

TITOLO DEL PROTOCOLLO DI STUDIO

TRATTAMENTO DELLE FISTOLE PERIANALI NELLA MALATTIA DI CROHN, RESISTENTI AL TRATTAMENTO CONVENZIONALE, CON CELLULE STAMINALI MIDOLLARI IMMUNOSELEZIONATE CON CD133 STUDIO DI FASE 2 A

1. RAZIONALE DELLO STUDIO

La malattia di Crohn è una patologia infiammatoria cronica che può colpire qualsiasi parte del tratto gastrointestinale ma che più frequentemente si localizza nell'ileo terminale e nel colon destro. La sintomatologia della malattia di Crohn è caratterizzata prevalentemente da diarrea e dolore addominale ma può complicarsi con la presenza di manifestazioni extraintestinali, più frequentemente a carico di cute (eritema nodoso o pioderma gangrenoso), articolazioni (artriti assiali e periferiche) e occhi (uveiti o episcleriti). Circa il 30% dei pazienti con malattia di Crohn presenta inoltre un coinvolgimento flogistico e settico della regione perianale, che si manifesta con la formazione di ascessi e fistole, che rendono difficile la gestione terapeutica di questi pazienti. Le fistole perianali si distinguono in fistole semplici (superficiali, inter- o transfinteriche, che originano al di sotto della linea dentata, con unico orifizio esterno e in assenza di raccolte ascessuali) e complesse (inter-, sopra- o extrasfinteriche, che originano al di sopra della linea dentata, con orifizi esterni multipli, in presenza di raccolte ascessuali o stenosi). Le linee guida italiane prevedono l'utilizzo dei farmaci biologici (infliximab e adalimumab) quale terapia di prima linea nei pazienti con fistole perianali complesse, previa bonifica chirurgica della sepsi perianale mediante fistulotomia, fistulectomia e posizionamento di setoni.¹ Circa il 20-30% dei pazienti non risponde tuttavia a questo approccio terapeutico, con persistenza o recidiva precoce della malattia perianale. Recentemente è stata valutata l'efficacia dell'utilizzo di cellule staminali mesenchimali (MSC) nel trattamento di fistole perianali di Crohn, non responsive ai trattamenti standard.^{2,3,4,5,6}

Le Cellule Staminali Mesenchimali (MSC) sono cellule di origine midollare che si ritrovano in diversi distretti anatomici, come il tessuto adiposo, il sangue del cordone ombelicale, il tessuto muscolare e lo stroma della cornea.^{7,8} Le MSC sono dotate di potenzialità miogenica, adipogenica e condrogenica⁹ e sembra che possano svolgere un ruolo importante nel controllare l'infiammazione locale e nel riparare i tessuti danneggiati.^{10,11} Queste cellule mostrano infatti un effetto immunomodulatorio e antinfiammatorio su varie cellule linfoidi attivate, come i linfociti T, i linfociti B, le cellule NK e le cellule dendritiche. Data la loro capacità di influenzare la risposta immune sia innata che adattativa, e la mancanza di immunogenicità, le MSC sono considerate un promettente strumento della terapia cellulare rigenerativa.^{12,13} In 3 studi^{4,6,14} è stata valutata

l'efficacia e la sicurezza dell'inoculo di cellule staminali adipose espanse su fistole perianali di pazienti con malattia di Crohn. In un iniziale studio di fase 1, 9 fistole sono state trattate con cellule staminali adipose ed il 75% di esse è stato considerato guarito dopo 8 settimane.⁴ In un successivo studio di fase 2, 14 pazienti con malattia di Crohn e fistole perianali sono stati trattati con cellule staminali adipose in combinazione con l'applicazione di colle di fibrina e confrontati con pazienti trattati solo con l'applicazione di colla di fibrina. La percentuale di pazienti che ha ottenuto la guarigione delle fistole è risultata significativamente maggiore nel gruppo trattato con cellule adipose rispetto al gruppo trattato solo con colla di fibrina.⁶ In uno studio di fase 2 più recente 43 pazienti sono stati trattati con cellule staminali adipose in combinazione con l'applicazione di colla di fibrina. Una completa chiusura delle fistole, valutata clinicamente, è stata osservata nel 82% dei pazienti trattati dopo 8 settimane dalla iniezione delle cellule staminali e l'88% dei 26 pazienti seguiti per 1 anno è riuscita a mantenere la chiusura delle fistole. Nessun evento avverso è stato riportato.¹⁴ Un solo studio ha valutato l'efficacia e la sicurezza della iniezione all'interno di fistole perianali di MSC espanse derivate da midollo osseo in 12 pazienti con malattia di Crohn complicata da malattia perianale refrattaria alle terapie convenzionali. Una completa chiusura delle fistole è stata riportata nel 70% dei pazienti trattati, senza eventi avversi.²

Le MSC, pur riscontrandosi in diversi distretti anatomici, sembrano derivare da progenitori staminali residenti a livello del midollo osseo, che si caratterizzano per la capacità di dar luogo a differenti linee cellulari. Fra queste cellule ve ne sono alcune dotate di estrema plasticità e capacità differenziativa *multilineage*, recentemente identificate dalla presenza di uno specifico marcatore di superficie: CD133.^{15, 16, 17, 18} Il CD133 è una glicoproteina transmembrana che ha il ruolo di "organizzatore" della topologia delle membrana cellulare. È stata descritta come proteina espressa dalle cellule staminali ematopoietiche umane ed è stata riscontrata non solo in progenitori endoteliali ma anche linfoangiogenetici e mioangiogenetici.¹⁹ Il CD133, da solo o in combinazione con altri marcatori, è infatti correntemente usato per l'isolamento di cellule staminali normali da diversi tessuti, come il midollo osseo,^{20, 21} il cervello,^{22, 23} la milza,²⁴ la prostata,²⁵ il fegato,²⁶ il pancreas^{27, 28} e la pelle.²⁹

Recenti dati della letteratura scientifica dimostrano la capacità delle cellule staminali CD133 di intervenire attivamente nei processi rigenerativi e riparativi di diversi tessuti.³⁰⁻³⁸

Le cellule CD133, pur essendo riscontrate in diversi distretti anatomici, sembrano derivare prettamente da fegato e midollo osseo fetale, midollo osseo adulto, sangue cordonale e cellule mobilizzate da sangue periferico.

Il CD133 rappresenta un marcatore di staminalità presente a livello di una popolazione cellulare sia CD34+ che CD34-, la loro caratterizzazione sta contribuendo a chiarire meglio l'organizzazione

gerarchica del differenziamento ematopoietico, indicandola come una popolazione precoce nei processi maturativi e valutandone l'efficacia per un potenziale uso a scopo trapiantologico, sia autologo che allogenico.³⁰ Tant'è che alcuni autori sottolineano l'esigenza di considerare altri marcatori di staminalità, come appunto il CD133, oltre ai marker di routine CD34 e CD45 per individuare il numero minimo di cellule utilizzabili per la ricostituzione ematopoietica.³¹

L'uso delle cellule CD133 nella medicina rigenerativa è sostenuto anche da un effetto paracrino mostrato da queste cellule. Microvescicole derivate dalle CD133 esprimono infatti diversi fattori antiapoptotici e proangiopoietici, inclusi kit-ligando, IGF-1, VEGF, BFGF e IL-8. Questi stessi fattori sono stati riscontrati in mezzi condizionati derivati da colture cellulari di CD133.³²

Le cellule CD133, essendo considerate non solo staminali ematopoietiche ma anche cellule con capacità differenziative in tessuti non ematopoietici, sono state utilizzate in numerosi studi di terapia rigenerativa. I primi studi di fase I, condotti su cellule CD133 di derivazione midollare, hanno mostrato notevole sicurezza e affidabilità. Non si sono registrate complicanze dovute all'impiego di tali cellule, le dosi sono state ben tollerate, mostrando invece un effetto rigenerativo sui tessuti utilizzati. In particolare, cellule CD133 infuse a livello coronarico in pazienti con occlusione totale cronica o ischemia hanno mostrato un miglioramento del tessuto del miocardio ischemico e nessun paziente ha dovuto interrompere il trattamento, hanno tutti seguito il loro iter terapeutico, non si è registrato nessun evento ischemico o aritmico nei pazienti trattati.³³ Tale sistema di trattamento non solo ha mostrato sicurezza ed efficacia nella somministrazione coronarica delle cellule CD133, ma anche un'azione promuovente nella ripresa dell'attività miocardica post infarto.³⁴ La sicurezza, l'applicabilità e la flessibilità d'uso è mostrato anche in altri lavori: lo studio pilota su 24 pazienti di Marginas del 2007, il trial TOPCARE-AMI su 59 pazienti, il successivo trial REPAIR-AMI e il COMPARE-AMI del 2011, per citarne alcuni.^{35,36,37,38}

La fonte delle cellule CD133 sembra rivestire un ruolo importante. Nel condurre un trial clinico randomizzato per valutare l'effetto dell'infusione intracoronarica di cellule CD133 autologhe sulla riperfusione miocardica dopo infarto del miocardio di tipo STEMI, i pazienti sono stati trattati con cellule CD133 derivate da midollo osseo, cellule CD133 isolate da sangue periferico o solo con trattamento terapeutico. L'infusione delle cellule è avvenuta 10-14 giorni dopo l'infarto, mostrando un incremento del volume del ventricolo sinistro e della frazione di eiezione solo nel gruppo che aveva ricevuto cellule CD133 isolate da sangue midollare rispetto alla terapia tradizionale. Probabilmente questo potrebbe spiegarsi con una diminuita potenzialità delle cellule presenti a livello periferico, considerato che i fattori del microambiente specifico possono essere importanti nel mantenere le capacità staminali dei progenitori.³⁹

L' IMPACT-CABG trial è il primo studio randomizzato canadese di Fase II sull'uso di cellule staminali CD133+, di derivazione midollare, in pazienti che si sottopongono a intervento di bypass coronarico dopo infarto del miocardio e disfunzione ventricolare. I primi risultati di case report riportano un tangibile miglioramento, con nessuna complicazione relativa al protocollo di infusione. Sono state usate 1×10^6 cellule isolate attraverso immunoselezione con CliniMACS CD133 dal midollo osseo⁴⁰.

Diversi studi sottolineano l'efficacia del trattamento con cellule CD133 nel trattamento degli episodi necrotici del miocardio, con un range ampio sia per quel che riguarda il numero di cellule infuse che le procedure utilizzate, ottenendo però risultati efficaci come mostrano diverse meta-analisi sull'argomento^{41,42}. A tal proposito, nel trial di Fase III PERFECT, randomizzato, multicentrico, in cui si valutava l'efficacia dell'infusione intracoronarica di cellule CD133 in pazienti sottoposti a intervento di bypass coronario sono state usate da $0,5$ a 5×10^6 cellule CD133 per l'iniezione, proprio perché in fase I e II le differenze numeriche delle cellule non sembrano essere correlate all'efficacia, indicazione questa di elevata potenzialità staminale.⁴³

Le cellule CD133 sono state altresì utilizzate nella rigenerazione del tessuto epatico, producendo una serie di studi che ne hanno valutato e confermato l'efficacia sia in termini di crescita cellulare, che di neoangiogenesi e di elevata sicurezza.^{44,45,47,48}

Il fegato pur essendo un organo dotato di elevata capacità rigenerativa può in talune circostanze essere incapace a ricostituire la sua integrità strutturale, questo avviene quando in seguito ad una resezione chirurgica il futuro volume residuo del tessuto epatico (FLRV) sarà all'incirca inferiore al 40% del volume iniziale. Questa condizione spesso si associa a eventi neoplastici che colpiscono il fegato e per cui è necessaria una epatectomia segmentale. Per stimolare la rigenerazione epatica sono stati identificati diversi trattamenti medici, fra cui l'embolizzazione portale, condizione questa che stimola la proliferazione delle cellule epatiche. Però la resezione chirurgica è così elevata e il progredire della neoplasia epatica così rapida che anche la procedura di embolizzazione non risulta così efficace nel garantire un volume residuo adeguato alla rigenerazione epatica. In questo senso sono state impiegate le cellule staminali CD133, per aumentare sia direttamente attraverso proliferazione e differenziamento, sia indirettamente, attraverso sostanze paracrine, la ricrescita del tessuto epatico.

In un interessante esperimento di Furst l'infusione a livello della vena porta di cellule staminali CD133 autologhe prelevate dal midollo osseo in concomitanza alla procedura di embolizzazione portale, porta a un miglioramento nella crescita epatica giornaliera, a un relativo guadagno di FLRV e di conseguenza a un tempo minore per raggiungere il livello di FLRV adeguato per

sottoporsi all'epatectomia. Non vi è una correlazione fra il numero delle cellule infuse e il guadagno giornaliero, relativo o assoluto in termini di FLRV.⁴⁴

Nonostante si infondano cellule in un tessuto affetto da un tumore epatico, non si sono evidenziati effetti sulla biologia del tumore, né di diffusione della neoplasia⁴⁵. Difatti, alla somministrazione autologa di CD133 attraverso la vena porta non sono associati effetti avversi immediati o tardivi⁴⁶

Diversi studi sottolineano l'efficacia di questo trattamento per stimolare la rigenerazione epatica, come lo studio italiano di Canepa su 16 pazienti, dove la somministrazione di progenitori aumenta in modo statisticamente rilevante l'effetto dell'embolizzazione portale⁴⁷ o lo studio retrospettivo di am Esch dove sembrerebbe indurre un outcome migliore nei pazienti trattati.⁴⁸

È stato anche valutata la sicurezza dell'infusione di cellule CD133 attraverso la vena porta in pazienti affetti da cirrosi epatica. Nessun effetto avverso è stato evidenziato sia durante un periodo di follow-up breve (6 mesi) che lungo (24 mesi), non vi sono alterazioni di enzimi epatici e funzioni epatiche, indicandone un potenziale uso per trattare pazienti affetti da cirrosi epatica scompensata.⁴⁹

Infine recenti studi evidenziano un potenziale ruolo delle cellule CD133 nella rigenerazione neuronale e nei trattamenti dei disordini neurodegenerativi.⁵⁰

Esperimenti con cellule staminali mesenchimali esprimenti CD133 condotti su topi hanno mostrato la potenzialità di questi progenitori di differenziare in cellule neuronali, producendo anche fattori neurotrofici. Tali scoperte hanno aperto la speranza a un possibile sviluppo di terapie autologhe tese a riparare il danno neurodegenerativo.^{50,51}

Altri esperimenti mostrano un potenziale rigenerativo delle cellule CD133 sia esse espanse da sangue periferico, sia midollari non espanse, nel ricostruire l'integrità del sistema neuronale a livello del sistema nervoso periferico⁵¹

A testimonianza sia della sicurezza d'uso, sia dell'attenzione rivolta dalla comunità scientifica alle potenzialità terapeutiche delle CD133, sono all'incirca 40 i trial registrati negli USA (www.ClinicalTrial.gov) che hanno come oggetto l'infusione di cellule staminali CD133+; i campi di applicazione maggiormente implicati sono quelli precedentemente esposti. Tra questi 4 studi sono italiani, di cui tre con fase di reclutamento completata. Altri 4 trial al momento sono registrati anche su EU Clinical Trial register (www.clinicaltrialsregister.eu).

Alla luce di questi dati è opportuno sottolineare che le cellule CD133 hanno mostrato elevata capacità rigenerativa, senza che questa sia influenzata dal numero di cellule inoculate, segno di una notevole capacità staminale rigenerativa.

Probabilmente il numero elevato di cellule necessario per la rigenerazione tissutale basata su staminali mesenchimali adipose o midollari sia proprio da imputare a una diminuita potenzialità staminale delle cellule stesse. Fra l'altro, l'espansione in vitro, pur aumentandone il numero ne

diminuisce la “potenza staminale”, poiché, in qualche misura, tale espansione ne determina un iniziale differenziamento.⁵² Questo implica che le cellule CD133+ non debbano essere sottoposte a espansione in vitro, eliminando da un lato i rischi potenziali connessi a inquinamento ambientale, sempre presente seppur ridotto dall’uso di procedure GMP, e dall’altro i rischi di alterazioni genetiche acquisite nei cicli di espansione. Questo rischio si riduce infondendo le cellule prima del terzo passaggio di espansione in vitro. E’ da considerare inoltre che l’espansione in vitro potrebbe determinare dei cambiamenti genetici compromettenti le loro potenzialità staminali, dalla capacità di self-renewal alla loro multipotenza.^{53,54,55}

Questi dati ci fanno ritenere che i progenitori endoteliali CD133+ possano coadiuvare la rigenerazione di tessuto cicatriziale attraverso un processo di neovascolarizzazione e concorrere infine alla guarigione della fistola perianale nei pazienti con malattia di Crohn.

2. OBIETTIVI DELLO STUDIO

Il protocollo si prefigge di:

- Valutare la sicurezza della procedura di impianto in loco di cellule staminali midollari autologhe CD133+ nei pazienti con malattia di Crohn complicata dalla presenza di fistole perianali.
- Valutare a 3 mesi dall’ultima infusione gli effetti clinici della procedura di impianto in loco di cellule staminali midollari autologhe CD133+ sui processi rigenerativi e di riparazione tissutale nel trattamento delle fistole perianali.
- Valutare a 6 mesi dall’ultima infusione gli effetti della procedura di impianto in loco di cellule staminali midollari autologhe CD133+ sui processi rigenerativi e di riparazione tissutale nel trattamento delle fistole perianali mediante RMN pelvica.

3. DISEGNO DELLO STUDIO

La procedura prevede una infusione di cellule staminali ematopoietiche CD133+ purificate autologhe raccolte tramite prelievo di sangue midollare dalla cresta iliaca. Le cellule staminali midollari, prima di essere infuse, verranno purificate “ex vivo” secondo i protocolli “clinical-grade” in collaborazione con l’ U.O. di Ematologia con Trapianto di Midollo Osseo dell’Azienda Ospedaliera “Villa Sofia-Cervello” .

Da 7 a 30 giorni prima della procedura di inoculo delle cellule staminali il paziente, già trattato chirurgicamente con posizionamento di setone, rimosso in corso di trattamento convenzionale, verrà

sottoposto, in regime di anestesia totale, al prelievo di 100-150 ml di sangue midollare (procedura di prelievo descritta nel programma trapianti aziendale). Cellule midollari autologhe CD133+ verranno purificate mediante immunoselezione positiva utilizzando biglie immunomagnetiche (CliniMACS CD133 cod.172-01) ed il sistema CLINIMACS Miltenyi Biotec. Le cellule verranno risospese in un volume di 2,5 ml in dosi di $5-20 \times 10^6$ e criopreservate. La prima dose di cellule verrà infusa nella cute al livello delle fistole. L'inoculo delle MSC avverrà sia nel canale della fistola che lungo la parete, fino all'orificio interno della fistola. Le dosi aggiuntive rimarranno criopreservate per eventuali successive infusioni. Potranno essere programmate successive infusioni a distanza di 4 settimane l'una dall'altra, previa valutazione della risposta clinica, fino ad un massimo di 4 infusioni. L'infusione cutanea verrà effettuata dal chirurgo che ha precedentemente sottoposto il paziente a bonifica della sepsi perianale mediante posizionamento e successiva rimozione del setone.

I trattamenti farmacologici in corso al momento dell'arruolamento saranno mantenuti. Il dosaggio e l'intervallo di somministrazione dei farmaci dovranno essere mantenuti costanti negli ultimi 2 mesi precedenti l'arruolamento. Se il paziente è in trattamento con steroidi al momento dell'arruolamento sarà consentito il tapering del farmaco, con modalità stabilite dallo sperimentatore.

L'incidenza di eventi avversi correlati alla procedura di impianto in loco di cellule staminali midollari autologhe CD133+ sarà valutata dopo 4 settimane da ogni inoculazione di cellule staminali, poi dopo 3 e 6 mesi dall'ultima inoculazione.

La valutazione degli effetti clinici sarà effettuata dopo 4 settimane da ogni inoculazione di cellule staminali e poi dopo 3 mesi dall'ultima inoculazione, mediante valutazione clinica, e dopo 6 mesi dall'ultima inoculazione, mediante RMN pelvica.

Lo studio terminerà quando sarà stato arruolato l'ultimo paziente.

Tutte le procedure fin qui descritte saranno effettuate secondo protocolli GMP (Good Manufacturing Practice).

4. DIMENSIONE DEL CAMPIONE

Saranno arruolati 7 pazienti con malattia di Crohn e fistole perianali complesse non responsive ai trattamenti standard. Per il calcolo del campione minimo di pazienti da includere è stata adottata la formula $(EN=n1+(1-PET)n2)$ di Simon (che prevede il numero minimo di pazienti da arruolare in cui avere la risposta attesa che in questo caso è il 30 % contro lo 0% nel caso di non trattamenti con un alpha di 0.1 ed un beta di 0.1)

4.1 CRITERI DI INCLUSIONE

- Diagnosi di malattia di Crohn
- Presenza di fistole perianali complesse già trattate chirurgicamente con posizionamento di setone e non responsive ai trattamenti farmacologici attualmente in uso.
- Età > 18 anni e < 70 anni.
- Firma del consenso informato alla procedura di prelievo di midollo osseo ed al successivo reimpinato.
- Rettoscopia entro 3 mesi dall'inizio dello studio .
- RMN pelvica eseguita nei 30 giorni precedenti la procedura di inoculo delle cellule staminali.

4.2 CRITERI DI ESCLUSIONE

- Diagnosi di rettocolite ulcerosa
- Presenza di fistole retto-vaginali o retto-vulvari
- Paziente portatore di ileo-stomia
- Test di gravidanza positivo
- Qualsiasi infezione in fase attiva
- Presenza di ascessi perianali

5. DURATA DELLO STUDIO

Lo studio avrà una durata di 36 mesi a partire dalla data di arruolamento del primo paziente. L'inizio dello studio è subordinato all'ottenimento del parere favorevole del comitato etico locale e della relativa autorizzazione dell'autorità competente.

6. RACCOLTA DEI DATI

L'arruolamento dei pazienti e la raccolta dei dati sarà effettuata all'interno di un data base elettronico su cui saranno riportati dati anagrafici, anamnestici e clinici dei pazienti coinvolti nello studio, nonché il verificarsi di eventuali eventi avversi. Le variabili inserite nel data base saranno: nome e cognome, data di nascita, sesso, fumo, familiarità per malattia di Crohn o rettocolite ulcerosa, patologie concomitanti, anno di diagnosi della malattia di Crohn, sede di malattia (ileale, colica, ileo-colica, del tratto gastro-intestinale superiore, pattern di malattia (infiammatorio, stenotante, fistolizzante), manifestazioni extraintestinali, anno di diagnosi della malattia perianale,

numero di fistole, tipologia di fistole (intersfinterica, trans-sfinterica, extra-sfinterica, sovra-sfinterica), pregressi interventi chirurgici sulla malattia perianale, pregressa terapia effettuata senza successo sulla malattia perianale, età al momento dell'inserimento nello studio, data posizionamento ultimo setone, data rimozione del setone, data di prelievo delle cellule staminali, date di infusione delle cellule staminali, numero totale di infusioni, chiusura della fistola a 3 mesi (valutazione clinica), chiusura della fistola a 6 mesi (valutazione clinica e mediante RMN pelvica), eventi avversi. Le suddette variabili, insieme ai criteri di inclusione ed esclusione dallo studio, saranno riportate all'interno di una scheda cartacea che verrà di volta in volta compilata dallo sperimentatore.

7. ATTIVITA' SVOLTE DURANTE LE VISITE

V0 (arruolamento)

- Raccolta dell'anamnesi e dei dati clinici
- Valutazione criteri di inclusione ed esclusione
- Ispezione chirurgica della regione perianale
- Firma del consenso informato

V1 (da 7 a 30 giorni prima della procedura di inoculo delle cellule staminali)

- Prelievo in anestesia totale di 100-150 ml di sangue midollare e successiva
- Purificazione e successiva criopreservazione di cellule midollari autologhe CD133+ come previsto dal protocollo

V2 (inoculo)

- Inoculo delle cellule midollari autologhe CD133+, in anestesia totale, nel canale della fistole che lungo la parete, fino all'orificio interno della fistola

V3 (4 settimane dal primo inoculo)

- Valutazione degli effetti clinici della prima infusione di cellule staminali, ovvero chiusura dell'orificio fistoloso esterno valutata mediante esplorazione chirurgica della regione perianale

- Eventuale secondo inoculo di cellule CD133+, in caso di non efficacia
- Valutazione degli eventi avversi

V4 (8 settimane dal primo inoculo, solo in caso di infusioni successive alla prima)

- Valutazione degli effetti clinici della seconda infusione di cellule staminali, ovvero chiusura dell'orificio fistoloso esterno valutata mediante esplorazione chirurgica della regione perianale
- Eventuale secondo inoculo di cellule CD133+, in caso di non efficacia
- Valutazione degli eventi avversi

V5 (12 settimane dal primo inoculo, solo in caso di infusioni successive alla seconda)

- Valutazione degli effetti clinici della terza infusione di cellule staminali, ovvero chiusura dell'orificio fistoloso esterno valutata mediante esplorazione chirurgica della regione perianale
- Eventuale secondo inoculo di cellule CD133+, in caso di non efficacia
- Valutazione degli eventi avversi

V6 (3 mesi dall'ultima infusione di cellule staminali)

- Valutazione degli effetti clinici, ovvero chiusura dell'orificio fistoloso esterno, mediante esplorazione chirurgica della regione perianale
- Valutazione degli eventi avversi

V7 (6 mesi dall'ultima infusione di cellule staminali)

- Valutazione della avvenuta chiusura del tragitto fistoloso mediante RMN pelvica
- Valutazione degli eventi avversi

8. ASSICURAZIONE

Relativamente alla copertura assicurativa, laddove l'azienda non coprisse il costo dell'assicurazione, saranno utilizzati i proventi di altre sperimentazioni per la copertura assicurativa dello studio.

9. DISEGNO STATISTICO

per il calcolo del campione si adopererà il metodo di Simon per il calcolo minimo del numero di pazienti da includere nello studio . La probabilità di risposta calcolata sarà del 20% con un alfa di 0.05 ed una beta di 0.20 (56)

10. ONERI DEL COMITATO ETICO

Lo studio è stato elaborato e promosso spontaneamente ed autonomamente e pertanto si richiede l'esonero del pagamento del compenso al Comitato Etico.

11. FINANZIAMENTO DELLO STUDIO

I costi relativi alle procedure dello studio saranno coperti in parte dai fondi della ricerca, in parte da proventi di altre sperimentazioni.

12. TRATTAMENTO DEI DATI PERSONALI

I dati personali saranno trattati in accordo alle normative D.M. 15 luglio 1997 e al Decreto Legislativo N° 196 del 30/06/2003 (e successive modifiche ed integrazioni), in merito alla protezione dei dati ed in accordo alla normativa europea in materia. Il Promotore dello studio, il comitato etico, le autorità regolatorie e l'amministrazione sanitaria locale potranno accedere direttamente alla documentazione medica dei pazienti per verificare le procedure dello studio e/o i

dati, nella misura prevista dalle norme vigenti. Lo scopo di queste verifiche è controllare che lo studio sia stato condotto correttamente. I dati dei pazienti non saranno resi pubblici e tutte le identità dei pazienti arruolati rimarranno segrete. Le persone che avranno accesso diretto ai dati sensibili e personali hanno l'obbligo alla confidenzialità e si dovranno conformare alla normativa in materia di confidenzialità.

13. REGOLE DI CONDUZIONE DELLO STUDIO

Lo studio sarà svolto nel rispetto della normativa italiana vigente sulla sperimentazione clinica, sulla normativa europea e nel rispetto della dichiarazione di Helsinki per l'intera durata dello studio. Lo sperimentatore principale e tutti i co-sperimentatori dovranno attenersi a quanto descritto nel protocollo clinico nel completo rispetto delle GCP e dovranno impegnarsi a mantenere la massima riservatezza nei confronti di qualsiasi persona non autorizzata afferente allo studio, sia in riferimento ai risultati ottenuti nel corso della sperimentazione sia riguardo tutti i dati sensibili dei pazienti arruolati nello studio clinico nel rispetto del D.Lgd. n. 196/2003 Codice in materia di protezione dei dati personali. Sarà cura del promotore dello studio informare tempestivamente il Comitato Etico di eventuali informazioni utili alla conduzione dello studio e di eventuali emendamenti dovessero verificarsi nel corso dello studio.

L'esecuzione dello studio non comporterà oneri straordinari a carico del Servizio Sanitario Nazionale in quanto:

- non sono previsti esami diversi o in più rispetto a quella che è la normale pratica clinica.
- non è prevista dal protocollo alcuna modifica della pratica clinica attuale.

Si dichiara che essendo uno studio spontaneo non è previsto alcun compenso per il centro partecipante e per i ricercatori che parteciperanno alla sperimentazione clinica.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Orlando A, Armuzzi A, Papi C et al. The Italian Society of Gastroenterology (SIGE) and the Italian Group for the study of Inflammatory Bowel Disease (IG-IBD) Clinical Practice Guidelines: The use of tumor necrosis factor-alpha antagonist therapy in Inflammatory Bowel Disease. *Dig Liver Dis* 2011;43:1-20.
- ² Ciccocioppo R, Bernardo ME, Sgarella A, Maccario R, Avanzini MA, Ubezio C, Minelli A, Alvisi C, Vanoli A, Calliada F, Dionigi P, Perotti C, Locatelli F, Corazza GR. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn's disease. *Gut*. 2011 Jun;60(6):788-98. doi: 10.1136/gut.2010.214841. Epub 2011 Jan 21.
- ³ de la Portilla F, Alba F, García-Olmo D, Herrerías JM, González FX, Galindo A. Expanded allogeneic adipose-derived stem cells (eASCs) for the treatment of complex perianal fistula in Crohn's disease: results from a multicenter phase I/IIa clinical trial. *Int J Colorectal Dis*. 2013 Mar;28(3):313-23.
- ⁴ García-Olmo D, García-Arranz M, Herreros D, Pascual I, Peiro C, Rodríguez-Montes JA. A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis Colon Rectum*. 2005 Jul;48(7):1416-23.
- ⁵ Garcia-Olmo D, Garcia-Arranz M, Herreros D.; Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula including Crohn's disease. *Expert Opin Biol Ther*. 2008 Sep;8(9):1417-23
- ⁶ Garcia-Olmo D, Herreros D, Pascual I, Pascual JA, Del-Valle E, Zorrilla J, De-La-Quintana P, Garcia-Arranz M, Pascual M. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Dis Colon Rectum*. 2009 Jan;52(1):79-86.
- ⁷ Prockop, D. J. 1997. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276:71-74.
- ⁸ Branch, M. J., K. Hashmani, P. Dhillon, D. R. Jones, H. S. Dua, and A. Hopkinson Mesenchymal stem cells in the human corneal limbal stroma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* . 2012 53: 5109-5116.
- ⁹ Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001 Apr;7(2):211-28.

- ¹⁰ Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*. 2007 Nov 15;110(10):3499-506.
- ¹¹ Satija NK, Singh VK, Verma YK, Gupta P, Sharma S, Afrin F, Sharma M, Sharma P, Tripathi RP, Gurudutta GU. Mesenchymal stem cell-based therapy: a new paradigm in regenerative medicine. *J Cell Mol Med*. 2009 Nov-Dec;13(11-12):4385-402.
- ¹² Ren G, Zhao X, Zhang L, Zhang J, L'Huillier A, Ling W, Roberts AI, Le AD, Shi S, Shao C, Shi Y. Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *J Immunol*. 2010 Mar 1;184(5):2321-8.
- ¹³ Bernardo ME, Locatelli F, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells. *Ann N.Y. Acad Sci*. 2009; 1176:101-17.
- ¹⁴ Lee WY, Park KJ, Cho YB, Yoon SN, Song KH, Kim do S, Jung SH, Kim M, Yoo HW, Kim I, Ha H, Yu CS. Autologous adipose tissue-derived stem cells treatment demonstrated favorable and sustainable therapeutic effect for Crohn's fistula. *Stem Cells*. 2013 Nov;31(11):2575-81.
- ¹⁵ Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997 Feb 14;275(5302):964-7.
- ¹⁶ Majka SM, Jackson KA, Kienstra KA, Majesky MW, Goodell MA, Hirschi KK. Distinct progenitor populations in skeletal muscle are bone marrow derived and exhibit different cell fates during vascular regeneration. *J Clin Invest*. 2003 Jan;111(1):71-9.
- ¹⁷ Quirici N, Soligo D, Caneva L, Servida F, Bossolasco P, Deliliers GL. Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells. *Br J Haematol*. 2001
- ¹⁸ Petri Salven, Satu Mustjoki, Riitta Alitalo, Kari Alitalo and Shahin Rafii. VEGFR-3 and CD133 identify a population of CD34+ lymphatic/vascular endothelial precursor cells. *Blood*. 2003 Jan 1;101(1):168-72.
- ¹⁹ Elena Irollo, Giuseppe Pirozzi. CD133: to be or not to be, is this the real question? *Am J Transl Res* 2013;5(6):563-581.
- ²⁰ Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, Bray RA, Waller EK, Buck DW. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 1997; 90: 5013-21.
- ²¹ Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997; 90: 5002-5012.

- ²² Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, Tsukamoto AS, Gage FH, Weissman IL. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 14720-14725.
- ²³ Lee A, Kessler JD, Read TA, Kaiser C, Corbeil D, Huttner WB, Johnson JE, Wechsler-Reya RJ. Isolation of neural stem cells from the postnatal cerebellum. *Nat Neurosci* 2005; 8: 723-729.
- ²⁴ Sagrinati C, Netti GS, Mazzinghi B, Lazzeri E, Liotta F, Frosali F, Ronconi E, Meini C, Gacci M, Squecco R, Carini M, Gesualdo L, Francini F, Maggi E, Annunziato F, Lasagni L, Serio M, Romagnani S, Romagnani P. Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 2443-2456
- ²⁵ Richardson GD, Robson CN, Lang SH, Neal DE, Maitland NJ, Collins AT. CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *J Cell Sci* 2004; 117: 3539-3545
- ²⁶ Kordes C, Sawitza I, Müller-Marbach A, Ale-Agha N, Keitel V, Klonowski-Stumpe H, Häussinger D. CD133+ hepatic stellate cells are progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 352: 410-417.
- ²⁷ Oshima Y, Suzuki A, Kawashimo K, Ishikawa M, Ohkohchi N, Taniguchi H. Isolation of mouse pancreatic ductal progenitor cells expressing CD133 and c-Met by flow cytometric cell sorting. *Gastroenterology* 2007; 132: 720-732.
- ²⁸ Sugiyama T, Rodriguez RT, McLean GW, Kim SK. Conserved markers of fetal pancreatic epithelium permit prospective isolation of islet progenitor cells by FACS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 175-180.
- ²⁹ Ito Y, Hamazaki TS, Ohnuma K, Tamaki K, Asashima M, Okochi H. Isolation of murine hair-inducing cells using the cell surface marker prominin-1/CD133. *J Invest Dermatol* 2006; 127: 1052-1060
- ³⁰ Handgretinger R, Kuçi S. CD133-Positive Hematopoietic Stem Cells: From Biology to Medicine. *Adv Exp Med Biol*. 2013;777:99-111
- ³¹ Beksac M, Preffer F. Is it time to revisit our current hematopoietic progenitor cell quantification methods in the clinic? *Bone Marrow Transplant*. 2012 Nov;47(11):1391-6.
- ³² Ratajczak J, Kucia M, Mierzejewska K, Marlicz W, Pietrzkowski Z, Wojakowski W, Greco NJ, Tendera M, Ratajczak MZ. Paracrine proangiopoietic effects of human umbilical cord blood-derived purified CD133+ cells--implications for stem cell therapies in regenerative medicine. *Stem Cells Dev*. 2013 Feb 1;22(3):422-30

- ³³ Adler DS, Lazarus H, Nair R, Goldberg JL, Greco NJ, Lassar T, Laughlin MJ, Das H, Pompili VJ. Safety and efficacy of bone marrow-derived autologous CD133+ stem cell therapy. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2011 Jan 1;3:506-14.
- ³⁴ Bartunek J, Vanderheyden M, Vandekerckhove B, Mansour S, De Bruyne B, De Bondt P, Van Haute I, Lootens N, Heyndrickx G, Wijns W. Intracoronary injection of CD133-positive enriched bone marrow progenitor cells promotes cardiac recovery after recent myocardial infarction: feasibility and safety. *Circulation*. 2005; 112(9 Suppl):I178-I183.
- ³⁵ Manginas A, Goussetis E, Koutelou M, Karatasakis G, Peristeri I, Theodorakos A, Leontiadis E, Plessas N, Theodosaki M, Graphakos S, Cokkinos DV. Pilot study to evaluate the safety and feasibility of intracoronary CD133(+) and CD133(-) CD34(+) cell therapy in patients with nonviable anterior myocardial infarction. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2007 May 1;69(6):773-81.
- ³⁶ Schächinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, Abolmaali ND, Vogl TJ, Hofmann WK, Martin H, Dimmeler S, Zeiher AM. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *J Am Coll Cardiol*. 2004 Oct 19;44(8):1690-9.
- ³⁷ Dill T, Schächinger V, Rolf A, Möllmann S, Thiele H, Tillmanns H, Assmus B, Dimmeler S, Zeiher AM, Hamm C. Intracoronary administration of bone marrow-derived progenitor cells improves left ventricular function in patients at risk for adverse remodeling after acute ST-segment elevation myocardial infarction: results of the Reinfusion of Enriched Progenitor cells And Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction study (REPAIR-AMI) cardiac magnetic resonance imaging substudy. *Am Heart J*. 2009 Mar;157(3):541-7.
- ³⁸ Mansour S, Roy DC, Bouchard V, Stevens LM, Gobeil F, Rivard A, Leclerc G, Reeves F, Noiseux N. One-Year Safety Analysis of the COMPARE-AMI Trial Comparison of Intracoronary Injection of CD133 Bone Marrow Stem Cells to Placebo in Patients after Acute Myocardial Infarction and Left Ventricular Dysfunction. *Bone Marrow Res*. 2011;2011:385124.
- ³⁹ Colombo A, Castellani M, Piccaluga E, Pusineri E, Palatresi S, Longari V, Canzi C, Sacchi E, Rossi E, Rech R, Gerundini P, Viecca M, Delilieri GL, Rebulla P, Soligo D, Giordano R. Myocardial blood flow and infarct size after CD133+ cell injection in large myocardial infarction with good recanalization and poor reperfusion: results from a randomized controlled trial. *J Cardiovasc Med(Hagerstown)*. 2011 Apr;12(4):239-48.
- ⁴⁰ Forcillo J, Stevens LM, Mansour S, Prieto I, Roy DC, Noiseux N. IMPACT-CABG Trial: Implantation of CD133(+) Stem Cells in Patients Undergoing Coronary Bypass Surgery-Presentation of the First Treated Patient. *Case Rep Transplant*. 2011;2011:685394.

-
- ⁴¹ Kang S, Yang YJ, Li CJ, Gao RL. Effects of intracoronary autologous bone marrow cells on left ventricular function in acute myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis for randomized controlled trials. *Coron Artery Dis*. 2008 Aug;19(5):327-35.
- ⁴² Delewi R, Andriessen A, Tijssen JG, Zijlstra F, Piek JJ, Hirsch A. Impact of intracoronary cell therapy on left ventricular function in the setting of acute myocardial infarction: a meta-analysis of randomised controlled clinical trials. *Heart*. 2013 Feb;99(4):225-32.
- ⁴³ Donndorf P, Kaminski A, Tiedemann G, Kundt G, Steinhoff G. Validating intramyocardial bone marrow stem cell therapy in combination with coronary artery bypass grafting, the PERFECT Phase III randomized multicenter trial: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2012 Jul 2;13:99
- ⁴⁴ Fürst G, Schulte am Esch J, Poll LW, Hosch SB, Fritz LB, Klein M, Godehardt E, Krieg A, Wecker B, Stoldt V, Stockschräder M, Eisenberger CF, Mödder U, Knoefel WT. Portal vein embolization and autologous CD133+ bone marrow stem cells for liver regeneration: initial experience. *Radiology*. 2007 Apr;243(1):171-9.
- ⁴⁵ am Esch JS, Knoefel WT, Klein M, Ghodsizad A, Fuerst G, Poll LW, Piechaczek C, Burchardt ER, Feifel N, Stoldt V, Stockschräder M, Stoecklein N, Tustas RY, Eisenberger CF, Peiper M, Häussinger D, Hosch SB: Portal application of autologous CD133+ bone marrow cells to the liver: a novel concept to support hepatic regeneration. *Stem Cells* 2005, 23:463–470.
- ⁴⁶ Canepa MC, Quaretti P, Perotti C, Vercelli A, Rademacher J, Peloso A, Barbieri L, Franchi E, Briani L, Gaspari A, Brugnattelli S, Pedrazzoli P, Dionigi P Maestri M. Autologous CD133+ cells augment the effect of portal embolization. *Minerva Chir*. 2013 Apr;68(2):163-8.
- ⁴⁷ am Esch JS, Schmelzle M, Fürst G, Robson SC, Krieg A, Duhme C, Tustas RY, Alexander A, Klein HM, Topp SA, Bode JG, Häussinger D, Eisenberger CF, Knoefel WT. Infusion of CD133+ bone marrow-derived stem cells after selective portal vein embolization enhances functional hepatic reserves after extended right hepatectomy: a retrospective single-center study. *Ann Surg*. 2012 Jan;255(1):79-85
- ⁴⁸ Nikeghbalian S, Pournasr B, Aghdami N, Rasekhi A, Geramizadeh B, Hosseini Asl SM, Ramzi M, Kakaei F, Namiri M, Malekzadeh R, Vosough Dizaj A, Malek-Hosseini SA, Baharvand H. Autologous transplantation of bone marrow-derived mononuclear and CD133(+) cells in patients with decompensated cirrhosis. *Arch Iran Med*. 2011
- ⁴⁹ Nichols JE, Niles JA, Dewitt D, Prough D, Parsley M, Vega S, Cantu A, Lee E Cortiella J. Neurogenic and neuro-protective potential of a novel subpopulation of peripheral blood-derived

CD133+ ABCG2+CXCR4+ mesenchymal stem cells: development of autologous cell-based therapeutics for traumatic brain injury *Stem Cell Res Ther.* 2013 Jan 6;4(1):3

⁵¹ Ohtsubo S, Ishikawa M, Kamei N, Kijima Y, Suzuki O, Sunagawa T, Higashi Y, Masuda H, Asahara T, Ochi M. The therapeutic potential of ex vivo expanded CD133+ cells derived from human peripheral blood for peripheral nerve injuries. *J Neurosurg.* 2012 Oct;117(4):787-94. Jan;14(1):12-7.

⁵² Vacanti V, Kong E, Suzuki G, Sato K, Canty JM, Lee T. Phenotypic changes of adult porcine mesenchymal stem cells induced by prolonged passaging in culture. *J Cell Physiol* 2005; 205: 194-201

⁵³ Baxter MA, Wynn RF, Jowitt SN, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I. Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells* 2004; 22: 675-682

⁵⁴ Abdallah BM, Haack-Sørensen M, Burns JS, Elsnab B, Jakob F, Hokland P, Kassem M. Maintenance of differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene despite [corrected] extensive proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 326: 527-538

⁵⁵ Liu L, DiGirolamo CM, Navarro PA, Blasco MA, Keefe DL. Telomerase deficiency impairs differentiation of mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 2004; 294: 1-8

⁵⁶ Simon R. Optimal two stage designs for phase II clinical trials *Controlled Clinical Trials* 10:1-10 (1989)