

RETE NAZIONALE PER STUDI CLINICI E DI STRUTTURE GMP PER LE BIOTERAPIE DEI TUMORI

Giorgio Parmiani (a), Enrico Proietti (b)

(a) *Unità Immuno-Bioterapia Tumori Solidi Fondazione S. Raffaele del Monte Tabor, Milano*

(b) *Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Base di partenza e razionale

Di recente, in editoriali su riviste internazionali di grande prestigio, è stata sottolineata l'importanza di promuovere le terapie sperimentali antitumorali su base biologica come disciplina specifica, evidenziandone le potenzialità di ricaduta e le caratteristiche peculiari, e suggerendo iniziative idonee a garantirne il pieno sviluppo. Il trasferimento alla sperimentazione clinica dei risultati della ricerca nel settore delle bioterapie innovative contro i tumori è stato rilevante in alcuni Paesi europei, in Giappone e, in modo particolare, negli Stati Uniti, mentre in Italia si registrano notevoli ritardi e carenze in questo processo. Tale situazione ha motivato il riconoscimento della necessità della creazione in Italia di una rete nazionale per la promozione della ricerca clinica/traslazionale nel settore delle bioterapie e dell'immunoterapia dei tumori e per la realizzazione di infrastrutture a supporto di tale sperimentazione. A tale riguardo, è interessante sottolineare, che proprio ricercatori americani leader nel settore dell'immunoterapia hanno recentemente evidenziato i problemi specifici (carenza di coordinamento e cooperazione sia tra le diverse istituzioni pubbliche che operano nel campo, sia tra enti pubblici e privati; complessità della regolamentazione riguardo alle procedure per la preparazione di prodotti cellulari per uso clinico) che limitano il trasferimento di approcci sperimentali bioterapeutici in applicazioni cliniche, identificando nello sviluppo di collaborazioni strategiche tra le diverse istituzioni operanti in questo settore la base di partenza per superare le barriere che ostacolano il pieno sviluppo delle grandi potenzialità applicative di questi approcci terapeutici. Infatti, per il loro ottimale sviluppo clinico, queste nuove modalità terapeutiche devono prevedere il coinvolgimento di più figure professionali che operano in ambito clinico e pre-clinico, regolatorio e industriale, che possano interagire culturalmente e, soprattutto, operativamente. Ciò rende indispensabile uno sforzo unitario per poter portare in clinica nuove modalità terapeutiche valutandone con tempestività, appropriatezza e rigore clinico-scientifico l'efficacia. Infine, la bioterapia dei tumori consolidandosi sempre più come ulteriore strategia clinica "strutturata" nel percorso terapeutico del paziente oncologico, pone nuove e specifiche problematiche di tipo procedurale, etico e medico-legale, sia nella sperimentazione terapeutica che nella pratica clinica. Sulla base di queste considerazioni, gruppi di ricercatori italiani operanti in ambito pre-clinico e clinico hanno costituito nel settembre 2004 un'associazione, il Network Italiano per la Bioterapia dei Tumori (NIBIT) che persegue i seguenti obiettivi: i) promuovere interazioni scientifiche tra figure professionali operanti nel campo delle bioterapie dei tumori (accademia, industria, agenzie regolatorie); ii) sviluppare strategie e studi clinici multicentrici a livello nazionale nel settore delle terapie innovative dei tumori; iii) sviluppare iniziative tese ad informare i pazienti sul potenziale terapeutico delle nuove terapie biologiche antitumorali. In particolare, in seguito al recepimento delle direttive europee sulla sperimentazione clinica e sull'armonizzazione della legislazione dei prodotti farmaceutici, esiste

la necessità di facilitare l'accesso a laboratori in grado di preparare farmaci biologici in condizioni di GMP (*Good Manufacturing Practice*), come imposto dalle direttive europee. Tale esigenza appare particolarmente urgente per quanto riguarda i prodotti medicinali avanzati, basati su cellule. Inoltre, lo sviluppo e la standardizzazione di metodiche per il monitoraggio della risposta alle bioterapie e all'immunoterapia sono particolarmente cogenti per l'identificazione di biomarcatori predittivi della risposta biologica e clinica. Si ritiene quindi opportuna la realizzazione di una rete nazionale per la promozione della ricerca clinica e di strutture di produzione GMP nel settore delle bioterapie dei tumori, che veda la partecipazione di tutti gli "attori" potenzialmente coinvolti, compresi i rappresentanti di agenzie regolatorie in grado di svolgere un ruolo di consulenza e orientamento per il trasferimento alla clinica dei risultati generati dagli IRCCS e altri istituti di ricerca pubblici.

Gli studi clinici di bioterapie, e in particolare di immunoterapia, devono però essere sostenuti da un accurato e dettagliato monitoraggio della risposta biologica che il trattamento innesca *in vivo*, finalizzato all'identificazione di parametri che si associno all'efficacia terapeutica del trattamento. Per quanto diverse metodiche siano attualmente disponibili per l'identificazione e la caratterizzazione di tale risposta, non esiste, al momento, un consenso riguardo all'approccio tecnologico ottimale di monitoraggio, che peraltro dipende strettamente dalla tipologica di terapia biologica (vaccini, anticorpi, immunoterapia cellulare, ecc.) in valutazione. Inoltre, alcune delle metodologie di monitoraggio soffrono di variabilità tecnica molto ampia, che richiede quindi una competente standardizzazione e validazione. Un accurato monitoraggio immuno-biologico richiede infine competenze specifiche non facilmente istituibili a livello capillare nei diversi centri coinvolti nella sperimentazione clinica di bio-immunoterapie.

Nel complesso risulta quindi cruciale poter costituire una rete che permetta, anche in stretta cooperazione con il NIBIT, lo sbocco verso la clinica delle notevoli esperienze in ambito preclinico maturate in Italia nel campo delle bioterapie dei tumori.

Obiettivo principale e obiettivi secondari del progetto

L'obiettivo principale del presente progetto è quello di realizzare in Italia una rete nazionale per la promozione della ricerca clinica nel settore delle bioterapie e dell'immunoterapia dei tumori e per la realizzazione di infrastrutture a supporto di tale sperimentazione clinica. Tale obiettivo sarà perseguito attraverso lo sviluppo di iniziative a molteplici livelli che hanno i seguenti scopi:

1. Promozione della ricerca italiana sulle bioterapie dei tumori attraverso organizzazione di meeting e workshop, al fine di generare documenti consensus e iniziative specifiche su temi di particolare cogenza per favorire la competitività della ricerca clinica nazionale e la sua integrazione nel contesto internazionale. Il coinvolgimento di giovani medici e ricercatori con esperienza in ricerca traslazionale e protocolli clinici sarà indispensabile per attuare una fase di educazione ai metodi da utilizzare per il disegno e la conduzione di studi clinici nel settore delle nuove bioterapie antitumorali.
2. Sviluppo e standardizzazione di metodi e tecnologie per la definizione di marcatori di risposta biologica e clinica e per il monitoraggio delle risposte biologiche e immunologiche a trattamenti di bioterapia e/o immunoterapia.
3. Definizione di un documento consensus e preparazione di linee guida su nuovi piani di sviluppo clinico e farmaceutico per prodotti da utilizzare per la bioterapia dei tumori, con particolare riferimento ai prodotti medicinali avanzati. Tali obiettivi verranno realizzati attraverso: i) organizzazione di incontri, workshop, e conferenze; ii) attività di formazione e informazione per gli aspetti tecnici e regolatori sullo sviluppo di medicinali per

bioterapia e sulle procedure autorizzative, mediante la creazione di un ufficio di riferimento (*contact point-help desk*) e collegamento con AIFA.

4. Sviluppo di un network di strutture GMP, identificando le risorse disponibili in termini di metodologie, programmi attualmente in corso, autorizzazioni esistenti o programmate, competenze e potenziale di attrazione di finanziamenti e di offerta di servizi.
5. Realizzazione di studi di fattibilità e di convalida per metodiche, materiali e standard di riferimento, relativamente alla produzione, caratterizzazione/controllo di qualità, e conservazione GMP di prodotti medicinali avanzati.

Stato generale di sviluppo del progetto e conseguimento dei risultati

Nel primo anno di attività tutte le UO coinvolte nello sviluppo dei diversi WP hanno collaborato attivamente alle iniziative indicate.

Il presente progetto comprende 5 *Work Package* (WP):

- WP1. Promozione della ricerca sulle bioterapie dei tumori attraverso la promozione della comunicazione. Responsabili: Maria Ferrantini (ISS), Michele Maio (NIBIT);
- WP 2. Definizione e divulgazione di metodi per il disegno e la conduzione di trias clinici di bioterapia dei tumori attraverso convegni, workshops tematici e corsi di formazione. Responsabili: G. Parmiani (HSR/NIBIT), C. Pintus (AIFA);
- WP3. Costruzione di una rete per lo sviluppo e la standardizzazione di metodiche per il monitoraggio immunologico e l'identificazione di biomarcatori della risposta alla bioterapia dei tumori. Responsabili: P. Nisticò (IFO/NIBIT), L. Rivoltini (INT Milano/NIBIT);
- WP4. Sviluppo di documenti consensus, di linee guida e documenti divulgativi degli aspetti regolatori. Informazioni sulla normativa (Help Desk). Responsabili: A.R. Meneguz (ISS), P. Ascierio (Pascale/NIBIT);
- WP5. Supporto alla realizzazione di una rete di laboratori GMP per la produzione di prodotti medicinali avanzati. Responsabile: Giovanni Migliaccio (ISS).

Nell'ambito del WP1 e in collaborazione con altre UO afferenti al Progetto e al Network Italiano per la Bioterapia dei Tumori (NIBIT) sono state realizzate le seguenti iniziative:

1. Costruzione del sito web del NIBIT (www.nibit.org) che è ormai in fase finale di organizzazione;
2. Pubblicazione, anche grazie al contributo della Fondazione Federico Calabresi, della guida "Utilizzo dei vaccini in oncologia" indirizzata ai pazienti affetti da neoplasia e agli operatori sanitari non del settore;
3. Organizzazione dell'evento internazionale "International clinical trials' day on biotherapy of cancer", nel contesto della "2008 Scientific Conference and General Assembly of the Organization of European Cancer Institutes" (Genova, 20-24 maggio 2008);
4. Organizzazione del VI Convegno nazionale del NIBIT durante il quale, in aggiunta a specifiche tematiche scientifiche, si è tenuta la Tavola Rotonda "Cancer Immuno-Biotherapy: A shared strategic goal in the international competitiveness of Italy?" che ha visto la partecipazione attiva di rappresentanti di differenti Istituzioni nazionali.

Le UO impegnate alla realizzazione del WP2 hanno pianificato l'organizzazione di master educazionali per la divulgazione degli elementi regolatori basilari e alla creazione di un contatto diretto con esperti del settore per soddisfare esigenze specifiche dei singoli ricercatori che vogliono intraprendere studi di bioterapia antitumorale. Sono state individuate 4 sedi dove

organizzare tali corsi: Milano, Siena o Roma, Napoli e Bari. Nel luglio 2008 è stato organizzato, presso l'Istituto San Raffaele di Milano, il primo dei suddetti master dal titolo "Razionale pre-clinico della bioterapia dei tumori" (vedi sopra). Il secondo master si svolgerà a Napoli, presso l'Istituto Tumori Fondazione "Pascale", nei giorni 11 e 12 dicembre 2008. Tale corso è in fase di registrazione ECM e prevede la partecipazione di 100 medici, 50 biologi e 50 infermieri.

Nell'ambito del WP3, con il concorso di tutte le UO coinvolte, si è dato inizio allo sviluppo e alla standardizzazione di protocolli per le varie metodiche di monitoraggio (Elispot, colorazione con HLA-tetrameri, mobilitazione CD107a, ecc.) mediante una verifica comparativa di diversi metodi di indagine che verranno a breve resi disponibili all'interno del sito NIBIT. Le due unità coordinatrici della rete hanno organizzato il 1° Workshop NIBIT/ACC che ha visto la partecipazione di numerosi gruppi di ricerca. Nell'ambito del workshop si è proceduto alla definizione di linee guida per il monitoraggio immunologico e sono state concordati dalle unità di INT/Milano e di Roma alcuni protocolli unificati, allo scopo di trasferire le competenze tecnico-scientifiche nei diversi campi di studio sia ai diversi centri del Network che a laboratori esterni interessati.

Inoltre sono state generate librerie fagiche di anticorpi a singolo dominio VHH per identificare anticorpi tumore specifici per screening precoce di malattia. Si è valutata la risposta spontanea di linfociti T CD4+ verso antigeni tumorali (proteine trasformanti E6 ed E7 di virus del papilloma umano, l'antigene tumorale MAGE-A3 e il CEA) rispettivamente in pazienti con lesioni della cervice uterina ad alto grado, con melanoma avanzato e con carcinoma del pancreas. I risultati hanno dimostrato che, nelle lesioni della cervice uterina, la quantità di IFN- γ prodotto è in grado di predire l'andamento clinico dopo trattamento chirurgico. Nel melanoma la risposta CD4+ verso MAGE-A3 è presente in un'alta percentuale di pazienti e le citochine prodotte sono sia di tipo Th1 che Th2. Nel carcinoma del pancreas la percentuale di linfociti T CD4+ specifici per CEA è inferiore a quella dei donatori normali e la polarizzazione è deviata verso Th2. È stata ulteriormente sviluppata la banca biologica dell'Unità che comprende sieri e plasmi, prelevati prima del trattamento e a varie fasi della terapia, di pazienti affetti da neoplasie inseriti in sperimentazioni cliniche di immunoterapia. È stata programmata la messa a punto della tecnologia dei protoarray che permette di valutare contestualmente la presenza qualitativa e quantitativa di anticorpi circolanti diretti contro circa 8000 proteine umane.

Gli obiettivi relativi al WP 4 sono stati affrontati con la preparazione di un sito web, collegato al sito dell'Autorità Competente nazionale per l'autorizzazione alla sperimentazione di fase I, già esistente nel Dipartimento del Farmaco dell'Istituto Superiore di Sanità. Il modello ha previsto uno strumento guida per il Navigatore e documenti di dettaglio per allinearsi alle richieste normative attuali per la conduzione di una sperimentazione clinica FIM (*First in Man*). La presentazione di questo strumento informatico verrà effettuata durante i corsi di cui al WP2 che saranno tenuti a Napoli, Siena o Roma e Bari. Durante il primo anno è stata, inoltre, formulata per tutti i partecipanti al progetto, una nota informativa sull'applicazione dell'articolo 15 del DL.vo 200/2007 relativo alla formulazione di farmaci sperimentali presso le farmacie ospedaliere.

Nel primo anno di attivazione dei progetti afferenti al WP5, sono stati organizzati, in collaborazione tra ISS e AIFA, tre corsi di formazione destinati prioritariamente agli operatori degli IRCCS, dal titolo "Fabbricazione e caratterizzazione dei medicinali sperimentali per terapie avanzate". Tali corsi sono stati effettuati presso l'ISS dal 4 al 5 febbraio 2008, dal 10 al 11 marzo 2008, dal 3 al 4 luglio 2008 e sono stati accreditati per ECM dal Ministero della Salute. Il programma ha coperto sia aspetti regolatori sia tecnico-scientifici.

Per organizzare e facilitare l'accesso dei pazienti all'utilizzo dei prodotti medicinali basati su cellule CBMP) bisognava procedere ad una ricognizione delle strutture attive o potenzialmente attivabili in Italia. A tal scopo l'ISS, in collaborazione con NIBIT, ha diffuso un questionario

per il censimento di tali strutture. La distribuzione delle 17 strutture mostra una differenza fra le differenti aree geografiche, con 13 strutture al nord, 3 in centro e una sola nel sud.

È stato preparato un sito web in collaborazione tra AIFA e CNT per sostenere le attività del network tra laboratori GMP (http://www.terapiecellulari.it/index.php?option=com_content&task=view&id=214&Itemid=381).

È stata ultimata la preparazione di un manuale di istruzioni per l'applicazione all'autorizzazione delle fasi I.

È stato predisposto il protocollo di convalida del metodo di individuazione di contaminazione da micoplasma mediante PCR, che prevede l'uso di un pool di 9 *primer* capaci di riconoscere oltre 25 specie di micoplasma, tra cui le cinque responsabili di oltre il 95% delle contaminazioni di colture cellulari.

In Italia il Ministero della Salute ha pubblicato Circolari sulle "Raccomandazioni per la sicurezza del trasporto di materiali infettivi e di campioni diagnostici". A livello europeo il trasporto di merci pericolose è regolamentato dalla normativa ADR, secondo cui per la spedizione di materie infettanti si deve utilizzare un triplo imballaggio formato da imballo esterno, un secondario e da contenitori primari. Si sono inoltre analizzate le procedure doganali di esportazione.

Sono stati elaborati i risultati di due studi relativi alla valutazione della suscettibilità alla trasformazione neoplastica delle cellule staminali mesenchimali umane da midollo osseo (MO-MS), propagate *in vitro*. Le MO-MS sono state testate per l'espressione di Attività Telomerasica (AT), dei trascritti di hTERT e dei meccanismi alternativi di allungamento dei telomeri (ALT). Tra i diversi donatori è stata osservata variabilità della capacità proliferativa e durata dell'espansione *in vitro*. È stata eseguita la valutazione della predisposizione alla trasformazione neoplastica di: 1) MO-MS, ottenute da pazienti affetti da malattia di Crohn e propagate *in vitro* con LP; 2) MS derivate da due diverse unità di sangue di cordone ombelicale e propagate *in vitro* con LP. I risultati ottenuti non hanno evidenziato predisposizione alla trasformazione neoplastica.

Sono stati condotti studi preliminari per verificare l'assenza di cellule proliferanti in campioni di cellule apoptotiche e lisati tumorali. I dati ottenuti hanno mostrato assenza di proliferazione nelle colture allestite con le cellule irradiate.

Publicazioni conseguite nell'ambito del progetto

Il presente progetto ha prodotto in questo primo anno di attività le seguenti pubblicazioni:

1. Maio M, Nicolay HJM, Ascierio P, Belardelli F, Camerini R, Colombo MP, Queirolo P, Ridolfi R, Russo V, Anzalone L, Fonsatti E, Parmiani G. The Italian Network for Tumor Biotherapy (NIBIT): getting together to push the field forward. *Journal of Translational Medicine* 2008;6:8.
2. Tassi E, Gavazzi F, Albarello L, Senyukov V, Longhi R, Dellabona P, Doglioni C, Braga M, Di Carlo V, Protti MP. Carcinoembryonic antigen-specific but not antiviral CD4+ T cell immunity is impaired in pancreatic carcinoma patients. *J Immunology* 2008;181:6595-6603.

Articolazione del progetto

L'articolazione del progetto è descritta nella Tabella 1:

Tabella 1. Articolazione della Rete nazionale per studi clinici e di strutture GMP per le bioterapie dei tumori

Proponente <i>(Coordinatori della rete)</i>	Ente di appartenenza dell'UO	Responsabile scientifico delle UO
ISS (<i>Enrico Proietti</i>) HSR (<i>Giorgio Parmiani</i>)	Azienda Ospedaliera Universitaria Senese	Michele Maio
	ISS	Maria Ferrantini
	HSR	Giorgio Parmiani
	AIFA	Cristina Pintus
	INT	Licia Rivoltini
	IRE	Paola Nisticò
	IEO	Maria Rescigno
	ISS	Enrico Proietti
	HSR	Maria Pia Protti
	CRO	Michele Maio
	ISS	Annarita Meneguz
	Pascale	Paolo Ascierto
	ISS	Giovanni Migliaccio
	ISS	Maria Cristina Galli
	IRST	Ruggero Ridolfi
	ISTGE	Barbara Parodi
	Fondazione IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena	Paolo Rebutta
	San Matteo	Rita Maccario
ISS	Carmen Rozera	