

PRESIDENZA DEL CONSIGLIO DEI MINISTRI

COMITATO NAZIONALE PER LA BIOSICUREZZA E LE BIOTECNOLOGIE

GRUPPO DI LAVORO PER LA SICUREZZA E LA QUALITÀ DELLA SPERIMENTAZIONE IN TERAPIA CELLULARE E PER L'IMPIEGO DEI "PRODOTTI DELL'INGEGNERIA DEI TESSUTI" A SCOPO TERAPEUTICO OVVERO A SCOPO DI TRAPIANTO SU PAZIENTI

Presidente

Prof. Leonardo Santi

Coordinatore

Prof. Ranieri Cancedda

Componenti

Dr. Pietro Chistolini
Prof. Giulio Cossu
Dr. Michele De Luca
Prof. Luigi Donati
Dr. Fulvio Mavilio
Dr. Giovanni Migliaccio
Dr. Carlo Pini
Prof.ssa Aurelia Sargentini

LINEE GUIDA PER L'INGEGNERIA DEI TESSUTI E LA TERAPIA CELLULARE.

Linee guida per la sicurezza e la qualità della sperimentazione in terapia cellulare e per l'impiego dei "prodotti dell'ingegneria dei tessuti" a scopo terapeutico, ovvero a scopo di trapianto su pazienti

Premessa

L'enorme progresso delle conoscenze nel campo della biologia cellulare e delle biotecnologie ha consentito, negli ultimi 10 anni, lo sviluppo di tecnologie mirate alla coltivazione ed alla ricostruzione "in vitro" di tessuti ed ha messo a disposizione della comunità medica nuove possibilità terapeutiche attraverso l'impiego di prodotti che utilizzano cellule ottenute "ex vivo" dallo stesso paziente o da donatore e, in un minor numero di casi, di origine animale.

Queste tecnologie contribuiscono a definire una nuova branca delle scienze biomediche: la ingegneria dei tessuti. E' opportuno ricordare che i prodotti derivati dall'ingegneria dei tessuti non possono essere definiti come farmaci, ne' sono assimilabili a trapianti in senso stretto (ad es. cuore, rene, cornea, osso, ecc), ne' possono essere definiti come tessuti artificiali (ad es. protesi valvolari), in quanto sono costituiti da cellule viventi isolate da tessuti, espanse "in vitro", eventualmente associate a biomateriali con origine e caratteristiche diverse.

Esempi di questi prodotti sono: i lembi di epidermide e di altri epitelii espansi "in vitro", le colture di condrociti articolari, i sostituti ossei contenenti osteoblasti o osteoprogenitori, le cellule derivate dal pancreas ed inserite in capsule trapiantabili che permettono l'uscita dell'insulina ma non l'ingresso degli anticorpi.

Quadro di riferimento legislativo

Attualmente, in Italia non esiste una normativa che regoli l'autotrapianto. Il prelievo, il trapianto, le banche l'importazione e l'esportazione di tessuti da cadavere sono invece regolati dalla legge n. 91 del 1° aprile 1999 (GU n. 87 del 15 aprile 1999) "Disposizioni in materia di prelievi e di trapianti di organi e di tessuti", mentre la Direttiva 93/42 CEE sui "Medical Devices" recepita dalla Legge n. 46 del 24.2.1997 esclude esplicitamente la possibilità di utilizzare materiali ricavati da tessuti umani per la realizzazione di dispositivi medici. In ogni caso dovrà essere chiarito che le cellule umane espanse "in vitro", anche in associazione con biomateriali diversi, non devono essere considerate *tout court* "parti di cadavere"

Sarebbe opportuno, sia a livello nazionale, sia a livello europeo, definire una normativa specifica che regoli la produzione e l'impiego terapeutico di cellule coltivate o tessuti ricostruiti in vitro. Una iniziativa in questa direzione e' stata presa dalla FDA (Food and Drug Agency) americana che ha divulgato un documento sull'argomento ("Proposed approach to regulation of cellular and tissue-based products", FDA, 28/2/1997). In Europa la Francia ha recentemente divulgato una normativa specifica (98-535, 1/7/98) e la Spagna ha regolamentato il settore.

La Circolare 10 luglio 1997, n.8 "Sperimentazione clinica dei medicinali" del Ministero della Sanità (GU del 21 luglio 1997) rinvia alle specifiche linee guida dell'Istituto Superiore di Sanità per l'avvio degli studi clinici di fase I/II con cellule umane viventi per la terapia cellulare somatica di cui al Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità vol. 10, n. 5, 1997.

In ambito europeo, nella “Comunicazione della Commissione sulle procedure comunitarie di autorizzazione e all’immissione in commercio dei medicinali” (GU delle Comunità europee del 22 luglio 1998), i prodotti per la terapia cellulare vengono considerati medicinali per i quali è obbligatoria un’autorizzazione all’immissione in commercio se sono fabbricati industrialmente.

Anche se non ne viene fatto esplicito riferimento nel testo che segue, sembra opportuno ricordare, anche agli operatori di questo settore, l’obbligo di rispettare la legislazione specifica sul rischio negli ambienti di lavoro (Dlgs 626/94) e la normativa in essere sullo smaltimento dei rifiuti biologici.

Definizioni

Con il termine “Prodotti della ingegneria dei tessuti” si intendono:

- Cellule e/o tessuti di origine umana o animale, espansi “in vitro” o che comunque abbiano subito una “estensiva manipolazione” a scopo terapeutico ovvero a scopo di trapianto su pazienti.
- Per “Terapia cellulare” si intende, in particolare, la somministrazione nell’uomo per scopi terapeutici, diagnostici e profilattici di cellule umane viventi autologhe od eterologhe che hanno subito qualsiasi tipo di manipolazione *ex vivo*, incluso la loro propagazione *in vitro*.

Viene definito come autologo l’utilizzo di cellule e/o tessuti dello stesso paziente, come allogenico quello di cellule e/o tessuti derivati da donatore e come xenogenico quello di cellule e/o tessuti di origine animale.

Nei “Prodotti dell’ingegneria dei tessuti” le cellule possono essere gli unici costituenti o possono essere associate con biomateriali di origine e caratteristiche diverse.

Non sono compresi nella definizione “Prodotti della ingegneria dei tessuti”:

- Cellule e/o tessuti prelevati da vivente o cadavere per un loro diretto trapianto (per questa situazione esiste già una normativa di riferimento).
- Cellule e/o tessuti che hanno subito una “manipolazione minima”
- Prodotti che siano secreti o estratti dalle cellule e dai tessuti. Esempi di questi prodotti sono il latte umano, i collagene, alcuni enzimi e fattori di crescita (anche per prodotti di questo tipo esistono già, o in alcuni casi sono in preparazione, normative di riferimento specifiche).
- Cellule del sangue e del midollo osseo che siano utilizzate direttamente o dopo “una manipolazione minima” (per questa situazione esiste già una normativa di riferimento).
- Cellule e/o tessuti da utilizzare a scopo di riproduzione (in considerazione delle problematiche aggiuntive si dovrà fare riferimento ad una normativa specifica).

Per “manipolazione estensiva” di cellule e tessuti si intendono tutte quelle manipolazioni che possono portare ad una attivazione delle cellule e/o ad una stimolazione della proliferazione cellulare. Vengono considerate “estensivamente manipolate” anche le cellule che, pur non essendo state specificamente attivate o stimolate a proliferare, risultano associate con biomateriali, sia che si tratti di biomateriali sintetici, sia che si tratti di biomateriali di origine estrattiva. Vengono considerate “estensivamente manipolate” tutte le cellule che hanno subito una manipolazione del loro patrimonio genetico.

Per “manipolazione minima” si intendono tutte quelle manipolazioni che non portano ad una attivazione delle cellule e/o ad una stimolazione della proliferazione cellulare. In particolare sono considerate “manipolazione minima”: il taglio, la modificazione della forma, la criopreservazione, la sterilizzazione mediante radiazioni gamma, la centrifugazione ed il trattamento con antibiotici di un

tessuto. Analogamente sono considerate “manipolazioni minime” la estrazione o la separazione di cellule da un tessuto, quando questo non alteri le caratteristiche principali delle cellule e del tessuto rimanente dal quale le cellule sono state estratte o separate.

Scopi delle linee guida

Queste linee guida hanno lo scopo di indicare norme di comportamento, valide per tutti gli operatori, con l’obiettivo di:

- Impedire l’utilizzo di cellule ottenute a partire da tessuti di pazienti infetti o comunque da soggetti potenzialmente in grado di trasmettere agenti infettivi, quali ad esempio virus dell’AIDS ed dell’epatite.
- Impedire una impropria manipolazione dei tessuti e delle cellule coltivate che potrebbe causare una contaminazione degli stessi con agenti infettivi.
- Garantire che, per i prodotti dell’ingegneria dei tessuti, prima del trapianto su pazienti, sia stata data una preventiva dimostrazione della loro sicurezza. In tutti i casi in cui una sperimentazione preclinica sia possibile, questa dimostrazione dovrà essere data

Nel caso di sperimentazione, svolta da qualificate strutture di ricerca e cliniche, che comporti il trapianto di prodotti dell’ingegneria dei tessuti su pazienti, le linee guida prevedono

- obbligo di accreditamento delle strutture in cui la sperimentazione viene svolta
- obbligo di notifica, con silenzio assenso, dei protocolli sperimentali e delle procedure prima dell’inizio della sperimentazione
- obbligo di notifica immediata di eventuali problemi ed inconvenienti che dovessero insorgere nel corso della sperimentazione clinica

Nel caso di commercializzazione di questi prodotti, sia da parte dell’industria privata, sia da parte di strutture pubbliche, ovvero nel caso di produzione e impiego dei prodotti nell’ambito di una attività che possa essere considerata di servizio assistenziale anche se non a fine di lucro, le linee guida prevedono procedure al fine di:

- Consentire l’utilizzo per il trattamento di pazienti solo di quei prodotti dell’ingegneria dei tessuti per i quali esista una dimostrazione certa della loro efficacia.

Per quanto concerne cellule geneticamente modificate per un utilizzo in terapia genica, si dovrà fare riferimento non solo alle presenti linee guida, che si riferiscono alle norme da seguire per garantire la sicurezza e la qualità di cellule “estensivamente manipolate”, ma, per quanto riguarda i rischi derivati dall’uso dei virus e/o dei vettori utilizzati per modificare geneticamente le cellule, si dovranno seguire anche le indicazioni del d.lg. 91/93 (che recepisce la Direttiva 90/219/CEE) sull’uso confinato di microrganismi geneticamente modificati, nonché fare riferimento alle “Linee guida per la sicurezza della sperimentazione in terapia genica” elaborate dal Comitato Scientifico per i rischi derivanti dall’impiego di agenti biologici della Presidenza del Consiglio.

Per quanto riguarda infine la terapia cellulare, le presenti linee guida intendono integrare, estendere ed approfondire la circolare del Ministero della Sanità citata in precedenza, soprattutto per quanto attiene agli aspetti di sicurezza e di qualità della sperimentazione.

Istituzione di una “Commissione per i rischi derivanti dall’impiego dei prodotti dell’ingegneria dei tessuti”

Nei casi in cui non vi sia la certezza che un particolare trattamento delle cellule e/o dei tessuti possa essere considerato “manipolazione minima”, dovrà necessariamente essere richiesta l’opinione di una “Commissione per i rischi derivanti dall’impiego dei prodotti dell’ingegneria dei tessuti” costituita a tale scopo. Chiunque assuma che un particolare trattamento sia da considerarsi “manipolazione minima”, e su questa base inizi l’attività senza chiedere preventivamente un chiarimento alla commissione, lo fa assumendosi tutti i rischi che potrebbero derivare da una successiva classificazione di questo trattamento come “manipolazione estensiva”.

I pareri espressi dalla Commissione dovrebbero essere resi pubblici e costituire precedente.

Accreditamento delle strutture e notifica di attività

Come “strutture” si intendono gruppi di persone organizzate in modo tale che possano essere identificati alcuni ruoli chiave ed operanti all’interno di locali destinati all’attività per le quali le strutture sono state create. Queste strutture possono essere dedicate sia all’intero processo (prelievo, manipolazione ed utilizzo), sia ad una singola fase del processo. E’ necessario che le strutture siano accreditate e pertanto che appropriate regole vengano stabilite per

- l’identificazione dei responsabili della struttura,
- le caratteristiche dei locali e delle attrezzature
- l’identificazione dell’Ente Ispettore e di quello Accreditante (Ministero della Sanità)

A queste regole sono sottoposte tutte le strutture che effettuino prelievi, manipolazione ed utilizzo a scopo terapeutico di cellule o tessuti anche se senza scopo di lucro. Ne sono escluse le strutture che effettuano solo attività di ricerca in vitro o su modelli animali. Ne sono escluse le strutture che operino con tessuto riproduttivo o germinale. Per queste ultime strutture si dovrà fare riferimento ad una normativa apposita.

In tutti i casi, le strutture dovranno segnalare obbligatoriamente al Ministero della Sanità eventuali problemi ed inconvenienti che dovessero insorgere nel corso delle attività. Nel caso delle strutture destinate al prelievo e/o all’utilizzo delle cellule e dei tessuti la segnalazione dovrà essere fatta anche alle strutture dedicate alla manipolazione.

Nel caso di nuove tecnologie, applicazioni o processi produttivi, o comunque nei casi in cui non esista sufficiente documentazione o esperienza consolidata di utilizzo clinico, sarà necessario sottoporre alla stessa autorità anche la documentazione relativa alla sperimentazione pre-clinica che ne indichi il grado di sicurezza.

I requisiti richiesti alle strutture potranno variare a seconda del tessuto manipolato e dello scopo d’uso, autologo od eterologo. Infatti questa suddivisione ha notevole rilevanza per la sicurezza delle operazioni e quindi per i controlli richiesti.

IDENTIFICAZIONE DEI RESPONSABILI DELLA STRUTTURA

Per tutte le strutture occorre identificare un responsabile legale ed un responsabile scientifico/clinico.

Nel caso di strutture dove si effettuano manipolazioni di cellule, oltre all’identificazione di un responsabile scientifico, occorre prevedere la presenza di un responsabile del controllo di qualità. Queste ultime figure professionali sono necessariamente separate fra di loro. In particolare il responsabile scientifico deve essere laureato nel settore biomedico, e avere una provata esperienza scientifica nel campo specifico.

Solo nel caso di laboratori di ricerca che effettuino un numero limitato di interventi terapeutici nel corso di un anno solare, le figure professionali del responsabile scientifico e del responsabile del controllo di qualità possono essere cumulate nel responsabile della ricerca e della struttura.

CARATTERISTICHE DEI LOCALI E DELLE ATTREZZATURE PER LA MANIPOLAZIONE DELLE CELLULE E DEI TESSUTI

In considerazione delle caratteristiche tecnologiche dei processi di manipolazione delle cellule e dei tessuti, le strutture fisiche, includendo edifici ed apparecchiature, dovranno essere chiaramente identificate ed essere in grado di garantire la sicurezza e la qualità finale del prodotto. Le strutture fisiche devono essere adeguate allo scopo di garantire la sicurezza del paziente, del donatore e degli operatori. Di seguito vengono indicati i requisiti di carattere generale delle strutture fisiche. Altri requisiti potranno dipendere dal tipo di tessuto e di operazione che si intende effettuare.

REQUISITI DELLE STRUTTURE

In assenza di una normativa specifica, quadro di riferimento generale devono essere considerate le norme GLP e, per aspetti specifici GMP e ISO9002. Sarà compito della “Commissione per i rischi derivanti dall’impiego dei prodotti dell’ingegneria dei tessuti” identificare tali aspetti specifici eventualmente integrandoli ed aggiornandoli.

In tutti i casi dovranno essere seguite le indicazioni seguenti:

- Tutti i tessuti e le coltivazioni cellulari che ne risultano devono essere lavorate in modo asettico utilizzando materiali e strumenti sterili.
- I locali dove si processano i prelievi e si coltivano le cellule per trapianto devono essere di tipo BL3 (circolazione di aria autonoma, flusso, temperatura ed umidità controllati, filtri assoluti, etc.)
- Tutti i locali BL3 devono essere indipendenti e sterilizzabili all’occorrenza.
- Le cellule destinate all’utilizzo clinico dovranno essere coltivate in locali adibiti esclusivamente a tale uso. Nel caso di laboratori di ricerca che effettuino un numero limitato di interventi terapeutici concentrati in un periodo di tempo limitato, il diverso utilizzo dei locali destinati alla coltura di cellule per uso clinico può essere consentito a condizione che siano identificate e validate procedure di sanitizzazione delle strutture prima di un nuovo impiego per colture di cellule ad uso terapeutico.
- Nei locali destinati alle colture di cellule per utilizzo clinico dovranno essere garantite condizioni tali da impedire contaminazioni crociate fra cellule di origine diversa (separazione fisica e/o temporale delle diverse colture).
- Gli apparecchi di particolare rilevanza per il mantenimento della qualità delle colture devono essere dotati di allarme (es.: congelatori, incubatori, cappe a flusso laminare, impianto per la CO₂, impianto per l’azoto liquido).
- Un sistema di assicurazione di qualità verifica tra l’altro le certificazioni sui materiali in entrata e le caratteristiche dei materiali in uscita, garantisce l’assenza di contaminazioni, virali e batteriche, e soprattutto di cross-contaminazioni crociate tra diversi donatori.
- Viene garantita la completa rintracciabilità di ogni lotto di materiale prodotto (ogni paziente è identificato da un numero di lotto). Le procedure di etichettatura di tutto il materiale (biopsie, fiasche di coltura, contenitori per le cellule pronte per la spedizione, etc.) sono critiche e devono essere condotte con ogni cura.
- La struttura deve prevedere l’addestramento del personale coinvolto.

In tutti i casi, le strutture dovranno richiedere l’accreditamento.

CARATTERISTICHE DEI LOCALI E DELLE ATTREZZATURE PER IL PRELIEVO E/O L'UTILIZZO DELLE CELLULE E DEI TESSUTI

Le strutture dovranno essere in grado di garantire le normali condizioni di sterilità e sicurezza previste dall'attuale normativa nel caso di prelievi e di interventi chirurgici.

Le strutture dovranno richiedere l'accreditamento per ciascuno degli utilizzi specifici dei "Prodotti dell'ingegneria dei tessuti" previsti.

IDENTIFICAZIONE DELL'ENTE ISPETTORE E DI QUELLO ACCREDITANTE

In considerazione delle operazioni che si intendono svolgere in queste strutture e data la necessità di un criterio omogeneo su tutto il territorio nazionale e nei rapporti con enti o individui di altre nazioni l'Ente Accreditante dovrebbe essere il Ministero della Sanità che può delegare per l'attività ispettiva una entità di natura diversa.

NOTIFICHE PER LE STRUTTURE CHE EFFETTUANO PRELIEVI

Le strutture che effettuano il solo prelievo, laddove si tratti di materiale ad uso autologo, devono inviare la sola notifica al Ministero della Sanità senza bisogno di certificazione.

In presenza di raccolta o di uso di materiale destinato a uso allogenico, una notifica dell'attività svolta deve essere unita ad una identificazione dei responsabili come già indicato precedentemente. Inoltre una descrizione dettagliata delle procedure deve essere fornita al Ministero della Sanità che risponde in regime di silenzio/assenso.

NOTIFICHE PER LE STRUTTURE CHE EFFETTUANO MANIPOLAZIONI IN VITRO

Nel caso di manipolazioni estensive o di manipolazioni minime per finalità d'uso allogenico e xenogenico una notifica che includa tutti i protocolli che si intendono utilizzare, la descrizione dettagliata delle strutture fisiche e delle procedure di sicurezza, unitamente ad un elenco del personale con le informazioni riguardanti la preparazione per i compiti specifici, deve essere fornita al Ministero della Sanità. Sarà compito del Ministero della Sanità disporre, se necessario ed entro un limite di tempo prefissato, una verifica degli impianti e del personale ed una valutazione dei protocolli presentati.

E' auspicabile che venga stabilito per ogni tessuto e/o procedura delle caratteristiche di riferimento che rappresentino lo stato dell'arte e che permettano una valutazione rapida della fattibilità e commerciabilità del prodotto di ingegneria dei tessuti proposto.

Il Ministro della Sanità dovrebbe provvedere a rendere pubblico annualmente un elenco delle strutture accreditate per la produzione ed utilizzo di "Prodotti dell'ingegneria dei tessuti".

Qualsiasi modifica che non sia di pura sostituzione fra apparati, o reagenti analoghi, ma significhi una modificazione sostanziale delle procedure utilizzate deve essere notificata al Ministero della Sanità prima della messa in atto. I cambiamenti si ritengono approvati se entro un periodo di tempo limitato e prefissato non viene fatta alcuna comunicazione a riguardo da parte del Ministero della Sanità. Se del caso, dovrà essere ripetuta la dimostrazione dell'efficacia del prodotto dell'ingegneria dei tessuti ottenuto.

Controllo di qualità'

CRITERI GENERALI

Nel caso di cellule e tessuti manipolati in vitro, l'obiettivo da raggiungere nel controllo dei processi di produzione e della qualità del prodotto finale è quello di garantire la sicurezza e l'efficacia dei prodotti da immettere nell'uso clinico permettendo allo stesso tempo che lo sviluppo e l'innovazione tecnologica nel settore possa procedere senza l'aggravio di regolamentazioni eccessivamente complesse o non necessarie.

Il livello di controllo che è ragionevole prospettare è variabile e dipende dal rischio che le cellule/tessuti

- vengano contaminate da agenti biologici potenzialmente dannosi per il ricevente
- perdano, durante il processo di manipolazione, tutte o parte delle caratteristiche funzionali o strutturali richieste per l'utilizzo specifico
- acquistino, durante il processo di manipolazione, caratteristiche indesiderate (es.: trasformazione neoplastica).

Il livello di rischio finale è dipendente dai seguenti fattori, che identificano diversi livelli di rischio specifico per i quali è necessario applicare diversi standard di controllo di qualità di processo e di prodotto:

- manipolazione: va operata una distinzione in base al grado di manipolazione e trattamento a cui vengono sottoposte le cellule/tessuti tra il prelievo e l'utilizzo finale nel paziente, distinguendo tra materiale non trattato o minimamente manipolato dal materiale manipolato estensivamente;
- conservazione: va distinto il caso in cui le cellule/tessuti vengono impiegate direttamente o a breve distanza dal prelievo da quello in cui vengono conservate, spedite o trattate in banche o strutture in cui vengono conservate o trattate cellule da donatori differenti;
- tipo di utilizzo: va distinto l'utilizzo di cellule/tessuti per uso autologo dall'utilizzo per uso allogenico e xenogenico;
- categoria di utilizzo: va distinto l'utilizzo di cellule/tessuti per una funzione identica a quella normalmente svolta nell'organismo da quello per una funzione diversa, e se la funzione in oggetto è di tipo ricostruttivo o di riparo (es.: impianto di cartilagine/osso) o metabolico (es.: impianto di cellule con funzioni secretorie).

In generale, cellule/tessuti non manipolati o manipolati in modo minimo, non conservati in banche, e destinati ad uso omologo ed autologo (es.: trapianto di cellule staminali ematopoietiche mobilizzate e purificate per ricostituire tessuto ematopoietico), andrebbero assimilati per gli aspetti di controllo di processo e di qualità ai trapianti d'organo o alle trasfusioni di sangue. Per tutti gli altri casi, in cui le manipolazioni effettuate possono, o hanno lo scopo di, modificare le caratteristiche biologiche o la funzione di cellule/tessuti, sarà necessario il rilascio di una autorizzazione preventiva all'utilizzo clinico da parte di una autorità preposta, sulla base di una descrizione dettagliata del processo, dei materiali, dei test e dei criteri di validazione impiegati.

CONTROLLO DI QUALITÀ DEL PROCESSO PRODUTTIVO

Origine delle cellule/tessuti.

L'origine anatomica, l'identità tissutale o cellulare e altre informazioni rilevanti per l'identificazione dovrebbero essere descritte. Queste includono le caratteristiche del donatore quali età, sesso, etnia, informazioni diagnostiche rilevanti e storia clinica e, nel caso di impianti permanenti di "Prodotti dell'ingegneria dei tessuti" allogenici, tipizzazione serologica e degli antigeni di istocompatibilità (HLA di classe I e II nonché, in alcuni casi, gli antigeni minori),.

Le cellule/tessuti ottenuti all'inizio del processo dovranno essere preliminarmente classificati come destinati ad impiego autologo o allogenico. L'impiego allogenico comporta il rischio di trasmissione di malattie infettive, in quanto il donatore potrebbe essere portatore di agenti patogeni ai quali il ricevente potrebbe essere suscettibile. Il donatore andrebbe quindi testato per la presenza di virus dell'AIDS (anti-HIV-1, anti-HIV-2, HIV-1-Ag) virus T-linfotropici (anti-HTLV-I/II), epatite (HBsAg, anti-HCV) sifilide e citomegalovirus. L'esame medico dovrebbe includere l'identificazione di fattori di rischio specifici per AIDS, epatite, malattia di Creutzfeld-Jacob e tubercolosi. Cellule/tessuti da donatori positivi o a rischio per uno o più degli agenti patogeni elencati non andrebbero prelevati, o se prelevati andrebbero distrutti. Questa regola non si applica in caso di utilizzo autologo e può avere eccezioni, in caso di utilizzo allogenico, per la gravità della sindrome oggetto del trattamento o per la rarità del genotipo del donatore. In questi casi è possibile autorizzare sia la conservazione che l'utilizzo di materiale positivo ad uno o più test di patogenicità. Il materiale deve comunque essere opportunamente identificato ed etichettato (es.: BIOHAZARD o PER ESCLUSIVO USO AUTOLOGO), e conservato in contenitori separati da quelli contenenti materiale esente da patogeni. Le ragioni che giustificano un utilizzo di cellule/tessuti potenzialmente associato a rischio di infezione andrebbero documentate e corredate di consenso informato del ricevente o di persona legalmente autorizzata a fornirlo.

Le procedure e le metodologie utilizzate per la selezione dei donatori e per la raccolta e la conservazione delle cellule/tessuti devono essere descritte nel dettaglio.

COLTURA, ESPANSIONE E/O INGEGNERIZZAZIONE DELLE CELLULE IN VITRO.

I materiali e i reagenti utilizzati nel processo di produzione (materiale plastico, terreni di coltura, fattori di crescita, citochine, anticorpi, etc.) dovranno essere dotati di certificazione per uso clinico. Per tutti i materiali non disponibili con questo tipo di standard, dovrebbe essere prodotta documentazione che ne attesti l'idoneità all'utilizzo. Nel caso dei materiali, dovrebbero essere garantite sterilità, apirogenicità e assenza di contaminanti chimici, biologici e da agenti avventizi. Nel caso dei reagenti, e per ogni lotto usato, andrebbe fornita identificazione del produttore e del lotto, data di produzione, di acquisto e di scadenza, composizione chimica, grado di purezza, attività biologica, livello e natura dei contaminanti noti, assenza di contaminazione da agenti avventizi (virus, batteri, lieviti, funghi, micoplasmi) e grado di pirogenicità. Dovrebbe inoltre essere tenuto un registro che permetta di risalire, per ogni campione processato, a tutti i materiali e i reagenti utilizzati durante il processo di produzione.

Mezzi di coltura o sostanze che possano indurre sensibilizzazione o reazioni immunitarie, quali sieri animali, proteine del siero, penicilline o altri antibiotici beta-lattamici ed antimicotici, dovrebbero essere evitati o limitati alle prime fasi di manipolazione/coltura, e dovrebbero essere comunque assenti nel prodotto finale. In caso di utilizzo di siero non umano, andrebbero comunque documentate le ragioni che lo rendono necessario e non sostituibile da siero umano o terreno di coltura sintetico a composizione nota.

CONTROLLO DI QUALITÀ DEL PRODOTTO

Durante l'espansione in vitro, le cellule sono esposte ad una varietà di rischi biologici che dovranno essere analizzati accuratamente a varie fasi dell'espansione e obbligatoriamente prima dell'eventuale reintroduzione delle cellule nel paziente. Questi rischi includono:

- contaminazione da agenti avventizi (provenienti dall'ambiente e/o dai mezzi di coltura) quali virus, batteri, micoplasmi, miceti e lieviti. Nei limiti del ragionevole, la presenza di ogni possibile

agente patogeno deve essere verificata periodicamente con ogni mezzo diagnostico commercialmente disponibile.

- senescenza. Cellule primarie umane sono capaci di un limitato numero di divisioni cellulari in coltura, al termine delle quali, entrano in una fase di senescenza. In questo caso le cellule non soltanto non sono capaci di ulteriori divisioni, anche se stimolate opportunamente, ma spesso non sono nemmeno più capaci di svolgere le funzioni differenziate proprie del tessuto di appartenenza. Il raggiungimento della senescenza in vitro nella maggior parte della popolazione cellulare renderebbe l'utilizzo di dette cellule per lo meno inutile. Conseguentemente sarà necessario misurare il numero medio di divisioni cellulari di una data popolazione cellulare a partire dall'espianto, includendo i passaggi precedenti e successivi ad una eventuale criopreservazione. Sarà inoltre necessario utilizzare le cellule entro un limite di passaggi in vitro che garantisca il mantenimento di una sufficiente residua capacità proliferativa in vivo. Nel caso di popolazioni che contengano cellule staminali, la capacità di automantenimento e di produrre progenitori maturi dovrà essere verificata durante l'espansione in coltura.
- Alterazioni del corredo cromosomico. La coltivazione prolungata di cellule di mammifero normali aumenta la probabilità di insorgenza di anomalie quantitative e qualitative del corredo cromosomico. Tale evenienza dovrebbe essere verificata mediante analisi del cariotipo, da effettuarsi con criteri in uso per la diagnosi prenatale di anomalie cromosomiche.
- Perdita del fenotipo differenziato. Durante la coltivazione in vitro, alcuni tipi cellulari possono perdere, in parte o totalmente, la capacità di esprimere i prodotti genici tipici del tessuto di appartenenza. Questo potrebbe compromettere sia la possibilità delle cellule di reintegrarsi nel tessuto d'origine, sia la capacità di svolgere in vivo la nuova funzione eventualmente acquisita durante la manipolazione in vitro. Ciò dovrà essere verificato attraverso analisi immunocitochimica mediante anticorpi specifici per prodotti genici del tessuto in questione (esempio cheratine per epitelio). Esiste inoltre la possibilità che una popolazione cellulare contaminante, presente in piccola proporzione al momento dell'espianto in coltura, possa proliferare più rapidamente e quindi sostituire progressivamente la popolazione cellulare che si intende manipolare. Anche in questo caso, la diversa proporzione di popolazioni eterogenee, dovrà essere analizzata quantitativamente mediante analisi immunocitochimica per marcatori specifici delle diverse popolazioni cellulari.
- Insorgenza di fenotipo neoplastico. Benchè trasformazione neoplastica spontanea sia un fenomeno raro nei mammiferi e rarissimo nelle cellule umane, l'esposizione di cellule ad agenti potenzialmente patogeni, quali farmaci o sostanze chimiche, ormoni e fattori di crescita o vettori virali e non, potrebbe aumentare questo rischio. Ciò dovrà essere verificato prima dell'utilizzo delle cellule in vivo e/o della criopreservazione mediante saggio di crescita in adeguato terreno di coltura e, in caso di risultati positivi o dubbi, mediante saggio di crescita in animali immunodeficienti.

I punti precedenti dovranno essere attentamente considerati in fase di validazione del processo. Successivamente l'assenza di agenti avventizi ed il numero di divisioni cellulari effettuate dovranno essere determinati per ogni coltura. La presenza delle cellule staminali, le eventuali alterazioni del corredo cromosomico, il mantenimento del fenotipo desiderato e l'assenza di un fenotipo neoplastico dovranno essere controllati, quando applicabile, periodicamente e/o a campione.

CRIO CONSERVAZIONE

A seconda della necessità operativa, una coltura cellulare può essere crioconservata a diversi passaggi, sia in forma di prodotto finito dell'ingegneria dei tessuti, ad esempio lembi di epitelio

espanso “in vitro” e associato a biomateriali diversi, sia in forma di sospensione di singole cellule. Quando una coltura cellulare viene crioconservata, preferibilmente il congelamento dovrebbe essere effettuato con cellule ai primi passaggi della coltura.

Il protocollo di crioconservazione indicherà:

- composizione della soluzione crioconservante
(sono utilizzabili agenti crioprotettivi diversi. E' in tutti i casi essenziale che il crioprotettore sia facilmente allontanabile una volta terminato il compito crioprotettivo, abbia bassa tossicità alle concentrazioni utilizzate e sia completamente privo di ogni effetto mutageno)
- le modalità di raggiungimento della temperatura di conservazione
(solitamente il decremento graduale e costante della temperatura fino a -80°C , prima del trasferimento in azoto liquido, consente un più efficace ripristino della capacità vitale cellulare dopo scongelamento)
- la temperatura di mantenimento
(il mantenimento della temperatura di crioconservazione deve essere garantito da congelatori a -80°C e/o da bidoni di azoto liquido -196°C provvisti di allarme. Gruppi di continuità o sistemi con CO_2 garantiranno la costante temperatura dei congelatori -80°C qualora, in assenza del personale, si determinasse un'assenza di energia elettrica)
- i tempi di conservazione
(i tempi massimi di conservazione dovranno essere determinati per ciascun prodotto dell'ingegneria dei tessuti)
- le modalità e i tempi di scongelamento.
(generalmente l'azione citotossica dei crioconservanti a temperatura ambiente impone l'adozione di tempi rapidissimi per la fase di scongelamento)

Nel protocollo saranno anche reperibili tutte le informazioni su:

- la vitalità a breve termine e a lungo termine delle cellule o dei tessuti ricostruiti in vitro dopo lo scongelamento
- i controlli da eseguire per verificare il mantenimento della vitalità: “colony forming efficiency” (breve termine) e “life span” (lungo termine)

Sterilità

Ogni fase del processo di crioconservazione deve svolgersi in modo sterile.

Confezione ed etichettatura

Le cellule ed i tessuti ricostruiti in vitro vengono congelati, conservati in ampolle e contenitori ermeticamente chiusi di materiale sterile, non permeabile a gas e vapori e non tossico per le cellule contenute, né prima né dopo la sterilizzazione, né a seguito di eventuale termosaldatura.

L'etichettatura sulla confezione deve contenere tutti i dati necessari alla identificazione e corretto utilizzo del campione. Ad esempio:

- numero della preparazione
- nome del paziente o sigla (per autotrapianti)
- data di congelamento
- scadenza del preparato
- temperatura di conservazione
- sigla del produttore

Soprattutto nel caso di una attività su larga scala e' auspicabile l'utilizzo di codifiche mediante codice a barre.

“Banche per la conservazione dei prodotti dell'ingegneria dei tessuti”

Le ampole di cellule e/o i contenitori dei tessuti ricostruiti devono essere conservati in contenitori di azoto liquido o in congelatori dedicati. La posizione, l'identità e un inventario delle singole ampole di cellule e/o dei contenitori dei tessuti ricostruiti devono essere disponibili.

Deve essere attivata una procedura mirata con la quale si controlla che la temperatura di conservazione nell'azoto liquido (temperature tra -180°C e -130°C) e nel congelatore (temperature tra -70°C e -85°C) rimanga costante.

Origine dei materiali

ORIGINE DEI MATERIALI DA UTILIZZARE PER COLTURE CELLULARI

I terreni che vengono a contatto con cellule o tessuti devono essere idonei alle colture cellulari, certificati per la loro composizione, qualità, contenuto in sali, aminoacidi e altri componenti rilevanti e provvisti di una scadenza definita. Analogamente, i materiali plastici utilizzati per colture di tessuti, così come i biomateriali con i quali le cellule siano eventualmente associate, devono essere certificati.

Particolare attenzione deve essere posta al siero (fetale bovino o, in genere, di origine non umana), se utilizzato, a causa delle patologie encefaliche trasmissibili (TSE). Idonea certificazione e conformità con le normative vigenti devono essere ottenute dall'utilizzatore e associate alla documentazione del lotto di materiale prodotto con quel particolare lotto di siero.

ORIGINE DI TUTTI GLI ALTRI REAGENTI

Tutti gli altri reagenti comuni devono essere certificati dal produttore per i parametri previsti o devono essere certificati dal laboratorio di controllo di qualità dell'utilizzatore secondo una procedura definita e codificata.

Selezione del donatore per utilizzo

CATEGORIE DEI DONATORI

- A) donatori viventi
- B) donatori deceduti

Le due categorie verranno indicate nel testo di seguito come A), B).

Informazioni sul donatore e l'impianto allogenico

Il dossier del donatore, che viene conservato presso la struttura che effettua la biopsia e/o il prelievo, contiene le seguenti informazioni:

- numero di sequenza
- identità, sesso, età del donatore
- identità delle strutture alle quali sono inviate le biopsie e/o i prelievi

- il donatore è donatore multi-organo? (solo B)
- causa del decesso e/o altre sofferenze
- data e ora del decesso (solo B)
- data e ora del prelievo
- origine e dimensione o volume della biopsia e/o del prelievo
- eventuali dati sulla conservazione della biopsia e/o del prelievo

ETA' E ANAMNESI MEDICA

Di norma l'età dei donatori deve essere inferiore a 30 anni (è d'obbligo l'approvazione dei genitori con donatori minorenni)

Dall'anamnesi si devono escludere donatori con:

- setticemia oppure infezione estesa con potenziale setticemia
- malattie contagiose: sifilide, epatite B, epatite C, AIDS (inclusi i gruppi a rischio per AIDS), HIV I e HIV II, sindrome di Jacob-Creutzfeldt.
- affezioni neurologiche di origine virale oppure sconosciuta;
- trattamento con l'ormone della crescita derivante da ipofisi umana
- trattamento con dura madre
- trattamento con osso demineralizzato
- trattamento con pericardio bovino
- tumori maligni
- malattie genetiche o acquisite che compromettano l'integrità del tessuto di interesse

Sono esclusi i donatori con causa di decesso sconosciuta

I donatori del gruppo A) che rispondono ai suddetti requisiti dovranno ripetere gli esami sierologici per le patologie per le quali la comparsa di una sieropositività non si abbia immediatamente dopo l'infezione a distanza di almeno 6 mesi dal prelievo per donazione. In assenza del secondo prelievo potrà essere considerata la possibilità di utilizzare la PCR.

I prelievi provenienti da donatori dei gruppi B) devono essere analizzati per PCR, per le patologie per le quali la comparsa di una sieropositività non si abbia immediatamente dopo l'infezione.

CONSENSO INFORMATO

La legislazione esige il consenso informato dei donatori viventi. I donatori (oppure i genitori dei donatori in caso di minorenni) devono firmare una dichiarazione di consenso.

TECNICA DI BIOPSIA E TRASPORTO

La biopsia dovrà essere eseguita secondo le norme della sala operatoria

La biopsia deve essere trasportata in una soluzione sterile, privilegiando, quando possibile, l'uso di terreni di coltura con massimo apporto nutrizionale. Il contenitore per il trasporto deve essere chiuso ermeticamente e deve permettere una conservazione sterile ad una temperatura appropriata. In attesa della lavorazione, la biopsia viene conservata alla stessa temperatura.

Definizione di un “gold standard” per “Prodotti dell'ingegneria dei tessuti specifici”

Per alcuni “Prodotti dell’ingegneria dei tessuti” che sono stati impiegati con successo dalla comunità scientifica e clinica nazionale ed internazionale già da alcuni anni, sia nel caso di uso autologo sia nel caso di uso allogenico verrà definito dalla Commissione un “gold standard” per quanto riguarda la produzione, il controllo di qualità e l’impiego degli specifici Prodotti dell’ingegneria dei tessuti.

Per quanto riguarda una eventuale sperimentazione su prodotti e procedure alternative che si discostino dal “gold standard” sopra definito, si conferma l’obbligo di notifica, con silenzio assenso, dei protocolli sperimentali e delle procedure prima dell’inizio della sperimentazione.