Laura Ceriotti e Marisa Meloni
Vitroscreen

Dispositivi Medici

La sicurezza dei dispositivi medici: aggiornamenti regolatori e scientifici

Valutazione della biocompatibilità dei dispositivi medici

La Direttiva 93/42/CE esplicita nell'allegato I i requisiti generali secondo i quali i *Dispositivi Medici* (DM) devono essere progettati e fabbricati in modo che la loro utilizzazione non comprometta lo stato clinico o la sicurezza dei pazienti, come anche la sicurezza e la salute degli utilizzatori ed eventualmente di terzi, quando vengano rispettate le condizioni e gli usi previsti. Non esistono dispositivi medici senza rischi, ma fondamentale è che qualsiasi effetto collaterale, o comunque negativo, debba costituire un rischio accettabile rispetto alle prestazioni previste e garantite durante la vita dei DM indicata dal fabbricante.

La sicurezza dei DM progettati per essere usati nell'uomo, richiede innanzitutto la valutazione biologica dei materiali. La valutazione deve essere acquisita con certezza tramite test sperimentali, effettuati secondo adeguati sistemi di qualità e poi approvata dagli organismi deputati (per esempio, dagli organismi notificati in Europa, dalla *Food and Drug Administration* (FDA) in USA) prima della loro commercializzazione e utilizzo. Per la valutazione complessiva dei rischi di dispositivi di classe superiore alla I, la valutazione tossicologica deve essere considerata insieme ad altre informazioni sui DM ottenute da studi pre-clinici, clinici, dati di esposizione sull'uomo e dall'esperienza post-marketing. Per i dispositivi di classe I, vista la bassa criticità associata a questi prodotti, è il fabbricante che autocertifica la conformità ai requisiti essenziali.

Le linee guida ISO 10993 rappresentano uno standard di riferimento per la valutazione biologica dei DM pur non avendo valore cogente. Sono state sviluppate nello sforzo di armonizzare i test di biocompatibilità per la valutazione biologica dei DM e sono attualmente composte da 20 parti. La parte 1: 'Valutazione e prove all'interno di un processo di gestione del rischio' fornisce la matrice utile per pianificare la valutazione biologica dei DM permettendo una classificazione dei dispositivi sulla base della natura del dispositivo (dispositivo di superficie, impiantabile, esterno) e della durata del contatto (limitato se ≤ di 24h, prolungato se compreso tra 24 h e 30 giorni, permanente se > di 30 giorni) con la parte del corpo coinvolta (es. pelle, mucose, sangue, tessuto/ossa). Le restanti parti invece descrivono i metodi ritenuti appropriati per condurre i test biologici identificati seguendo la parte 1 dello standard. Questi test si basano sia su modelli animali che su modelli *in vitro* ed *ex vivo*: è importante sottolineare che nessuno di questi modelli è stato sottoposto a convalida scientifica.

Con la revisione dello standard ISO 10993 del 2009, il *focus* della parte 1 del documento è stato modificato inserendo un approccio che considera tutte le informazioni esistenti prima di determinare i test di biocompatibilità necessari. Questa revisione sottolinea l'importanza di ridurre il numero e l'esposizione degli animali utilizzati nei test dando preferenza alla caratterizzazione chimica dei materiali ed ai modelli *in vitro* in situazioni dove questi modelli forniscono informazioni ugualmente rilevanti rispetto a quelle ottenute da modelli *in vivo*. Lo stesso standard riporta che i test *in vitro, propriamente convalidati, ragionevolmente e praticamente disponibili, affidabili e riproducibili devono essere preferiti ai test in vivo* (ISO 10993-1: 2009). Questo è in accordo con la Direttiva CE n.63/2010 sulla protezione degli animali usati a fini scientifici, che, ispirandosi esplicitamente al principio delle 3R (*Reduction, Refinement, Replacement*) di Russel and Burch (**1**) promuove nei paesi dell'Unione Europea lo sviluppo e l'impiego di metodi alternativi *verso il conseguimento dell'obiettivo finale della completa sostituzione delle procedure su animali vivi a fini scientifici ed educativi non appena ciò sia scientificamente possibile* (comma 10 della Direttiva 63/2010).

La valutazione della biocompatibilità deve essere condotta all'interno di centri di saggio accreditati e secondo criteri di qualità richiesti, tipicamente le *Buone Pratiche di Laboratorio* (BPL), che negli USA sono obbligatorie, o le ISO 17025 (Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura).
La selezione dei test *in vitro* ed *in vivo* per valutare la biocompatibilità dei DM deve essere basata sull'utilizzo finale del dispositivo.

Valutazione dei tre *endpoints* essenziali per un DM ad uso topico su cute umana

Come mostra un estratto della tabella riportata nelle linee guida ISO 10993-1:2009 e presentato in *Figura 1*, citotossicità, irritazione (o reattività intracutanea) e sensibilizzazione sono gli *endpoints* da valutare in prima istanza per tutte le categorie di DM individuate nello standard ISO e nella linea guida FDA (**2**) attualmente in revisione. In funzione poi dell'eventuale passaggio sistemico, la valutazione si apre o si chiude ad ulteriori approfondimenti che includono, ad esempio, studi di genotossicità e cancerogenicità.

La citotossicità è valutata *in vitro* seguendo protocolli descritti nello standard ISO 10993-5 aggiornato nel 2009. Lo schema proposto permette di valutare specificamente:

i il danno cellulare
ii l'effetto sulla crescita cellulare
iii specifici aspetti del metabolismo cellulare alterati in seguito ad esposizione diretta o indiretta col DM.

Normalmente si effettua un test *in vitro* su colture cellulari in monostrato (nel documento sono proposte cellule di origine molto diverse) esposte per 24 ore ai DM o ai loro estratti.

La valutazione dell'irritazione e della sensibilizzazione cutanea sono l'oggetto della parte 10 dello standard ISO 10993. Questa parte prevede l'impiego di test su piccoli animali prima di passare sull'uomo.

Il test *in vivo* su animale per la valutazione del potenziale irritante cutaneo prevede l'applicazione topica del materiale o dei suoi estratti sulla pelle dell'animale, normalmente conigli per almeno 4 ore, e l'osservazione dell'eventuale insorgenza dei sintomi di arrossamento e gonfiore nelle zone esposte.

I test tradizionalmente accettati per valutare la sensibilizzazione cutanea includono i due test sui porcellini d'India, il test di Buehler e il Maximisationt test, descritti nella OECD TG 406 (1992). Alternativamente, le autorità regolatorie accettano l'impiego del saggio *Local Lymph Node Assay* (LLNA) attualmente descritto nella linea guida OECD TG 429 (2002).

Il test è un metodo alternativo di riduzione del numero (*Reduction*) e miglioramento delle condizioni (*Refinement*) degli animali impiegati nella valutazione del potenziale sensibilizzante di singole sostanze chimiche rispetto ai test tradizionali sui porcellini d'India.

Il test prevede l'impiego di topi e la valutazione della proliferazione cellulare nei linfonodi auricolari misurati mediante marcatura radioattiva o altre varianti non radioattive convalidate ed accettate a livello regolatorio nel 2010. Mentre i test tradizionali includono sia la fase di induzione (attivazione del sistema immunitario in seguito a un primo contatto con l'allergene), che la fase di elicitazione (reazione di ipersensibilità in seguito ad una seconda esposizione all'allergene), l'LLNA copre solo i meccanismi della fase di induzione (***Tab 1***).

Recentemente, si è suggerito l'impiego di test *in vitro* a scopo di *screening* prima dell'impiego degli animali per ridurne il numero da utilizzare. L'*endpoint* inoltre è, dal punto di vista etico, particolarmente critico da realizzare su un eventuale volontario umano.

Categorizzazione dei dispositivi medici			Effetto biologico							
Tipo di contatto corporeo (cfr 5.2) Categoria	Contatto	durata contatto (cfr 5.3) A-Limitato (≤ 24 h) B-prolungato (>24h to 30d) C-permanente (>30d)	Citotossicità	Sensibilizzazione	Irritazione o reattività intracutanea	Tossicità sistemica (acuta)	Tossicità subcronica (tossicità subacuta)	Genotossicità	Impianto	Emocompatibilità
Dispositivo a contatto con superficie	Pelle	A	X[a]	X	X					
		B	X	X	X					
		C	X	X	X					
	Membrane mucose	A	X	X	X					
		B	X	X	X					
		C	X	X	X		X	X		
	Superficie lesa o compromessa	A	X	X	X					
		B	X	X	X					
		C	X	X	X		X	X		

Figura 1 Estratto della tabella dell'Allegato A dello standard ISO 10993-1:2009. Citotossicità, sensibilizzazione e potenziale irritante devono essere valutati per i DM ad uso topico qualunque sia la durata del contatto con la cute/mucosa umana sul quale il dispositivo verrà applicato. Il potenziale passaggio sistemico apre o chiude alla valutazione di altri *endpoints*

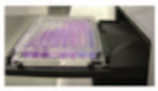
Nome del test	Buehler Test/ Guinea Pig Maximization Test	Local Lymph Node Assay (LLNA)	Strategia di test integrati 
OECD TG	406 (1992)	429 (2002) (aggior. 2010)	Linee guida previste per il 2016
Rilevanza delle 3R	Miglioramento condizioni animali (Refinement)	Riduzione numero animali (Reduction) e miglioramento condizioni animali (Refinement)	Sostituzione (Replacement)
Specie animale	Porcellino d'India	Topo	Nessuna
Esposizione	Applicazione topica/ Iniezione intradermica	Applicazione topica	
Durata del test (giorni)	30-32/23-25	6-8	1-3
Numero di animali/test	30	20	0
Fasi del processo di sensibilizzazione coinvolte	Induzione + Elicitazione	Induzione	Eventi chiave della fase di induzione
Endpoint	Reazioni cutanee (rossore/gonfiore)	Proliferazione cellulare nei linfonodi auricolari misurate mediante marcatura radioattiva o non radioattiva	Legame con proteine della pelle Attivazioni dei cheratinociti Maturazione e migrazione delle cellule immunocompetenti, Attivazione delle cellule T, ...

Tabella 1 Descrizione di test *in vivo* (Buehler Test, Maximisation Test e il Local *Lymph Node Assay*) attualmente utili per la valutazione del potenziale sensibilizzante delle sostanze che costituiscono i DM (ISO 10993-10). Nella colonna di destra si introduce la strategia di test integrati che EURL ECVAM sta convalidando per sostituire completamente (Replacement) l'impiego dell'animale nella valutazione della sensibilizzazione cutanea di sostanze ed ingredienti

Evoluzione della valutazione della biocompatibilità su epidermide umana 3D ricostruita *in vitro*

Citotossicità ed irritazione primaria cutanea

Oggi esiste a livello EU un test *in vitro* convalidato come alternativa di sostituzione per la valutazione dell'irritazione primaria cutanea e per la classificazione regolatoria di tutte quelle sostanze/ingredienti che rientrano nell'ambito di applicazione del test stesso (OECD TG 439, 2010). Il test per la valutazione *in vitro* dell'irritazione cutanea è stato convalidato su epidermide ricostruita 3D quali EpiDerm™, SkinEthic™, Episkin™ e LabCyte EPI-MODEL24 SIT (OECD TG 439, 2013).

In questo saggio il potenziale irritante delle sostanze/ingredienti viene valutato su modelli 3D di epidermide umana ricostruita che rappresentano, ad oggi, un'alternativa interessante anche per la valutazione caso per caso della biocompatibilità dei DM.

L'allegato D dell'ISO 10993-10:2010 riconosce che modelli di epidermide ricostruita 3D possono essere utili modelli sperimentali nella valutazione del potenziale irritante dei DM. I modelli di epiteli riscostruiti rappresentano il modello biologico di riferimento per la sostituzione della sperimentazione animale, in quanto i più vicini come morfologia e funzionalità ai tessuti umani *in vivo*. La presenza di un tessuto organizzato morfologicamente con diversi strati cellulari è essenziale per quantificare in modo sensibile l'impatto biologico del dispositivo medico grazie alla rilevanza biologica del modello tridimensionale che è superiore a quella delle colture cellulari monostrato.

La presenza di uno strato pluristratificato permette infatti l'applicazione topica del prodotto alle stesse dosi e con le stesse frequenze usate *in vivo* e tiene conto della sua possibile penetrazione in funzione delle caratteristiche formulative: la complessità ed unicità di ogni formulazione ad uso topico rendono questo fattore decisamente rilevante ai fini tossicologici.

E' inoltre possibile valutare

1 l'assenza d'interferenza con l'omeostasi fisiologica del tessuto,
2 l'assenza di effetti tossici assimilabili al prodotto o alla sostanza 'ancillare'
3 l'assenza di effetti sistemici valutati tramite test di passaggio.

I modelli tissutali 3D rappresentano quindi un importante passo avanti verso una valutazione della sicurezza dei DM più esaustiva, predittiva e riproducibile rispetto alle colture cellulari

monostrato. Accanto ad epidermide ricostruita sono disponibili commercialmente modelli di epitelio corneale ricostruito (*human corneal epithelium*, HCE) la cui rilevanza biologica è già stata riconosciuta da EURL-ECVAM tanto che è attualmente in corso di convalida un metodo basato su HCE per la valutazione *in vitro* dell'irritazione oculare. A questi epiteli si aggiungono mucose di vario tipo, rilevanti per valutare prodotti applicati a livello della mucosa vaginale, orale oppure nasale, che coprono numerose aree terapeutiche.

Uno schema di analisi multi-parametrica applicabile a tutti i modelli 3D (*Multiple-Endpoint Analysis*, MEA) per valutare la sicurezza di un dispositivo medico per uso topico su cute integra è riportato in *Figura 2*.

Questa apertura delle ISO ai nuovi modelli sperimentali *in vitro* è importante e giustifica l'impiego di altri metodi e strategie alternative utili nella valutazione della biocompatibilità dei DM che in un prossimo futuro potrebbero estendersi anche alla valutazione del potenziale sensibilizzante dei DM e dei materiali che li compongono.

Sensibilizzazione

Esigenze regolatorie (Regolamento REACH e Regolamento 1223/2009/CE sui prodotti cosmetici *in primis*) e questioni etiche hanno spinto nell'ultimo decennio verso lo sviluppo di metodi alternativi per predire il potenziale sensibilizzante di sostanze ed ingredienti. Per questo scopo EURL ECVAM sta attualmente sviluppando una strategia integrata di test (*Integrated Testing Strategy*, ITS) che non prevede l'impiego di animali, ma combina metodi *in vitro*, *in chemico* o *in silico*, per identificare il potenziale sensibilizzante delle sostanze e per permetterne la corretta classificazione e stabilirne la potenza (**3**). La *Tabella 1* riassume alcuni aspetti di questa strategia di *Replacement* in corso di convalida. In particolare, tre saggi *in vitro* sono in uno stadio avanzato dell'*iter* di convalida ed accettazione regolatoria per questo *endpoint*. Si tratta del KeratinoSens™, dello *Human Cell Line Activation Test* (h-CLAT) e del saggio *Direct Peptide Reactivity Assay* (DPRA).

Ciascuno di questi metodi è stato progettato per rivolgersi e modellare meccanismi biologici chiave nel processo complesso, ma ormai ben conosciuto, della fase di induzione del processo di sensibilizzazione cutanea.

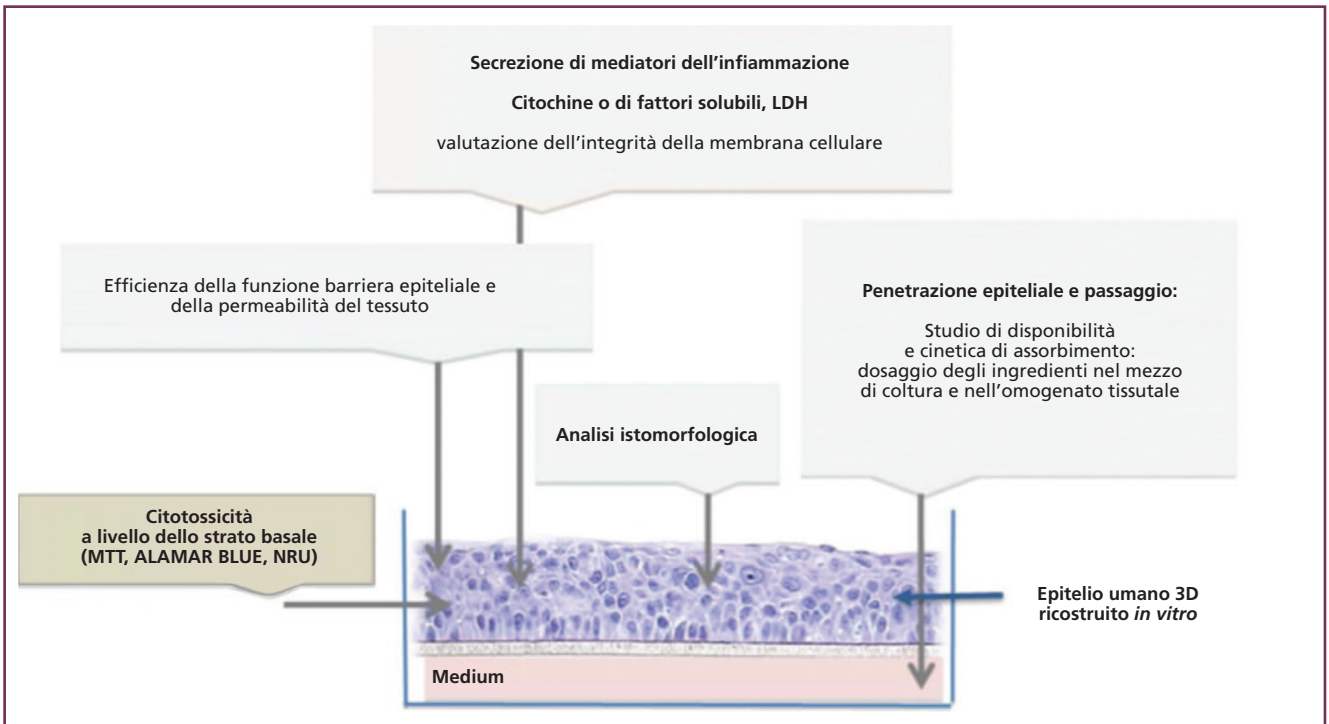


Figura 2 Valutazione della sicurezza di un DM per uso topico su cute integra mediante l'impiego di tessuti umani 3D ricostruiti *in vitro*. Il vantaggio di scegliere il tessuto ricostruito rilevante per la tipologia di dispositivo medico in esame in funzione del sito di applicazione è quello di poter applicare il prodotto nelle condizioni realistiche d'uso e di effettuare analisi multi-parametriche che aumentano la predittività della valutazione. I dati ottenuti forniscono informazioni sia sulla biocompatibilità del dispositivo medico sia sull'impatto a livello della struttura della barriera cutanea che è il *target* del dispositivo medico in seguito all'esposizione col prodotto

Il KeratinoSens™ (*Keratinocyte-based ARE-Nrf2 luciferase Reporter Gene Test Method*) misura l'attivazione della cascata di eventi molecolari sotto il controllo dell'elemento ARE (*Antioxidant/electrophile Responce Element*) nella linea cellulare HaCat derivata da cheratinociti umani. L'attivazione di questa cascata controlla il rilascio di mediatori citoprotettivi in risposta a stress elettrofilo ed ossidativo. Nel febbraio 2014 EURL-ECVAM ha pubblicato una raccomandazione sull'impiego di questo metodo nel contesto di una ITS o in un approccio peso dell'evidenza (*Weight of Evidence*, WoE) per valutare la capacità sensibilizzante della sostanza e la sua potenza in combinazione con altri saggi *in vitro* che valutano altri aspetti del processo di sensibilizzazione così come metodi non sperimentali, quali approcci *read-across* da sostanze analoghe (**4**).
L'*Human Cell Line Activation Test* (h-CLAT) si basa sull'impiego di cellule THP1, una linea cellulare umana pro-monocitica, utilizzata come surrogato di cellule dentritiche. Il saggio, che valuta l'attivazione delle cellule immunitarie, è stato convalidato in Giappone (**5**) ed è attualmente in revisione dal Comitato Scientifico di EURL ECVAM (ESAC). Una bozza della Raccomandazione di EURL-ECVAM sull'impiego di questo test è attesa più avanti nel corso del 2014.

Il saggio *Direct Peptide Reactivity Assay* (DPRA) è un test acellulare *in chemico*, proposto per valutare l'evento molecolare iniziale del processo di sensibilizzazione cutanea, cioè il legame covalente che si forma tra l'allergene e le proteine presenti nella pelle. Il saggio quantifica mediante HPLC la reattività degli allergeni nei confronti di peptidi sintetici contenenti lisine o cisteine. Essendo un test acellulare è meno applicabile se non per *screening* molecolari. Nel novembre del 2013 EURL ECVAM ha pubblicato una Raccomandazione sull'impiego di questo metodo (**6**).

La valutazione combinata dei risultati ottenuti da una ITS sembra una soluzione promettente per raggiugere la sostituzione completa dei test *in vivo* nella valutazione del potenziale sensibilizzante e la classificazione regolatoria delle sostanze/ingredienti, inclusi i singoli materiali che compongono i DM o il prodotto tal quale se la sua formulazione lo consente.

Conclusione

Le metodologie per la valutazione della biocompatibilità dei DM sono in evoluzione, tengono conto del progresso scientifico e tecnologico e si basano su modelli sperimentali concretamente disponibili che le norme ISO non hanno ancora fatto proprie.
Considerato che innovazione e rapida evoluzione tecnologica caratterizzano questo settore, la necessità di avere metodi *in vitro* più predittivi per la valutazione della biocompatibilità dei DM diventa una necessità. Basti pensare alle nuove esigenze introdotte per la valutazione di prodotti derivati da nanotecnologie per i quali i tradizionali metodi di caratterizzazione e valutazione biologica non sono adeguati.
La conoscenza dei nuovi approcci alternativi per la valutazione della biocompatibilità dei DM favorisce l'innovazione del settore, permette di acquisire informazioni sul meccanismo d'azione del dispositivo in esame e di rispondere alle esigenze regolatorie, inclusa quella di riduzione del numero di animali utilizzati a fini sperimentali. Infine, ma non meno importante, i risultati degli studi *in vitro* su tessuti umani 3D permettono una più accurata pianificazione degli studi clinici sull'uomo necessari a finalizzare la valutazione dei rischi.

Bibliografia

1 **W.M.S. Russell, R.L. Burch (1959)** The Principle of Humane Experimental Technique, London, Methuen
2 **Office of Medical Device Evaluation General Program Memorandum #G95-1 (1995)** Use of International standards ISO 10993, 'Biological Evaluation of Medical Devices-Part 1: Evaluation and Testing
3 EURL ECVAM Strategy for Replacement of Animal Testing for Skin Sensitisation Hazard Identification and Classification, 2013
4 EURL ECVAM Recommendation on the KeratinoSensTM assay for skin sensitisation testing, February 2014
5 **T. Ashikaga *et al* (2008)** Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the first Japanese Inter-laboratory Study, *AATEX* **13**(1): 27-35
6 EURL ECVAM Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for Skin Sensitisation Testing, November 2013