

PARTE 3
Progetti speciali

PAGINA BIANCA

Accordo di collaborazione Italia-USA

Nel marzo 2003 l'Italia e gli Stati Uniti hanno firmato un accordo che prevede la collaborazione tra i ricercatori dei due Paesi nei seguenti campi:

- malattie rare;
- oncologia;
- malattie infettive di grande rilievo sociale e di possibile utilizzo con armi non convenzionali. Problemi di salute pubblica.

Gli Istituti Nazionali di Sanità degli Stati Uniti d'America (*National Institutes of Health*, NIH) e l'ISS della Repubblica italiana, desiderando rafforzare la collaborazione in essere, confermata nel *Memorandum* di Intesa firmato il 17 aprile 2003 dal Dipartimento per la Salute e i Servizi Umani degli Stati Uniti d'America e dal Ministero della Salute della Repubblica italiana, hanno incrementato la cooperazione nella ricerca e nella formazione nel campo delle scienze biomediche e comportamentali.

Da questo accordo sono derivate azioni molto importanti che hanno fatto scaturire collaborazioni di altissimo contenuto professionale e di ricerca.

Entrambe le parti intendono collaborare negli ambiti del proprio mandato istituzionale per promuovere la riduzione delle disuguaglianze nella salute a livello globale.

Le attività previste includono:

- organizzazione e attuazione congiunta di workshop;
- identificazione di opportunità di formazione congiunta per ricercatori, inclusi i ricercatori provenienti da Paesi in via di sviluppo e da economie in transizione;
- scambio di ricercatori;
- scambio di informazioni;
- scambio di materiali;
- realizzazione di progetti di ricerca congiunti che includono la ricerca traslazionale e clinica;
- conduzione di progetti di ricerca congiunti in Paesi terzi in via di sviluppo e in transizione;
- altre forme di cooperazione che comprendano il sostegno a ricercatori provenienti dai Paesi in via di sviluppo e in transizione.

Malattie rare

L'accordo bilaterale fra l'ISS (Italia) e gli NIH (Stati Uniti), finalizzato a sviluppare e a potenziare attività di ricerca e sanità pubblica su selezionate malattie rare, ha consentito nel 2006 il finanziamento di 82 progetti di ricerca. I progetti sono stati sviluppati nell'ambito di tematiche relative a:

- modelli di studio per la prevenzione di malattie rare;
- caratterizzazione di entità nosologiche e condizioni morbose senza diagnosi certa (dal sospetto diagnostico, alla caratterizzazione fenotipica e management clinico);
- sviluppo di nuovi approcci (molecolari, biochimici, strumentali, ecc.) diagnostici e prognostici;
- modelli sperimentali per lo sviluppo di nuove terapie (fase pre-clinica) e per la valutazione della loro sicurezza ed efficacia;
- ricerche in ambito epidemiologico e clinico, con particolare riferimento a studi su: incidenza, prevalenza, fattori di rischio, ritardo diagnostico, percorsi e linee guida diagnostico-assistenziali, a partire da dati del Registro Nazionale Malattie Rare;
- validazione e ottimizzazione di modelli per la valutazione della qualità della vita dei cittadini affetti da malattie rare, anche in relazione alla qualità dei servizi erogati.

Resoconto attività 2008

I risultati preliminari dei progetti finanziati (raggiunti durante i primi sei mesi di attività), sono stati presentati durante il primo workshop che si è tenuto in occasione della Conferenza internazionale sulle malattie rare e i farmaci orfani (5-8 novembre 2007, ISS; in: Taruscio D, Salvatore M. ISTISAN Congressi 07/C8). A distanza di un anno i responsabili di ciascun progetto sono stati invitati a presentare il nuovo stato di avanzamento dei loro risultati in occasione del secondo workshop sui progetti svolti nell'ambito della collaborazione ISS-NIH tenutosi in occasione del Congresso internazionale "Malattie rare e farmaci orfani" (27-31 ottobre, 2008, ISS). I risultati raggiunti sono stati riassunti da ciascun responsabile di progetto in un *abstract* raccolto all'interno di uno speciale volume edito dall'ISS (Taruscio D, Salvatore M. ISTISAN Congressi 08/C10).

Le tematiche affrontate nei progetti hanno riguardato principalmente temi legati a patogenesi, diagnosi, trattamento e gestione clinica di varie malattie rare e, ad ognuna di esse, è stata dedicata un'apposita sezione durante i lavori del workshop.

In particolare, i progetti di ricerca relativi alla "patogenesi" di malattie rare erano rivolti sia alla comprensione delle basi molecolari, genetiche e funzionali che allo studio della regolazione dei meccanismi di espressione genica in alcune malattie e tumori rari.

I progetti di ricerca relativi alla "diagnosi" erano rivolti principalmente a: i) diagnosi genomica e classificazione attraverso tecnologie avanzate di alcune malattie rare caratterizzate, ad esempio, da ritardo mentale e difetti nello sviluppo neurale; ii) sviluppo di nuovi approcci diagnostici nello studio di alcune patologie caratterizzate da neuropatie e difetti cardiovascolari; iii) analisi di fattori genetici ed epigenetici sottesi ad ampie coorti di pazienti affetti da sindrome di Beckwith-Wiedemann, epidermolisi bullosa ereditaria, linfomi e tumori maligni rari; iv) diagnosi e possibili bersagli terapeutici di rare malattie metaboliche, cardiache e del sangue.

Infine, un gruppo di progetti era strettamente legato alla tematica del "trattamento e gestione clinica" e finalizzato pertanto allo sviluppo di nuove strategie e terapie innovative per alcune rare patologie neurodegenerative, muscolari, immunologiche e metaboliche.

Sebbene la maggior parte dei risultati presentati siano stati ottenuti da eccellenti gruppi di ricercatori italiani, è importante sottolineare che molti progetti sono stati sviluppati all'interno di più ampie collaborazioni a livello internazionale, attraverso lo sviluppo di specifici network di collaborazione con enti di ricerca e associazioni di pazienti di tutto il mondo. Tutto questo ad indicare il ruolo sempre più determinante dell'approccio interdisciplinare nella ricerca rivolta alla comprensione delle malattie rare.

Attività programmata 2009

Nel corso del 2009 verranno continuate e concluse le attività di ricerca sui progetti finanziati. I risultati definitivi verranno presentati nel corso del terzo workshop a questi dedicati che si svolgerà nel mese di novembre presso l'ISS.

Oncologia

— *La sieroproteomica per la diagnosi precoce delle neoplasie*

Lo studio dell'insieme delle proteine e delle loro reciproche interazioni ("proteomica") ha acquistato in questi anni un ruolo fondamentale nella ricerca oncologica. L'analisi proteomica è oggi possibile mediante nuove metodiche di spettrometria di massa, messe a punto dal gruppo statunitense di L. Liotta ed E. Petricoin presso l'NIH e utilizzate con successo per valutare le modifiche del corredo proteico nel siero di pazienti affetti da neoplasie, specificamente nei tumori dell'ovaio. Questo corredo proteico, confrontato con

quello di soggetti sani, ha rivelato interessanti differenze che hanno aperto la strada all'identificazione di nuovi marcatori precoci di malignità oncologica ed eventualmente nuovi bersagli terapeutici. Le informazioni derivate dalla sieroproteomica applicata ai tumori umani può consentire di individuare dei *pattern* predittivi per la diagnosi precoce e il trattamento personalizzato dei tumori. Il programma Italia-USA di Oncoproteomica si propone di applicare tali metodiche ad alcune neoplasie molto diffuse, mettendo in stretta collaborazione il gruppo statunitense di Liotta-Petricoin presso la *George Mason University* (GMU) e i principali IRCCS e Centri Oncologici di ricerca italiani, coordinati dall'ISS.

Il programma prevede la raccolta di circa 11.000 sieri corredati da schede anamnestiche e di informazioni emato-chimiche provenienti da pazienti affetti da tumori della mammella, colon, ovaio, polmone, prostata, fegato, leucemie, melanoma e da soggetti sani.

— *I microRNA: la nuova frontiera dell'oncologia*

I micro RNA (miR) sono dei piccoli RNA (21-25 nucleotidi) non codificanti capaci di inibire la sintesi di specifiche proteine attraverso una modulazione della stabilità e della efficienza traslazionale di specifici RNA messaggeri. I miR sono prodotti come trascritti primari (*long pri-miR*) processati successivamente da complessi enzimatici nucleari (Drosha) e citoplasmatici (Dicer) fino a produrre i maturi miR. È stato dimostrato che l'espressione dei miR è specifica per tessuti e per stadi di sviluppo, sia in modelli animali che nell'uomo, ma i meccanismi di produzione/maturazione dei miR e soprattutto le loro funzioni e specificità di azione su specifici bersagli sono attualmente oggetto di approfondito studio e di grande interesse, soprattutto nel campo oncologico.

Resoconto attività 2008

— *La sieroproteomica per la diagnosi precoce delle neoplasie*

Nel corso del 2008 si è proceduto all'ulteriore raccolta di sieri e di schede da parte dei Centri, con relativo stoccaggio e spedizione dei sieri alla Biobanca dell'Ospedale Maggiore di Milano e immissione delle schede nel database da parte del Coordinamento. Alla fine del 2008 il numero di campioni di sieri raccolti ammonta a circa 5.000 per i "casi" e 3.000 per i "controlli". Oltre all'attività relativa alla raccolta di sieri, si è continuato ad effettuare le spedizioni dei campioni in USA per le analisi di spettrometria di massa presso la GMU e il *National Cancer Institute* (NCI) di Bethesda. In sintesi, nel corso dell'ultimo anno sono stati ottenuti considerevoli risultati con l'invenzione di nuove piattaforme tecnologiche che sono state applicate all'analisi dei tessuti e del sangue. Queste includono: i) nuove nanotecnologie per la selezione di marcatori biologici, ii) miglioramento nelle tecniche di microdissezione con cattura laser, di preparazione del campione sia per la spettrometria di massa che per i *microarray* di proteine, iii) la scoperta di nuovi marcatori ematici e tissutali per la diagnosi e la terapia, e iv) nuovi accorgimenti per preservare la struttura chimica dei biomarcatori. Questi studi sono stati condotti anche grazie all'attività dei borsisti del Programma Italia-USA, che nel corso del 2008 sono aumentati di sette unità, alle quali si aggiungono tre ricercatrici italiane alle quali è stata assegnata una integrazione per poter svolgere la loro attività presso la GMU. Il bilancio dell'attività svolta finora è più che positivo, grazie anche all'implementazione di tre piattaforme tecnologiche che hanno consentito il trasferimento di tecnologie innovative in campo proteomico dagli Stati Uniti all'Italia: i) la piattaforma per l'analisi *Reverse Phase Protein Microarray* presso l'Università di Padova, ii) la piattaforma tecnologica per la spettrometria di massa per analisi di sieroproteomica presso l'ISS, e iii) la piattaforma bioinformatica presso il Consiglio Nazionale delle Ricerche di Avellino.

– *I microRNA: la nuova frontiera dell'oncologia*

Mediante metodologia di *microarray*, è stata valutata l'espressione dei miR in una larga serie di tessuti umani normali e neoplastici. Uno studio approfondito è stato effettuato sulla espressione dei miR nei singoli *lineage* ematopoietici, generati in colture di progenitori CD34+ indotti a differenziazione unilinea. In questi studi l'espressione dei miR è risultata lineare e stadio-specifica, come evidenziato dall'analisi del *clustering*. Inoltre, è stata studiata l'espressione dei miR in una varietà di tipi cellulari comprese cellule mesenchimali primitive e cellule differenziate da esse generate, cellule neurali primitive normali e di glioblastoma, nonché in cellule staminali tumorali isolate da una varietà di tumori solidi.

Un importante risultato è stato ottenuto nel carcinoma prostatico, grazie all'identificazione di una delezione del *cluster* miR-15a/miR-16-1, particolarmente frequente nelle forme avanzate. Lo studio ha dimostrato che questo *cluster* agisce da soppressore tumorale, attraverso il controllo di molteplici geni target. Queste indagini possono costituire la base per future terapie molecolari nel carcinoma della prostata.

Inoltre, sono stati approfonditi gli studi sul ruolo dei miR 155, 221, 222 nel controllo della megacariopoiesi, che hanno confermato il coinvolgimento dei due fattori di trascrizione Ets1 e Meis1. È stato anche analizzato il ruolo del miR-221/-222 nella progressione del melanoma, dimostrando anche su modelli animali che il silenziamento di questi miR è associato ad una riduzione della crescita e della disseminazione metastatica del tumore.

Attività programmata 2009

In considerazione dei successi ottenuti dal Programma e del ruolo che lo stesso esercita nello scenario della ricerca italiana, grazie in primo luogo al trasferimento tecnologico e di *know how* dagli Stati Uniti al nostro Paese, è di fondamentale importanza che le attività scientifiche intraprese proseguano senza interruzioni. Per tale motivo sarà avanzata richiesta di rinnovo del Programma.

Malattie infettive di grande rilievo sociale e di possibile utilizzo con armi non convenzionali. Problemi di salute pubblica

Al contrario di pochi anni fa, quando un atto di bioterrorismo era ritenuto piuttosto remoto, gli eventi recenti e la situazione internazionale complessiva inducono oggi a ritenere che un attacco bioterroristico anche su larga scala sia di fatto possibile. In questo contesto, tutte le istituzioni di ricerca internazionali sono impegnate da un lato nella validazione puntuale degli strumenti di lotta ai vari agenti di classe A ora esistenti, e contemporaneamente alla individuazione delle deficienze e alla programmazione di ricerche atte a colmare queste deficienze il più rapidamente possibile. Strumento da tutti ritenuto comunque essenziale per la riuscita di questa strategia è una forte collaborazione internazionale che integri e sinergizzi le forze in campo, come anche riconosciute da tutte le istituzioni finanziatrici di grandi progetti internazionali nel settore (NIH, Programmi Quadro europei, ecc.).

Brillante esempio di questo approccio è stato il successo goduto dai laboratori del network WHO per la lotta alla SARS, certamente non un attacco bioterroristico ma con in più tutte le caratteristiche di un nuovo e inaspettato evento epidemico su scala globale.

Fra tutti i possibili agenti di attacco bioterroristico, *Bacillus anthracis*, e precisamente le sue forme sporali, è unanimemente riconosciuto come uno dei più probabili per un attacco su larga

scala in futuro per quasi tutte le caratteristiche che un buon agente bioterroristico “deve” avere e cioè:

- indurre una patologia grave a basso dosaggio per via inalatoria
- avere caratteristiche di elevata resistenza ambientale
- non essere prevenibile da un efficace e sicuro vaccino esistente
- poter essere preparato in grandi quantità
- poter essere conservato e disseminato con facilità
- avere un corto periodo di incubazione (nella forma inalatoria)

Inoltre, è da considerare che un attacco bioterroristico con antrace è già avvenuto con successo (lettere all’antrace negli Stati Uniti) sia pure non nelle forme e negli scenari catastrofici più comunemente immaginati.

Quantunque molte siano le conoscenze già possedute sull’agente della malattia e sulla malattia stessa, esistono molti gap di conoscenze che è necessario affrontare organicamente per poter disporre di strumenti efficaci e sicuri di prevenzione e controllo di un eventuale attacco bioterroristico.

Oltre a nuove ricerche di base, è soprattutto necessario traslare l’ampia mole di ricerche già in corso in utili strumenti di lotta, attraverso progetti di ricerca applicata e operativa, in particolare mirati a generare:

- test diagnostici sicuri e affidabili sul campo e in laboratorio;
- farmaci innovativi;
- preparazione laboratoristica ad un eventuale attacco.

La sinergia fra i migliori gruppi di ricerca italiana e americana impegnati nel settore o reclutati *ex novo* potrà costituire il valore aggiunto per la rapida generazione di nuovi strumenti. La collaborazione pubblico-privato con meccanismi di cofinanziamento è anche da ritenersi fondamentale, con l’individuazione e la generazione di piattaforme e reti integrate di validazione diagnostica e *high-throughput screening* di nuovi prodotti terapeutici nonché per la generazione di vaccini e anticorpi terapeutici.

Resoconto attività 2008

L’attività del 2008 ha terminato e aggiornato il completamento delle collaborazioni di ricerca nel settore fra i vari componenti delle UO. Tutte le UO hanno collaborato attivamente nel raggiungere gli obiettivi proposti con un largo numero di pubblicazioni internazionali. Una riunione finale del gruppo di collaborazione è prevista per fine 2009.

Attività programmata 2009

L’attività del 2009 concluderà il progetto attraverso una riunione finale annuale.

Progetti tra Istituto Superiore di Sanità e *National Institutes of Health*

L’accordo con gli NIH rappresenta un importante traguardo per l’ISS per la straordinarietà e la peculiarità del rapporto di collaborazione tra i due gemelli NIH americani e ISS poiché si tratta di un accordo che per la prima volta viene coperto finanziariamente da entrambi i Paesi. Una nuova intesa che promuove progetti di ricerca su numerosi e importanti settori della biomedicina quali: le neoplasie, le malattie cardiovascolari, le malattie respiratorie, la salute della donna, le neuroscienze (che includono le malattie neurodegenerative), la ricerca sulla riabilitazione in campo medico, le malattie infettive (tra cui l’infezione da HIV/AIDS) e il tabagismo. L’accordo riserva, inoltre, una parte delle risorse per la creazione di *partnership* in Paesi terzi finalizzate a

ridurre le disuguaglianze nella salute a livello globale. Attraverso questa azione, poi, oltre a valorizzare le eccellenze, si creano sinergie in modo nuovo con la mobilità dei ricercatori e lo scambio delle competenze, che sono parte essenziale di quest'accordo, formano una nuova importante rete per l'avanzamento della conoscenza e costituiscono un investimento importante e sistematico sui nuovi talenti in base a una visione comune della politica della ricerca.

Nell'ambito di tale collaborazione è stato individuato, valutato e deliberato, da parte del Comitato Scientifico dell'ISS, il finanziamento di circa 70 progetti che verranno portati avanti nelle varie strutture dipartimentali dell'ISS insieme agli Istituti degli NIH di seguito elencati: *National Cancer Institute; National Institute of Allergy and Infectious Diseases; National Institute of Environmental Health Sciences; National Institute for Alcohol abuse and Alcoholism; National Institute of Neurological Disorders and Stroke; National Institute on Drug Abuse; National Institute of Mental Health; National Institute of Child Health and Human Development; Department of Transfusion Medicine; National Heart, Lung and Blood Institute; National Eye Institute; National Human Genome Research Institute; National Institute of Aging; National Center for Complementary and Alternative Medicine; National Center for Medical Rehabilitation Research.*

Altri progetti sono stati avviati tra l'ISS e istituzioni americane finanziate dagli NIH quali: *John Hopkins University; Public Health Research Institute; Washington University School of Medicine; Rockefeller University; University of Illinois at Chicago; University School of Medicine Boston; Vanderbilt University Medical Center; George Mason University.*

Nel corso del 2006 si è tenuto in ISS un convegno dal titolo *ISS/NIH Collaboration Programme. 2006 Meeting* durante il quale sono stati comunicati i risultati conseguiti nell'ambito della collaborazione Italia/USA e più in particolare tra l'ISS e gli NIH. Tale convegno ha visto la partecipazione anche dei partner americani e ha riscosso grande successo, per questo motivo sono state raccolte le sintesi degli interventi dei relatori che sono state pubblicate a cura dell'ISS (*ISS/NIH Collaborative Programme. 2006 Progress Report Meeting*, Rapporti ISTISAN 06/50).

Nel 2007 i progetti esistenti hanno ricevuto ulteriori finanziamenti per continuare a svolgere le ricerche in programma e per proseguire la proficua collaborazione messa in atto anche grazie all'attività svolta in USA da giovani ricercatori provenienti da varie istituzioni nazionali che hanno usufruito di una borsa di studio.

A fine 2008 sono in scadenza i Progetti ISS-NIH, che hanno prodotto straordinari risultati nel campo della biomedicina. Risultati che sono testimoniati non solo dalla produzione di alcuni brevetti ma anche dal numero rilevante di articoli pubblicati su riviste internazionali con elevato *Impact Factor*. Le relazioni finali di tali progetti, con il dettaglio degli esiti raggiunti, dei brevetti e delle pubblicazioni, saranno contenute in un volume della serie Rapporti Istisan in corso di stampa.

Ad aprile 2009 l'ISS ospiterà un convegno internazionale nel quale saranno descritti tutti i Progetti ISS-NIH e i risultati raggiunti.

Accordo ISS-Novartis (ex Chiron) per lo sviluppo di un vaccino combinato contro l'HIV/AIDS

Nel 2002 è stato ratificato tra l'ISS e Novartis (*ex Chiron Corporation*) un accordo scientifico finalizzato allo sviluppo di vaccini di seconda generazione contro l'HIV/AIDS comprendenti Tat in associazione ad altri antigeni di HIV. Obiettivo dell'accordo, finanziato pariteticamente dal Ministero della Salute e da Novartis, è la creazione di una *task force* accademico-industriale, competitiva a livello internazionale, volta a sviluppare ricerche

innovative nel campo dei vaccini contro l'AIDS. L'accordo è fondato su risultati ottenuti indipendentemente da Novartis e ISS con i rispettivi vaccini. Il contributo di ISS è basato sull'esperienza pluriennale nel vaccino basato sulla proteina Tat, di cui si è recentemente conclusa con successo la fase I di sperimentazione clinica preventiva e terapeutica di fase I in Italia, per valutarne l'innocuità e l'immunogenicità. Novartis sta concludendo la fase I della sperimentazione clinica di un vaccino preventivo basato sulla molecola trimerica $\Delta V2$ Env, un immunogeno di nuova concezione in grado di indurre anticorpi neutralizzanti *cross-clade* grazie ad una migliorata esposizione del dominio responsabile del riconoscimento dei co-recettori per HIV (Env V3 loop).

L'accordo prevede studi preclinici, condotti in primati non-umani, volti a valutare l'efficacia della combinazione degli approcci vaccinali ISS e Novartis. Il programma di ricerca e sperimentazione è organizzato in sei fasi distinte e consecutive: i) produzione di antigeni e di sistemi di *delivery*; ii) sfruttamento di Tat come adiuvante per Env e identificazione delle formulazioni appropriate per gli antigeni combinati; iii) studi vaccinali preclinici parenterali e mucosali nel modello murino; iv) trial preclinici di efficacia mucosali e sistemici nei primati non umani; v) produzione in condizioni GLP del candidato vaccinale selezionato per i trial clinici di fase I; vi) studi di tollerabilità e immunogenicità del candidato vaccinale prodotto in condizioni GLP per il futuro sviluppo GMP e per l'approvazione dell'uso nell'uomo.

Parte di questi obiettivi è già stata raggiunta. In particolare, nel biennio 2003-2005 l'ISS ha prodotto e validato la proteina Tat di HIV-1 (biologicamente attiva) e un mutante di Tat (Tatcys22), privo di attività transattivante. Novartis ha prodotto antigeni strutturali virali, tra cui la proteina Gag di HIV-1 e il DNA di HIV-1 esprimente Gag, il DNA e la proteina $\Delta V2$ Env, peptidi di HIV-1 Env, la proteina Gag di SIV mac239, e adiuvanti mucosali (MF59, LT-K63). Grazie all'accordo, sono stati compiuti nel Centro Nazionale AIDS esperimenti di immunizzazione combinando Tat di HIV-1 e Gag di SIV o Tat e $\Delta V2$ -Env, nel topo e nella scimmia. Gli studi vaccinali condotti nel topo hanno evidenziato che l'associazione Tat/Env è superiore alla combinazione di Tat con Gag o di Tat con Env e Gag nell'indurre risposte immuni umorali e cellulari specifiche. Questi studi hanno indicato che la proteina Tat ha la capacità di polarizzare in senso Th1 la risposta immune cellulare, confermando dati recenti emersi dalle ricerche del Centro Nazionale AIDS.

Resoconto attività 2008

Obiettivo dell'accordo, finanziato pariteticamente dal Ministero della Salute e da Novartis (ex Chiron), è la creazione di una *task force* accademico-industriale, competitiva a livello internazionale, volta a sviluppare ricerche innovative nel campo dei vaccini contro l'AIDS. Il candidato in fase più avanzata di sviluppo è un vaccino basato sulla combinazione della proteina Tat con il prodotto di geni strutturali di HIV (Env, Gag).

In questo contesto, sono stati prodotti nuovi lotti della proteina Tat e di un suo mutante privo di attività transattivante (Tatcys22), nuovi lotti della proteina $\Delta V2$ Env e della proteina Gag, del DNA di HIV-1 esprimente Gag, del DNA di $\Delta V2$ Env, peptidi di HIV-1 Env, la proteina Gag di SIV mac239, e adiuvanti mucosali (MF59, LT-K63). Sono stati inoltre prodotti vettori basati sugli *alphavirus* per l'espressione di Tat e di un Env modificato debole della regione V2 ($\Delta V2$ Env).

Studi pre-clinici nel modello murino hanno dimostrato l'innocuità e l'immunogenicità delle componenti usate singolarmente o in combinazione (Caputo *et al.* *Vaccine* 2008;26:1214-27; Brave *et al.* *Vaccine* 2007;25:6882-90; Gavioli *et al.* *Vaccine* 2008;26:727-37).

È in fase di conclusione la sperimentazione della combinazione Tat/ $\Delta V2$ Env relativa al secondo protocollo di vaccinazione sistemica e mucosale con *challenge* intrarettale con SHIV R5-tropico nelle scimmie *Macaca fascicularis*. Il follow-up clinico e virologico (viremia

plasmatica, DNA provirale, conta dei linfociti CD4+) attualmente in corso servirà a determinare se la vaccinazione conferisca un migliore controllo dell'infezione durante la fase cronica.

Sono stati inoltre prodotti i sottotipi B e C delle proteine di Env ($\Delta V2$ Env) in condizioni di GMP, che sono disponibili per test pre-clinici e clinici insieme con il candidato vaccinale Tat prodotto in condizioni di GMP. Attualmente è in corso la valutazione della stabilità a lungo termine del sottotipo C di $\Delta V2$ Env. Analogamente, è stata realizzata la produzione di Tat GMP e sono stati compiuti gli studi di stabilità a lungo termine del prodotto.

È iniziato lo scambio di informazioni fra ISS e Novartis necessario per la preparazione dei documenti regolatori richiesti per la conduzione in Italia e in Africa dei trial clinici con il candidato vaccinale basato sulla combinazione di Tat e $\Delta V2$ Env. In particolare, è stata finalizzata l'importazione della proteina $\Delta V2$ Env necessaria alla conduzione degli studi clinici e alla preparazione della documentazione per richiedere l'autorizzazione alla sperimentazione di fase I.

Sono stati, infine, condotti studi nei topi per accertare l'innocuità e l'immunogenicità delle proteine GMP Tat del sottotipo B e $\Delta V2$ Env del sottotipo C, dopo inoculo singolo o ripetuto delle due proteine somministrate sia singolarmente che in associazione. I risultati ottenuti dopo singola o multipla somministrazione del vaccino combinato Tat/Env indicano che questo è sicuro e immunogenico, e che la risposta immune indotta è superiore a quella ottenuta tramite inoculazione delle singole proteine.

Attività programmata 2009

Sono in corso di preparazione nuovi esperimenti di tossicità e immunogenicità *in vivo* (topo, coniglio e/o ratto), utilizzando lo stesso schema di immunizzazione che verrà utilizzato nei trial clinici, da eseguirsi in ambiente certificato GLP, come richiesto dalle attuali norme italiane ed europee.

È stata finalizzata una bozza per il rinnovo dell'accordo fra ISS e Novartis che prevede la prosecuzione degli studi oggetto del precedente accordo.

AIDS Vaccine Integrated Project (AVIP)

Vaccini basati su prodotti di geni strutturali (Env/Gag/Pol), da soli o in combinazione, non sono stati capaci di prevenire l'infezione con SIV/HIV nel modello preclinico, mentre vaccini basati sui geni regolatori (Tat/Rev/Nef) sono stati capaci di contenere la replicazione virale e di bloccare la progressione clinica dell'infezione. Un vaccino basato sulla combinazione sia di geni strutturali che regolatori, potrebbe avere una efficacia superiore poiché indurrebbe risposte immuni contro antigeni virali sia precoci che tardivi. La missione del progetto AVIP è quella di sviluppare nuovi vaccini preventivi e terapeutici da utilizzare in trial clinici di fase I in Europa nell'arco dei cinque anni di durata del progetto. A questo scopo sono stati selezionati quattro candidati vaccinali sulla base di due presupposti: i) combinazione di geni regolatori di HIV (Tat, e/o Rev, e/o Nef) con geni strutturali (Env, e/o Gag/Pol) e ii) lo stadio di avanzamento dei singoli candidati vaccinali con l'inclusione di studi di efficacia in modelli preclinici. Il razionale e l'obiettivo di questi vaccini è l'induzione di risposte immuni antivirali che, modificando sin dall'inizio l'interazione virus-ospite, assicurino il controllo della replicazione virale e, conseguentemente, la progressione clinica dell'infezione e, a causa della ridotta carica virale, anche la trasmissione di HIV ad individui sani. Questa strategia sarà utilizzata sia in approcci preventivi che terapeutici che prevedono la combinazione di geni e prodotti genici sia regolatori che strutturali. A questo proposito, i partecipanti a questo Consorzio hanno introdotto

modificazioni nel gene Env di HIV (delezione nella regione V2 di Env) che permettono la esposizione di epitopi immunogenici che sono conservati tra i diversi sottotipi virali. Questo dovrebbe impedire la selezione o la comparsa di mutanti virali non più controllabili dal sistema immune.

In particolare, la formulazione dei candidati vaccinali selezionati dall'AVIP si basa su due strategie fondamentali. In un primo approccio il vaccino è costituito da una proteina regolatoria (Tat o Nef) e una proteina strutturale (Env V2 deleto – deltaV2 Env).

- Tat ± deltaV2 Env (*prime* e *boost* con proteina)
- Nef ± deltaV2 Env (*prime* e *boost* con vettori virali e proteina).

Lo scopo di questa combinazione è quello di valutare il contributo del singolo gene regolatore nell'indurre immunità protettiva sia di tipo cellulare che umorale (anticorpi neutralizzanti).

Un secondo approccio che vuole mimare il vaccino basato sul virus vivo attenuato, considera invece la combinazione di molteplici proteine sia strutturali che regolatorie.

- Multi-HIV antigeni/epitopi [geni rev, tat, nef, gag (p17, p24), e più di 20 epitopi T delle proteine Pol, Proteasi ed Env di *clade* virali diverse (A,B,C, FGH).
- HIV vaccino basato su una combinazione multigenica (nef, rev, tat, gag, rt, env).

L'efficacia dei diversi antigeni che compongono i candidati vaccinali di AVIP, è stata dimostrata in modelli preclinici. Inoltre, per alcuni di questi antigeni (HIV Tat *clade* B, MVA-HIV Nef *clade* B, Multi-HIV antigeni/epitopi *clade* B, HIV multigene *clade* B) trial clinici sono stati già completati, o sono in corso (HIV deltaV2 Env *clade* B, Multi-HIV antigeni/epitopi *multiclade*, HIV multigene *clade* A,B,C), mentre per altri (HIV Tat + deltaV2 Env e HIV Nef + deltaV2 Env) i trial clinici inizieranno a breve.

L'analisi comparativa dei trial preclinici e clinici di fase I di questi candidati vaccinali permetterà la selezione di candidati vaccinali da valutare in trial clinici di fase II/III nell'ambito di una *partnership* tra Europa e Paesi in via di sviluppo (EDCTP).

Le attività del progetto AVIP sono le seguenti::

- Studi preclinici (topi, scimmie) per la selezione della migliore formulazione e protocollo vaccinale dei candidati da testare in trial clinici di fase I.
- Produzione in GMP degli antigeni vaccinali, valutazione della tossicità, preparazione del dossier per l'approvazione del uso sull'uomo.
- Esecuzione di trial clinici preventivi di fase I e follow-up.
- Esecuzione di trial clinici terapeutici di fase I e follow-up.
- Studi immunologici focalizzati al riconoscimento *cross-clade* dei candidati vaccinali di AVIP preparatori a futuri trial clinici di fase II/III da condurre nei Paesi in via di sviluppo.
- Utilizzo di *European Vaccine against AIDS (EVA) Programme – Centralised Facility for AIDS Reagents* (NIBSC, UK) come banca centralizzata che, attraverso la distribuzione di reagenti standardizzati, supporta tutte le attività di ricerca, sviluppo e dimostrazione di AVIP.

Tra gli scopi generali del progetto vi sono anche le attività di formazione e trasferimento tecnologico considerate come preparatorie per studi clinici di fase avanzata da condurre nel prossimo futuro in Europa e nei Paesi in via di sviluppo. Il Consorzio AVIP è costituito da 20 centri di ricerca di provata esperienza e professionalità appartenenti a diversi Paesi europei (Italia, Germania, Francia, Finlandia, Svezia, Regno Unito) e al Sudafrica.

Il progetto AVIP è coordinato dal CNAIDS, e finanziato dalla Comunità Europea (FP6).

Il Consorzio è governato da una *Steering Committee* che, a sua volta, si avvale di un *Advisory Board* e *Monitoring Committee*, i cui membri sono esperti internazionali. Inoltre,

l'AVIP pone particolare enfasi in programmi di educazione e ha creato l'“*AVIP International School*” a cui concorrono centri europei e sudafricani il cui compito principale è quello di educare giovani ricercatori e di armonizzare e standardizzare procedure e altri aspetti associati allo sviluppo di vaccini e alla conduzione di trial clinici.

L'AVIP sinergizza con le proprie risorse economiche e scientifiche con altri progetti nazionali e internazionali già esistenti quali: i) Azione concertata italiana per lo sviluppo di un vaccino contro HIV/AIDS (ICAV), ii) Agenzia svedese per lo sviluppo e cooperazione (SAREC)/SIDA, iii) Programmi bilaterali con Paesi in via di sviluppo (Italia-Sudafrica, Italia-Uganda, Italia-Swaziland, Svezia-Tanzania, Regno Unito-Uganda), iv) Progetti e Network europei (HIVIS, VIAV, MUVAPRED, EAPN).

Resoconto attività 2008

Il progetto AVIP è continuato nel 2008, come da programma, raggiungendo tutti gli obiettivi che si era prefissato (valutazione di immunogenicità ed efficacia di quattro diversi approcci vaccinali, sviluppo delle capacità cliniche e di laboratorio di siti in Sudafrica e in Swaziland per la conduzione di trial clinici con vaccini contro l'HIV/AIDS). In particolare, per alcune combinazioni vaccinali (HIV Tat *clade* B, MVA-HIV Nef *clade* B, Multi-HIV antigeni/epitopi *clade* B, HIV multigene *clade* B) trial clinici preventivi o terapeutici di fase I sono stati completati, (HIV ΔV2 Env *clade* B e C, Multi-HIV antigeni/epitopi *multiclade*, HIV multigene *clade* A,B,C).

Le seguenti attività del progetto AVIP sono state continuate o iniziate nel corso del 2008:

- Studi di immunogenicità ed efficacia in scimmie con proteine Tat e ΔV2 Env (*clade* B) infettate rettamente con SHIV R5-tropico dopo vaccinazione. I risultati dello studio, volto ad individuare la migliore modalità e via di somministrazione del vaccino, sono in fase di valutazione.
- Standardizzazione di test, scambio di *Standard Operating Procedure* (SOP), al fine di migliorare il rilevamento delle risposte immuni, training inter-laboratorio di personale, trasferimento tecnologico.
- Produzione in GMP degli antigeni vaccinali, valutazione della tossicità, preparazione del dossier per l'approvazione dell'uso sull'uomo. È stato acquisito ΔV2 Env *clade* C *research grade* e GMP.
- Interazione di scimmie *cynomolgus* con SHIV-1157ipd3N4 di *clade* C al fine di sviluppare SHIV patogeni di *clade* C da utilizzare come virus *challenge*.
- Conduzione di studi virologici per l'identificazione di sottotipi di HIV immunologici focalizzati al riconoscimento *cross-clade* dei candidati vaccinali di AVIP ed epidemiologici, preparatori a futuri trial clinici di fase II/III da condurre nei Paesi in via di sviluppo (Sudafrica e Swaziland).
- Utilizzo della “*European Vaccine against AIDS (EVA) Programme – Centralised Facility for AIDS Reagents* (NIBSC, UK)” quale banca centralizzata di reagenti standardizzati.
- Inserimento delle attività AVIP nell'ambito del progetto EUROPRIDE mirante alla creazione di un network europeo per lo sviluppo di vaccini contro HIV/AIDS.

L'insieme delle attività condotte tra il 2005-2008 nel contesto del progetto AVIP e del progetto MUVAPRED (in cui il CNAIDS partecipa quale partner) indica che la vaccinazione di scimmie *Cynomolgus* con le proteine Tat e ΔV2-Env di HIV-1 da sole e in combinazione, somministrate per via sistemica o mucosale, protegge dall'infezione con uno SHIV CCR5-tropico somministrato per via intrarettale. Sulla base di questi risultati, nel 2008 è stato presentato alla Commissione Europea il progetto AVIP-TEV, mirante alla conduzione di trial

terapeutici di fase I in Sudafrica con un vaccino basato sulla combinazione di Tat e ΔV2Env (*clade C*) di HIV-1.

Nel 2008, nell'ambito del progetto AVIP sono stati organizzati i seguenti congressi/workshop:

- *Report of the forth year of activity and planning for the next 18 months of the AVIP Program*, Urbino 13 e 14 marzo 2008.
- *5th AVIP Workshop on “Data specification spreadsheets, statistical analysis and presentations”*, Tampere (UK) 12 e 13 giugno 2008.
- *Advisory Board and Monitoring Committee meeting Franschhoek*, Cape Town (Sudafrica) 17 e 18 ottobre 2008.
- *AVIP Scientific meeting*, 18 e 19 ottobre 2008.

Attività programmata 2009

In considerazione dei risultati ottenuti, la Commissione Europea ha esteso il progetto fino al gennaio 2010. Le attività previste per il 2009 sono:

- Produzione GMP di Tat (*clade B*) e ΔV2 Env (*clade C*).
- Completamento della documentazione per l'approvazione del vaccino combinato per l'uso nell'uomo da parte delle Agenzie regolatorie.
- Completamento del follow-up dei trial clinici di fase I condotti con i singoli antigeni (Tat; ΔV2 Env; Nef).
- Follow-up delle scimmie inoculate con lo SHIV di *clade C* per la valutazione della sua patogenicità e preparazione degli stock virali per il *challenge* delle scimmie vaccinate con Tat *clade B* e DV2-Env *clade C*.
- Implementazione delle attività nei Paesi in via di sviluppo; quali gli studi volti a valutare la *cross*-reattività delle risposte immuni indotte dal vaccino Tat/ΔV2 Env verso i sottotipi virali presenti in questi Paesi.
- Deposito, circolazione e *testing* centralizzato dei reagenti sviluppati in AVIP, nello *European Vaccine against AIDS (EVA) Programme – Centralised Facility for AIDS Reagents* (NIBSC, UK).
- Implementazione delle SOP per la standardizzazione dei saggi e delle procedure per la conduzione dei trial e delle analisi di laboratorio, trasferimento di tecnologie, *training* e interscambio di personale tra i centri clinici e i laboratori centrali nei siti dei vari paesi coinvolti per garantire l'armonizzazione e gli standard di qualità GCP/cGLP (*Buona Pratica Clinica, Good Clinical Practice/current Good Laboratory Practice*) intra- e inter-centro.
- Implementazione delle attività relative allo sviluppo di vaccini efficaci contro HIV/AIDS nel quadro del network EUROPRISE.

Archivi sostanze e preparati pericolosi

Presso il CSC, viene svolta un'intensa attività nel campo delle sostanze e dei preparati chimici pericolosi. Nell'ambito di tali attività sono stati creati, e vengono regolarmente aggiornati, archivi informatizzati riguardanti aspetti specifici seguiti dal Centro, che possono essere resi accessibili o a utenti selezionati (es. i Centri Antiveneni nazionali per l'Archivio Preparati), o a tutti i cittadini, quale contributo ad una migliore conoscenza sui prodotti chimici utilizzati sia in ambiente professionale che domestico, e in un'ottica di sempre maggiore trasparenza sulle informazioni disponibili e non confidenziali. L'Archivio Preparati Pericolosi è una banca dati informatizzata sui

preparati pericolosi in base a quanto stabilito dall'art. 10 del DL.vo n. 285 del luglio 1998 riguardante la classificazione, l'imballaggio e l'etichettatura dei preparati pericolosi; riporta le composizioni chimiche complete dei preparati pericolosi presenti sul mercato nazionale; poiché contiene informazioni confidenziali è accessibile solo ai Centri Antiveleni accreditati dal Ministero della Salute. Le aziende produttrici che immettono sul mercato nazionale preparati classificati come pericolosi devono produrre alcune informazioni rilevanti, compresa la composizione chimica, all'Archivio Preparati che le registra. Queste informazioni sono molto utili per poter adottare le varie misure preventive o curative in caso di emergenza.

L'art. 9 della Legge del 23 dicembre 1978, n. 833 ha affidato all'ISS il compito di approntare e aggiornare periodicamente l'Inventario Nazionale Sostanze Chimiche (INSC), corredato dalle caratteristiche chimiche, fisiche e tossicologiche necessarie per la valutazione del rischio sanitario connesso alla loro presenza nell'ambiente. Questa banca dati relazionale rappresenta per l'Amministrazione pubblica il punto di riferimento nazionale per la raccolta delle informazioni disponibili sulle sostanze chimiche di maggior rilievo.

L'Elenco delle Sostanze Classificate riporta la classificazione aggiornata di cui all'allegato I della Direttiva 67/548/CEE.

Il DL.vo 66/2000 stabilisce le norme per la protezione dei lavoratori da agenti cancerogeni. La norma fa riferimento non solo alle sostanze classificate come cancerogene dall'UE, in applicazione della direttiva 67/548/CEE, ma anche alle sostanze che, pur non essendo classificate ufficialmente, rientrano nei criteri di classificazione. Tale disposizione responsabilizza enormemente il datore di lavoro, affidandogli il compito di individuare se all'interno della propria azienda si realizzino le condizioni per l'applicazione del Titolo VII del DL.vo 626/1994. Il database, Banca Dati Cancerogeni, realizzato dall'ISS, rappresenta uno strumento utile a supporto di tale fase decisionale, riportando le varie classificazioni di cancerogenesi effettuate da organismi internazionali e nazionali, quali l'UE, lo IARC, il *Report on Carcinogens*, l'*US Environmental Protection Agency* e la Commissione Consultiva Tossicologica Nazionale.

La Banca Dati Bonifiche, realizzata in collaborazione con il Reparto "Suolo e Rifiuti" del Dipartimento Ambiente e con il Settore I – Informatica del SIDBAE, e di libero accesso sul sito dell'ISS, contiene i valori di riferimento proposti dall'ISS per sostanze di interesse nelle procedure di bonifica di siti contaminati (DL.vo 152/2006).

La Banca Dati Sensibilizzanti, realizzata in collaborazione con il CRIVIB e con il Settore I – Informatica del SIDBAE e di libero accesso sul sito dell'ISS, contiene informazioni su sostanze sensibilizzanti o potenzialmente tali.

Le sostanze chimiche o le miscele di più sostanze (preparati) devono essere classificate ed etichettate in base alla valutazione del pericolo connesso al loro uso secondo quanto stabilito dall'UE e recepito dalla normativa italiana in continuo aggiornamento. Il risultato è l'etichetta che deve essere apposta sui contenitori e le schede informative di sicurezza che devono essere fornite agli operatori specializzati.

Resoconto attività 2008

L'attività del 2008 della Banca Dati sui Preparati Pericolosi si può sintetizzare in tre punti:

- Attività di segretariato con la validazione di 194 nuove società registrate e consulenze, a mezzo e-mail, per un totale di 104 e 53 a mezzo fax 52. Non calcolabili sono le risposte telefoniche che giornalmente pervengono.
- Attività tecnico-informatica: è stata supportata con 242 risposte a mezzo e-mail. Innumerevole e non calcolata l'assistenza telefonica alle ditte.
- La consulenza specifica su problematiche prettamente di tipo chimico è stata supportata con 200 e-mail, oltre alla giornaliera assistenza telefonica.

Il lavoro di aggiornamento della Banca Dati Bonifiche ha portato all'inserimento di oltre 270 nuove entrate.

Il lavoro di aggiornamento della Banca Dati Cancerogeni ha portato all'inserimento di oltre 500 nuove entrate.

Il lavoro di aggiornamento della Banca Dati Sensibilizzanti ha portato all'inserimento di oltre 70 nuove entrate.

Attività programmata 2009

Per l'anno 2009 si prevede un notevole incremento delle attività in seguito alla pubblicazione del DPR 6 febbraio 2009, n. 21 relativo ai detergenti. Questo comporterà, da parte delle ditte, la dichiarazione anche di prodotti detergenti classificati come non pericolosi nonché la revisione di quelli già in commercio, secondo le modalità stabilite dal DPR. La banca dati è già aggiornata per accettare questo nuovo format di dichiarazione.

Proseguirà l'aggiornamento della Banca Dati Cancerogeni, della Banca Dati Sensibilizzanti e della Banca Dati Bonifiche anche in considerazione della pubblicazione del Regolamento 1272/2008 e dell'entrata in vigore, a decorrere dal primo giugno 2009 dell'Allegato XVII del Regolamento 1907/2006.

Attività corrente per la produzione di farmaci cellulari innovativi e promozione della ricerca clinica basata su protocolli di immunoterapia sperimentale

In questi ultimi anni, gli sviluppi delle ricerche nel campo dell'immunologia e delle biotecnologie hanno aperto nuovi orizzonti nel trattamento di pazienti oncologici mediante strategie innovative di vaccinazione antitumorale e di immunoterapia cellulare. L'importanza di promuovere l'immunoterapia clinica sperimentale come disciplina specifica è stata recentemente sottolineata in editoriali su prestigiose riviste internazionali, che ne hanno evidenziato le potenzialità di ricaduta sanitaria, suggerendo strategie e iniziative idonee a superare i limiti che attualmente ne ostacolano il pieno sviluppo. In Italia, nonostante i livelli di eccellenza della ricerca di base nel settore dell'immunologia e immunoterapia dei tumori, si registra un notevole ritardo nel trasferimento dei risultati della ricerca alla sperimentazione clinica. L'attivazione e la prosecuzione di un progetto speciale dell'ISS appaiono particolarmente opportune, non solo per colmare un vuoto di iniziative e coordinamento ispirati a finalità di promozione in questo importante settore della ricerca biomedica, ma anche sulla base dell'esperienza pregressa e delle prospettive della ricerca del gruppo proponente. Infatti, il gruppo possiede una lunga esperienza di ricerca sull'interferone (IFN) e altre citochine, che hanno negli anni portato all'avvio di studi clinici originali basati sul nuovo razionale di uso di IFN-alfa come adiuvante di vaccini. Il gruppo ha contribuito all'identificazione di nuovi adiuvanti di natura proteica o cellulare, individuando tecnologie e strategie terapeutiche oggetto di brevetti dell'ISS. Recentemente, partendo dalla valutazione dell'importanza di creare un centro pubblico di riferimento in grado di produrre cellule in condizioni GMP per lo sviluppo di progetti clinici innovativi derivanti dalla ricerca italiana, il gruppo ha portato avanti il progetto di costruzione e attivazione dell'"officina farmaceutica" FaBioCell, finalizzata alla preparazione di farmaci cellulari per sperimentazione clinica. Un'attività importante di questo progetto speciale consisterà nella preparazione in condizioni GMP di cellule e reagenti per sperimentazioni cliniche innovative soprattutto nel settore dell'immunoterapia dei tumori in

collaborazione con centri clinici. Altra attività del Centro sarà quella di sviluppare e coordinare ricerche tese: i) all'implementazione delle metodologie correnti per il monitoraggio immunologico dei pazienti nel contesto di studi clinici di immunoterapia; ii) allo sviluppo di nuove tecnologie basate sull'uso dei *microarray* finalizzate a monitorare e, possibilmente, predire la risposta clinica. Infine, un'altra importante attività di questo progetto speciale riguarderà l'attuazione di iniziative di promozione e implementazione del trasferimento della ricerca pre-clinica in sperimentazioni cliniche nel settore delle bioterapie nell'ambito di attività sia a livello nazionale (azioni di coordinamento relative ai programmi 2 e 3 del progetto "ISS per ACC" previsti dall'art. 3 del DM 21 luglio 2006) che internazionale (partecipazione alle fasi preparatorie per la costruzione delle infrastrutture europee di ricerca nel settore della biomedicina, con particolare riferimento a EATRIS e a ECRIN).

Resoconto attività 2008

– Attività relative a FaBioCell

Attività propedeutiche all'autorizzazione del laboratorio GMP FaBioCell alla produzione di farmaci cellulari:

- Sviluppo del Sistema di Qualità necessario alla gestione delle attività di produzione e controllo qualità.
- Convalida dell'impianto di trattamento aria e della strumentazione.
- Convalida del personale allo svolgimento di attività definite.
- Sviluppo e convalida dei principali metodi di controllo qualità.
- Sviluppo e convalida di metodi per la produzione di cellule da utilizzare in protocolli di immunoterapia (v. attività programmata 2009).

Sono state completate le attività propedeutiche alla richiesta di ispezione all'autorità regolatoria competente (AIFA) per l'ottenimento dell'autorizzazione alla produzione di farmaci cellulari presso il laboratorio GMP FaBioCell.

In particolare, è stata completata la convalida della struttura e delle apparecchiature, sono state sviluppate le procedure per la produzione su larga scala di cellule dendritiche (DC) differenziate in presenza di IFN alfa. La procedura è stata simulata per tre volte, come richiesto dalle GMP, utilizzando terreno per microrganismi (*Media Fill*) allo scopo di accertare eventuali punti critici del processo di produzione sterile. Sono state poi effettuate tre produzioni di DC a partire da prodotti di aferesi ottenuti da donatori sani. Le popolazioni cellulari ottenute al termine delle produzioni sono risultate conformi ai parametri prestabiliti in termini di purezza (>80%) e caratteristiche fenotipiche (CD83 > 10%, CD86 > 50%, CD80 > 80%, HLA-DR e HLA-ABC > 90%). Le cellule prodotte sono state inoltre controllate per la sterilità, assenza di micoplasmi e contenuto di endotossina. Tutti i test hanno dato risultati conformi alle specifiche prestabilite. I risultati delle convalide sono stati raccolti nel dossier da sottoporre all'autorità regolatoria (AIFA) per la valutazione dell'idoneità della struttura alla produzione di farmaci cellulari. Tale valutazione potrà essere rilasciata a seguito della visita ispettiva dell'AIFA. È stato inoltre sviluppato il protocollo per la separazione di cellule CD34+ da sangue periferico di donatori per l'utilizzo nei trapianti aploidentici e sono stati effettuati i *Media Fill* per la verifica della sterilità della procedura. La convalida del metodo sarà effettuata con modalità concomitante non essendo possibile utilizzare cellule di donatori sani per questo tipo di procedura.

– Attività di ricerca clinica in studi coordinati dall'ISS nel settore dell'immunoterapia

Studio di fase I-II di trattamento combinato con dacarbazina e un vaccino peptidico con IFN-alfa in pazienti con melanoma in stadio II/IV (ISS – IFO Istituto Regina Elena –