



Notiziario

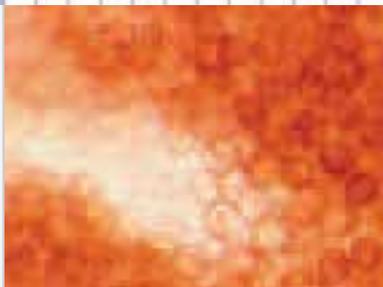
dell'Istituto Superiore di Sanità



**70 anni dell'Istituto
Superiore di Sanità**

**La nostra ricerca
per la salute di tutti
1934-2004**

**Linee guida
sui Prodotti
per Terapia Cellulare**



**Linee guida
sulla sperimentazione
clinica di fase I
con medicinali
sperimentali
per terapia genica
somatica**

Indagine sugli aspetti organizzativi
della campagna stagionale
di vaccinazione anti-influenzale

Valutazione degli effetti
delle nuove norme del codice
della strada



Inserto BEN

**Bollettino
Epidemiologico Nazionale**



**Volume 17
Numero 7/8
Luglio/Agosto 2004**

ISSN 0394-9303

Sommario

Gli articoli

70 anni dell'Istituto Superiore di Sanità. La nostra ricerca per la salute di tutti: 1934-2004	3
Linee guida sui Prodotti per Terapia Cellulare	9
Linee guida sulla sperimentazione clinica di fase I con medicinali sperimentali per terapia genica somatica	15
Alimentazione e longevità. Meno calorie per vivere più a lungo	28

Le rubriche

"Visto... si stampi"	8
----------------------------	---

Bollettino Epidemiologico Nazionale (Inserito BEN)

Indagine sugli aspetti organizzativi della campagna stagionale di vaccinazione anti-influenzale	i
Valutazione degli effetti delle nuove norme del codice della strada	iii

L'Istituto Superiore di Sanità

è il principale ente di ricerca italiano per la tutela della salute pubblica.
È organo tecnico-scientifico del Servizio Sanitario Nazionale e svolge attività di ricerca, sperimentazione, controllo, consulenza, documentazione e formazione in materia di salute pubblica.
L'organizzazione tecnico-scientifica dell'Istituto si articola in
Dipartimenti, Centri nazionali e Servizi tecnico-scientifici

Dipartimenti

Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria
Biologia Cellulare e Neuroscienze
Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare
Farmaco
Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate
Sanità Alimentare ed Animale
Tecnologie e Salute

Centri nazionali

Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute
Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari
Centro Nazionale Trapianti

Servizi tecnico-scientifici

Servizio Biologico e per la Gestione della Sperimentazione Animale
Servizio Informatico, Documentazione, Biblioteca ed Attività Editoriali

Direttore responsabile: Enrico Garaci
Redattore capo: Paola De Castro
Redazione: Carla Faralli, Anna Maria Rossi, Giovanna Morini
Progetto grafico: Eugenio Morassi
Impaginazione e grafici: Giovanna Morini
Fotografia: Bruno Ballatore, Luigi Nicoletti
Distribuzione: Patrizia Mochi
Versione online (www.iss.it/notiziario):
Simona Deodati, Giovanna Morini

Istituto Superiore di Sanità
Presidente: Enrico Garaci - *Direttore generale:* Sergio Licheri
Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma
Tel. 0649901 - Fax 0649387118
e-Mail: pubblicazioni@iss.it - **Sito Web:** www.iss.it
Telex 610071 ISTSAN I
Telegr. ISTISAN - 00161 Roma
Iscritto al n. 475/88 del 16 settembre 1988.
Registro Stampa Tribunale di Roma
© Istituto Superiore di Sanità 2004
Numero chiuso in redazione il 26 luglio 2004
Stampa: Tipografia Facciotti s.r.l. - Roma



Giuseppe Vitiello¹ e Mirella Taranto²

¹Settore Attività Editoriali, ISS

²Ufficio Stampa, ISS

Riassunto - Il 30 giugno 2004 si è svolta la giornata celebrativa dei settant'anni dalla nascita dell'Istituto Superiore di Sanità (1934-2004). In questa occasione è stato organizzato un convegno al quale hanno partecipato importanti personalità del mondo scientifico e politico. Gli anni trascorsi sono stati rievocati attraverso i discorsi del Presidente dell'Istituto e dei Premi Nobel Paul Greengard e Rita Levi-Montalcini, ma si è anche discusso delle nuove tendenze e priorità dell'attuale ricerca biomedica con importanti interventi e due tavole rotonde a conclusione dei lavori. Accanto al convegno sono stati allestite: una mostra fotografica con pannelli illustranti le tappe più importanti della storia dell'Istituto; un'esposizione di diciassette disegni anatomici di Antonio Canova, posseduti dall'Istituto dal 1943; una mostra sui principali strumenti scientifici di interesse storico utilizzati nel corso degli anni dai ricercatori dell'Istituto.

Parole chiave: Giornata celebrativa, mostra fotografica, Canova

Summary (*Seventy years of the Istituto Superiore di Sanità. Research for public health: 1934-2004*) - On the occasion of the 70th birthday of the Istituto Superiore di Sanità (1934-2004) a Celebration Day took place at the Institute, on 30th June 2004. A congress was organized with the participation of important political and scientific personalities. Past years of the Institute's history were recalled through the speeches of the Institute's President and of the Nobel Prizes Paul Greengard and Rita Levi-Montalcini. The new trends and priorities of the present biomedical research were the object of some other contributions and of the two final round tables. In addition the congress site hosted: a photographic exhibition of panels describing the most important historical phases of the Institute; the exhibition of 17 anatomical drawings by Antonio Canova, property of the Institute since 1943; scientific instruments of historical value that the Institute's researchers used through its 70 years activity.

Key words: Celebration Day, photographic exhibition, Canova

giuseppe.vitiello@iss.it

R*erum cognoscere causas.* Aprendo il convegno del 30 giugno 2004 dedicato ai settant'anni dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS), Enrico Garaci, Presidente dell'Istituto, ha fatto suo il motto virgiliano che già aveva ispirato uno dei suoi predecessori, Domenico Marotta. La giornata celebrativa si è svolta alla presenza del Presidente del Senato, Marcello Pera, e del Ministro della Salute, Girolamo Sirchia, e molte sono state le personalità del mondo politico e scientifico convenute, tra cui i Premi Nobel Paul Greengard e Rita Levi-Montalcini oltre a rappresentanti di istituzioni scientifiche nazionali e internazionali. Scienziati che hanno rievocato

le loro storie personali interne all'Istituto, relazionando sui loro successi e dando vita a una rassegna di cultura scientifica ai massimi livelli: la *lectio magistralis* di Paul Greengard dedicata al cervello e alle comunicazioni interneuronali, una sessione sulle nuove tendenze della ricerca biomedica e due tavole rotonde dedicate alla ricerca traslazionale e al monitoraggio e controllo della salute.

“Questi settant'anni - ha detto Enrico Garaci in apertura del Convegno - sono trascorsi interamente al servizio della salute dei cittadini perseguendo studi mirati soprattutto alla ricerca applicata. Un'attività distribuita oggi in sette Dipartimenti e due Cen-



Il Presidente Enrico Garaci inaugura il Convegno

tri nazionali che assommano una grande concentrazione di competenze scientifiche diverse e integrate tra loro: dall'infettivologia all'epidemiologia, dalla tossicologia alla fisica. Unite nell'obiettivo di migliorare la salute dei cittadini, la qualità delle cure e di combattere vecchie e nuove patologie". Hanno fatto seguito gli interventi del Ministro della Salute, Girolamo Sirchia, e del Premio Nobel Rita Levi-Montalcini. Delle nuove tendenze della ricerca biomedica ha parlato Antonio Cassone, Direttore del Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate dell'ISS, con un intervento sulle "Emergenze infettivologiche e nuovi approcci terapeutici". Della lotta al cancro e dei suoi più recenti progressi hanno trattato Carlo Croce, Direttore del Kimmel Cancer Center di Philadelphia (USA), con la relazione "Micro - RNA: nuova frontiera del sapere", e Sergio Pecorelli, Professore dell'Università degli Studi di Brescia, con un intervento su "I progressi dell'oncologia: dal laboratorio al letto del malato". Di cellule staminali ha discusso Cesare Peschle, Direttore del Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare dell'ISS, che ha affrontato il tema "Cellule staminali e terapie rigenerative".

Hanno chiuso l'incontro, nel pomeriggio, due tavole rotonde, una sulla "Ricerca traslazionale", moderata da Giovanni Zotta, Direttore Generale del Ministero della Salute, l'altra dedicata al "Monitoraggio e controllo della salute", moderata da Sergio Licheri, Direttore Generale dell'ISS. Ai due dibattiti hanno partecipato: Claudio Cavazza, Presidente della Sigma Tau; Barbara Ensoli, Direttore del Re-

parto AIDS dell'ISS; Ranieri Guerra, Capo Ufficio Relazioni Esterne dell'ISS; Nello Martini, Direttore dell'Agenzia Italiana del Farmaco; Enrico Solcia, Direttore scientifico dell'IRCCS "San Matteo" di Pavia; Ferruccio Bonino, Direttore Scientifico dell'IRCCS Ospedale Maggiore di Milano; Giuliano D'Agnolo, Direttore del Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze dell'ISS; Donato Greco, Direttore Generale della Prevenzione Sanitaria del Ministero della Salute; Renato Lauro, Preside della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università degli Studi di Tor Vergata di Roma; Guido Rasi, Consigliere di Amministrazione dell'Agenzia Italiana del Farmaco; Stefano Vella, Direttore del Dipartimento del Farmaco dell'ISS.

Per introdurre l'Istituto nella sua dimensione storica sono state allestite la mostra di diciassette disegni anatomici di Antonio Canova (1757-1822), esposti per la prima volta, e quella di alcuni strumenti di interesse storico posseduti dall'Istituto, cimeli che a giusto titolo rientrerebbero nelle collezioni di un ideale museo italiano di storia della scienza. La giornata si è svolta in un'atmosfera di intensa partecipazione e di semplice festività, quelle stesse che avevano probabilmente caratterizzato la cerimonia di inaugurazione dell'Istituto, il 21 aprile 1934. Quest'ultima ci è stata restituita con tutta la fragranza delle tecniche di registrazione dell'epoca da un video, costruito a partire da materiale di archivio interno e dell'Istituto Luce, dove compare il primo Direttore dell'Istituto, Gaetano Basile, un soddisfatto Mussolini e altre autorità, mentre schizzano da ogni lato invitati e portaborse.

All'ingresso della mostra allestita in seno all'Istituto, una serie di pannelli ne illustra la storia, rievocata in rapida passerella: lo sterro per la costruzione dell'edificio (1931), la successiva costruzione degli edifici minori nell'area annessa (1939), l'ulteriore espansione nelle zone adiacenti durante gli anni Cinquanta e, nel 2004, ultimo arrivato, l'annesso in via Giano della Bella. La storia delle pietre va in parallelo con la definizione degli assi portanti della ricerca... e su quali pilastri! Due sono infatti i filoni su cui l'ISS ha organizzato il suo sviluppo. Il primo è la lotta al vettore della malaria, in cui si trovava a recuperare l'eredità della Rockefeller Foundation di New York. Quest'ultima era stata protagonista nell'Italia degli anni Venti di una campagna di sanità pubblica durata oltre un decennio e conclusasi col quasi debellamento della malattia, anche grazie all'uso intensivo di un preparato a base di arsenico, il cosiddetto "verde di Parigi", riversato in dosi massicce nelle zone malariche. Protagonisti erano state due personalità scientifiche di grande valore: Lewis W. Hackett, della Rockefeller Foundation, e Alberto Missiroli, uno dei migliori malariologi italiani. Unen-

do senso pratico a talento scientifico, i due studiosi avevano presentato, nel 1929, un progetto per la costruzione di un istituto scientifico di sanità, approvato nel 1930 dalla Rockefeller Foundation con un finanziamento di 786 000 dollari, poi saliti a un milione. Completato nel 1934, l'Istituto di Sanità Pubblica doveva poi denominarsi, a partire dal 1941, Istituto Superiore di Sanità.

Il secondo pilastro era l'Ufficio del Radio, diretto da Giulio Cesare Trabacchi e ospitato sin dal 1923 in via Panisperna, nei locali dell'Istituto di Fisica dell'Università degli Studi di Roma. L'Ufficio del Radio era il mitico laboratorio in cui lavorava un gruppo di fisici di eccezionali capacità che il pubblico avrebbe in seguito conosciuto come i "ragazzi di via Panisperna". I "ragazzi" si erano autodesignati con nomi curiosi per descrivere i loro ruoli nella ricerca. Orso Maria Corbino, detto "il Padreterno", era il Direttore dell'Istituto e il nume protettore scientifico e politico; Enrico Fermi era "il Papa", perché infallibile; Franco Rasetti "il Cardinal Vicario"; Emilio Segrè ed Edoardo Amaldi "gli Abati"; Ettore Majorana "lo Spirito Santo"; il giovanissimo Bruno Pontecorvo "il Cucciolo" e, infine, Giulio Cesare Trabacchi era soprannominato "la Divina Provvidenza", perché tramite necessario per l'assegnazione dei fondi di competenza della sanità pubblica.

Compito dell'Ufficio del Radio era il campionamento obbligatorio delle sostanze e dei preparati radioattivi presenti sul territorio nazionale. Passato nel 1935 sotto la tutela del neonato Istituto di Sanità Pubblica, l'Ufficio aveva intrecciato una relazione assai proficua con via Panisperna. Enrico Fermi aveva infatti avuto l'idea di sostituire le sorgenti di "po-



Il Presidente dell'Istituto offre una targa commemorativa al Ministro della Salute Girolamo Sirchia



Il Presidente dell'Istituto con Rita Levi-Montalcini

lonio + berillio" con quelle di "radon + berillio"; l'Istituto di Sanità pubblica, dotatosi appunto di tali particelle elementari, le dava in prestito il fine settimana per poi riprendersene e utilizzarle per gli esperimenti giornalieri. Anche oggi, la presenza di attività riguardanti la fisica in un ente di ricerca biomedica è forse uno dei tratti più originali dell'ISS, giacché i fisici che si occupano di ricerca fondamentale si calano anche in questioni eminentemente pratiche, come la protezione della popolazione e l'uso delle radiazioni e della radiobiologia nella terapia del cancro.

Rockefeller Foundation è stata rappresentata al Convegno da Paul Greengard, premio Nobel per la Medicina o la Fisiologia nel 2000, attualmente Direttore del Laboratorio di Neuroscienza Molecolare e Cellulare alla Rockefeller University di New York. Questi è stato preceduto da Rita Levi-Montalcini, premio Nobel per la Medicina o la Fisiologia nel 1986. In una toccante testimonianza, Levi-Montalcini ha rievocato il suo periodo di soggiorno all'Istituto, durato oltre otto anni, quando fu invitata alla fine degli anni Sessanta dall'allora Direttore Giovanni Battista Marini Bettolo per continuare le ricerche sul NGF (*Nerve Growth Factor*) intraprese negli Stati Uniti. Nel 1987 Levi-Montalcini aveva fatto ritorno in Istituto, iniziando una collaborazione, tutt'ora in corso, con il Laboratorio di Fisiopatologia di Organo e di Sistema, mirata alla comprensione e alla caratterizzazione del ruolo del NGF nel comportamento aggressivo del topo e in alcune patologie legate a fenomeni di stress. Una linea più recente di collaborazione riguarda il ruolo della molecola NGF nell'attivazione di cellule staminali come conseguenza dell'arricchimento ambientale.

I Premi Nobel sono stati, alla lettera, di casa all'ISS grazie a un'ammirevole operazione di "importazione di cervelli". Non diversamente si può infatti denominare l'iniziativa di Domenico Marotta - una delle direzioni più lungimiranti e longeve - di invitare Ernst Boris Chain, un ebreo berlinese esiliato a Londra subito dopo l'ascesa del nazismo, che, per le sue ricerche sulla penicillina, aveva ottenuto nel 1945 il premio Nobel per la Medicina o la Fisiologia, insieme a Howard Florey e Alexander Fleming. Professore all'Università di Oxford, Chain aveva sostenuto che gli impianti di produzione della penicillina dovessero essere di natura pubblica. La promessa di Marotta di affidargli la direzione di un Centro Internazionale di Chimica Microbiologica, appositamente creato per lui, e di dargli piena libertà di movimento, aveva convinto l'illustre scienziato a trasferirsi a Roma. E Chain non aveva perso tempo a tradurre in risultati le sue conoscenze: già dal 1951 erano stati installati numerosi fermentatori di diversa potenza e, dopo qualche mese, il centro di produzione dell'ISS era pienamente funzionante. Uno dei fermentatori di quell'epoca, peraltro rimasto in uso fino a una decina di anni fa, è stato restaurato e inserito nella mostra di strumenti storici.

Chain non è stato il solo "acquisto" dell'Istituto. L'altro scienziato di talento reclutato all'estero e poi entrato nei ruoli dell'istituzione era stato Daniel Bovet, biologo svizzero emigrato a Parigi, responsabile dal 1947 del Laboratorio di Chimica Terapeutica dell'ISS. Bovet aveva analizzato le potenzialità dei sulfamidici dapprima su modelli sperimentali e poi in clinica, dimostrando che l'azione antibatterica dei preparati è opera della sola frazione sulfamidica della molecola di Prontosil, il noto antibatterico precedentemente messo a punto in un laboratorio industriale tedesco. Bovet aveva proseguito in Istituto le ricerche già iniziate a Ginevra sugli antagonisti dell'istamina e sui curari di sintesi, antagonisti di un altro neurotrasmettitore, l'acetilcolina. Per l'importanza delle sue ricerche gli era stato conferito il premio Nobel per la Medicina o la Fisiologia nel 1957.

Con Marotta alla guida (1935-1961), l'Istituto era passato da quattro a dieci laboratori e da 40 a 800 unità di personale di ruolo. La sua superficie si estendeva su 30 000 metri quadri (dagli 8 000 iniziali). Dotato di forte personalità, abilità e intraprendenza, Marotta aveva perseguito gli ideali dell'indipendenza della scienza dal potere politico. La scelta del logo dell'Istituto, in cui compariva la scritta *Rerum cognoscere causas*, non era stata casuale: "Abbiamo scelto come nostro simbolo, come nostro motto il virgiliano *Rerum cognoscere causas* e abbia-

mo scelto un crogiuolo, circondato da carboni ardenti. Nel motto virgiliano c'è tutto un programma: nelle fiamme che attorniano il crogiuolo, c'è la fiamma che anima i nostri petti, la fiamma della ricerca scientifica, la fiamma che deve ardere in tutti, per il benessere dell'umanità". Egli aveva inoltre messo l'Istituto in condizioni di provvedere con risorse proprie alla costruzione di apparecchiature utili al perseguimento della sua missione. Due esempi: la costruzione del microscopio elettronico, che aveva sostituito quello requisito dai tedeschi durante la Seconda Guerra Mondiale, e il già menzionato impianto pilota per la produzione di penicillina.

Il microscopio elettronico ha costituito uno dei pezzi forti della mostra di strumenti storici. Un esemplare identico era stato ordinato nel 1939 e montato nel Laboratorio di Fisica nel 1942; pochi mesi dopo esso era stato smontato per ordine del comando militare germanico per essere messo "in sicurezza". Ma, come aveva scritto in seguito Giulio Cesare Trabacchi, allora Direttore del Laboratorio di Fisica, "noi non ponemmo fiducia in questa promessa ed infatti, il giorno dopo che fu portato via il microscopio... accettammo la proposta di costruire un altro nella nostra officina". Il microscopio elettronico - il primo e l'unico realizzato in Italia - fu utilizzato dal luglio 1946 agli inizi degli anni Sessanta.

La storia dell'Istituto aveva assunto un andamento confuso e incerto tra la fine degli anni Sessanta e gli inizi degli anni Settanta, dopo una serie di aspri confronti scientifici e politici sulla sua collocazione e destino, accompagnati da agitazioni interne ed esterne. La Legge di riforma dell'ISS (n. 519/1973) aveva creato spazio per il rilancio e il potenziamento delle attività, ma occorre la presenza di una direzione incisiva e impegnata, come quella di Francesco Pocchiari (1971-1989), per restituire slancio alla sua vita scientifica e alle attività internazionali. Decisiva fu anche la Legge istituti-



Strumenti storici dell'Istituto (a destra, il microscopio elettronico costruito nel 1943)

va del Servizio Sanitario Nazionale (n. 833/1978), che elesse l'ISS a organo tecnico-scientifico posto alle dirette dipendenze del Ministro della Sanità. In questo periodo la ricerca era stata per la prima volta organizzata per grandi aree tematiche ed erano nati i progetti speciali fondati su contratti di collaborazione con altri enti e su leggi *ad hoc* (ad esempio, per la terapia dei tumori e per l'AIDS).

Come si è detto, in occasione dalla celebrazione dei settant'anni dalla nascita dell'Istituto, sono stati esposti per la prima volta alcuni disegni anatomici di Antonio Canova (1757-1822), posseduti dalla Biblioteca e acquistati nel 1943 dalla libreria antiquaria Olschki di Roma. La mostra, *Miologie canoviane*, è stata articolata in 17 tavole, di cui una raffigurante il collo, tre il tronco, e le restanti le estremità inferiori e superiori del corpo umano. Studente a Roma, Canova si era applicato, tra il 1779 e il 1780, al disegno del corpo umano. È probabile che risalga a questo periodo le tavole nelle quali, in conformità a una prassi inaugurata già da Leon Battista Alberti e consolidatasi con Leonardo Da Vinci, Canova applica particolari invenzioni grafiche e soluzioni stilistiche per la rappresentazione del corpo umano, rappresentando, ad esempio, i muscoli in modo filiforme, indicandone stratificazione e azione. L'intenzione didattica era quella già espressa a suo tempo da Leonardo: compilare trattati di anatomia per gli artisti e di anatomia chirurgica. Questa tradizione all'epoca del Canova era incarnata, da un lato, da Vincenzo Camuccini e, dall'altro, da Giuseppe Bossi; il primo ritraeva dal vero le forme del corpo umano negli ospedali in sedute frontali con i cadaveri, il secondo rivendicava per il disegno uno studio delle forme esterne, riservando alla chirurgia e all'anatomia l'analisi delle forme interne. I disegni del Canova, che rimarranno in esposizione all'ISS fino al dicembre 2004, sono realizzati con matita rossa per la rappresentazione dei tratti carnosi e in lapis nero per le conformazioni del tendine.



Mostra dei disegni anatomici di Antonio Canova



Pannelli sulla storia dell'Istituto

Due parole, infine, sulla mostra di strumenti storici che ha annoverato, oltre al già menzionato microscopio elettronico e al fermentatore per la penicillina, gli occhiali utilizzati dal generale Umberto Nobile durante la spedizione al Polo Nord del 1929 e regalati successivamente a Giulio Cesare Trabacchi, una serie di apparecchi per la taratura e il controllo della radioattività, microscopi, bilance e chimografi per la misurazione delle attività biologiche.

L'eco del convegno e delle mostre che lo hanno accompagnato ha trovato una forte risonanza nella stampa nazionale e nei principali canali televisivi. La giornata celebrativa è stata l'occasione per ribadire l'importanza che l'ISS riveste oggi quale principale istituto di ricerca scientifica nazionale e internazionale, ruolo che l'ISS ha costruito fin dalle sue origini grazie alla preziosa attività svolta dai suoi scienziati, ma anche da tutto il resto del personale che si è avvicinato nel corso degli anni. Negli articoli dei quotidiani (*Il Messaggero*, *La Repubblica*, *Il Giornale*, *La Stampa*, *Avvenire* e altre testate di rilevanza nazionale), è stato dato particolare spazio alla mostra del Canova, per la sua indubbia rilevanza artistica, e ai più recenti progetti di ricerca, come ad esempio quello sul vaccino contro l'AIDS. I servizi televisivi (RAI TG1 e RAI TG2 Medicina 33, La7 TG) hanno trasmesso, oltre alle immagini della giornata, spezzoni tratti da un filmato storico che ripercorre la storia dell'ISS a partire dalla cerimonia di inaugurazione.

Settant'anni possono essere un fardello carico di passato, ma alla sua storia densa di successi l'Istituto guarda per ricavare slancio, capacità propositiva e una nuova giovinezza ricca di prospettive di ricerca e di impegno scientifico e sociale.

Riferimenti bibliografici

La nostra ricerca per la salute di tutti: 1934-2004. Roma: Istituto Superiore di Sanità, 2004. 81 p.

Visto... si stampi

A cura di Paola De Castro

Settore Attività Editoriali, ISS

In questa rubrica sono annunciate tutte le pubblicazioni editte direttamente da questo Istituto, accessibili online in full-text e su supporto cartaceo. Per informazioni consultate la pagina: www.iss.it/pubblicazioni e per richieste specifiche scrivete a: pubblicazioni@iss.it



Rapporti

Rapporti ISTISAN 04/03

Caratterizzazione di dispositivi di assistenza meccanica ventricolare.

Mauro Grigioni, Carla Daniele, Cristina Romanelli,
Umberto Morbiducci, Costantino Del Gaudio,
Vincenzo Barbaro
2004, 45 p.

Lo scompenso cardiaco, gravoso peso per la salute pubblica, ha come terapia elettiva il trapianto cardiaco, ma per la difficoltà della procedura e per la scarsità di organi disponibili non è una soluzione sempre praticabile. Quindi è necessario rivolgersi ad altre soluzioni: le assistenze meccaniche al circolo. Lo svilupparsi delle tipologie di assistenze e del loro impiego ha portato alla necessità di valutarle e di caratterizzarle correttamente con opportuni banchi di prova. Utilizzando il sistema di prove (già realizzato presso il Dipartimento di Tecnologia e Salute dell'Istituto Superiore di Sanità) e l'Hemopump®HP31 come dispositivo da caratterizzare, questo lavoro fornisce una possibile linea guida per le prove, non strettamente secondo normative tecniche, ad oggi non ancora consolidate, e propone un'analisi del dispositivo nella situazione di cuore patologico e fisiologico con la possibilità di variare parametri per consentire vari gradi di assistenza. I risultati ottenuti dipenderanno dalle scelte effettuate e dalla messa a punto sperimentale, e rappresenteranno una caratterizzazione del dispositivo confrontabile con dati forniti da letteratura.

grigioni@iss.it

Rapporti ISTISAN 04/04

Rischio chimico associato alla qualità delle acque del mare Adriatico. Rapporto finale delle attività finanziate dal progetto MURST/CNR "Prisma 2".

A cura di Fulvio Ferrara e Enzo Funari
2004, iv, 158 p.

In questo studio è stata valutata la contaminazione chimica dei prodotti ittici del mare Adriatico. In 12 prodotti ittici sono stati analizzati 140 contaminanti ambientali: 4 metalli, 8 idrocarburi policiclici aromatici (IPA), 76 policlorobifenili (PCB), 7 paraclorodibenzo-diossine (PCDD), 10 para-

clorodibenzo-furani (PCDF), 31 pesticidi organoclorurati (POC) e 4 alchilfenoli (APE). I metalli mostrano i livelli di contaminazione più elevati nelle vongole e nei mitili (fa eccezione il cadmio nelle pannocchie): non si osserva un evidente gradiente di contaminazione nord-sud. Le concentrazioni maggiori di IPA sono state riscontrate nei molluschi filtratori. Nelle altre specie i livelli degli IPA sono risultati nella gran parte dei casi inferiori al limite di rilevabilità. L'area più contaminata è quella dell'Adriatico settentrionale. I livelli di PCDD, PCB, PCDF, POC, e APE sono risultati più elevati nelle specie a maggior contenuto lipidico. Le specie più contaminate sono risultate le alici, gli sgombri e le triglie che, infatti, hanno i contenuti di grasso più alti. In genere si osserva un gradiente di contaminazione nord-sud.

funari@iss.it

Rapporti ISTISAN 04/05

Valutazione del rischio sanitario e ambientale nello smaltimento di rifiuti urbani e pericolosi.

A cura di Loredana Musmeci
2004, 130 p.

La preoccupazione circa la eventualità di un rischio sanitario potenzialmente associabile agli impianti di smaltimento dei rifiuti è sempre più diffusa tra la popolazione. Di conseguenza, è sempre più opportuno effettuare studi indirizzati alla individuazione di un possibile rapporto causa-effetto tra sistemi di smaltimento dei rifiuti e stato di salute delle popolazioni residenti in prossimità di siti di discarica. A tal fine, nel presente rapporto è stato preso in considerazione un gruppo di siti di discarica ipotizzabili rappresentativi della situazione italiana e su di essi è stata effettuata innanzitutto una caratterizzazione ambientale allo scopo di individuare i fattori di rischio eventualmente presenti; sulle aree circostanti tali siti di discarica sono state quindi condotte analisi epidemiologiche di dati disaggregati a livello comunale di mortalità (per malformazioni, condizioni morbose perinatali, leucemie e tumori dell'encefalo, per la classe di età 0-14 anni), malformazioni congenite, natimortalità, abortività spontanea, basso peso alla nascita, nascita pretermine, rapporto maschi/femmine (sex ratio); è stata inoltre effettuata una valutazione di protocolli per studi di epidemiologia veterinaria. Dai risultati ottenuti emerge la necessità di ulteriori approfondimenti al fine di individuare con sufficiente attendibilità le eventuali relazioni di causa-effetto tra esposizione a rifiuti e rischi sanitari.

musmeci@iss.it

Linee guida sui Prodotti per Terapia Cellulare



Giovanni Migliaccio¹, Ugo Testa², Francesca Cometa³, Stefano Fais³, Pietro Chistolini⁴, Margherita Bignami⁵, Umberto Agrimi⁶, Enrico Proietti¹ ed Eliana Coccia⁷

¹Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, ISS

²Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare, ISS

³Dipartimento del Farmaco, ISS

⁴Dipartimento di Tecnologie e Salute, ISS

⁵Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, ISS

⁶Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale, ISS

⁷Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, ISS

Riassunto - L'uso di cellule per ottenere un'azione terapeutica, diagnostica o preventiva definisce una nuova categoria di medicinali: i Prodotti per Terapia Cellulare (PTC). I PTC sono preparazioni in cui la principale azione biologica è svolta da cellule, anche se in presenza di matrici o rivestimenti di natura inorganica od organica. Questo documento è proposto come ausilio per l'identificazione dei PTC rispetto ad altre formulazioni, sulla base dei principi di "manipolazione più che minima" e "uso non omologo". L'obiettivo di queste linee guida è di assicurare la massima sicurezza possibile ai pazienti che si sottopongono a procedure sperimentali con i PTC.

Parole chiave: Prodotti per Terapia Cellulare, sperimentazione clinica di fase I, linee guida

Summary (*Cell Therapy Product Guidelines*) - The use of a cell suspension to obtain a therapeutic, diagnostic or preventive effect, defines a new category of medicinal products: the Cell Therapy Products (CTPs). These Products perform their intended biological effect mainly through the cell fraction, even in the presence of matrix or inorganic components. This document is proposed to discriminate the CTPs from other products containing cells, on the basis of "more than minimal manipulation" and "non homologous use" criteria. The purpose of this guidelines is to insure the maximal safety possible to the patients which will be enrolled in clinical trials using CTPs.

Key words: Cell Therapy Products (CTPs), phase I clinical trial, guidelines

migliagi@iss.it

Nel corso dell'ultimo decennio si è assistito a un incremento esponenziale della comprensione dei meccanismi cellulari e biochimici che controllano la proliferazione cellulare in tessuti normali o patologici. La produzione, mediante tecniche di ingegneria genetica, dei fattori regolatori identificati nel corso di questi studi ha permesso la produzione industriale di tessuti normali. L'uso di tessuti normali ottenuti *in vitro* ha portato alla definizione di una nuova categoria di medicinali applicati alla terapia di patologie acquisite o ereditarie: i Prodotti per Terapia Cellulare (PTC). Nella terminologia corrente viene talvolta usato il termine "Ingegneria Tissutale" per indicare la ricostruzione di tessuti od organi *in vitro*.

Si intendono come PTC le preparazioni in cui la principale azione biologica venga svolta da cellule o tessuti, anche se in presenza di matrici o rivestimenti di natura inorganica od organica.

Esempi di questo tipo di prodotti sono: vaccini antitumorali; pelle coltivata *in vitro*; prodotti composti da parti strutturali e cellulari per la ricostruzione di ossa o cartilagini, ecc.

SCOPO DELLE LINEE GUIDA

La sperimentazione clinica di fase I dei prodotti medicinali innovativi, che comprendono i PTC, è soggetta a un parere preventivo da parte della Commissione istituita presso l'Istituto Superiore di Sanità (ISS), ai sensi del DPR 70/2001 art. 2, comma 3, lettera c, e del DPR 439 del 21 settembre 2001.

Questo documento viene proposto come ausilio per l'identificazione dei PTC e per la preparazione della documentazione richiesta dalla Commissione per la valutazione del rapporto rischio/beneficio.

L'obiettivo della normativa è di assicurare la massima sicurezza possibile ai pazienti che si sottopongono

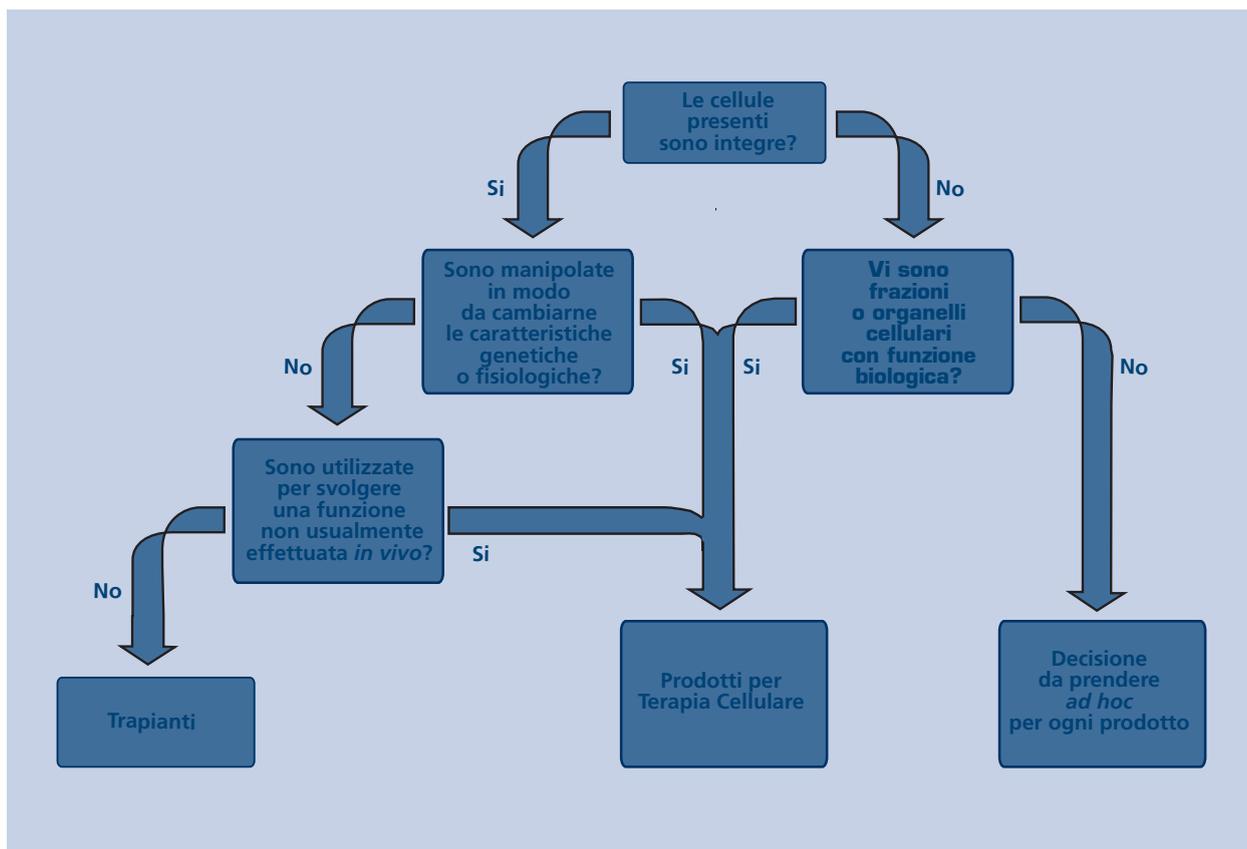


Figura - Algoritmo per l'identificazione di un Prodotto per Terapia Cellulare (PTC)

no a procedure sperimentali con PTC e quindi che le caratteristiche del prodotto somministrato siano tali da garantire un rapporto rischio/beneficio favorevole.

Rischi per i pazienti legati all'uso dei PTC

Oltre a quelli dovuti alla trasmissione di malattie infettive o alla presenza di contaminanti dei prodotti cellulari che possano portare a shock tossici/anafilattici, i PTC presentano rischi di natura diversa dai prodotti farmaceutici classici. Ad esempio:

a) un rischio proliferativo/oncogenetico. Per quanto raramente, si può supporre che il processo di produzione dei PTC possa essere associato a una trasformazione in senso oncogeno delle cellule utilizzate e che questo raro evento sia in seguito amplificato *in vivo* dalla normale proliferazione cellulare. Infatti una delle caratteristiche fondamentali dei PTC è che questi sono in grado di aumentare il loro "dosaggio" *in vivo* (tramite la proliferazione cellulare), fenomeno che non si verifica per prodotti chimici o proteici;

b) un rischio immunitario. La immunogenicità dei prodotti farmaceutici è legata alla complessità della molecola e alla forma di presentazione *in vivo*. In generale, il rischio di una reazione immunitaria del ricevente aumenta progressivamente in rapporto alla dose e complessità degli antigeni presenti nel prodotto. Tessuti e cellule sono chiaramente immunogeni se

di origine eterologa e possono, quindi, dare origine a una reazione di rigetto che ne bloccherebbe l'uso ripetuto. Inoltre, le procedure di produzione possono conferire immunogenicità anche a cellule autologhe per la presenza di sostanze immunogene sulla superficie cellulare o nel terreno di sospensione/coltura/conservazione. Infine, una reazione immunitaria da parte delle cellule del PTC di origine eterologa contro le cellule del ricevente può essere sia desiderata in trattamenti antitumorali che indesiderata quando attacca tessuti normali.

Test di sicurezza e qualità applicabili ai PTC

Per quello che riguarda i prodotti medicinali per terapie avanzate, è possibile che i test di sicurezza e qualità preclinici convenzionali possano non essere appropriati. Ad esempio, gli studi di tossicità acuta e cronica negli animali possono non essere possibili, in quanto il prodotto cellulare autologo umano sarebbe xenologo per l'animale e quello derivato dalle cellule autologhe animali potrebbe essere regolato in modo diverso nelle varie specie. Infatti le caratteristiche fisiologiche dei tessuti sono spesso diverse nelle varie specie rendendo difficile l'estrapolazione di risultati ottenuti in modelli animali con tessuti autologhi o da donatori allogeneici o xenogeneici (modelli come i topi SCID/NOD).

Le proprietà strutturali e biologiche del prodotto in questione, includendo l'alto grado di specie-specificità e la specificità di azione, le barriere immunologiche e le differenze nelle risposte pleiotropiche, rendono molto difficile indicare quali controlli di sicurezza in modelli animali siano indicativi del livello di rischio per i pazienti.

Quindi, a parte la indubbia rilevanza dei primati non umani come principale modello per saggiare la tossicità e la specificità degli eventi tossici, può essere necessario identificare e sviluppare nuovi modelli animali specifici per un determinato PTC.

L'uso di questi prodotti in volontari sani per un classico studio di sicurezza di fase I non sembra avere alcuna giustificazione scientifica o etica; infatti questo tema è risolto sul piano normativo dall'art. 2, comma 2, del DPR n. 439, che definisce gli studi di fase I sul volontario malato.

Questo determina problemi non ancora risolti per il controllo della sicurezza e della qualità del PTC proposto per la sperimentazione di fase I nell'uomo. Allo scopo di garantire la massima sicurezza possibile per il paziente debbono essere fatti tutti i necessari controlli per assicurare:

- 1) che la scelta e origine dei materiali usati nella produzione delle cellule originarie sia appropriata;
- 2) che il mantenimento dell'integrità funzionale del prodotto sia assicurata;
- 3) che gli standard di qualità e sicurezza del laboratorio e del processo di produzione dichiarati siano rispettati;
- 4) che gli studi di efficacia e tossicità siano stati effettuati sui modelli animali della malattia disponibili dopo aver definito obiettivi rilevanti per la patologia di riferimento. Nel caso non siano disponibili modelli *in vivo* si potrà ricorrere a modelli *in vitro* purché in presenza di un solido *background* scientifico che giustifichi il loro impiego ai fini della definizione dell'efficacia e sicurezza del farmaco.

Queste linee guida sono rese disponibili allo scopo di assicurare che i vigenti principi generali di qualità e sicurezza per i prodotti medicinali siano applicati ai PTC destinati alla sperimentazione in modo coerente con la pratica medica e la legislazione nazionale.

DEFINIZIONE DI PTC

Si intende per PTC ogni preparazione che venga somministrata a un essere umano con finalità analoghe ai medicinali, come definiti nel DL 178 (1992) e

successive modifiche, e che contenga cellule vive o parti complesse di esse, sia che queste siano somministrate da sole o insieme a matrici/involucri di origine sintetica o biologica.

Questa definizione include anche popolazioni cellulari e prodotti che sono parte di correnti pratiche cliniche come trasfusioni di sangue o trapianti di organi. Allo scopo di chiarirne i limiti, si riassumono i criteri correntemente applicati per l'identificazione di un PTC per distinguerli da quelle pratiche mediche consolidate in cui popolazioni cellulari vengono isolate, separate e somministrate a soggetti umani sia in modo autologo (stesso donatore-ricevente) o allogenico (diverso donatore-ricevente):

a) sono esclusi dai PTC le trasfusioni di sangue e i derivati del plasma che sono regolati da apposita legislazione;

b) sono esclusi i trapianti di organi vascolarizzati o di tessuto *in toto*, e quindi quelle procedure che prevedono l'espanto di tutto, o parte, di un organo o tessuto da donatori o cadaveri e il loro trapianto in breve tempo in un soggetto ricevente, dopo una minima

manipolazione *ex-vivo*^a. Con "manipolazione minima" si intende una procedura che non alteri le caratteristiche genetiche, fisiologiche o biologiche del tessuto/organo trattato;

c) sono inclusi nei PTC quei prodotti contenenti cellule o parti di esse ottenuti dopo una manipolazione non minima. Con "manipolazione non minima" si intendono quelle procedure che alterano le caratteristiche genetiche, fisiologiche o biologiche del tessuto/organo trattato.

Esempi di manipolazioni non minime sono l'attivazione cellulare mediante antigeni/fattori di crescita, l'induzione di proliferazione cellulare mediante fattori di crescita, l'inserzione di DNA/RNA per l'espressione permanente o temporanea di nuove proteine allo scopo di indurre nuove funzioni o caratteristiche funzionali, e l'induzione di maturazione/differenziazione mediante fattori sintetici (cellule dendritiche, cellule staminali).

Sono quindi incluse nella definizione di PTC le immunoterapie effettuate con linfociti attivati, le vaccinazioni con cellule dendritiche trattate *in vitro*, tutte le terapie geniche in cui l'effetto terapeutico sia ottenuto attraverso popolazioni cellulari trasfettate

a) Le cellule del midollo osseo e del sangue periferico mobilizzato, *in toto* o sotto forma di staminali emopoietiche purificate, di derivazione sia autologa che allogenica, sono escluse dai PTC se la somministrazione del preparato cellulare avviene allo scopo di ricostituire il sistema emopoietico dopo ablazione mediante chemio o radioterapia.

“
I PTC
sono somministrati
all'essere umano
con finalità analoghe
ai medicinali
”

ex-vivo e quindi somministrate al paziente, tessuti o popolazioni cellulari amplificati *ex-vivo* come pelle, condrociti, miociti, linfociti regolatori/soppressori o altre cellule emopoietiche;

d) sono incluse nei PTC quelle preparazioni composte da cellule o parti di esse somministrate in combinazione con matrici sintetiche o biologiche, nel caso che l'elemento cellulare svolga la funzione biologica desiderata. Esempi di questo tipo di prodotti sono:

- la ricostruzione di cartilagini o di ossa mediante l'impianto di matrici biologiche o sintetiche in combinazione con condrociti od osteoblasti con lo scopo di accelerare la ricostruzione di un tessuto danneggiato;
- i trapianti allogenici di isole pancreatiche, incapsulate in modo da proteggerle dal riconoscimento e rigetto da parte del sistema immunitario ricevente, allo scopo di controllare i livelli di insulina ematici.

e) l'uso di un tessuto o parte di un organo in modo "non omologo" alla sua normale funzione biologica lo rende ai fini normativi un PTC. Per "uso non omologo" si intende la somministrazione di popolazioni cellulari anche se minimamente manipolate in siti dove normalmente non sono presenti, o per svolgere una funzione che normalmente non hanno.

L'"uso non omologo" di cellule per quanto minimamente manipolate deve essere considerato come PTC a causa dell'aumentato rischio per il paziente. L'aumento di rischio è dovuto alla mancanza di informazioni su possibili controindicazioni, limitazioni o reazioni avverse sia a breve che a lungo termine dovute alla presenza di tessuto con caratteristiche funzionali diverse da quello originale. In effetti, la stessa base razionale per

l'uso di tessuto di origine diversa per svolgere azioni biologiche sottintende una capacità di modificazione del tessuto ricevente e quindi una capacità di modificazione in modo non strutturale. Questa capacità comporta un aumento del rischio e quindi la necessità di controlli mirati per la sicurezza dei pazienti.

Esempi di terapie con "uso non omologo", sono l'impianto di cellule staminali mesenchimali o emopoietiche midollari per riattivare funzioni alterate su base degenerativa o traumatica. In generale, l'uso di tessuti, sia pure autologhi, per la riparazione di traumi avvenuti in siti o tessuti diversi da quelli di origine.

Definizione di cellule vive

Sia nella definizione di PTC che in quella di trapianti o di dispositivi medici si fa riferimento a cellule vive. Tuttavia, nell'ambito dei PTC è necessario definire cosa è inteso come "cellula o parte di essa".

La capacità proliferativa *in vitro* non può essere usata come criterio per definire la vitalità di una cellula, in quanto esistono PTC che fanno uso di cellule differenziate che non sono in grado di proliferare ulteriormente.

Inoltre, alcune popolazioni cellulari eterologhe potrebbero essere trattate (irradiazione, reagenti o farmaci) in modo da evitarne la proliferazione *in vivo* pur mantenendo la capacità di produrre un effetto biologico.

Anche la presenza di un nucleo non può essere usata come criterio in quanto cellule con attività biologica, come piastrine o globuli rossi, sono anucleate.

Pertanto, come definizione operativa si propone di definire come "cellule vive", cellule o parti di esse la cui membrana sia intatta e non permetta l'ingresso di coloranti come lo Ioduro di Propidio o il Trypan Blue al momento della somministrazione. Si escludono quei prodotti ottenuti mediante formazione *in vitro* di una membrana lipoproteica, come i liposomi, in quanto non derivati da cellule ma costruiti mediante tecniche artificiali *in vitro*.

Frammenti cellulari (exosomi)

Frammenti di membrana possono essere eliminati o secreti dalle cellule con funzione sia di stimolo che regolatrice. Gli exosomi o esosomi sono stati inizialmente descritti come microvescicole rilasciate da un ampio spettro di cellule ematopoietiche, inclusi i reticolociti, linfociti B EBV-trasformati, CTL, mastociti, cellule dendritiche e piastrine e possono essere identificati e definiti in base a criteri morfologici, biochimici (composizione proteica e lipidica) e processi di purificazione.

Gli exosomi esprimono varie proteine che caratterizzano le cellule di provenienza. In particolare, è stato rilevato che gli exosomi che derivano dalle cellule B linfocitarie e dendritiche (DC) esprimono sulla loro superficie complessi peptide-MHC classe I/II funzionali e la somministrazione di exosomi purificati da DC trattate *in vitro* con antigeni tumorali hanno indotto regressione tumorale in modelli animali. Per questa ragione sono in corso sperimentazioni cliniche basate sull'immunizzazione di pazienti con tumori metastatici con exosomi derivati da DC autologhe. Secondo l'attuale definizione di PTC, i protocolli clinici che ne fanno uso sono soggetti all'autorizzazione preventiva della Commissione.

Estratti o lisati cellulari

In alcuni protocolli clinici si prospetta l'uso di un lisato cellulare non frazionato in congiunzione di

“
Le "cellule vive"
sono cellule
o parti di esse
in cui la membrana
è intatta
”

materiale con funzione strutturale (ricostruzione ossea con matrice inorganica supplementata con lisato di piastrine) o isolatamente come stimolo antigenico (inoculazione di lisato tumorale in corrispondenza dei linfonodi afferenti alla zona tumorale) o l'uso di una matrice extracellulare ottenuta da pezzi di tessuti trattati in modo da eliminare le cellule.

Questi prodotti ricadono nella definizione corrente di PTC e i protocolli clinici che ne fanno uso sono soggetti alla valutazione di rischio/beneficio da parte della Commissione a meno che non siano stati regolati precedentemente.

Prodotti per terapia genica

I prodotti per terapia genica sono descritti in apposite linee guida dell'ISS contenute in questo stesso numero del *Notiziario*. Cellule il cui patrimonio genetico sia stato modificato *ex-vivo* in modo stabile o temporaneo sono sia prodotti per terapia genica che PTC. In questo caso, per la parte di sicurezza e qualità concernente il sistema di produzione del vettore si deve far riferimento alle linee guida sulla terapia genica.

La parte riguardante la produzione di cellule o tessuti è regolata dalle correnti linee guida sui PTC (1) e dalla vigente legislazione.

Prodotti per uso estetico

Preparazioni contenenti cellule o frammenti di tessuto, il cui scopo è puramente estetico senza funzioni terapeutiche o di diagnostica, sono soggette alle stesse regole di sicurezza e qualità dei prodotti farmaceutici. Nel caso la parte cellulare ricada nella definizione di PTC, la sperimentazione clinica di fase I di questi prodotti è soggetta alla preventiva autorizzazione della Commissione presso l'ISS.

DIFFERENZE E SEPARAZIONE DEI PTC DA ALTRI PRODOTTI AD USO TERAPEUTICO, DIAGNOSTICO O PREVENTIVO

Dispositivi medici (biomateriali, matrici sintetiche, scaffold, contenitori, dispenser utilizzati in terapia cellulare)

I PTC possono essere combinati con dispositivi medici e/o componenti meccaniche e sintetiche, biomateriali e materiali non vitali di origine biologica.

In sintesi, si definisce un dispositivo medico qualsiasi dispositivo che non contenga componenti di origine umana o componenti vitali di origine animale e la cui azione principale non è di tipo farmacologico, immunologico o metabolico, come definito nell'art. 1 del DL 46/1997 "Attuazione della Direttiva 93/42/CEE concernente i dispositivi medici".



Per quanto riguarda l'utilizzo di dispositivi medici nella terapia cellulare, possono verificarsi tre circostanze:

I. il dispositivo è presente sul mercato e viene impiegato nelle condizioni d'uso indicate. In questo caso è soggetto a marcatura CE secondo il DL 46/1997 sopra citato, o se del caso, secondo il DL 507/1992 concernente i dispositivi medici impiantabili attivi;

II. il dispositivo ha l'autorizzazione all'immissione in commercio o alla sperimentazione con indicazioni diverse da quelle previste o si tratta di un dispositivo fabbricato su misura. Il dispositivo ricade nelle condizioni previste dall' art. 5 del DL 46/1997 o degli art. 6-7 del DL 507/1992;

III. il dispositivo non è presente sul mercato e le componenti cellulari sono integralmente parte del prodotto, che è destinato a essere utilizzato esclusivamente in tale associazione e non può essere altrimenti utilizzato. Tale prodotto per la componente di dispositivo medico viene valutato secondo i riferimenti normativi riportati al punto II.

Vaccini

L'uso di vaccini contenenti cellule vive rappresenta una categoria regolata estensivamente. Si propone che la distinzione fra un PTC e un vaccino sia rappresentata dalla presenza di cellule umane o parti di esse nel PTC.

Trapianti

L'uso di tessuto omologo, cioè l'uso sullo stesso tipo di tessuto per funzioni di riparazione o sostituzione dopo traumi, ricade nella categoria dei trapianti ed è soggetta alle regole appropriate per tali procedure. Esempi di trapianti omologhi sono quelli di pelle in pazienti ustionati o di osso per la ricostruzione di articolazioni o dopo traumi.

La terapia cellulare rappresenta una situazione, almeno nei casi di un "uso non omologo", difficilmente differenziabile dal trapianto di cellule o parti di tessuto ottenute con minime manipolazioni. Inoltre, a livello della Commissione Europea coesistono, sulla differenziazione tra terapia cellulare e trapianto di cellule, orientamenti diversi che potrebbero portare a indicazioni operative non armoniche.

In ogni caso è possibile affermare che la Direttiva Europea "Norme di qualità e sicurezza su donazione, approvvigionamento, controllo, lavorazione, conservazione, stoccaggio e distribuzione di tessuti e cellule umani" riguarda le fasi di prelievo, raccolta, controllo, lavorazione, conservazione, stoccaggio e distribuzione di cellule e non il controllo e la valutazione delle procedure terapeutiche.

Pertanto all'interno di una stessa procedura sperimentale si possono verificare fasi il cui controllo sarà disciplinato dalla Direttiva sulle cellule e tessuti e altre il cui controllo sarà disciplinato dalla normativa che riguarda più specificatamente la terapia cellulare.

Le fasi riconducibili alla Direttiva Europea su cellule e tessuti saranno identificate dalla Commissione che utilizzerà la struttura del Centro Nazionale Trapianti, indicata dal Ministero della Salute, per le parti di sua competenza.

Xenotrapianti

L'uso di organi, cellule intatte o manipolate di origine non umana per sostituire o ripristinare una funzione biologica è definito come xenotrapianto. A causa della difficoltà di valutazione dei rischi connessi all'insorgenza di nuove patologie legata alla commistione di eventuali patogeni animali e tessuti umani, la sperimentazione clinica dei tessuti e organi di origine xenologa è sospesa per direttiva della Commissione Europea e del Ministero della Salute.

Quando la sospensione precauzionale sarà terminata, i PTC contenenti cellule di origine xenologa saranno ammissibili alla sperimentazione clinica e, in recepimento della Direttiva Europea 2003/63/CE del 25 giugno 2003 di modifica del codice comunitario sui prodotti farmaceutici, saranno applicate le stesse regole utilizzate per i prodotti contenenti cellule umane.

APPLICAZIONE DELLE BUONE PRATICHE MANUFATTURIERE

Il Ministero della Salute, in accordo con la vigente legislazione e la corrente pratica internazionale, ha deliberato che i prodotti medicinali per sperimentazione clinica devono essere soggetti agli stessi standard qualitativi richiesti per la messa in commercio (DLvo n. 211 del 24 giugno 2003, art. 13, pubblicato sulla *Gazzetta Ufficiale* n. 184 del 9 agosto 2003).

Una comunicazione del Ministero della Salute, pubblicata nella *Gazzetta Ufficiale* n. 46 del 23 febbraio 2002, richiede che il produttore di materiale destinato alla sperimentazione comunichi al Ministero della Salute tale intenzione prima di iniziare la produzione. Il Ministero della Salute certifica dopo ispezione che la produzione avviene nel rispetto delle vigenti regole (*Good Manufacturing Practices*).

Tali regole sono riassunte nel DLvo n. 178, pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* n. 139 del 15 giugno 1991 e successive modifiche.

PROTOCOLLI TERAPEUTICI CONTENENTI PRODOTTI LA CUI CLASSIFICAZIONE NORMATIVA NON È DEFINITA

Vi sono inoltre una serie di situazioni al confine fra i prodotti definiti in precedenza, i dispositivi medici, le trasfusioni, i trapianti o combinazioni di questi soggetti che possono dare origine a nuove identità la cui locazione nell'ambito delle regole per la sicurezza del paziente deve essere ancora definita.

Allo scopo di sollecitare commenti e discussioni si riportano di seguito alcune delle situazioni non ancora definite.

Apparati extracorporei contenenti cellule

Si ritiene che l'uso di tessuti cellulari all'esterno del corpo umano come parte di un macchinario sia esente dalla regolazione a cui sono soggetti i PTC. Infatti, la definizione restringe i PTC a prodotti che sono somministrati al soggetto e in questo caso la presenza di filtri limita lo scambio ai soli elementi proteici solubili. Un esempio di questo tipo d'apparato è il "fegato bioartificiale", mentre "reni bioartificiali", basati su cellule d'origine xenologa o allogenica, sono in fase di sviluppo preclinico.

I requisiti di sicurezza da applicare a questo tipo di prodotti e, in generale, agli apparati che contengono cellule o che le separano in modo extracorporeo non è stato ancora definito in sede nazionale o comunitaria, ma non possono essere inferiori ai criteri di qualità applicati ai PTC. Inoltre, l'uso di questi protocolli sperimentali è in ogni caso soggetto alle regole di sicurezza e qualità applicate per i trapianti d'organo.

Relazione dei PTC rispetto alle pratiche della fecondazione *in vitro*

Tali procedure sono escluse in quanto le regole dei PTC e la loro applicazione riguardano in modo esclusivo i tessuti somatici.

Riferimenti bibliografici

1. Linee guida per l'ingegneria dei tessuti e la terapia cellulare. *Not Ist Super Sanità* 1999;12(5):1-8.

Linee guida sulla sperimentazione clinica di fase I con medicinali sperimentali per terapia genica somatica



Maria Cristina Galli¹, Alessandra Caré², Maurizio Cianfriglia³, Marco Crescenzi⁴, Eugenia Dogliotti⁴, Maurizio Federico⁵ e Ugo Testa²

¹Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, ISS

²Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare, ISS

³Dipartimento del Farmaco, ISS

⁴Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, ISS

⁵Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, ISS

Riassunto - Viene presentata la revisione periodica delle linee guida italiane per la sperimentazione clinica di fase I con medicinali sperimentali per terapia genica, effettuata dal gruppo multidisciplinare di esperti costituito presso l'Istituto Superiore di Sanità. Gli esperti hanno tenuto in considerazione il progresso scientifico nel campo della terapia genica, sia riguardo ai nuovi tipi di vettori oggi disponibili (ad esempio quelli lentivirali) sia riguardo alle conoscenze sui rischi correlati (ad esempio quello di mutagenesi inserzionale). Le linee guida forniscono raccomandazioni sui requisiti di qualità e sicurezza del medicinale sperimentale e sui requisiti specifici del protocollo clinico. I requisiti descritti riflettono il principio che il medicinale sperimentale venga preparato e caratterizzato in modo tale da avere le informazioni chimico-molecolari-biologiche necessarie per una corretta valutazione del rapporto rischio-beneficio in relazione all'uso clinico proposto. Nel caso in cui il medicinale sperimentale sia costituito da cellule geneticamente modificate, dovrà essere seguita anche la linea guida sulla terapia cellulare somatica.

Parole chiave: terapia genica somatica, sperimentazione clinica, linee guida

Summary (*Guideline for phase I clinical trials using gene transfer medicinal products*) - This revised guideline gives the quality and safety requirements for gene transfer medicinal products to be used in phase I clinical trials. The revision of previous guideline has been carried out by a multidisciplinary group of experts at the Istituto Superiore di Sanità, taking into consideration scientific progress on new vectors (such as lentiviruses) as well as on risks connected with their use (such as insertional mutagenesis risk). Requirements stem from the principle that the products are prepared and characterised so that all needed chemical, molecular and biological information will be available to assess the risk-to-benefit ratio with respect to the clinical use foreseen. When the product is comprised of gene-modified somatic cells, the guideline on somatic cell therapy should also be followed.

Key words: somatic gene therapy, clinical trials, guideline

mc.galli@iss.it

Le presenti linee guida hanno lo scopo di fornire raccomandazioni circa i requisiti di qualità e sicurezza del medicinale sperimentale per la terapia genica da usarsi nella sperimentazione clinica e circa i requisiti specifici del protocollo clinico relativo.

Le presenti linee guida dovranno essere seguite durante lo sviluppo del medicinale sperimentale, nella produzione dei dati scientifici e nella preparazione della documentazione da presentare all'Istituto Superiore di Sanità (ISS) allo scopo di ottenere l'autorizzazione del medicinale sperimentale alla sperimentazione clinica di fase I (Rif: DPR 439/2001).

Le presenti linee guida si applicano a tutti i prodotti, così come definiti nel paragrafo successivo "definizione" ed esemplificati nella Tabella, il cui uso è proposto in una sperimentazione clinica di terapia genica somatica in soggetti affetti da patologie.

Dallo scopo delle presenti linee guida sono esclusi i medicinali sperimentali costituiti da oligonucleotidi ottenuti per sintesi chimica.

È esclusa la possibilità di effettuare trasferimento genico della linea germinale; è altresì esclusa la possibilità di effettuare studi di trasferimento genico su individui non affetti da malattia.

1. DEFINIZIONE

Medicinali sperimentali per terapia genica, così come definiti dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) nel documento "WHO Report of the WHO clinical gene transfer monitoring group", maggio 2002, sono quelli usati *in vivo* per modificare geneticamente cellule somatiche umane oppure quelli costituiti da acidi nucleici, da microrganismi geneticamente modificati o da cellule autologhe, allogene o xenogene modificate geneticamente *ex vivo*. Tali prodotti sono usati per il trattamento, la prevenzione o la diagnosi di malattie nell'uomo.

La Tabella fornisce una panoramica dei tipi di medicinali sperimentali per terapia genica attualmente in uso.

I requisiti qui descritti riflettono il principio che il medicinale sperimentale di terapia genica venga preparato e caratterizzato in modo tale da avere le informazioni chimico-molecolari-biologiche necessarie per una corretta valutazione del rapporto rischio-beneficio in relazione all'uso clinico proposto.

Poiché i medicinali sperimentali di cui si può prevedere l'uso hanno caratteristiche diverse e possono comportare rischi differenti, il tipo e la quantità di informazioni da presentare per ottenere l'ammissibilità alla sperimentazione clinica potranno essere diversi da caso a caso, ma comunque coerenti con le presenti linee guida.

Il medicinale sperimentale dovrà essere già disponibile almeno su scala pilota al momento della presentazione della domanda di autorizzazione alla sperimentazione clinica di fase I. La sperimentazione pre-clinica dovrà essere svolta con un lotto rappresentativo della produzione da usarsi in clinica.

Combinazione di terapia genica e terapia con cellule somatiche - Le presenti linee guida trattano i requisiti dei medicinali sperimentali costituiti da cellule autologhe o allogene solo relativamente alla modificazione genetica. Ogni altra informazione dovrà essere reperita nelle linee guida sulla terapia cellulare somatica, che pertanto dovranno essere seguite congiuntamente a queste nel caso in cui il medicinale sperimentale sia costituito da cellule geneticamente modificate.

2. DOCUMENTAZIONE DA PRESENTARE

Il formato della documentazione da presentare dovrà essere in conformità a quanto richiesto dal Decreto del Presidente dell'ISS del 26 aprile 2002 e successivi adeguamenti. La documentazione potrà essere presentata in lingua italiana o in lingua inglese. È consigliabile presentarla anche sotto formato elettronico in un formato largamente diffuso.

La documentazione dovrà contenere tutti i dati sperimentali necessari a sostenere le conclusioni sui requisiti di qualità e sicurezza del medicinale sperimentale. I dati e le informazioni dovranno essere opportunamente descritti e discussi. La mancanza di dati o informazioni relative a uno qualunque dei successivi paragrafi dovrà essere giustificata.

Poiché alcuni tipi di informazione possono essere richiesti in più sezioni, la documentazione potrà risultare ridondante ma dovrà comunque essere allegata laddove richiesta.

2.1 Descrizione generale della sperimentazione clinica proposta

Nella parte generale si richiede di includere le seguenti informazioni:

1. rationale e strategia generale alla base della terapia genica proposta;
2. strategia terapeutica (ad esempio, sostituzione di gene difettivo, correzione funzionale mediante espressione di un gene diverso da quello la cui mutazione o delezione determina la malattia, espressione genica ectopica, ecc.), scelta della sequenza terapeutica, del vettore (plasmidico, virale, cellulare), della modalità di trattamento (*in vivo*, *ex vivo*), vantaggi rispetto a terapie standard disponibili;
3. malattia o gruppo di malattie oggetto della terapia genica; cellule, tessuti, organi o sistemi bersaglio della terapia; terapie standard disponibili;
4. previsione, basata su dati sperimentali, circa la durata nel tempo dell'espressione genica, i livelli minimi efficaci e massimi tollerabili;

Tabella - Esempi di medicinale sperimentale per terapia genica

Acidi nucleici liberi	Di solito inseriti in plasmidi, somministrati come tali oppure con adiuvanti
Acidi nucleici complessati (vettori non virali)	Plasmidi complessati con policoni, proteine, altri polimeri, oppure incapsulati in liposomi, oppure veicolati da particelle colloidali
Vettori virali	Derivati da <i>adenovirus</i> , <i>retrovirus</i> , virus adeno-associati, <i>lentivirus</i> , <i>herpesvirus</i> , virus vaccinico; di solito resi difettivi, ma in alcuni casi competenti, per la replicazione <i>in vivo</i>
Cellule geneticamente modificate	Di solito umane autologhe o allogene, talvolta xenogene o di origine microbiologica



Inserto BEN

Bollettino Epidemiologico Nazionale

Sorveglianze nazionali

INDAGINE SUGLI ASPETTI ORGANIZZATIVI DELLA CAMPAGNA STAGIONALE DI VACCINAZIONE ANTI-INFLUENZALE

Giuseppe Pontrelli¹, Antonino Bella²
e Stefania Salmaso²

¹Scuola di Specializzazione in Igiene
e Medicina Preventiva, Università Tor Vergata, Roma
²Centro Nazionale di Epidemiologia,
Sorveglianza e Promozione della Salute, ISS

La campagna stagionale di vaccinazione antinfluenzale costituisce un importante e complesso intervento di prevenzione regolato da disposizioni nazionali e internazionali. La realizzazione è affidata a livello locale ai servizi territoriali di prevenzione, che rendono operativa l'offerta vaccinale attuando diversi modelli organizzativi scelti in autonomia. Nel 2004, al fine di conoscere le modalità impiegate dalle ASL per l'approvvigionamento e la somministrazione dei vaccini, e per identificare, informare e raggiungere la popolazione appartenente alle categorie a rischio, l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) ha condotto un'indagine utilizzando un questionario autocompilato via Internet.

Tra ottobre 2003 e gennaio 2004, un questionario costituito da 20 tra domande con risposta multipla o campi aperti è stato disponibile sul sito di EpiCentro (www.epicentro.iss.it), portale di Sanità Pubblica gestito dal Centro di Epidemiologia, Sorveglianza, e Promozione della Salute dall'ISS. L'iniziativa si è rivolta ai responsabili dei Servizi di Epidemiologia e Prevenzione (SEP) delle ASL, informati mediante l'invio di e-Mail personali e attraverso le pagine del portale. Ogni partecipante, successivamente alla registrazione, ha ricevuto una *password* che gli ha consentito la compilazione del questionario.

Sono state raccolte informazioni sulla quantità e sulla tipologia dei vaccini acquistati durante le campagne 2002-2003 e 2003-2004. Poiché l'indagine è stata condotta mentre la campagna 2003-2004 era ancora in corso, le informazioni raccolte riguardanti le strategie organizzative sono state limitate alla stagione 2002-2003.

Sono stati forniti i dati dai SEP di 71 ASL (il 36,4% di tutte le ASL italiane) appartenenti a 16 Regioni e alla Provincia Autonoma di Trento (Tabella). La dimensione delle ASL variava tra i 47 996 e i 1 008 583 assistiti.

Per la campagna 2003-2004 sono state ordinate in media 44 907 dosi di vaccino per ASL (min 10 000-max 147 000) con un aumento medio del 12,8% rispetto alle dosi acquistate nell'anno precedente.

Per ogni ASL è stato calcolato il rapporto tra il numero di vaccini ordinati nella campagna 2003-2004 e il numero di assistiti di età compresa tra i 65 anni e oltre; in media tale rapporto è risultato pari al 91,6% (min 57,7-max 186,0).

I vaccini frazionati non adiuvati sono stati la tipologia di vaccino più utilizzata (77,1% del totale), seguita dai vaccini frazionati adiuvati (20,6%). I vaccini interi sono stati il 2,3% del totale.

Nel 2002-2003 il 68% dei vaccini sono stati somministrati dai medici di famiglia-MF (medici di medicina generale-MMG e pediatri di libera scelta-PLS), il 28,1% da centri vaccinali delle ASL, e il 3,9% da altre strutture (ospedali, case circondariali, case di riposo, aeroporti, servizi di medicina del lavoro).

La vaccinazione è stata offerta nelle diverse regioni secondo strategie molto eterogenee.

Se nelle ASL di Friuli-Venezia Giulia, Emilia-Romagna, Lazio e Campania gli MF hanno somministrato più del 90% del totale delle dosi, in quelle della provincia di Trento e della Sardegna tale percentuale non ha superato il 10% (Tabella).

Per il 53,5% delle ASL un solo approvvigionamento è risultato insufficiente ed è stato necessario ricorrere a ulteriori approvvigionamenti. Alla fine della campagna vaccinale nel 77,5% delle ASL sono rimaste inutilizzate dosi di vaccino (in media il 6,9% del totale delle dosi ordinate).

Alla fine della stagione 2002-2003 la copertura media raggiunta dalle ASL è stata pari al 61,5% della popolazione di età pari o superiore a 65 anni. Il Ministero della Salute riporta per la stessa stagione una copertura vaccinale non dissimile, pari al 60,1%. Solo il 10,5% delle ASL ha raggiunto l'obiettivo di copertura vaccinale del 75% previsto dal Piano Sanitario Nazionale per gli assistiti nella suddetta fascia d'età e circa la metà delle ASL partecipanti è a meno di dieci punti percentuale da tale obiettivo.

Tabella - Campagna antinfluenzale 2002-2003. Offerta dei vaccini: distribuzione per strutture

Regione	n. di ASL partecipanti ^a		Medici di famiglia ^b	Centri vaccinali	Altre strutture
	n.	%	%	%	%
Piemonte	22	(100)	59,9	36,0	4,1
Valle D'Aosta	1	(100)	25,0	66,4	8,6
Lombardia	1	(7)	54,9	38,0	7,0
Provincia Autonoma di Trento	1	(100)	8,1	80,6	11,3
Veneto	3	(14)	69,1	21,8	9,1
Friuli-Venezia Giulia	3	(50)	93,2	2,8	4,0
Emilia-Romagna	9	(82)	91,3	5,8	3,0
Toscana	1	(8)	86,4	11,4	2,3
Umbria	1	(25)	28,1	66,7	5,3
Marche	3	(23)	84,2	11,4	4,5
Lazio	3	(25)	93,4	1,4	5,2
Campania	4	(31)	92,0	7,3	0,7
Puglia	1	(8)	86,3	13,8	0,0
Basilicata	5	(100)	26,6	69,8	3,5
Calabria	11	(100)	22,5	76,2	1,2
Sicilia	1	(11)	64,3	30,4	5,4
Sardegna	1	(13)	5,3	92,1	2,6
Italia	71	(36)	68,0	28,1	3,9

a) % sul totale delle ASL della regione

b) Medici di medicina generale-MMG; Pediatri di libera scelta-PLS

Al raggiungimento di livelli di copertura superiori al 65% si associa un numero di dosi acquistate superiore ai residenti di oltre i 65 anni (RR 2,4; $p = 0,0028$) e una percentuale di vaccini somministrati dai MF superiore al 50% del totale (RR 5,0 $p = 0,0001$).

Solo 23 ASL, pari al 32,4% delle ASL partecipanti, disponeva di un registro degli assistiti appartenenti alle categorie a rischio (assistiti di età compresa tra i 65 anni e oltre; persone con patologie croniche quali cardiopatie, broncopneumopatie e diabete; personale sanitario e addetto ai servizi di pubblica utilità; assistiti istituzionalizzati; contatti familiari di assistiti a rischio)

Il 95,6% delle ASL partecipanti ha dichiarato di avere eseguito una campagna informativa rivolta alla popolazione generale. Sono stati impiegati diversi mezzi di comunicazione: stampa locale (87%), poster e dépliant (75%), Tv locali (31%), posta (4%); il 79% delle ASL ne ha utilizzato più di uno. Tra le altre modalità di informazione impiegate, ci sono state iniziative presso le parrocchie, i centri per anziani e lettere personali inviate dai MF.

Inoltre, al fine di raccogliere informazioni quanto più complete il questionario online ha offerto ai diversi referenti l'opportunità di esprimere, e mettere in comune, le proprie esperienze, le valutazioni positive e negative, e i suggerimenti per migliorare la campagna antinfluenzale. È emerso che la maggioranza delle ASL ritiene necessaria una formazione specifica degli operatori coinvolti nella campagna di vaccinazione, con attenzione particolare alle informazioni riguardanti le caratteristiche del vaccino (controindicazioni, reazioni avverse, specificità dei diversi tipi) e le strategie di intervento impiegate per raggiungere la popolazione a rischio.

Il punto di forza della campagna di prevenzione più frequentemente riferito dai partecipanti è stato la collaborazione tra ASL e MF. I giudizi negativi più frequentemente riferiti riguardavano invece l'informazione da parte dei mass-media, non sempre corretta e adeguata, e una congestione delle strutture vaccinali nel breve arco di tempo previsto per la campagna stagionale.

Questa indagine dimostra la possibilità di ottenere informazioni rilevanti per la sanità pubblica attraverso un questionario online in maniera tempestiva ed economica. Nel caso specifico le informazioni raccolte forniscono un quadro descrittivo delle strategie di offerta vaccinale, attraverso le quali i servizi di prevenzione delle ASL si prefiggono di migliorare, spesso in maniera originale, la copertura nelle diverse realtà territoriali. Inoltre, pur essendo stata la partecipazione volontaria, e quindi il campione di ASL partecipanti non selezionato su base statistica, il numero e la distribuzione territoriale delle ASL consentono di ottenere un quadro comune rappresentativo della situazione nazionale. A suggerirlo è anche la sostanziale sovrapposizione dei dati ottenuti sulla copertura vaccinale raggiunta negli ultra sessantacinquenni con i dati analoghi pubblicati dal Ministero della Salute.

Tra i risultati significativi dell'indagine, pur nella specificità e diversità delle varie realtà territoriali, emergono come elementi rilevanti per l'intero territorio nazionale l'aumento del numero di dosi acquistate per ASL, l'aumento della quota di vaccini frazionati adiuvati, un sostanziale abbandono dei vaccini interi, il coinvolgimento attivo dei MF, la ne-

cessità di ricorrere a ulteriori approvvigionamenti, la presenza a fine stagione di una quota consistente di dosi non utilizzate, l'assenza di registri nominali degli appartenenti alle categorie a cui offrire la vaccinazione.

Tali contributi risultano utili sia a una migliore programmazione delle campagne di vaccinazione, a partire dalla prossima ormai vicina, sia nell'eventualità di interventi straordinari come quelli previsti dal Piano Nazionale Pandemico.

La disponibilità di uno spazio virtuale conosciuto e preposto alla condivisione delle diverse esperienze in sanità pubblica, come il portale di Epicentro, consentirà di raccogliere in un forum elettronico i contributi delle ASL che avranno sviluppato con successo le loro strategie, ad esempio attraverso la creazione di registri delle persone a rischio, l'elaborazione di materiale informativo come poster o dépliant, o di nuove e creative strategie.

Si ringraziano i referenti delle ASL partecipanti: Piemonte: (Chiara Maria Rossi, ASL 1 Torino; Domenico Montù, ASL 17 Savigliano; Elena Moiso, ASL 2 Torino; Paola Bugatti, ASL Casale Monferrato; Giacomo Buzzone, Antonella Barale, Rossanna Manzino, Pierangela Ferrero, ASL Alessandria; Maria Marchisio, ASL Asti; Anna Bertorello, ASL Mondovì; Piero Bragazzi, ASL Vercelli; Marco Merlo, ASL Novi Ligure; Angelo Pellegrino, ASL Cuneo; Anna Musso, ASL Biella; Marzia Barengo, ASL Novara; Franco Giovanetti, ASL Alba; Edoardo Quaranta, ASL Verbania; Edoardo Tegani, ASL 3 Torino; Paolo Laurenti, ASL Pinerolo; Maria Pia Alibrandi, ASL Ivrea; Anna Scala, ASL Chieri; Maria Teresa Galatti, ASL Chiasso; Paolo Rosso, ASL Ciriè; Angela Gallone, ASL Collegno; Fernando Ferracane, ASL 4 Torino); Valle D'Aosta: (Luigi Sudano, ASL Valle D'Aosta); Lombardia: (Giuseppe Monaco, ASL 11 Monza); Provincia Autonoma di Trento: (Valter Carraro, ASL Trento); Veneto: (Andrea Todescato, ASL 6 Vicenza; Anna Puppo, ASL 9 Treviso; Maurizio Foroni, ASL 2 Villafranca); Friuli-Venezia Giulia: (Andrea Iob, ASL 3 - Alto Friuli; Daniela Gnesutta ASS n. 4 Medio Friuli, Emanuela Zamparo, ASS 6 - Friuli Occidentale); Emilia-Romagna: (Emanuela Fiumana, ASL Forlì; Anna Pecci, ASL Rimini; Anita Capra, ASL Piacenza; Roberto Rangoni, ASL Imola; Maria Luisa DiMaggio, AUSL Bologna; Patrizia Camerlengo, ASL Reggio Emilia; Anna Rosa Gianninoni, Azienda USL Città di Bologna; Barbara Bondi, AUSL Cesena; Andrea Lambertini, ASL Modena); Toscana: (Luigi Ricci, ASL 4 Prato); Umbria: (Oronza Concetta Penza, USL 2 Perugia); Marche: (Rossana Rossigni, ASL 4 Senigallia; Nadia Storti, ASL 5 Jesi; Giuseppe Moretti, ASL 10 Camerino); Lazio: (Patricia Porcelli, ASL Latina; Silvia Aquilani, ASL Viterbo; Annarita Bellomo, ASL RMD); Campania: (Paolo D'Argenio, ASL Benevento 1; Angelo D'Argenzio, ASL Caserta 2; Raffaele Palombino, ASL Napoli 4; Francesco Giugliano, ASL Napoli 5); Puglia: (Sante Minerba, ASL Taranto 1); Basilicata: (Maria Lucia Graziano, ASL 1 Venosa; Polani, ASL 2 Potenza; Marandola, ASL 3 Lagonegro; Moliterni, ASL 4 Matera; Teresa Russo, ASL 5 Montalbano Jonico); Calabria: (Rubens Curia, Regione Calabria; Francesca Scrivano, ASL 1 Paola; Franca Aloia ASL 2 Castrovillari; Vincenzo Gaudio, ASL 3 Rossano; Rosanna Fortino, ASL 4 Cosenza; ASL 5 Crotona; Bruno Monaco, ASL 6 Lamezia Terme; Claudia Gabriele, ASL 7 Catanzaro; Cesare Pasqua, ASL 8 Vibo Valentia; Pier Domenico Mammi, ASL 9 Locri; Adele Carbone, ASL 10 Palmi; Sandro Giuffrida, ASL 11 Reggio Calabria); Sicilia: (Filippo Giurdanella, ASL 7 Ragusa); Sardegna: (Francesco Congiu, Antonio Frailis, AUSL Sanluri).

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DELLE NUOVE NORME DEL CODICE DELLA STRADA

Marco Giustini

*Dipartimento di Ambiente
e Connessa Prevenzione Primaria, ISS*

Nel luglio 2003 è entrato in vigore il Decreto sul nuovo codice della strada, successivamente convertito in legge il 1° agosto. Il nuovo codice che ha introdotto la patente a punti, prevede che alla patente vengano assegnati 20 punti decurtabili a ogni infrazione della legge. I punti da decurtare possono essere da uno a dieci: un punto viene dedotto, ad esempio, per aver tenuto i fari spenti quando invece è obbligatorio accenderli, 5 punti per il mancato uso delle cinture di sicurezza, 10 punti per guida in stato di ebbrezza.

Una valutazione svolta nel novembre 2003 (1) ha dimostrato che la nuova legge ha avuto come effetto un'immediata notevole riduzione del numero di incidenti e delle loro conseguenze nel periodo luglio-ottobre 2003 rispetto all'analogo periodo dei due anni precedenti, con una diminuzione di circa il 19% degli incidenti, e una diminuzione ancora più consistente del numero dei morti (28%) e dei feriti (21%).

I dati relativi al primo anno di applicazione della patente a punti (sostanzialmente relativi agli ambienti stradali "autostrade", "strade statali" e "strade provinciali", che nel seguito saranno indicati complessivamente con l'acronimo ASP), dimostrano che se confrontato con il periodo luglio 2002 a giugno 2003, il numero di incidenti occorsi negli stessi mesi nel periodo 2003-2004 è diminuito del 14,5% (da 189 181 a 161 696), una differenza assoluta di -27 485. Nello stesso periodo, i decessi sono diminuiti del 18,8% (da 4 569 a 3 712, differenza assoluta -857), e anche i feriti sono diminuiti del 17,9% (da 136 733 a 112 228, differenza assoluta -24 505).

Naturalmente, l'effetto non è stato uniforme nel corso dell'anno. Nei primi mesi dell'applicazione della legge (luglio-settembre 2003), la diminuzione degli incidenti rispetto all'analogo periodo dell'anno precedente è stata assai più marcata (tra il 25% e il 30% a seconda dell'indicatore sanitario prescelto), successivamente, si è riscontata una riduzione dell'effetto anche se poi la situazione è sembrata stabilizzarsi (Figura).

Dai risultati del progetto DATIS (DATI Incidenti Stradali) è stato stimato che a ogni morto corrispondono almeno 2 invalidi gravi (nella gran parte relativi a traumi cranio-encefalici e spinali) e circa 20 ospedalizzazioni. Applicando questi rapporti è possibile stimare che, relativamente alle ASP, nei primi 12 mesi vi siano stati, oltre ai 857 morti in meno, anche circa 1 700 invalidità gravi e 17 000 ricoveri evitati. Il beneficio economico com-

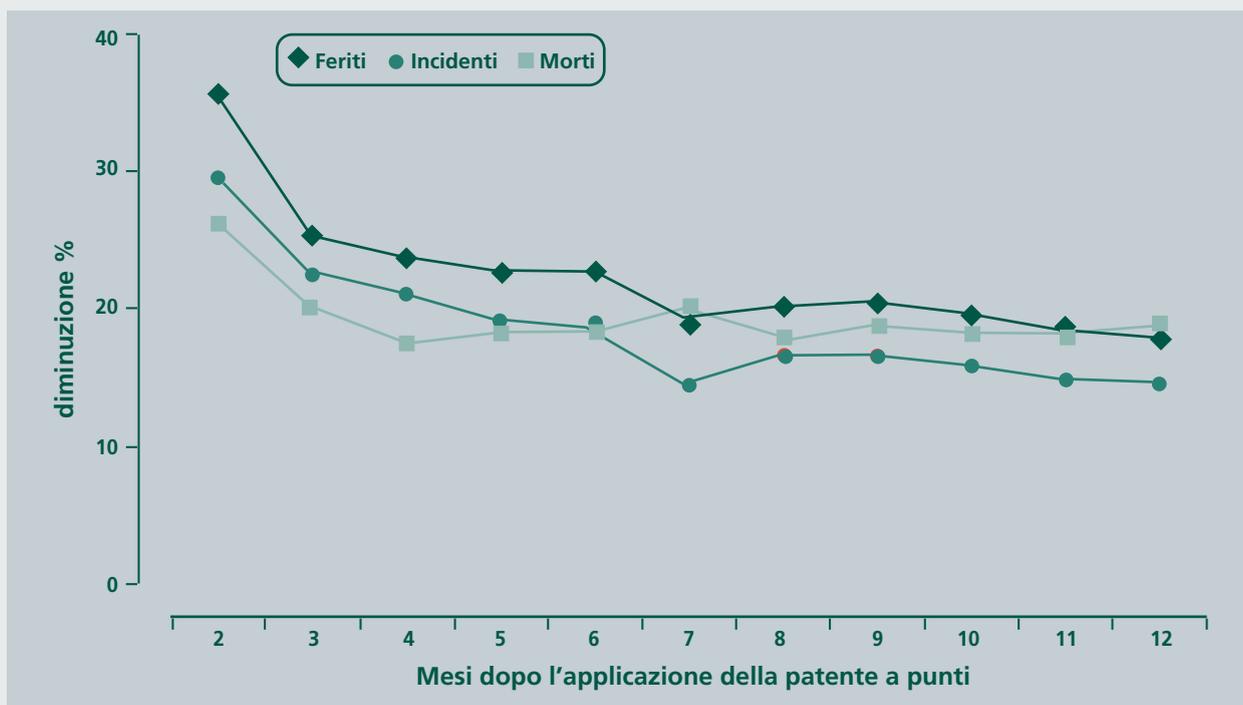


Figura - Diminuzione del numero di incidenti, feriti e morti indotta dalla patente a punti. I valori relativi agli anni 2003-2004, successivi all'introduzione della nuova legge, sono stati calcolati per ogni mese confrontando i dati relativi allo stesso periodo nel 2002-2003

plessivo che si evidenzia in base alle voci considerate, già acquisito al 30 giugno 2004 e relativo a quanto accaduto in ambito extraurbano, in termini di perdita di capacità produttiva evitata e di costi di assistenza sanitaria risparmiati, risulta essere pari a circa 1,2 miliardi di euro.

Poco si sa circa gli effetti della patente a punti sulla riduzione degli incidenti stradali in zona urbana. Certamente le dinamiche della circolazione stradale appaiono assai differenti tra le due realtà, tuttavia il forte incremento dell'uso dei dispositivi di sicurezza concomitante con l'avvento della patente a punti osservato proprio in città, unitamente al fatto che le velocità mediamente più basse della circolazione urbana rendono tali dispositivi più efficaci, porta a ritenere che il beneficio ipotizzabile in ambiente urbano non sia inferiore a quello registrato fuori città.

Tuttavia, applicando le stesse diminuzioni osservate nelle ASP alle zone urbane, si può stimare che la nuova legge complessivamente consentirebbe di evitare 1 391 morti, 2 782 invalidità gravi, e 27 824 ricoveri, con un beneficio economico totale di quasi 2 miliardi di euro nel primo anno dall'introduzione della legge.

Esistono evidenze certe sul fatto che la nuova legge e la sua applicazione abbia portato a una riduzione del numero di morti dovuti a incidenti stradali (2).

I dati relativi ai primi 12 mesi di patente a punti indicano una sostanziale diminuzione del numero di incidenti, feriti, e morti. Si osservi che quanto osservato in Italia è paragonabile a quanto è accaduto in Irlanda dove la patente a punti è stata introdotta nel novembre 2002 e ha prodotto una riduzione del 19% del numero di morti e del 21% dei feriti gravi (3).

Ovviamente anche un sistema come la patente a punti per essere efficace nel tempo ha bisogno di essere accompagnato da un'organica strategia repressiva. Non a caso nell'ultimo anno le infrazioni contestate da Polizia Stradale e Carabinieri su strade extraurbane sono state oltre 3 milioni, mentre i punti tolti sono stati oltre 2 milioni e mezzo. Proseguire su questa strada non abbassando la guardia sui controlli è quindi condizione necessaria per avvicinarci all'obiettivo fissato dall'Unione Europea di una riduzione del 50% dell'incidentalità stradale entro il 2010.

Riferimenti bibliografici

1. Giustini M, Pitidis A, Taggi F. Valutazione di efficacia delle nuove norme del codice della strada. *Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità* - Insetto BEN 2003;16(11). Disponibile all'indirizzo: <http://www.epicentro.iss.it/ben/2003/novembre2003/1.htm>
2. Task Force on Community Preventive Services. Motor-vehicle occupant injury: strategies for increasing use of child safety seats, increasing use of safety belts and reducing alcohol-impaired driving. *MMWR* 2000;49(RR-12):1-11. Disponibile all'indirizzo: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5007a1.htm>.
3. Department of Transportation. Road safety in Ireland. Disponibile all'indirizzo: http://www.business2000.ie/cases/cases_7th/case11.htm#04.

Comitato editoriale BEN

**Nancy Binkin, Paola De Castro, Carla Faralli,
Marina Maggini, Stefania Salmasso**

e-Mail: ben@iss.it

segue

5. indicatori utilizzati per valutare il successo della terapia genica proposta;
6. modalità di trasduzione: ad esempio, iniezione di DNA nudo, "biolistica", liposomi, virus, ecc.;
7. considerazioni sulla sicurezza per il paziente, in relazione al rapporto fra i rischi prevedibili e i benefici attesi, basandosi sui risultati della sperimentazione preclinica, tenendo in considerazione anche elementi rilevanti presenti in letteratura, per quanto riguarda tanto la tollerabilità del vettore quanto quella del prodotto genico espresso. Entrambe le componenti andranno valutate in funzione della via di somministrazione, della dose clinica e programma di somministrazione, della massima espressione attesa del prodotto genico e del tipo di pazienti previsti. Indicazioni derivanti dagli studi preclinici sull'alterazione genetica della linea germinale come conseguenza indesiderata della terapia proposta;
8. considerazioni sulla sicurezza per gli operatori sanitari, per la popolazione umana in genere e per l'ambiente, per quest'ultimo in relazione alla probabilità di rilascio di Microrganismi Geneticamente Modificati (MOGM) e al loro potenziale impatto;
9. descrizione generale del protocollo clinico;
10. sponsor (nome e istituzione);
11. tipo di sperimentazione (monocentrica/multicentrica/internazionale);
12. patologia, tipo e numero di pazienti coinvolti;
13. forma farmaceutica, modalità di somministrazione, dosi e programma di trattamento;
14. strutture cliniche partecipanti alla sperimentazione (nome e indirizzo delle strutture; nome e qualifica dei responsabili).

“
I requisiti di qualità
sono qui discussi
sia in modo generale
sia per classi specifiche
di vettori
”

3. REQUISITI DI QUALITÀ

Nella parte che riguarda i requisiti di qualità dovranno essere incluse le informazioni, opportunamente descritte, discusse e giustificate, qui di seguito indicate sia in modo generale sia per classi specifiche di vettori.

3.1 Sviluppo genetico del prodotto: geni e sequenze

Questa sezione dovrà contenere le seguenti informazioni:

- 1) derivazione, composizione genica e sequenze dei vettori di espressione impiegati;
- 2) specie di provenienza e sequenza completa dei geni inseriti nel vettore, inclusi quelli terapeutici, gli even-

tuali marcatori di selezione o di espressione e le sequenze (ad esempio, promotori) che ne regolano l'espressione.

Nel caso di mutazioni apportate rispetto al tipo selvatico: razionale e verifica sperimentale.

3) Uso di sequenze regolatrici per limitare l'espressione del transgene nel tempo o in determinati tessuti o condizioni: razionale e verifica sperimentale;

4) marcatori di selezione (ad esempio, resistenza ad antibiotici) o di espressione (ad esempio, GFP): dovrebbero essere evitati, in quanto possono determinare effetti indesiderati difficili da prevedere. Se il loro uso è ritenuto indispensabile: giustificazione ed evidenza a sostegno della sicurezza d'uso nelle condizioni di impiego proposte;

5) descrizione dei metodi di amplificazione del materiale genetico e delle cellule procariotiche o eucariotiche mediante le quali tale amplificazione viene condotta.

Note: Si raccomanda di limitare all'indispensabile la composizione genica del vettore. Non dovranno essere presenti regioni a sequenza e funzione sconosciute.

La verifica delle sequenze dovrà derivare da una reale procedura di sequenziamento del medicinale sperimentale da utilizzare per la terapia genica, non da letteratura o banche di dati, e sarà effettuata preferibilmente sulla banca cellulare o virale di lavoro. Una verifica effettuata a livello differente può essere accettabile, secondo i casi, ma richiederà nelle fasi successive di sviluppo del medicinale sperimentale un'approfondita caratterizzazione delle banche di lavoro per garantire l'equivalenza al materiale inizialmente sequenziato.

3.2 Vettori costituiti da acidi nucleici liberi o complessati

Questa sezione dovrà contenere le seguenti informazioni:

- descrizione dettagliata della strategia di sviluppo del DNA plasmidico, informazioni sul gene terapeutico, sulla presenza di sequenze capaci di mediare l'integrazione nel DNA dell'ospite, di sequenze regolatrici dell'espressione, sulla capacità replicativa *in vivo* sia in cellule batteriche sia in cellule umane, sulla costruzione dell'intero plasmide e sull'origine e storia del ceppo batterico ospite;
- descrizione del razionale scientifico alla base dell'uso del/i gene e del ceppo batterico ospite;
- sequenza completa del plasmide, mappa di restrizione informativa della posizione e dimensione relativa delle varie parti del plasmide;

- dati sulla presenza di eventuali contaminanti quali RNA, proteine e DNA dell'ospite batterico, sulla quantità di DNA rilassato e superavvolto nella preparazione e sulla presenza di sostanze chimiche tossiche.

Nel caso in cui venga usata la selezione con antibiotici, si raccomanda di evitare penicillina e altri antibiotici beta-lattamici; inoltre è preferibile evitare marcatori che conferiscono resistenza ad antibiotici che abbiano un uso clinico significativo.

Dovrà essere determinata la sequenza completa del plasmide dalla banca batterica di lavoro utilizzata per la produzione del medicinale sperimentale. Per assicurarsi che sia mantenuta la sequenza corretta del plasmide che contiene il gene inserito, dovranno essere forniti dati sulla stabilità del plasmide nella cellula batterica durante la fermentazione. Ciascun lotto di plasmide prodotto dovrà essere analizzato mediante mappa di restrizione con enzimi multipli e informativi.

I vettori plasmidici possono essere somministrati insieme a preparazioni di lipidi, anestetici locali, adiuvanti o altre sostanze chimiche che ne facilitino la capacità trasfettante. Se questi agenti vengono utilizzati durante la formulazione, ne dovranno essere determinate la qualità, quantità e identità nel prodotto finale.

3.3 Vettori virali

Questa sezione dovrà contenere informazioni relative a:

- origine del vettore da impiegare e provenienza degli stock virali. Descrizione dettagliata delle modifiche apportate al vettore e rationale per la loro introduzione;
- descrizione delle modifiche del vettore che ne impediscono la replicazione e riducono la probabilità di ricombinazione con virus selvatici.

Allo stato attuale delle conoscenze, nel caso in cui venga proposto l'uso di un vettore virale competente per la replicazione, è indispensabile un'approfondita

discussione e giustificazione dei motivi che lo richiedono, basata su dati preclinici.

- Descrizione dei metodi di amplificazione dei vettori virali e delle cellule mediante le quali tale amplificazione viene condotta. Se la propagazione virale richiede la coinfezione della linea di impaccettamento con un virus *helper* o l'introduzione di altro materiale genetico, descrizione delle modalità di rimozione di eventuali virioni, proteine virali o materiale genetico indesiderati dal prodotto finale;
- presentazione delle sequenze codificanti proteine costituenti del vettore ma che non siano codificate nell'acido nucleico da esso contenuto, come nel caso di virus difettivi; le sequenze presentate devono derivare da una procedura sperimentale di sequenziamento del materiale effettivamente utilizzato per la produzione del prodotto. Dati bibliografici non saranno presi in considerazione;
- documentazione circa l'origine e le caratteristiche biologiche del virus parentale; dettagliata descrizione, caratterizzazione e identificazione delle sequenze terapeutiche inserite, siano esse codificanti o regolatorie. Tutte le sequenze virali modificate per la costruzione del vettore andranno indicate e caratterizzate almeno attraverso adeguate analisi di restrizione. Nel caso dei vettori retro- e lentivirali, nonché dei vettori adeno-associati e dei vettori *amplicon*, è richiesta la verifica sperimentale della sequenza dell'intero vettore;
- descrizione del rationale scientifico alla base della scelta del vettore virale per la patologia considerata. Nel caso in cui saranno preferiti vettori virali competenti per la replicazione, è richiesta un'approfondita giustificazione basata su consolidati dati scientifici. In particolare, andranno considerati i seguenti punti: a) motivazione della necessità della competenza per la replicazione del vettore virale ai fini dell'efficacia del medicinale sperimentale; b) dimostrazione dell'assenza di elementi genetici potenzialmente coinvolti in processi oncogenetici se non giustificati dall'approccio sperimentale; c) se il virus parentale ha proprietà patogenetiche, indicazione del tipo di manipolazioni genetiche effettuate per eliminare l'effetto patogenetico dal prodotto finito oppure delle misure terapeutiche disponibili; d) indicazione dei tessuti dove ci si aspetta la replicazione del vettore, fornendo evidenze che confermino l'ipotesi; e) valutazione della sicurezza d'uso, oltre che per il paziente, anche per gli operatori sanitari e per la popolazione umana in generale.

Nel caso di vettori virali non competenti per la replicazione, questi devono necessariamente essere prodotti attraverso l'espressione delle funzioni difettive nel



vettore in adatte linee cellulari (*packaging cells*). Saranno quindi richieste l'origine e le caratteristiche delle *packaging cells*, nonché la descrizione, caratterizzazione e sequenziamento (quest'ultimo solo nel caso di vettori retrovirali e lentivirali) di tutti i costrutti molecolari che forniscono le funzioni difettive al vettore virale.

Particolare attenzione dovrà essere rivolta nel ridurre al minimo la possibilità di eventi di ricombinazione in grado di generare particelle virali competenti per la replicazione (Replication Competent Virus - RCV), nonché alle relative metodiche di saggio. In questa prospettiva, andranno eliminate tutte quelle sequenze virali non necessarie per la produzione/espressione del vettore virale. Andranno altresì ridotte al minimo tutte quelle sequenze che presentano omologie conosciute con virus competenti per la replicazione o con virus endogeni umani. In particolare, nel caso di vettori retrovirali, andrà eliminata ogni omologia di sequenza tra il vettore e i costrutti *packaging*, potenzialmente in grado di originare retrovirus competenti per la replicazione attraverso eventi di ricombinazione. Con lo stesso criterio, sarà anche necessario che le diverse funzioni *packaging* vengano espresse il più possibile da vettori indipendenti.

I genomi retro- e lentivirali presentano all'estremità 3' una sequenza regolatoria/promotrice (3'LTR) che, una volta inserita nel genoma delle cellule ospite, è potenzialmente in grado di promuovere l'espressione di geni cellulari adiacenti. Per escludere ragionevolmente questa possibilità, si raccomanda che i vettori retro- e lentivirali siano costruiti in modo tale che, una volta integrati, perdano qualsiasi funzione regolatoria/promotrice alla propria estremità 3'.

3.4 Cellule geneticamente modificate

Il tipo di cellule che si vuole ingegnerizzare deve essere classificato come autologo, allogenico o xenogenico. Nel caso di cellule allogeniche, i donatori dovranno soddisfare i vigenti requisiti nazionali relativi alle donazioni di sangue e organi/tessuti. Sarà necessario indicare il tessuto di provenienza e fornire altre eventuali informazioni rilevanti.

Le procedure di prelievo e di coltura cellulare dovranno essere descritte nei passaggi più importanti.

Le cellule dovranno essere gestite come lotti o banche cellulari e, pertanto, dovranno essere sottoposte a controlli di qualità e a procedure di rilascio prima della trasduzione genica. Nel caso di cellule autologhe,

quando un tale sistema non sia applicabile, deve essere stabilito un programma di controlli in accettazione. Approcci diversi dovranno essere giustificati.

I controlli di qualità da eseguire prima della trasduzione genica sono quelli richiesti dalla linea guida sulla terapia cellulare somatica, che pertanto andrà consultata in parallelo alla presente linea guida. In casi specifici potranno essere necessari saggi aggiuntivi.

Sulle cellule trasdotte, dovrà essere descritta e giustificata qualsiasi alterazione nel cariotipo, nella morfologia, nelle funzioni o nel comportamento (ad esempio, capacità di migrazione) rispetto alle cellule non geneticamente modificate.

È essenziale la dimostrazione di assenza di contaminazione da agenti avventizi quali virus, batteri (compresi i micoplasmi) e funghi.

Nel caso di cellule trasdotte con vettori virali difettivi, dovrà essere dimostrata l'assenza di vettore replicativo. Dovrà essere controllata la possibile riattivazione di virus latenti (ad esempio, herpes, Epstein-Barr, citomegalovirus). Andrà, inoltre, considerata la possibilità che la modificazione introdotta alteri l'immunogenicità delle cellule, ad esempio a causa dell'espressione di proteine non umane o di proteine precedentemente non espresse a causa dello specifico difetto genetico del paziente.

Nel caso di cellule autologhe, qualora per ragioni cliniche non sia possibile eseguire tali studi di caratterizzazione sul materiale prelevato dal paziente, sarà necessario che tale caratterizzazione sia eseguita su una popolazione cellulare il più possibile simile.

3.5 Processo di produzione

La produzione dovrà avvenire in conformità alle Norme di Buona Fabbricazione applicabili.

Banche cellulari - Il processo di produzione deve avvenire tramite un sistema di banche cellulari a due braccia, *Master Cell Bank* (MCB) e *Working Cell Bank* (WCB). Un diverso approccio deve essere opportunamente giustificato.

Master Cell Bank - La caratterizzazione della banca cellulare dovrà includere le seguenti informazioni:

1. origine e storia delle linee cellulari utilizzate;
2. protocolli di congelamento e scongelamento delle cellule, specificando i materiali utilizzati;
3. numero di lotti, numero di fiale/lotto e condizioni di conservazione;
4. conferma dell'identità delle cellule attraverso l'analisi di opportuni marcatori genotipici o fenotipici. La frazione di cellule positive verrà fornita co-

“
La produzione di cellule deve avvenire tramite banche cellulari: *Master Cell Bank* e *Working Cell Bank*
”

me indicatore di purezza. Sarà necessario fornire una mappa di restrizione del vettore con il gene da esprimere e/o un saggio di attività della proteina codificata dal gene trasdotto;

5. saggi per la presenza di organismi contaminanti, quali funghi, virus diversi dal vettore trasdotto, micoplasma, batteri e virus competenti per la replicazione, salvo laddove specificato;
6. saggi sulle cellule dopo scongelamento: sterilità, vitalità, identità e funzione dovranno essere confermate paragonando le cellule fresche con le cellule dopo scongelamento;
7. data di scadenza: studi di stabilità dovranno dimostrare una vitalità accettabile al momento dello scongelamento.

Working Cell Bank (WCB) - La banca cellulare di lavoro dovrà essere caratterizzata per dimostrare omogeneità e stabilità rispetto alla MCB. La presenza e l'integrità del costrutto dovranno essere confermate mediante una mappa di restrizione e/o l'attività della proteina. È essenziale inoltre dimostrare l'assenza di contaminazione da agenti avventizi.

Caratterizzazione delle linee cellulari di impacchettamento di vettori virali - Dovranno essere forniti tutti i dettagli sulla linea cellulare originaria e sulle modifiche apportate per la costruzione della cellula ricevente per il *packaging*, compreso il tipo e la localizzazione del virus *helper* e la presenza di particelle virali endogene.

Il punto più importante da tenere sotto controllo è la possibile riacquisizione della competenza per la replicazione attraverso eventi di ricombinazione o complementazione. Deve essere valutata la possibilità di eventi di ricombinazione *in vivo* qualora la sequenza del vettore abbia delle omologie con la sequenza genetica.

Reagenti - Descrizione del grado di qualità di tutti i reagenti utilizzati in tutte le fasi della produzione, dalla MCB al prodotto finito.

I reagenti di origine animale dovranno essere conformi alle vigenti normative sull'encefalopatia spongiforme trasmissibile e dovranno essere saggiati per la presenza di agenti avventizi; per tutti i reagenti di origine biologica dovranno essere allegati i certificati di analisi.

Nel caso di reagenti di origine biologica non autorizzati per l'uso clinico, sarà necessario descrivere dettagliatamente il processo di produzione, i controlli eseguiti sui lotti e allegare il certificato di qualità.

È da evitare l'uso di sostanze che possano sensibilizzare alcuni individui (quali gli antibiotici β -lattamici) o possiedano pronunciata tossicità.

Produzione e purificazione - Descrizione dettagliata delle varie fasi (coltura cellulare/fermentazione, raccolta, purificazione, formulazione).

Descrizione e dati sperimentali della convalida del processo per l'assenza di virus avventizi contaminanti. In assenza di tale convalida, tutti i lotti dovranno essere sottoposti al controllo della contaminazione da virus avventizi.

La riproducibilità del processo di produzione sarà valutata su almeno 3 lotti diversi, alla stessa scala dello studio clinico. Nel caso in cui lo sponsor dichiari di produrre un solo lotto, dovrà dimostrare che esso sarà sufficiente per l'intero protocollo clinico previsto.

Per il processo di produzione delle cellule geneticamente modificate è richiesta la convalida completa del processo (da ripetere periodicamente) nel caso in cui i lotti di medicinale sperimentale non possano essere sottoposti a saggi di sterilità, contaminazione da micoplasma, presenza di virus competente per la replicazione (RCV), ai fini del rilascio.

3.6 Prodotto finale

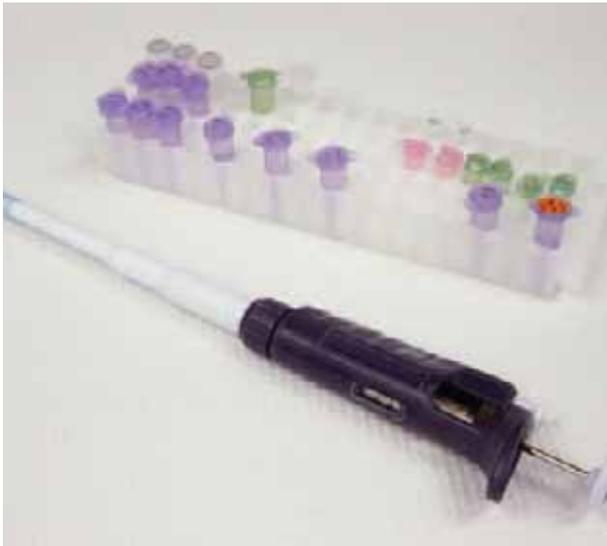
Preparazione dei diversi lotti e relativi controlli - Controlli di qualità dovranno essere effettuati sul prodotto finale ai fini del rilascio del lotto per l'uso clinico.

I saggi selezionati dovranno dimostrare: l'identità, il grado di purezza minimo accettabile, la quantità per dose clinica, l'attività biologica (efficienza di trasferimento e/o espressione del gene terapeutico), la sterilità, l'assenza di micoplasmi, di endotossine, di virus avventizi (se il processo non è stato convalidato per questo aspetto). Secondo il tipo di prodotto e di processo, eventuali contaminanti tossici derivati dal processo di produzione dovranno essere quantificati fissandone un limite di accettabilità.

Per i vettori virali, dovrà essere determinato il rapporto infettività/numero di particelle e definito il più basso limite accettabile. Nel caso di vettori virali difettivi per la replicazione, dovrà essere valutata la presenza di RCV mediante saggi di sensibilità adeguata in rapporto alle dosi cliniche proposte. Nel caso di vettori retro- o lentivirali, la presenza di RCV determinerà il rifiuto dell'intero lotto. Nel caso di altri vettori, il limite di accettabilità sarà determinato in base a dati preclinici.

Nel caso di cellule geneticamente modificate, i saggi da eseguire per il rilascio del lotto comprenderanno: identità, omogeneità/purezza della popolazione, nu-

Ai fini del rilascio del lotto per l'uso clinico, il prodotto finale sarà sottoposto a controlli di qualità



mero di cellule per dose, fenotipo, vitalità, sterilità, assenza di contaminazione da virus avventizi (se il processo non è stato convalidato per questo aspetto), assenza di micoplasmi e di endotossine, assenza di RCV, capacità proliferativa o risposta a fattori di crescita (secondo i casi), espressione del gene terapeutico.

Nel caso in cui alcuni di questi saggi non possano essere eseguiti sul prodotto finale, per scarsità di cellule nel caso di prodotto autologo oppure per il breve intervallo di tempo tra preparazione e utilizzo clinico, in aggiunta alla convalida completa del processo come richiesto nel paragrafo precedente, sarà necessario che ogni lotto sia sottoposto ad alcuni rapidi saggi che diano informazioni sulla qualità della preparazione (ad esempio, vitalità, purezza microbiologica microscopica, fenotipo, quantità) e che vengano prelevati campioni per eseguire i saggi a lungo termine, se la quantità di cellule disponibili lo permette. La determinazione di RCV con metodo molecolare deve comunque sempre essere eseguita su tutti i lotti.

3.7 Metodi di saggio

Questa sezione comprende le descrizioni:

- di tutti i metodi usati per il rilascio dei lotti; descrizione e dati sperimentali della convalida dei metodi per la sicurezza (ad esempio, presenza di RCV, micoplasmi, sterilità, virus avventizi) almeno per gli aspetti principali (ad esempio, secondo il metodo: limite di sensibilità, ripetibilità, intervallo di lavoro, specificità);
- degli standard di riferimento usati, della loro preparazione e controllo di qualità; allegare il certificato di analisi;
- di tutti i metodi usati per il monitoraggio di sicurezza dei pazienti e dei loro contatti, con relativa convalida se diversi da quelli usati per il rilascio dei lotti.

Si raccomanda di utilizzare metodi di saggio della Farmacopea Europea o Ufficiale Italiana, se disponibili. Di questi metodi non sarà necessario allegare descrizione o convalida, ma solo l'indicazione della monografia seguita.

3.8 Stabilità del medicinale sperimentale

Dovrà essere iniziato un programma di stabilità che permetta di assegnare al medicinale sperimentale una scadenza alle previste condizioni di conservazione. Nel caso di produzione di un singolo lotto, tale scadenza, basata sui dati sperimentali disponibili, dovrà essere tale da coprire l'intera sperimentazione.

4 REQUISITI DI TOLLERABILITÀ

4.1 Valutazione farmacotossicologica preclinica

Considerazioni generali - Per questi medicinali sperimentali, che contengono acidi nucleici e altro materiale biologico, si applicano molte delle considerazioni di sicurezza dei prodotti medicinali derivati da biotecnologie (consultare la *Note for Guidance CPMP/ICH/302/95* - <http://www.emea.eu.int/>).

La mancanza o l'impossibilità della conduzione degli studi preclinici di seguito descritti deve essere giustificata specificamente per il medicinale sperimentale oggetto della richiesta.

Tutti gli studi di sicurezza, ad eccezione di quelli di farmacodinamica primaria, dovranno essere condotti in conformità con le vigenti Buone Pratiche di Laboratorio.

Riconoscendo la varietà delle strategie utilizzabili per terapia genica, la valutazione verrà in generale condotta caso per caso.

Poiché la comprensione delle caratteristiche del prodotto in esame è prioritaria al fine di valutare gli studi preclinici, riferimenti incrociati fra le parti di qualità e preclinica sono inevitabili. La tipologia e la quantità delle informazioni da presentare in questa sezione dipenderà dalla natura del medicinale sperimentale per terapia genica, dall'uso clinico proposto e dalla durata del trattamento, nonché dalla popolazione di pazienti da trattare. In ogni caso, come minimo dovranno essere fornite informazioni sul tipo di vettore e sulla sua capacità replicativa, sul gene terapeutico e sulla regolazione dell'espressione genica, sui prodotti genici previsti dalla costruzione del vettore, sulla formulazione e su eventuali impurezze presenti nel prodotto per uso clinico.

Il prodotto da usare per i saggi descritti in questa sezione deve essere costituito da un lotto rappresentativo della produzione da usarsi nel protocollo cli-

“ Un programma di stabilità assegnerà una scadenza al medicinale sperimentale ”



nico proposto. Eventuali deviazioni da questo approccio devono essere giustificate con dati sperimentali.

Tutti gli studi di tossicità e di localizzazione di seguito descritti devono essere condotti inoculando negli animali (o nelle cellule se si tratta di studi *in vitro*) il medicinale sperimentale nella sua formulazione finale, poiché materiali aggiuntivi (come liposomi), cambiamenti nel pH o nel contenuto salino possono alterare la tossicità o il profilo di distribuzione. Non si può tuttavia escludere che per certi tipi di prodotto sia necessario anche eseguire studi separati per le componenti singole.

Tutti gli studi di seguito descritti devono indagare la presenza, persistenza, attività non solo del vettore ma anche del gene terapeutico, salvo motivate eccezioni. Pertanto con il termine "materiale genetico" si intenderà di seguito il complesso vettore-gene terapeutico.

Se risulta possibile una sperimentazione su modelli preclinici animali, vanno considerati il problema della selezione della specie e il suo stato fisiologico o patologico e il sistema di liberazione del prodotto utilizzando lo stesso regime di trattamento che per l'uomo, ove possibile.

Tossicità dopo somministrazione singola e ripetuta, comportamento cinetico e tollerabilità locale - Questi dati non sono ritenuti necessari se viene fornita adeguata dimostrazione che il composto in esame non penetra la circolazione sistemica, ma resta circoscritto nell'area limitrofa al punto di somministrazione.

In assenza di tale dimostrazione, i dati da presentare in questa sezione devono fornire tutte le informazioni potenzialmente ottenibili con uno studio a dose singola, ad esempio esaminando contemporaneamente anche aspetti di farmacologia generale (analisi dei parametri cardiocircolatori, respiratori e del sistema nervoso centrale - SNC). La via di somministrazione deve essere quella proposta per l'uso clinico e assicurare la massima esposizione sistemica.

Studi di tossicità ripetuta sono richiesti qualora il protocollo clinico preveda dosi multiple nell'uomo. La scelta della durata degli studi ripetuti deve rispecchiare, se possibile, lo schema di trattamento clinico. La durata della fase di recupero deve essere basata sulla persistenza del gene e dalla sua espressione.

Dovranno inoltre essere inclusi studi volti a fornire informazioni sulla cinetica di distribuzione del prodotto e la sua presenza in organi non bersaglio, in particolare la linea germinale, la persistenza sia del materiale genetico che del suo prodotto nei vari tessuti, la possibile mobilizzazione, nonché la possibilità di disseminazione (*shedding*). Andranno anche fornite informazioni sul prodotto di espressione del gene e sulla cinetica di eventuali altri composti presenti nel medicinale sperimentale in esame. Nel caso in cui il prodotto sia costituito da vettori virali capaci di replicarsi, sarà necessario confermare che la capacità replicativa sia confinata come atteso in base al disegno molecolare del vettore. Nel caso di cellule trasdotte con vettori replicativi, si dovrà dimostrare per quanto tempo si mantiene attiva la replicazione.

Anche la tollerabilità locale, se necessaria, potrà essere analizzata nello stesso modello utilizzato per lo studio preclinico di tossicità.

Immunogenicità e immunotossicità - Tali studi hanno lo scopo di indagare se il medicinale sperimentale possa causare effetti a carico del sistema immunitario.

Immunogenicità - Per valutare il potenziale immunogenico associato alla terapia dovranno essere fornite indicazioni sul tipo di risposta immune (cellulo-mediata ed immunoglobulinica) indotta da:

- prodotto/proteina di cui si intende stabilire espressione e/o funzione;
- elementi che compongono il medicinale sperimentale (acido nucleico libero o complessato, proteine virali, cellule geneticamente modificate).

In questa analisi si dovrà inoltre considerare se la sintesi del prodotto possa dar luogo a nuove conformazioni molecolari potenzialmente immunogeniche (epitopi) diverse e distinte da quelle prevedibilmente presenti in ogni singolo elemento che compone il medicinale sperimentale.

Nel quadro delle immunoreazioni originate dalla somministrazione di un medicinale sperimentale per terapia genica, bisognerà considerare inoltre se, parallelamente ad una risposta immune specifica, possano prodursi alterazioni immunologiche di tipo generalizzato (risposte infiammatorie croniche, autoimmunità, ridotte capacità delle varie sottopopolazioni linfocitarie) comprese modificazioni funzionali della rete dei mediatori linfocinici/chemocinici.

Dovrebbero quindi essere fornite informazioni concernenti:

- presenza di immunoglobuline specificamente dirette verso il medicinale sperimentale somministrato ed il/i prodotto/i genico/i relativo/i;
- eventuale presenza di una risposta immune cellulo-mediata diretta verso componenti proteiche dei vettori virali.

È da tener presente che l'insieme di queste osservazioni potranno costituire un importante criterio di inclusione o esclusione del paziente nella sperimentazione clinica.

Inoltre dovranno essere forniti dati sul quadro ematologico (conta delle cellule, rapporto fra varie popolazioni cellulari/linfocitarie).

Qualora nel corso della terapia e/o a seguito di somministrazioni ripetute si verificassero significative alterazioni del quadro ematologico, delle popolazioni linfocitarie e/o del livello sierico di immunoglobuline specifiche, sono consigliabili ulteriori studi che consentano di ottenere informazioni sulla funzionalità del sistema immune nel suo complesso. Questi possono eventualmente includere saggi (*in vitro*) atti a verificare:

1. attività citotossica naturale (NK);
2. risposta proliferativa delle popolazioni linfocitarie a stimoli aspecifici o specifici ed eventuale valutazione delle linfocine prodotte;
3. funzione macrofagica;
4. presenza di cellule T citotossiche specifiche;
5. tassi sierici di particolari classi di linfocine.

Immunotossicità - Secondo le linee guida europee, l'approccio più corretto per questo tipo di studi è quello in serie successive (*tier approach*), che comporta una fase iniziale volta a valutare come somministrazioni singole e/o ripetute alterino una serie di parametri che includono il quadro ematologico dell'animale, le dimensioni (peso) degli organi linfoidi, l'istologia dei tessuti linfatici; la distribuzione delle cellule del midollo osseo, delle varie popolazioni linfocitarie e, infine, l'attività NK. Se gli ultimi due saggi non fossero praticabili, gli studi possono essere completati verificando la risposta anticorpale primaria a un antigene che stimola una risposta di tipo T.

In presenza di una significativa alterazione dei parametri sopra elencati si potrebbe ricorrere all'effettuazione di ulteriori saggi tesi a completare il quadro delle informazioni sull'immunotossicità del prodotto. Indicazioni sull'immunotossicità derivano da una valutazione complessiva delle alterazioni delle varie componenti del sistema immune, tenendo però sempre in

attenta considerazione lo stato generale delle condizioni di salute dell'animale preso in esame.

L'obiettivo principale di una seconda fase di studi consiste nel definire i fenomeni immunotossici in rapporto alle dosi di prodotto somministrate. Da questi studi possono derivare importanti indicazioni sul rischio di immunotossicità del medicinale e, in particolare, quale siano le alterazioni di stato e di funzione delle varie popolazioni cellulari del sistema immune. Qualora non fossero già disponibili dati sull'alterazione delle varie funzioni delle popolazioni linfocitarie e dell'attività NK, questi possono essere inclusi come parte degli studi di seconda fase.

Tossicità riproduttiva - Il grado di approfondimento di tali studi dovrà essere valutato caso per caso, in considerazione del tipo di medicinale sperimentale e della sua applicazione clinica. L'aspetto più rilevante è la localizzazione del medicinale sperimentale nelle gonadi e l'analisi di eventuale alterazione della linea germinale, determinabile negli studi di biodistribuzione.

Genotossicità/cancerogenicità - I saggi standard di genotossicità e gli studi di cancerogenesi non sono in generale applicabili ai medicinali sperimentali per terapia genica. Tuttavia gli studi di genotossicità possono essere richiesti in caso di presenza di specifiche impurezze o componenti del sistema di trasferimento genico (ad esempio, adiuvanti, veicolo, ecc.) delle quali non sia noto il potenziale genotossico.

Uno degli aspetti di maggiore preoccupazione inerente all'uso di medicinali sperimentali per terapia genica è il rischio di mutagenesi inserzionale. L'integrazione di materiale genetico esogeno nel genoma di cellule bersaglio può dare luogo a inattivazione di geni soppressori di tumori o a cis- o trans-attivazione di proto-oncogeni.

Lo studio dell'integrazione del materiale genetico potrà essere effettuato sui medesimi animali utilizzati per gli studi di tossicità. In casi specifici tale studio potrebbe essere svolto *in vitro*, su colture cellulari umane.

Dove possibile, in questi studi deve essere utilizzata la stessa via di somministrazione proposta per lo studio clinico. Gruppi di animali possono essere trattati anche per via intravenosa per fornire un modello di ampia disseminazione del materiale genetico.

L'analisi della distribuzione del materiale genetico nel sito di somministrazione e in tessuti distali deve includere la valutazione della persistenza del materiale genetico e della sua eventuale espressione. Dovrà inoltre essere valutato il rischio di trasferimento del

In caso di specifiche impurezze sono richiesti studi di genotossicità



materiale genetico alla linea germinale mediante esame delle gonadi di animali trattati. Nel caso sia rivelato un segnale nelle gonadi, dovranno essere condotti ulteriori studi per determinare se le sequenze siano presenti nelle cellule germinali o piuttosto in tessuti stromali. Le tecniche utilizzate dovranno avere sensibilità adeguata anche in relazione alla frequenza degli eventi di integrazione attesi.

Nel caso in cui si osservi una localizzazione aberrante o inattesa dovranno essere condotti studi per determinare se il gene è espresso e se la sua espressione è associata a effetti patologici.

L'introduzione di materiale genetico nell'uomo può comportare un rischio non trascurabile di mutagenesi inserzionale. Casi recenti indicano che effetti oncogeni della mutagenesi inserzionale non sono eventualità teoriche ma hanno una probabilità finita di verificarsi. Pertanto la documentazione fornita dovrà comprendere una valutazione dei rischi connessi alla mutagenesi inserzionale, che consideri il rapporto rischio-beneficio in relazione alla gravità della patologia da trattare. Tale valutazione dovrà tener conto di tutte le informazioni disponibili, inclusi possibilmente i dati quantitativi relativi all'integrazione del materiale genetico terapeutico derivanti dagli studi preclinici per la specifica terapia oggetto della richiesta.

Dovrà anche essere valutato il potenziale tumorigenico del prodotto genico espresso, ad esempio, l'espressione prolungata di un fattore di crescita o di un suo recettore. Non è possibile indicare un saggio generalmente applicabile per valutare il rischio cancerogeno di un prodotto genico. Tale valutazione sarà basata caso per caso sul complesso delle conoscenze possedute sullo specifico prodotto in esame. Nei casi in cui sia utilizzabile a questo scopo un saggio di trasformazione in colture cellulari, tale saggio dovrà essere condotto utilizzando lo specifico medicinale sperimentale proposto.

Farmacodinamica secondaria - I dati sono necessari solo se tali aspetti non siano stati presi in considerazione e analizzati in altri studi presentati a supporto della sicurezza del prodotto.

4.2 Valutazione preclinica della farmacodinamica

Dovranno essere eseguiti saggi che permettano di valutare:

- l'efficienza di trasferimento del vettore in cellule *in vitro*;
- il livello di espressione del materiale genetico introdotto;
- la presenza e l'attività biologica del prodotto genico atteso;
- le caratteristiche delle cellule bersaglio;
- la trascrizione tessuto-specifica, se attesa in base al disegno molecolare del vettore;
- l'inducibilità del gene, se attesa in base al disegno molecolare del vettore;
- la correzione del fenotipo patologico, se applicabile.

Si dovrà monitorare la variabilità del sistema biologico vettore/cellule riceventi, in particolare quando le cellule hanno diversa origine e quando si segue l'espressione a lungo termine del materiale genetico transfettato.

Ove possibile, sarebbe utile individuare opportune unità di misura dell'efficacia, ad esempio per unità di massa del DNA, al fine di caratterizzare l'attività specifica del prodotto, indicandone i limiti accettabili di variabilità.

Nel caso di vettori virali deficienti per la replicazione andrà determinata, se possibile, l'infettività in rapporto al numero di particelle.

Nel caso di vettori virali capaci di replicarsi, sarà necessario confermare che la capacità replicativa sia confinata come atteso in base al disegno molecolare del vettore. Nel caso di cellule trasdotte con vettori replicativi, si dovrà dimostrare per quanto tempo si mantiene attiva la replicazione.

5. REQUISITI DEL PROTOCOLLO CLINICO

5.1 Indicazioni dettagliate relativamente ai punti di seguito riportati

Protocollo

1. Sponsor e responsabile scientifico della sperimentazione clinica;
2. tipo di sperimentazione (studio monocentrico o multicentrico, estensione nazionale o internazionale);
3. basi razionali che motivano il ricorso alla terapia genica, in assenza di terapie standard adeguate. In

particolare, deve essere presentata una valutazione del rapporto rischio/beneficio, almeno quello che può essere atteso sulla base di una serie di considerazioni teoriche e di dati della letteratura e degli studi preclinici;

4. dichiarazione che tutta la sperimentazione clinica verrà effettuata secondo le vigenti Buone Pratiche Cliniche;
5. piano di sviluppo clinico. Esso dovrebbe essere basato sui risultati ottenuti da studi farmacologici e tossicologici preclinici: le modalità di somministrazione del prodotto di trasferimento genico (inoculo loco-regionale o inoculo per via sistemica), la scelta delle dosi da somministrare, del programma di trattamento e del monitoraggio di eventuali reazioni avverse o indesiderate dovrebbero essere giustificati dal risultato della sperimentazione preclinica. In molti casi non esistono modelli animali che consentano un corretto inquadramento dell'attività proposta in clinica e quindi non esistono delle condizioni rigorose per determinare la dose iniziale da utilizzare nello studio clinico. In presenza di queste limitazioni, lo sperimentatore dovrà fornire tutti quegli elementi relativi al meccanismo d'azione e alle caratteristiche del prodotto di trasferimento genico che consentano di giustificare il piano di sviluppo clinico adottato;
6. analisi dei potenziali rischi connessi con l'utilizzo del particolare tipo di vettore genico o di modalità di trasferimento genico. Questa analisi de-

ve essere basata non solo sui dati preclinici, ma anche su tutti i dati di letteratura disponibili per quel vettore genico o, in mancanza di tali dati, per vettori genici simili. Raccomandazioni per eventuali sistemi contraccettivi potrebbero essere prese in considerazione;

7. indicazioni precise e dettagliate su forma, modalità e tempi di somministrazione;
8. giustificazione della scelta del numero di soggetti da arruolare e di eventuali differenze nella forma, modalità e tempi di somministrazione tra gruppi di soggetti;
9. eventuale simultaneo trattamento con terapie convenzionali o loro sospensione;
10. nel caso di malattie tumorali o nel caso di potenziale tumorigenicità dei vettori o delle cellule modificate usate per il trasferimento genico, indicazione delle misure intese a ridurre o eliminare le cellule neoplastiche;
11. *end points* biochimici, fisiologici, patologici o clinici della sperimentazione.

“
Il protocollo clinico deve includere studi sulla farmacologia umana aventi uno o più obiettivi
”

Schema di trattamento - Negli studi di fase I iniziali che implicano una procedura che abbia carattere innovativo (o per il tipo di vettore utilizzato, o per il transgene implicato, o per la modalità d'inoculo, o per il tipo di patologia da trattare) è auspicabile che si parta con una singola somministrazione del medicinale sperimentale di terapia genica. Questa fase può essere poi seguita da una fase nella quale vengono previste molteplici somministrazioni. Per ogni modalità o dose di principio attivo è importante che vengano arruolati almeno tre pazienti.

Studi di farmacodinamica - Il protocollo clinico deve includere necessariamente studi di farmacologia umana che devono avere uno o più dei seguenti obiettivi:

- definire la dose del medicinale sperimentale di terapia genica;
- convalidare la scelta della via di somministrazione utilizzata;
- studiare, se appropriato, la biodistribuzione del vettore;
- determinare se il tropismo del vettore e/o l'espressione del transgene siano in accordo con quanto atteso;
- determinare il livello di espressione genica del vettore e, in particolare, del transgene e determinarne





la durata nel tempo. Nel caso dei vaccini a DNA, il tipo di risposta immune indotta dalla vaccinazione dovrebbe essere considerata come parte dei parametri di valutazione dell'efficacia del medicinale sperimentale di terapia genica;

- valutare effetti collaterali a breve termine associati con la somministrazione del medicinale sperimentale di terapia genica, classificati secondo le tabelle dell'OMS;
- definire le condizioni per una eventuale sospensione del trattamento.

Piano dei controlli sui pazienti

- Piano temporale e descrizione dettagliata degli accertamenti da eseguire su ogni paziente. Descrizione delle procedure cliniche e dei saggi necessari per monitorare gli effetti della sperimentazione;
- per gli studi che prevedono somministrazione del vettore virale o non virale direttamente nel paziente senza trasduzione *ex vivo* di cellule: descrizione delle modalità con cui viene seguito l'inserimento del gene terapeutico e la sua espressione nelle cellule bersaglio del soggetto, e delle tecniche con le quali ne verrà accertato il confinamento alle cellule bersaglio;
- nel caso di trattamento *in vivo* con vettori virali difettivi: descrizione delle modalità di accertamento di fenomeni di disseminazione e presenza di forme competenti per la replicazione nei tessuti del paziente;
- nel caso di trattamento *in vivo* con vettori virali competenti per la replicazione: descrizione delle modalità di accertamento di fenomeni di disseminazione e di replicazione al di fuori di quella prevista; discussione della sicurezza d'uso per il paziente, per gli operatori sanitari, per la popolazione umana in genere e per l'ambiente;

“ Il protocollo clinico considera le conseguenze dell'uso di medicinali sperimentali per la terapia genica ”

- nel caso di trattamento *in vivo* con vettori derivanti da virus patogeni: descrizione delle modalità di accertamento di eventi di riformazione *in vivo* in seguito ad eventi di ricombinazione di forme virali *wild-type*, che hanno o che possono ripristinare il loro potere patogeno in seguito a questi eventi;
- nel caso di terapia genica basata sul trattamento con cellule trasdotte *ex vivo*: descrizione delle modalità di accertamento dell'eventuale rilascio *in vivo* del vettore endogeno e del piano di monitoraggio per accertare l'integrazione del vettore (vedi paragrafo “Mutagenesi inserzionale”);
- monitorare i pazienti da un punto di vista immunologico per valutare l'insorgenza di eventuali reazioni immunologiche indotte da: (a) sistema cellulare utilizzato per il trasferimento genico (quando applicabile); (b) vettore genico o acido nucleico; (c) materiale genetico facente parte del vettore, incluso il transgene, a livello di proteina. I pazienti dovranno anche essere monitorati per quanto riguarda l'insorgenza di eventi di autoimmunità.

Reclutamento e selezione dei pazienti - I criteri d'inclusione e di esclusione dei pazienti dovranno essere descritti in dettaglio secondo i criteri adottati per gli studi clinici di fase I. Nell'ambito dei criteri d'inclusione e di esclusione particolare attenzione dovrà essere posta: (a) all'eliminazione dei rischi di trasferimento del materiale genetico alla linea germinale e al feto; (b) allo stato immunitario dei soggetti in relazione al vettore virale utilizzato e con la consapevolezza che l'arruolamento di bambini è consentito solo quando strettamente indispensabile e non sia possibile ottenere le stesse informazioni o gli stessi risultati con soggetti adulti o con metodi alternativi.

Follow up - Indicare le modalità con cui il soggetto verrà seguito, una volta finita la sperimentazione, con quale frequenza, per quale durata e a quali esami verrà sottoposto.

5.2 Note importanti da considerare

Possibili conseguenze indesiderate derivanti dall'uso clinico di medicinali sperimentali per terapia genica da considerare attentamente nella valutazione del protocollo clinico.

Mutagenesi inserzionale - L'integrazione di materiale genetico esogeno nel genoma di cellule bersaglio può dar luogo a una serie di fenomeni indesiderati quali:

- inattivazione di un gene soppressore di tumori;
- *cis* - o trans-attivazione di proto-oncogeni o altri geni capaci di promuovere proliferazione cellulare;
- variazioni nella capacità delle cellule a rispondere ad agenti quali fattori di crescita, citochine o ormoni, con conseguente acquisizione di potenziale tumorigenicità.

L'insorgenza di eventi di mutagenesi inserzionale è stata osservata di recente in uno studio di terapia genica facente uso di cellule staminali emopoietiche trasdotte *ex vivo* con vettori retrovirali.

Nei protocolli che prevedono l'utilizzazione di cellule trasdotte *ex vivo* con vettori retrovirali o lentivirali, o comunque potenzialmente capaci di generare eventi di mutagenesi inserzionale, le condizioni di trasduzione e le dosi dovranno essere giustificate in rapporto ai dati di integrazione già disponibili e i pazienti dovranno essere sottoposti a monitoraggio per verificare l'inserzione del vettore.

Negli altri tipi di protocollo, la necessità di monitorare i pazienti per l'integrazione del vettore verrà valutata caso per caso.

In tutti i casi, tale monitoraggio non deve essere considerato un surrogato del controllo di effetti avversi del trattamento.

Riattivazione di virus latenti - Il protocollo clinico dovrà prendere in considerazione la possibile riattivazione nel paziente di virus latenti (quali *herpes*, Epstein-Barr, *citomegalovirus*) e prevedere relativi adeguati controlli sia nella selezione dei pazienti che nel periodo di osservazione successivo alla terapia.

Altrettanto vale per la possibilità di complementazione nel paziente di vettori virali deficienti per la replicazione per la presenza di virus endogeni.

Effetti immunitari - La sovra-espressione del gene terapeutico e/o di qualsiasi costituente del vettore genico, in particolare in organi o tessuti non-bersaglio, può



portare ad una attivazione indesiderata del sistema immunitario (ad esempio, risposte infiammatorie croniche, induzione di fenomeni di auto-immunità). Dovrà essere presa in considerazione l'immunogenicità del prodotto del gene introdotto, indipendentemente dal fatto che il meccanismo d'azione previsto sia mediato o meno dalla risposta immune.

Mobilizzazione del materiale genetico - Come è stato già evidenziato, la competenza alla replicazione virale recuperata *in vivo* in seguito a eventi di co- o super-infezione del paziente con virus correlati, oppure a seguito di eventi di ricombinazione con sequenze virali endogene, può portare alla mobilizzazione del materiale genetico verso cellule non-bersaglio (ad esempio, cellule della linea germinale) o alla sua diffusione al personale medico o para-medico, ai familiari del paziente o ad altri. Nel protocollo clinico dovranno essere descritte le procedure atte a riconoscere e minimizzare questi rischi.

5.3 Considerazioni in termini di salute pubblica

Dovranno essere considerati:

- quali sono le possibilità che il vettore contenente il materiale genetico possa propagarsi oltre il bersaglio previsto (ad esempio, diffusione di vettori competenti per la replicazione, ricombinazione con virus *helper*, ecc.);
- le misure preventive intese a minimizzare o eliminare il rischio di diffusione del prodotto ad altri individui come il personale medico infermieristico o nell'ambiente;
- quali saggi sono previsti per controllare un'eventuale diffusione del medicinale sperimentale al di fuori del soggetto della sperimentazione;
- se e per quanto tempo il paziente dovrà essere mantenuto in isolamento e in base a quali criteri potrà uscirne;
- i criteri di selezione del personale medico e para-medico che può venire in contatto col paziente e con suo materiale biologico;
- come tale personale viene informato sul protocollo sperimentale.
- eventuali accertamenti da eseguirsi sul personale.

5.4 Strutture cliniche e loro organizzazione

Si dovrà indicare il riferimento dell'autorizzazione all'uso confinato di MOGM (richiesto oppure già ottenuto) per le strutture cliniche in cui sarà svolta la sperimentazione.

5.5 Parere del Comitato etico locale

Se già disponibile, potrà essere incluso il parere del Comitato etico locale alla proposta di sperimentazione.

Alimentazione e longevità

Meno calorie per vivere più sani e più a lungo



Luigi Fontana

Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale, ISS

Riassunto - Le patologie cardiovascolari su base aterosclerotica sono le principali cause di morbidità e mortalità nei Paesi occidentali. In numerosi studi è stato dimostrato che la restrizione calorica è in grado di aumentare la vita massima di topi e ratti da laboratorio, anche del 30%, proteggendoli dal cancro. Tuttavia, finora, gli effetti di una cronica restrizione calorica sul metabolismo non erano mai stati valutati nell'uomo. In un recente studio, sono stati studiati 18 uomini che si sono sottoposti volontariamente a una dieta ipocalorica bilanciata per un periodo di 3-15 anni. I dati dimostrano come una cronica restrizione calorica sia in grado di migliorare drasticamente i più importanti fattori di rischio cardiovascolare: colesterolo totale, colesterolo LDL ed HDL, trigliceridi e pressione arteriosa. Nello studio si dimostra inoltre che la restrizione calorica svolge un potente effetto protettivo contro l'obesità e l'insulino-resistenza, e riduce infine l'infiammazione.

Parole chiave: restrizione calorica, malattie cardiovascolari, longevità

Summary (*Nutrition and longevity*) - Atherosclerotic arterial disease is the leading cause of morbidity and mortality in Western Societies. Research has consistently demonstrated that stringent calorie restriction (CR) can increase the lifespan of mice and rats by about 30% and protect them against cancer. However, until now the long-term effects of such dieting on metabolic health has not been carefully documented in lean human subjects. In a recent study, it has been carefully evaluated the metabolic profile of 18 men and women who underwent self-imposed well-balanced CR diet for 3 to 15 years. The data show that CR results in profound and sustained beneficial effect on the major atherosclerosis risk factors, serum total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol and triglyceride concentrations and blood pressure. They further show that CR provides a powerful protective effect against obesity and insulin resistance, and provide evidence for a decrease in inflammation.

Key words: calorie restriction, cardiovascular diseases, longevity

fontana@iss.it

In Europa e negli Stati Uniti è attualmente in corso una vera e propria epidemia di obesità. Secondo le ultimissime stime in Italia circa il 50% degli uomini e il 34% delle donne tra i 35 e i 74 anni sono in sovrappeso, mentre il 18% degli uomini e il 22% delle donne nella stessa fascia d'età sono obesi (1).

Negli ultimi anni è stata chiaramente dimostrata una stretta correlazione nell'uomo tra l'accumulo di grasso a livello addominale e la patogenesi della sindrome pluri-metabolica, caratterizzata da insulino-resistenza, iper-

insulinemia, diabete mellito di tipo 2, dislipidemia e ipertensione arteriosa. Tutti questi sono potenti fattori di rischio per l'inizio e la progressione della patologia aterosclerotica, e quindi per infarto del miocardio, ictus cerebrale e scompenso cardiaco (1).

L'accumulo di grasso viscerale, infatti, è un sensibile marker di bilancio energetico positivo, ovvero di un introito calorico cronicamente superiore alle necessità dell'organismo. Fino a qualche anno fa si pensava che gli adipociti fungessero da semplici e inerti magazzini dell'eccesso energetico sotto forma di trigliceridi, mobilizzabili in caso

In Italia il 50% degli uomini e il 34% delle donne sono in sovrappeso

di necessità. Negli ultimi anni, tuttavia, è emerso con chiarezza che il tessuto adiposo è un organo che produce importanti molecole dotate di un'azione sistemica, in grado d'influenzare pesantemente il rischio cardiovascolare (2).

Secondo le ultime informazioni elaborate dall'Osservatorio Epidemiologico Cardiovascolare Italiano dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS), relative al 1998, le patologie cardiovascolari rappresentano ancora la prima causa di morte, rendendo conto del 44% di tutti i decessi in Italia. Considerando gli anni potenziali di vita persi, cioè gli anni che ciascuna persona avrebbe potuto vivere in più secondo l'attuale speranza di vita media, le malattie cardiovascolari tolgono ogni anno circa 300 mila anni di vita alle persone di età inferiore ai 65 anni. Si stima che ogni 16 minuti si verifichi un nuovo caso d'infarto del miocardio nell'uomo, e ogni 48 minuti un nuovo caso nella donna. Inoltre, chi sopravvive a un infarto del miocardio o a un ictus cerebrale diventa purtroppo un malato cronico, con notevoli ripercussioni sulla qualità di vita e sui costi sanitari e sociali che la società deve sopportare. In Italia nel 2001 c'erano 423 000 titolari di pensione d'invalidità per patologia cardiovascolare, per una spesa complessiva di circa 2,7 miliardi di euro. I ricoveri ospedalieri sono anche dominati dalle dimensioni epi-

demiche delle malattie cardiovascolari: nel 1998 ci sono stati 167 949 ricoveri ospedalieri dovuti a coronaropatia. Infine, secondo la Relazione sullo Stato Sanitario del Paese redatta nel 2000, a fronte di una spesa farmaceutica italiana che si attesta all'1,34% del PIL, il 23,5% di essa è impiegata per i farmaci usati per la cura del sistema cardiovascolare, che rappresentano il 48% del consumo *pro-capite* di farmaci (3).

È stato ampiamente dimostrato che una dieta ipercalorica e una vita sedentaria sono i fattori responsabili dell'accumulo di grasso addominale, che, a sua volta, sta alla base di una cascata di eventi che aumenta drasticamente il rischio cardiovascolare. Per ridurre la situazione di cronico bilancio energetico positivo che sottende all'accumulo di grasso esistono due opzioni terapeutiche altamente efficaci ed economiche: la riduzione dell'introito calorico e/o l'incremento del consumo energetico tramite l'esercizio fisico.

È stato dimostrato negli animali da esperimento che entrambi gli interventi sono in grado di contrastare l'eccessivo accumulo di tessuto adiposo, e le deleterie conseguenze metaboliche a esso associate, prolungando la vita media. Tuttavia, solo la restrizione calorica (RC) si è dimostrata in grado di aumentare sia la vita media che la vita massima degli animali da esperimento (Figura) (4).

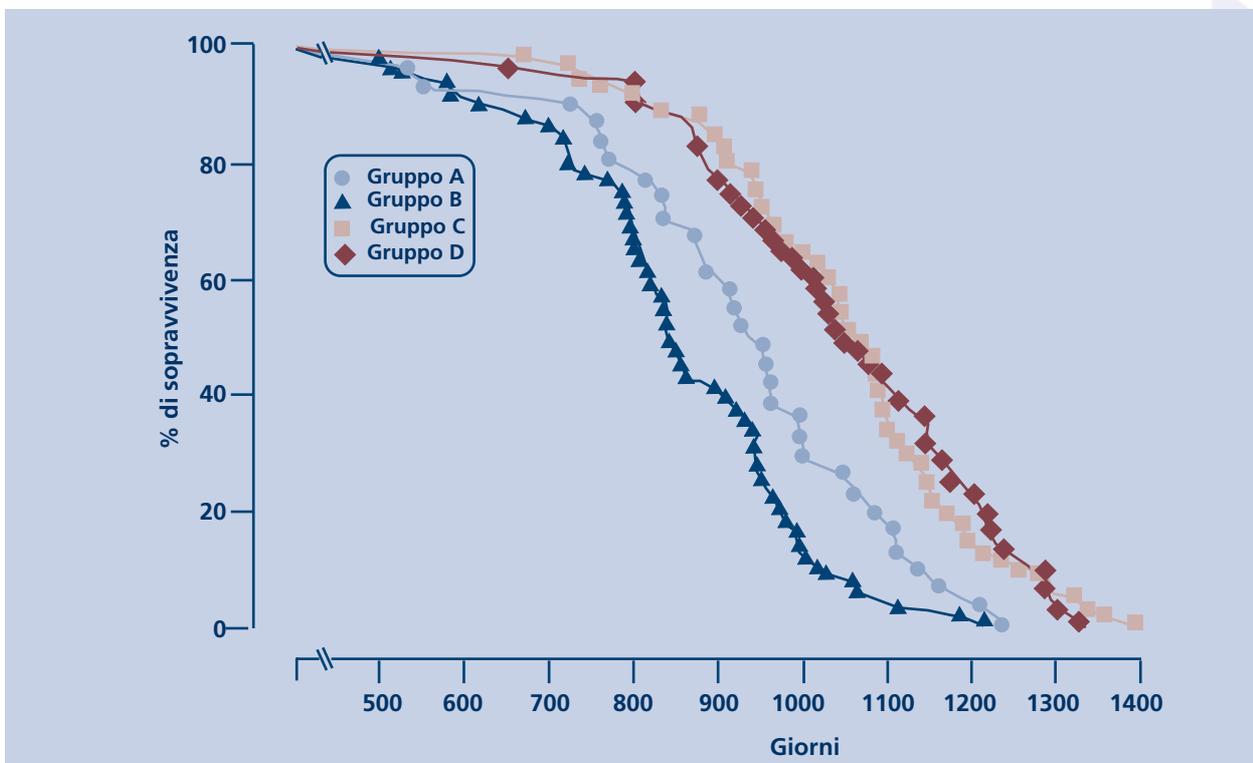


Figura - Curve di sopravvivenza dei 4 gruppi (3). La curva di sopravvivenza dei ratti sedentari di controllo nel gruppo B è significativamente differente da quella dei corridori nel gruppo A ($P < 0,02$), dei corridori in restrizione calorica nel gruppo C ($P < 0,0001$), e dei ratti sedentari in restrizione calorica nel gruppo D ($P < 0,0001$). Le curve di sopravvivenza dei ratti corridori nel gruppo A è significativamente differente da quella dei ratti corridori in restrizione calorica nel gruppo C ($P < 0,01$) e dei ratti sedentari in restrizione calorica nel gruppo D ($P < 0,01$)

Centinaia di studi scientifici condotti sui roditori hanno ormai sancito che la RC è un potentissimo intervento sperimentale in grado di allungare la durata massima della vita, anche del 30-40%, e di ridurre l'incidenza di cancro di questi mammiferi (5). Svitati studi su modelli animali hanno anche dimostrato un potente effetto della RC nel prevenire o ritardare un ampio spettro di malattie cronico-degenerative, tra cui il diabete mellito, alcune patologie renali, varie neoplasie e malattie autoimmuni. La RC è anche in grado di rallentare la perdita neuronale associata con l'invecchiamento in molti modelli murini di disordini neurodegenerativi come la malattia di Parkinson o la malattia di Alzheimer. Un regime cronico di RC è anche in grado di prevenire il declino psico-motorio e di memoria spaziale che normalmente si osserva durante l'invecchiamento, la perdita di spine dendritiche necessarie per l'apprendimento ed è in grado di migliorare la plasticità del cervello e la sua capacità di autoriparazione.

Alcuni studi in corso su primati non umani suggeriscono che la RC sia in grado d'indurre nelle scimmie le stesse modificazioni biologiche dimostrate sui roditori. In particolare, si è notato una riduzione dell'accumulo di grasso soprattutto a livello viscerale, una drastica riduzione dei valori pressori, della glicemia e insulinemia a digiuno, un netto miglioramento del profilo lipidico con un sensibile calo della trigliceridemia e un notevole miglioramento dell'insulino-resistenza.

Poco o nulla si conosce sugli effetti della RC nell'uomo. Durante la Seconda Guerra Mondiale in seguito alla scarsità di cibo in alcuni Paesi del Nord Europa, isolati dall'avanzata delle truppe naziste, si notò un drastico calo della mortalità per patologie cardiovascolari; quando la guerra terminò, la mortalità tornò rapidamente ai livelli pre-bellici. I dati ottenuti sugli 8 soggetti confinati nella Biosfera 2 (un'area ecologica chiusa, di 0,6 milioni di m³, situata vicino a Tucson, in Arizona) per due anni dimostrano che la RC è in grado di migliorare alcuni fattori di rischio cardiovascolari, tra cui la pressione arteriosa, i livelli plasmatici di colesterolo totale e di trigliceridi. Tuttavia, non esistono a nostra conoscenza dati scientifici circa gli effetti di un regime cronico di RC in individui che consumano una dieta varia ed equilibrata e che vivono e lavorano con successo nella società occidentale moderna.

In un recente lavoro, pubblicato sulla rivista scientifica americana *Proceedings of the National Academy of Sciences* (6), è stato dimostrato per la prima volta che un'alimentazione equilibrata, ma con poche calorie,

praticata per lungo tempo è in grado di ridurre drasticamente il rischio di sviluppare diabete mellito, ipertensione arteriosa e placche aterosclerotiche nelle arterie. Lo studio è stato condotto alla Washington University di St. Louis negli Stati Uniti, nell'ambito di un progetto di collaborazione con l'ISS, su un piccolo ma

“
Un'alimentazione equilibrata riduce il rischio di diabete mellito, ipertensione arteriosa e placche aterosclerotiche
”

prezioso numero di individui che stanno seguendo da molti anni un regime dietetico ipocalorico. Gli individui studiati sono per lo più professionisti di successo, professori universitari e manager di compagnie che “amano la vita” a tal punto che hanno deciso di rinunciare a un po' di calorie nella convinzione che ciò li farà vivere più a lungo e più sani.

Stanno seguendo questa particolare alimentazione per un periodo di tempo variabile tra i 3 e i 15 anni, e sono tutti seriamente intenzionati a continuare così per il resto della loro probabilmente lunga vita. La loro alimentazione è diversa, non solo in termini di apporto calorico, ma anche di composizione, da quella tipicamente occidentale dei 18 soggetti costituenti il gruppo di controllo. Nel primo gruppo, infatti, gli individui introducevano tra le 1 100 e le 1 950 calorie al giorno, distribuite in un 26% di proteine, un 28% di grassi e un 46% di carboidrati. Nel secondo gruppo, l'apporto calorico variava tra 1 975 e 3 550 calorie giornaliere, provenienti per il 18% dalle proteine, per il 32% dai grassi e per il 50% dai carboidrati. I soggetti in restrizione calorica, infatti, hanno attentamente disegnato la propria dieta in modo da ingerire giornal-



mente almeno il 100% del fabbisogno giornaliero per ogni nutriente e vitamina conosciuti, limitando il numero di calorie.

I risultati parlano chiaro: tutti i maggiori indici di rischio cardiovascolare sono sistematicamente e notevolmente più bassi nel gruppo che segue una dieta ipocalorica. La RC è in grado di determinare un profondo e sostenuto effetto benefico sulle concentrazioni plasmatiche del colesterolo totale, del colesterolo LDL, del colesterolo HDL e dei trigliceridi, e sulla pressione arteriosa, che tendono normalmente ad aumentare con l'età. Questi dati dimostrano, inoltre, che la RC fornisce un potente effetto protettivo contro l'obesità, l'insulino-resistenza e contro l'infiammazione.

I livelli dei trigliceridi, ad esempio, sono risultati esser più bassi di oltre il 95% rispetto alla media della popolazione americana, comparabili addirittura con quelli di giovani di 20 anni o poco più, sebbene i partecipanti allo studio avessero un'età media di 50 anni (range 35-82). La pressione arteriosa media dei soggetti in RC era eccezionalmente bassa (100/60 mmHg), paragonabile a quella che si riscontra normalmente in bambini di 10 anni. Straordinariamente basse si sono anche rivelate le concentrazioni a digiuno del glucosio e dell'insulina nel sangue di questi soggetti; ad esempio, le concentrazioni d'insulina erano inferiori del 65% rispetto a quelle del gruppo di controllo. La proteina C-reattiva, un indice di infiammazione che sembrerebbe giocare un ruolo chiave nello sviluppo della malattia aterosclerotica, è anche drasticamente più basso che nei soggetti di controllo. Lo spessore intima-media delle arterie carotidi dei soggetti in RC, infine, era più basso di circa il 40% rispetto a quello del gruppo di controllo.

Il confronto con i coetanei del gruppo di controllo è risultato quindi essere schiacciante. Ma non solo. Alcuni dei soggetti in restrizione calorica hanno inoltre fornito ai ricercatori i loro diari medici e copie degli originali esami di laboratorio raccolti prima d'iniziare la dieta e durante il periodo di restrizione calorica. Il loro peso corporeo, i valori di colesterolo e di trigliceridi prima d'iniziare la dieta erano vicini alla media di quelli della popolazione media americana, e sono drasticamente crollati dopo solo circa un anno di dieta.

Lo studio smentisce quella che appare come un'ineluttabile legge di natura, che ci sia una proporzionalità diretta tra l'avanzamento dell'età e la maggiore probabilità di sviluppare malattie cardiovascolari. Attualmente non possiamo sapere con esattezza quanto



vivranno le persone coinvolte nell'indagine e se la RC sia in grado di aumentare la loro vita massima, ma di sicuro la loro aspettativa di vita è maggiore rispetto alla media degli altri individui poiché, con molta probabilità, non andranno incontro all'occlusione delle arterie né svilupperanno diabete o ipertensione arteriosa, condizioni che precedono, spesso, l'insorgere di infarto del miocardio e di ictus cerebrale.

Senza arrivare agli eccessi, può essere fondamentale ridurre l'apporto calorico giornaliero e contemporaneamente migliorare la qualità dei cibi che si mangiano, preferendo, a portate raffinate e cibi eccessivamente processati, verdura, frutta, legumi e cereali integrali ricchi di vitamine e antiossidanti. La natura ci fornisce una grandissima varietà di cibi sani naturalmente ricchi di nutrienti, antiossidanti e fitocomposti, e relativamente poveri di calorie, che ci aiutano a mantenerci magri, giovani e sani.

Riferimenti bibliografici

1. Osservatorio Epidemiologico Cardiovascolare Italiano. *Ital Heart J* 2004;5(Suppl. 3):49S-92S.
2. Tracy RP. Is visceral adiposity the "enemy within"? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:881-3
3. Disponibile all'indirizzo: <http://www.cuore.iss.it>; ultima consultazione 31 maggio 2004.
4. Holloszy JO. Mortality rate and longevity of food-restricted exercising male rats: a reevaluation. *J Appl Physiol* 1997;82:399-403.
5. Weindruch R, Sohal RS. Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Caloric intake and aging. *N Engl J Med* 1997;337:986-94.
6. Fontana L, Meyer TE, Klein S, *et al.* Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(17):6659-63.

“
È importante
diminuire l'apporto
calorico giornaliero
e scegliere una corretta
alimentazione
”

Istituto Superiore di Sanità

Viale Regina Elena, 299
00161 Roma
tel: +39 0649901

Il **Notiziario**
è a disposizione
per accogliere commenti
e suggerimenti
dei suoi lettori

Redazione del **Notiziario**

e-Mail: pubblicazioni@iss.it
tel: +39 0649902944-2428
fax: +39 0649902253

www.iss.it

