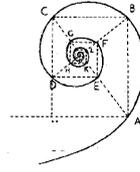




UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO



SCUOLA DI DOTTORATO IN MEDICINA MOLECOLARE

CICLO XXVI

Anno Accademico 2012/2013

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

MED/04

**PRODUZIONE DI CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI
PER APPLICAZIONI DI TERAPIA AVANZATA**

Dottorando: Lucia VELLECA

Matricola N° R09213

TUTORE: Alberto CLIVIO

CO-TUTORE: Maria Luisa NOLLI

DIRETTORE DEL DOTTORATO: Mario CLERICI

SOMMARIO

I prodotti di ingegneria tissutale sono medicinali che contengono o consistono in cellule o tessuti sottoposti ad una rilevante manipolazione così da ottenere caratteristiche biologiche, funzioni fisiologiche e proprietà strutturali pertinenti alla finalità di rigenerazione, riparazione o sostituzione. 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 garantire la sicurezza e l'efficacia dei prodotti da immettere nell'uso clinico. Ne consegue la necessità di operare nel rispetto di norme proprie dei processi produttivi dei farmaci sia dal punto di vista della qualità che della sicurezza del prodotto.

Lo scopo del lavoro svolto durante il dottorato è stato lo studio e messa a punto di sistemi di produzione per la generazione di un prodotto innovativo per terapie avanzate. Si tratta di un prodotto costituito da cellule staminali mesenchimali, ottime candidate per applicazioni cliniche in medicina rigenerativa. Per la produzione di un prodotto di terapia avanzata, l'intero processo, a partire dal campione iniziale fino al prodotto finito, deve essere svolto in un'officina farmaceutica autorizzata che operi nel rispetto delle Good Manufacturing Practices (GMP). Si tratta di linee guida il cui scopo è assicurare che un farmaco sia prodotto, analizzato e rilasciato in un regime di Qualità controllata e certificata in modo da minimizzare il pericolo che vi siano rischi non previsti per il paziente.

Nella fase preliminare del processo è stata valutata la fattibilità del metodo e sono stati definiti i protocolli da impiegare. La fase di fattibilità ha permesso di mettere a punto la procedura di isolamento, espansione, differenziamento delle cellule staminali. E' stato possibile valutare la stabilità genomica e le caratteristiche immunofenotipiche delle cellule a vari passaggi cellulari. Tutti i dati ottenuti durante lo studio di fattibilità sono stati fondamentali per definire i test di controllo di qualità, le specifiche di prodotto e i criteri di accettabilità richiesti per la successiva convalida del processo. I risultati presentati durante lo studio di fattibilità evidenziano come sia possibile trasferire protocolli di ricerca in processi potenzialmente applicabili in sperimentazione clinica. Alla fine del processo di convalida che prevede la produzione di tre lotti di cellule, le specifiche previste per i controlli in ingresso, durante il processo di produzione e sul prodotto finito devono risultare conformi a tutte le richieste.

I passi futuri sono la validazione del processo asettico, mediante l'esecuzione di tre mediafill e la valutazione del rischio relativa alla produzione di lotti destinati alla clinica, in modo da completare la serie di studi necessari per la presentazione di una domanda di autorizzazione allo studio clinico.

ABSTRACT

Tissue Engineered products may carry cells or tissues either of human or animal origin. The cells and tissues shall be subjected to substantial manipulation in order to obtain biological characteristics, physiological functions or structural properties relevant for the intended regeneration, repair or replacement.

For cells and tissues manipulated in vitro, the objective to be achieved in terms of control of production processes and quality of the final product is to ensure the safety and effectiveness of the products that would be placed in clinical use. Hence the need to act in accordance with the rules which define production processes used for drugs, in order to guarantee the quality and safety of the product..

The purpose of the work done during the PhD was the study and the development of production protocol for the generation of an innovative product for advanced therapies. It is a cellular product made of mesenchymal stem cells, good candidates for clinical applications in regenerative medicine. For this production, all stages, starting from the initial sample and up to the final product, must be carried out in an authorized pharmaceutical facility which operates in compliance with Good Manufacturing Practices (GMP). The purpose of these guidelines is to ensure that drugs are produced, analysed and released in a regime of controlled and certified quality minimizing the danger of unexpected risks for the patient.

In the preliminary phase of the process the feasibility of the method was evaluated and the protocols to be used were defined. The feasibility phase allowed the development of procedures for the isolation, expansion and differentiation of stem cells. It was possible to evaluate the genomic stability and immunophenotypic features of the cells at different steps. All data obtained during the feasibility study have been fundamental to define the tests of quality control, product specifications and criteria of acceptability required for the subsequent validation of the process. The results presented in the feasibility study show that it is possible to transfer research protocols to a GMP framework which is potentially applicable in clinical trials.

At the end of the validation process, which involves the production of three batches of cells, the specifications required for the incoming controls, during the production's process and on the final product must comply with all the requirements.

The future steps will be the validation of the aseptic process, through the execution of three mediafill and the risk assessment related to the production of batches intended for clinical use, in order to complete the series of documents required for the submission of an application for a clinical study.

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Terapie avanzate : Regolamento CE N. 1394/2007	4
1.1.1 Autorizzazione all'immissione in commercio di medicinali per terapie avanzate	10
1.2 Good Manufacturing Practice (GMP)	12
1.2.1 Impianto di produzione: "clean room"	15
1.3 Medicina rigenerativa	22
1.4 Cellule staminali	24
1.4.1 Le cellule staminali adulte	26
1.4.2 Le cellule staminali mesenchimali	27
1.4.3 Proprietà delle cellule staminali mesenchimali	28
1.4.4 Fonti delle cellule staminali mesenchimali	33
1.4.5 Fonte alternativa di cellule staminali mesenchimali: tessuto adiposo	34
1.5 Potenziali utilizzi clinici delle cellule staminali mesenchimali	36
2. SCOPO DELLA TESI: RAZIONALE PER L'UTILIZZO IN STUDI CLINICI	40
2.1 Stato dell'arte	40
2.2 Descrizione del processo	44
2.3 Studio di fattibilità	45
2.3.1 Ricevimento del campione	46
2.3.2 Controlli sul materiale in ingresso	47
2.3.3 Micoplasma	49
2.3.4 Test del micoplasma	52
2.3.5 Digestione enzimatica del tessuto di partenza	55
2.3.6 Espansione cellulare	57
2.3.7 Prove di crioconservazione	61
2.3.8 Test di potency: Differenziamento osteogenico	63
2.3.9 Caratterizzazione citofluorimetrica	66
2.3.10 Analisi del cariotipo	67
2.3.11 Formulazione e stabilità del prodotto finito	72

3. RISULTATI	74
3.1 Risultati dello studio di fattibilità	74
3.1.1 Criteri di accettabilità richiesti	77
3.2 Produzione dei lotti di convalida	79
3.2.1 Descrizione del processo di convalida	80
3.2.2 Test del controllo di qualità	81
3.2.2.1 Controlli sul materiale in ingresso	82
3.2.2.2 Controlli in processo	84
3.2.2.3 Controlli sul prodotto finito	89
4. CONCLUSIONI	103
5. BIBLIOGRAFIA	106

1. INTRODUZIONE

Negli ultimi anni il mondo scientifico ha riposto particolare attenzione verso la ricerca e lo sviluppo di una nuova categoria di prodotti medicinali basati su materiale genetico, cellule e tessuti che hanno un grande potenziale nel trattamento di numerose patologie. Tali prodotti terapeutici presentano caratteristiche del tutto particolari e, proprio in virtù delle loro peculiarità, la loro produzione e sperimentazione è strettamente regolata a livello internazionale. Tale regolamentazione impone criteri specifici e selettivi atti a garantire, in primo luogo, la sicurezza del prodotto finale poiché destinato alla somministrazione a pazienti.

Nell'insieme si parla di "terapie avanzate" qualora la strategia terapeutica preveda l'uso di prodotti di terapia cellulare contenenti cellule vive o parti complesse di esse opportunamente manipolate per "alterare" le caratteristiche genetiche, fisiologiche o biologiche del tessuto/organo trattato e direttamente somministrate ad un paziente per scopi terapeutici, diagnostici e profilattici.

Le terapie avanzate comprendono tre tipologie di prodotti: prodotti per terapia cellulare somatica, prodotti per terapia genica e prodotti di ingegneria tissutale. Tutti i prodotti di terapia avanzate (TA) sono dal punto di vista giuridico/regolatorio dei prodotti medicinali come disciplinato nell'allegato I della direttiva 2001/83/CE del Parlamento Europeo [1]. Il regolamento Europeo N. 1394/2007 integra la suddetta direttiva con disposizioni atte a disciplinare la produzione di medicinali per Terapie Avanzate destinati a essere immessi in commercio negli Stati membri. La procedura di autorizzazione all'immissione in commercio prevede un'unica valutazione della qualità, della sicurezza e dell'efficacia del prodotto effettuata dall'Agenzia Europea per i Medicinali (EMA) ed è valida in tutti i paesi dell'Unione Europea.

Le cellule che compongono i prodotti per TA sono di origine umana, animale, o entrambe, possono essere vitali o non vitali e possono essere abbinati con altre sostanze come biomolecole, sostanze chimiche, supporti o matrici biodegradabili. I medicinali per TA non vanno confusi con altri prodotti a base di cellule o tessuti (come ad esempio i trapianti) poiché le cellule per terapie avanzate prima di essere somministrate al ricevente, vengono sottoposte ad un processo di “ingegnerizzazione” (o “manipolazione estensiva”), con lo scopo di modificare le cellule del donatore ed ottenere un cambiamento che sia mirato ed utile alla cura del ricevente. Il Regolamento ha stabilito che un prodotto a base di cellule sottoposte ad una manipolazione rilevante o impiegate nel ricevente per funzioni che non sono le stesse che aveva nel donatore, sono prodotti di ingegneria tissutale, ovvero rientrano nella categoria dei medicinali per terapie avanzate.

Gli scopi terapeutici principali che si stanno esplorando con le terapie avanzate sono: *la rigenerazione di tessuti danneggiati* (articolazioni o parti ossee lesionate da incidenti); *la ricostruzione dei tessuti mancanti* (gravi malformazioni o menomazione di organi a seguito di interventi chirurgici); *la ripopolazione del numero insufficiente di cellule o la riattivazione di cellule poco attive del sistema immunitario* (infezioni gravi o tumori); *la modifica di cellule con DNA ricombinante* e somministrate a pazienti affetti da gravi malattie genetiche [2].

L'ingegneria tissutale, combina vari aspetti della medicina, della biologia cellulare e molecolare, della scienza e dell'ingegneria dei materiali, al fine di rigenerare, riparare o sostituire tessuti umani [3]. Le attuali applicazioni del settore emergente della “medicina rigenerativa” includono trattamenti per patologie o lesioni della pelle, della cartilagine e delle ossa e in un vicino futuro, prodotti più complessi come valvole cardiache, vasi

sanguigni, tessuto muscolare cardiaco. La standardizzazione dei metodi produttivi come pure la definizione di nuovi modelli di ricerca preclinica e clinica specifici per le terapie cellulari è ancora oggetto di dibattute discussioni sia a livello comunitario che nazionale. L'accresciuto uso di tessuti e cellule di origine umana a fini terapeutici ha messo in evidenza la necessità di garantirne la qualità e la sicurezza. Se le nuove tecnologie lasciano intravedere grandi speranze, soprattutto nell'utilizzo della medicina rigenerativa, d'altro canto i protocolli di vigilanza sulle ricerche in questo ambito devono offrire la garanzia di una sicurezza assoluta per i pazienti. Questa presuppone, fra gli obiettivi principali, oltre a un elevato livello di protezione sanitaria, anche un sistema di gestione della qualità.

Aspetto fondamentale della produzione di medicinali per Terapie Avanzate è la necessità di lavorazione in ambienti asettici, vista l'impossibilità di una sterilizzazione terminale del prodotto che porterebbe al danneggiamento e all'inefficacia dello stesso.

L'applicazione delle GMP (Good Manufacturing Practice) per produzioni asettiche, oltre a controllare tutti gli aspetti relativi al processo, sono finalizzate alla minimizzazione dei possibili fattori di contaminazione (personale, ambiente, attrezzature, condizioni di lavorazione e di conservazione, etc.), assicurando (al fine di garantire) la sicurezza e l'efficacia dei prodotti da immettere nell'uso clinico. Pertanto, la produzione deve essere effettuata in un'officina farmaceutica specializzata, dotata di aree a contaminazione controllata, ed autorizzata dal Ministero della Salute a seguito di verifica ispettiva dall'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) [4].

Le cellule maggiormente utilizzate nella messa a punto di prodotti di terapia cellulare sono le cellule staminali adulte: cellule non specializzate che possono essere selezionate da vari tessuti dell'organismo e dotate della singolare capacità di differenziarsi in diversi altri tipi di cellule del corpo. Le

cellule staminali hanno dimostrato una grande capacità di rigenerazione dei tessuti, di rimodulazione del sistema immunitario e posseggono, inoltre, una serie di altre qualità benefiche per l'organismo.

1.1 *Terapie avanzate: Regolamento CE N. 1394/2007*

I medicinali per terapie avanzate sono diversi dai farmaci convenzionali, in quanto sono basati sui geni e cellule. Appartengono alla categoria di medicinali per terapie avanzate i prodotti per terapia genica, prodotti per terapia cellulare somatica e prodotti di ingegneria tissutale.

I prodotti per *terapia genica* sono utilizzati per trattare le malattie genetiche. Molti di questi prodotti operano con l'inserimento di geni (DNA) nelle cellule. Quando il nuovo gene è integrato nei cromosomi di una cellula, la cellula produce (o si arresta la produzione) di una proteina che può aiutare a rallentare o guarire una malattia.

I prodotti per *terapia cellulare somatica* contengono cellule o tessuti che sono stati manipolati per modificare le proprie caratteristiche biologiche. Possono essere utilizzati per curare, diagnosticare o prevenire una malattia. Il termine "terapia cellulare" identifica una modalità di cura in cui i farmaci sono costituiti da cellule. Più recentemente, il termine è stato utilizzato soprattutto per indicare procedure che prevedono l'uso di sottopopolazioni cellulari ben caratterizzate, sottoposte a particolari trattamenti, quali ad esempio la selezione cellulare, l'espansione in vitro, la generazione di cloni antinfettivi o anti neoplastici. Le terapie genica e cellulare sono state testate a livello clinico per il trattamento di specifiche malattie genetiche, forme rare di cancro e altre malattie neurodegenerative. L'aggettivo "somatica" specifica che restano escluse in modo assoluto le modifiche alle cellule della linea riproduttiva.

I *prodotti di ingegneria tissutale* contengono cellule o tessuti che sono stati "ingegnerizzati" in modo che possano essere utilizzati per riparare, rigenerare o sostituire tessuti oppure possono essere utilizzati o somministrati ad essere umani a tal fine [1].

Un prodotto di ingegneria tissutale può contenere cellule o tessuti di origine umana o animale, o entrambe. Le cellule o i tessuti possono essere vitali o non vitali. Il prodotto può anche contenere sostanze supplementari, quali prodotti cellulari, biomolecole, biomateriali, sostanze chimiche, supporti o matrici. Sono esclusi i prodotti che contengono o consistono esclusivamente di cellule e/o tessuti umani o animali non vitali, che non contengono cellule o tessuti vitali e che non agiscono principalmente con azione farmacologica, immunologica, o metabolica" [5].

Cellule o tessuti sono considerati «di ingegneria tissutale» se soddisfano almeno una delle seguenti condizioni (art 2. paragrafo 1, lettera c):

- le cellule o i tessuti sono stati sottoposti ad una rilevante manipolazione così da ottenere caratteristiche biologiche, funzioni fisiologiche e proprietà strutturali pertinenti alle finalità di rigenerazione, riparazione o sostituzione
- le cellule o i tessuti non sono destinati ad essere utilizzati per la stessa/le stesse funzioni essenziali nel beneficiario e nel donatore”.

I medicinali per terapie avanzate fanno riferimento a tre livelli normativi (figura 1) :

- Il livello 1 comprende il Regolamento (CE) n.1394/2007 e la legislazione già esistente [6,7,8,9,10]
- Il livello 2 comprende le Prescrizioni tecniche (direttive tecniche), necessarie per dimostrare la qualità, sicurezza ed efficacia dei

farmaci per terapie avanzate; sono altamente specifiche e dipendono dal livello di rischio associato a tali prodotti.

- Il livello 3 comprende le Linee guida particolareggiate, concernenti ad esempio il tipo e la quantità di dati preclinici/clinici necessari per dimostrare la qualità, sicurezza ed efficacia dei medicinali per terapie avanzate.

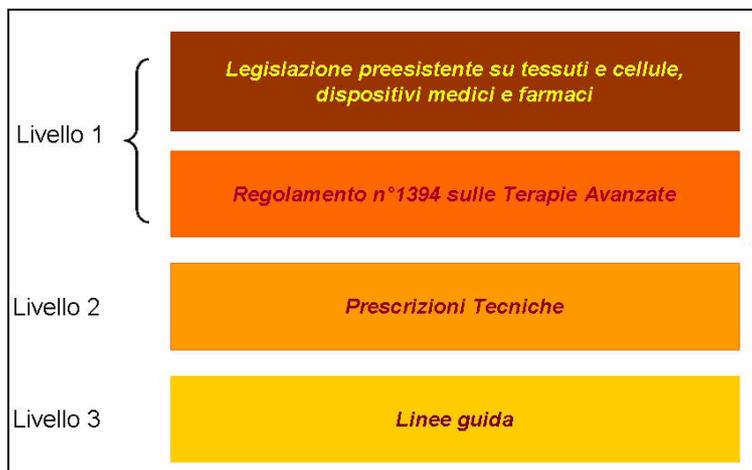


Figura 1: Livelli normativi per i prodotti di terapia avanzata [10].

I prodotti destinati alla terapia genica e alla terapia cellulare somatica erano già stati classificati come medicinali e disciplinati a livello europeo con la direttiva generale sui farmaci 2001/83/CE (Figura 2) [10].

In Italia la Direttiva è recepita dal Decreto legislativo 24 aprile 2006, n.219 [11].

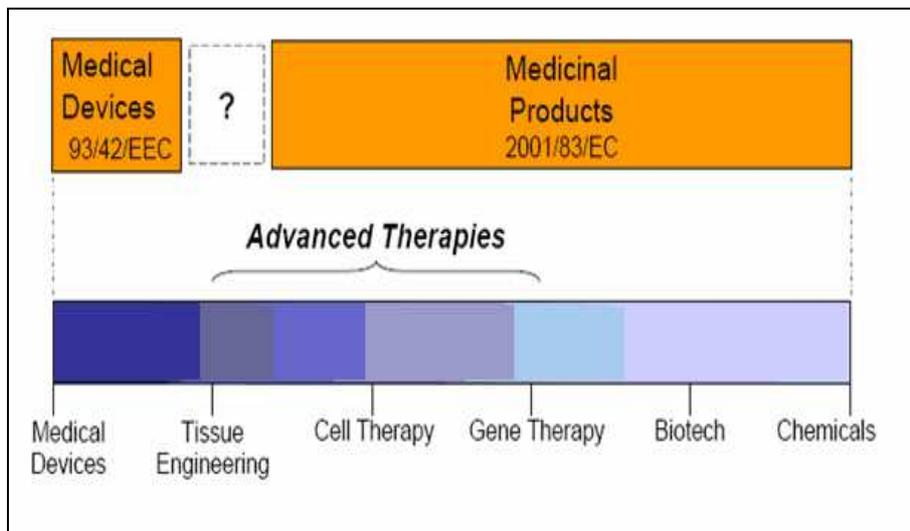


Figura 2: Inquadramento legislativo dei prodotti medicinali per TA, antecedente all'emanazione del Regolamento n 1394/2007: i prodotti di ingegneria tissutale erano privi di chiari riferimenti normativi [12].

Successivamente anche i prodotti di ingegneria tissutale, che in precedenza ne erano esclusi, sono stati inseriti con la pubblicazione del Regolamento n. 1394/2007 nella normativa comunitaria sui medicinali per terapie avanzate. In sintesi, come definito nell' art. 2 (Definizioni) paragrafo 1, lettera a) del suddetto regolamento per "medicinale per Terapia Avanzata" si intende medicinali di terapia genica, medicinali di terapia cellulare somatica, prodotti di ingegneria tissutale ad uso umano.

Il regolamento ha inoltre stabilito che un prodotto a base di cellule, solo se sono state sottoposte ad una manipolazione sostanziale rientra nei medicinali per terapia avanzata e che le cellule siano impiegate nel ricevente per funzioni che non sono le stesse che avevano nel donatore (uso non omologo), come per esempio la somministrazione di cellule staminali isolate dal midollo dell'osso e trasferite nel cuore del paziente

(cioè in una sede in cui non sono normalmente presenti) dopo un infarto, con lo scopo di riparare il tessuto cardiaco danneggiato. L'uso non omologo, anche se eseguito nello stesso paziente, ovvero il paziente è donatore e ricevente allo stesso tempo, è considerato terapia avanzata.

Il Regolamento (CE) n. 1394/2007 fornisce inoltre una definizione di medicinali per *terapie avanzate combinate* (art 2, paragrafo 1, lettera d) intendendo medicinali che contengono come parte integrante del prodotto, uno o più dispositivi medici o uno o più dispositivi medici impiantabili attivi, e la loro parte cellulare o tissutale deve contenere cellule o tessuti vitali o non vitali deve essere capace di agire sul corpo umano con un'azione che possa considerarsi primaria rispetto a quella dei dispositivi in questione.

Il presente regolamento è una *lex specialis*, con più intensi standard di qualità e sicurezza per i suddetti medicinali che, in quanto complessi ed ancora parzialmente inesplorati, necessitano di una regolamentazione adeguata per salvaguardare la sanità pubblica [1].

L'approvazione del prodotto avviene tramite una procedura simile a quella centralizzata prevista per gli altri medicinali: l'autorizzazione alla commercializzazione viene rilasciata dalla Commissione, dopo una valutazione scientifica della domanda, contenenti i dati relativi degli studi certificati atti a dimostrare la qualità e la sicurezza dei farmaci, da parte dell'agenzia europea dei medicinali (EMA), che si avvale, a tal fine, di un nuovo organo creato *ad hoc*: l'*EMA's Committee for Advanced Therapies* (CAT). Tale autorizzazione è valida in tutto il territorio comunitario, ma non osta all'applicazione delle legislazioni nazionali in materia etica, che vietano o limitano l'utilizzazione di tipi specifici di cellule umane od animali, nonché la vendita, la fornitura o la somministrazione di medicinali che contengono o derivano da dette cellule [13].

Inoltre, il CAT svolge un ruolo di consulenza ad un altro Comitato dell'EMA, il Comitato per i Prodotti Medicinali ad Uso Umano (CHMP), che elabora raccomandazioni per la Commissione Europea in merito all'autorizzazione alla commercializzazione per un dato prodotto. Per questo il CAT è estremamente importante, essendo responsabile della valutazione dei prodotti per le terapie avanzate, della preparazione di un parere su ciascuna richiesta di autorizzazione alla commercializzazione e della relativa presentazione al CHMP prima della raccomandazione finale. I membri del CAT studiano le richieste delle aziende che intendono sviluppare terapie avanzate e preparano un parere sulla possibilità che tali prodotti possano ottenere la designazione di terapie avanzate e che rispondano a standard di sicurezza sul mercato. Il loro compito è inoltre quello di offrire consigli sui dati non clinici che possono essere di aiuto alle piccole e medie imprese nello sviluppare nuovi medicinali. Il CAT è composto da cinque membri del CHMP, un rappresentante di ciascuno Stato dell'Unione Europea, due professionisti del settore sanitario e due rappresentanti dei malati. Il Regolamento N. 1394/2007 e il CAT che è stato creato di conseguenza, hanno la possibilità di sostenere lo sviluppo delle terapie emergenti e di migliorarne l'accessibilità da parte dei malati, favorendo la ricerca, lo sviluppo e l'autorizzazione di tali prodotti.

Il nuovo regolamento, che di fatto rappresenta un emendamento alla direttiva 2001/83/CE, fissa norme per l'autorizzazione, la supervisione e la farmacovigilanza dei medicinali per terapie avanzate (ATMPs) - consistenti in quelle genetiche, cellulari, somatiche e nell'ingegneria tessutale - preparati industrialmente o nella cui fabbricazione intervenga un processo industriale, e destinati ad essere commercializzati negli Stati membri.

In ambito europeo, il regolamento CE 1394/2007 costituisce la normativa di riferimento per i medicinali di terapia genica, di terapia cellulare somatica e

di ingegneria tissutale, insieme alle altre tre direttive CE 2004/23, 2006/17 e 2006/86 (che disciplinano, fra l'altro, le fasi di approvvigionamento, controllo, lavorazione di tessuti e cellule umane) ed è destinato a soddisfare i seguenti obiettivi principali:

- garantire un elevato livello di protezione sanitaria per i pazienti europei trattati con prodotti per terapie avanzate;
- armonizzare l'accesso al mercato e migliorare il funzionamento del mercato interno istituendo un quadro normativo su misura ed esaustivo per l'autorizzazione, la supervisione e il controllo successivamente all'autorizzazione, dei prodotti per terapie avanzate;
- stimolare la competitività delle imprese europee che operano in questo campo;
- garantire la sicurezza giuridica generale, pur consentendo una sufficiente flessibilità a livello tecnico, al fine di tenere il passo con l'evoluzione della scienza e della tecnologia.

1.1.2 Autorizzazione all'immissione in commercio di medicinali per terapie avanzate

L'autorizzazione all'immissione in commercio dei medicinali per terapia avanzata è regolata da due livelli autorizzativi:

- Livello comunitario dall'EMA, l'autorità competente che fornisce consulenze scientifiche e rilascia certificazioni utili all'approvazione dell'immissione in commercio dei prodotti industriali sul mercato UE
- Livello nazionale da AIFA (In Italia), che autorizza la cell factory per la produzione di prodotti paziente-specifico e autorizza le sperimentazioni cliniche di fase II e III.

In Italia, in base alle leggi nazionali che regolamentano l'impiego sperimentale dei medicinali, le sperimentazioni cliniche con terapie avanzate sono soggette all'approvazione da parte della Commissione per l'accertamento dei Requisiti dei Prodotti Farmaceutici di Nuova Istituzione presso l'Istituto Superiore della Sanità (ISS) per gli studi clinici di fase I, inviando un dossier con le informazioni relative alla produzione, con i dati preclinici e clinici, ove disponibili, mentre l'autorizzazione per le fasi successive viene rilasciata dall'AIFA - Ufficio Sperimentazioni Cliniche.

Il ruolo dell'ISS è principalmente legato alla approvazione dei trial clinici di fase I e II, ma interviene anche come organo tecnico-scientifico in caso di verifiche legate alla qualità di un Farmaco in fase post-autorizzazione al commercio. Ad AIFA spetta il compito di gestire gli aspetti legati alla registrazione di un Farmaco non biotecnologico, avvalendosi del parere di esperti dell'ISS e della commissione Tecnico Scientifica (CTS), siano essi di nuova istituzione o legati a cambi, alla Farmacovigilanza, per garantire il monitoraggio continuo delle segnalazioni di reazioni avverse, e alla produzione e controllo mediante visite ispettive periodiche presso i siti autorizzati.

Anche il Ministero del lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali, principalmente svolto dalla Direzione generale dei farmaci e dei dispositivi medici, si occupa principalmente di vigilare sull'AIFA, di disciplinare le attività di vendita al pubblico dei medicinali, di gestire la pubblicità dei medicinali di automedicazione.

A questi enti va aggiunta l'EMA (European Medicines Agency) che è l'agenzia comunitaria dell'Unione Europea per la valutazione dei medicinali. Il ruolo dell'EMA è strettamente strategico per i medicinali biotecnologici, innovativi e di terapie avanzate, in quanto è l'ente responsabile della registrazione centralizzata di tali farmaci.

La responsabilità del trattamento del paziente con le terapie avanzate è divisa tra il laboratorio (cell factory) ed il medico che somministra, oltre che con le autorità sanitarie competenti (l'Istituto Superiore di Sanità, l'AIFA ed i Comitati Etici) che devono giudicare l'innocuità e la sicurezza dei prodotti.

1.2 Good Manufacturing Practice (GMP)

La produzione di medicinali per terapie avanzate necessita dell'applicazione delle norme di Buona Pratica di Fabbricazione (GMP), ovvero regole prescrittive e obbligatorie che stabiliscono i vari aspetti organizzativi e tecnici per garantire la qualità del prodotto in termini di sicurezza, analogamente ai prodotti farmaceutici di tipo tradizionale (come definito nella direttiva europea 2003/94/CE) [14].

La Buona Prassi di Fabbricazione (Volume 4 Eudralex) consiste in quella parte della garanzia della qualità che assicura che i prodotti siano costantemente fabbricati e controllati in modo da soddisfare le norme di qualità appropriate all'uso cui sono destinati. Le Norme di Buona Fabbricazione (NBF o GMP - Good Manufacturing Practice, o Buone Prassi di Fabbricazione), sono un insieme di regole, procedure e linee guida in base alle quali vengono prodotti i medicinali, i dispositivi medici, i prodotti per la diagnostica, alcuni cibi e le sostanze farmacologicamente attive (Active Pharmaceutical Ingredients, API). Le GMP sono disposizioni obbligatorie come definito in Italia dal Decreto legislativo 219 del 24 aprile 2006, relativo all'attuazione della direttiva 2001/83/C, all'art. 58 e art. 60 e sono costituite dagli allegati (annexes) al Volume 4 EU (GMP guidelines) che identificano specifici settori e capitoli di natura generale, applicabili sempre per tutte le tipologie di produzione farmaceutica.

Il primo documento redatto dalla World Health Organisation (WHO), in cui si definisce il testo per le *good manufacturing practice (GMP)* risale al 1967. Esso fu messo a punto da un gruppo di consulenti in seguito alla richiesta, da parte della Twentieth World Health Assembly, di definire delle “norme di buona fabbricazione”, sia per la produzione che per il controllo della qualità e della sicurezza del farmaco. Il testo fu revisionato nel 1968, ad opera di un comitato di esperti della WHO e successivamente pubblicato. Tale guida fu ulteriormente rivista nel 1971 e riproposta nel *Supplement* della seconda edizione della manuale: la Farmacopea Internazionale.

Nel 1992 nel documento GMP sono stati introdotti ulteriori cambiamenti che riguardano: il management della qualità nella industria farmaceutica nell'ambito dell'igiene, della validazione, dell' auto-ispezione, della operatività del personale, della sicurezza dello stabile, della scelta dei materiali e della compilazione dei documenti; la buona pratica nella produzione e il controllo di qualità, che definisce una guida su come deve comportarsi il personale nella produzione e nel controllo di qualità per poter integrare i principi generali dell'assicurazione della qualità (*Quality Assurance*). L'assicurazione della qualità è il complesso delle misure adottate allo scopo di garantire che i prodotti abbiano la stessa qualità richiesta per l'impiego cui sono destinati.

Le GMP assicurano che i prodotti siano costantemente fabbricati e controllati in modo da soddisfare gli standard di qualità e le prescrizioni dell'autorizzazione alla commercializzazione [4].

I requisiti fondamentali delle GMP riguardano:

- tutti processi di fabbricazione devono essere chiaramente definiti e sistematicamente riesaminati;

- le fasi critiche dei processi di fabbricazione e le modifiche significative devono essere convalidate;
- si deve disporre di tutte le infrastrutture necessarie all'applicazione delle GMP (personale con qualifiche ed addestramento adeguati, locali e spazio adeguati, servizi e attrezzature adeguati, materiali - contenitori - etichette corretti, procedure e istruzioni approvate, idonee infrastrutture per immagazzinamento e trasporto);
- le istruzioni e le procedure devono essere scritte in forma esplicativa con un linguaggio chiaro e privo di ambiguità;
- gli operatori devono essere addestrati ad eseguire in modo corretto le procedure;
- deve essere presente documentazione da cui risulti che tutte le fasi richieste dalle procedure e dalle istruzioni si sono effettivamente svolte e che il prodotto soddisfa le aspettative in termini di quantità e di qualità; i relativi documenti devono essere correttamente archiviati;
- la distribuzione dei prodotti deve minimizzare i rischi che potrebbero comprometterne la qualità;
- deve esistere un sistema per il ritiro dei lotti dalla distribuzione;
- devono essere riesaminati reclami e difetti di qualità e instaurate adeguate azioni correttive.

Per il settore farmaceutico, la conformità alle GMP è dunque requisito legislativo; a tal fine tutte le aziende vengono ispezionate, con cadenza biennale, dall'ente regolatorio nazionale, che nel caso dell'Italia è costituito dall'AIFA (Agenzia Italiana del Farmaco), mentre nel caso degli Stati Uniti è costituito dall'FDA (Food and Drug Administration).

1.2.1 Impianto di produzione: “clean room”

La produzione di specialità medicinali per TA deve avvenire sin dall’inizio in condizioni tali da prevenire ogni contaminazione microbica possibile. Ci deve essere una idonea qualità dell’ambiente (tutti i requisiti dell' Annex I GMP). Il Layout (configurazione) deve essere strutturato in modo da evitare il rischio di contaminazioni, di cross-contaminazioni e di accumulo di materiale quale polvere o sporco. Pertanto, gli ambienti a contaminazione controllata sono realizzati secondo un modello “a cipolla” procedendo dalle aree esterne alle aree pulite e alle aree critiche come rappresentato in figura 3 [15].

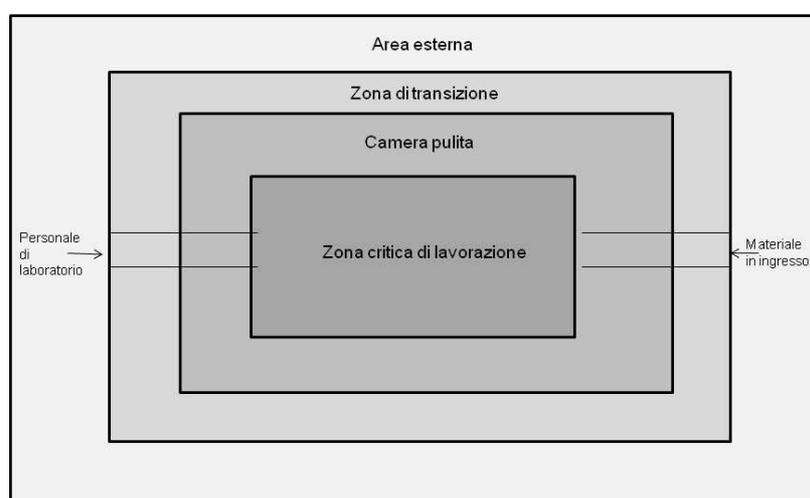


Figura 3. Progettazione degli ambienti a contaminazione controllata [15].

La separazione dei flussi del materiale e del personale e la segregazione delle operazioni permette di ridurre la contaminazione particellare, in particolare la cross-contaminazione; inoltre aiuta a prevenire errori e mix-up di materiali.

Con il termine "clean room", ovvero camera bianca, si intende un qualsiasi ambiente in cui la concentrazione di particelle aerotrasportate è controllata con mezzi e costruzioni apposite al fine di limitarne la numerosità. Tale controllo della concentrazione è associato a quello di altri parametri quali la temperatura, l'umidità relativa e la pressione.

Le tre funzioni principali di una Camera Bianca sono:

- Contenimento del volume di aria pulita
- Riduzione al minimo della quantità di particelle attraverso filtri speciali
- Sovrapressione interna per evitare l'ingresso di particelle inquinanti esterne; procedure di accesso ed abbigliamento adeguato per il personale

Cronologicamente, la progettazione e l'utilizzo di clean rooms risale a circa a cento anni fa e riguarda il loro impiego negli ospedali al fine di prevenire e combattere le infezioni; attualmente, la maggioranza delle richieste per l'utilizzo delle clean rooms, proviene da industrie farmaceutiche e soprattutto elettroniche.

Le attuali "clean rooms" risultano migliaia di volte più pulite rispetto al passato. Infatti esse sono state oggetto di modifiche e miglioramenti tali, che è possibile progettare a priori ambienti puliti in grado di soddisfare per larga parte le rigorose esigenze di sterilità di cui necessita il prodotto farmaceutico.

Negli ultimi due decenni, l'esigenza di clean rooms sempre più avanzate e affidabili per la produzione di medicinali sterili è cresciuta enormemente; di fatto, molte industrie attualmente si affidano a questa tecnologia mentre altre che ancora non l'adottano, sviluppano i propri prodotti considerando il controllo ambientale una condizione stringente ed indispensabile.

La produzione di medicinali per terapie avanzate deve avvenire in una classe A, rappresentata generalmente da una cappa a flusso laminare, posta in un locale di classe B, cui si accede attraverso un sistema di spogliatoi di classe B, C e D [16]. La normativa di riferimento sulla classificazione delle Clean Rooms è rappresentata dalla norma EN ISO 14644 (Camere bianche e ambienti associati controllati). Il controllo della biocontaminazione è trattato dalla norma EN ISO 14698.

L'Annex 1 propone una classificazione appropriata per i locali di produzione farmaceutica per prodotti sterili e fornisce criteri di assegnazione della classe appropriata per i diversi locali di produzione, a seconda della criticità decrescente delle operazioni che vi si svolgono:

- *Classe A:* zona locale ad alto rischio, dove il prodotto è esposto alle potenziali contaminazioni, come per esempio le fasi di riempimento e di sigillatura, mentre le vials e fiale sono aperte e le fasi in cui si effettuano collegamenti o aggiunta di reagenti in asepsi. Di norma tali condizioni si verificano in una zona di lavoro con circolazione d'aria a flusso laminare. I sistemi di flusso laminare devono garantire una velocità omogenea dell'aria di 0.45 m/s +/- 20% (valore indicativo) nella posizione di lavoro
- *Classe B:* classe di contorno alla classe A per le preparazioni e le fasi di riempimento aseptiche
- *Classe C e D:* ambienti puliti per le fasi meno critiche di fabbricazione di prodotti che possono essere sterilizzati terminalmente

La tabella 1 mostra la classificazione dell'aria in termini di particelle presenti, suddivisa nelle quattro classi [17].

CLASSIFICAZIONE DELL'ARIA				
Classe	Massimo numero consentito di particelle per m³ equivalenti o superiori alla dimensione specificata			
	0.5 µm	5 µm	0.5 µm	5 µm
A	3.500	1	3.500	1
B	3.500	1	350.000	2.000
C	350.000	2000	3.500.000	20.000
D	3.500.000	20.000	Non definito	Non definito

TABELLA 1. Parametri di classificazione dell'area.

La fabbricazione di prodotti sterili deve svolgersi in ambienti controllati ai quali il personale, il materiale e le attrezzature accedono attraverso compartimenti a tenuta d'aria. Questi ambienti devono essere mantenuti puliti in maniera appropriata e ventilati con aria convogliata attraverso filtri HEPA (High Efficiency Particulate Air) con adeguata capacità filtrante.

Ogni operazione di produzione richiede un adeguato livello di pulizia dell'ambiente in fase operativa, allo scopo di minimizzare il rischio di contaminazione del prodotto o dei materiali utilizzati per l'azione di particelle o microbi.

Per dimostrare l'adeguatezza dell'ambiente destinato alla produzione di prodotti sterili è necessario effettuare frequenti monitoraggi microbiologici effettuati con metodi di sedimentazione, campionatura d'aria e contatto delle superfici mediante l'uso di piastre contenenti agar solido o tamponi. Il monitoraggio della contaminazione deve essere effettuato nelle condizioni

di riposo e operatività. Per rispettare i requisiti della condizione di operatività, questi ambienti devono essere progettati in modo da garantire il grado specifico di purezza dell'aria nella condizione "a riposo". Tale condizione si verifica quando l'impianto di produzione è completamente installato ed in funzione, ma in assenza degli operatori addetti. La condizione di "operatività" si verifica quando l'impianto è in funzione nella modalità operativa prestabilita, in presenza del numero specifico di addetti. Anche i dati del campionamento sono parte integrante della documentazione necessaria al rilascio del lotto, inoltre l'analisi dei dati raccolti permette di gestire e correggere eventuali deviazioni del processo dagli standard abituali.

I limiti raccomandati per il controllo microbiologico degli ambienti di produzione sono riportati in tabella 2.

MONITORAGGIO MICROBIOLOGICO DELL'AREA CRITICA DI LAVORO (GMP)				
Classe	Aspirazione CFU/m³	Esposizione (Diametro da 90mm) CFU/m³	Contatto (Diametro da 60mm) CFU/m³	Operatori CFU/Guanto
A	<1	<1	<1	<1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

TABELLA 2. Parametri per il monitoraggio microbiologico.

Occorre peraltro stabilire preventivamente adeguati limiti di allerta e di azione relativi agli esiti del controllo per il rilevamento di microbi e particelle (USP 24).

Si definisce limite di allerta un valore di contaminazione microbiologica che mostri un discostamento del processo dal suo normale standard, ma che non necessariamente debba essere seguito da azioni correttive. Si definisce invece limite di azione un valore di contaminazione microbiologica che, quando raggiunto, necessiti di un immediato “follow up” investigativo e di azioni correttive. I limiti di allerta dovrebbero essere stabiliti dal Quality Assurance (QA) sulla base di una periodica valutazione dei dati storici; qualora tali limiti venissero superati, le procedure di funzionamento, devono prevedere azioni correttive.

Le procedure operative devono prevedere misure correttive se questi limiti vengono superati (limiti di allerta e di azione).

Altro aspetto rilevante consiste nella scelta dei punti del campionamento: essi devono essere rappresentativi di situazioni potenzialmente a rischio per la sterilità del prodotto o di zone particolarmente soggette a contaminazione.

Per le superfici si selezionano quelle più critiche per il processo (ripianti, carrelli, supporto aghi) oltre a pavimenti e pareti, mentre gli operatori si campionano i guanti e, generalmente, avambracci e/o addome. La frequenza del campionamento è stabilita in base alla criticità dell'operazione. Gli operatori vanno campionati almeno una volta per ogni sessione di lavoro, generalmente al termine delle attività.

L'insorgenza di trend negativi richiede un'indagine per ricercare la causa e l'istituzione di un piano operativo che stabilisca le azioni correttive da intraprendere.

Lo sviluppo di un' efficace programma di controllo microbiologico ambientale rappresenta una fase cruciale nell'ottica dell'ottenimento adeguato livello di Sterility Assurance; tale programma dovrebbe essere preceduto da un attento esame del processo aseptico in tutte le sue fasi, in modo da individuare i punti critici e le attività più a rischio. Il programma inoltre dovrebbe essere sostenuto da una documentazione adeguata ed esaustiva durante un'eventuale "audit" e periodicamente rivisto in funzione dei dati raccolti e degli altri riscontri sperimentali.

1.3 Medicina rigenerativa

La medicina rigenerativa è costituita da un insieme di attività interdisciplinari, sia di ricerca sia di sperimentazioni cliniche, volte a riparare e rigenerare tessuti ed organi compromessi dalla malattia piuttosto che dall'invecchiamento. Anziché sostituire il tessuto, l'obiettivo è di rigenerarlo biologicamente [3].

Scopo della biologia rigenerativa è l'identificazione delle diversità cellulari e molecolari che distinguono il normale turnover tissutale dalla riparazione cicatriziale, al fine di ricreare un ambiente adatto alla rigenerazione in un tessuto adulto danneggiato.

Tale compito può essere raggiunto identificando la sorgente cellulare capace di rigenerare al meglio il tessuto danneggiato e l'ambiente più adatto per ospitare e istruire le cellule.

La fonte cellulare può essere considerata ideale quando è accessibile, facilmente espandibile in vitro, multipotente, capace di rigenerare stabilmente un tessuto funzionalmente maturo in vivo e priva di rischi di trasformazione neoplastica. Nella pratica le cellule staminali sono quelle che si avvicinano maggiormente a tale modello. Finora sono state impiegate due principali categorie di cellule staminali: embrionali e dell'adulto.

Si sta facendo sempre più strada il concetto che le proprietà fondamentali delle cellule staminali siano regolate da segnali e interazioni intercellulari entro il microambiente in cui esse sono localizzate (*nicchie*) [18].

A tal proposito, la Matrice Extra Cellulare (ECM) gioca un ruolo cruciale, trasducendo alle cellule stimoli che provengono dall'esterno mediante segnali fisici e chimici. Lo studio delle modificazioni della ECM in corso di rimodellamento, delle modificazioni fisiologiche e patologiche di struttura e funzioni del tessuto, ha come target quello di giungere a manipolazioni

sperimentali delle componenti della matrice al fine di promuovere la rigenerazione tissutale [19,20].

Ad oggi sono due i principali filoni delle applicazioni terapeutiche. Il primo è rappresentato dalla rigenerazione di tessuti solidi con l'utilizzo di staminali per ricostruire in laboratorio una parte di tessuto della cornea, della pelle, del diaframma, o della trachea, che poi viene impiantato in soggetti affetti da gravi malformazioni congenite. La prospettiva è quella di utilizzare delle cellule facilmente isolabili come ad esempio le cellule staminali presenti nel liquido amniotico per generare dei tessuti da trapiantare in bambini che nascono con gravi patologie.

Il secondo filone riguarda invece la terapia cellulare di malattie che non hanno un'origine genetica, con l'utilizzo di popolazioni cellulari ben caratterizzate, sottoposte a particolari trattamenti, quali ad esempio la selezione cellulare, l'espansione in vitro, la generazione di cloni anti infettivi o anti neoplastici [21].

Non essendo possibile sottoporre, i tessuti prodotti in vitro o le colture cellulari a procedure di sterilizzazione senza incidere sulla loro vitalità e quindi sulle loro proprietà terapeutiche, tutti questi trattamenti devono essere eseguiti in condizioni che garantiscano un bassissimo livello di contaminazione ambientale, allo scopo di ridurre il rischio microbiologico associato [22]. La produzione di tessuti o prodotti cellulari utilizzati in protocolli clinici sperimentali segue un iter ben definito che prevede una fase preclinica, una fase di validazione ed un iter approvativo.

1.4 Cellule staminali

Le cellule staminali sono cellule primitive, non specializzate, caratterizzate dalla capacità sia di generare, indefinitamente e ad ogni duplicazione, cellule con le stesse caratteristiche della cellula madre (proprietà che va sotto il nome auto-rinnovamento), che di differenziare dando origine ad una progenie cellulare con caratteristiche diverse [23, 24, 25].

Le cellule staminali possono essere distinte per alcune peculiarità: la potenzialità differenziativa, o plasticità, e il tessuto d'origine.

In base alle loro potenzialità differenziative (figura 4), le cellule staminali sono classicamente suddivise in:

- **Cellule Staminali Totipotenti:** cellule staminali in grado di differenziare in ogni tessuto embrionale ed extraembrionale. Queste cellule derivano da embrioni allo stadio di 4-8 cellule, dopo 1-3 giorni dalla fecondazione;
- **Cellule Staminali Pluripotenti:** cellule embrionali allo stadio di blastocisti, dopo 4-14 giorni dalla fecondazione. Queste cellule sono capaci di differenziare in tessuti di origine embrionale organizzati nei tre diversi foglietti germinali (ectoderma, mesoderma ed endoderma);
- **Cellule Staminali Germinali:** sono cellule staminali pluripotenti (cellule riproduttive progenitrici). Nell'embrione post-impianto e poi nel feto sono ancora molte le cellule staminali presenti, anche se difficile è il loro isolamento. Queste cellule rappresentano lo stadio di differenziamento che precede la formazione delle gonadi e compaiono nell'embrione di topo e umano, alla 1° e 3° settimana di sviluppo, rispettivamente. Se isolate, queste cellule sono in grado, come le cellule staminali embrionali, di replicarsi illimitatamente in vitro mantenendo capacità differenziative pluripotenti.

- **Cellule Staminali Multipotenti:** sono cellule che hanno la capacità di moltiplicarsi e di mantenersi in coltura, ma non quella di rinnovarsi in modo illimitato. Differenziano in tessuti diversi ma appartenenti allo stesso foglietto embrionale. Appartengono a tale categoria le cellule staminali adulte.
- **Cellule Staminali Unipotenti:** presenti nei tessuti adulti, potenzialmente più limitate nonché organo-specifiche, sono in grado di auto-rinnovarsi e di differenziare nel tipo cellulare del tessuto di appartenenza, assicurandone la riparazione ed il mantenimento. La multipotenzialità dei compartimenti rigenerativi intratissutali viene conservata nell'individuo adulto dalle cellule staminali adulte con un potenziale di staminalità che assicura il rinnovamento dei vari tessuti specializzati [26]

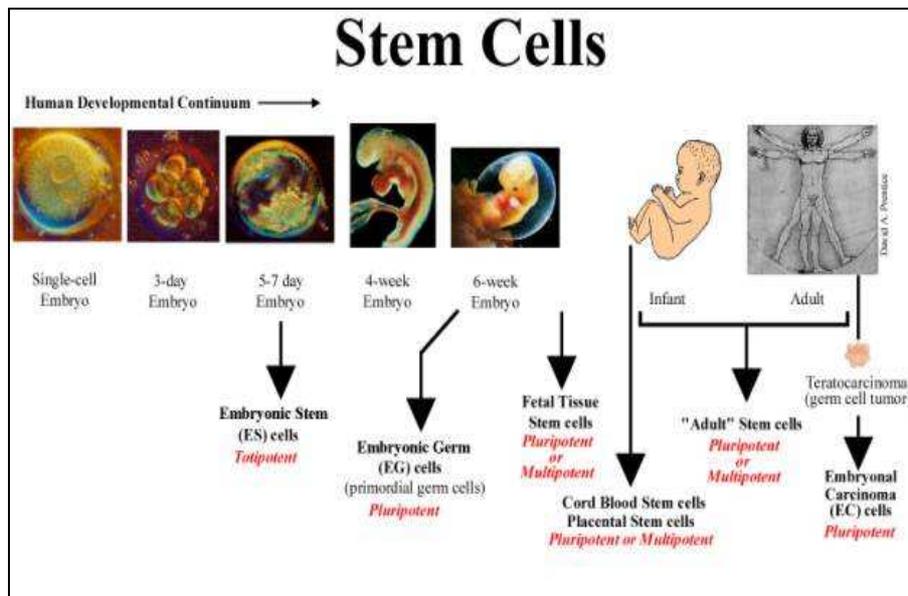


Figura 4: Le cellule staminali e il loro potenziale differenziativo.

Le cellule staminali si distinguono anche per il tessuto d'origine in: *staminali embrionali* ESCs (Embrionic Stem Cells.), le cellule pluripotenti collocate nella blastocisti, e *staminali adulte* presenti in tutti i tessuti già formati che sono prevalentemente multipotenti e unipotenti, che hanno il compito di mantenere costante il numero di cellule dell'organismo e che comprendono le staminali fetali o FSCs (Fetal Stem Cell) presenti negli abbozzi degli organi fetali e le staminali neonatali o NSCs (Neonatal Stem Cell) isolate dal cordone ombelicale e dal liquido amniotico.

Le cellule staminali embrionali sono pluripotenti, quindi se opportunamente stimolate, possono dare origine ad un organismo completo. Sono recuperabili da embrioni, di cui necessariamente si provoca la distruzione e sono molto "flessibili" ma meno governabili, in quanto potrebbero causare tumori, come dimostrato in alcuni modelli animali. Le cellule staminali adulte possono essere isolate dal cordone ombelicale, dalla placenta, dal midollo e da altri tessuti o organi. Sono meno "flessibili" rispetto alle cellule staminali embrionali, ma più governabili e quindi possono essere utilizzate con maggior sicurezza.

1.4.1. Le cellule staminali adulte

Le cellule staminali adulte, *Adult Stem Cells*, sono cellule non specializzate che possono essere selezionate da vari tessuti dell'organismo e dotate della singolare capacità di differenziarsi in diversi altri tipi di cellule del corpo [27].

Le *Adult Stem Cells* persistono durante la vita e svolgono in genere funzioni di riparazione tissutale, in risposta ad eventi traumatici o al naturale *turnover* cellulare. Lo studio e la progressiva caratterizzazione delle cellule staminali adulte hanno modificato significativamente il concetto di cellula staminale, secondo il quale esiste una differenziazione

progressiva dei precursori immaturi che segue lo schema della filiera di derivazione embrionale a cui una cellula appartiene. L'osservazione che alcune cellule staminali adulte presenti nel midollo osseo (di origine mesodermica) o in molti altri tessuti sono in grado di assumere morfologia e funzione di cellule di diversa origine embrionale come neuroni o cellule gliali (di origine ectodermica), ed epatociti o pneumoniti (di origine endodermica), ha evidenziato una pluripotenzialità di questi elementi cellulari che ricorda quella delle cellule staminali embrionali. Tali elementi staminali adulti possono migrare in siti diversi da quelli di origine, partecipando a fenomeni di rigenerazione tissutale e presentano capacità differenziative e proliferative simili a quelle della blastocisti entro le prime due settimane dall'impianto. Queste osservazioni mostrano la capacità rigenerativa dei tessuti adulti suggerendo enormi potenzialità applicative nell'ambito della medicina rigenerativa [28].

Un tipo particolarmente promettente di cellule staminali adulte per la medicina rigenerativa sono le cellule staminali mesenchimali.

1.4.2 Le cellule staminali mesenchimali

Le cellule staminali mesenchimali (MSCs) sono precursori non ematopoietici inizialmente isolati dal midollo osseo come elementi aderenti, altamente proliferanti, dotati di potenziale di *self-renewal* a lungo termine e di differenziazione multilineare in diversi tessuti di origine mesenchimali [29,30]. Tali proprietà, la facilità di isolarle e coltivarle ed il loro elevato potenziale di espansione *ex vivo* ne fanno una interessante risorsa utilizzabile in una vasta gamma di applicazioni cliniche nel contesto della terapia cellulare e genica ed in medicina rigenerativa [31].

Le MSCs derivano dal mesoderma, il foglietto embrionale intermedio da cui originano i tessuti connettivi di tutto l'organismo, che si differenzia intorno al

terzo mese di gestazione. Il mesenchima differisce notevolmente dagli altri foglietti embrionali, costituiti quasi esclusivamente di cellule, in quanto è composto da un'abbondante matrice extracellulare in cui sono immerse le cellule mesenchimali. Il tessuto mesenchimale si ritrova in tutti gli organi per garantire supporto strutturale e per regolare il traffico di cellule attraverso i tessuti. Le MSCs, derivano principalmente dal mesoderma, ma possono originare anche da alcune porzioni degli altri due foglietti embrionali: l'ectoderma della cresta neurale e l'endoderma della placca precordiale [32].

Le MSCs sono in grado di differenziare non solo in tessuti di origine mesenchimale, tra cui stroma midollare, tessuto adiposo, osseo, cartilagineo, tendineo e muscolare scheletrico, mesoderma viscerale e cellule endoteliali ma anche in cellule di origine non mesodermica quali neuroni, cellule epiteliali di cute e tubo digerente, fegato e polmone.

1.4.3 Proprietà delle cellule staminali mesenchimali

Numerosi studi condotti sulle MSC sono stati portati avanti con diverse metodiche per isolare, espandere e provare a caratterizzare queste cellule. Alla luce di questi studi sono stati stabiliti i tre criteri minimi per poter definire le MSC.

Il primo criterio riguarda la capacità delle MSC di aderire alla plastica, nei recipienti di coltura dove vengono fatte proliferare, in condizioni standard. Le cellule possono essere seminate in piastre o fiasche di coltura a diverse concentrazioni, con terreni di coltura addizionati di siero animale o umano al 10-20% ed antibiotici, e coltivate in appropriate condizioni.

Dopo alcune ore, le cellule aderiscono alla superficie della fiasca, mentre quelle non aderenti vengono rimosse con un cambio di terreno, generalmente dopo 48 o 72 ore. Già dopo alcuni giorni si formano dei foci

di proliferazione cellulare, *fibroblast colony forming units* (CFU-F), costituite da aggregati di almeno 50 cellule, che vengono contate dopo 14 giorni e rapportate alla popolazione cellulare di partenza, in modo da quantificarne la capacità clonogenica. Una popolazione cellulare omogenea si ottiene in genere dopo 3-5 settimane di coltura e questa è capace di proliferare senza differenziare spontaneamente fino a 40 generazioni. Le MSCs possono essere isolate ed espanse *in vitro* senza apparente modificazione del fenotipo e/o perdita di funzione.

Il secondo criterio interessa i marcatori di superficie, misurabili tramite analisi citofluorimetrica.

La caratterizzazione fenotipica delle MSCs rimane ancora un campo di approfondimento data la mancanza di un marcatore specifico per l'analisi e l'isolamento delle MSCs. Infatti, le MSCs sono prive di *markers* distintivi unici, così vengono individuate attraverso l'analisi di un complesso immunofenotipo, che comprende la mancanza di antigeni tipici delle cellule staminali emopoietiche, come il CD45, il CD34 ed il CD14, e l'espressione di una serie di molecole di superficie, come il CD90, chiamato anche Thy-1, il CD105 o endoglina; CD29 o subunità $\alpha 3$ del recettore per la fibronectina, il CD44 o recettore-III della matrice extracellulare ed il CD73 o SH3-SH4. Le MSCs, anche dopo espansione *in vitro*, mantengono l'espressione di antigeni di superficie come il CD105, CD90, CD73 e CD44. Questi marcatori sono risultati uniformemente e fortemente espressi sulle MSCs isolati da tessuti di diversa origine [33].

Lo studio del profilo immunofenotipico delle MSC rappresenta un buon approccio per la loro caratterizzazione. Tuttavia piccole differenze nell'espressione dei marcatori di superficie non sono sufficienti per distinguere eventuali sottopopolazioni di cellule staminali.

Il terzo criterio consiste nell'abilità delle MSC di differenziare in osteoblasti, adipociti e condroblasti, attraverso opportune condizioni di differenziamento *in vitro* (figura 5) [34].

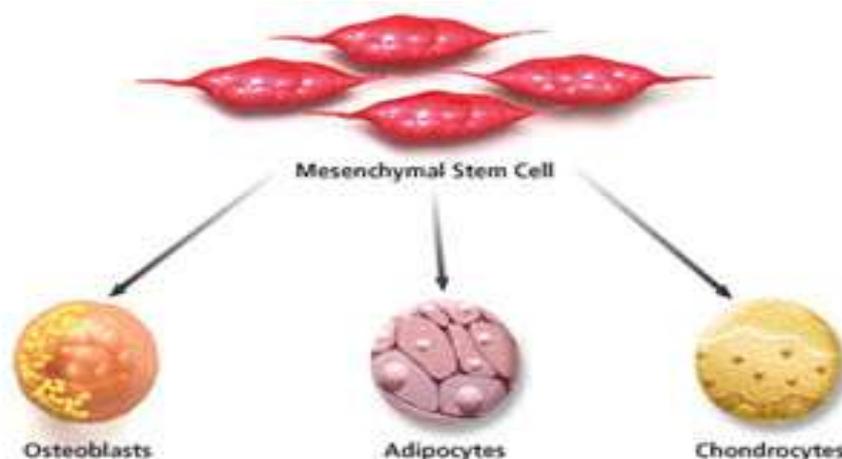


Figura 5: Differenziamento delle MSC nelle tre linee mesenchimali: osteogenica, adipogenica e condrogenica.

L'induzione al differenziamento, tramite terreni lineage-specifici in senso condrogenico, adipogenico e osteogenico, permette di caratterizzare ulteriormente la potenzialità mesenchimale delle MSC. Inoltre evidenze dimostrano che le MSC sono in grado di differenziarsi non solo in cellule di origine mesenchimale ma anche in miociti, epatociti e neuroni. Data la loro elevata potenzialità differenziativa e proliferativa, le cellule staminali mesenchimali rappresentano un importante strumento per la terapia cellulare e per la medicina rigenerativa. Nell'ambito della terapia cellulare sull'uomo le cellule staminali mesenchimali hanno dimostrato nella pratica clinica o in avanzati trial clinici il loro importante ruolo coadiuvante nel supporto dei trapianti di midollo osseo, nel trattamento dell'osteogenesi

imperfetta e in numerosi altri casi in cui non erano disponibili alternative terapeutiche.

In figura 6, sono descritti i pathway molecolari coinvolti nei diversi processi differenziativi:

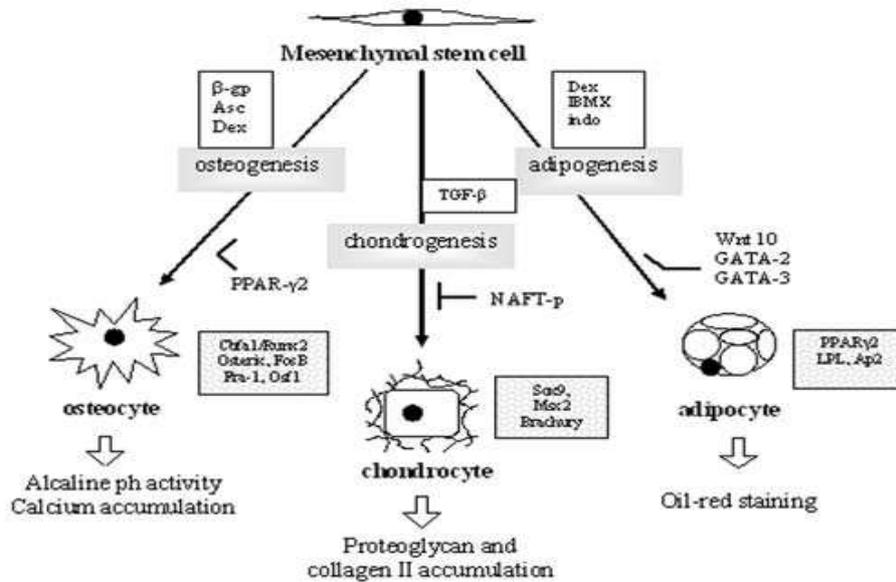


Figura 6: Pathway rappresentativo del differenziamento delle MSC nelle tre linee mesenchimali: osteogenica, adipogenica e condrogenica.

- Differenziamento osteogenico: prevede la partecipazione delle proteine dette BMPs [35]. Altri importanti fattori coinvolti sono: il TGF, l'IGF (*insulin-like growth factor*), la leptina e il PTHrP (*parathyroid hormone related peptide*). Tali molecole regolano la secrezione delle proteine della matrice e l'espressione di segnali necessari per il rimodellamento delle ossa attraverso l'attivazione degli osteoclasti. La progressione nell'osteogenesi può essere valutata mediante la misura dell'attività della fosfatasi alcalina e dell'accumulo di calcio [36].

- Differenziamento adipogenico: è accompagnato, inoltre, dall'espressione di specifiche proteine come PPAR γ 2 (*peroxisome proliferation-activated receptor γ 2*), LPL (protein lipasi), aP2 (proteine che legano gli acidi grassi). L'inibizione dell'adipogenesi è accompagnata dall'induzione di Wnt10b, GATA-2 e GATA-3 [37].

Il differenziamento in senso osteogenico e adipogenico è regolato dalle proteine BMPs (*bone morphogenetic proteins*). BMP-2 e bFGF giocano un ruolo fondamentale nel differenziamento in senso osteogenico delle MSC. Un blocco selettivo di BMPR-1R provoca il differenziamento in senso adipogenico; questo suggerisce che l'espressione di tale recettore è fondamentale per la formazione degli osteociti. Al contrario, l'over-espressione di BMPR-1 inibisce il differenziamento adipogenico e promuove quello osteogenico. Questo indica che il cambiamento nei livelli dei recettori BMP è un fattore intrinseco per la produzione di osteociti e adipociti. Inoltre, è stato dimostrato che PPAR γ 2 (fattore che promuove la formazione di adipociti) reprime il processo di osteogenesi.

- Differenziamento condrogenico: è regolato dalle proteine BMPs e CDMPs (*cartilage-derived morphogenetic proteins*), appartenenti alle proteine della famiglia TGF- β , che giocano un ruolo chiave durante il differenziamento condrogenico. Un ruolo regolatorio in tale processo è attribuito alle proteine della famiglia Wnt, in particolare Wnt-4 e Wnt-14 [38]. TGF- β promuove il differenziamento condrogenico mediante l'attivazione della via delle MAP kinasi (*mitogen-activated protein*) che comprende le proteine ERK-1, p38, PKC e Jun [39]. Alcuni studi hanno dimostrato che esiste un altro pathway (*Smad protein signaling*) coinvolto nel differenziamento condrogenico, che vede come protagonista il recettore FGF-3.

Entrambe le vie permettono l'attivazione di geni specifici come quelli dell'aggregano, del collagene II e del collagene XI.

Negli ultimi anni è stata indagata la capacità delle MSC di differenziare in senso miogenico. Da alcuni studi è emerso che le MSC isolate da cordone ombelicale sembrano in grado di originare cellule muscolari scheletriche. Recenti evidenze hanno dimostrato che le MSC derivate dalla placenta (PL-MS) sono in grado di differenziarsi *in vitro* in senso epatogenico. Inoltre, anche la membrana amniotica e la placenta umana si sono rivelati fonte di MSC, cellule che hanno dimostrato di essere in grado di differenziare in diverse linee cellulari, tra cui cellule endoteliali. Le MSC della placenta sono in grado di differenziarsi in neuroni, oligodendrociti e cellule della glia [40].

1.4.4 Fonte delle cellule staminali mesenchimali

Allo stato attuale il midollo osseo è la fonte più comunemente utilizzata per l'isolamento delle MSC (BMSC, Bone Marrow Stromal Cells), ma presenta alcune limitazioni quali la necessità dell'anestesia generale durante il prelievo, la sensazione dolorosa avvertita dal paziente nel post-operatorio e la scarsa resa cellulare [41]. E' generalmente accettato che le MSCs sono cellule relativamente rare nel midollo osseo ($1/10^5$ delle cellule nucleate), dotate di elevata capacità proliferativa senza trasformazione neoplastica, conservando le proprietà staminali [42,43]. Sono in grado di esprimere geni di origine embrionale, di sintetizzare molecole di contatto cellula-cellula e componenti della matrice extra-cellulare come il collagene e la fibronectina, di secernere citochine quali interleuchina IL-7, IL-8, IL-11, stem cell factor (SCF) e stromal-derived factor- 1 (SDF-1), attraverso cui viene regolata la mobilitazione dal midollo delle cellule staminali emopoietiche. Per questa

ragione le MSCs svolgono il ruolo essenziale di compartimento omeostatico delle cellule stromali midollari, rinnovando continuamente il microambiente necessario per l'emopoiesi. Infatti, le cellule staminali mesenchimali rappresentano una seconda popolazione di cellule che regola la sopravvivenza, proliferazione e differenziazione delle cellule staminali ematopoietiche.

L'utilizzo di MSCs da midollo osseo è limitato da due principali problematiche: la procedura invasiva del prelievo di midollo e l'esiguo numero di cellule staminali che si ottengono da ogni prelievo [44]. Per questo vengono ricercate fonti alternative come il tessuto adiposo, il sangue periferico, il cordone ombelicale ed i tessuti fetali. Queste cellule condividono, in vitro, molte delle caratteristiche delle MSCs da midollo osseo: l'aderenza alla plastica, la morfologia fibroblastoide, la formazione di CFU-F, alcuni markers superficiali ed il potenziale differenziativo in senso osteogenico, adipogenico e condrogenico in seguito ad appropriati stimoli.

1.4.5. Fonte alternativa di cellule staminali mesenchimali: tessuto adiposo

Il tessuto adiposo rappresenta una ricca e facilmente accessibile risorsa di cellule staminali adulte, che costituiscono una popolazione cellulare pluripotente che può differenziarsi in cellule di vari tessuti, derivati dalla linea mesodermica (cellule del tessuto osseo, adiposo, cartilagineo, cardiaco e muscolare) e non mesodermica (cellule neuron-like, cellule endoteliali, epatociti, cellule pancreatiche) [45].

Dai dati di bibliografia, le MSCs isolate da midollo osseo e tessuto adiposo non mostrano differenze nella morfologia simil-fibroblastica, immunofenotipo, capacità di isolamento, frequenza di unità formanti colonie e capacità differenziative. Dalla frazione vasculostromale del tessuto

adiposo è infatti possibile estrarre cellule staminali, che presentano caratteristiche fenotipiche e plastiche simili alle cellule staminali mesenchimali estratte da midollo osseo [46]. Questa frazione vasculostromale del tessuto adiposo è composta da cellule endoteliali CD34+/CD31+, da macrofagi, residenti o infiltrati, CD14+/CD31+, e da precursori degli adipociti CD34+/CD31 [47]. Generalmente, le MSCs da tessuto adiposo hanno un tempo di raddoppiamento di popolazione di 2-4 giorni, dipendente dall'età del donatore, dalla localizzazione (grasso omentale o grasso sottocutaneo), dal tipo di procedura chirurgica, dalle condizioni di coltura, dalla densità di semina e dalla composizione del terreno di coltura. La proliferazione delle MSCs da tessuto adiposo può essere stimolata da molti supplementi esogeni, come il *fibroblast growth factor 2* (FGF-2) tramite il suo specifico recettore, da *sphingosylphosphorylcholine* tramite l'attivazione di *c-jun N-terminal kinase* (JNK), *platelet-derived growth factor* tramite l'attivazione di JNK [48], e *oncostatin M* tramite l'attivazione di *microtubule-associated protein kinase* (MEK)/*extracellular signalregulated kinase* (ERK) e *JAK3/STAT1 pathway* [49]. Le MSCs da tessuto adiposo secernono alcuni fattori di crescita come il *vascular endothelial growth factor* (VEGF), l'*hepatocyte growth factor* (HGF), l'FGF 2, ed *insulin-like growth factor 1* (IGF-1) [50,51]. Inoltre, i livelli di VEGF ed HGF secreti dalle MSCs possono essere aumentati tramite l'esposizione delle cellule all'ipossia [52], a fattori di crescita, a fattori di differenziazione [53] o a *tumor necrosis factor* [54].

Pertanto, le cellule staminali mesenchimali prelevate da tessuto adiposo rappresentano delle ottime candidate per applicazioni cliniche nella medicina rigenerativa il cui obiettivo principale è la rigenerazione o la sostituzione dei tessuti biologici danneggiati da patologie o traumi, che viene raggiunto creando dei dispositivi bioingegnerizzati, chirurgicamente

impiantabili, integrando cellule, scaffold biocompatibili e fattori bioattivi (quali farmaci, citochine e fattori di crescita) in grado di promuovere la rigenerazione garantendo l'integrazione con i tessuti ospiti circostanti. Questa tecnologia trova grande applicazione in numerosi ambiti clinici come la dermatologia, la chirurgia plastica ricostruttiva, la chirurgia oro-maxillo-facciale e l'ortopedia.

1.5 Potenziali utilizzi clinici delle cellule staminali mesenchimali

Negli ultimi anni, le conoscenze relative all'identificazione e alla caratterizzazione delle MSCs umane sono significativamente aumentate [55]. Parallelamente, sono stati sviluppati vari protocolli di laboratorio per l'espansione ex-vivo delle MSCs ed è pertanto possibile studiare gli effetti delle MSCs in modelli di trapianto [56]. Numerosi studi preclinici e alcuni studi clinici sono attualmente in corso ed è prevedibile che nel volgere di alcuni anni verranno definitivamente chiarite la fattibilità e l'efficacia terapeutica del trapianto di MSCs e l'impatto di questo peculiare tipo cellulare sia nell'ambito del trapianto di midollo sia nella medicina rigenerativa [57,58]. Come detto precedentemente, le MSCs possono essere isolate a partire da aspirati midollari o da tessuto adiposo dal momento che sono cellule in grado di aderire alla plastica delle fiasche di coltura e quindi possono essere facilmente espanse a tempi successivi, generando monostrati di cellule aderenti. Le MSCs del midollo così isolate hanno capacità differenziativa multilineare essendo, infatti, capaci di generare – quando vengono create appropriate condizioni di coltura - progenitori di tipo osteoblastico, condrocitario, adipocitario, miocitario, endoteliale. Date le suddette proprietà "trans-differenziative", le MSCs sono

oggetto di fervido studio da parte dei ricercatori in particolare nell'ambito della terapia o medicina rigenerativa.

Nel campo della medicina rigenerativa, studi in vitro hanno dimostrato la capacità differenziativa delle cellule staminali in senso osseo mediante espansione delle MSCs al fine di riparare in vivo alcuni difetti tissutali [59,60]. MSCs di origine midollare sono state seminate su matrici extracellulari, come idrossiapatite, ed impiantate in vivo in topi immunodeficienti, ottenendo la formazione di tessuto osseo. Sono state messe a punto delle strategie di ingegneria tissutale basate sull'utilizzo di MSCs per indurre la differenziazione locale in cartilagine di precursori mesenchimali [61,62]. Le MSCs sono state usate in vivo per riparare difetti della cartilagine articolare in modelli animali dimostrando l'applicabilità, l'innocuità e la potenziale efficacia locale delle MSCs per la riparazione cartilaginea [63,64].

È stata studiata anche la possibilità d'indurre la differenziazione delle MSCs in tessuti connettivi diversi dall'osso e dalla cartilagine, come tendini e legamenti, nell'ottica della terapia cellulare rigenerativa. Numerosi studi hanno dimostrato la potenziale utilità della somministrazione di MSCs in malattie del sistema nervoso. E' stato osservato come l'impianto diretto delle MSCs nel muscolo striato di ratti anziani con deficit motori e cognitivi porti ad un miglioramento dell'attività motoria [65], mentre in modelli animali di morbo di Parkinson, di danno neurale ipoischemico e danno retinico è stato dimostrato un recupero funzionale dopo trapianto in vivo di cellule staminali nella sede della lesione [66]. Inoltre, la possibilità di modificare geneticamente le MSCs prima dell'inoculazione apre nuove prospettive per il loro uso come vettori cellulari di terapia genica in caso di deficit neurologici, danni da ischemia e gliomi cerebrali. Attraverso procedure di terapia genica, le MSCs possono essere utilizzate come veicoli per

l'espressione di geni codificanti per proteine deficitarie nell'individuo per cause genetiche o acquisite, o per molecole con attività terapeutica [67].

Negli ultimi anni è diventato chiaro che le MSCs posseggono spiccate proprietà immunoregolatorie. Le cellule staminali mesenchimali sono capaci di sopprimere reazioni immuni sia *in vitro* che *in vivo* in modo indipendente dal complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) [68,69]. È stato dimostrato un effetto immunosoppressivo delle MSCs attraverso un meccanismo che coinvolge l'inibizione paracrina della proliferazione delle cellule T e B. La capacità immunosoppressiva delle MSCs risulta presente in diverse specie animali, anche se con meccanismi solo parzialmente chiariti. In modelli murini è stata dimostrata la capacità inibitoria delle MSCs nei confronti di risposte antigene specifiche mediate da linfociti T. Inoltre, è stato dimostrato *in vivo* che le MSCs prolungano in modo significativo nel babuino la sopravvivenza di trapianti cutanei incompatibili dal punto di vista dell'MHC; riducono nell'uomo l'incidenza di GvHD quando co-trapiantate assieme alle cellule staminali emopoietiche; determinano la remissione completa delle manifestazioni cliniche della GvHD di grado IV refrattaria alla terapia immunosoppressiva, pur essendo aploidiche quando infuse in pazienti pediatrici sottoposti a trapianto di midollo per leucemia. La presenza di un'immunoregolazione così multiforme e complessa ha consentito di dimostrare che l'effetto inibitorio delle MSCs interessa praticamente tutte le popolazioni cellulari coinvolte nella risposta immunitaria, dai linfociti T, ai linfociti B, alle cellule NK ed alle cellule dendritiche di origine monocitaria. L'effetto immunoregolatorio è espresso non solo dalle MSCs, ma anche dalle cellule di derivazione mesenchimale più differenziate quali adipociti ed osteoblasti. Ad oggi l'esatto meccanismo responsabile dell'effetto immunoregolatorio delle MSCs rimane ancora sconosciuto ma considerata la loro capacità d'inibire risposte immuni

specifiche verso antigeni minori di istocompatibilità come HY [70,71], di prevenire l'insorgenza di GvHD (Graft Versus Host Disease) [72] se co-trapiantate assieme alle cellule staminali emopoietiche, e di spegnere completamente la GvHD di grado IV refrattaria alla terapia immunosoppressiva [73], le MSCs si candidano ad essere una strategia efficace per la prevenzione della GvHD in trapianti MHC-non correlati e per il trattamento di pazienti con forme resistenti di GvHD, altrimenti gravate da una mortalità altissima per complicanze infettive, soprattutto in caso di coinvolgimento intestinale.

Sono attualmente in corso sperimentazioni cliniche per stabilire la sicurezza di tale procedura, ma è facile prevederne a breve un utilizzo più ampio in quelle strutture trapiantologiche dotate di laboratori per la manipolazione cellulare per uso clinico. Le MSCs sono, inoltre, delle buone candidate per la terapia cellulare antitumorale. Queste cellule ingegnerizzate possono produrre molecole ad attività antineoplastica, rappresentando un possibile strumento efficace per una terapia antitumorale mirata con bassa incidenza di effetti collaterali. In conclusione, le cellule staminali hanno dimostrato una grande capacità di rigenerazione dei tessuti, di rimodulazione del sistema immunitario e posseggono, inoltre, una serie di altre qualità benefiche per l'organismo.

2 SCOPO DELLA TESI: RAZIONALE PER L'UTILIZZO IN STUDI CLINICI

2.1 Stato dell'arte

Negli ultimi anni il mondo scientifico ha riposto particolare attenzione verso la ricerca e lo sviluppo di una nuova categoria di prodotti medicinali basati su cellule, tessuti ed acidi nucleici, che stanno dimostrando un grande potenziale nel trattamento di numerose patologie.

Le cellule maggiormente utilizzate nella messa a punto di prodotti di terapia cellulare sono le cellule staminali adulte, cellule non specializzate che possono essere selezionate da vari tessuti dell'organismo e dotate della singolare capacità di differenziarsi, se stimolate opportunamente, in altri tipi di cellule del corpo. Le cellule staminali hanno dimostrato una grande capacità di rigenerazione dei tessuti, di rimodulazione del sistema immunitario e pare abbiamo molte potenzialità sfruttabili per le terapie cellulari; in particolare per patologie in cui non è stata ancora identificata una terapia risolutiva quali Parkinson, Alzheimer, malattie cardiache, disordini del sistema immunitario, Leucemie, AIDS, diabete, cancro.

Un tipo particolarmente promettente di cellule staminali adulte per la medicina rigenerativa sono le cellule staminali mesenchimali (MSC, Mesenchymal Stem Cell).

Si tratta di cellule immature con la capacità di autorinnovarsi e differenziarsi continuamente in cellule specializzate tessuto specifiche. Sono cellule di origine midollare ma si ritrovano anche nel tessuto adiposo, nel sangue periferico, nel cordone ombelicale, nel derma, nel pancreas, nel fegato, nel polmone ed in altri tessuti fetali. Attualmente il midollo osseo è la fonte più comunemente utilizzata per l'isolamento delle MSC (BMSC, Bone Marrow Stromal Cells), ma presenta alcune limitazioni quali la necessità

dell'anestesia generale durante il prelievo, la sensazione dolorosa avvertita dal paziente nel post-operatorio e la scarsa resa cellulare. Una fonte alternativa di MSC è stata individuata nel tessuto adiposo sottocutaneo, prelevabile mediante semplici interventi di liposuzione. I vantaggi dell'utilizzo di questo tessuto, normalmente considerato di scarto, sono il prelievo in anestesia locale, e la possibilità di ottenerne grandi quantità e, di conseguenza, un elevato numero di cellule Human adipose-derived stem cells (hASCs) (circa 500 volte superiore rispetto al midollo osseo). Le hASCs presentano un profilo immunofenotipico molto simile a quello osservato nelle cellule staminali mesenchimali derivate da midollo osseo (human bone marrow mesenchymal stem cells, hBM-MSC), in quanto positive a marcatori mesenchimali, quali CD29, CD44, CD73, CD90 e CD105, ma negative a marcatori endoteliali (CD31), ematopoietici (CD14, CD45 e CD34) e a molecole di adesione (CD106).

Molti studi hanno confermato anche la multipotenza delle cellule mesenchimali che in presenza di adeguati stimoli sembrerebbero avere la capacità di differenziarsi sia in vivo che in vitro in diversi tipi cellulari quali adipociti (con formazioni di vacuoli citoplasmatici contenenti lipidi), osteoblasti (con depositi di cristalli di idrossipatite), condrociti (con sintesi di matrice cartilaginea) e cellule muscolari (ricche di miotubuli).

Già Caplan nei primi anni '90, propose e anticipò che le MSC avrebbero avuto la capacità di differenziarsi in una grande varietà di tessuti mesodermali. In accordo con questo concetto, le MSC sono state proposte come fonte di cellule "staminali" nella medicina rigenerativa.

In questo ultimo decennio sono stati eseguiti numerosi studi che dimostrano l'utilità delle MSC in diverse applicazioni cliniche come la neurogenesi, l'osteogenesi, la riparazione cardiaca, il trattamento della GVHD (Graft Versus Host Disease) sebbene le basse percentuali di

attecchimento di queste cellule non sembrerebbero giustificare il loro effetto benefico.

Pertanto, come suggerito da Horwitz & Dominici (2008) in un commentary su Cytotherapy, le MSC sembrerebbero agire più secondo un effetto paracrino e potrebbero avere diverse applicazioni nella terapia cellulare essendo in grado di:

- differenziarsi in cellule mature e popolare il tessuto dove risiedono
- secernere citochine o altri mediatori solubili in grado di modificare il microambiente in cui si trovano
- svolgere la funzione di veicolare le proteine

Quindi, l'evidenza più attuale sarebbe che la notevole attività biologica intesa come secrezione di marker solubili dopo l'infusione sistemica delle MSC, supplirebbe alla scarsità di attecchimento locale e ciò implicherebbe almeno due cose:

1. il tessuto scelto come sorgente delle MSC può essere importante nel determinare l'attività biologica, ovvero diversi tessuti di origine possono generare MSC con differenti profili di espressione di citochine; pertanto, possono fornire MSC più idonee per specifiche applicazioni cliniche

2. l'isolamento e le condizioni di espansione in coltura possono influire considerevolmente sull'espressione genica, riprogrammando la bioattività delle cellule. Tali condizioni includono la densità di semina, il mezzo di coltura, il siero e le citochine aggiunte. Diventa perciò importante standardizzare le condizioni di coltura ed espansione nonché la caratterizzazione immunofenotipica delle MSC prima dell'utilizzo clinico. Studi del profilo genico di MSC derivate da tessuti diversi dimostrano ancora una volta un diverso pattern di espressione

genica suggerendo l'esistenza di sottopopolazioni funzionalmente diverse di MSC in relazione alla sorgente tissutale.

Le cellule mesenchimali staminali, grazie alla loro capacità immunomodulatoria, possono essere impiegate ad uso terapeutico e rappresentano delle ottime candidate per applicazioni cliniche nella medicina rigenerativa il cui obiettivo principale è la rigenerazione o la sostituzione dei tessuti biologici danneggiati da patologie o traumi, che viene raggiunto creando dei dispositivi bioingegnerizzati chirurgicamente impiantabili, integrando cellule, scaffold biocompatibili e fattori bioattivi (quali farmaci, citochine e fattori di crescita) in grado di promuovere la rigenerazione tissutale garantendo l'integrazione con i tessuti ospiti circostanti.

Questa tecnologia trova grande applicazione in numerosi ambiti clinici come la dermatologia, la chirurgia plastica ricostruttiva, la chirurgia maxillo-facciale e l'ortopedia.

Considerata la potenzialità delle hMSC, il lavoro svolto si propone di valutare l'idoneità del tessuto adiposo umano come fonte di cellule staminali mesenchimali, analizzando dapprima le caratteristiche delle hASCs allo stato indifferenziato e successivamente inducendo il differenziamento delle hASCs verso la linea osteogenica come modello per una futura applicazione clinica. Queste popolazioni cellulari potranno anche in seguito essere utilizzate come modelli di studio in vitro per nuovi prodotti di medicina rigenerativa.

2.2 Descrizione del processo

Il processo prima di poter passare alla produzione in GMP è stato preceduto da fasi preliminari volte allo studio e messa a punto del protocollo sperimentale da impiegare (Figura 7).

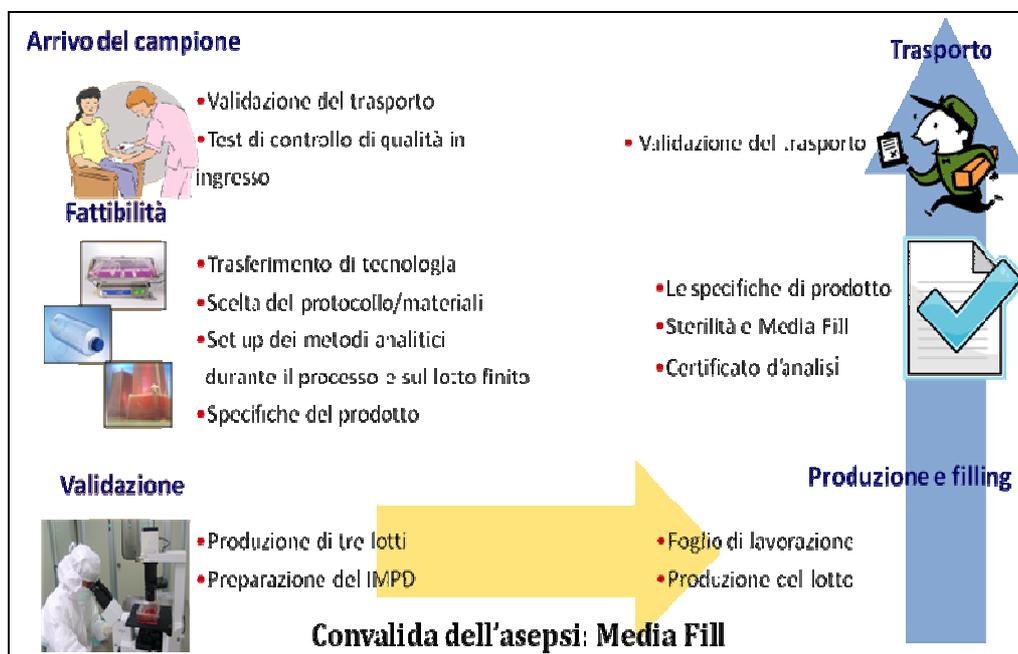


Figura 7: Cartoon rappresentativo del tipico flusso che segue un processo per passare dalla ricerca alla clinica.

All' arrivo del campione, dopo aver valutato l'integrità e la corrispondenza del materiale di partenza, sono state eseguite prove di produzione per la definizione del protocollo sperimentale da impiegare in ogni fase del processo: digestione enzimatica del tessuto di partenza, isolamento ed espansione delle cellule mesenchimali staminali, valutazione della capacità proliferativa e caratterizzazione delle MSCs analizzando i parametri di *identity* e *purity* mediante analisi immunofenotipica della popolazione cellulare in coltura, *potency* tramite test di differenziamento in altro lineage,

e *safety* mediante studi di mantenimento del cariotipo nei diversi passaggi in coltura.

Al termine dello studio di fattibilità, effettuato per definire il protocollo da impiegare e le specifiche di prodotto, è stato possibile effettuare la validazione del processo, dall'arrivo del campione al rilascio del lotto, mediante la produzione dei lotti di convalida e la successiva stesura della domanda di approvazione per la sperimentazione clinica da presentare all'Istituto Superiore di Sanità.

2.3 Studio di fattibilità

Lo scopo dello studio di fattibilità è definire il protocollo sperimentale da impiegare al fine di redigere il foglio di lavorazione necessario per poter eseguire la convalida del processo, passaggio fondamentale per la futura produzione di lotti di cellule per il trattamento dei pazienti in studi clinici.

Campioni di tessuto adiposo sono stati digeriti enzimaticamente e le cellule selezionate sono state seminate in coltura ed espanse. Durante il processo di espansione, sono stati valutati i parametri di vitalità e crescita cellulare, stabilità genetica e immunofenotipo. Dall'analisi dei dati ottenuti, tutti i campioni analizzati hanno mostrato una proliferazione cellulare sufficiente a raggiungere il numero di cellule necessario per la terapia, una corretta espressione dei marcatori valutata mediante FACS, e nessun tipo di mutazioni cromosomiche.

Inoltre è stata valutata anche la capacità delle cellule mesenchimali di differenziarsi in senso osteogenico confermando la potenzialità delle cellule mesenchimali di differenziare in cellule progenitrici e "committed".

Il protocollo di manipolazione ed espansione del tessuto è quindi risultato idoneo e trasferibile in GMP.

2.3.1 Ricevimento del campione

Per la fase di fattibilità dello studio clinico sono state analizzate cellule hASC (human Adipose derived Stem Cells) isolate da tessuto adiposo sottocutaneo prelevato mediante interventi di liposuzione da 6 donatori, di età compresa fra i 24 e i 67 anni, opportunamente informati e che hanno sottoscritto il consenso all'utilizzo di tale materiale biologico per ricerca.

I campioni di tessuto, di peso variabile fra i 1.85 e i 4.05 gr per ciascun donatore, e provenienti dallo stesso distretto corporeo (addome) sono pervenuti sterilmente in tempi differenti e sono stati identificati con un codice numerico per ciascun paziente (Tabella 3).

CAMPIONE	CERTIFICAZIONE DEL CAMPIONE	PESO (g)	CARIOTIPO	MANTENIMENTO DELL'ASEPSI (SOLUZIONE DI TRASPORTO)
DONATORE 1	CONFORME	2,51	46, XY	STERILE
DONATORE 2	CONFORME	2,19	46, XY	STERILE
DONATORE 3	CONFORME	3,19	46, XX	STERILE
DONATORE 4	CONFORME	3,41	46, XY	STERILE
DONATORE 5	CONFORME	4,05	46, XX	STERILE
DONATORE 6	CONFORME	1,85	46, XY	STERILE

Tabella 3: Tabella riassuntiva delle caratteristiche dei campioni pervenuti dalla clinica.

Nella fase preliminare sono stati preparati contenitori sterili e apirogeni contenenti la soluzione di trasporto Alpha-MEM addizionato di FBS 10%, conservata alla temperatura di 2-8°C, dove è stata in seguito depositata la biopsia del tessuto adiposo.

2.3.2 Controlli sul materiale in ingresso

Al momento del ricevimento in Areta dei campioni, il Controllo di Qualità ha verificato l'integrità dell'imballo esterno, l'integrità dei campioni, la corrispondenza fra quanto riportato sull'etichetta del campione e i documenti allegati, la presenza di eventuali evidenze di contaminazione, la presenza della data di prelievo e la presenza di etichetta recante codice identificativo del donatore.

Viene, inoltre, verificato che non sia intercorso un tempo superiore alle 72 ore dalla data di spedizione.

Rispettate tutte le verifiche, il campione è stato accettato con riserva e conservato alla temperatura di 2-8°C.

L'invio dei campioni deve essere accompagnato da certificati che attestino:

- la provenienza da un donatore vivo
- la corretta tracciabilità del campione e la verifica della corrispondenza fra numero del donatore riportato sui certificati e sulla etichetta presente sul campione stesso
- la certificazione medica di esclusione di anamnesi comportamentale e medica del donatore
- l'assenza di malattie ad eziologia sconosciuta
- l'assenza di manifestazioni di patologie maligne attuali o precedenti
- l'assenza di infezioni sistemiche, malattie batteriche e infezioni sistemiche virali, fungine e parassitarie riscontrate al momento della donazione

- l'assenza di vaccinazioni recenti con virus attenuati da parte del donatore
- l'assenza di xenotrapianti da parte del donatore
- l'assenza di possibili ingestione o esposizione a sostanze quali cianuro, piombo, mercurio, oro da parte del donatore
- la valutazione del rischio di trasmissioni causate da prioni:
 - donatori a cui è stata diagnosticata la malattia di Creutzfeldt-Jacob
 - donatori con anamnesi di demenza a degenerazione rapida
 - donatori che ricevono ormoni derivanti dall'ipofisi umana
 - donatori che hanno ricevuto innesto di cornea, sclera e dura madre oppure che hanno ricevuto interventi chirurgici non documentati nei quali può essere stata utilizzata dura madre
- la valutazione del rischio sulla base dei viaggi effettuati dal donatore
- i risultati dei seguenti test biologici:
 - HIV 1 e 2 - Anti HIV 1 e 2
 - Epatite B HbsAg - Anti-HBc
 - Epatite C – Anti –HCV Ab
 - Sifilide

I risultati devono provenire da un laboratorio riconosciuto dall'autorità competente dello Stato membro come centro di analisi, che utilizza dispositivi di diagnosi con marchio CE. I test devono essere eseguiti sul siero o sul plasma del donatore.

Prima di procedere al processamento del campione, effettuato entro 48 ore all'atto del ricevimento del campione tissutale di partenza, è stata effettuata l'analisi dell'assenza di Micoplasma sul materiale in ingresso.

2.3.3 Micoplasma

Il micoplasma, rilevato la prima volta nelle colture cellulari da Robinson et al. nel 1956, fa parte di una classe di batteri, la cui natura rimase ignota per un considerevole lasso di tempo. La scoperta "del tutto casuale" avvenne durante lo studio degli effetti del micoplasma sulle cellule HeLa, in cui si scoprì che le stesse colture cellulari di controllo erano già contaminate da micoplasma.

Le cellule di questi batteri (gram negativi) sono immobili, molto delicate e deformabili, perché prive di parete cellulare. In virtù di questa loro caratteristica morfologica sono resistenti agli antibiotici che agiscono sulla parete cellulare quali beta lattamici e glicopeptidi. È difficile descrivere la forma cellulare del micoplasma, poiché essa varia a seconda della tecnica di coltura e del metodo con cui vengono esaminate le cellule al microscopio. Su terreno solido, le cellule appaiono appiattite; nelle colture liquide, si osservano spesso forme irregolari, con ramificazioni e prolungamenti filiformi. I micoplasmi hanno un diametro da 0.3 a 0.8 μm e possono condurre una vita parassitaria strettamente adesi alle membrane plasmatiche di cellule vegetali o animali. Grazie a queste caratteristiche morfologiche il micoplasma può crescere ad elevate densità nelle colture cellulari (da 10^7 a 10^9 unità formanti colonie (cfu/ml) senza segni visibili di contaminazione come la torbidità, cambio del pH o effetti citopatici. La tipica colonia micoplasmatica è rotonda con un bordo ben definito. All'incirca il diametro è di 100 μm ma potrebbe variare da 10 a 600 μm . Le colonie esibiscono una zona centrale piuttosto densa e una periferia traslucida; la maggiore densità dell'area centrale è dovuta soprattutto alla crescita in agar.

Le caratteristiche principali che differenziano un micoplasma da un batterio sono la mancanza della parete cellulare e quindi anche di un suo tipico amminoacido quale l'acido diamminopimelico. Inoltre anche la membrana cellulare mostra differenze più biochimiche che strutturali essendo una membrana lipoproteina trilaterale con contenuto di steroli di cui i batteri in genere sono privi. Sono inoltre dotati di un notevole polimorfismo strutturale ossia in grado di assumere molte forme diverse tra loro e sono stati per questo raggruppati nella classe dei *Molliculites*. Il citoplasma contiene regioni a diversa opacità con regioni meno più o meno scure dove si trovano addensamenti di ribosomi, non vi è presenza di mesosomi, né di membrana nucleare. Dal punto di vista metabolico non sono in grado di sintetizzare amminoacidi, steroli e i precursori degli acidi nucleici; ciò è dovuto anche alla ridotta dimensione del cromosoma ($5-10 \times 10^5$ dalton) che è il più piccolo cromosoma conosciuto tra organismi capaci di replicarsi indipendentemente ed è anche uno dei più piccoli fra gli esseri viventi. Il DNA è a doppia elica circolare, povero in GC (23-40%), codificante mediamente per circa 700 proteine e molti genomi di micoplasma sono stati completamente sequenziati. Si riproducono per scissione binaria e raramente per gemmazione nel qual caso la gemma può non contenere un genoma completo. Sono noti due generi patogeni per l'uomo *Mycoplasma* e *Ureaplasma*, quest'ultimi in grado di utilizzare l'urea.

I *Mycoplasma* patogeni sono rappresentati dalla specie *M.pneumoniae*, *M.salivarum*, *M.hominis*, *M.genitalium*, *M. orale* e *M.incongitus*, mentre sono una specie nota tra gli *Ureaplasma*, l' *U.urealyticum*.

Le contaminazioni da micoplasma sono ancora le più diffuse a causa delle loro caratteristiche combinate alle loro capacità di alterare i parametri e le funzioni cellulari. Infatti, nonostante i progressi nei metodi di rivelazione, il

tasso di contaminazione da micoplasma non è visibilmente cambiato dalla loro prima rivelazione nelle colture cellulari.

Le principali fonti di contaminazione nelle colture cellulari sono:

- il personale di laboratorio
- il siero bovino o altre componenti dei terreni di coltura
- la tripsina
- la contaminazione proveniente dagli incubatori

In genere l'inizio di una contaminazione micoplasmatica coincide con l'introduzione in laboratorio di una coltura cellulare contaminata. I micoplasmi vengono poi amplificati durante la propagazione cellulare. Infatti spesso le diverse linee cellulari contaminate in un laboratorio sono infettate dalla stessa specie di micoplasma. Le specie di micoplasma, appartenenti ai generi *Mycoplasma* e *Acholeplasma*, maggiormente coinvolte nella contaminazione del 98% delle colture cellulari sono: *Acholeplasma laidlawii*; *Mycoplasma arginini*; *Mycoplasma Hyorhinis*; *Mycoplasma orale*; *Mycoplasma salivarium*; *Mycoplasma dominus*.

La rimozione dei micoplasmi non può essere effettuata mediante filtrazione sterilizzante a causa delle ridotte dimensioni dei micoplasmi, capaci di attraversare i pori a 0.22 µm delle membrane filtranti.

Inoltre, trattandosi di coltura cellulare, queste non possono essere filtrate per definizione, né possono essere sterilizzate con altre tecniche (es. radiazione sterilizzante). L'unico sistema per rimuovere il micoplasma è l'uso di farmaci. Infatti, il micoplasma è resistente ad alcuni antibiotici mentre è suscettibile alla gentamicina e alla ciprofloxacina.

Il micoplasma aderisce al vetro, alla plastica e anche alle cellule. Il micoplasma influenza le procedure per la fusione cellulare e interagisce

con i linfociti, svolge attività tossica per le cellule mediante l'escrezione di tossine e attraverso la modificazione del DNA cellulare, compete con le cellule per i nutrienti influenzandone la crescita. Pertanto, è fondamentale prevenire la crescita del micoplasma monitorando le linee cellulari al momento dell'ingresso in laboratorio e mantenendo sotto controllo continuo tutte le cellule in coltura.

2.3.4 Test del micoplasma

I metodi di rivelazione del micoplasma accettati e decritti dalla Farmacopea Europea 7.0 (Paragrafo 2.6.7) sono:

- Il metodo colturale
- La tecnica di amplificazione degli acidi nucleici (NAT)

Il metodo colturale è effettuato utilizzando una quantità sufficiente sia di terreno liquido che solido, per assicurare la crescita nelle condizioni di incubazione scelte di un piccolo numero di micoplasmi, di diverse specie, che potrebbero essere presenti nel prodotto da esaminare. Il terreno liquido deve contenere il rosso fenolo. Durante l'esecuzione del test vengono utilizzati come controlli positivi: *Acholeplasma laidlawii*; *Mycoplasma gallisepticum*; *Mycoplasma hyorhinis*; *Mycoplasma orale*; *Mycoplasma pneumonite*; *Mycoplasma synoviae*.

Il prodotto viene prima inoculato nel terreno liquido e incubato per 20-21 giorni. Se il pH del terreno vira si riporta al valore originale mediante aggiunta di sodio idrossido (NaOH) o acido idroclorico (HCl). Il prodotto da esaminare viene anche inoculato in piastre di terreno solido e incubato per 14 giorni. Il controllo negativo consiste nella semina di terreno liquido non inoculato su una piastra di agar. Successivamente tra il secondo e terzo giorno, tra sesto e ottavo, tra tredicesimo e quindicesimo e tra diciannovesimo e ventunesimo giorno, il terreno liquido di ogni subcultura

viene seminato in piastre di terreno solido. Se il terreno liquido mostra contaminazioni batteriche o fungine, il test è invalidato. Il test è valido se almeno una piastra per terreno e per giorno d' inoculo può essere letta al microscopio.

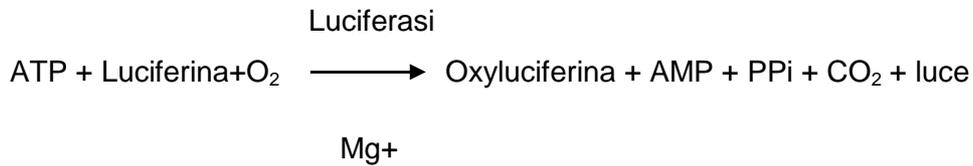
Il NAT potrebbe essere usato per la rivelazione del micoplasma mediante l'amplificazione di acidi nucleici estratti dal campione da testare con specifici primer, che rivelano la presenza del target. Il NAT indica la presenza di una sequenza di acidi nucleici particolare ma non necessariamente del micoplasma. Il NAT potrebbe essere usato come alternativa al metodo in coltura dopo un'attenta validazione e può essere applicato in presenza di materiale citotossico, dove è necessario un metodo rapido. Per valutare l'arricchimento di colture cellulari mediante NAT, il campione da testare e il substrato cellulare appropriato sono coltivati insieme per un determinato periodo; poi gli acidi nucleici estratti dalle cellule e dal soprannatante vengono usati per la rivelazione con il NAT. Nonostante questi metodi siano consigliati dalla Farmacopea, vi sono altri test per il riconoscimento del micoplasma, in particolare la PCR e un metodo basato sulla chemiluminescenza.

Il test in chemiluminescenza è una procedura rapida, semplice da eseguire ed economica, quindi permette di effettuare controlli più frequenti su più prodotti contemporaneamente. Il test viene eseguito su soprannatanti cellulari; dopo la lisi del micoplasma, gli enzimi micoplasmatici presenti reagiscono con un particolare substrato che permette la conversione di ADP in ATP, il quale viene rilevato mediante una reazione di luminescenza. La quantità di ATP rilevata indica la presenza o meno del micoplasma.

Per rilevare l'assenza/presenza del micoplasma nei campioni da processare è stato applicato il metodo basato sulla chemiluminescenza mediante l'utilizzo di un kit commerciale MycoAlert (Lonza cod. LT07-118).

I mycoplasmi vitali presenti nella cultura sono lisati e gli enzimi reagiscono con il substrato catalizzando la conversione di ADP in ATP. Se gli enzimi sono presenti, reagendo con il substrato, permettono un aumento del livello di ATP.

Questo aumento può essere rilevato secondo la seguente reazione bioluminescente:



L'intensità della luce emessa è proporzionale alla concentrazione di ATP ed è misurata utilizzando un luminometro. Il rapporto tra la quantità di ATP in un campione prima e dopo l'aggiunta di MycoAlert Substrate indica la presenza o l'assenza di micoplasma. Se gli enzimi del micoplasma sono assenti la seconda lettura non mostra un aumento significativo (<1) rispetto alla prima lettura e il campione è negativo. Se gli enzimi del micoplasma sono presenti la seconda lettura mostra un aumento significativo (>1) rispetto alla prima lettura, e il campione è positivo. Se il risultato del rapporto Lettura B/lettura A è compreso nel range 0,9-1,3 il campione è dubbio si aspettano altre 24-48 ore e si ritesta il soprannatante cellulare.

Se non vengono rilevate contaminazioni da micoplasma si ha, inoltre, un sufficiente grado di sicurezza di assenza di altre contaminazioni dovute alla manipolazione del prodotto.

In caso di positività al micoplasma di una coltura in produzione è necessario isolare le colture inquinate ed identificarne le cause e le conseguenze. Gli incubatori e le cappe dove è stata manipolata la suddetta coltura vengono sterilizzati e dopo la pulizia, l'assenza di micoplasma viene

monitorata mediante test specifici. Tutti gli strumenti venuti a contatto restano fuori uso fino alla verifica dell' assenza di contaminazioni.

Dall'analisi dei risultati del test del micoplasma nei campioni pervenuti (vedi tabella x), due campioni (donatore 3 e 5) sono risultati positivi e pertanto sono stati eliminati. Gli altri 4 campioni sono stati processati in quanto risultati negativi.

2.3.5. Digestione enzimatica del tessuto di partenza

I campioni di lipoaspirato addominale, in quantità variabile per ciascun donatore, sono stati lavati in DPBS e subito processati mediante digestione enzimatica con Collagenasi NB1 Premium Grade (Lonza cod. SE 1745503), alla concentrazione del 60% in terreno base HSSB (Lonza cod. BE10-527F) per 60 minuti, in agitazione lenta a 37°C.

Dopo il blocco dell'azione della collagenasi con l'aggiunta di terreno α DMEM completo (Lonza cod. BE12-169F) contenente FBS 10% e glutammina 2mM, la sospensione cellulare è stata centrifugata a 1500 rpm per 5 minuti. Il pellet ottenuto è stato risospeso delicatamente con una soluzione di Red Blood Cell Lysis Buffer per eliminare i globuli rossi presenti.

La sospensione è stata ulteriormente centrifugata e il pellet ottenuto contenente le cellule staminali mesenchimali, è stato risospeso in terreno di crescita completo e filtrato su filtro con pori di 100 μ m per eliminare i detriti tissutali grossolani non ben digeriti.

La resa cellulare, dopo la digestione e prima della semina, è risultata elevata (200.000-400.000 cellule totali/grammo di tessuto) e si è osservata una variabilità inferiore al 5% tra i vari campioni. Le cellule risospese sono state seminate in fiasche per coltura cellulare e poste in un termostato a 37°C con una concentrazione di CO₂ pari al 5%.

Ogni 24-48 ore, il terreno della coltura cellulare è stato rinnovato. Dopo solo pochi giorni dalla digestione enzimatica e successiva semina in fiasca, le hASCs appaiono una popolazione omogenea di tipica forma fibroblastoide (Figura 8).

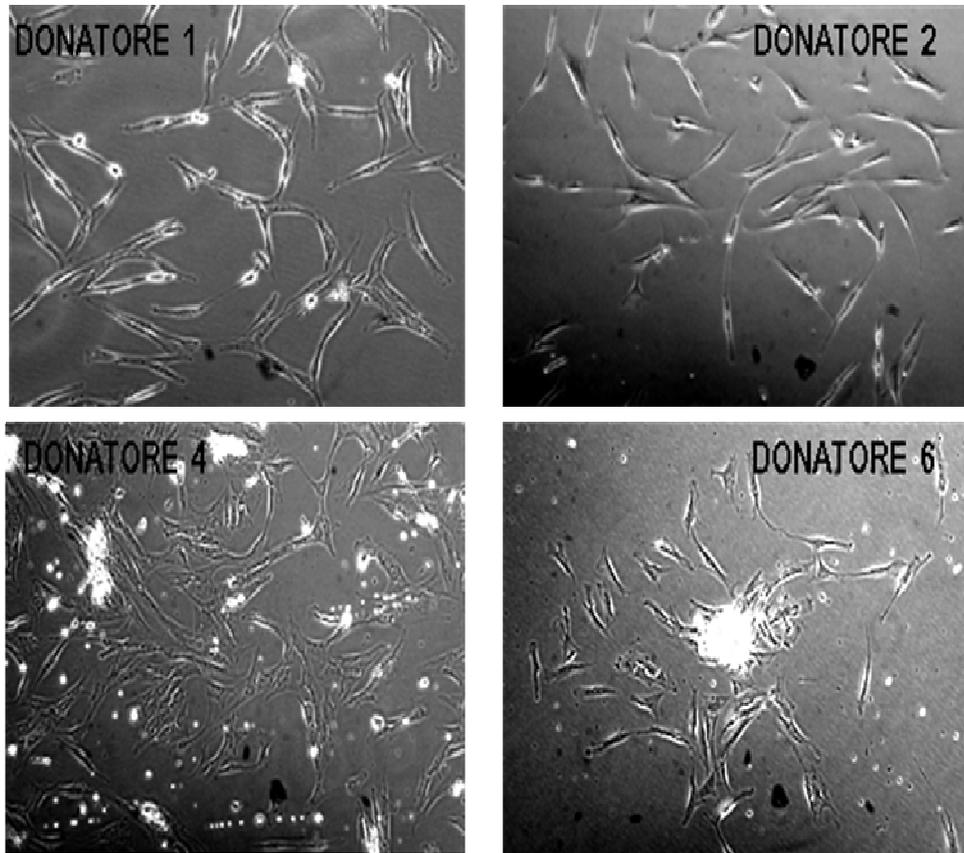


Figura 8: Immagini al microscopio della morfologia delle cellule mesenchimali da tessuto adiposo provenienti dai differenti campioni analizzati dopo pochi giorni dalla semina in piastra.

Al raggiungimento della confluenza 80-90%, le cellule sono state lavate con DPBS, staccate dalla fiasca mediante trattamento con tripsina, centrifugate per 5 minuti a 1500 rpm e seminate nuovamente in fiasca ad una nota densità cellulare (circa $2 \cdot 10^3$ cellule/cm²) in modo da valutare la capacità proliferativa della stessa coltura a distanza di vari giorni dalla semina.

Ad ogni passaggio, viene effettuata una conta cellulare così da poter allestire una curva di crescita e seguire l'espansione in vitro delle differenti colture cellulari.

2.3.6 Espansione cellulare

La capacità delle cellule staminali mesenchimali di essere mantenute ed espanse in coltura è stata quantificata in termini di tempo (giorni) e numero di passaggi sulle colture in cui sono state determinate le curve di crescita e il tempo di duplicazione cellulare.

Per stimare il tempo di duplicazione, le colture cellulari, derivate dai differenti campioni di tessuto adiposo, sono state contate e seminate ad una densità nota e lasciate proliferare fino a confluenza. Cellule confluenti sono state staccate mediante trattamento con tripsina, contate e riseminate, fino al raggiungimento della fase di plateau. Le cellule sono state contate tramite l'utilizzo del Nucleocounter (Chemotec A/S DK 3450 Allerod). Il test viene eseguito su un campione prelevato dopo ogni passaggio di splitting.

Il Nucleocounter rappresenta un metodo di conta cellulare automatizzato basato sull'uso di un sistema di microscopia a fluorescenza. La sospensione cellulare viene caricata in un dispositivo monouso (Nucleocassetta) contenente ioduro di propidio che interagisce chimicamente con il DNA. In questo modo, in un campione non trattato, i nuclei delle cellule morte, permeabili al colorante, risulteranno marcati e

potranno essere contati dal sistema a fluorescenza. Il valore che apparirà sul display corrisponde al numero di cellule morte per ml. Per poter misurare il numero di cellule totali è necessario sottoporre preventivamente il campione ad un trattamento di lisi aggiungendo un uguale volume di Reagent C.

Il Reagent C provoca la disgregazione delle membrane ed è in grado di ripristinare il valore di pH che consente allo ioduro di propidio di legarsi al DNA con maggiore efficienza. Per ottenere il numero di cellule totali presenti nel campione è necessario moltiplicare il valore apparso sul display per il fattore di diluizione.

Il numero di cellule vive è calcolato come differenza tra il numero di cellule totali ed il numero di cellule morte. Il range di misura dello strumento è compreso tra $5 \times 10^3 - 10^7$ cellule/ml.

Per stimare l'andamento della crescita, sono stati allestiti grafici che riportano, rispettivamente:

- il numero di cellule vitali in relazione ai giorni di coltura (Figura 8)

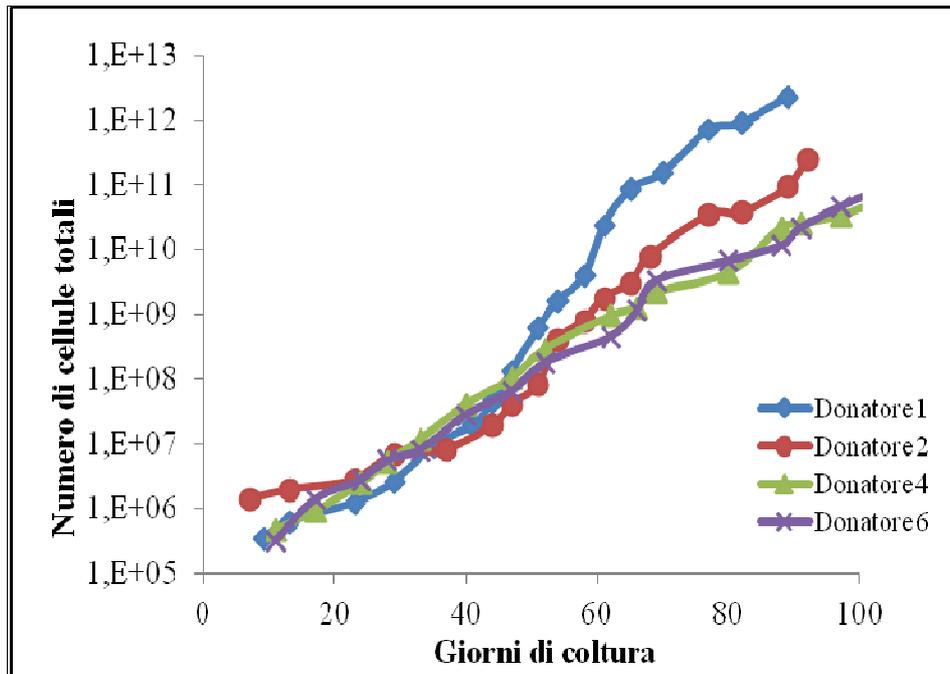


Figura 8. Rappresentazione grafica della crescita cellulare di 4 colture di MSCs isolate da differenti campioni di lipoaspirato.

- il numero di duplicazioni (population doublings) in relazione al numero di passaggi applicando la seguente formula:

$$P_d = \log (Q_2/Q_1)/\log 2$$

- il tempo di duplicazione (in ore) in relazione al numero di passaggi, applicando la seguente formula:

$$T_d = (t_2 - t_1) * \log 2 / \log (Q_2/Q_1)$$

dove P_d è il numero di duplicazioni, T_d è il tempo di duplicazione, t_1 e t_2 sono i tempi (in ore) della conta e Q_1 e Q_2 il numero di cellule ai due diversi tempi (Figura 9).

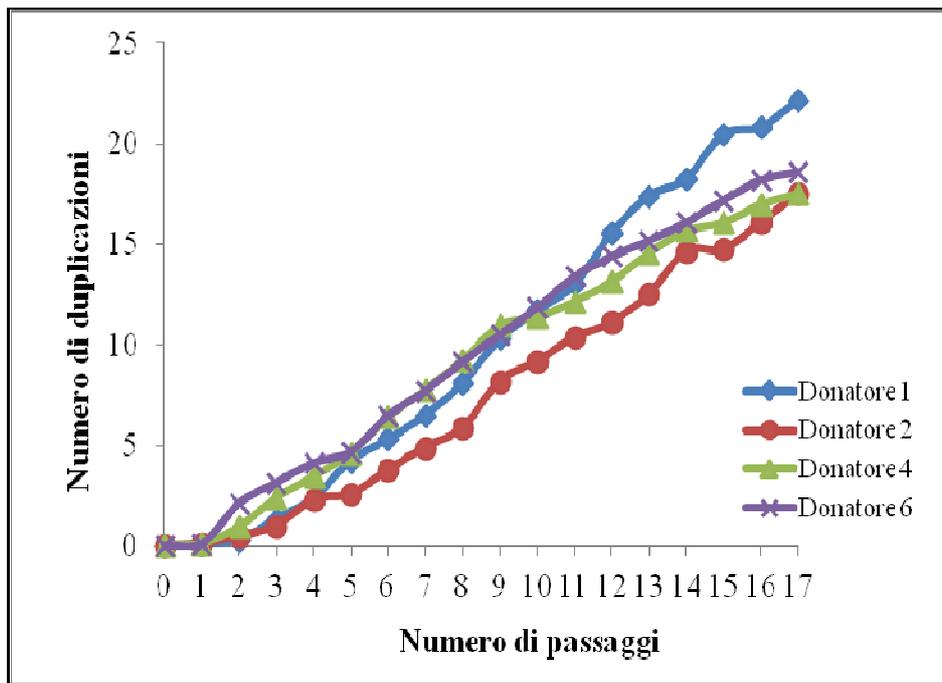


Figura 9. Rappresentazione grafica del numero di duplicazioni totali (CPD = Cumulative Population Doublings) di 4 colture di MSCs isolate da differenti campioni di lipoaspirato.

Dalle curve di proliferazione, ricavate dalle conte ad ogni passaggio, si è riscontrato un andamento pressoché simile nei primi 40 giorni (Figura 8) corrispondente al tempo di interesse per la preparazione della quantità di cellule necessaria allo studio. Una maggiore disomogeneità si è osservata nei passaggi più tardivi (Figura 9).

2.3.7 Prove di crioconservazione

Una nota quantità ($1,5 \times 10^6$ cellule totali) di cellule mesenchimali raccolte durante l'espansione del campione proveniente dai donatore 1 e 3 sono state congelate al 4° passaggio di coltura in un adeguato terreno di congelamento (10% DMSO e 90% siero bovino fetale). A distanza di un mese dal congelamento, la popolazione cellulare è stata scongelata e le cellule sono state seminate in una fiasca T25 nel terreno di coltura.

Al raggiungimento della confluenza il campione è stato splittato in tre fiasche T25 alla stessa concentrazione cellulare e sono stati valutati i seguenti parametri:

- concentrazione e vitalità cellulare
- marker di staminalità mediante analisi citofluorimetrica
- capacità differenziativa verso la linea osteogenica
- analisi del cariotipo

CAMPIONE	DONATORE 1	DONATORE 2	DONATORE 4
<i>TEST</i>	<i>RISULTATI</i>	<i>RISULTATI</i>	<i>RISULTATI</i>
CONCENTRAZIONE CELLULARE (cells/mL) AL 5° PASSAGGIO	3.8 *10 ⁶	4.2 *10 ⁶	3.4 *10 ⁶
VITALITA'	95%	96%	98%
TEST DI POTENCY	Positivo	Positivo	Positivo
FENOTIPO	CD34 1% CD44 =78 % CD73 = 74 % CD90 = 96 % CD105 = 91%	CD34 NEGATIVO CD44 =73 % CD73 = 72% CD90 = 95 % CD105 = 92%	CD34 2% CD44 =75 % CD73 = 70% CD90 = 97 % CD105 = 91%
CARIOTIPO	Assenza di anomalie cromosomiche	Assenza di anomalie cromosomiche	Assenza di anomalie cromosomiche

Tabella 4. Tabella rappresentativa dei risultati ottenuti dai test eseguiti su 3 donatori testati dopo il congelamento delle cellule al 4°passaggio di espansione cellulare.

Dai risultati ottenuti (Tabella 4), si evince che le cellule indifferenziate, sottoposte a cicli di congelamento/scongelo, hanno mantenuto

inalterati la loro vitalità e il loro potenziale proliferativo; anche i marker di espressione sono espressi e la capacità differenziativa delle cellule staminali è stata conservata. Tali evidenze ci permettono di considerare fattibile la crio-preservazione delle hASC come metodo di conservazione.

2.3.8 Test di potency: Differenziamento osteogenico

E' stata valutata la potenzialità delle hASCs in coltura di differenziare in cellule progenitrici e "committed" andando incontro a mutamenti morfologici e alla formazione di strutture caratteristiche.

Questo test è stato utilizzato come parametro per valutare la potency della popolazione cellulare.

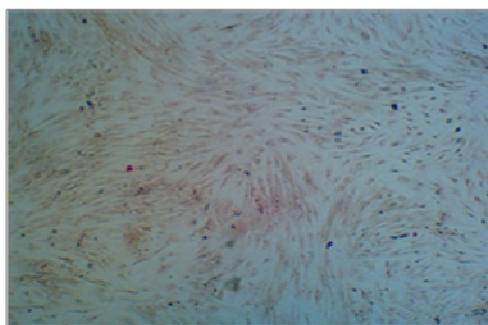
A tale scopo, cellule in coltura allo stato indifferenziato a vari passaggi (3°, 5°, 7° e 9° passaggio) sono state indotte a differenziare, in presenza di uno specifico terreno, verso la linea osteogenica.

Per la valutazione della capacità di mineralizzazione della matrice le cellule sono state seminate alla densità di circa 10^5 cellule per pozzetto su piastra 24 well. Al 50-70% di confluenza il terreno completo è stato sostituito con medium di differenziamento contenente 0.1 μ M Desametasone, 50 μ M Acido ascorbico e 10mM β -glicerofosfato.

L'acido ascorbico (vitamina C) funziona come cofattore nella idrossilazione dei residui di prolina e lisina nelle molecole di collagene, promuovendo la formazione della matrice extracellulare, la maturazione e la deposizione di collagene; induce l'attività della fosfatasi alcalina della membrana plasmatica degli osteoprogenitori; il β -glicerofosfato promuove la mineralizzazione dal momento essendo incorporato nei cristalli di idrossiapatite della matrice. e il desametasone ha una triplice funzione in quanto promuove il differenziamento, agisce sui promotori responsivi dei

fattori di trascrizione necessari per il commitment delle MSCs nel lineage osteogenico; ed è responsabile della calcificazione in vitro. Dopo 28 giorni le cellule sono state fissate con 75% di etanolo per 15 minuti e successivamente incubate con una soluzione di Alzarin Red S 1,5% (Sigma Aldrich cod.A5533).

Le cellule sono state osservate al microscopio ottico per individuare i nuclei di mineralizzazione costituiti da precipitati di calcio-fosfato, riconoscibili come noduli rossi (Figura 10).



Controllo non differenziato

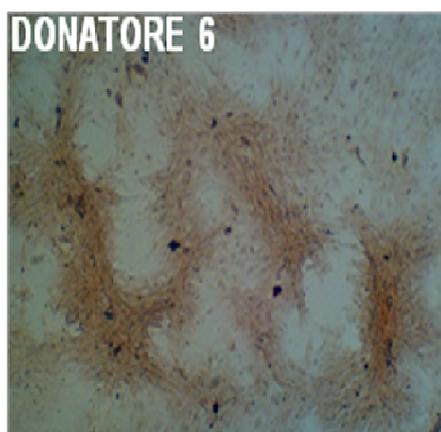
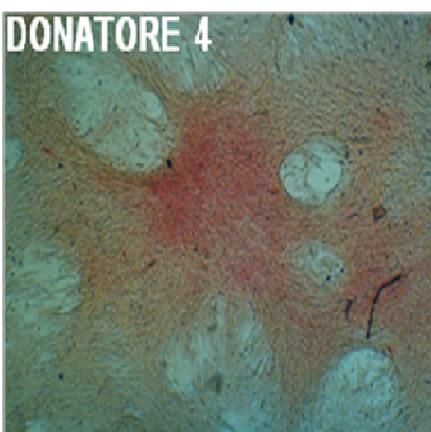
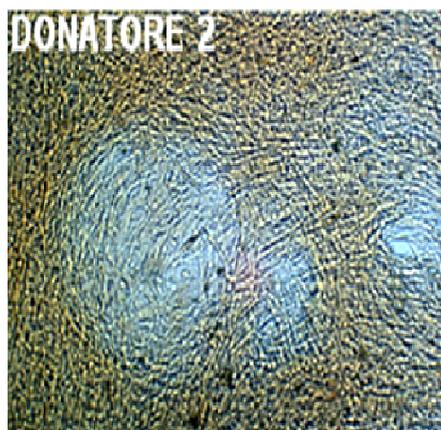
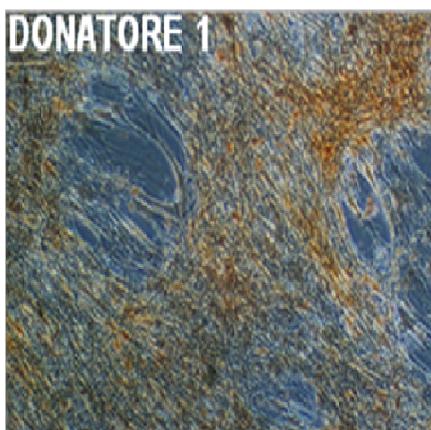


Figura 10. Immagine al microscopio della morfologia delle MSCs di differenti donatori dopo 28 giorni di induzione in senso osteogenico.

Il differenziamento in senso osteogenico viene evidenziato da cambiamenti nella morfologia cellulare, da forma affusolata a forma cuboidale e dalla presenza di aree di mineralizzazione evidenziate dalla colorazione rossa dei depositi di calcio, e dopo 2 settimane è stato possibile vedere al microscopio un primo accenno di organizzazione cellulare con formazione di strutture caratteristiche.

Gli studi eseguiti per valutare la capacità delle MSC in coltura di andare incontro a differenziamento osteogenico hanno mostrato positività in tutti i campioni. Già dopo due settimane è stato possibile vedere al microscopio ottico un primo accenno di organizzazione cellulare con formazione di strutture caratteristiche.

2.3.9 Caratterizzazione citofluorimetrica

Le cellule hASCs sono state caratterizzate immunofenotipicamente mediante analisi citofluorimetrica, valutando l'espressione di marcatori specifici delle cellule staminali mesenchimali (CD44, CD73, CD90 e CD105) (Figura 11) e la mancanza di espressione di un marcatore ematopoietico CD34 a vari passaggi della coltura cellulare (3^o 5^o 10^o).

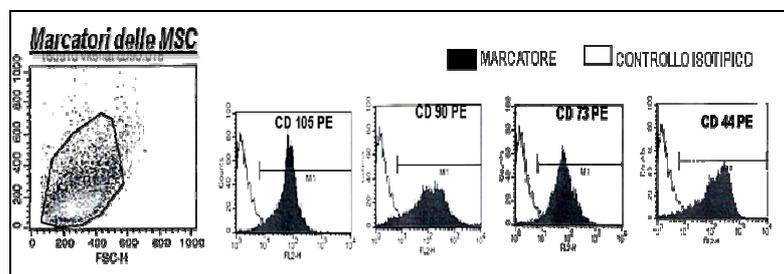


Figura 11. Analisi citofluorimetrica dei marcatori di staminalità mesenchimale.

Per l'analisi citofluorimetrica, una quantità nota di cellule in coltura (10^5 cellule totali), ai vari passaggi, sono state lavate, e risospese in un adeguato tampone contenente uno specifico anticorpo per ogni marcatore in esame e incubate per 30 minuti a 2-8°C.

Dopo centrifugazione e risospensione in paraformaldeide 1%, i campioni sono stati analizzati mediante citofluorimetro. L'acquisizione è stata eseguita mediante lo strumento FACS Calibur, (Beckton Dickinson). Grazie all'analisi del valore di fluorescenza emessa effettuata servendosi del software Cell Quest, è stata stimata la percentuale della sottopopolazione cellulare esprimente le molecole in esame, in rapporto al rispettivo controllo isotipico. La valutazione citofluorimetrica ha permesso di valutare le dimensioni e la granulosità delle varie popolazioni confermandone l'omogeneità.

Dai risultati dell'analisi immunocitofluorimetrica risulta che le hASCs presentano un profilo immunofenotipico molto simile a quello osservato nelle cellule staminali mesenchimali derivate da midollo osseo (human bone marrow mesenchymal stem cells, hBM-MS), in quanto positive a marcatori mesenchimali, quali CD44, CD73, CD90 e CD105, ma negative a marcatori endoteliali (CD34) come riportato in tabella 5.

		MARCATORE				
CAMPIONE	PASSAGGIO	CD 105 (%)	CD 90 (%)	CD 73 (%)	CD 44 (%)	CD 34 (%)
DONATORE 1	3°	92	89	90	93	1
	5°	91	98	92	95	1
	10°	94	91	90	72	2
DONATORE 2	3°	92	98	94	91	2
	5°	90	97	91	90	2
	10°	62	95	85	91	2
DONATORE 4	3°	74	85	94	87	5
	5°	85	93	96	90	2
	10°	68	91	94	93	2
DONATORE 6	3°	58	92	86	92	4
	5°	73	89	89	93	3
	10°	92	97	92	98	3

Tabella 5. Tabella rappresentativa della caratterizzazione immunofenotipica eseguita sui 4 donatori testati a vari passaggi cellulari.

2.3.10 Analisi del cariotipo

Per valutare la stabilità genomica delle cellule staminali mesenchimali in coltura è stata effettuata l'analisi del cariotipo tramite bandeggio eseguito sulle metafasi.

L'analisi del cariotipo può essere effettuata a vari passaggi cellulari:

- Nei passaggi precoci (1^o-2^o): valutazione dell'assetto cromosomico del donatore
- Nei passaggi intermedi (6^o-7^o): valutazione della stabilità genomica delle cellule in proliferazione in fase esponenziale
- Nei passaggi tardivi (9^o-10^o): valutazione del mantenimento della stabilità genomica a fine espansione

Pertanto, cellule mesenchimali in coltura, ottenute da differenti campioni a vari passaggi di espansione (2^o- 7^o- 15^o), sono state inviate sterilmente in fiasche con filtro da 25 cm² al laboratorio di analisi di una società esterna. Al raggiungimento della confluenza le cellule sono state staccate dalla fiasca mediante trattamento con tripsina, centrifugate per 5 minuti a 1500 rpm e seminate nuovamente ad una nota densità cellulare in due fiasche per almeno 24 ore di incubazione. In modo da valutare la capacità proliferativa della stessa coltura a distanza di vari giorni dalla semina. Le rispettive colture sono state staccate mediante tripsinizzazione, seminate in tre piastre Petri con vetrino e incubate a 37°C e 5 % di CO₂ per almeno 24 ore in modo da verificare al microscopio la presenza di cellule in divisione. Per effettuare l'analisi, le cellule sono state trattate con colcemid per 3 ore a 37°C e i vetrini vengono colorati con una soluzione contenente quinacrina (bandeggio QFQ) e fotografati al microscopio a fluorescenza.

L'analisi del cariotipo è stata effettuata valutando trenta metafasi. Se nelle prime trenta metafasi analizzate viene osservata la presenza di anomalie cromosomiche (aneuploidia, esclusa la monosomia di un autosoma, o un

riarrangiamento strutturale), l'analisi verrà estesa ad altre venti metafasi provenienti dalla subcoltura di controllo (per un totale di cinquanta metafasi).

CAMPIONE	PASSAGGIO	RISULTATO
DONATORE 1	2	NESSUNA ANOMALIA
	7	NESSUNA ANOMALIA
	15	NESSUNA ANOMALIA
DONATORE 2	2	NESSUNA ANOMALIA
	7	TRASLOCAZIONE SU DUE METAFASI
	15	NESSUNA ANOMALIA
DONATORE 4	2	NESSUNA ANOMALIA
	7	NESSUNA ANOMALIA
	15	NESSUNA ANOMALIA
DONATORE 6	2	NESSUNA ANOMALIA
	7	NESSUNA ANOMALIA
	15	NESSUNA ANOMALIA

Tabella 6: Tabella rappresentativa dei risultati ottenuti dalle analisi del cariotipo delle colture cellulari a vari passaggi

Come si può osservare nella tabella 6, solo un campione ha riportato una traslocazione cromosomica a livello di due metafasi osservate. Tale dato non è stato riconfermato nella successiva analisi al 15° passaggio suggerendo la presenza di un clone non dominante o di un probabile artefatto.

In conclusione, dalle analisi effettuate sul cariotipo si può notare stabilità genomica e quindi assenza di anomalie nei 4 differenti campioni fino al 15° passaggio. In figura 12, è riportato un esempio di analisi del cariotipo eseguita sul donatore 1 a vari passaggi (2°, 5°, 7°).

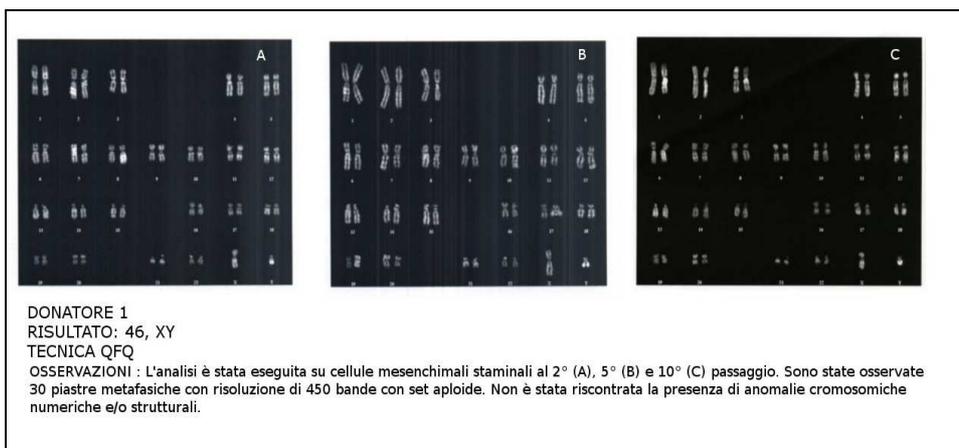


Figura 12: Analisi del cariotipo del donatore 1 a vari passaggi (2°, 5° e 7°).

2.3.11 Formulazione e stabilità del prodotto finito

Al raggiungimento di confluenza del passaggio target (5° passaggio), le cellule sono state lavate con DPBS, staccate mediante tripsinizzazione, contate con il nucleocounter e suddivise per dose ($1 \cdot 10^7$ cellule/dose) nel volume finale (375 μ L/dose) di soluzione fisiologica. Il target per lo studio in oggetto è la produzione di un lotto di cellule costituito da 4 dosi da $1 \cdot 10^7$ cellule in sospensione in volume totale di 375 μ L. Per le analisi del controllo di qualità saranno necessarie 6 dosi da $1 \cdot 10^7$ cellule.

Per verificare la stabilità del campione nel packaging finale, sono state eseguite prove di valutazione della vitalità delle cellule a vari tempi (24, 48 e 72 ore) e temperature di conservazione (2-8°C; 25 °C) (Tabella 7).

TEMPO	TEMPERATURA	CELLULE TOTALI	CELLULE MORTE	CELLULE VIVE	VITALITA'
T0	25 °C	$1,13 \cdot 10^7$	$0,10 \cdot 10^7$	$1,03 \cdot 10^7$	91%
T24h	2-8 °C	$1,13 \cdot 10^7$	$0,16 \cdot 10^7$	$0,97 \cdot 10^7$	86%
	25 °C	$1,12 \cdot 10^7$	$0,18 \cdot 10^7$	$0,94 \cdot 10^7$	84%
T48h	2-8 °C	$1,12 \cdot 10^7$	$0,17 \cdot 10^7$	$0,95 \cdot 10^7$	85%
	25 °C	$1,12 \cdot 10^7$	$0,18 \cdot 10^7$	$0,94 \cdot 10^7$	84%
T72h	2-8 °C	$1,12 \cdot 10^7$	$0,19 \cdot 10^7$	$0,3 \cdot 10^7$	83%
	25 °C	$1,10 \cdot 10^7$	$0,21 \cdot 10^7$	$0,89 \cdot 10^7$	81%

Tabella 7: Tabella riassuntiva dei risultati ottenuti dalle prove di stabilità del prodotto finito.

Dai risultati ottenuti e schematizzati in tabella 7, le cellule conservate a 2-4 °C per 48-72 ore rappresentano la condizione migliore per il trasporto del prodotto finito presso un eventuale sito clinico di utilizzo raggiungibile entro questa finestra temporale.

Definite le condizioni per il packaging del prodotto finito, il trasporto sarà può essere effettuato disponendo la provetta all'interno di un contenitore isolante dedicato al trasporto delle cellule staminali mesenchimali e un data logger verrà inserito all'interno del contenitore per monitorare la temperatura durante tutto il trasporto.

3. RISULTATI

3.1 Risultati dello studio di fattibilità

L'isolamento della componente cellulare mesenchimale da tessuto adiposo si è rivelata una metodica riproducibile e caratterizzata da una buona resa cellulare per tutti i campioni indipendentemente dall'età del donatore. Le curve di crescita elaborate con i dati provenienti dalle conte cellulari mostrano un andamento esponenziale della proliferazione fino al 40° giorno per tutti e 4 i campioni testati. Confrontando campioni provenienti da pazienti di diverse età non sono state riscontrate differenze significative riguardanti la capacità proliferativa delle cellule esaminate. Le cellule indifferenziate, sottoposte a cicli di congelamento/scongelamento, hanno mantenuto inalterati la loro vitalità e il loro potenziale proliferativo; tale caratteristica ci permette di crio-preservare le hASC anche per lunghi periodi. Le popolazioni cellulari esaminate al citofluorimetro (FACS) sono risultate omogenee a partire dal 3° passaggio in coltura. La caratterizzazione delle hASC isolate ha permesso la valutazione di alcuni marcatori cellulari di superficie caratteristici delle cellule mesenchimali. In linea con i dati presenti in letteratura, nelle hASC si è osservata un'elevata espressione di CD44, CD73, CD90, CD105 mentre risulta assente l'espressione di CD34. A partire dal 3° passaggio, le cellule hASC sono state indotte al differenziamento verso la linea osteogenica, mantenendole in coltura per diversi tempi nello specifico terreno. Dopo 15 giorni dal differenziamento verso la linea osteogenica, le cellule subiscono una modificazione morfologica significativa propria delle cellule differenziate. La stabilità genomica delle popolazioni cellulari è stata analizzata mediante analisi del cariotipo a vari passaggi di coltura e per tutti i campioni non si è osservata la presenza di anomalie cromosomiche.

Pertanto, le prove sperimentali condotte durante lo studio di fattibilità hanno dimostrato la possibilità di isolare una popolazione di cellule mesenchimali staminali da lipoaspirato addominale definendo un protocollo adeguato al raggiungimento del target prefissato.

In Tabella 8, sono riassunti i risultati ottenuti dai test effettuati sui 4 campioni analizzati.

CAMPIONE	DONATORE 1	DONATORE 2	DONATORE 4	DONATORE 6
<i>TEST</i>	<i>RISULTATI</i>	<i>RISULTATI</i>	<i>RISULTATI</i>	<i>RISULTATI</i>
CONFORMITA' DELLA BIOPSIA	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
MICOPLASMA	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
STERILITA'	Sterile	Sterile	Sterile	Sterile
TEST DI POTENCY	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
FENOTIPO	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
CARIOTIPO	Assenza di anomalie cromosomiche	Assenza di anomalie cromosomiche	Assenza di anomalie cromosomiche	Assenza di anomalie cromosomiche

Tabella 8: Tabella riassuntiva dei risultati ottenuti dallo studio di fattibilità

In conclusione, i risultati ottenuti durante lo studio di fattibilità hanno quindi dimostrato l'adeguatezza del protocollo utilizzato sia in termini di raggiungimento del numero di cellule necessarie sia in termini di qualità del prodotto cellulare. Tutti i dati ottenuti durante lo studio di fattibilità sono stati fondamentali per definire le specifiche di prodotto e i criteri di accettabilità richiesti per la successiva convalida del processo. I successivi studi di convalida secondo GMP, che sono obbligatori per legge, consentiranno di consolidare tali processi e renderli idonei ad una lavorazione su larga scala, o ripetitiva.

3.1.1 Criteri di accettabilità richiesti

Nelle tabelle 9,10 e 11 sono riportati i criteri di accettabilità per le analisi sul materiale in ingresso, durante il processo di produzione e sul prodotto finito che saranno confermati al termine dell'esecuzione dei lotti di convalida.

I loro limiti sono stati determinati per garantire la sicurezza del prodotto (micoplasma, endotossine, sterilità, cariotipo) in accordo alla normativa vigente.

Test sul materiale in ingresso	Criteri di accettabilità
Micoplasma	Negativo
Esami virali	Negativo
Peso	< 2 gr

Tabella 9: Tabella riassuntiva dei criteri di accettabilità richiesti sul materiale in ingresso prima del processo di produzione

Test in processo	Metodo	Criteri di accettabilità
Micoplasma	<i>Luminometria</i>	Negativo
Monitoraggio microbiologico e particellare	<i>Secondo metodo interno</i>	Annex 1 GMP

Tabella 10: Tabella riassuntiva dei criteri di accettabilità richiesti durante il processo di produzione.

Test sul prodotto finito	Metodo	Specifica
Aspetto	<i>Valutazione visiva</i>	Sospensione gialla ed opalescente
Vitalità	<i>Conta Nucleocounter</i>	≥ 70%
Conta cellulare	<i>Conta Nucleocounter</i>	0,5 – 1,5 x 10 ⁶ cells/mL
Fenotipo al terzo e quinto passaggio	<i>Analisi citofluorimetrica</i>	CD44 ≥ 70% CD73 ≥ 70% CD90 ≥ 70% CD105 ≥ 70% CD34 ≤ 10% CD29 ≤ 10% CD19 ≤ 10% CD45 ≤ 10% CD14 ≤ 10%
Cariotipo al secondo e al quinto passaggio	<i>Microscopia</i>	Assenza di anomalie cromosomiche
Sterilità	<i>Ph. Eur. 2.6.1</i> Inoculo diretto	Sterile
Determinazione del contenuto di endotossine	<i>Ph. Eur. 2.6.14</i> LAL Test	< 10 EU/ml

Tabella 11 Tabella riassuntiva dei criteri di accettabilità richiesti sul prodotto finito.

3.2 Produzione dei lotti di convalida

Per convalidare il processo sono prodotti tre lotti all'interno dell'impianto GMP, lavorando in ambiente di classe A con ambiente circostante di classe B.

La validazione del processo è eseguita per verificare la consistenza del processo di produzione delle cellule staminali mesenchimali e determinare le specifiche di prodotto. Tutte le operazioni effettuate durante la convalida del processo sono riportate nel foglio di lavorazione, redatto dal responsabile di produzione, revisionato dal Quality Assurance (QA) e approvato dal Qualified Person (QP) prima dell'emissione.

Il foglio di lavorazione (FdL) contiene tutte le informazioni necessarie allo svolgimento delle lavorazioni e deve riportare:

- il nome del prodotto
- il numero di lotto di produzione
- le verifiche da effettuare prima di iniziare le lavorazioni
- le condizioni HVAC da monitorare
- i locali/ apparecchiature nei quali svolgere le differenti attività
- la sequenza e le istruzioni per ogni attività del processo di lavorazione
- i metodi/ istruzioni (o i riferimenti ad essi) da seguire per lo svolgimento delle attività di controllo
- i limiti di accettazione dei controlli in processo se condizionati e/o definiti dalla specifica di prodotto
- le istruzioni per il prelievo, l'impiego e conservazione di controcampioni
- le istruzioni per la conservazione dei prodotti intermedi e prodotti finiti

- la lista completa dei materiali necessari con le relative quantità impiegate

Il foglio di lavorazione può contenere l'elenco delle attività di produzione e il personale coinvolto per ciascuna attività. Per le operazioni critiche è prevista la presenza di due operatori: uno che esegue le attività di produzione e l'altro che le verifica. Entrambi gli operatori appongono la firma sul foglio di lavorazione. Il secondo operatore può essere un operatore di produzione o di controllo di qualità.

Una corretta stesura e compilazione del foglio di lavorazione è indispensabile per la tracciabilità del processo e obbligatoria per ogni lavorazione GMP.

3.2.1 Descrizione del processo di convalida

Campioni di lipoaspirato addominale, dopo gli accertamenti sull'idoneità agli esami richiesti, vengono processati entro 48 ore. Ogni campione, dopo centrifugazione, viene lavato due volte con DPBS, disgregato meccanicamente e digerito enzimaticamente con collagenasi per 60 minuti a 37°C. Dopo il blocco dell'azione dell'enzima con terreno completo addizionato con FBS 10% e L-Glutammina 2mm, il campione viene centrifugato per 5 minuti a 1500 rpm e la porzione di interesse (precipitato) viene seminata in piastra T25 e incubate a 37°C con 5% CO₂. Il primo cambio di terreno viene effettuato dopo 24 ore dalla semina e successivamente il terreno di coltura viene cambiato ogni 72/96 ore. Al raggiungimento di circa il 90% della confluenza, le cellule vengono staccate mediante tripsinizzazione e seminate con diluizione 1:3 per il primo passaggio. Al raggiungimento di almeno $1 \cdot 10^7$ cellule (5° passaggio), dopo centrifugazione, il pellet viene sottoposto a 3 lavaggi con DPBS al fine di eliminare i residui di FBS e le cellule vengono risospese in siero umano al

10%. Per i passaggi successivi, la densità di semina è 1:2. Per i test di potency e per la stabilità, la coltura cellulare viene espansa su piccola scala per ulteriori 3 passaggi.

Come definito dai dati ottenuti dallo studio di fattibilità, il processo di espansione ha una durata di circa 40 giorni, durante i quali vengono eseguiti otto “passaggi” (definiti come trattamenti con tripsina) corrispondenti ad un numero di duplicazioni di popolazioni (“Cumulative Population Doublings”) compreso tra 6 e 9 passaggi.

Al raggiungimento del numero di fiasche definito dal protocollo di espansione, le cellule sono raccolte, lavate e formulate in quantità nota (10^7 milioni di cellule) in 375 μ l di soluzione fisiologica. Alcune aliquote di prodotto finito sono prelevate in questa fase per l'esecuzione dei test di rilascio del lotto. Per ciascun lotto di convalida, le cellule in coltura sono caratterizzate a diversi passaggi per analizzare la presenza di marcatori, la stabilità cromosomica e la capacità di differenziare in senso osteogenico.

3.2.2 Test di controllo di qualità

I lotti prodotti durante lo studio di fattibilità sono stati utilizzati per la messa a punto dei test per il controllo di qualità. Sono stati definiti tutti i test da eseguire sul prodotto finito e i criteri di accettabilità richiesti per ogni analisi impiegata.

Oltre a questi test, sono stati definiti anche le analisi da effettuare sul prodotto in ingresso, durante il processo di produzione e al rilascio del lotto finito.

3.2.2.1 Controlli sul materiale biologico in ingresso

Tutti i materiali biologici, provenienti da donatori e pazienti, in ingresso da utilizzare in un impianto GMP o nel controllo di qualità devono essere sottoposti a controlli prima di essere utilizzati (Tabella 12).

Saggio	Metodo	Specifiche	Frequenza
SIEROLOGIA	Analisi in outsourcing	Negativo	Ingresso del campione
CONTROLLO DOCUMENTAZIONE	Revisione certificazione allegati e tracciabilità del campione	Conforme	Ingresso del campione
MICOPLASMA	Luminometria	Negativo	Ingresso del campione
STERILITÀ'	Inoculo diretto	Sterile	Ingresso del campione

Tabella 12: Tabella riassuntiva dei test di controllo di qualità da effettuare sul materiale in ingresso

All'arrivo, il materiale in ingresso viene ricevuto, accettato con riserva e sottoposto ai seguenti controlli:

- Verifica dell'integrità dell'imballo esterno
- Verifica dell'integrità della materia prima contenuta nell'imballo

- Verifica della data di prelievo e/o data di scadenza
- Verifica della presenza di etichetta recante il codice identificativo del donatore. L'etichetta deve essere leggibile in tutte le sue parti e non deve mostrare segni di eventuale rimozione.
- Verifica della corrispondenza fra quanto descritto nei documenti inviati dallo sponsor o dal fornitore e quanto contenuto nell'imballo

Se uno o più controlli sopraelencati danno esito negativo, il Quality Control provvede all'etichettatura del materiale "non conforme", allo stoccaggio nell'aerea materiali respinti e avvisa il QA per aprire una non conformità. Tutte le operazioni devono essere comunicate allo sponsor. Se tutti i controlli sopraelencati danno esito positivo, il QC provvede alla registrazione dei documenti riportando tutte le informazioni necessarie per l'utilizzo. A seconda della categoria di appartenenza, i materiali in ingresso vengono processati in modo differente. Per i prelievi cellulari, è necessario verificare la presenza di certificazioni con esito negativo, fornite dallo sponsor (vedi paragrafo 3.2) ed eseguire il test del micoplasma, mediante metodo lumino metrico, prima del processamento. Solo se i test interni e le certificazioni fornite dallo sponsor risultato negative, il campione viene accettato e il personale di produzione provvede a processare il campione come descritto dal foglio di lavorazione. In caso contrario, il campione non viene accettato e viene informato lo sponsor.

3.2.2.2 Controlli in processo

Il processo di produzione è monitorato durante tutte le fasi di lavorazione mediante l'esecuzione di test di controllo di qualità al fine di controllare e garantire l'asepsi. I test del controllo di qualità da effettuare durante la fase di produzione sono schematizzati nella seguente tabella 13:

Saggio	Metodo	Limiti	Frequenza
<i>MONITORAGGIO AMBIENTALE</i>	<i>Microbiologico</i>	Secondo metodo interno	Ad ogni step di lavorazione
<i>MONITORAGGIO AMBIENTALE</i>	<i>Contatore di particelle</i>	Secondo metodo interno	Ad ogni step di lavorazione
<i>MICOPLASMA</i>	<i>Luminometria</i>	Negativo	Monitoraggio settimanale
<i>CONCENTRAZIONE CELLULARE</i>	<i>Nucleocounter</i>	Dipendente dallo splitting	Ad ogni splitting
<i>VITALITÀ'</i>	<i>Nucleocounter</i>	>70%	Ad ogni splitting
<i>FENOTIPO</i>	<i>Immunoflorescenza (FACS)</i>	Presenza dei marcatori delle cellule staminali e	Al 3° e 5° splitting
<i>CARIOTIPO</i>	<i>Microscopia</i>	Assenza di anomalie	Al 2°, 5° e 8° splitting
<i>TEST POTENCY</i>	<i>Differenziamento osteogenico</i>	Positivo	Al 2°, 5° e 8° splitting

Tabella 13: Tabella riassuntiva dei test di controllo di qualità da effettuare durante la fase di produzione.

3.2.2.1 Monitoraggio particellare

Il monitoraggio particellare può essere eseguito con sistemi portatili o con sistemi fissi in ambiente in continuo. In entrambi i casi una quantità definita di aria viene aspirata da una pompa e quindi un contatore di particelle laser conta il numero delle particelle di una certa dimensione rilevata.

Il monitoraggio particellare deve essere adeguato alle condizioni richieste dalla classificazione ambientale e viene effettuato semestralmente da una società esterna e durante le fasi di lavorazione da un operatore di produzione mediante l'utilizzo di un contatore di particelle posizionato sotto la cappa a flusso laminare durante tutte le fasi di lavorazione.

3.2.2.2 Monitoraggio microbiologico

Il monitoraggio microbiologico viene eseguito durante tutte le fasi di produzioni in cui è richiesto l'ottenimento di un prodotto sterile o a condizioni di carica microbica controllata. Tale metodo permette di verificare il numero di particelle vive presenti in un ambiente, sulle superfici o direttamente sugli operatori coinvolti durante le fasi di lavorazione in cui il prodotto è potenzialmente esposto. Il monitoraggio viene effettuato mediante aspirazione, contatto diretto ed esposizione.

Per il monitoraggio degli operatori, ciascun operatore (principale e/o di supporto) coinvolto durante la fase di lavorazione deve essere monitorato mediante contatto diretto del polpastrello di ogni dito della mano destra e sinistra con la piastra Petri contenente Tryptic Soy Agar (TSA).

Per il monitoraggio delle cappe a flusso laminare di classe A e B, è necessario esporre all'interno della cappa o del flusso dove è esposto il prodotto e lasciarla aperta per l'intera durata delle operazioni. Per operazioni superiori alle 4 ore, sostituire la piastra con un'altra. Al termine

delle operazioni, prima della pulizia, è necessario eseguire il monitoraggio al centro della piastra mediante piastra da contatto.

In classe B, durante le operazioni di lavorazione, e in classe C, al termine delle operazioni, in presenza dell'operatore e con la cappa accesa, deve essere effettuato il monitoraggio mediante aspirazione (SAS: Surface Air System) di 1 m³ di aria nella zona adiacente alla cappa in cui il prodotto viene esposto. Il monitoraggio ambientale viene effettuato mediante aspirazione nella zona adiacente alla cappa in cui il prodotto viene esposto prima della lavorazione, durante e al termine della stessa identificando le piastre utilizzate con il numero del locale, la data e l'indicazione SAS-pre, SAS-durante e SAS-post.

Per l'ambiente di lavoro di classe B, C e D il monitoraggio viene effettuato mediante l'utilizzo di piastre d'esposizione contenente il terreno TSA nell'ambiente di lavoro in prossimità della cappa usata o del flusso laminare e lasciarla aperta per l'intera durata delle operazioni.

Tutte le piastre, delle cappe, ambientali e degli operatori, vengono incubate dagli operatori del controllo di qualità per almeno 3 giorni a 30-35°C allo scopo di rilevare la presenza di batteri e successivamente per altri tre giorni a 20-25°C per rilevare la presenza di muffe e lieviti. Trascorso il periodo richiesto, le piastre incubate vengono ispezionate e in caso di crescita di microrganismi, è necessario procedere all'identificazione degli stessi.

Il responsabile del controllo di qualità revisiona i dati ottenuti valutando per ogni singolo campionamento se sono rispettati i limiti di allerta, d'azione e dell'Annex 1. Tali limiti sono riportati in Tabella 14.

I limiti di azione corrispondono ai limiti definiti dall'Annex 1 o di poco inferiori, i limiti di allerta sono stati definiti valutando la distribuzione dei valori riscontrati nei diversi protocolli di monitoraggio delle camere bianche,

scegliendo come valore limite il valore che è stato superato all'incirca una volta ogni venti.

	Limiti d'allerta	Limiti d'azione	Limiti dell'Annex 1
CLASSE A			
Piastre d'aspirazione	1	1	< 1
Piastre da contatto	1	1	< 1
Piastre da esposizione	1	1	< 1
CLASSE B			
Piastre d'aspirazione	3	8	10
Piastre da contatto	3	4	5
Piastre da esposizione (4 ore)	3	4	5
CLASSE C			
Piastre d'aspirazione	50	90	100
Piastre da contatto	15	20	25
Piastre da esposizione (1 ora)	6	10	12
CLASSE D			
Piastre d'aspirazione	100	160	200
Piastre da contatto	25	40	50
Piastre da esposizione (1 ora)	15	20	25

Tabella 14: Limiti d'allerta, d'azione e dell'Annex 1.

3.2.2.2.3 Determinazione della concentrazione cellulare e vitalità

La conta cellulare può essere espressa come il numero di cellule per volume e la vitalità come il numero di cellule vive per volume.

Per la determinazione della concentrazione cellulare viene utilizzato il nucleocounter, metodo di conta automatizzato basato su un sistema di microscopia a fluorescenza (vedi paragrafo 3.5).

L'analisi viene effettuata dopo ogni trattamento con tripsina in modo da valutare l'andamento dell'espansione cellulare, consentendo il calcolo per la suddivisione delle cellule durante lo splitting e verificare la conta cellulare alla fine del processo di produzione. Per la vitalità cellulare calcolare il rapporto tra il numero di cellule vive e il numero di cellule totali moltiplicando il risultato per 100.

3.2.2.2.4 Test del micoplasma

Il test del micoplasma viene effettuato mediante il metodo della chemiluminescenza settimanalmente per verificare l'assenza di contaminazione nel campione durante il processo di espansione (vedi paragrafo 3.3) e mediante PCR sul soprannatante cellulare prima della formulazione del prodotto finito.

Quest'ultima analisi viene effettuata da una società esterna.

3.2.2.3 Controlli sul prodotto finito

Il controllo di qualità esegue le analisi sul prodotto finito in modo da assicurare la conformità del prodotto finito con le specifiche definite in fase durante lo studio di fattibilità.

I test di controllo di qualità sul prodotto finito sono i seguenti:

- Determinazione dell'aspetto
- Determinazione della concentrazione cellulare e vitalità (come descritto nel paragrafo 5.3.3)
- Analisi immunofenotipica
- Analisi del cariotipo
- Test di potency
- Determinazione delle endotossine
- Verifica della sterilità

I metodi impiegati per ogni test e i limiti accettati sono schematicamente rappresentati nella tabella riportata di seguito (Tabella 15).

Saggio	Metodo	Limiti
ASPETTO	Valutazione visiva	Sospensione gialla ed
VITALITÀ'	Conta Nucleocounter	≥ 70%
CONTA CELLULARE	Conta Nucleocounter	0,5 – 1,5 x 10 ⁶ cells/mL
FENOTIPO	Analisi citofluorimetrica	CD44 ≥ 70% CD73 ≥ 70% CD90 ≥ 70% CD105 ≥ 70% CD34 ≤ 10% CD29 ≤ 10% CD19 ≤ 10%
CARIOTIPO	Microscopia	Assenza di anomalie cromosomiche
STERILITÀ	Ph. Eur. 2.6.1 Inoculo diretto	Sterile
DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI ENDOTOSSINE	Ph. Eur. 2.6.14 LAL Test	< 10 EU/ml

Tabella 15: Tabella riassuntiva dei test di controllo di qualità da effettuare sul prodotto finito.

3.2.2.3.1. Determinazione dell'aspetto

La valutazione visiva dell'aspetto di applica a sostanza o preparazioni di cui è richiesta una descrizione dell'aspetto esteriore e delle caratteristiche fisiche del prodotto. La valutazione viene effettuata mediante osservazione macroscopica della preparazione ed è riferita essenzialmente al colore, consistenza e trasparenza. Al termine dell'analisi, i risultati vengono registrati sul relativo quaderno indicando per ogni campione analizzato il colore, la consistenza (liquida/ gelatinosa/ polverosa/ granulare) e la trasparenza (trasparente/ torbido/ opaco).

3.2.2.3.2 Analisi immunofenotipica

Una quantità nota di cellule $1,5 \cdot 10^6$, prelevati a vari passaggi (2° e 5° passaggio) saranno analizzate mediante analisi immunofenotipica per valutare la presenza di marcatori di staminalità mesenchimale (CD105, CD90, CD73 e CD44) e l'assenza di marcatori ematopoietici (CD34, CD45, CD29, CD19, CD14).

3.2.2.3.3 Analisi del cariotipo

La determinazione del cariotipo viene effettuata tramite bandeggio eseguito sulle metafasi, presso i laboratori di una società esterna Secondo metodo descritto nel paragrafo 2.3.9.

3.2.2.3.4 Test di potency

Per valutare la capacità differenziativa delle cellule mesenchimali, una quantità nota di cellule ($6 \cdot 10^4$ cellule) a vari passaggi (3°-5°-8°) viene indotta a differenziare in senso osteogenico in presenza di specifici fattori (come descritto nel paragrafo 2.3.8).

Dall'analisi microscopica delle cellule, è possibile valutare il differenziamento delle cellule mesenchimali in senso osteogenico evidenziato da cambiamenti morfologici.

3.2.2.3.5 Determinazione delle endotossine

L'endotossine appartengono alla classe delle tossine, un gruppo di sostanze diverse per composizione chimica che hanno effetti negativi sulle cellule degli organismi superiori. Le endotossine a differenza delle esotossine, molecole di natura proteica prodotte e liberate dai batteri patogeni nei tessuti da loro colonizzati, sono componenti ad alto peso molecolare della parte più esterna della parete cellulare dei batteri gram

negativi che vengono liberate nell'ambiente o alla morte del batterio oppure al momento della sua divisione cellulare.

Le endotossine sono prodotte solo dai batteri gram negativi in quanto presentano una parete differente per dimensione e per composizione da quella dei gram positivi.

Oltre al peptidoglicano, i batteri gram negativi possiedono uno strato aggiuntivo chiamato membrana esterna. Pur trattandosi effettivamente di un doppio strato lipidico, esso non è soltanto costituito da fosfolipidi e proteine, come la membrana citoplasmatica, ma contiene anche polisaccaridi. I lipidi e i polisaccaridi sono strettamente legati tra loro a formare un complesso lipopolisaccaridico. A causa della presenza di questo complesso, la membrana è frequentemente chiamata strato lipopolisaccaridico o semplicemente LPS. La porzione lipopolisaccaride consiste di due frazioni, il lipopolisaccaride interno o core polisaccaridico e il lipopolisaccaride esterno chiamato anche lipopolisaccaride O. Sebbene la funzione della membrana esterna sia di tipo strutturale una delle sue importanti proprietà biologiche è la tossicità per gli animali. Le proprietà tossiche dipendono da una porzione del LPS, e in particolare del lipide A di questi microrganismi. Per definire questo composto tossico viene normalmente utilizzato il termine endotossina ed alcune di queste endotossine possono causare gravi sintomi all'uomo. A differenza della membrana citoplasmatica, la membrana esterna dei gram negativi pur essendo essenzialmente un doppio strato fosfolipidico, è parzialmente permeabile a piccole molecole. Ciò avviene grazie alla presenza sulla membrana esterna di piccole proteine chiamate porine che svolgono la funzione di canali permettendo l'entrata e l'uscita di sostanze idrofile a basso peso molecolare, attraverso la membrana. Sono state identificate numerose porine, sia specifiche che aspecifiche: le porine aspecifiche

formano canali acquosi attraverso i quali possono transitare piccole molecole di ogni tipo, mentre quelle che contengono uno specifico sito di legame per uno o più sostanze strettamente correlate sono porine specifiche.

Le endotossine derivano dalla rottura del lipopolisaccaride. Sono micelle di forma e dimensioni diverse ed il loro peso molecolare varia da 10 a 20 kDa. L'attività biologica delle endotossine è direttamente associabile al lipopolisaccaride, composto da molecole di grasso legate ad unità di zucchero. Il lipopolisaccaride presenta particolare affinità per le membrane biologiche dei mammiferi. Talvolta, quest'affinità causa alterazioni del doppio strato fosfolipidico delle membrane cellulari. Il lipopolisaccaride è formato da un doppio strato, analogo al doppio strato fosfolipidico caratteristico delle membrane cellulari, nel quale i componenti idrofili sono esposti all'ambiente acquoso mentre gli acidi grassi idrofobici sono uniti al centro del doppio strato. Il lipopolisaccaride è in genere stabilizzato dalla presenza di cationi bivalenti calcio e magnesio.

Le endotossine hanno la caratteristica di essere stabili al calore e non agiscono enzimaticamente ma possiedono un'azione pirogenica molto potente rispetto a quella di altre sostanze pirogeniche. Le condizioni ottimali per la rimozione delle endotossine, ed in generale di tutti i pirogeni, consistono in trattamenti con calore secco a 200° C per mezz'ora oppure con calore umido a 120° C per più ore. L'inattivazione e degradazione delle endotossine può anche essere effettuata con l'utilizzo di agenti ossidanti, quali i perossidi.

Come riportato nella European Pharmacopoeia 7.0, 2.6.14 Bacterial Endotoxins, per la valutazione delle endotossine viene effettuato il test LAL (Limulus Amebocyte Lysate), test quantitativo cromogenico end-point per la

determinazione di endotossine da batteri gram-negativi, basato sul rapporto quantitativo tra la concentrazione di endotossina e la quantità di cromoforo rilasciata alla fine del periodo di incubazione. L'endotossina catalizza l'attivazione di un proenzima presente nel lisato di amebociti di limulus che scinde un substrato generando una reazione colorimetrica rilevabile spettrofotometricamente alla lunghezza d'onda di 405nm.

Per l'esecuzione del test, preparare la curva standard da 0.1 a 0.0125 EU/ml utilizzando lo stock di endotossina presente nel kit.

Per ogni test prevedere l'analisi di:

- curva standard in triplicato
- campioni in doppio
- campioni con lo spike di endotossina in doppio
- controllo negativo costituito da H₂O LAL grade in doppio

Per verificare l'assenza di inibizione/attivazione da prodotto aggiungere una quantità nota di endotossina (0.5 EU/ml finali) ad una aliquota del campione in analisi diluito 1/50 e 1/100 ottenendo una diluizione finale di 1/2 con l'aliquota dello standard. Dopo aver dispensato i punti della curva standard e i campioni da analizzare, aggiungere il Lisato di Amebociti di Limulus e lasciare incubare per 30 minuti a 37°C. Trascorso il periodo di incubazione, aggiungere il substrato cromo genico e lasciar colorare per 6 minuti. Bloccare la reazione colorimetrica con una soluzione di acido acetico 25% e leggere la reazione colorimetrica a 405nm.

Per l'analisi dei dati, la concentrazione di endotossina presente nei campioni in analisi viene calcolata mediante confronto alla curva standard tramite regressione lineare. Se il valore del bianco è compreso tra i \pm tsa calcolare il risultato usando la funzione analitica riportata. In caso contrario,

calcolare la concentrazione del campione interpolando la lettura tra i due punti dello standard che comprendono il valore di OD del campione.

Confermare la validità del saggio solo se:

- $r^2 \geq 0.98$
- la differenza tra la quantità nota di endotossina presente nello spike e quella calcolata risulta compresa tra 50-200%

Al termine del test, registrare tutte le operazioni effettuate sul quaderno dedicato.

3.2.2.3.6 Verifica della sterilità

Il test di sterilità viene utilizzato per analizzare sostanze o preparazioni per le quali è richiesta la sterilità, requisito fondamentale per i prodotti di terapia avanzata.

Il test viene eseguito per inoculo diretto della sostanza o della preparazione in un terreno adatto alla crescita microbica (European Pharmacopoeia 7.0; 2.6.1 Sterility). Il test è condotto all'interno di un isolatore precedentemente pulito mediante l'utilizzo di panni di isopropanolo e sterilizzato con perossido di idrogeno VHP100. Dopo la verifica preliminare di tutti i parametri (verifica delle condizioni prima del test e avvio del ciclo di sterilizzazione) procedere all'esecuzione del test eseguendo un monitoraggio ambientale all'interno dell'isolatore, mediante l'esposizione di una piastra Petri contenente con TSA (Tryptic Soy Agar). La piastra d'esposizione deve essere lasciata aperta per tutta l'esecuzione del test. Eseguire i controlli negativi utilizzando le stesse quantità di terreno TSB (Tryptic Soy Broth pH 7.3 ± 0.2) e THG (THioGlicollato pH 7.1 ± 0.2) usate per il test di sterilità non inoculate con il campione.

Il campione da testare viene inoculato al 10% nei terreni TSB e THG e incubato rispettivamente alla temperatura di 22-25°C (TSB) e 30-35°C (TSG) per 14 giorni. Lo stesso procedimento viene eseguito per i controlli negativi. Durante il periodo di incubazione, i campioni vengono giornalmente monitorati per la presenza di contaminanti mediante osservazione della torbidità.

Per l'analisi dei risultati, durante il periodo d'incubazione e alla conclusione dell'analisi, esaminare il terreno di coltura per rilevare l'eventuale crescita microbica. In alcuni casi il materiale testato, quando viene introdotto nel terreno di coltura, genera torbidità dello stesso in modo tale da impedire, tramite esame visivo, la verifica della presenza o dell'assenza di crescita microbica.

Nel caso di lettura dubbia del campione, al termine dei 14 giorni di incubazione, trasferire una quantità pari al 10% di terreno precedentemente inoculato in terreno fresco. Continuare l'incubazione del terreno originario e di quello nuovo per un periodo non inferiore a 4 giorni dall'incubazione originaria. Se non è riscontrata crescita microbica, il prodotto esaminato soddisfa il test di sterilità. Se è riscontrata crescita microbica il test di sterilità non è soddisfatto a meno che non possa essere chiaramente invalidato per ragioni non correlate al prodotto. Al termine dell'analisi, registrare i risultati sul relativo quaderno dedicato.

Il test potrebbe essere considerato non valido solo quando si sono riscontrate una o più condizioni sotto riportate:

- i dati del monitoraggio microbiologico del test di sterilità mostrano contaminazioni
- un'indagine sull'esecuzione del test rivela un errore
- presenza di crescita microbica nei controlli negativi

- dopo la determinazione dell'identità dei microrganismi isolati dal test, la crescita di queste specie potrebbe essere ascrivibile inequivocabilmente ad un errore relativo al materiale e/o alla tecnica utilizzata nella procedura del test di sterilità.

Se il test è dichiarato non valido, deve essere ripetuto mantenendo lo stesso numero di unità come nel test originale. Se non è stata riscontrata crescita microbica nel test ripetuto, il prodotto esaminato soddisfa il test di sterilità. Se è riscontrata crescita microbica nel test ripetuto, il prodotto esaminato non soddisfa il test di sterilità.

3.2.2.3.7 Test di fertilità

Per la convalida del test di sterilità, su uno dei tre lotti di convalida, verrà effettuato il test di fertilità del terreno e delle piastre di agar impiegate nelle analisi microbiologico. Il test viene condotto in accordo con le indicazioni della E.P. (2.6.1) scegliendo i microrganismi specifici a seconda del terreno di coltura utilizzato.

I microrganismi adatti all'esecuzione del test di fertilità sono i seguenti:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- *Candida albicans* ATCC 10231
- *Aspergillus niger* ATCC 16404
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
- *Clostridium sporogenes* ATCC 19404

Altri ceppi considerati idonei sono: *Escherichia coli* SKF 12140, *Candida Albicans* SKF 2270, *Aspergillus fumigatus* IUMM 94538.

Scongelare a temperatura ambiente, per i ceppi conservati a -80°C, le criovials contenenti i microrganismi da inoculare/piastrare. Effettuare diluizioni della sospensione cellulare di partenza in tampone DPBS fino

all'ottenimento di un sospensione alla concentrazione desiderata. Come controllo negativo si utilizza un contenitore/piastra non inoculato/piastrato con i microorganismi ma solo con DPBS in quantità paragonabile al volume delle soluzioni microbiche. Verificare la fertilità dei medium inoculando microorganismi vitali e valutandone l'eventuale crescita (torbidità nel caso di medium liquido, formazione di colonie in caso di piastre) secondo quanto descritto di seguito:

Per i microorganismi *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium sporogenes* e *Bacillus subtilis* inoculare 4-100 CFU, in porzioni separate di medium THIO (Fluid Thioglycolate medium pH 7.1 ± 0.2), e incubare a 30-35°C e verificare l'eventuale crescita dopo non più di 3 giorni in caso di batteri.

Per i microorganismi *Candida albicans* e *Aspergillus niger* e inoculare 4-100 CFU, in porzioni separate di medium (TSB Soya bean casein digest medium pH 7.3 ± 0.2), e incubare a 20-25°C e verificare l'eventuale crescita dopo non più di 5 giorni in caso di funghi.

Al termine del periodo di incubazione procedere all'ispezione visiva dei campioni, se si osserva evidente crescita rispetto al controllo negativo per tutti i microorganismi impiegati e in tutti i campioni, il medium si può considerare fertile.

3.3 Risultati della convalida di processo

Un processo può definirsi convalidato con successo quando viene fornita l'evidenza documentale necessaria per confermare che il processo produttivo condurrà sistematicamente alla produzione di un lotto conforme alle specifiche e ai requisiti di qualità predefiniti nello studio di fattibilità.

Il superamento dei test del controllo di qualità sul prodotto finito permetterà di avere una valutazione positiva dei lotti di convalida eseguiti in ambiente classificato di classe B e i loro limiti sono stati determinati per garantire la sicurezza del prodotto (micoplasma, endotossine, sterilità, cariotipo)..

Se tutti i test e i controlli effettuati sui tre lotti di convalida delle cellule staminali mesenchimali eseguiti in ambiente classificato B, risulteranno conformi alle specifiche richieste sia per i controlli in ingresso, sia durante il processo di produzione che sul prodotto finito, verrà confermata la riproducibilità del processo e la stabilità del prodotto.

Alla produzione dei lotti di convalida, seguirà la redazione dell'IMPD e la presentazione della domanda di autorizzazione allo studio clinico presso l'Istituto Superiore di Sanità.

3.4 Convalida dell'asepsi

Per assicurare che la produzione e il filling dei prodotti siano svolti in condizioni asettiche non basta eseguire tutti i test di qualità sul prodotto finito ma è necessario effettuare la convalida dell'asepsi mediante Media Fill.

Il Media Fill consiste in una prova di validazione di riempimento asettico usando un terreno nutriente sterile, solitamente Tryptic Soy Broth (TSB) in sostituzione del prodotto; la mancata moltiplicazione di microrganismi nel recipiente, al termine di un periodo d'incubazione, conferma il riempimento asettico. Il Media Fill viene eseguito in accordo a un foglio di lavorazione precedentemente redatto dal responsabile di produzione ed emesso dal QA.

Il FdL deve prevedere la simulazione del processo di produzione cellulare e filling in ogni sua operazione:

verifica stato di pulizia dell'impianto e dei piani di lavoro; verifica calibrazione/manutenzione attrezzature; verifica condizioni HVAC, preparazione del materiale necessario; monitoraggio ambientale dell'area interessata; esecuzione del media fill con lo stesso numero di passaggi di produzione e del filling; simulazione di eventi che potrebbero causare inquinamento (es. caduta dei tappi in caso di vial).

Per quanto riguarda la simulazione della produzione devono essere svolti un numero di passaggi superiori del 10-20% a quelli previsti per la produzione di prodotto, simulando tutte le operazioni svolte (cambi terreno, aggiunta di terreno, centrifugazione). Le operazioni devono essere concentrate in tempi più ristretti in modo da simulare in uno stesso giorno le operazioni che di solito vengono svolte in giorni diversi; in questo modo si crea una situazione peggiorativa in termini di volumi e operazioni svolte.

Per quanto riguarda la simulazione del filling le dimensioni del lotto di media fill devono essere uguali o preferibilmente superiori del 10-20% a quelle del lotto di produzione e la quantità di medium inserito nei contenitori non deve essere superiore alla metà del volume del contenitore e possibilmente deve essere uguale o maggiore a quella del lotto di produzione. Il Media fill prevede l'utilizzo dello stesso contenitore primario che verrà utilizzato in produzione. Qualora per una stessa produzione esistessero differenti formati di confezionamento primario, il Media fill deve essere eseguito sul formato maggiore in quanto l'ingombro sterico e la scarsa maneggevolezza costituiscono la peggiore condizione di lavoro.

Durante il Media fill deve essere presente una persona in più (in qualità di osservatore) rispetto a quelle strettamente necessarie, in modo tale da creare una fonte di possibili contaminazioni ambientali e una peggiore condizione di lavoro.

Il Media fill deve essere incubato sette giorni a 30-35°C, per determinare l'eventuale crescita batterica e successivamente incubate a 20-25°C per valutare la crescita di muffe. Alla fine del periodo d'incubazione deve essere eseguito il test di fertilità sul 10% dei contenitori utilizzati inoculando in caso di utilizzo di TSB in porzioni separate di medium i seguenti microorganismi: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* e *Bacillus subtilis*. Incubare a 20-25°C e verificare l'eventuale crescita dopo non più di 3 giorni in caso di batteri e non più di 5 giorni in caso di funghi

In caso di una produzione frequente (più di tre lotti in un anno per la stessa tipologia di prodotto) il media fill viene convalidato eseguendo tre media fill distinti e la convalida mantenuta ripetendo il media fill due volte l'anno. In caso di produzioni singole per tipologia di prodotto il media fill verrà effettuato in occasione della produzione. In caso di riempimenti frequenti

(più di tre in un anno) di un certo tipo di contenitori il media fill viene convalidato eseguendo 3 media fill distinti e la convalida mantenuta ripetendo il media fill due volte l'anno. In caso di riempimenti non frequenti il media fill sarà effettuato in occasione della produzione.

A fine lavorazione, il foglio di lavorazione debitamente compilato deve essere riconsegnato al QA unitamente ai dati relativi all'incubazione del media fill, del test di fertilità e/o altre eventuali registrazioni dei controlli in processo. Il QA verifica la chiarezza e completezza delle registrazioni e l'esito del media fill.

Poiché le dimensioni dei filling eseguiti per prodotti di terapie avanzate sono sempre inferiori a 5000 unità l'esito del media fill è positivo solo in caso di nessuna contaminazione. In caso di esito negativo il QA e il responsabile di produzione devono aprire un'indagine e dovrà essere eseguita la convalida del media fill (3 run) a conclusione dell'indagine e delle azioni correttive se individuate.

4. CONCLUSIONI

Allo stato attuale, l'utilizzo di cellule staminali adulte mesenchimali per applicazioni di terapia cellulare rappresenta uno dei settori della medicina di maggior interesse. Le cellule staminali mesenchimali (MSC, Mesenchymal Stem Cells), oggi coinvolte in molti studi nel settore della medicina rigenerativa, sono presenti nel midollo osseo e in altri tessuti adulti.

In particolare sono ampiamente utilizzate le cellule staminali mesenchimali prelevate da tessuto adiposo hASC (human Adipose-derived Stem Cells) in quanto sono facilmente reperibili e in grado di differenziarsi in differenti tipi cellulari (adipociti, osteociti, condrociti, miociti e neuroni). Le hASCs presentano un profilo immunofenotipico molto simile a quello osservato nelle cellule staminali mesenchimali derivate da midollo osseo (human bone marrow mesenchymal stem cells, hBM-MSC), in quanto positive a marcatori mesenchimali, quali CD29, CD44, CD73, CD90 e CD105, ma negative a marcatori endoteliali (CD31), ematopoietici (CD14, CD45 e CD34) e a molecole di adesione (CD106).

Considerata la potenzialità delle hASC, tali popolazioni cellulari rappresentano delle ottime candidate per applicazioni cliniche nella medicina rigenerativa il cui obiettivo principale è la rigenerazione o la sostituzione dei tessuti biologici danneggiati da patologie o traumi, che viene raggiunto creando dei dispositivi bioingegnerizzati, chirurgicamente impiantabili, integrando cellule, scaffold biocompatibili e fattori bioattivi (quali farmaci, citochine e fattori di crescita) in grado di promuovere la rigenerazione garantendo l'integrazione con i tessuti ospiti circostanti. Questa tecnologia trova grande applicazione in numerosi ambiti clinici come la dermatologia, la chirurgia plastica ricostruttiva, la chirurgia oro-maxillo-facciale e l'ortopedia.

Lo studio qui presentato ha messo in luce la possibilità di isolare e purificare cellule indifferenziate mesenchimali da tessuto adiposo con una metodica indolore, non invasiva e di più facile attuazione rispetto al prelievo da midollo osseo. Le cellule hASC sono capaci di crescere in coltura allo stato indifferenziato per lunghi periodi e possono subire cicli di congelamento e scongelamento senza che venga alterata la capacità proliferativa e differenziativa. Dall'analisi citofluorimetrica è stato dimostrato che le hASC conservano la natura mesenchimale staminale e la mancanza di contaminazioni con altre popolazioni cellulari. Questa natura mesenchimale è stata avvalorata dalla dimostrazione della loro potenzialità a differenziare in senso osteogenico, in cui è stato possibile, tramite colorazione istochimica, evidenziare i depositi di calcio e formazioni tipiche. La stabilità genomica è confermata in varie fasi dell'espansione in vitro e per lunghi periodi aumentando il profilo di sicurezza nel caso di applicazione in protocolli clinici.

I risultati presentati durante lo studio di fattibilità evidenziano come sia possibile trasferire protocolli di ricerca in processi potenzialmente applicabili in sperimentazione clinica. I successivi studi di convalida secondo GMP, che sono obbligatori per legge, consentiranno di consolidare tali processi e renderli idonei ad una lavorazione su larga scala, o ripetitiva.

Infatti, l'applicazione clinica di un processo di manipolazione cellulare estensiva può essere concretizzata solo mediante dimostrazione che il processo in questione è in grado di fornire costantemente il prodotto con la qualità richiesta.

Alla fine del processo di convalida che prevede la produzione di tre lotti di cellule, le specifiche previste per i controlli in ingresso, durante il processo

di produzione e sul prodotto finito devono risultare conformi a tutte le specifiche richieste.

I passi futuri sono la validazione del processo asettico, mediante l'esecuzione di tre mediafill e la valutazione del rischio relativa alla produzione di lotti destinati alla clinica, in modo da completare la serie di studi necessari per la presentazione di una domanda di autorizzazione allo studio clinico.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Regolamento (CE) N. 1394/2007 del Parlamento Europeo e del Consiglio, del 13 Novembre 2007, sui medicinali per le terapie avanzate recante modifica della direttiva 2001/83/CE e del regolamento (CE) n. 726/2004.
2. Pintus C. Terapie avanzate e medicinali innovative. Curare malattie gravi e riparare tessuti. Dialogo sui farmaci n.3/2008 pag.117
3. Fortier R.A. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications Vet Surg.;34(5):415-23 Oct (2005).
4. EU Guide To Good Manufacturing Practice (GMP) Volume 4 1999
5. Allegato I, Regolamento (CE) N. 1394/2007 del Parlamento Europeo e del Consiglio, del 13 Novembre 2007, sui medicinali per le terapie avanzate recante modifica della direttiva 2001/83/CE e del regolamento (CE) n. 726/2004.
6. Direttiva 2001/83/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 06 novembre 2001 recante un codice comunitario relativo ai medicinali per uso umano e Direttiva di modifica 2004/63/CE
7. Regolamento (CE) n. 726/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 31 marzo 2004 che istituisce procedure comunitarie per l'autorizzazione e la sorveglianza dei medicinali per uso umano e veterinario, e che istituisce l'agenzia europea per i medicinali

8. Direttiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 31 marzo 2004, sulla definizione di norme di qualità e di sicurezza per la donazione, l'approvvigionamento, il controllo, la lavorazione, la conservazione, lo stoccaggio e la distribuzione di tessuti e cellule umani

9. Direttiva 2001/20/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 4 aprile 2001 concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative degli Stati membri relative all'applicazione della buona pratica clinica nell'esecuzione della sperimentazione clinica di medicinali ad uso

10. Decreto legislativo 24/04/2006 n. 219, attuazione della direttiva 2001/83/CE relativa ad un codice comunitario concernente i medicinali per uso umano, nonché della direttiva 2003/94/CE.

11. Decreto Legislativo 24 Aprile 2006, n°219 Linea Guida per le ispezioni ai produttori di medicinali per terapie avanzate e per terapia cellulare somatica (D.S.Q/12 Rev.1 del 01.10.2007)

12. Tissue-engineering & advanced therapies Press Briefing 16 November 2005.http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/advtherapies/advanced_keydoc.htm

13. The Committee for Advanced Therapies (CAT) and the CAT Scientific Secretariat, "Challenges with advanced therapy medicinal products and how to meet them", Nature Review Drug Discovery, Volume 9, March 2010, pp.195-201.

14. Direttiva europea 2003/94/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio della Commissione dell'8 ottobre 2003 che stabilisce i principi e le linee direttrici delle buone prassi di fabbricazione relative ai medicinali per uso umano e ai medicinali per uso umano in fase di sperimentazione
15. Bini G. CTP Systems, Ingegneria in GMP della struttura produttiva per terapie avanzate. Corso
Advanced therapies, tissue engineering, cellule staminali e produzione in GMP: aspetti e problematiche. Bologna, 19 dicembre 2006.
<http://www.btm.ior.it/Allegati/6b295eab-d33a-409f-b3f7-170a20d75df2.pdf>
16. EudraLex Volume 4 EU Guidelines to Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary Use Annex 1 Manufacture of Sterile Medicinal Products, pag.3
17. Mistò R. Il controllo microbiologico degli ambienti: tra le banche di tessuti e le GMP farmaceutiche. IV
Corso di Società Italiana Banche degli Occhi. Torino, 10 Ottobre 2009
<http://www.bancheocchi.it/>
18. Li L., Neaves W.B. Normal Stem Cells and Cancer Stem Cells: The Niche Matters Cancer Res; 66: (9). May 1 (2006).
19. Li L., Xie T. Stem cell niche: structure and function. Annu Rev Cell Dev Biol. 21:605-31(2005).
20. Chen WW, Blurton-Jones M. *Concise Review: Can Stem Cells be Used to Treat or Model Alzheimer Disease?* Stem Cells. Sep (2012).

21. Piscaglia A.C. Stem cells, a two-edged sword: Risks and potentials of regenerative medicine World JGastroenterol 14(27): 4273-4279 July 21(2008).
22. Verfaillie C. M., Pera M. F., Lansdorp P. M. Stem cells: hype and reality. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 369-391(2002).
23. Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. Cell. 1997 Feb 7;88(3):287-98.
24. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. Cell. 2000 Jan 7;100(1):157-68.
25. Till JE, McCulloch EA. Hemopoietic stem cell differentiation. Biochim Biophys Acta. 1980 Nov 26;605(4):431-59.
26. Young H.E., Duplaa C., Ramos M.R. Adult reserve stem cells and their potential for tissue engineering Cell Biochemistry and Biophysics 40 (2004).
27. Jackson L., Jones DR, Scotting P., Sottile V. Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications. J Postgrad Med 2007; 121-126.
28. Krampera M. Cellule staminali mesenchimali. Seminari di ematologia oncologia 2007; 131-153.

29. Friedestein AJ., Gorskaja JF., Kulagia NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hemopoietic organs. *Exp Hematol* 1976; 4: 267-274.
30. Jiang Y., Jahagirdar BN., Reinhardt RL., et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418: 41-49.
31. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* 2001;226:507-520.
32. Ambrosi G, et al. Embriologia e organogenesi in Anatomia dell'uomo. Edi. Ermes, Editor 2001: Milano.
33. Spitalieri P, Cortese G, Pietropolli A, Filareto A, Dolci S, Klinger FG, Giardina E, Di Cesare S, Bernardini L, Lauro D, Scaldaferrì L, Citro G, Novelli G, De Felici M, Sangiuolo F. Identification of multipotent cytotrophoblastic cells from human first trimester chorionic villi. *Cloning and stem cells* (2009); 11(4):535-56.
34. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* (2006); 8: 315–317.
35. Jaiswal N et al. Differentiation of human mesenchymal stem cells by transforming growth factor β superfamily: expression of osteoblast phenotype by BMP-2 and BMP-4. *J Bone Miner Res* (2000); 14: 240.
36. Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res* (2004); 95:9–20.

37. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* (1999); 284:143–7.
38. Enomoto-Iwamoto M, Kitagaki J, Koyama E, Tamamura Y, Wu C, Kanatani N, Koike T, Okada H, Komori T, Yoneda T, Church V, Francis-West PH, Kurisu K, Nohno T, Pacifici M, Iwamoto M. The Wnt antagonist Frzb-1 regulates chondrocytes maturation and long bone development during limb skeletogenesis. *Dev Biol* (2002); 251: 142-156.
39. Sekiya I, Vouristo TJ, Larson BL, Prockop DJ. *In vitro* cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* (2002) 99:4397-4402.
40. Gang EJ, Jeong JA, Hong SH, Hwang SH, Kim SW, Yang IH, Ahn C, Kim H. Skeletal Myogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood. *Stem cells* (2004); 22:617-624.
41. Friedenstein AJ, Piatetzky S, II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 1966; 16: 381-90.
42. Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol*. 2004; 32: 414-425.
43. Dennis JE, Charbord P. Origin and differentiation of human and murine stroma. *Stem Cells* 2002; 20: 205-214.
44. Harvey C, Jan Thorsen S, Arun KG. Beyond the Vernacular: New Sources of Cells for Bone Tissue Engineering. *Plast Reconstr Surg* 2007; 122:755.

45. Zuk PA, Zhu M, Mizumo H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue:implicazion for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001; 7:211-28.
46. Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, et al. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells.*J Cell Physiol* (2001);189:54-63.
47. Sengenès C, Lolmède K, Zakaroff-Girard A, et al. Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult Mesenchymal and hematopoietic stem cells. *J Cell Physiol* (2005);205:114-122.
48. Kang YJ, Jeon ES, Song HY, et al. Role of c-Jun N-terminal kinase in the PDGF-induced proliferation and migration of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* (2005);95:1135-1145.
49. Song HY, Jeon ES, Jung JS, Kim JH. Oncostatin M induces proliferation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* (2005);37:2357-2365.
50. Rehman J, Traktuev D, Li J, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* (2004);109:1292-1298.
51. Nakagami H, Maeda K, Morishita R, et al. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2005);25:2542-2547.

52. Rehman J, Traktuev D, Li J, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* (2004);109:1292-1298.
53. Zeng Q, Li X, Beck G, et al. Growth and differentiation factor-5 (GDF-5) stimulates osteogenic differentiation and increases vascular endothelial growth factor (VEGF) levels in fat-derived stromal cells in vitro. *Bone* (2007);40:374-381.
54. Wang M, Crisostomo P, Herring C, et al. Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF and IGF-1 in response to TNF by a p38 mitogen activated protein kinase dependent mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (2006);291:880-884.
55. Mariani E, Facchini A. Clinical applications and biosafety of human adult mesenchymal stem cells. *Curr Pharm Des* 2012; 18:1821-45.
56. Pieri, Lucarelli, Corinaldesi, Aldini NN, Fini M, Parrilli A. at all Dose-dependent effect of adipose-derived adult stem cells on vertical bone generation in rabbit calvarium. *Biomaterials* 2010;31:3527-35.
57. Bonassar LJ, Vacanti CA. Tissue engineering: the first decade and beyond. *J Cell Biochem (Suppl.)* 1998; 30:297-303.
58. Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering-current challenges and expanding opportunities. *Science* 2002; 295: 1009-1014.
59. Barry FP, Boynton RE, Liu B, Murphy JM. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res* 2001; 268: 189-200.

60. Krebsbach PH, Kuznetsov SA, Satomura K, et al. Bone formation in vivo: comparison of osteogenesis by transplanted mouse and human marrow stromal fibroblasts. *Transplantation* 1997; 63: 1059-1069.
61. Schultz O, Sittinger M, Haeupl T, Burmerster GR. Emerging strategies of bone and joint repair. *Arthritis Res* 2000; 2: 433-6.
62. Caplan AL, Elyaderani M, Mochizuki Y, et al. Principles of cartilage repair and regeneration. *Clin Orthop* 1997; 342: 254-269.
63. Reddi AH. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol* 1998; 16: 247-52.
64. Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, et al. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10: 199-206.
65. Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, et al. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nature Med* 2006; 12: 459- 465.
66. Locatelli F, Corti S, Donadoni C, et al. Neuronal differentiation of murine bone marrow Thy-1- and Sca-1-positive cells. *J Hematother Stem Cells Res* 2003; 727-34.
67. Devine SM, Bartholomew AM, Mahmud N, et al. Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion. *Exp Hematol* 2001; 29: 244-255.

68. Krampera M, Cosmi L, Angeli L, et al. Role of the IFN- γ in the immunomodulatory activity of human mesenchymal stem cell. *Stem Cells* 2005; 24: 386-398.
69. Krampera M, Glennie S, Dyson J, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naïve and memory antigen-specific cells to their cognate peptide. *Blood* 2003; 101: 3722-3729.
70. Krampera M, Glennie S, Dyson J, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naïve and memory antigen-specific cells to their cognate peptide. *Blood* 2003; 101: 3722-3729.
71. Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 2005; 105: 2821-2827.
72. Lazarus HM, Koc ON, Devine SM, et al. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11: 389- 398.
73. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graftversus- host disease with third party aploidentical mesenchymal stem cells. *The Lancet* 2004; 363: 1439-1441.