneuploidy: a report of an ECETOC task force. *Mutat Res* 1998;410(1):3-79.
4. Gibson et al. *Mutat. Res.*, 343, 7-24, 1995.
5. Carere A, Mohn GR, Parry JM, Sors AI, Nolan CV. *Methods and testing strategies for evaluating the genotoxic properties of chemicals*. Report EUR 15945 EN, 1995
6. Food and Drug Administration. *Toxicological principles for the safety assessment of direct food additives and color additives used in food*. Washington DC: FDA; 1982.
7. CEC (1989) (Doc. CB-55-89-843-EN-C).
8. Müller L, et al. ICH-Harmonised guidance on genotoxicity testing of pharmaceuticals: evolution, reasoning and impact. *Mutation Research* 1999;436:195-225.
9. Ashby J, Tennant RW. Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the US NTP. *Mutat Res* 1991; 257:229-308.
10. Organisation for Economic Co-operation and Development. Ninth Addendum to the OECD Guidelines for the testing of chemicals. Paris: OECD; 1998.
11. Guidelines on the preclinical safety testing of medicinal products derived from biotechnology – Commission of the European Communities notes to the applicants for premarketing authorizations. TIBTECH 1989; 7: 226-9.
12. Gocke E, et al. Genotoxicity testing of biotechnology-derived products. Report of a GUM task force. *Mutat Res* 1999;436:137-56.

LO SVILUPPO DI NUOVI FARMACI ANTI-TUMORALI: ASPETTI SCIENTIFICI E NORMATIVI

Ugo Testa

Laboratorio di Ematologia ed Oncologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Necessità di sviluppo di nuovi farmaci anti-tumorali

In molte aree del mondo i tumori sono divenuti la seconda causa di mortalità dopo le malattie cardiovascolari. Ma proiezioni future basate su varie considerazioni spingono a ritenere che rapidamente le neoplasie diverranno la prima causa di mortalità. Esistono due motivi principali che determinano questa situazione particolare: a) il cancro è una malattia caratterizzata dall'insorgenza di mutazioni multiple che progressivamente conducono allo sviluppo del fenotipo tumorale e questi eventi divengono ovviamente più probabili nelle popolazioni attuali che hanno prospettive di vita prolungate e che quindi presentano, rispetto al passato, un incremento delle fasce di persone anziane; b) l'incidenza e la mortalità delle malattie cardio-vascolari è in diminuzione in ragione di consistenti progressi sulla comprensione dei meccanismi di genesi di queste malattie e di spettacolari progressi nella terapia medica della fase acuta degli accidenti vascolari. Al contrario il trattamento dei tumori, ed in particolare le terapie mediche oncologiche presentano dei limiti maggiori. La chirurgia e la radioterapia sono efficaci in termini di guarigione dalla malattia solo nei casi in cui la malattia non si presenta in uno stadio avanzato di diffusione. Nella malattia in stadio avanzato queste terapie risultano solo di limitata efficacia.

I trattamenti chemioterapici attualmente disponibili sono basati su una preferenziale suscettibilità delle cellule tumorali rispetto a quelle normali a questi farmaci citotossici. Tuttavia, i chemioterapici manifestano una notevole tossicità anche a livello di numerosi tessuti normali e date le dosi alle quali questi farmaci devono essere somministrati ne risulta che la chemioterapia anti-tumorale nella pratica clinica è spesso associata ad una notevole tossicità. Tuttavia, i limiti maggiori della chemioterapia risultano dal fatto che essa solo di rado risulta essere curativa in maniera radicale: infatti nelle maggior parte delle neoplasie epiteliali in stadio avanzato (ad esempio il carcinoma della mammella, prostata, colon-retto, polmone, stomaco) la somministrazione di vari tipi di chemioterapici risultano in un effetto terapeutico solo lenitivo. Solo in alcuni casi particolari, quali il carcinoma del testicolo, il linfoma di Hodgkin e la leucemia linfoblastica del bambino, le terapie chemioterapiche producono effetti terapeutici guaritivi.

Queste considerazioni ci fanno quindi comprendere che lo sviluppo di nuove terapie anti-tumorali è assolutamente necessario. I recenti progressi della ricerca bio-medica sono indirizzati verso una comprensione dei meccanismi molecolari che sono alla base dello sviluppo delle neoplasie e verso uno studio su solide basi biochimiche rivolto all'analisi del processo di sviluppo delle neoplasie maligne (ad esempio lo studio dei meccanismi di metastasizzazione delle cellule tumorali). Gli studi relativi all'analisi delle alterazioni genetiche acquisite che si sviluppano nelle cellule tumorali ha portato all'identificazione in molte neoplasie di anomalie genetiche (ad esempio la formazione di proteine di fusione in seguito ad una doppia traslocazione cromosomica) di sicuro significato patogenetico. In tal senso è interessante segnalare che in circa il 60% delle leucemie acute sono state rinvenute anomalie genetiche acquisite specifiche per un sottotipo di leucemia e di sicuro significato patogenetico. D'altro

canto lo sviluppo delle conoscenze sui meccanismi di sviluppo delle neoplasie ha portato all'identificazione di alcuni processi biologici che svolgono un ruolo chiave nella progressione di queste malattie e questo è il caso ad esempio relativo all'identificazione dei fattori che promuovono la neoangiogenesi tumorale o dei fattori che influenzano il potenziale metastatico delle cellule tumorali.

Nello sviluppo di nuovi chemioterapici anti-tumorali bisogna tenere presenti alcuni criteri ai quali dovrebbero uniformarsi questi farmaci di nuova generazione: 1) specificità d'azione con riconoscimento selettivo di bersagli molecolari presenti solo nelle cellule tumorali ma non in quelle normali; 2) aumento dell'efficacia e della durata dell'azione anti-tumorale; 3) riduzione degli effetti tossici secondari; 4) capacità di prevenire lo sviluppo della resistenza ai farmaci; 5) possibilità di combinarsi ad altre terapie efficaci, nell'ottica di studi di eradicazione della malattia minima residua. Le aspettative attuali suggeriscono che utilizzando le conoscenze di base derivate dallo studio delle anomalie molecolari dei tumori sia possibile sviluppare dei farmaci con potenziata attività anti-tumorale, associata a ridotta tossicità. Questa prospettiva di sviluppo può essere realisticamente considerata ed estrapolata anche dall'analisi storica di sviluppo di altre categorie di farmaci, quali, ad esempio, i farmaci anti-ipertensivi, dove si è passati dallo sviluppo di farmaci ad ampio meccanismo d'azione a farmaci con selettività d'azione e con prospettive terapeutiche più mirate, con riduzione degli effetti collaterali.

Più in generale si può affermare che lo sviluppo delle conoscenze di base sui meccanismi delle malattie ha rappresentato spesso storicamente un fattore di progresso importante anche verso lo sviluppo di un approccio farmacologico efficace alla cura di queste malattie. Tuttavia, lo sviluppo di un trattamento efficace non dipende solo dal progredire delle conoscenze di base sulle malattie, ma anche da un efficiente piano di sviluppo clinico dei principi farmacologici attivi sviluppati in seguito al progredire di queste conoscenze di base. In tal senso, bisogna tenere presente che lo sviluppo di nuovi farmaci anti-tumorali richiede oltre agli sforzi intellettuali degli studi di base rivolti all'identificazione del nuovo potenziale farmaco, un notevole impegno di tempo e di risorse finanziarie necessario al piano di sviluppo che copre le varie fasi del processo di sviluppo dalla scoperta del principio attivo fino all'approvazione dello stesso sotto forma di farmaco nella terapia oncologica. Numerosi problemi possono ostacolare il piano di sviluppo del nuovo farmaco, quali, ad esempio, l'insorgenza di una eccessiva tossicità, l'assenza di una via di somministrazione efficiente per un utilizzo clinico dello stesso, l'insorgenza di fenomeni di tossicità inattesi che si manifestano a distanza di tempo dalla somministrazione, una formulazione chimica inappropriata del farmaco o un ritardo nell'esecuzione degli studi clinici pilota.

I tempi richiesti per l'approvazione per l'uso clinico di nuovi farmaci anti-tumorali è stato molto variabile negli ultimi dieci anni per i vari tipi di farmaci, ma in ogni caso attualmente ogni tipo di sforzo deve essere realizzato per ridurre i tempi necessari per l'esecuzione della sperimentazione pre-clinica e clinica. Lo sviluppo di nuovi farmaci è un processo difficile e laborioso in tutti i settori della medicina, ma lo sviluppo di nuovi farmaci anti-tumorali è particolarmente urgente in quanto l'assenza di farmaci efficienti viene pagato in termini di elevata mortalità.

Nello stabilire un piano di sviluppo di un nuovo farmaco anti-tumorale gli sperimentatori si devono porre due quesiti essenziali:

Quale sistema di screening verrà utilizzato per procedere allo studio di un composto di potenziale interesse?

Quale tipo di composti verranno studiati in questo tipo di sistema?

La risposta a questi due quesiti di base determinerà quanto l'approccio di sviluppo del nuovo farmaco sia basato su un approccio prettamente empirico o viceversa su un solido approccio scientifico nel quale si punta su un bersaglio molecolare specifico (ad esempio un oncogene). In

effetti la storia dello sviluppo dei farmaci anti-tumorali riflette largamente il passaggio da una fase empirica basata sull'analisi di una batteria di composti diversi sulla crescita di cellule tumorali leucemiche a rapida proliferazione ad una fase odierna basata su un approccio molto più razionale nel quale viene valutata l'attività anti-tumorale di principi naturali o sintetizzati *in vitro* contro linee di cellule tumorali ben caratterizzate o contro bersagli molecolari che o sono marcatori specifici delle neoplasie o, oltre ad essere dei marcatori della neoplasia, svolgono un ruolo patogenetico nello sviluppo della neoplasia stessa.

L'analisi storica dello sviluppo dei vari agenti chemioterapici anti-tumorali ha mostrato l'utilizzo di vari composti che si caratterizzano in genere per la loro azione citotossica sulle cellule tumorali. La maggiore difficoltà che è stata riscontrata nel processo di sviluppo di questi farmaci è consistita nella difficoltà ed in molti casi nell'impossibilità di potere rinvenire dei modelli pre-clinici in qualche modo realmente predittivi dello spettro d'azione anti-tumorale di questi farmaci stessi: ad esempio gli studi di farmacologia pre-clinica non avevano consentito di valutare la potenziale efficacia del cisplatino nel trattamento del carcinoma del testicolo, né tanto meno di valutare la sua inefficacia nel trattamento di altri tumori.

Lo sviluppo delle conoscenze sulla biologia dei tumori ci porta ora a cercare dei bersagli mirati della terapia anti-tumorale e le aree attuali di sviluppo hanno focalizzato l'attenzione verso farmaci attivi a livello di alcuni costituenti implicati nella trasduzione del segnale, nel controllo del ciclo cellulare, dell'apoptosi, della biologia dei telomeri e dell'angiogenesi.

Modelli animali utilizzati nello sviluppo dei farmaci anti-tumorali

Il processo di sviluppo di un nuovo farmaco anti-tumorale può iniziare partendo da un approccio di natura prettamente empirica o da un progetto di sviluppo razionale basato sulla conoscenza precisa della struttura e del meccanismo d'azione del potenziale farmaco anti-tumorale. In ogni caso, tuttavia, uno stadio necessario ed indispensabile nel processo di sviluppo del nuovo farmaco è rappresentato dalla disponibilità di un modello animale adeguato per potere valutare non solo gli effetti tossici ma anche quelli farmacologici del farmaco in via di sviluppo.

Infatti, i modelli animali vengono utilizzati sempre di più, non solo per analizzare i vari aspetti tossicologici, il metabolismo del farmaco o la distribuzione tissutale e compartimentale dello stesso, ma anche per servire come guida allo sviluppo di studi clinici di fase I che prevedono la somministrazione di dosi crescenti del farmaco e/o come modelli in grado di fornire un microambiente che sia in qualche modo predittivo della situazione clinica osservata nell'uomo.

Nel 1955 era stato deciso di testare la maggior parte dei farmaci anti-tumorali utilizzando come modelli iniziali di screening le due linee cellulari murine P388 e L1210. Questo tipo di modello cellulare presentava, tuttavia, delle limitazioni intrinseche importanti, derivanti dal fatto che si tratta di cellule leucemiche in rapida crescita e che quindi lo screening dei nuovi farmaci anti-tumorali realizzato utilizzando questo tipo di cellule ha portato inevitabilmente a selezionare preferenzialmente quei farmaci attivi contro tumori che presentano una quota elevata di cellule in rapida proliferazione. A conferma di quanto su evidenziato, è stato poi dimostrato che colture di cellule tumorali in fase di plateau sono meno sensibili ad agenti chemioterapici anti-tumorali ciclo-specifici, mentre altre categorie di farmaci anti-tumorali, come gli agenti alchilanti, risultano essere attivi contro cellule tumorali quiescenti. Pertanto è risultato chiaro che lo sviluppo di farmaci attivi contro la maggior parte dei tumori solidi che si

sviluppano in soggetti adulti richiede un approccio differente a livello di sistemi cellulari da utilizzare per lo screening iniziale del farmaco.

Lo sviluppo di nuovi tipi di linee cellulari tumorali murine ha consentito di realizzare dei sistemi di screening più razionali basati sull'impiego di una batteria di linee cellulari tumorali di differente origine e con differenti caratteristiche di crescita. Inoltre, alcuni di questi modelli tumorali includevano anche dei tipi di cellule tumorali trapiantabili in topi normali, in qualche modo capaci di riprodurre nell'animale da esperimento uno sviluppo del tumore simile a quello osservato nell'uomo. E ciò è stato reso possibile grazie alla disponibilità di topi atimici ("nudi") che consentono d'inoculare *in vivo* e di fare sviluppare molti tipi di cellule tumorali.

Attualmente la procedura di screening di nuovi farmaci anti-tumorali implica uno screening a due stadi, nel quale lo stadio I è rappresentato dall'analisi dello spettro d'azione del nuovo farmaco su una batteria di linee cellule tumorali e lo stadio II è rappresentato dallo studio dell'azione anti-tumorale contro un ampio pannello di cellule di tumori solidi, sia *in vitro* che *in vivo* dopo trapianto in topi immunodeficienti. Gli agenti che in questo screening iniziale presentano o un ampio spettro di attività anti-tumorale o una spiccata attività anti-tumorale contro un determinato tipo di tumore ricevono una priorità nel successivo piano di sviluppo verso gli studi clinici di fase I.

Una volta che è stato identificato con chiarezza un nuovo farmaco ad azione anti-tumorale il ricorso ai modelli animali non si limita solo allo studio dell'azione anti-tumorale, ma anche al settore della tossicologia pre-clinica. Questi studi sono particolarmente importanti nell'ambito del piano di sviluppo del farmaco in quanto consentono innanzitutto di verificare se lo spettro di effetti tossici è compatibile con un potenziale piano di sviluppo pre-clinico e poi di determinare sia una dose non tossica per iniziare gli studi di fase I nell'uomo, sia per predire fenomeni di tossicità acuta e cronica in modelli pre-clinici predittivi.

Valutazione della risposta anti-tumorale in modelli animali

Una serie di metodi differenti possono essere utilizzati nell'ottica di valutare gli effetti di un farmaco anti-tumorale sulle cellule tumorali in modelli animali.

Saggio clonogenetico di citotossicità

Questo metodo è stato ampiamente utilizzato come sistema per valutare la frazione di cellule tumorali che rimane proliferante dopo esposizione ad un farmaco anti-tumorale. Questo saggio è basato sull'assunzione che il potenziale proliferativo o clonogenetico di un tumore rifletta la tumorigenicità dei progenitori tumorali *in vivo*. Pertanto il numero di colonie osservato in un saggio del genere riflette il numero di cellule vitali dopo trattamento con l'agente chemioterapico anti-tumorale. I valori osservati in test di questo tipo consentono una valutazione dell'efficacia del trattamento con il farmaco in termini di induzione di morte cellulare.

Una variante di questo test è stata proposta alcuni anni or sono onde valutare la sensibilità *in vitro* delle cellule tumorali a singoli agenti chemioterapici o a cocktails di agenti anti-tumorali, nel tentativo di realizzare un equivalente di quello che è l'antibiogramma per la valutazione della sensibilità di un agente microbico nei confronti di agenti anti-microbici.

Saggio della TD50 (saggio della diluizione a punto finale)

La TD50 viene definita come la dose di cellule tumorali in grado di produrre crescita tumorale *in vivo* nel 50% degli animali inoculati o a livello sistemico o a livello loco-regionale. Il test praticamente rappresenta una misura del numero di cellule necessarie a produrre tumori a partire da inoculi effettuati *in vivo*. Il saggio è basato su un principio analogo a quello utilizzato nel test clonogenetico: una preparazione cellulare viene preparata a partire dall'animale di controllo e dall'animale trattato, con varie diluizioni sequenziali del numero di cellule; la sospensione cellulare viene quindi inoculata in gruppi di animali di controllo e la percentuale di attecchimento del tumore rispetto al numero di cellule inoculate viene determinata per ciascun tipo di trattamento e paragonata ai valori osservati negli animali non trattati onde determinare la TD50.

Test del ritardo della crescita tumorale

Il trattamento con agenti citotossici può produrre un ritardo della crescita tumorale o, idealmente, un blocco della crescita del tumore. Questi effetti di ritardo sulla crescita del tumore possono essere misurati con il test del ritardo della crescita del tumore. Il ritardo della crescita del tumore viene definito come il tempo richiesto per il tumore trattato per raggiungere una massa o un peso determinato meno il tempo richiesto dal tumore non trattato per raggiungere la stessa massa tumorale. A differenza del test di sopravvivenza questo test non richiede come punto terminale di osservazione la morte degli animali, o di una parte degli animali trattati.

Test del tempo di sopravvivenza

Il test di sopravvivenza riveste ovviamente un ruolo cruciale negli studi relativi allo sviluppo di un farmaco anti-tumorale.

Il motivo è abbastanza ovvio ed è essenzialmente dovuto al fatto che l'esito di questo test rappresenta la risultante dell'interazione fra vari fattori d'importanza fondamentale, rappresentati dall'interazione fra il tipo di tumore, la sua crescita e l'ospite. Inoltre, dato che l'esito del test dipende sia dall'aggressività del tumore che dalla tossicità del farmaco che viene somministrato, ne deriva che dai risultati di questi test possano essere derivate delle indicazioni relative all'indice terapeutico.

In un siffatto test l'efficacia terapeutica si estrinseca sotto forma di una aumentata sopravvivenza, che in genere aumenta con l'aumentare della dose somministrata: ciò è dovuto al fatto che il numero di cellule tumorali uccise dal chemioterapico aumenta in genere in maniera logaritmica all'aumentare della dose del farmaco. Il tempo di sopravvivenza aumenta fino a raggiungere il massimo ad una dose determinata del farmaco (dose ottimale): ad un ulteriore aumento della dose del farmaco, viene riscontrato un decremento dei tempi di sopravvivenza, un fenomeno dovuto al sopravvalere degli effetti tossici rispetto a quelli benefici del trattamento. Il massimo punto di sopravvivenza è definito come punto ottimale e consente di definire la dose ottimale del farmaco. Più alto è il valore del punto ottimale, più elevate sono le possibilità di efficacia terapeutica.

Questo tipo di studio consente anche di determinare un altro importante parametro che è rappresentato dall'indice terapeutico, che può essere definito come il rapporto fra la dose ottimale e la dose che porta ad un significativo aumento nel tempo di sopravvivenza.

Studi di tossicologia generale

Nel 1979 un gruppo di esperti americani ha passato in rassegna i dati esistenti all'epoca in relazione agli studi di tossicologia sui farmaci anti-tumorali ed è giunto alla conclusione che gli studi di tossicità effettuati nel topo erano in larga misura ampiamente predittivi degli studi effettuati in animali da esperimento di grande taglia, quali il cane e la scimmia. Nonostante queste osservazioni, gli studi di tossicologia in animali di grande taglia e filogeneticamente più vicini all'uomo rimangono necessari, ma vengono condotti con uno spirito tendente a ridurre i costi in termini di risorse finanziarie e di animali da sacrificare.

Attualmente si procede alla determinazione della dose letale per il 10% degli animali trattati (LD_{10}) nell'ambito del modello dei roditori (topo e/o ratto). La LD_{10} nel topo viene testata nel cane estrapolando una dose equivalente calcolata in base ad una equazione di conversione.

Ovviamente questi parametri di tossicità risultano essere fortemente influenzati dalla via di somministrazione oltre che dalla dose di farmaco somministrata.

Gli studi clinici di fase I vengono in genere iniziati ad una dose che corrisponde ad 1/10 della LD_{10} osservata nel topo. Tuttavia, se gli studi di tossicità nel cane hanno mostrato una tossicità più spiccata di quella osservata nel topo si tiene conto di quest'ultimi dati per quanto riguarda la determinazione delle dosi iniziali da utilizzare per l'inizio degli studi di fase I. In genere, in questo caso si può scegliere come dose iniziale una dose corrispondente ad un terzo della dose minima tossica nel cane. Questo tipo di approccio ha consentito finora di potere intraprendere studi clinici di fase I con dosi iniziali di farmaco che non presentano effetti tossici spiccati e che limitano al tempo stesso i costi ed i tempi necessari per la realizzazione degli studi di tossicità.

Recentemente gli studi di tossicità negli animali da esperimento sono stati integrati a studi di farmacodinamica, con lo scopo di identificare dei criteri che consentano di guidare la progressione di dosaggio negli studi clinici di fase I. La base razionale per questo tipo di approccio si basa sulla semplice assunzione che simili effetti tossici siano osservati sia nel topo che nell'uomo a dosi paragonabili di farmaco. Dal momento che sia la tossicità che l'azione anti-tumorale di un farmaco sono dipendenti dal livello di farmaco attivo che agisce *in vivo*, l'area sotto la curva farmacocinetica (AUC) è stata proposta come parametro da tenere presente in questo tipo di studio. In pratica il valore di AUC viene misurato nel topo a livello di un dosaggio del farmaco che corrisponde alla dose LD_{10} . Questo valore viene paragonato al valore di AUC osservato nei pazienti arruolati in studi di fase I trattati alla dose iniziale, che in genere corrisponde a 1/10 della dose che nel topo corrisponde a LD_{10} . Se il valore di AUC osservato nell'uomo è significativamente inferiore al corrispondente valore di AUC osservato nel topo a LD_{10} , la progressione di dosaggio può essere considerevolmente accelerata oltre gli incrementi standard previsti in accordo alla base incrementale secondo Fibonacci. In pratica, quindi, la rapidità di progressione dei dosaggi di un determinato farmaco dipende in larga misura dal suo indice terapeutico.

Studi di farmacologia

Gli studi di farmacologia dei farmaci anti-tumorali ricalcano in larga misura gli studi di farmacologia effettuati per altri tipi di farmaci.

Un primo fattore essenziale affinché il farmaco anti-tumorale possa esplicare la sua azione dipende dalla possibilità di potere entrare in contatto con le cellule tumorali. Ciò dipende in larga misura dalla presenza di un adeguato flusso ematico a livello del distretto tumorale. Tuttavia, questo non è il solo fattore ad influenzare la possibile azione anti-tumorale del

farmaco, in quanto anche altri fattori entrano in gioco come ad esempio il livello di legame del farmaco a proteine plasmatiche e, per i farmaci somministrati per via orale, l'assorbimento intestinale ed un suo eventuale metabolismo iniziale a livello epatico.

Alcuni farmaci anti-tumorali possono richiedere un'attivazione metabolica prima di essere in grado di esercitare azione citotossica anti-tumorale. Questo processo di attivazione implica in genere dei processi chimici o enzimatici da parte dei tessuti sani o dei tessuti tumorali o di entrambi, che devono essere caratterizzati in dettaglio.

In questo caso bisogna determinare le variabili che influenzano la conversione del farmaco nella sua forma attiva da un punto di vista citotossico: a) la velocità di trasporto del farmaco a livello della membrana cellulare; b) la quantità e l'affinità degli enzimi presenti nella cellula e necessari per l'attivazione del farmaco; c) la presenza di una eventuale competizione fra il farmaco ed eventuali substrati naturali degli enzimi attivanti; d) la velocità di degradazione del farmaco attivato da parte di enzimi catabolici.

Una fase importante dello studio farmacologico dei nuovi farmaci anti-tumorali consiste nella determinazione dei bersagli biochimici di questi farmaci. Infatti la tendenza attuale è quella di classificare i farmaci anti-tumorali non solo in base al loro meccanismo d'azione, ma, soprattutto, in base ai bersagli potenziali dell'azione farmacologica. In base a quest'ultima classificazione vengono riconosciute cinque categorie di farmaci anti-tumorali che possono essere così riassunte: 1) farmaci attivi su acidi nucleici; 2) farmaci attivi su enzimi; 3) farmaci attivi su membrane cellulari; 4) farmaci attivi su microtubuli; 5) farmaci attivi su recettori ormonali o di fattori di crescita.

Nello studio della farmacologia di un nuovo agente anti-tumorale bisogna anche considerare aspetti relativi alla possibile presenza di meccanismi di riparo da parte delle cellule tumorali e che consentono a quest'ultime di vanificare almeno in parte l'azione citotossica esercitata dai farmaci stessi. La conseguenza è che, ove esistano questi meccanismi di riparo, l'effetto citotossico del farmaco anti-tumorale è la risultante dell'azione citotossica dello stesso da un lato e dei meccanismi di riparo, in alcuni casi amplificati, esistenti a livello delle cellule tumorali.

Gli studi di farmacocinetica dei farmaci anti-tumorali vengono effettuati in pieno accordo con gli studi di siffatto tipo comunemente effettuati per qualsiasi altro tipo di farmaco. Pertanto la valutazione dei parametri relativi all'assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione del farmaco viene effettuata in base a metodiche standardizzate.

Gli studi di farmacodinamica rivestono ovviamente un ruolo importante nell'ambito dello sviluppo di un nuovo farmaco anti-tumorale. In un senso generale gli studi di farmacodinamica sono tutto quell'insieme di studi che hanno a che vedere con l'analisi della dose- risposta. Quindi ogni test di laboratorio che misura gli effetti di varie dosi di un farmaco indirizza verso una questione di farmacodinamica. Esempi in tal senso sono forniti dagli studi nei quali vengono valutati gli effetti indotti dall'esposizione di cellule tumorali *in vitro* a varie dosi di un nuovo farmaco anti-tumorale o studi clinici di fase I che sono indirizzati a determinare la massima dose tollerata o a valutare l'esistenza di tossicità maggiori che limitano il progredire nel dosaggio del farmaco.

Per ogni tipo di farmaco può e deve essere determinata la dose in grado di esplicare l'effetto farmacologico massimo, così come la dose mediana, cioè la dose richiesta per esplicare la metà dell'effetto farmacologico massimo.

La relazione fra dose del farmaco ed effetto farmacologico mostra un andamento che è diverso a seconda del tipo di farmaco e che in genere è di tipo lineare per agenti farmacologici che non agiscono in una fase specifica del ciclo cellulare, mentre risulta essere più complessa per agenti farmacologici che non agiscono selettivamente in una sola fase del ciclo cellulare.

In questo contesto, bisogna anche tenere presente che gli effetti farmacologici di alcuni agenti anti-tumorali dipendono sia dalla concentrazione del farmaco che dal tempo di esposizione a quella determinata concentrazione del farmaco stesso. In particolare, per alcuni farmaci l'effetto farmacologico è una funzione del prodotto della concentrazione del farmaco e del tempo di esposizione, un parametro analogo all'AUC. Tuttavia, questo parametro rappresenta spesso una mera e semplice approssimazione, come mostrano gli studi effettuati sugli antimetaboliti e gli agenti anti-tumorali fase-specifici, dove sono state rinvenute relazioni matematiche molto complesse che spiegano la relazione esistente fra dose del farmaco, tempo di esposizione ed effetti farmacologici.

La maggior parte degli studi farmacodinamici viene effettuata con lo scopo di valutare la relazione esistente fra AUC e gli effetti tossici.

Nella situazione clinica gli effetti del trattamento dipendono sia dalla farmacocinetica che dalla farmacodinamica. Ad esempio, un paziente può manifestare una tossicità inattesa ad un determinato dosaggio del farmaco per due ragioni differenti: a) la farmacocinetica del farmaco in questo paziente è differente da quella osservata negli altri pazienti in quanto la clearance del farmaco risulta essere diminuita, determinando una esposizione al farmaco maggiore di quella attesa; b) il paziente può essere più sensibile a quella dose del farmaco per motivi che possono dipendere da non meglio definita sensibilità individuale, da trattamenti precedenti, dallo stato nutrizionale. Nel caso del primo paziente una diminuzione del dosaggio non comporterà una diminuzione degli effetti farmacologici in quanto verrà raggiunta una situazione di esposizione media al farmaco paragonabile a quella osservata nel paziente di riferimento con farmacocinetica normale; nel secondo caso un abbassamento del dosaggio sarà associato ad una diminuita efficacia farmacologica, in quanto si osserverà una diminuzione dell'esposizione media al farmaco.

Sulla scorta di queste osservazioni si tende oggi a cercare di ottimizzare la chemioterapia anti-tumorale individualizzando la dose in base alla misura dei livelli plasmatici o tissutali della concentrazione del farmaco.

Studi clinici di fase I

Lo scopo principale di uno studio clinico di fase I consiste nel determinare la dose ottimale che deve essere poi utilizzata in uno studio di fase II. Di solito pazienti con tumori in stadio avanzato vengono arruolati in questo tipo di studi; tuttavia, è importante che vengano selezionati pazienti che abbiano conservato una normale funzionalità d'organo, in particolare per quanto riguarda l'emuntorio renale ed il fegato.

Esistono differenti tipi di studi di fase I. Il tipo più comune è rappresentato dallo studio di fase I di un farmaco citotossico. Questi studi vengono di solito iniziati con una dose di farmaco che non è attesa produrre effetti tossici importanti in nessuno dei pazienti trattati. Di solito in questi studi viene utilizzata come dose iniziale una dose che corrisponde ad un decimo della dose LD₁₀, come da determinazioni effettuate nelle specie animali che hanno manifestato maggiore sensibilità agli effetti tossici del farmaco. Se non vengono osservati effetti tossici a questa dose iniziale è possibile passare a dosi successive secondo un piano prestabilito.

Il passaggio ad una dose più alta di farmaco è consentito solo se è trascorso un lasso di tempo sufficiente per la valutazione degli effetti tossici osservati nel gruppo di pazienti trattati con la dose più bassa del farmaco. In genere gruppi di 3-6 pazienti vengono trattati a ciascun livello di dosaggio del farmaco. Di solito se non vengono osservati fenomeni di tossicità dose-limitante, la dose viene aumentata secondo lo schema previsto nel gruppo successivo di pazienti. Se l'incidenza di fenomeni di tossicità dose-limitante corrisponde ad 1/3 dei pazienti

trattati, viene di solito richiesto il trattamento di altri tre pazienti a quel dosaggio del farmaco. Se non vengono osservati fra questi tre pazienti additivi casi di tossicità dose-limitante, allora è autorizzato il passaggio al gruppo di trattamento a dosi maggiori. In caso contrario, la progressione di dosaggio viene terminata in quanto è stata raggiunta una dose del farmaco che produce effetti tossici maggiori.

I livelli del farmaco nei vari gruppi di pazienti vengono determinati secondo un modello di progressione in base ad una serie di Fibonacci modificata. In tale schema le dosi di farmaco vengono incrementate secondo quanto segue: il secondo livello di dosaggio corrisponde al doppio del dosaggio iniziale; il terzo livello è 67% più grande del secondo; il quarto livello è 50% più grande del terzo; il quinto è 40% più grande del quarto.

Non esiste una base scientifica rigorosa per adottare questo approccio; tuttavia una solida e consistente esperienza clinico-farmacologica ha mostrato che si tratta di un approccio che risponde sia ai criteri della sicurezza che dell'efficacia. In alcuni casi viene richiesto di esplorare molti livelli del farmaco prima che possa essere raggiunta e determinata la dose massima tollerata.

Alcuni studi clinici di fase I rappresentano in effetti degli studi pilota per studi di fase III, in quanto vengono esplorati gli effetti da 1 a 3 dosi di una combinazione di due o più farmaci. Bisogna tenere presente che questi studi differiscono da studi propriamente detti di fase I nei quali vengono esplorati gli effetti di un farmaco non ancora somministrato ad esseri umani.

Gli studi di fase IB rappresentano una variante degli studi clinici di fase I classici. Questa variante viene applicata ad una particolare categoria di farmaci anti-tumorali, cioè ad agenti biologici, quali ad esempio citochine, dei quali si vogliono valutare sia gli effetti tossici che quelli immunologici. Questa variante di studi di fase I è particolarmente complessa ed in genere presenta dei limiti intrinseci nella sua impostazione: a) è difficile prevedere se in studi di questo tipo gruppi di tre-sei pazienti siano sufficienti per ciascun gruppo di dosaggio per valutare sia gli effetti tossici che quelli immunologici infatti, gli effetti immunologici presentano di solito una grande variabilità interindividuale e l'errore nella valutazione dei saggi immunologici è spesso molto ampio; b) spesso non esiste alcun criterio che indichi quale effetto immunologico dell'agente farmacologico sia fondamentale per la sua azione anti-tumorale. Alla luce di queste considerazioni è pertanto evidente che questo tipo di studio possa fornire solo di rado delle indicazioni realmente utili al fine di determinare le dosi di farmaco da utilizzare in studi clinici successivi con quell'agente biologico.

Esistono ovviamente anche degli aspetti etici relativi agli studi clinici di fase I che necessitano un approccio appropriato. Un elemento costante relativo agli studi di fase I con farmaci anti-tumorali è che in tali studi vengono inclusi soggetti con neoplasie in stadio avanzato e con malattia non più curabile con le terapie convenzionali. L'accesso a tali studi è condizionato alla accettazione e compilazione da parte dei pazienti arruolati nello studio di un modulo di consenso informato che deve contenere delle informazioni facilmente intelleggibili da parte del paziente relative allo studio clinico, ai rischi eventuali che esso comporta ed alle aspettative terapeutiche.

L'aspetto etico fondamentale del quale si deve tenere conto nell'ambito di uno studio di fase I è quello relativo al rapporto fra il potenziale beneficio clinico e la tossicità. Studi di fase I sviluppati con lo scopo di mantenersi a dosi inferiori alla soglia della tossicità attesa sono, contrariamente a quello che si può credere, poco etici in quanto in genere le dosi sub-tossiche di un farmaco citotossico anti-tumorale sono in genere delle dosi che non hanno effetti anti-tumorali significativi. Pertanto è evidente che nello sviluppo di uno studio di fase I si debba tenere conto di una progressione di dosaggi che preveda il passaggio alle dosi potenzialmente efficaci da un punto di vista terapeutico e potenzialmente tossiche. Anche se lo scopo degli studi di fase I non è quello di valutare gli effetti terapeutici del nuovo farmaco da studiare, questi

aspetti devono essere considerati attentamente onde raggiungere un giusto equilibrio fra le informazioni che devono acquisire gli sperimentatori clinici e le aspettative di un potenziale effetto terapeutico da parte dei pazienti.

Nuovi farmaci anti-tumorali in via di sviluppo

Farmaci attivi sull'angiogenesi

Nell'embrione i vasi sanguigni si formano attraverso due processi distinti che sono noti come vasculogenesi ed angiogenesi. La vasculogenesi implica la differenziazione de novo a partire dal mesoderma indifferenziato di cellule endoteliali, mentre l'angiogenesi implica la formazione di nuovi vasi a partire da vasi sanguigni pre-esistenti. La vasculogenesi avviene durante la vita embrionaria, mentre l'angiogenesi avviene durante il resto della vita.

La neovascolarizzazione è un processo importante in alcune condizioni patologiche, fra cui la crescita tumorale ed il processo di formazione delle metastasi. Pertanto è evidente che in queste condizioni cliniche una inibizione della neoangiogenesi potrebbe risultare di notevole ausilio terapeutico.

D'altro canto in clinica vengono osservate anche condizioni patologiche nelle quali si potrebbe trarre giovamento dall'uso di agenti che sono in grado di stimolare la neovascolarizzazione (vedi situazioni nelle quali si vuole favorire la formazione di un circolo collaterale, quali ad esempio le condizioni di ostruzione della circolazione arteriosa in seguito ad un fenomeno trombotico).

Gli agenti in grado di stimolare la neoangiogenesi sono rappresentati da due tipi differenti di fattori di crescita, il FGF ("fibroblast growth factor") ed il VEGF ("vascular endothelial growth factor"). Studi su vari modelli animali di ischemia hanno indicato un considerevole beneficio dopo somministrazione intralesionale o per via sistemica di questi fattori di crescita in varie situazioni d'ischemia tissutale. In seguito a queste osservazioni sugli animali da esperimento questi fattori di crescita sono stati introdotti in clinica nell'ambito di studi sperimentali. Tuttavia, gli studi clinici finora condotti in pazienti con ischemia del miocardio non hanno mostrato alcun beneficio clinico e rimane difficile per il momento comprendere le ragioni di queste significative discrepanze fra i risultati ottenuti nell'animale da esperimento e nell'uomo.

I fattori anti-angiogenetici rappresentano un'area di intensi studi nell'ambito dell'oncologia sperimentale con prospettive di applicazioni cliniche concrete. Sin dal 1971 è stato proposto che un'inibizione della neoangiogenesi potrebbe rappresentare un'importante strategia per il trattamento dei tumori solidi. Questa scelta si basa su una serie di osservazioni che hanno mostrato che le cellule di molti tumori hanno la capacità di stimolare fortemente la neoangiogenesi in ragione della produzione autocrina di fattori angiogenetici quali il VEGF. Pertanto è divenuto subito chiaro che se si vuole inibire questo processo bisogna disporre di farmaci in grado d'interferire con l'azione dei fattori angiogenetici o dei loro recettori.

Esperimenti condotti su vari modelli animali di crescita tumorale hanno chiaramente mostrato una potente azione anti-tumorale dei fattori anti-angiogenetici attraverso un blocco o del VEGF o dei suoi recettori.

Varie strategie sono state sviluppate per tentare lo sviluppo d'inibitori del VEGF utilizzabili da un punto di vista clinico.

Un approccio implica lo sviluppo di anticorpi "umanizzati" anti-VEGFR o anti-recettori del VEGF. Un anticorpo anti-VEGF umano ad alta affinità ha ricevuto molta attenzione ed è entrato nella fase di sperimentazione clinica. Questo anticorpo anti-VEGF è attualmente in corso di studio a livello di studi clinici di fase II per il trattamento del carcinoma del polmone non a

piccole cellule, somministrato in associazione con la chemioterapia standard e per il trattamento del colon e della mammella quale singolo agente. E' presto per una valutazione relativa all'efficacia di questo tipo di farmaco, tuttavia, è importante sottolineare in questa sede che il piano di sviluppo clinico di un siffatto farmaco somiglia per il tipo di problemi incontrati e per la strategia di sviluppo a quelli già sperimentati per farmaci a base di anticorpi monoclonali.

Diversa è la situazione per altri agenti che sono invece degli inibitori dei recettori dei recettori del VEGF. In tal senso particolarmente interessante è lo sviluppo degli studi relativi ad un nuovo farmaco anti-tumorale che agisce da inibitore dell'attività tirosin-chinasica del recettore II del VEGF (VEGFR2), un recettore che svolge un ruolo chiave nel mediare gli effetti di questo fattore di crescita sulla neoangiogenesi. Questi studi sono particolarmente interessanti anche perchè possono essere considerati paradigmatici per lo sviluppo di nuovi farmaci anti-tumorali con meccanismo d'azione simile. Studi preliminari hanno mostrato che questo farmaco, che è una molecola di basso peso molecolare, ha mostrato una potente azione anti-tumorale in vari modelli tumorali negli animali da esperimento. Sulla scorta di queste osservazioni, e di una scarsa tossicità in vari tipi di animali, sono iniziati gli studi clinici di fase I con un approccio sperimentale particolare. Infatti, a differenza di quanto di solito viene assunto e programmato per un farmaco anti-tumorale tradizionale ad azione preminentemente citotossica, in questo caso si è partiti da alcune assunzioni strategiche: a) il meccanismo d'azione del farmaco è preminentemente citostatico e non citotossico; b) la risposta obiettiva di riduzione rapida della massa tumorale non può essere considerata quale lo scopo primario del trattamento, bensì si deve prendere in considerazione il parametro del blocco della progressione della malattia; c) logica conseguenza del punto precedente è che una somministrazione cronica di un siffatto farmaco è richiesta al fine di potere sperare di sortire effetti terapeutici; d) la terapia con questo tipo di farmaco può essere associata a chemioterapia standard, senza rischi di incorrere in fenomeni di competizione a livello di bersagli terapeutici; e) le indicazioni terapeutiche per questo tipo di farmaco continuano ad essere come nel caso degli altri tipi di farmaci anti-tumorali organo-specifiche ed anche sito-specifiche; f) la risposta terapeutica ad un siffatto tipo di farmaco non dovrebbe essere condizionata in misura maggiore dall'entità della massa tumorale e dall'insorgenza di meccanismi di resistenza, fenomeni che viceversa condizionano in larga misura la risposta ai farmaci citotossici anti-tumorali.

Il punto importante da considerare nella presente sede è che il processo di sviluppo di questo tipo di farmaco anti-tumorale ha imposto un tipo di scelta particolare. Infatti i criteri di svolgimento della fase I di sperimentazione clinica di questo farmaco sono stati diversi da quelli adottati per un farmaco tradizionale anti-tumorale con attività citotossica, in particolare per quanto riguarda la durata del trattamento che è stata indirizzata sin dall'inizio verso una forma di trattamento cronico. La scelta fondamentale nel processo di sviluppo dell'inibitore dell'angiogenesi SU5416 ha riguardato le modalità di passaggio da uno studio di fase I a studi di fase II. Infatti tale transizione si è svolta in maniera particolare. Infatti, gli studi di fase I avevano mostrato una buona tollerabilità ed una possibile attività anti-tumorale tali da giustificare un proseguimento nel piano di sviluppo del farmaco. Tuttavia, nella transizione dalla fase I alla fase II è stato scelto un piano di sviluppo particolare. Infatti è stato deciso di passare ad uno studio di fase II/III nel quale il parametro principale di valutazione era il tempo di progressione della malattia e quindi un parametro di sopravvivenza dei pazienti trattati. Ovviamente questo è un tipo di scelta particolare che ha delle implicazioni molto importanti per quanto riguarda la durata di un siffatto studio, il numero dei pazienti da arruolare e le risorse finanziarie necessarie per sostenere un siffatto progetto. Un secondo tipo di scelta che è stato effettuato e che è anch'esso insolito è consistito nel prevedere questi studi somministrando il farmaco in associazione con chemioterapia standard; questa scelta è giustificata dal fatto che in questo tipo di studi vengono arruolati pazienti con malattia in stadio molto avanzato e che solo

difficilmente possono trarre vantaggio clinico significativo da un trattamento di natura citostatica, in assenza di un concomitante trattamento citotossico. Questo tipo di logica ha pertanto portato a definire due tipi di studi di fase II pilota basati sulla somministrazione a pazienti affetti da carcinoma del colon metastatico di 5-fluorouracile associato a SU5416 ed a pazienti affetti da carcinoma del polmone non a piccole cellule di gentamicina/cisplatino associati a SU5416; lo studio pilota che necessiterà l'arruolamento di almeno 80 pazienti, verrà seguito da uno studio di fase II/III nel quale verranno paragonate le risposte alla terapia nel braccio dei pazienti trattati con entrambi i tipi di farmaci rispetto a quelle osservate nei pazienti trattati con sola chemioterapia.

Questa situazione è paradigmatica probabilmente di quelle che saranno le strategie adottate per lo sviluppo della sperimentazione clinica dei nuovi farmaci anti-tumorali a meccanismo d'azione non su base citotossica. Questo tipo di piano di sviluppo è importante in quanto una strategia tradizionale di sviluppo potrebbe portare ad oscurare l'azione anti-tumorale del nuovo farmaco o a ritardarne la dimostrazione.

Farmaci con attività inibitoria sulle protein chinasi

Si tratta di un settore che è oggetto di intense ricerche con delle prospettive molto interessanti da un punto di vista terapeutico e farmacologico. La base razionale per lo sviluppo di farmaci che agiscono quali inibitori delle protein chinasi si basa sull'osservazione che molti geni implicati nella patogenesi di vari tipi di tumori posseggono un'attività protein chinasi costitutiva che è responsabile in larga misura dello sviluppo del fenotipo neoplastico. In alcuni casi la molecola bersaglio da un punto di vista farmacologico è posta all'inizio della cascata di trasduzione del segnale (si tratta, ad esempio, di un recettore di membrana che nelle cellule normali acquisisce attività chinasi in seguito ad interazione con il suo ligando specifico) o che in una fase intermedia nella via di trasduzione del segnale (si tratta di una chinasi indotta in seguito ad attivazione della chinasi recettoriale). Alla luce di queste considerazioni è pertanto logico procedere allo sviluppo di farmaci in grado di agire da inibitori di una chinasi specifica che è attiva solo nelle cellule tumorali, ma non in quelle normali. Ciò consente ovviamente di avere un bersaglio diretto verso la cellula tumorale, risparmiando le cellule normali e consente altresì di avere in prospettiva un farmaco con effetti tossici e secondari più limitati.

La punta di diamante in questo settore della ricerca farmacologica è rappresentata da un inibitore dell'attività chinasi della proteina di fusione bcr/abl che si forma nelle cellule della leucemia mieloide cronica in seguito ad una translocazione doppia. Numerose ricerche hanno consentito di determinare che la formazione di questa proteina di fusione rappresenta un evento patogenetico chiave per lo sviluppo di questa leucemia. La proteina di fusione bcr/abl possiede un'attività chinasi costitutiva, mentre la proteina c-abl normale non ha questo tipo di attività in maniera costitutiva, ma la acquisisce solo in maniera transitoria dopo attivazione.

Una serie di studi di chimica farmacologica hanno portato inizialmente a determinare che composti con una struttura chimica corrispondente alle 2-fenilaminopiridine erano in grado di agire *in vitro* da potenti inibitori delle protein chinasi con selettività d'azione per le tirosin-chinasi dipendenti da Abelson e dal recettore del PDGF (Platelet Derived Growth Factor). La selezione dei vari composti con questo tipo di struttura ha portato all'identificazione e selezione di un composto, STI 571, per lo sviluppo pre-clinico. Questo inibitore presentava una spiccata capacità d'inibire *in vitro* le tirosin chinasi Abl e PDGF-R ed era in grado *in vitro* d'inibire la crescita di cellule di leucemia mieloide cronica. Questi studi mostravano anche che l'effetto principale del farmaco consisteva nell'indurre un'inibizione della proliferazione delle cellule leucemiche e non nell'indurre apoptosi. Sulla scorta di queste osservazioni e di studi appropriati di farmacocinetica sono stati effettuati studi di terapia *in vivo* in topi immunodeficienti inoculati

con cellule di leucemia mieloide cronica. Questi studi indicavano che la somministrazione del farmaco con una schedula appropriata (3 somministrazioni/die) era in grado di curare 87-100% degli animali trattati, con una tossicità minima. La somministrazione di sole due dosi del farmaco/die non risultava in effetti curativa.

Sulla scorta di queste osservazioni sono stati condotti studi iniziali di fase I in pazienti affetti da leucemia mieloide cronica divenuti resistenti alla terapia con interferone. Tutti i pazienti trattati alla dose di 300 mg/die o a dosi più elevate hanno presentato risposte complete, in alcuni casi con negativizzazione citogenetica. Questi studi hanno altresì indicato un profilo farmacocinetico favorevole con un'emivita corrispondente a 12-14 ore.

Gli studi di fase II che sono in corso hanno lo scopo di determinare la dose ottimale del farmaco da utilizzare per un trattamento cronico quale quello che viene richiesto con questo tipo di farmaco e quanto durature siano le risposte osservate negli studi di fase I.

A conclusione di questa breve analisi sullo sviluppo di questo farmaco che consente un *targeting* specifico delle cellule tumorali, è importante sottolineare che anche in questo caso ci si trova di fronte ad un farmaco con azione prevalentemente citostatica. Ciò ha determinato, in maniera analoga in quanto discusso in precedenza per l'inibitore dell'angiogenesi un piano di sviluppo pre-clinico e clinico particolare che si discosta da quelli adottati per i classici farmaci ad azione prevalentemente citotossica.

Un esempio di farmaco anti-tumorale con *targeting* tumorale specifico, che di recente è stato registrato dalla Food and Drug Administration (FDA), è rappresentato dall'anticorpo monoclonale anti-HER-2. Questo recettore è espresso ad elevati livelli in circa il 30% dei carcinomi della mammella ed in questi casi si è pensato ad un possibile trattamento tramite somministrazione di un anticorpo monoclonale "umanizzato" anti-HER-2. L'anticorpo ha mostrato attività anti-tumorale agendo attraverso un meccanismo complesso che implica sia internalizzazione e downmodulation di HER-2, induzione d'inibitori endogeni del ciclo cellulare quali la p27 ed attivazione di una risposta immune specifica. L'anticorpo anti-HER-2 ha mostrato una buona efficacia terapeutica quando somministrato in associazione ad un derivato del taxolo o alla doxorubicina. Un aspetto interessante e purtroppo in parte limitante da un punto di vista terapeutico è che l'associazione dell'anticorpo anti-HER-2 e doxorubicina porta ad un potenziamento della cardiotoxicità indotta dalla doxorubicina. Questo tipo di osservazione, che era del tutto inattesa sulla scorta dei dati pre-clinici e dei primi dati clinici, trova una sua spiegazione nella presenza del recettore HER-2 a livello del miocardio.

Gli studi di fase II hanno mostrato che la combinazione chemioterapia+anticorpo anti-HER-2 determina una significativa percentuale di risposte cliniche obiettive in pazienti affetti da carcinoma della mammella HER-2+ in stadio metastatico. Il solo studio di fase III finora condotto ha indicato che la somministrazione combinata di anticorpo anti-HER-2 e di chemioterapia a base di un derivato del taxolo ha prodotto un più elevato numero di risposte cliniche, una più elevata durata delle risposte e del tempo di progressione della malattia rispetto a quanto osservato col trattamento con anticorpo monoclonale anti-HER-2 somministrato da solo. Inoltre, questa terapia di associazione è stata ben tollerata. Attualmente viene pertanto previsto di valutare l'efficacia del trattamento chemioterapia+anticorpo anti-HER-2 in pazienti a rischio con carcinoma della mammella HER-2+.

L'elemento d'interesse derivato dagli studi con l'anticorpo anti-HER-2 è consistito nel valutare gli effetti terapeutici di agenti tumorali che agiscono in maniera diversa sulle cellule tumorali, con un potenziamento degli effetti anti-tumorali.

Anche molti altri farmaci anti-tumorali sono in corso di sperimentazione e sono rappresentati essenzialmente da altri inibitori di protein chinasi che agiscono su altre chinasi attivate in altri tipi di tumori, ma che agiscono con un meccanismo d'azione simile a quello osservato per i farmaci di cui sopra e quindi si caratterizzano per un effetto essenzialmente citostatico. Alcuni

di questi farmaci hanno fornito risultati iniziali promettenti, ma nella loro strategia di sviluppo futuro si pensa inevitabilmente ad un loro impiego preferenzialmente in associazione alla chemioterapia standard.

Una ulteriore categoria di farmaci in attiva espansione è rappresentata dagli inibitori delle cicline che hanno un bersaglio biochimico differente rispetto agli altri farmaci di cui si è parlato sopra. Due di questi inibitori, flavopiridolo e UCN-01, agiscono da inibitori di alcune chinasi dipendenti dalle cicline ed hanno raggiunto una fase di sviluppo farmacologico fino agli studi clinici di fase I che hanno fornito risultati incoraggianti e tali da far prevedere una fase di sviluppo successiva fino agli studi di fase II. Le conseguenze dell'azione farmacologica di questi inibitori consiste in un blocco nella progressione nel ciclo cellulare ed in alcuni tipi cellulari nell'induzione di fenomeni apoptotici. La strategia di sviluppo farmacologico futuro è complessa in quanto rimangono ancora da determinare se sia logico somministrare un singolo inibitore di una singola attività chinasi-ciclina-dipendente o se, invece, sia più logico somministrare due o più inibitori insieme in maniera tale da ottenere un blocco più consistente della progressione nel ciclo cellulare. Inoltre rimane da determinare se si debbano privilegiare studi nei quali questi inibitori vengono somministrati da soli o in associazione con chemioterapici.

Questa breve carrellata sui farmaci oncologici in via di sviluppo ha delle implicazioni interessanti a livello di un nuovo approccio che dovrà essere adottato sia da parte dell'Industria che operano nel settore, sia delle autorità competenti in maniera tale da consentire uno sviluppo che risponda a criteri di scientificità e sicurezza, ma anche a criteri di sufficiente rapidità data la necessità assoluta di acquisire rapidamente informazioni sull'efficacia terapeutica dei nuovi principi anti-tumoralmente.

Bibliografia

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
2. Drews J. Drug discovery: a historical perspective. *Science* 2000;287:1960-4.
3. Gibbs JB. Mechanism-based target identification and drug discovery in cancer research. *Science* 2000;287:1969-73.
4. Sellers WR, Fisher DE. Apoptosis and cancer drug targeting. *J Clin Invest* 1999;104:1655-61.
5. Barinaga M. Angiogenesis research. Cancer drugs found to work in new way. *Science* 2000;288:245-8.
6. Carter SK. Clinical strategy for the development of angiogenesis inhibitors. *The Oncologist* 2000;Suppl.1:51-4.
7. Druker BJ, Lydon NB. Lessons learned from the development of an Abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest* 2000;105:3-7.
8. Gibbs JB. Anticancer drug targets: growth factors and growth factor signaling. *J Clin Invest* 2000;105:9-13.
9. Burris HA. Docetaxel (Taxotere) in HER-2-positive patients and in combination with trastuzumab (Herceptin). *Semin Oncol* 2000;27 (2 Suppl):19-23.
10. Senderowicz AM, Sausville EA. Preclinical and clinical development of cyclin-dependent kinase modulators. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:376-87.

ANALISI DELLA DOCUMENTAZIONE FARMACOLOGICA DEI PRODOTTI ANTIMICROBICI

Antonio Cassone

Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Prima di tutto voglio ringraziare il collega Marino Massotti di questo invito ed anche dell'iniziativa presa in questo settore. Va subito detto che, a differenza dei prodotti antiblastici, ci sono tanti prodotti antibiotici (soprattutto antibatterici) sostanzialmente sovrapponibili, per i quali nei vari anni passati si è verificata una corsa all'approvazione presso la Commissione Unica del Farmaco. Ciò in base al principio per cui non è possibile bloccare l'immissione in commercio di un farmaco che ha come riferimento e come controllo un altro farmaco già in circolazione.

In questo *milieu* si inserisce il concetto di innovatività. Il fatto per cui sono circa 20 anni che non si producono antibiotici innovativi, quasi 50 anni che per diverse patologie infettive l'antibiotico di riferimento rimane la penicillina (e quasi 40 che per quelle da funghi sia l'anfotericina B) è sintomatico della situazione attuale che vede un eccesso di antibiotici copia e mancanza di antibiotici innovativi.

Ciò che segue serve a illustrare i criteri utilizzati dalle autorità europee ed internazionali nella prima fase dell'iter di validazione degli antibiotici e cioè il giudizio di attività e tossicità pre-clinica, oltre a ribadire alcuni principi da rispettare nella documentazione.

La Figura 1 sottolinea un concetto di fondo, talvolta trascurato, della chemioterapia antinfettiva e cioè che abbiamo una partita non più a due, nella quale di solito c'è un ospite con una patologia organica ed un farmaco che deve risolvere quella patologia o attenuarne i sintomi, ma una partita a tre cioè *ospite, microrganismo e farmaco*. I tre interagiscono l'uno con l'altro in maniera molto stretta, quindi abbastanza particolare ed ampia deve essere la documentazione che serve a dimostrare il potenziale beneficio del farmaco.

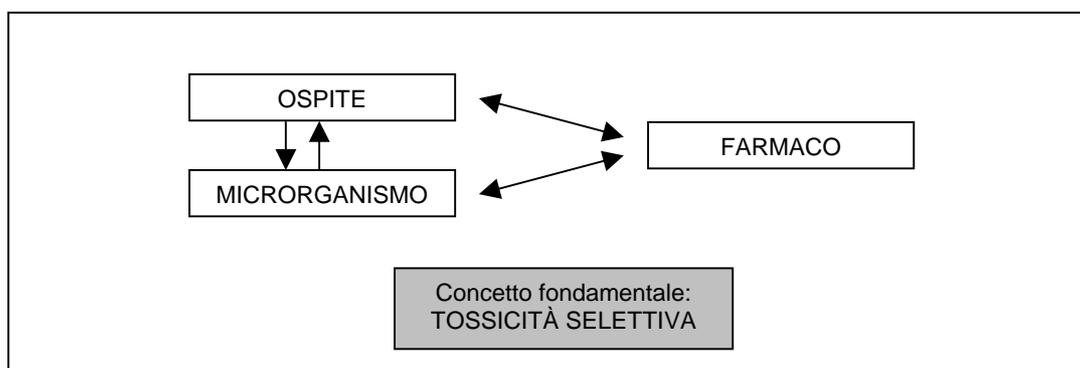


Figura 1. Innocuità: valutazione del rapporto rischio/beneficio

L'altro concetto molto importante – il *goal* della terapia antinfettiva – è di fatto eliminare (uccidere) l'agente infettante. Raramente lo possiamo realizzare con il solo farmaco: in generale, è necessaria la cooperazione del sistema immunitario per l'eliminazione del microrganismo: la *tossicità selettiva antimicrobica* è l'evento critico positivo che noi dobbiamo

sfruttare. Questo non è facilissimo: tutti sappiamo quanto siamo, nel codice genetico, simili al batterio, e quindi il problema rimane critico poiché, nel caso della terapia antibiotica, il gap di differenza fra tossicità dell'ospite e del batterio deve essere grande, in una situazione in cui il farmaco avrà vari effetti (sul microrganismo, sull'ospite, sulla loro interazione, sulla malattia stessa).

Gli effetti sul microrganismo sono ricapitolati in Tabella 1, e sono tutti solitamente ben studiati nei dossier applicativi. Meno ben studiati sono spesso gli effetti dell'antibiotico sull'ospite, anche in considerazione del fatto che il regime medio di trattamento di un'infezione acuta con un antibiotico è di una settimana. La tossicità si misura su organi e funzioni bersaglio, e questi studi devono attualmente essere corredati da una serie di documentazioni ormai imprescindibili sulla risposta del sistema immunitario e sulla capacità di modulare la risposta infiammatoria che è così critica nell'evoluzione dell'infezione.

Tabella 1. Effetti dell'antibiotico sul microrganismo

-
- Suscettibilità *in vitro*
 - Suscettibilità *in vivo*
 - Meccanismo d'azione
 - Insorgenza di resistenza
-

Lo studio dell'attività *in vitro* è un caposaldo per qualsiasi proposta. I criteri di fondo per questi studi sono esposti succintamente nella Tabella 2. E' rilevante il concetto dell'uso, per queste prove *in vitro*, di molti isolati clinici di diversa provenienza geografica. Per esempio, uno dei più grandi problemi in questo campo è la resistenza alla penicillina dello pneumococco: in Italia la resistenza è molto bassa mentre in Francia e Spagna è molto elevata. Quindi, se viene fatta una proposta di un farmaco innovativo a livello europeo deve essere compreso il saggio dei ceppi provenienti da questi paesi. In questo contesto è importante la documentazione di un'attività svolta verso ceppi microbici anche infrequentemente isolati. Nel proporre un nuovo derivato dell'eritromicina, una classe di antibiotici importantissimi per le infezioni respiratorie, di solito non vengono testati ceppi di Legionella, un organismo che dà gravi e sottostimate infezioni respiratorie in ospedali e comunità.

Tabella 2. Criteri fondamentali dell'attività *in vitro*

-
- Sufficiente numero di ceppi microbici, di diversa fonte, in particolare di fresco isolamento clinico, da diverse aree geografiche
In paragone diretto con
antibiotici delle classi di sostanze attive nelle patologie per le quali si prevede il beneficio
ed in particolare
con gli antibiotici di prima scelta per queste patologie
 - È particolarmente importante che le prove *in vitro* documentino se la sostanza è attiva verso ceppi microbici anche infrequentemente isolati dalle patologie bersaglio e quale sia la sua potency (valore MIC50 e MIC90)
 - È essenziale che venga stabilito se la sostanza è microbiostatica o microbicida, e se l'azione è dose/o tempo/dipendente (cosiddette curve di Killing)
 - Se è previsto il trattamento di infezioni da agenti intracellulari, deve essere documentata la capacità dell'antibiotico di penetrare in dose attiva nelle cellule bersaglio
 - È essenziale che fra gli agenti di malattia studiati vengono inclusi ceppi resistenti ad antibiotici di altre classi (od anche della stessa), con i diversi tipi di resistenza
 - Problema dei *break-point* dei saggi di sensibilità
-

E' particolarmente importante che il farmaco sia microbicida nell'infezione del paziente immunocompromesso; questo limita molto lo spettro di indicazione terapeutiche valide perché, ad esempio, per un paziente AIDS con infezione respiratoria batterica la sostanza non può essere batteriostatica. Nel valutare il rapporto rischio-beneficio questo diventa un parametro di grande importanza nei Paesi come il nostro in cui larga parte della patologia infettiva grave colpisce pazienti immunocompromessi o comunque il soggetto anziano e debole. Ovviamente l'azione microbistatica e microbicida dipende dal meccanismo di azione del farmaco: una sostanza microbistatica è veramente microbicida quando alla stessa dose in cui blocca la crescita uccide il batterio. In realtà molte sostanze con meccanismo di azione microbistatica diventano microbicide a dosi 10-20 volte maggiori: però, nell'aumentare 10-20 volte la dose microbistatica, si deve considerare il rischio di tossicità. Considerando l'azione citocida, oggi si ritiene che almeno due tipi di esperimento debbano essere eseguiti: l'esperimento di citocidia tempo-dipendente e l'esperimento di citocidia dose-dipendente. Molte classi di antibiotici si separano in base a questo parametro, per esempio chinolonici tempo-dipendente e penicilline concentrazione-dipendente. Infine, il problema dei *break-point*. Questi si definiscono soltanto *in vivo* e purtroppo soltanto dopo sperimentazione clinica, cioè dopo le fasi II e III. Purtroppo, è molto difficile che si riesca a pianificare ed eseguire una qualsiasi sperimentazione *in vitro* o nell'animale sperimentale che ci aiuti a definire questi *break-point*. Ma con questo non voglio dire che chi, nella documentazione, si sforzi a farlo non dia un contributo positivo: tuttavia direi che guadagnerebbe tempo più utile nel dimostrare che ceppi resistenti raccolti da tutto il Paese o da tutta l'Europa vengano uccisi o bloccati dal suo antibiotico piuttosto che definire i *break-point* sulla base esclusiva della sperimentazione *in vitro* o in modello sperimentale.

In Tabella 3 sono definiti alcuni problemi legati all'antibiotico resistenza. Fermo restando il fatto che l'antibiotico resistenza è un ineludibile fatto biologico, le sue conseguenze cliniche sono soprattutto un problema di cattivo uso dell'antibiotico stesso.

Tabella 3. Problemi legati all'insorgenza di resistenza agli antibiotici e suoi e meccanismi

-
- Intensità e frequenza
 - Single, multi-step
 - Trasferibilità
 - Ogni eventuale differenza con i meccanismi di resistenza verso composti della stessa classe e simili indicazioni terapeutiche
-

Ormai è abbastanza chiaro anche da ricerche fatte nel nostro Istituto, soprattutto dalla Dott.ssa Pantosti e dal Dott. Caprioli (vedi: Pantosti, *et al. Lancet* 1999;354:741-2), come sia possibile addirittura tornare indietro dalla resistenza, con politiche di uso mirato e ragionato degli antibiotici. Purtroppo questo non è facile da ottenere ma, senza dubbio, uno dei compiti maggiori del legislatore è fornire la dimostrazione per cui il nuovo antibiotico che si propone sia in grado di combattere le resistenze verso altri antibiotici e con quale meccanismo. Se uso un antibiotico per il trattamento della tubercolosi che mi dà resistenza ogni 10^6 divisioni cellulari non perseguo il mio obiettivo poiché già la rifampicina (il farmaco verso cui insorge più resistenza oggi nella tubercolosi) mi dà una resistenza ogni 10^8 . I concetti di intensità e frequenza della mutazione, tipo di mutazione o cambiamento genetico, relativa localizzazione e trasferibilità, sono fondamentali ai fini non solo del trattamento del paziente ospedalizzato ma dell'uso dell'antibiotico in comunità, poiché ci sono due meccanismi nell'insorgenza della resistenza: le mutazioni a livello cromosomiale e quelle a livello plasmidiale o trasposoniche, ossia a livello di elementi mobili genetici. Importante è il caso in letteratura dello stafilococco vancomicina resistente, - il famoso VISA, la cui resistenza è cromosomica mentre negli

enterococchi o in altri germi è plasmidiale, quindi si trasmette più facilmente ed è forse l'unica davvero rilevante in clinica.

Quest'informazione è dunque molto utile e richiede una ricerca di base oltre a prove di routine e ad una valutazione della resistenza verso antibiotici della stessa classe.

In Tabella 4 è schematizzato il tipo di parametri da studiare per la farmacocinetica dell'antibiotico. Sono necessari studi che documentino le concentrazioni sufficienti e il tempo sufficiente per l'effetto antibiotico *in vivo*, il calcolo delle concentrazioni tissutali e delle concentrazioni ematiche, della sua emivita, degli accumuli, dell'AUC (area sotto la curva farmacocinetica), ecc. Sono stati proposti dei test *in vitro* di suscettibilità in presenza di siero, in presenza di estratti tissutali, cioè in presenza di qualcosa che possa mimare quella che è la situazione biologica dell'ospite trattato. Molti studi su soggetti come bambini o persone anziane o donne in gravidanza non vengono fatti durante la sperimentazione per l'autorizzazione all'immissione in commercio. Questa sperimentazione è diventata ormai necessaria, considerato il progressivo invecchiamento della popolazione e l'età avanzata dei maggiori fruitori degli antibiotici.

Tabella 4. Parametri da studiare per la farmacocinetica dell'antibiotico

-
- Assorbimento e biodisponibilità
 - Distribuzione tissutale
 - Legami proteici
 - Metabolismo
 - Secrezione
 - Studi speciali (es. animale gravido)
 - Esaustiva degli studi di interazione con altri medicinali in particolare se il composto dovrà essere usato per patologie essenzialmente ospedaliere
 - Gruppi speciali di soggetti (epatici, renali, ecc.)
 - Categorie d'età
-

Nella Tabella 5 si schematizzano gli studi di efficacia *in vivo*. Il problema sorge dai modelli reali usati (topo, coniglio, ratto, cane) che sono spesso di bassa predittività per la patologia umana, ma che sono fondamentali, e che servono, comunque, a dare un'idea dell'attività biologica dell'antibiotico.

La definizione degli *end-point* è un altro punto assai discusso: noi vorremmo che l'*end-point* dell'esperimento *in vivo* su modello animale sia uguale all'*end-point* clinico umano e cioè che il batterio venga eliminato, ucciso, e non essere costretti a ricercare parametri più vaghi (ad esempio le transaminasi epatiche del ratto o altro).

Tabella 5. Studi di efficacia *in vivo*

-
- Modelli sperimentali appropriati rispettando le indicazioni della suscettibilità *in vitro* e quelle derivanti dagli studi di farmacocinetica
 - *End-point*
-

Un altro punto importante (forse trascurato in passato) riguarda l'interazione, la competizione e l'antagonismo fra farmaci nelle infezioni soprattutto ospedaliere in pazienti immunocompromessi. In genere, questi soggetti vengono trattati concomitantemente con antipiretici o antinfiammatori, altri antibiotici e così via. Di conseguenza, gli studi dell'interazione fra antibiotici e altri farmaci devono essere documentati molto bene per

prospettare razionalmente il beneficio atteso. La mancanza di questi studi comporta effetti negativi, per esempio nell'interazione fra fluorochinoloni e antidiuretici, effetti convulsivanti e comiziali, o, nel trattamento del paziente HIV con tubercolosi, gli inibitori delle proteasi mettono fuori gioco la rifampicina (un antibiotico importantissimo per i soggetti co-infetti da HIV e micobatterio tubercolare).

Si deve anche sottolineare l'esigenza di uno studio degli effetti del farmaco sui batteri commensali. In una terapia antibiotica, l'azione viene esplicata su altri batteri che svolgono un ruolo positivo per il benessere del soggetto: nel nostro intestino cieco, per esempio, ci sono circa 10^{12} batteri per grammo di feci. Se eliminiamo di colpo questa massa batterica, altri ne prendono il posto e la conseguenza può essere una superinfezione di *Clostridium difficile*. Un altro esempio: la crescita di funghi dopo una terapia a largo spettro con antibiotici antibatterici; nei recenti episodi di NEC (enterite necrotizzante) al Policlinico dell'Università di Roma "La Sapienza", in cui tutti i bambini con NEC sotto ampia antibiotico-terapia hanno sviluppato la candidosi orale. Ecco perché diventa importante sapere se rientra nel beneficio clinico il fatto che un antibiotico non elimini in modo non selettivo la flora intestinale.

Infine (Tabella 6) è importante il concetto della cooperazione fra antibiotico e sistema immunitario su cui non mi potrò dilungare per mancanza di tempo. E' necessario che l'antibiotico non disturbi questa collaborazione ma che anzi la esalti, potenziando ad esempio la risposta infiammatoria antimicrobica come succede con i macrolidi.

Tabella 6. Elementi da valutare nella cooperazione tra antibiotico e sistema immunitario

-
- Influenza sulle funzioni fagocitarie
 - Influenza sulla risposta infiammatoria
 - Attività immunomodulatorie sulle risposte adattive
-

In conclusione, lo scopo delle prove di attività e tossicità pre-cliniche è sempre duplice, dimostrare cioè che ad un certo potenziale beneficio corrisponda un potenziale rischio, dando elementi concreti per calcolare questo rapporto (Tabella 7).

Tabella 7. Prospetto sintetico delle considerazioni sulle prove di attività/tossicità pre-cliniche

-
- 1) Le prove di attività/tossicità pre-cliniche devono certamente soddisfare il primo requisito terapeutico
PRIMUM NON NOCERE
 - 2) Ma soprattutto devono dare ogni possibile elemento di giudizio circa
LA REALTÀ E PREVEDIBILITÀ dell'effetto antibiotico
 - 3) Le prove di attività e disponibilità dell'azione antibiotica non devono essere intese come una lunga serie di cose comunque da fare ma come somma integrata di prove utili a prevedere un ragionevole rapporto
RISCHIO/BENEFICIO
-

Questo vale anche e soprattutto per gli antibiotici che hanno un'attività farmacologica di tipo eziologico. In ultima analisi è questo il nostro specifico compito, nonché quello cui l'attuale normativa ci impegna.

APPENDICE

**Struttura del dossier
da presentare all'Istituto Superiore di Sanità
a corredo delle domande di autorizzazione
all'avvio degli studi clinici che ricadono
nel DPR 754/1994, articolo 1, lettera c)**

Per la valutazione dei risultati degli studi pre-clinici previsti dal DM 28 luglio 1977 e dal DM 25 agosto 1977 e dalle linee guida pubblicate sul *Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità* 9 (10), 1-8, 1996 e 10 (5), 1-8, 1997, l'Istituto distribuisce le varie parti del dossier ai laboratori di competenza. Per facilitare la distribuzione si propone di presentare la documentazione tecnica secondo la seguente suddivisione, che tra l'altro ripropone in parte quella prevista dall'EMEA:

1. Descrizione generale (5 copie)
2. Documentazione sulla qualità (1 copia)
3. Documentazione sulla inattivazione/rimozione virale (laddove necessaria) (1 copia)
(2 copie per i prodotti per terapia genica e cellulare somatica)
4. Documentazione sulla farmacologia (1 copia)
5. Documentazione sulla tossicologia generale e safety farmacologica (1 copia)
6. Documentazione sulla mutagenesi (1 copia)
7. Documentazione clinica (1 copia)

La documentazione potrà essere presentata in lingua italiana o inglese. Sarebbe utile ricevere tale documentazione *anche* su supporto informatico. Ciascuna parte dovrà includere all'inizio un indice dei vari capitoli che riportano i rapporti dei vari studi. Per favorire il lavoro degli esperti dell'Istituto ed accelerare quindi i tempi di completamento dell'istruttoria, è opportuno che ciascun capitolo tenga in considerazione i seguenti aspetti:

- Introduzione, comprendente il razionale e gli obiettivi dello studio;
- Descrizione dei metodi e del trattamento statistico dei risultati;
- Descrizione dei risultati;
- Presentazione dei dati sotto forma di tabelle e figure con leggenda "self-explanatory". Qualora le riproduzioni delle fotografie non siano chiaramente comprensibili, anche se solamente in alcune parti, dovranno essere presentati gli originali;
- Conclusioni e commenti dei risultati, in particolare per ciò che riguarda la loro rilevanza per la formulazione di ipotesi sulla sicurezza e sull'attività del composto sull'uomo. Queste conclusioni, tuttavia, potranno essere riportate alla fine di ogni parte, allorché siano desumibili esclusivamente dall'insieme degli studi di tutti i capitoli.

L'assenza degli studi previsti nei vari capitoli deve essere adeguatamente giustificata e, laddove non siano applicabili, i capitoli dovranno essere ugualmente riportati con la dicitura "non applicabile".

1. Descrizione generale

a) Introduzione

- i) Razionale scientifico
- ii) Definizione dei possibili vantaggi terapeutici della terapia proposta rispetto alle alternative terapeutiche disponibili (in caso di arruolamento di volontari malati)
- iii) Dati giudicati rilevanti ai fini della definizione del problema, del razionale e degli obiettivi proposti, anche se non pubblicati

b) Informazioni specifiche

- i) Nome e recapito del responsabile per gli aspetti regolatori della domanda
- ii) Nome e recapito dei responsabili di ciascun capitolo o della parte (da contattare in caso di approfondimenti tecnico-scientifici)
- iii) Riassunto del dossier (massimo 10 pagine)
- iv) Copia di eventuali autorizzazioni ottenute precedentemente in ottemperanza a norme di legge aventi rilevanza per la sperimentazione proposta

2. Documentazione sulla qualità

2.1. Farmaci chimici prodotti per sintesi o estrazione

Capitoli:

- b) Composizione del prodotto
- c) Forma farmaceutica
- d) Nomenclatura e descrizione del/dei principio/i attivo/i
- e) Descrizione del processo di produzione

- f) Caratterizzazione del/i principio/i attivo/i
- g) Controlli del/i principio/i attivo/i
- h) Controlli del prodotto finito
- i) Convalida dei metodi usati

2.2. Farmaci prodotti mediante tecnologia del DNA ricombinante

Capitoli:

- a) Composizione del prodotto
- b) Forma farmaceutica
- c) Descrizione del/dei principio/i attivo/i
- d) Descrizione del processo di produzione, con riferimento particolare alla caratterizzazione e stabilità delle banche cellulari e alla stabilità del costruito.
- e) Controlli degli eccipienti
- f) Controlli dei prodotti intermedi e del prodotto finito
- g) Convalida dei metodi usati
- h) Stabilità del prodotto

2.3. Farmaci costituiti da anticorpi monoclonali o da prodotti di linee cellulari continue

Capitoli:

- a) Composizione del prodotto
- b) Forma farmaceutica
- c) Descrizione del/dei principio/i attivo/i
- d) Descrizione del processo di produzione, con riferimento particolare alla caratterizzazione e stabilità delle banche cellulari e alla specificità del principio attivo.
- e) Controlli degli eccipienti
- f) Controlli dei prodotti intermedi e del prodotto finito
- g) Convalida dei metodi usati
- h) Stabilità del prodotto

2.4. Farmaci costituiti da vaccini (esclusi quelli che ricadono al punto 2.7)

Capitoli:

- a) Composizione del prodotto
- b) Forma farmaceutica
- c) Descrizione del/dei principio/i attivo/i
- d) Descrizione del processo di produzione
- e) Controlli degli eccipienti
- f) Controlli dei prodotti intermedi e del prodotto finito
- g) Convalida dei metodi usati
- h) Stabilità

2.5. Farmaci costituiti da allergeni

Capitoli:

- a) Composizione del prodotto
- b) Forma farmaceutica
- c) Descrizione della composizione qualitativa dell'estratto allergenico o della molecola allergenica
- d) Descrizione del processo di produzione
- e) Caratterizzazione e standardizzazione dell'estratto
- f) Controlli dei prodotti intermedi e del prodotto finito
- g) Controlli del prodotto finito quando applicabile
- h) Convalida dei metodi usati

2.6. Farmaci costituiti da derivati del plasma o sangue umano

Capitoli:

- a) Plasma "master file"
- b) Composizione del prodotto

- c) Forma farmaceutica
- d) Descrizione del/dei principio/i attivo/i
- e) Descrizione del processo di produzione
- f) Controlli degli eccipienti
- g) Controlli dei prodotti intermedi e del prodotto finito
- h) Convalida dei metodi usati
- i) Stabilità

2.7. Farmaci costituiti da prodotti per terapia genica

Capitoli (per ciascun componente che entra a far parte del prodotto da usarsi nella sperimentazione clinica):

- a) Descrizione del costrutto genico usato e del modo con cui è stato ottenuto il prodotto geneticamente modificato
- b) Allestimento, controlli di qualità e conservazione delle banche cellulari /di vettore virale
- c) Descrizione del processo di produzione
- d) Caratterizzazione chimico-molecolare-biologica del prodotto medicinale
- e) Caratterizzazione della popolazione cellulare prima e dopo la trasduzione (in caso di cellule geneticamente modificate)
- f) Controlli di qualità e rilascio dei lotti per l'uso clinico
- g) Convalida iniziale dei metodi usati e del processo di produzione
- h) Descrizione dei controlli di sicurezza sui pazienti e sui loro contatti (saggi biologici e/o molecolari, relativi metodi e loro convalida)
- i) Descrizione delle caratteristiche degli ambienti da dedicare alla preparazione ed alla somministrazione del prodotto, dei possibili rischi ambientali e delle relative misure di sicurezza.

2.8. Farmaci costituiti da prodotti per terapia cellulare somatica

Capitoli:

- a) Descrizione del processo di produzione e delle “manipolazioni estensive” che si intendono effettuare.
- b) Identificazioni dei componenti cellulari, dei terreni di mantenimento e dell'attività biologica desiderata per il prodotto per terapia cellulare somatica.
- c) Descrizione dei materiali ausiliari ed additivi utilizzati durante il processo di produzione ma non presenti nel prodotto finale.
- d) Descrizione degli apparati utilizzati e della tipologia degli ambienti da dedicare alla preparazione ed alla somministrazione del prodotto.
- e) Controlli di qualità e sicurezza effettuati durante il processo di produzione. Metodologie e tempi di esecuzione.
- f) Controlli di qualità e sicurezza per il rilascio dei lotti per l'uso clinico.
- g) Convalida del processo di produzione.
- h) Analisi dei rischi legati al processo di produzione.

3. Documentazione sulla inattivazione/rimozione virale

Capitoli:

- a) Descrizione delle fasi di inattivazione/rimozione virale nel processo di produzione
- b) Descrizione dei metodi di inattivazione/rimozione virale
- c) Descrizione dei risultati delle prove di validazione virale
- d) Descrizione dello “scaling down” del processo per le prove di validazione virale

4. Documentazione sulla farmacologia

Capitoli:

- a) Attività biologica correlata all'effetto principale del prodotto
- b) Attività farmacodinamica correlata all'effetto principale del prodotto
- c) Altri effetti
- d) Studi di farmacocinetica

5. Documentazione sulla tossicologia generale e safety farmacologica

Capitoli:

- a) Tossicità dopo somministrazione singola
- b) Tossicità dopo somministrazione ripetuta
- c) Tollerabilità locale
- d) Tossicocinetica
- e) Altri studi tossicologici
- f) “Safety” farmacologica

6. Documentazione sulla mutagenesi

Capitoli:

- a) Test di mutazioni geniche in cellule batteriche
- b) Test *in vitro* di aberrazioni cromosomiche in cellule di mammifero

7. Documentazione clinica

- a) Introduzione
 - i) Razionale scientifico
 - ii) Risultati degli studi clinici già effettuati in altri Paesi anche se per altre indicazioni con il prodotto oggetto della richiesta (non con prodotti analoghi o simili)
- b) Informazioni specifiche
 - i) Obiettivi della sperimentazione clinica
 - ii) Numero massimo di soggetti che si intende arruolare
 - iii) Numero di centri che si intende coinvolgere
 - iv) Formulazione(i) proposta(e)
 - v) Giustificazione dei dosaggi proposti, della via di somministrazione e della durata del trattamento
 - vi) Indicazione dei livelli di tollerabilità massima accettabili, raggiunti i quali verrà interrotto il trattamento
 - vii) Criteri di inclusione ed esclusione
 - viii) Misure da attuare a salvaguardia dei soggetti da arruolare anche a distanza di tempo dal termine del trattamento e, per i prodotti per terapia genica e cellulare somatica, i controlli di sicurezza previsti sia per i soggetti arruolati che per i loro contatti (personale medico e paramedico coinvolto nonché dei familiari, se del caso).
 - ix) Durata del follow-up
 - x) *End-point* per la valutazione dell’attività farmacologica nel caso di prodotti da utilizzare sul volontario malato.

*Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità
e Direttore responsabile: Enrico Garaci*

*Coordinamento redazionale:
Paola De Castro e Sandra Salinetti*

*Stampato dal Servizio per le attività editoriali
dell'Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299 - 00161 ROMA*

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
deve essere preventivamente autorizzata.*

Reg. Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Roma, settembre 2001 (n. 3) 4° Suppl.

*La responsabilità dei dati scientifici e tecnici
pubblicati nei Rapporti e Congressi ISTISAN è dei singoli autori*