AZIENDA OSPEDALIERO – UNIVERSITARIA DI SASSARI

Via M.Coppino, 26 - 07100 SASSARI – C.F. - P. IVA 02268260904

Deliberazione n. 148 del 31/03/2008

OGGETTO: ***Autorizzazione allo svolgimento del Protocollo di Studio clinico 3 Maggio 2006, dal titolo: Phenotypic and functional modification of dentitic cells in MS patients treated with Glatiramer Acetate", presso la Clinica.***

L'anno duemilaotto, il giorno 31 del mese di marzo, in Sassari, nella sede legale dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria

IL DIRETTORE GENERALE pro tempore
Prof. Antonello Ganau

VISTO il Decreto Legislativo n. 517 del 21 dicembre1999;

VISTO il Protocollo d'Intesa sottoscritto dalla Regione Sardegna e dalle Università di Cagliari e di Sassari in data 11 ottobre 2004;

VISTO l'Accordo Regione-Università di Sassari, sottoscritto in data 12.07.2005;

VISTA la Deliberazione della Giunta Regionale della Sardegna n. 17/2 del 27 aprile 2007, con la quale è stata costituita l'Azienda Ospedaliero – Universitaria di Sassari;

VISTO il Decreto n. 56 del 28 giugno 2007 con il quale il Presidente della Regione Autonoma della Sardegna ha nominato il Direttore Generale dell'Azienda Ospedaliero – Universitaria di Sassari nella persona del Dott. Giovanni Battista Cherchi;

TENUTO CONTO che il Dott. Giovanni Battista Cherchi ha assunto la funzione di Direttore Generale dell'Azienda Ospedaliero - Universitaria di Sassari il giorno 2 luglio 2007, data di stipulazione del relativo contratto;

DATO ATTO che nell'Azienda, ai sensi e per gli effetti della su citata DGR n. 17/2/07, sono confluite le strutture universitarie dell'ex Policlinico Universitario e le cliniche universitarie convenzionate con la ASL n. 1, con il personale ad esse afferente;

PREMESSO che il Prof. Stefano Sotgiu, afferente alla Clinica Neurologica dell'Azienda diretta dal Prof. Giulio Rosati, ha chiesto l'autorizzazione - ai sensi e per gli effetti del DM 17/12/2004 "Prescrizioni e condizioni di carattere generale, relative all'esecuzione delle sperimentazioni cliniche dei medicinali, con particolare riferimento a quelle ai fini del miglioramento della pratica clinica, quale parte integrante dell'assistenza sanitaria" – allo svolgimento di uno studio clinico no profit, monocentrico, prospettico, non randomizzato, in aperto dal titolo "Phenotypic and functional modification of dentitic cells in MS patients treated with Glatiramer Acetate", con la somministrazione del prodotto glatimer Acetato (Copaxone), distribuito in Italia da Sanofi Aventis al S.p.a;

CONSIDERATO che il competente Comitato etico della ASL n. 1 di Sassari, con decisione assunta il 21.11.2007, con verbale n.642/L ha espresso il proprio parere etico favorevole in merito al Protocollo di Studio suindicato, ai sensi e per gli effetti del D.M. 18.03.1998, del D.Lgs. 211 del 24.06.03, successive modificazioni ed integrazioni;

DATO ATTO della disponibilità della Sanofi- Aventis S.p.a a contribuire alla copertura delle spese aggiuntive derivanti dalla conduzione della sperimentazione;

DATO ATTO - che il Centro assicura di possedere la preparazione, le attrezzature ed il personale necessari per la esecuzione della sperimentazione garantendo, altresì l'osservanza del protocollo in questione da parte del personale coinvolto;

- che lo Sperimentatore principale aziendale dello Studio clinico sopra specificato si individua nella persona del Prof. Stefano Sotgiu,, afferente alla Clinica Neurologica dell'Azienda diretta dal Prof. Giulio Rosati presso le cui strutture sanitarie sarà condotto lo studio medesimo;
- che lo studio sarà e sarà condotto nel rispetto della vigente normativa in materia, in particolar modo delle norme di GCP recepite con DM Ministero della Sanità del 15.07.1997 altresì secondo la Circolare Ministeriale nr. 6 del 2 settembre 2002 e sarà svolto ai sensi e agli effetti del Decreto Ministeriale 17/12/2004 e secondo i criteri e le modalità descritte nel Protocollo di Sperimentazione esaminato già valutato con esito positivo dal Comitato Etico competente;

VISTA la convenzione, allegata quale parte integrante e sostanziale del presente provvedimento, relativa alla disciplina dei rapporti tra le parti inerenti lo svolgimento della sperimentazione;

DATO ATTO infine che, ai sensi dell'art. 3, comma 6, D.Lgs. 502/92, in vacanza dell'ufficio e in quanto direttore più anziano per età, il Direttore Sanitario esercita le funzioni di Direttore Generale *pro tempore*;

PRESO ATTO del parere positivo espresso dal Direttore Amministrativo;

DELIBERA

per le motivazioni espresse in premessa da intendersi qui integralmente richiamate

1) di prendere atto del parere favorevole espresso in data 21/11/2007 dal Comitato di Bioetica dell'ASL n.1 di Sassari in merito al Protocollo di Studio clinico studio clinico no profit, monocentrico, prospettico, non randomizzato, in aperto dal titolo "Phenotypic and functional modification of dentitic cells in MS patients treated with Glatiramer Acetate", con la somministrazione del prodotto glatimer Acetato (Copaxone), distribuito in Italia da Sanofi Aventis al S.p.a , da svolgersi presso la Clinica Neurologica sotto la responsabilità e il coordinamento del Prof. Stefano Sotgiu, ai sensi e per gli effetti del D.M. 18.03.1998, del D.L.gs. 211 del 24 giugno 2003 e successive modificazione ed integrazioni;

2) di autorizzare lo svolgimento della sopraccitata Sperimentazione Clinica presso la Clinica Neurologica;

3) di individuare nel Prof. Stefano Sotgiu, afferente alla Clinica di Neurologia diretta dal Prof. GiulioRosati, il Responsabile Scientifico aziendale nonché lo Sperimentatore principale nella conduzione dello Studio;

4) di prendere atto della disponibilità della Sanofi- Aventis S.p.a relativa alla contribuzione alle spese aggiuntive derivanti dalla conduzione della sperimentazione;

5) di approvare la convenzione, allegata quale parte integrante e sostanziale del presente provvedimento, relativa alla disciplina dei rapporti tra le parti inerenti lo svolgimento della sperimentazione.

IL DIRETTORE AMMINISTRATIVO
(Dott. David Harris)

IL DIRETTORE GENERALE pro tempore
(Prof. Antonello Ganau)

Allegato 1

SCRITTURA PRIVATA

tra

SANOFI-AVENTIS S.p.A., con sede legale ed uffici in Viale Bodio 37/b, 20158 Milano, Codice Fiscale e Partita I.V.A. n. 00832400154, rappresentata dal Dr. Daniel LAPEYRE, Presidente e Amministratore Delegato

(di seguito "**sanofi-aventis**")

e

AZIENDA OSPEDALIERO-UNIVERSITARIA di SASSARI, con sede legale in Via Michele Coppino n° 26, 07100 Sassari, Codice Fiscale e Partita IVA 02268260904, rappresentata dal Direttore Sanitario Prof. Antonello GANAU nell'esercizio delle funzioni di direttore generale pro-tempore domiciliato nella carica di cui sopra.

(di seguito il "**Promotore**")

(sanofi-aventis ed il Promotore, di seguito, congiuntamente, le "Parti")

Premesso che

- Il Promotore intende promuovere e condurre, presso la Clinica Neurologica diretta dal Prof. G. Rosati, sotto la responsabilità e coordinamento del Prof. S. Sotgiu, uno studio clinico no profit, monocentrico, prospettico, non randomizzato, in aperto,
  - dal titolo: "Phenotypic and functional modification of dendritic cells in MS patients treated with Glatiramer Acetate",
  - prodotto somministrato : Glatiramer Acetato (Copaxone®), di titolarità della società Teva Pharmaceuticals Ltd., 5 Chancery Lane, Clifford's Inn, Londra EC4A 1BU, UK, distribuito in Italia da sanofi-aventis (di seguito il "Prodotto")
  - Protocollo di studio versione del 3 Maggio 2006 (il "Protocollo")

  (di seguito la "Sperimentazione").

- Tale Sperimentazione, promossa dal Promotore ai sensi e per gli effetti del Decreto Ministeriale 17/12/2004 "Prescrizioni e condizioni di carattere generale, relative all'esecuzione delle sperimentazioni cliniche dei medicinali, con particolare riferimento a quelle ai fini del miglioramento della pratica clinica, quale parte integrante dell'assistenza sanitaria", è stata autorizzata, a norma delle disposizioni di cui al DL 24 giugno 2003 n. 211 e al succitato DM 17/1272004, dal Comitato Etico della ASL n. 1 di Sassari, nella seduta del 21/11/2007, Verbale n. 642/L.

- Il Promotore ha chiesto a sanofi-aventis di contribuire copertura delle spese aggiuntive derivanti dalla conduzione della Sperimentazione e sanofi-aventis, rilevata la valenza scientifica del Protocollo e delle finalità della Sperimentazione, si è dichiarata disponibile a fornire un contributo economico, previa sottoscrizione del presente Accordo, alle condizioni e con le modalità appresso indicate.

- Il Promotore ha autorizzato l'esecuzione della Sperimentazione presso le strutture della Clinica di Neurologia, con deliberazione n. ..... del .....

Tutto ciò premesso e preso atto che dette premesse fanno parte integrante e sostanziale della presente Convenzione

LE PARTI CONVENGONO E STIPULANO QUANTO SEGUE:

ARTICOLO 1. OGGETTO

1.1. L'oggetto del presente Accordo è di definire i termini e le condizioni dell'erogazione del supporto economico da parte di sanofi-aventis ai fini dello svolgimento della Sperimentazione conformemente al Protocollo di cui si allega la sinossi, quale parte integrante e sostanziale dell'Accordo stesso. Il presente Accordo è stato approvato da sanofi-aventis groupé ed il Protocollo è stato registrato nel registro Clubnet con il n° GLATI_L_01455.

1.2 Il Promotore assicura che l'erogazione del contributo economico da parte di sanofi-aventis è stata debitamente comunicata al Comitato Etico della ASL n. 1 di Sassari, ai sensi dell'Art. 2, comma 6, DM 17/12/04 ("*Per le sperimentazioni di cui all'art. 1, l'eventuale utilizzo di fondi, attrezzature, farmaci, materiale o servizi messi a disposizione da aziende farmaceutiche o comunque da terzi deve essere comunicato all'atto della richiesta di parere del Comitato etico e di autorizzazione dell'Autorità competente di cui al decreto legislativo n. 211 del 2003*").

ARTICOLO 2. OBBLIGHI DEL PROMOTORE

2.1 Il Promotore si obbliga ad eseguire la Sperimentazione nel rispetto delle disposizioni normative italiane ed europee applicabili e, in particolare, nel rispetto delle linee guida ICH per la Buona Pratica Clinica e delle disposizioni a tutela della sicurezza e benessere del paziente e dei suoi dati personali.

La Sperimentazione, della durata di 2 anni, si svolgerà sotto la responsabilità scientifica e coordinamento del Prof. Stefano Sotgiu (di seguito il "Responsabile Scientifico"), presso l'Istituto di Clinica Neurologica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Sassari diretta dal Prof. G. Rosati. Si prevede di arruolare, nell'arco di 6 mesi a decorrere dal 31/03/2008, circa 15 pazienti e 15 soggetti di controllo sani, di età e sesso confrontabili. Il periodo di trattamento e follow-up dei pazienti sarà di 18 mesi (conclusione prevista entro il 31/03/2010). Il report clinico statistico dovrebbe pertanto essere disponibile entro il 30/06/2010.

2.2 Il Promotore e, per esso, il Responsabile Scientifico, è responsabile degli obblighi in tema di farmacovigilanza nei confronti delle autorità competenti, nel rispetto dei tempi previsti dalla normativa, e ha inoltre l'obbligo (Art. 3 comma 1 DM17/12/04) di segnalare alla società Teva Pharmaceuticals Ltd. - 5 Chancery Lane, Clifford's Inn, Londra EC4A 1BU, UK - titolare dell'A.I.C. del Prodotto, le reazioni e gli eventi avversi di cui all'art. 16, commi 1 e 2 e Art. 17 commi 3 e 5 del D. Lgs 211/03, unitamente ad ogni informazione di farmacovigilanza inoltrata alle autorità competenti (rapporti periodici o comunque ogni altro aspetto relativo alla sicurezza della specialità emerso durante lo svolgimento della Sperimentazione).

Il Promotore s'impegna inoltre affinché ogni informazione di farmacovigilanza inoltrata

alle autorità competenti (SUSAR o rapporti periodici o comunque ogni altro aspetto relativo alla sicurezza del Prodotto emerso durante lo svolgimento della Sperimentazione) venga contemporaneamente inoltrata al servizio di farmacovigilanza di sanofi-aventis, per fax al numero. n. 02/39327209.

2.3 Il Promotore dovrà garantire un'adeguata conduzione della Sperimentazione, assumendosi la responsabilità di ogni decisione di ordine medico ad essa relativa nonché della affidabilità del Prodotto sulla base e nei limiti delle informazioni contenute nella documentazione trasmessa da sanofi-aventis come previsto all'articolo 3.2.

2.4 Il Promotore invierà a sanofi-aventis dei rapporti periodici sullo stato di avanzamento della Sperimentazione e, fermo restando l'assoluto anonimato dei pazienti, sul numero di pazienti arruolati e in trattamento affinché sanofi-aventis possa aggiornare il proprio registro Clubnet; nonché il rapporto finale sui risultati ottenuti.

Sanofi-aventis ha designato il Dr. Sergio Sommacal (Medical Manager) quale referente del Promotore per la gestione del presente Accordo, il ricevimento dei suddetti rapporti e per ogni altra informazione di natura scientifica che si rendesse necessario nel corso della Sperimentazione.

ARTICOLO 3. CONTRIBUTO E OBBLIGHI DI SANOFI-AVENTIS

3.1 sanofi-aventis s'impegna ad erogare, direttamente al Promotore e alle condizioni appresso indicate, un importo non superiore ad Euro 50.000,00 (cinquantamila/00) + IVA, che il Promotore fatturerà come segue

- Euro 25.000,00 (venticinquemila/00) + IVA, dopo la firma del presente Accordo, a copertura dei costi di avviamento della Sperimentazione;
- Euro 25.000,00 (venticinquemila/00) + IVA al termine dell'arruolamento, previo ricevimento del rapporto del Responsabile Scientifico sull'andamento della Sperimentazione e dichiarazione di regolare prosecuzione della stessa.

Qualora la Sperimentazione fosse interrotta prima dell'erogazione della seconda rata, la stessa non sarà più dovuta e sanofi-aventis non avrà alcun ulteriore obbligo nei confronti del Promotore ed il presente Accordo si risolverà ipso iure.

I pagamenti saranno effettuati a mezzo bonifico bancario a 60 giorni fine mese data fattura, sul c/c n. 4160348, ABI 01015, CAB 17201, Agenzia n. 1 del Banco di Sardegna, intestato ad !Azienda Ospedaliero – Universitaria di Sassari, dopo l'emissione da parte del Promotore di regolare fattura. Le fatture del Promotore dovranno tassativamente riportare i seguenti riferimenti:

- Studio No Profit ET.ST.CNS 02/07MP
- Ordine numero 4700079070

In mancanza di tali riferimenti, le fatture non potranno essere elaborate dal servizio contabile di sanofi-aventis.

3.2 Ai sensi e per gli effetti dell'Art. 4, comma 2, DM 17/12/04, Teva Pharmaceuticals Ltd. trasmetterà al Promotore le reazioni avverse serie e inattese e ogni rilevante variazione del profilo di sicurezza del Prodotto somministrato ai fini della Sperimentazione nonché copia della versione aggiornata del Dossier per lo Sperimentatore, fatta salva la confidenzialità dei dati inerenti agli aspetti industriali.

ARTICOLO 4. PROPRIETA' INTELLETTUALE

4.4 Sia il Promotore, sia sanofi-aventis mantengono i diritti di proprietà intellettuale da loro acquisiti prima della firma del presente Accordo ed inerenti ad una o più parti della Sperimentazione o del Prodotto. Il presente Accordo non conferisce ad una Parte alcun diritto o licenza di utilizzo di qualunque brevetto o marchio di proprietà dell'altra Parte.

4.5 Il Promotore e, per esso, il Responsabile Scientifico, è titolare a tutti gli effetti dei risultati della Sperimentazione.

4.6 sanofi-aventis potrà utilizzare i risultati della Sperimentazione ai soli fini scientifici, ad esclusione di qualsiasi utilizzo diretto ai fini industriali.

ARTICOLO 5. OBBLIGO DI RISERVATEZZA

5.1 Ciascuna delle Parti si obbliga, durante il periodo di validità del presente Accordo e per un periodo di 10 (dieci) anni dal suo termine, a mantenere strettamente riservate e a non comunicare, in tutto o in parte, a terzi, le informazioni riservate dell'altra Parte ricevute o generate in ragione del presente Accordo, e ad utilizzare tali informazioni riservate esclusivamente ai fini dell'esecuzione dell'Accordo e dello svolgimento della Sperimentazione.

5.2 Non costituiscono informazioni riservate, le informazioni che:

(i) siano pubbliche al momento della sottoscrizione del presente Accordo o lo divengano successivamente, purché ciò non avvenga in conseguenza della violazione del presente Accordo o di un obbligo di riservatezza sussistente in capo a terzi;
(ii) siano state legittimamente comunicate da terzi non vincolati da un obbligo di riservatezza nei confronti del proprietario delle informazioni riservate;
(iii) debbano essere rese pubbliche ai sensi di una disposizione normativa imperativa o per ordine di una pubblica autorità, purché la Parte proprietaria delle informazioni riservate sia tempestivamente informata della divulgazione;
(iv) siano sviluppate da una Parte, indipendentemente dalle informazioni riservate o di proprietà dell'altra Parte.

ARTICOLO 6. PUBBLICAZIONI

6.1 Il Promotore s'impegna a rendere pubblici e in maniera tempestiva i risultati della Sperimentazione, utilizzando anche la sezione specifica dell'Osservatorio Nazionale sulle sperimentazioni e/o o altro registro pubblico europeo.

6.2 sanofi-aventis non ha alcun facoltà di veto sulle pubblicazioni dei risultati della

Sperimentazione. Tuttavia, affinché possano essere tutelati i diritti di proprietà intellettuale del titolare del Prodotto oggetto della Sperimentazione, il Promotore accetta di concedere a sanofi-aventis il diritto di visionare e commentare qualsiasi progetto di presentazione o pubblicazione dei risultati della Sperimentazione. A questo fine il Promotore invierà a sanofi-aventis il progetto (i) di abstract con 2 settimane di anticipo e (ii) di pubblicazione con 4 settimane di anticipo, rispetto alla data prevista di divulgazione.

ARTICOLO 7. DURATA E RISOLUZIONE

7.1 Il presente Accordo decorre dalla data di sottoscrizione e rimarrà in vigore fino alla conclusione della Sperimentazione ed invio del rapporto finale, previsto entro Giugno 2010.

7.2 Una o l'altra Parte avrà la facoltà, a suo insindacabile giudizio, di risolvere anticipatamente il presente Accordo in caso di insorgenza di eventi suscettibili di mettere in pericolo la salute o sicurezza dei pazienti arruolati o qualora la finalità della Sperimentazione diventi obsoleta, o a seguito di una decisione delle autorità competenti. La Parte che intende risolvere l'Accordo dovrà informare l'altra tramite lettera raccomandata a.r. e la risoluzione prenderà effetto dalla data di ricevimento della raccomandata.

7.3 Ciascuna Parte potrà inoltre risolvere immediatamente, con comunicazione per mezzo di raccomandata a.r. e senza ulteriore preavviso, il presente Accordo qualora l'altra Parte sia inadempiente anche ad una sola delle proprie obbligazioni e non abbia rimediato all'inadempimento nel termine di 30 giorni dal ricevimento della relativa diffida a adempiere, trasmessa dalla Parte non inadempiente per mezzo di raccomandata a.r.

7.4 La risoluzione anticipata notificata come previsto ai punti 7.2 o 7.3 sopra, esonera la Parte richiedente la risoluzione da qualsivoglia responsabilità o risarcimento e non comporterà, pertanto, alcun diritto dell'altra Parte di avanzare pretese risarcitorie o richieste di pagamento.

ARTICOLO 8. GARANZIE E RESPONSABILITA'

8.1 Il Promotore svolgerà la Sperimentazione nel rispetto delle finalità del Protocollo e delle norme di legge. Ferma restando la responsabilità del produttore del Prodotto, ai sensi delle Norme di Buona Fabbricazione e della normativa in materia di sperimentazioni, il Promotore terrà sanofi-aventis indenne e manlevata da ogni responsabilità inerente alla Sperimentazione e relative finalità e modalità di svolgimento.

8.2 Il Promotore s'impegna nello svolgimento dell'attività di Sperimentazione a rispettare le disposizioni di cui al Decreto Legislativo 196 del 30.06.2003 e all'autorizzazione 2/2007 del Garante per la tutela dei dati delle persone.

Il Promotore garantisce di aver stipulato idonea polizza di responsabilità civile, a tutela dei pazienti arruolati nella Sperimentazione, ivi compresa la copertura delle conseguenze pecuniarie dei danni diretti o indiretti da loro subiti e derivanti dalla Sperimentazione, compresi i costi per il loro trattamento medico, qualora si verificassero complicanze causate dalla Sperimentazione.

ARTICOLO 9. NORME GENERALI

9.1 Con la sottoscrizione del presente Contratto, ciascuna Parte dichiara di essere informata sull'utilizzo dei suoi dati personali, e dà il proprio esplicito consenso, per i seguenti fini: i dati personali di ciascuna Parte e delle persone che per essa agiscono, sono raccolti, registrati, riordinati, memorizzati ed utilizzati per attività funzionali alla stipulazione ed alla esecuzione del rapporto contrattuale in essere tra le medesime Parti. Tali dati potranno altresì essere comunicati a terzi, qualora tale comunicazione sia necessaria in funzione degli adempimenti, diritti e obblighi, connessi all'esecuzione del presente Contratto, ovvero renda più agevole la gestione dei rapporti dallo stesso derivanti.

Le Parti prendono altresì atto dei diritti a loro riconosciuti dall'art.7 del Decreto Legislativo 196/2003 (Codice in materia di protezione dei dati personali) ed in particolare del diritto di richiederne l'aggiornamento, l'integrazione, la modifica, la rettifica o la cancellazione.

Le previsioni di cui al presente articolo assolvono i requisiti d'informativa e consenso di cui al succitato Decreto Legislativo.

9.2 Qualsiasi modifica al presente Accordo dovrà essere formalizzata tramite atto scritto e firmato da entrambe le Parti.

9.3 Il presente Accordo, stipulato sotto forma di scrittura privata non autenticata, è soggetto alla registrazione in caso d'uso. Le spese di bollo sono a carico di sanofi-aventis. Le spese di registrazione saranno a carico della Parte che avrà interesse a richiederla.

9.4 Qualsiasi controversia che dovesse insorgere tra le Parti circa la validità, l'interpretazione, l'esecuzione e la risoluzione del presente Accordo che le Parti non fossero in grado di risolvere in modo amichevole, sarà attribuita alla competenza esclusiva del Tribunale di Sassari.

9.5 Il Promotore non può trasferire a terzi diritti ed obbligazioni derivanti dal presente Accordo senza previo consenso di sanofi-aventis.

sanofi-aventis può cedere e/o trasferire i diritti di cui al presente Accordo ad un suo successore o ad una società appartenente allo stesso gruppo a condizioni che il cessionario accetti tutte le condizioni ed obbligazioni del presente Accordo.

Letto, accettato e sottoscritto, in 3 (tre) esemplari originali di cui 2 (due) per il Promotore e 1 (uno) per sanofi-aventis

Per SANOFI-AVENTIS S.p.A.

Il Presidente e Amministratore Delegato
Dr. Daniel LAPEYRE Data: _____ Firma: _____

Il Chief Financial Officer
Giuliano REDAELLI Data: _____ Firma: _____

Per il Promotore – AZIENDA OSPEDALIERO-UNIVERSITARIA di SASSARI

Il Direttore Generale
Prof. Antonello GANAU Data: _____ Firma: _____

Il Direttore della Clinical Neurologica
Prof. Giulio ROSATI Data: _____ Firma: _____

Il Responsabile della Sperimentazione
Prof. Stefano SOTGIU Data: _____ Firma: _____

SINTESI DEL PROTOCOLLO DI STUDIO
Versione del 3 Maggio 2006

PHENOTYPIC AND FUNCTIONAL MODIFICATION OF DENDRITIC CELLS IN MS PATIENTS TREATED WITH GLATIRAMER ACETATE

Institute of Clinical Neurology, University of Sassari, Italy.
Running title: Glatiramer acetate and dendritic cells in multiple sclerosis
Key words: Glatiramer acetate, multiple sclerosis, dendritic cells, lymphocytes, cytokines

1. BACKGROUND

According with present concepts on multiple sclerosis (MS) pathogenesis, infiltrating auto-reactive Th1 cells induce a complex pro-inflammatory cascade causing demyelination and axonal loss throughout the central nervous system [1].

Dendritic cells (DC) are the most effective antigen presenting cells (APC), able of priming naïve T cells toward either Th1 or Th2 subsets [2-3]. Depending on environmental instructions provided by both antigen type and cytokine milieu, monocyte-derived DC can be polarised into either Th1-driving DC_1 by IL-12 and IFN-γ [4, 5], or Th2-driving DC_2 by prostaglandin E2 [6]. Thus, DC-modulated adaptive immune response could be determinant in MS phenomenology [7, 8].

Recently a panel of mAbs has been generated that identify three presumably novel human dendritic cell antigens (Ags): BDCA-1, BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4. In blood, BDCA-2 and BDCA-4 are expressed on CD11c(-CD123bright) plasmacytoid dendritic cells, whereas BDCA-3 and –1 are expressed on small population of CD11c(+) CD123(-) dendritic cells. All these Ags are not detectable on a third blood dendritic cell population, which is CD1c(+) CD11c(bright) CD123(dim), or on any other cells in blood. BDCA-4 is also expressed on monocyte-derived and CD34(+) cell-derived dendritic cells. Expression of all three Ags dramatically changes once blood dendritic cells undergo in vitro maturation. BDCA-2 is completely down-regulated on plasmacytoid CD11c(-) CD123(bright) dendritic cells, expression of BDCA-3 is up-regulated on both plasmacytoid CD11c(-) CD123(bright) dendritic cells and CD1c(+) CD11c(bright) CD123(dim) dendritic cells, and expression of BDCA-4 is up-regulated on CD1c(+) CD11c(bright) CD123(dim) dendritic cells.[9]

Glatiramer acetate (GA; also known as Copolymer-1; Copaxone) is an approved therapy for MS that reduces both clinical and radiological disease activities [10-12].GA is a randomised mixture of synthetic peptides composed of four amino acids, selectively competing with activation and cytokine production of myelin basic protein (MBP)-specific auto-aggressive Th1 cells [13, 14], and inducing MBP-specific Th2-regulatory cells [13]. Although bystander suppression [15-17] and increased IL-10 production [18, 19] have been reported, mechanisms involved in GA-initiated Th2 responses are incompletely understood. According with the presence of both a systemic change of the APC system in GA-treated patients [20] and of an altered cytokine production from GA-treated DC [19], Farina and colleagues elegantly support the working idea that GA may positively act in MS also by changing the intrinsic properties of APC, including DC [21].

2. AIM OF THE PROJECT

Recently our group has found that in MS patients the percentage of plasmocytoid DCs is lower in MS patients compared to HC. Correspondingly, MNCs produce lower amounts of protective cytokines (manuscipt in preperation) compared to healthy controls.

Aim of this research project is to investigate the effects *in vivo* of GA on the percentage of monocytoid and plasmocytoid DCs and on protective cytokine production at different time points of GA treatment. As it will be specified in detail, we have chosen four time points (3, 6, 12 and 18 months) during the GA treatment of a cohort of MS patients. We will identify the DC utilizing that panel of mAbs that identify the novel human dendritic cell Ags.

3. MATERIALS AND METHODS

Patients and controls

Fifteen untreated patients with clinically definite MS, with more than three MS-like lesions on brain MRI and cerebrospinal fluid (CSF)-restricted oligoclonal IgG bands, will be included in the study. All patients will receive daily GA treatment. Fifteen age- and sex-matched healthy controls will also be recruited. Ethical approval will be previously required and all subjects will be asked to give their written informed consent prior to their inclusion to the study.

Preparation of the cells

30 ml of blood will be obtained from MS patients before starting GA treatment and after three, six, twelve and eighteen months of treatment.

30 ml of blood will be obtained from HC at the same time of MS patients sampling.

Peripheral blood mononuclear cells (MNC) will be isolated from heparinized blood by centrifugation on a discontinuous density gradient (Lymphoprep; 1.077 g/ml; Nycomed, Oslo, Norway).

$2*10^6$ MNCs will be phenotyped by flow cytometry; $2*10^6$ MNCs will be cultured for 48 hours in complete medium.

Culture medium

RPMI 1640 (Gibco, Paisley, Scotland) will be used as culture medium, supplemented with 2mM L-glutamine, 1% non-essential amino acids, 10% fetal calf serum, 50 U/ml penicillin and 50 μg/ml streptomycin (all from Gibco).

Flow cytometer analysis

The following monoclonal antibodies (mAbs) will be purchased for plasmocytoid and

monocytoid dendritic cell recognition: fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated lineage cocktail (CD3, CD19, CD20, CD16, CD56, CD14), phycoerythrin (PE)-CD123, periclinin chlorophyll protein (PerCP)-conjugated HLA-DR (Becton and Dickinson, San José, CA). Blood dendritic cell antigen (BDCA) mAbs will be purchased from Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany): FITC and PE-BDCA-2, PE-BDCA-4, FITC-BDCA-1, PE-BDCA-3. Isotype matched control mAbs will be PE-CD11c PE-, FITC- or PerCP-conjugated IgG1 or IgG2a or 2b (Becton and Dickinson).

The frequencies of BDCA-2 and CD123 double positive cells reflecting whole pDC subset, BDCA-2$^+$lineage$^-$ and BDCA-4$^+$lineage$^-$ pDC and the BDCA-2$^+$lineage$^+$ and BDCA-4$^+$lineage$^+$ subsets were measured by flow cytometry using two colour staining.

The frequencies of BDCA-1 or 3 and CD11c double positive cells reflecting whole pDC subset, BDCA-1$^+$lineage$^-$ and BDCA-3$^+$lineage$^-$ pDC and the BDCA-1$^+$lineage$^+$ and BDCA-3$^+$lineage$^+$ subsets will be measured by flow cytometry using two colour staining.

Measurement of cytokines by ELISA

After 48 hours of MNC colture, cell supernatant will be collected. Each sample will be tested in duplicate for IL-2, IL-4, IL-6, IL-10,IL-12, BDNF, MMP2 and 9, TIMP-1.

Statistics

The statistical analysis of the study results will be performed by using mean and standard deviation (SD). The "horizontal" comparison within each group before and after treatment at different time points (after 3, 6, 12, 18 months) will be performed by using the paired two-tailed T-test. Also, the unpaired two-tailed T-test will be used for "vertical" comparison between patients and controls. Significance level (p) will be conventionally set at <0.05.

4. MAIN ASPECTS TO INVESTIGATE

a) Expression of BDCA antigens on DCs before and during GA treatment;
b) MMP- 2 and 9 and TIMP-1 and 2 production by MNC before and at different time points during GA treatments in MS *in vivo* in relation to BDCA expression on DC.
b) Th1/Th2 profile by MNC before and at different time point of GA treatments in MS *in vivo* in relation to BDCA expression on DC.
c) BDNF production by MNC before and at different time point of GA treatments in MS *in vivo* in relation to BDCA expression on DC.

5. DURATION OF THE STUDY

The duration of the study will be approximately of 24 months.

6. REFERENCES

1. Olsson T. Humanized antibodies against an adhesion molecule block the CNS inflammation in multiple sclerosis. Lakartidningen 2003;100:1705.
2. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. Nature 1998;392:245-52.
3. Kalinski P, et al. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. Immunol Today1999; 20:561-7.
4. Hilkens CM, et al. Human dendritic cells require exogenous interleukin-12- inducing factors to direct the development of naive T-helper cells toward the Th1 phenotype.Blood 1997; 90:1920-6.
5. Vieira PL, et al. Glatiramer acetate (copolymer-1, copaxone) promotes Th2 cell development and increased IL-10 production through modulation of dendritic cells. J Immunol 2003; 170:4483-12.
6. Kalinski P, et al. Dendritic cells, obtained from peripheral blood precursors in the presence of PGE2, promote Th2 responses. Adv Exp Med Biol 1997;417: 363-7.
7. Pashenkov M, et al. Cerebrospinal fluid affects phenotype and functions of myeloid dendritic cells. Clin Exp Immunol 2002; 128: 379-87.
8. Pashenkov M, et al. Inflammation in the central nervous system: the role for dendritic cells. Brain Pathol 2003;13:23-33.
9. Dzionek A, et al. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. J Immunol. 2000 Dec 1;165(11):6037-46.
10. Johnson KP, et al. Glatiramer acetate (Copaxone): comparison of continuous versus delayed therapy in a six-year organized multiple sclerosis trial. Mult Scler 2003;9:585-91.
11. Comi G, Moviola L. Glatiramer acetate. Neurologia 2002;17:244-58.
12. Paty D, et al. Interferons in relapsing remitting multiple sclerosis. Lancet 2003;361:1822-4.
13. Aharoni R, et al. Glatiramer acetate-specific T cells in the brain express T helper 2/3 cytokines and brain-derived neurotrophic factor in situ. Proc Natl Acad Sci 2003;100: 14157-62.
14. Neuhaus O, et al. Immunomodulation in multiple sclerosis: from immunosuppression to neuroprotection. Trends Pharmacol Sci 2003;2:131-8.
15. Dhib-Jalbut S, et al. Glatiramer acetate-reactive peripheral blood mononuclear cells respond to multiple myelin antigens with a Th2-biased phenotype. J Neuroimmunol 2003; 140: 163-71.
16. Putheti P, et al. Effect of glatiramer acetate (Copaxone) on CD4+CD25high T regulatory cells and their IL-100 production in multiple sclerosis. J Neuroimmunol 2003; 144:125-31.
17. Rieks M, et al. Induction of apoptosis of CD4+ T cells by immunomodulatory therapy of multiple sclerosis with glatiramer acetate. Eur Neurol 2003;50:200-6.
18. Hussien Y, Sanna A, et al. Glatiramer acetate and IFN-beta act on dendritic cells in multiple sclerosis.J Neuroimmunol 2001; 121:102-10.
19. Vieira PL, et al. Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. J Immunol 2000;164:4507-12.
20. Weber MS, et al. Multiple sclerosis: glatiramer acetate inhibits monocyte reactivity in vitro and in vivo. Brain 2004;127:1370-8.
21. Farina C, et al. Glatiramer acetate in multiple sclerosis: update on potential mechanisms of action. Lancet Neurol 2005;4:567-75.

Responsabile Struttura Proponente – Direttore Amministrativo Estensore _____	VISTO Del Responsabile della Contabilità Economica in ordine alla correttezza dell'attribuzione della spesa al relativo conto di contabilità generale. Il Responsabile della Contabilità Economica

La presente deliberazione è in pubblicazione all'Albo Pretorio di questa Azienda Ospedaliero - Universitaria di Sassari dal 08/04/08 per la durata di quindici giorni.

Il Direttore Amministrativo
(Dott. David Harris)