



scienza attiva[®]

Dalla ricerca alla clinica:

trial clinici e traslazione

Prof.ssa Franca Fagioli

Università degli Studi di Torino

**Direttore della Struttura Complessa di Oncoematologia e
Centro Trapianti dell'Ospedale Infantile Regina Margherita di Torino.**

Franca Fagioli

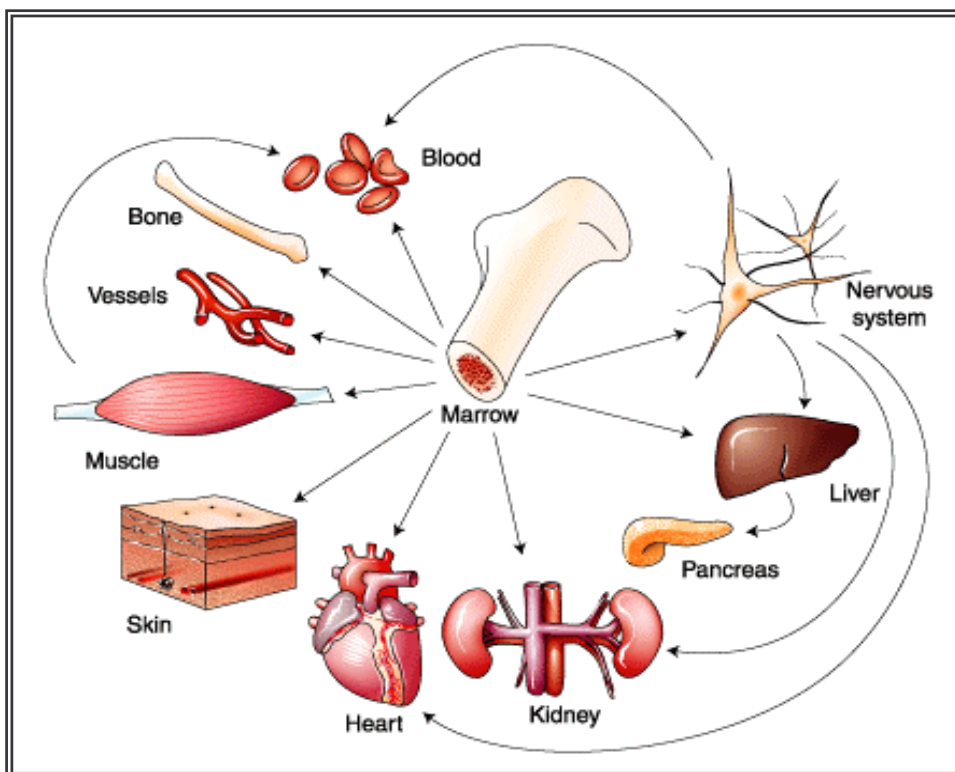
Introduzione

L'attività scientifica nell'ambito delle cellule staminali sta facendo passi da gigante come testimonia il numero sempre crescente di lavori scientifici pubblicati su questo argomento. Tali studi permettono non solo di capire i meccanismi biologici che determinano lo sviluppo di un organismo complesso, ma anche di condurre una ricerca traslazionale capace di trasferire i risultati prodotti in laboratorio all'attività clinica e questo, ovviamente, determina grandi aspettative nella popolazione dei "malati" e grande attenzione mediatica.

Nel nostro paese la ricerca scientifica si è focalizzata sulle cellule staminali adulte, ricercandone nuove fonti, oltre a quelle classicamente note, quali quelle di origine midollare (presenti all'interno del midollo osseo) e cordonali (presenti all'interno del sangue del cordone ombelicale), poi identificandone le variabili biologiche. Sia il midollo osseo sia il sangue del cordone ombelicale contengono cellule staminali ematopoietiche (CSE) in grado di dare origine a tutte le cellule mature del sangue, e cellule staminali mesenchimali (CSM) in grado di dare origine a diverse cellule dell'organismo tra cui cellule dell'osso (osteoblasti), della cartilagine (condrociti), del tessuto adiposo (adipociti), dei tendini (tenociti), del muscolo (miociti), del microambiente midollare (cellule stromali) e probabilmente di "transdifferenziare" in neuroni.

Mentre le cellule staminali ematopoietiche sono da anni ampiamente utilizzate per le cure delle malattie ematologiche, tumorali e non, esistono ad oggi ancora ostacoli all'impiego clinico di altre cellule staminali, nonostante gli studi preclinici siano incoraggianti. A tale proposito, si è compreso che la staminalità è una funzione più che una caratteristica temporalmente legata ad un gruppo di cellule e tale funzione può essere evocata grazie all'impiego di geni o di miscele di fattori di crescita. La staminalità è il frutto delle interazioni tra genoma (contenuto nel DNA) e ambiente e della interazione tra cellula e microambiente. In tale ottica diventano di cruciale importanza tutte le molecole, i fattori di crescita e di adesione prodotti dalle stesse cellule staminali. In particolare le CSM sono in

grado, per esempio, tramite la produzione di molecole particolari di agire direttamente sul tessuto danneggiato (neurone, osseo, cartilagineo) riducendo l'infiammazione o di stimolare indirettamente le cellule staminali in loco a intervenire nel processo di rigenerazione tissutale. La cellula staminale mesenchimale rappresenta, pertanto, un candidato ideale per protocolli di terapia cellulare per le malattie neurodegenerative sia per la sua possibile trasformazione in cellula simil-neuronale, sia perché produce fattori neurotrofici in grado di modificare il microambiente danneggiato.



Plasticità delle cellule staminali midollari (Golden C. et al., Stem Cell, 2002).

La terapia cellulare

Nel corso degli ultimi anni è cresciuto molto l'interesse verso le "cellule" potenzialmente utilizzabili come "armi terapeutiche"; questo ha creato la necessità di disporre di particolari laboratori attrezzati per la manipolazione di cellule, dal momento del prelievo fino al momento della somministrazione in un paziente.

L'uso di cellule o tessuti nella terapia cellulare ha portato alla definizione di una nuova categoria di medicinali applicati alla terapia di patologie acquisite o ereditarie: i Prodotti per Terapia Cellulare (PTC) definite come preparazioni in cui la principale azione biologica è svolta da cellule o tessuti. Nella terminologia corrente viene talvolta usato il termine di Ingegneria Tissutale per indicare la ricostruzione di tessuti od organi in vitro.

La terapia cellulare è uno dei principali ed innovativi approcci nelle malattie degenerative e post traumatiche. Tale strategia si fonda sulla possibilità che cellule o tessuti trapiantati possano rigenerare circuiti interrotti o agire nel tessuto danneggiato attraverso la produzione di fattori di crescita o molecole immunomodulatorie. L'utilizzo di tessuti e di cellule coltivate in vitro per uso clinico, rappresenta uno dei risultati più importanti della scienza trapiantologica. Inoltre, l'isolamento di specifiche sottopopolazioni cellulari, la loro espansione e manipolazione ha permesso la creazione di nuovi vaccini antitumorali proponendo così terapie cellulari anche in campo oncologico.

Sono inclusi nei PTC quei prodotti contenenti cellule o parti di esse ottenuti dopo una manipolazione "non minima", manipolazione che potrebbe alterare le caratteristiche genetiche, fisiologiche o biologiche del tessuto/organo trattato.

La produzione dei PTC è regolata quindi da normative molto rigide volte a controllare la qualità del prodotto durante tutte le fasi di produzione e la struttura all'interno della quale essi vengono preparati visto il loro carattere di produzioni asettiche specificatamente dedicate per singolo paziente. I PTC sono soggetti agli stessi standard qualitativi richiesti per la messa in commercio dei farmaci e devono essere prodotti in strutture controllate e accreditate dall'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA), denominate Cell-Factories. Per Cell Factory si intende quindi una struttura complessa in cui è possibile, in condizioni di microclima e contaminazione controllata, manipolare cellule destinate ad essere infuse nei pazienti per la rigenerazione di tessuti e di organi, secondo quanto stabilito dalle norme GMP (Good Manufacturing Practices, norme di buona fabbricazione) di riferimento (Eudralex vol. 4). Tali ambienti devono essere mantenuti in classe B (classe di purezza dell'aria), mediante filtri con adeguata capacità filtrante (filtri HEPA): per ottenere la classe B il numero di ricambi d'aria deve essere rapportato alle dimensioni del locale, al personale e alle attrezzature che vi stazionano.

Durante la manipolazione e l'espansione *in vitro*, le cellule sono esposte ad una varietà di rischi biologici che dovranno essere analizzati accuratamente a varie fasi dell'espansione e obbligatoriamente prima dell'eventuale infusione delle cellule nel paziente. Uno di questi rischi è rappresentato dalla contaminazione da agenti avventizi (provenienti dall'ambiente e/o dai mezzi di coltura) quali virus, batteri, micoplasmi miceti e lieviti.

Anche le apparecchiature e gli ambienti sono da considerare critici per la contaminazione del prodotto e pertanto da monitorare prima e durante il processo di produzione. In sintesi dovranno essere verificate le cappe biohazard, gli incubatori, gli ambienti e i piani di lavoro. Inoltre, vista la reale possibilità di contaminazione trasportata dagli operatori, questi

dovranno essere istruiti ad una corretta vestizione comprovata da una specifica convalida microbiologica e successivamente monitorati microbiologicamente prima e dopo la lavorazione relativamente agli indumenti (tuta, calzari e cappuccio) ed ai guanti.

Non essendo possibile sottoporre a procedure di sterilizzazione i prodotti cellulari senza incidere sulla loro vitalità e quindi sulle loro proprietà terapeutiche, tutti i processi di isolamento e di crescita delle cellule staminali devono essere eseguiti in condizioni che garantiscano un bassissimo livello di contaminazione ambientale, allo scopo di ridurre il rischio di infezioni. Le Cell Factories sono strutture GMP, dedicate alla produzione di prodotti cellulari utilizzati in protocolli clinici sperimentali composte da aree a contaminazione controllata.

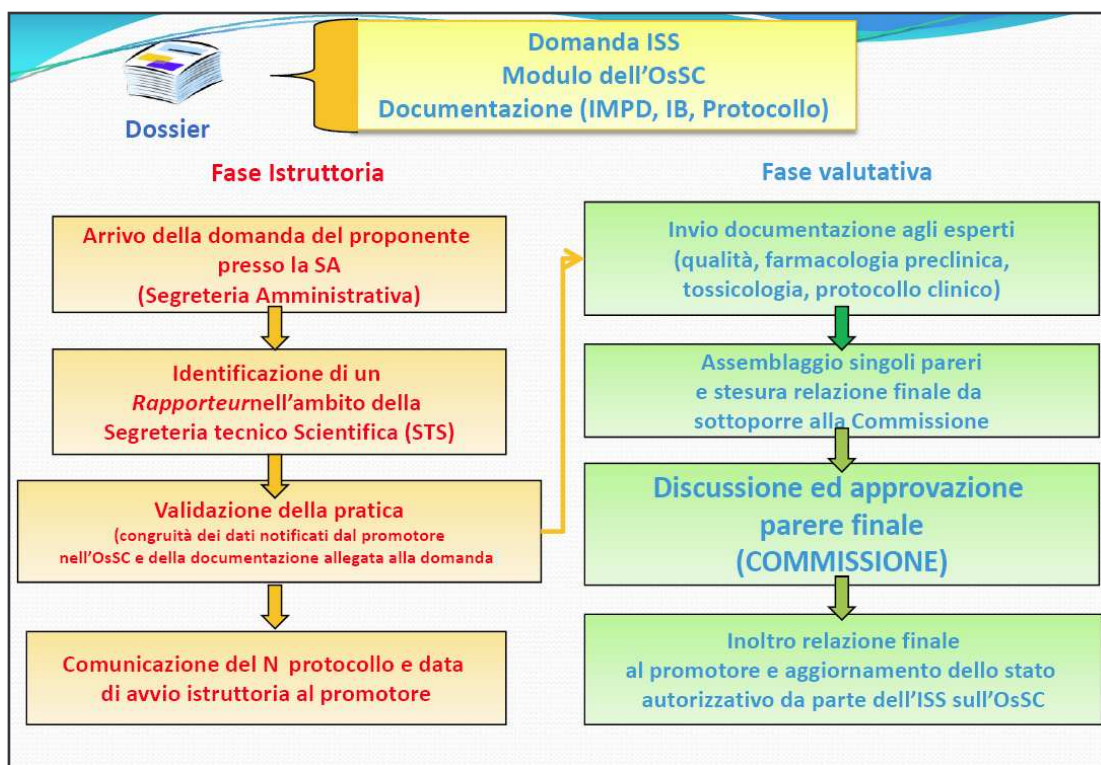
Sperimentazione pre-clinica e clinica

La produzione dei prodotti medicinali per sperimentazione clinica è soggetta agli stessi standard qualitativi richiesti per la messa in commercio dei farmaci, ed è regolata da normative molto rigide volte a controllare la qualità del prodotto durante tutte le fasi di produzione e la struttura all'interno della quale essi vengono preparati.

Lo sviluppo di un prodotto per terapia cellulare che possa essere impiegato in protocolli clinici sperimentali di fase I/II segue un iter ben definito che prevede una fase preclinica, una fase di validazione ed un iter autorizzativo da parte dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS), dell'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) e del Comitato Etico.

Questo iter, particolarmente complesso, necessita di un periodo molto lungo che può durare diversi anni e che coinvolge unità operative con competenze altamente specializzate coinvolte nelle varie fasi del progetto, dal disegno dello studio in laboratorio fino all'utilizzo clinico nel paziente.

La preparazione del prodotto dovrà avvenire nel rispetto delle norme GMP ed in ottemperanza a queste norme il dossier di autorizzazione dovrà contenere documentazione riguardante l'analisi dei rischi legati al processo di produzione e la convalida di processo di produzione stesso.



Questo iter permette di valutare gli eventuali rischi per i pazienti connessi all'uso del prodotto sperimentale. Oltre a quelli dovuti alla trasmissione di malattie infettive o alla presenza di contaminanti dei prodotti cellulari, i PTC comportano rischi di natura diversa dai prodotti farmaceutici classici. Ad esempio:

- a) Un rischio proliferativo o ontogenetico: il mantenimento in coltura delle cellule potrebbe essere associato ad una trasformazione in senso oncogeno delle cellule utilizzate.
- b) Un rischio immunitario: 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 quindi possono dare origine ad 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 (terreni di coltura, fattori di crescita, ...).

Per questi motivi risulta di particolare importanza la fase di studio cosiddetta pre-clinica, che comprende studi *in vitro* e studi *in vivo* volti alla raccolta di informazioni necessarie a dimostrare la safety (cioè la non tossicità e la tollerabilità) del prodotto medicinale e alla traslazione del protocollo sperimentale in campo clinico. Tale fase ha lo scopo di identificare e verificare endpoint biologici e funzionali (ad esempio il potenziale proliferativo

delle cellule in coltura, il profilo immunofenotipico, il rilascio di particolari fattori), verificare il mantenimento delle caratteristiche biologiche del prodotto cellulare dopo il mantenimento in coltura e/o la criopreservazione, e verificare la funzione biologica del prodotto cellulare in modelli animali rappresentativi della malattia in oggetto.

I risultati delle prove sperimentali e dell'attività di convalida costituiscono parte integrante del protocollo sperimentale che dovrà essere sottoposto ad iter autorizzativo.

Trials clinici

Superata con successo la fase preclinica, è possibile quindi studiare gli effetti del nuovo prodotto medicinale sull'uomo, che devono confermare la sicurezza e l'efficacia del composto osservate nella fase preclinica. Gli studi sull'uomo richiedono l'approvazione di un protocollo che viene sottoposto all'organo governativo di competenza al quale devono essere forniti tutti i dati preclinici raccolti nonché una dettagliata proposta degli studi clinici da intraprendere.

Le linee guida internazionali Good Clinical Practice (GCP) stabiliscono uno standard di qualità etico e scientifico per il disegno, la conduzione, la raccolta dati e la divulgazione di sperimentazioni cliniche. Nate nel 1981, si sono consolidate nel 1991 nell'ambito della ICH (International Conference on Harmonization).

A livello italiano la sperimentazione clinica di fase I dei prodotti medicinali innovativi, che comprendono i Prodotti per Terapia Cellulare, è soggetta ad un parere preventivo da parte della Commissione istituita presso l'Istituto Superiore di Sanità (ISS), ai sensi del DPR 439/2001. L'obiettivo della normativa è di assicurare la massima sicurezza possibile ai pazienti che si sottopongono a procedure sperimentali con PTC e quindi che le caratteristiche del prodotto somministrato siano tali da garantire un rapporto rischio/beneficio favorevole.

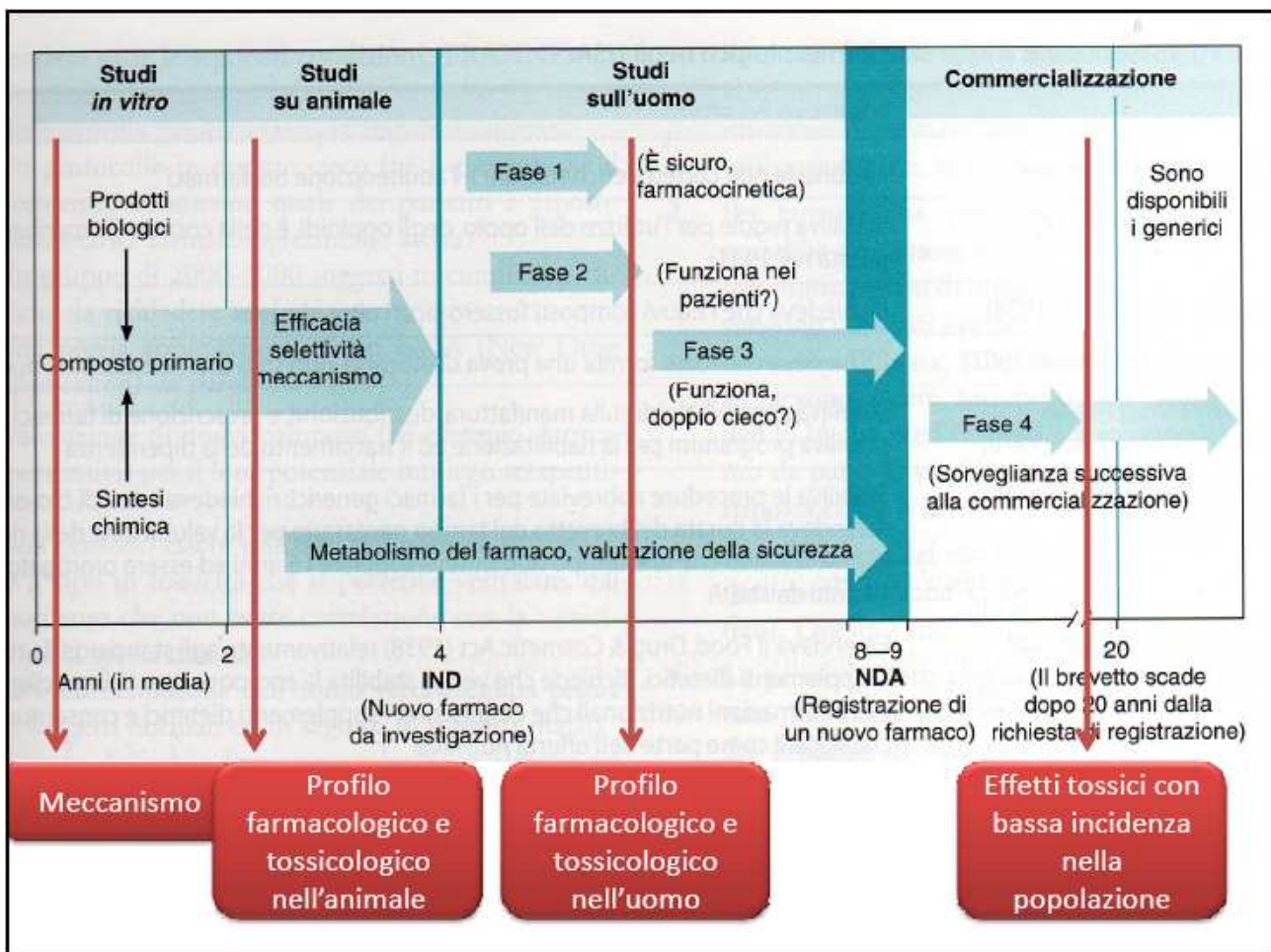
Gli studi clinici sperimentali si classificano in:

Studi di fase I: danno una prima valutazione sulla sicurezza e sulla relazione dose-risposta in un piccolo numero di volontari sani (20-30), o di pazienti, previo consenso informato.

Studi di fase II: hanno lo scopo di valutare la tollerabilità del farmaco in un piccolo numero di pazienti (100-200). Un placebo od un farmaco di controllo già in uso vengono inclusi in un protocollo a singolo o doppio cieco come termini di paragone.

Studi di fase III: sono studi più ampi che coinvolge 1000-5000 pazienti (studi multicentrici). Nella fase III vengono somministrati il nuovo farmaco, un farmaco di riferimento ed un placebo secondo uno schema a doppio cieco. Scopo di questi studi è quello di acquisire ulteriori dati di efficacia e sicurezza del farmaco su un campione più ampio di pazienti, fornendo ulteriori dati sulla relazione dose-effetto del farmaco utili a definire lo schema posologico da impiegare nella pratica clinica corrente. I prodotti farmaceutici che superano con successo la fase III ottengono l'autorizzazione per la commercializzazione.

Studi di fase IV: rappresentano la sorveglianza post-commercializzazione (post-marketing) del farmaco, volti a confermare la sicurezza e la tollerabilità a lungo termine del farmaco, su una casistica molto ampia.

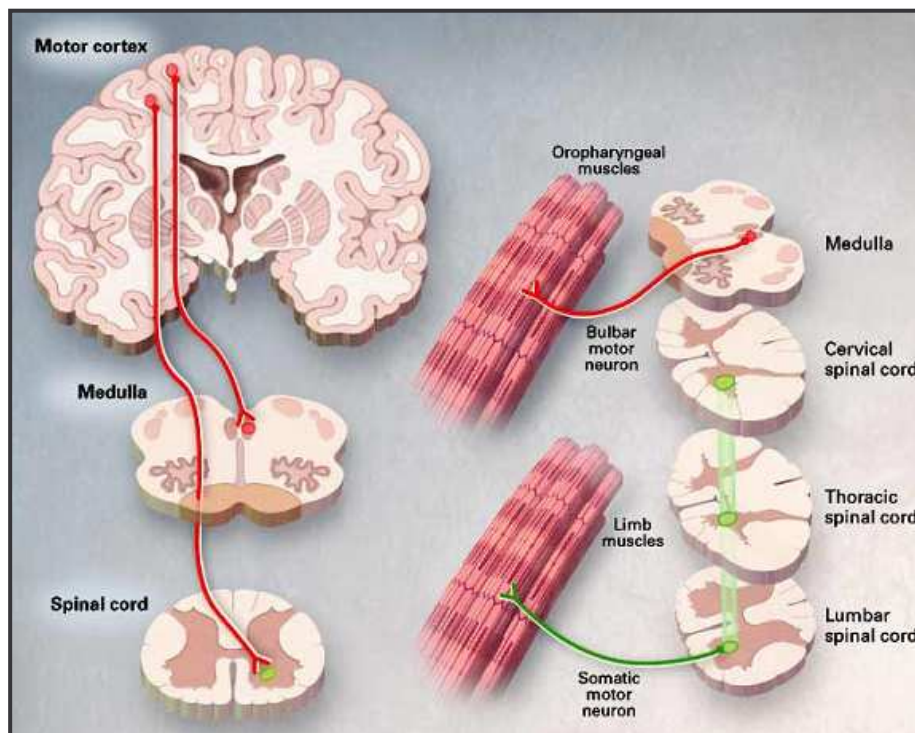


In tale scenario, la nostra struttura, in collaborazione con l'unità neurologica dell'Ospedale di Novara, ha iniziato i primi protocolli sperimentali per la cura della Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) con le cellule staminali.

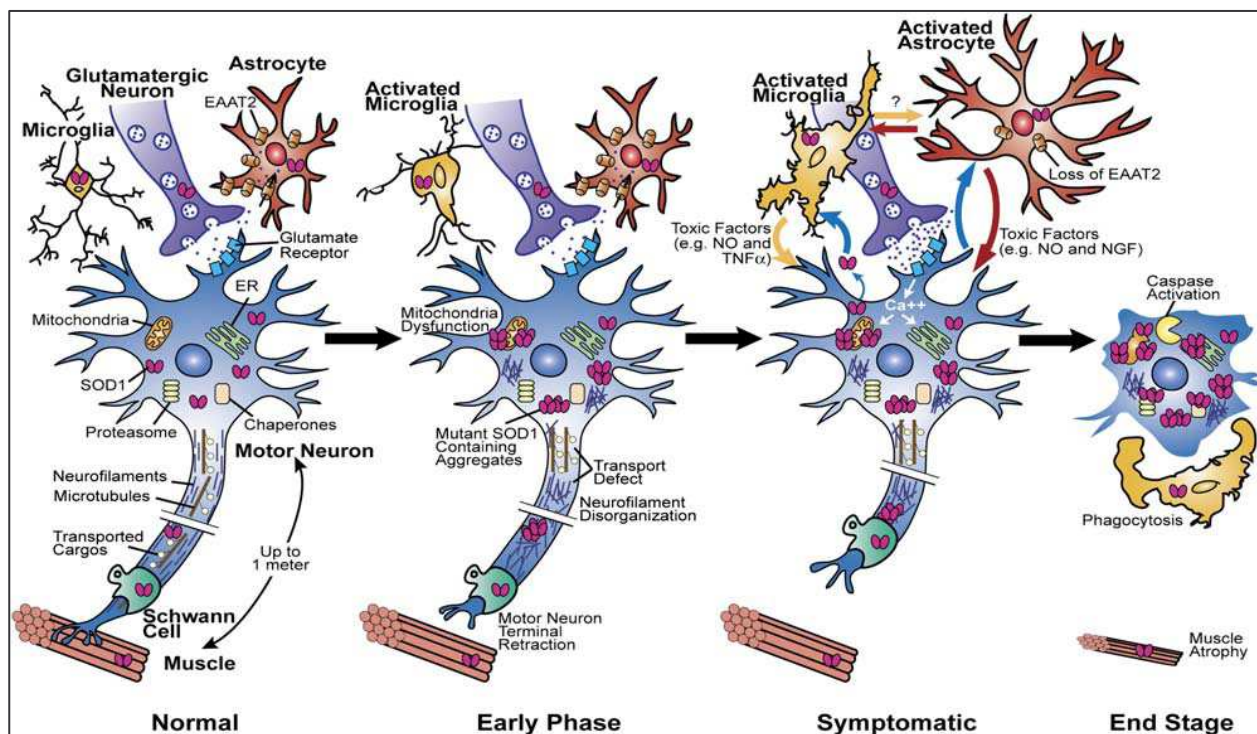
La Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA), conosciuta anche come Morbo di Lou Gehrig o malattia di Charcot, è una patologia degenerativa del sistema nervoso centrale che interessa selettivamente i motoneuroni sia centrali (a livello della corteccia cerebrale), sia periferici (a livello del tronco encefalico e del midollo spinale). Dal punto di vista clinico si manifesta una paralisi progressiva dei muscoli, che determina la morte del paziente quando coinvolge la funzione respiratoria, a distanza di 2-5 anni dall'esordio clinico. L'incidenza della SLA è di circa 1-3 casi per 100000 l'anno e la sua prevalenza si aggira sui 3-5 casi per 100000 l'anno (rapporto maschi/femmine 1.5/1), rappresentando così la causa più frequente di paralisi nell'adulto. Benché la SLA possa colpire individui di ogni età, generalmente è prediletta l'età adulta avanzata con picco fra i 50-70 anni.

Le cause della malattie sono ancora da chiarire e, attualmente, non esiste una terapia efficace per questa patologia.

La morte progressiva e irreversibile dei motoneuroni si traduce sul piano clinico in una progressiva plegia di tutta la muscolatura spinale e bulbare, che si manifesta con disfagia, disartria, perdita del controllo dei muscoli scheletrici fino all'exitus, generalmente determinato dalla insufficienza respiratoria nell'arco di 2 o 5 anni dall'esordio.



Progressiva degenerazione dei motoneuroni nella SLA.
(Rowland LP et al., N Engl J Med, 2001)



Degenerazione dei motoneuroni e attivazione della glia nella quattro fasi definite della SLA. (Boillée S et al., Neuron 2006)

L'approccio terapeutico basato sull'utilizzo di CSM nella SLA è iniziato nel 2001 con uno studio pilota di terapia cellulare che ha coinvolto nove pazienti, che sono stati sottoposti ad espianco di midollo osseo per isolare le CSM autologhe. Tali cellule sono poi state "espande" in laboratorio e successivamente somministrate a livello del midollo spinale mediante operazione chirurgica. Un secondo protocollo con modalità di conduzione molto simili al precedente è stato condotto su altri 10 pazienti dopo aver avuto l'autorizzazione da parte del Ministero della Salute. Entrambi gli studi avevano l'obiettivo principale di verificare la sicurezza e la non tossicità del trapianto di CSM a livello intraspinale. Tutti i pazienti coinvolti in questa sperimentazione sono stati e vengono tutt'ora sottoposti a monitoraggio periodico dello stato di malattia e tutti i dati relativi vengono comunicati all'Istituto Superiore di Sanità ed inseriti nel database nazionale per la terapia genica e cellulare. Tutti i risultati ottenuti dalle valutazioni cliniche (esami neurologici) e strumentali (risonanze magnetiche) effettuati finora sui pazienti, anche a distanza di 8 anni dall'impianto, hanno dimostrato che le CSM iniettate a livello intraspinale, sono sicure e ben tollerate, che non hanno subito modificazione genetiche o stimoli proliferativi tali da indurre trasformazioni tumorali. In alcuni pazienti è stata osservata una stabilizzazione della malattia, e sebbene questi dati siano incoraggianti, non è possibile trarre conclusioni cliniche dato il numero ristretto di pazienti trattati.

La trasferibilità di questo protocollo clinico dal laboratorio al paziente è stato pertanto un iter lungo e laborioso, che ha coinvolto unità operative differenti ognuna con una propria competenza, la cui interazione e collaborazione è stata fondamentale nelle varie fasi del processo. Gli studi preclinici sono stati fondamentali per definire il protocollo sperimentale a partire dagli esperimenti *in vitro* sulla caratterizzazione e capacità differenziativa e proliferativa delle CSM, a quelli *in vivo* per verificare la loro sopravvivenza, migrazione ed efficacia dopo essere state trapiantate in topi con una mutazione genetica che causa una malattia molto simile alla SLA.

Inoltre, è necessario ricordare che l'attuale normativa prevede che il prodotto di terapia cellulare utilizzato per qualsiasi sperimentazione clinica sia paragonato ai farmaci e come tale deve sottostare a regolamentazioni in ambito nazionale ed internazionale molto rigide per dimostrare le sue caratteristiche di efficacia, sicurezza e qualità. Ogni nuovo farmaco sperimentato per la prima volta sull'uomo, comporta rischi ignoti, e ha proprietà farmacologiche e tossicità ignote, pertanto la prima fase di uno studio (fase I) ha l'obiettivo di studiare su un numero ristretto di pazienti il primo contatto del farmaco sull'uomo e analizzare la sua tossicità. Il nostro studio che prevedeva per la prima volta l'utilizzo clinico di CSM nella SLA aveva l'obiettivo primario di verificare tali proprietà da parte delle cellule. Superata la fase I della sperimentazione che ha individuato la non tossicità delle CSM nei pazienti con la SLA, è necessario condurre studi più ampi per stabilire l'attività e la sicurezza (fase II), l'efficacia (fase III) e quindi, gli effetti a lungo termine del trattamento (fase IV) in un numero di pazienti sempre più ampio.

Proposte per approfondimenti didattici:

- Linee guida EMEA Guideline on Safety and Efficacy Follow-up - Risk Management of Advanced Therapy Medicinal Products (novembre 2008).
- Linee guida AIFA-ISS Requisiti di Qualità farmaceutica per la produzione di prodotti per terapia cellulare somatica già consolidati nella pratica clinica approvati dall'ISS ai sensi dell'articolo 2, comma 1 lettera e) del DM 5 dicembre 2006 (02-03-2008)

Normativa di riferimento:

- Regolamento CE N. 1394/2007 del Parlamento Europeo del 13 novembre 2007 sui medicinali per terapie avanzate recante modifica della direttiva 2001/83/CE e del regolamento (CE) n. 726/2004 (applicabile dal 30 dicembre 2008).
- Direttiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo del 31 marzo 2004 sulla definizione di norme di qualità e di sicurezza per la donazione, l'approvvigionamento, il controllo, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani.

- Decreto Legislativo 24 aprile 2006 n. 219. Attuazione della direttiva 2001/83/CE (e successive direttive di modifica) relativa ad un codice comunitario concernente i medicinali per uso umano, nonché della direttiva 2003/94/CE.
- Decreto del Presidente della Repubblica n. 439 del 21 settembre 2001. Regolamento di semplificazione delle procedure per la verifica e il controllo di nuovi sistemi e protocolli terapeutici sperimentali.
- Decreto 21/12/2007. Modalità di inoltro della richiesta di autorizzazione all'Autorità competente, per la comunicazione di emendamenti sostanziali, e la dichiarazione di conclusione della sperimentazione clinica e per la richiesta di parere al comitato etico.
- Decreto Legislativo 24 aprile 2006 n. 219. Attuazione della direttiva 2001/83/CE (e successive direttive di modifica) relativa ad un codice comunitario concernente i medicinali per uso umano, nonché della direttiva 2003/94/CE.

Bibliografia:

- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999; 284:143-7.
- Rowland LP, Shneider NA. Amyotrophic lateral sclerosis. N Engl J Med 2001;344:1688-1700
- Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. Nat Rev Immunol. 2008 Sep;8(9):726-36.
- Mareschi K, Ferrero I, Rustichelli D, et al. Expansion of mesenchymal stem cells isolated from pediatric and adult donor bone marrow. J Cell Biochem 2006; 97:744-54.
- Mazzini L, Mareschi K, Ferrero I, et al. Autologous mesenchymal stem cells: clinical applications in amyotrophic lateral sclerosis. Neurol Res. 2006 Jul;28(5):523-6.
- Mazzini L, Ferrero I, Luparello V, et al. Mesenchymal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: A Phase I clinical trial. Exp Neurol. 2010 May;223(1):229-37.
- Boillée S, Vande Velde C, Cleveland DW. ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. Neuron. 2006 Oct 5;52(1):39-59.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy 2006; 8:315-7.

Link utili:

- Istituto Superiore di Sanità - Sperimentazioni Cliniche: <http://www.iss.it/scf1/>
- Agenzia Italiana del Farmaco: <http://www.iss.it/scf1/>
- Centro Nazionale Trapianti: <http://www.trapianti.salute.gov.it/>
- Gruppo Italiano Cellule Staminali Mesenchimali: <http://www.gism.altervista.org/>
- Stem Cell Research Italy: <http://www.stemcellitaly.org/?page=1-0>
- Forum of Italian Researchers on Mesenchymal Stromal Stem Cells (FIRST): <http://www.stemcellsfirst.org/index.html>
- International Society of Cellular Therapy: <http://www.celltherapysociety.org/>
- Fondazione Vialli&Mauro: <http://www.fondazionevialliemauro.com/2005/default.asp>
- Associazione Italiana Sclerosi Laterale Amiotrofica: www.aisla.it