

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

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.

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

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-



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 linfochine prodotte;
3. funzione macrofagica;
4. presenza di cellule T citotossiche specifiche;
5. tassi sierici di particolari classi di linfochine.

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, 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.