



Barbara Rossi¹ (foto)
Gabriela Ciapetti²
Benedetta Spazzoli³
Davide Donati³
Nicola Baldini²

¹ UO Ortopedia e Traumatologia, ASL Umbria 1; ² SSD Fisiopatologia Ortopedica e Medicina Rigenerativa, IOR Bologna; ³ Clinica Ortopedica e Traumatologica III, IOR Bologna

Uso di cellule staminali mesenchimali adulte in medicina rigenerativa applicata all'ortopedia: presupposti, potenzialità e prospettive terapeutiche

Use of adult mesenchymal staminal cells in regenerative medicine applied to orthopedics: conditions, potential and therapeutic perspectives

Riassunto

Le cellule staminali mesenchimali (MSC) sono oggetto di grande interesse in medicina rigenerativa ortopedica.

Scopo del lavoro è presentare i protocolli di ricerca e considerare aspetti tecnici, organizzativi e legislativi sull'impiego clinico sperimentale delle MSC in ortopedia e traumatologia.

L'Istituto Ortopedico Rizzoli partecipa allo studio clinico prospettico interventistico di fase I/IIa multicentrico europeo REBORNE che prevede 3 protocolli sull'uso di MSC autologhe o allogeneiche, associate o meno a bioceramica, per trattare pseudoartrosi delle ossa lunghe e osteonecrosi della testa femorale.

Le MSC rappresentano oggi la più valida alternativa all'innesto osseo autologo: potenziali vantaggi sono la maggior disponibilità di cellule rispetto agli innesti, la mini-invasività chirurgica e la minore incidenza di comorbidità per il paziente.

Parole chiave: cellule staminali mesenchimali, medicina rigenerativa, difetti ossei, biomateriali

Summary

Mesenchymal stem cells (MSC) are the main topic in orthopedic regenerative medicine.

The aim is to present recent research protocols considering technical aspects, organization and regulations about the clinical trials on MSC in orthopedics and traumatology.

The Rizzoli Orthopaedic Institute is involved in the multicenter European REBORNE project, a prospective clinical phase I/IIa study which includes 3 protocols on the use of autologous or allogeneic MSC, associated or not to bioceramics, to treat nonunion of long bones and osteonecrosis of the femoral head.

MSCs are now the most valuable alternative TO autologous bone graft: potential advantages include greater cells availability compared to the grafts, the mini-invasive surgery and the lowest incidence of patient comorbidity.

Key words: mesenchymal staminal cells, regenerative medicine, bone defects, biomaterials

Indirizzo per la corrispondenza:

Barbara Rossi

Dipartimento Chirurgico, UO Ortopedia e Traumatologia, ASL Umbria 1, Presidio Ospedaliero Gubbio-Gualdo Tadino largo Unità d'Italia 06024 Loc. Branca, Gubbio (PG)
E-mail: barbararossi82@yahoo.it

Introduzione: aspetti del problema e presupposti clinici

La perdita di tessuto osseo può essere causata da trauma, pseudoartrosi, osteonecrosi, ampia resezione per pseudoartrosi o tumore, o *debridement* di tessuto settico. In Europa, circa un milione di pazienti all'anno sono sottoposti a interventi di ricostruzione ossea e tale incidenza è destinata ad aumentare a causa dell'allungamento della vita della popolazione¹. Ad oggi, l'innesto di osso autologo od

omologo è l'approccio chirurgico tradizionale per ottenere la rigenerazione ossea. L'utilizzo di osso autologo rappresenta la procedura più "biologica", sicura ed efficace per riparare una lesione ossea, poiché da sola fornisce, allo stesso tempo, cellule con proprietà osteogenetiche, proteine che favoriscono l'osteoiduzione e una matrice trabecolare che favorisce la crescita di nuovo osso (osteconduttiva). Tuttavia la quantità di osso autologo è limitata e il prelievo, più frequentemente dalla cresta iliaca, rappresenta un intervento chirurgico addizionale, frequentemente associato a dolore e altre complicazioni. L'alternativa a tale approccio è l'utilizzo di *innesti omologhi* da donatore, cioè osso fresco, congelato o liofilizzato, opportunamente processato, preparato, conservato e fornito dalle Banche di Tessuto Muscoloscheletrico. Questa tipologia di innesto non contiene però cellule vitali; inoltre gran parte della matrice viene distrutta dai processi di inattivazione microbiologica e virale e dal congelamento, per cui è dotata solo di proprietà osteoconduttive. Gli svantaggi di entrambe le suddette procedure di innesto hanno spinto la ricerca scientifica alla realizzazione di materiali biocompatibili da usare al posto degli innesti. La scelta dipende sia dall'obiettivo della ricostruzione, in termini di riempimento o sostegno meccanico, sia dall'approccio chirurgico più o meno invasivo, aperto o percutaneo. Di conseguenza, lo scenario dei sostituti ossei utilizzabili spazia dalle ceramiche a base di calcio-fosfato ai polimeri biodegradabili, dai granuli di idrossiapatite e tricalciofosfato alla matrice ossea demineralizzata, spesso associati a fattori ad azione osteoinduttiva (ad es. le *Bone Morphogenetic Proteins*, BMPs), mai assicurando però le proprietà osteogeniche che solo l'osso autologo può offrire^{1,2}. Di fronte a tali limitazioni e al numero sempre crescente di procedure chirurgiche ricostruttive, le cellule staminali mesenchimali adulte (MSC) sono largamente utilizzate come prodotti di terapia cellulare e tissutale e rappresentano, ad oggi, il settore di maggior interesse in medicina rigenerativa ortopedica³⁻⁶. Nel perseguire l'obiettivo della rigenerazione e riparazione di tessuto lesionato, danneggiato o modificato dal processo d'invecchiamento, l'ingegneria tissutale può giovare delle potenzialità delle MSC sia stimolate localmente a proliferare e/o differenziarsi, sia impiantate dopo opportuno isolamento, da sole o in associazione con biomateriali che fungono da matrice di sostegno^{5,7}. Come prodotti di terapia cellulare, le MSC sono soggette a manipolazioni più o meno estese, quali la selezione o isolamento cellulare e l'espansione in vitro, e sono classificate come "medicinali per terapie avanzate" (*Advanced Therapy Medicinal Product*, ATMP), attualmente utilizzabili solo nell'ambito di sperimentazioni cliniche strettamente controllate e regolamentate presso centri autorizzati dall'Istituto Superiore di Sanità e dall'AIFA (www.agenziafarmaco.gov.it).

Come già detto, il trapianto di MSC autologhe riveste uno straordinario interesse in Ortopedia e Traumatologia per il potenziale utilizzo nella guarigione e rigenerazione di tessuto osseo da processi patologici di tipo degenerativo, tumorale o traumatico.

Scopo del lavoro è riportare, a partire dai suddetti presupposti, le nozioni scientifiche alla base dei protocolli di ricerca attualmente in atto in tale ambito e considerare gli aspetti tecnici, organizzativi e le attuali regolamentazioni legislative in materia d'impiego clinico sperimentale delle MSC in ortopedia e traumatologia.

Il progetto REBORNE

Nell'ambito dell'Istituto Ortopedico Rizzoli di Bologna (IOR) la Struttura Semplice Dipartimentale Fisiopatologia Ortopedica e Medicina Rigenerativa e la Clinica Ortopedica e Traumatologica 3 partecipano attualmente allo studio clinico prospettico interventistico di fase I/IIa multicentrico europeo REBORNE *Regenerating bone defects using new biomedical engineering approaches*. REBORNE mira allo sviluppo di strategie rigenerative in campo sia ortopedico che maxillofacciale, e comprende complessivamente 5 studi clinici di fase II, con 30 pazienti seguiti in 12 Centri clinici di 8 Paesi europei. Nei tre protocolli ortopedici è previsto l'utilizzo di MSC autologhe o allogeniche associate o meno ad una bioceramica.

L'ambito ortopedico oggetto di tale ricerca intende trattare, oltre alle fratture non consolidate delle ossa lunghe (protocollo OrthoCT1 *Evaluation of efficacy and safety of autologous MSCs combined to biomaterials to enhance bone healing in patients with delayed consolidation after long bone fracture requiring graft apposition or alternative orthobiologics*, EudraCT n°2011-005441-13), anche l'osteonecrosi della testa femorale avascolare dell'adulto (protocollo OrthoCT2 *Evaluation of safety and feasibility of bone marrow derived autologous MSCs to enhance bone healing in patients with avascular necrosis of the femoral head*, EudraCT n°2012-002010-39) e l'osteonecrosi nei pazienti giovani secondaria a terapie mediche immunosoppressive (protocollo OrthoCT3 *Bone healing enhancement in patients (age 12-18 yr) with avascular necrosis of the femoral condyle or head with previously treated hematologic malignancy with immunosuppression*). Quest'ultimo ha ottenuto le autorizzazioni necessarie, ma non ha avviato ancora la fase di reclutamento pazienti.

Il protocollo OrthoCT1 è volto a dimostrare la sicurezza e l'efficacia dell'impiego combinato di biomateriali e MSC autologhe espanse per favorire la riparazione ossea nei ritardi di consolidazione e pseudoartrosi delle ossa lunghe (www.reborne.org). Nei pazienti reclutati, le MSC autologhe vengono prelevate dal midollo osseo della cresta iliaca ed espanse se-

condo le procedure di *Good Medical Practice* (GMP) presso la *Cell Factory* della Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano, fino ad ottenere 200 milioni di MSC da re-impiantare nel paziente.

Le MSC espanse vengono quindi mescolate in sala operatoria a granuli di fosfato di calcio bifasico (diametro 1-2 mm, MBCP™, Biomatlante) 30-60 minuti prima di essere impiantate localmente nel sito di difetto osseo, mantenendo o modificando il trattamento di osteosintesi già presente. Durante le visite di controllo a 6, 12, 24 e 52 settimane dall'intervento di reimpianto di MSC/granuli, il processo di guarigione ossea viene valutato mediante esami radiologici (RX e TAC) per la formazione di callo osseo, e la valutazione clinica per la presenza di nuovi sintomi, di dolore e la capacità di carico. Vengono inoltre prelevati campioni di sangue per il dosaggio dei marcatori del rimodellamento osseo nel siero dei pazienti.

L'autorizzazione del Comitato Etico IOR e dell'AIFA sono stati ottenuti a maggio 2013, il reclutamento dei pazienti è terminato a dicembre 2014, e i risultati ancora parziali sono attualmente in fase di analisi, in quanto le visite di follow-up sono tuttora in corso e si estenderanno fino a 1 anno. L'obiettivo primario dello studio è dimostrare la sicurezza dei costrutti ibridi biomateriale – MSC – e la loro equivalenza rispetto ai trattamenti standard che prevedono l'uso di tradizionali innesti biologici, in assenza dei rischi a questi connessi. L'obiettivo secondario è ottenere il consolidamento nella sede di frattura con questo approccio di ingegneria tissutale, senza aumentare il tasso di complicanze rispetto alle tecniche standard.

I risultati preliminari, seppur ancora in fase di rielaborazione, sembrano soddisfare le attese dei ricercatori: sin dal primo controllo postoperatorio è stata documentata, nei pazienti trattati presso il centro italiano IOR, la riduzione del dolore e segni radiografici di formazione di callo e successivamente, a 3 e 6 mesi, la consolidazione ossea nei pazienti trattati con protocollo OrthoCT1.

Per quanto riguarda il protocollo di trattamento dell'osteonecrosi (ON) della testa del femore, le autorizzazioni dell'AIFA e del Comitato Etico IOR sono state ottenute definitivamente nel marzo 2014 e il primo paziente è stato reclutato a novembre 2014. Il protocollo prevede il prelievo di MSC autologhe dal midollo osseo della cresta iliaca e l'espansione come sopra, fino ad ottenere 140 milioni di MSC da reimpiantare attraverso il tramite di 'core decompression' della testa femorale. I pazienti trattati allo IOR fino ad ora sono 3, di cui 1 con ON a seguito di trattamento terapeutico per talassemia beta e 2 con ON a eziologia non nota. I dati clinici e radiologici raccolti durante le visite di controllo, previste fino a due anni dall'intervento di inserimento delle MSC espanse, sono ancora troppo scarsi per trarre alcuna conclusione.

Terapia avanzata basata sull'utilizzo di MSC: applicazione clinica in ortopedia e traumatologia

La chirurgia ortopedica moderna ha sempre più esigenza di possibilità ricostruttive biologiche: da qui l'importanza di approfondire lo stato dell'arte in merito alle applicazioni cliniche dei prodotti di terapia avanzata cellulare per la rigenerazione ossea^{8,9}.

Le MSC sono presenti nel midollo osseo, dove costituiscono la controparte stromale della componente staminale ematopoietica, ma sono presenti anche nel sangue periferico, nel cordone ombelicale e in altre sedi fra cui il tessuto muscolare, quello adiposo, la sinovia e il periostio¹⁰. Le MSC del midollo osseo sono le più utilizzate ed oggetto di numerosi trial clinici, cui è ricco il midollo osseo, sia per l'agevole reperibilità dall'agoaspirato da cresta iliaca¹¹. Le MSC possono replicarsi illimitatamente (*self-renewing*) e in coltura formano popolazioni omogenee di cellule simil-fibroblastiche aderenti che, se stimolate opportunamente, si differenziano in specifiche popolazioni cellulari di derivazione mesodermica (osteoblasti, osteociti, adipociti, condrociti, ecc.): sono quindi multipotenti prestandosi a varie possibilità applicative nella rigenerazione di tessuto muscolo-scheletrico^{3,10,12,13}.

Le MSC hanno dimostrato la capacità di modulare alcune componenti del sistema immunitario¹⁴ ed esercitano un ruolo attivo nella neoangiogenesi¹⁵. Possiedono, inoltre, la capacità di produrre componenti della matrice extracellulare (collagene, fibronectina, laminina) e secernere fattori di crescita, citochine e interleuchine, essenziali nei processi di commissionamento, differenziamento e maturazione funzionale di altri progenitori o cellule adulte^{4,7}: questa produzione e rilascio di molecole attive su altre cellule o meccanismi è la cosiddetta attività paracrina delle MSC, indicata nel 2006 da Caplan e oggi ritenuta alla base dei processi di rigenerazione modulati dalle MSC⁴.

La ricerca negli ultimi anni si è concentrata sulla standardizzazione di protocolli di isolamento ed espansione di MSC da varie fonti tessutali, sulla caratterizzazione delle loro proprietà fenotipiche e biologiche, sullo sviluppo di terapie avanzate che combinano le MSC a *scaffold* sintetici e molecole segnale (fattori di crescita e di differenziazione tissutale) per la realizzazione di costrutti ibridi^{2,5-7,16-18}. Infatti, nonostante la scoperta e successiva caratterizzazione delle MSC come elementi per la rigenerazione risalga a 25-30 anni fa, l'effettiva applicazione in clinica è tuttora limitata a causa della mancanza di standardizzazione di sistemi e protocolli di isolamento/espansione, con conseguente variabilità dei risultati¹⁹. I primi studi per il sistema muscoloscheletrico consistevano nella somministrazione

di MSC, prelevate da topo *wild-type*, in topi transgenici che esprimevano un gene mutato per collagene tipo I isolato da un paziente con osteogenesi imperfetta, con l'obiettivo di migliorarne la fragilità ossea²⁰. I risultati incoraggianti indussero un gruppo di ematologi ad avviare la prima pratica clinica utilizzando MSC da donatori sani da infondere in bambini con osteogenesi imperfetta potenzialmente fatale²¹. Il miglioramento tuttavia si rivelò temporaneo e con scarse prove di attecchimento delle cellule a lungo termine; i risultati non sostennero la speranza iniziale che le MSC infuse potessero definitivamente sostituire una sufficiente frazione degli osteoblasti nei bambini che esprimevano il gene mutato del collagene^{3 20 21}. In seguito, sono state proposte diverse modalità d'impiego delle MSC finalizzate al trattamento di perdita di sostanza ossea localizzata post-traumatica: prelevate dal midollo osseo e direttamente impiantate per iniezione percutanea nella sede del danno osseo, oppure previa centrifugazione, coltura e/o espansione cellulare, applicate da sole o in combinazione ad una matrice, associando o meno il loro impianto ad altre procedure chirurgiche quali osteotomie o osteosintesi^{3 5 6 22-24}. Nonostante le MSC dell'agoaspirato midollare possano essere teoricamente iniettate direttamente nella sede di lesione ossea, alcuni studi hanno dimostrato che la probabilità di guarigione è proporzionale alla loro concentrazione locale. Pertanto è possibile separare la frazione cellulare mononucleare del midollo osseo tramite centrifugazione e concentrarle fino a 3-6 volte rispetto alla loro numero nel prelievo iniziale²⁵. Alternativamente le cellule midollari mononucleate possono essere coltivate *in vitro* per isolare ed espandere la corrispondente frazione di MSC, incrementando la loro concentrazione fino ad ottenere milioni di cellule^{3 26}.

Con il documento pubblicato nel 2010 dalla Commissione Rigenerazione Tissutale², la SIOT si è espressa in maniera dettagliata ed aggiornata sullo stato dell'arte della rigenerazione tissutale in campo ortopedico, fornendo preziosi suggerimenti per ulteriori sviluppi scientifici e quasi prevedendo il potenziale impiego terapeutico delle MSC, attualmente diventato una realtà in via di sperimentazione. Gli approcci di medicina rigenerativa sono potenzialmente applicabili non solo nei difetti ossei di natura traumatica, ma anche nei ritardi di consolidazione, nelle pseudoartrosi, nelle osteonecrosi, nelle fratture da fragilità osteoporotica, e nelle fratture periprotetiche, cioè in tutte quelle condizioni in cui è richiesta la rigenerazione ossea ma il potenziale osteogenico risulta insufficiente per il danno traumatico locale vascolare o tissutale, per le dimensioni della perdita di sostanza ossea in sé o per comorbidità proprie del paziente. È innegabile quindi che le MSC rappresentino oggi la più valida alternativa all'innesto osseo autologo: i potenziali vantaggi della terapia cellulare consistono nella

maggior disponibilità e concentrazione di cellule rispetto agli innesti, nella durata più breve e nella mini-invasività della procedura chirurgica, nonché in una minore incidenza di comorbidità per il paziente⁸.

Normative sulla sperimentazione clinica di MSC in Ortopedia e Traumatologia

Come già accennato, nonostante l'accertata potenzialità delle MSC di innescare e regolare il processo di rigenerazione ossea, vari fattori limitano la loro applicazione clinica in ortopedia. La scarsità di esperienza clinica, la controversia dei risultati riportati in letteratura e quindi le conclusioni sui potenziali benefici o effetti collaterali, sono legati alle caratteristiche del biomateriale delle MSC stesse, e, conseguentemente, dall'estrema variabilità dei *cell-scaffold composites* e del microambiente osseo che riceve il costrutto^{6 16 27 28}. Innanzitutto i biomateriali, il cui utilizzo è ancora ristretto a piccoli difetti ossei, devono essere colonizzati da cellule, vascolarizzati e progressivamente sostituiti da nuovo osso per promuovere la guarigione ossea^{23 29}. In secondo luogo, l'approccio autologo di isolamento e differenziamento osteogenico delle MSC è complicato in termini di procedure logistiche, preparazione, costi, sicurezza. A fronte della possibilità di isolare ed espandere *in vitro* le MSC adulte, i meccanismi molecolari che ne regolano la stabilità genomica, la velocità di replicazione, il processo di commissionamento e differenziamento cellulare non sono ancora interamente chiariti^{3 8 30}. Inoltre l'associazione tra biomateriali e cellule osteoprogenitrici proposti in differenti trial clinici comporta quesiti tecnici in merito alla fonte d'estrazione cellulare, la dose, il timing di combinazione, ecc.; non meno importante, la rigenerazione ossea richiede una struttura tissutale complessa in cui la vascolarizzazione e la neoangiogenesi giocano un ruolo fondamentale. Infine, il differenziamento osteogenico delle MSC combinate agli innesti *in vivo* non è analogamente supportato, come avviene nel differenziamento indotto *in vitro*, da fattori di crescita osteogenici²³.

Concentrate, espanse o meno, prima dell'impianto in sala operatoria le MSC possono essere combinate ad una matrice osteoconduttiva naturale (*allograft*) o sintetica, purché il biomateriale sia certificato dalla Comunità Europea per il suo impiego clinico e la concentrazione cellulare sia preparata e combinata al biomateriale attraverso un procedimento scientificamente sviluppata e approvata secondo le norme di GMP (Direttiva 2009/120/EC)¹. Tuttavia, il passaggio alla pratica clinica è quanto mai problematico, poiché l'utilizzo di MSC è considerato dalla nostra legislazione corrente una "terapia farmacologica avanzata":

ne derivano la necessità di certificazione dei laboratori, i costi elevati, gli aspetti medico legali, le autorizzazioni di marketing, la rintracciabilità, le ripercussioni in campo etico, la tematica della donazione, i criteri di selezione della popolazione donatrice. I medicinali per terapia avanzata composti da cellule o tessuti umani si distinguono in prodotti la cui donazione, l'approvvigionamento e il controllo sono regolamentati dalla legislazione sui trapianti di cellule e tessuti (Direttiva 2004/23/CE), mentre altri prodotti come le MSC che subiscono una manipolazione sostanziale, come l'espansione, sono definiti e regolamentati da altre norme specifiche per medicinali di terapia avanzata (Direttiva 2001/83/CE e Regolamento CE n° 1394/2007)^{2 8 31}: non sempre è facile determinare in quale categoria rientra un prodotto cellulare e le diverse norme comportano anche diverse procedure amministrative, legali, finanziarie e di autorizzazioni in caso di proposta di trial clinico.

In base al tipo di prodotto medicinale e dell'indicazione terapeutica, un trial clinico con MSC deve essere supportato da solidi studi preclinici con lo scopo di ottenere le autorizzazioni dalle Autorità Nazionali Competenti e dei Comitati Etici di Ricerca degli Stati partecipanti alla sperimentazione, dall'EMA (*European Medical Agency*) e dalla Commissione Europea, nonché di un accordo contrattuale finanziario tra lo sponsor, i ricercatori ed i rispettivi centri di ricerca. Prima di sottoporre il progetto, gli investigatori devono richiedere un numero identificativo dello studio dal sistema EudraCT (*European Union Drug Authorities Clinical Trials*), ovvero un database europeo che regola le sperimentazioni cliniche interventistiche con prodotti medicali condotte dopo il 1 maggio 2004. Istituito in accordo alla Direttiva Europea 2001/20, tale registro è confidenziale e accessibile alle Autorità Competenti degli Stati membri, all'EMA e alla Commissione Europea. La sottomissione dello studio clinico al giudizio delle Autorità Nazionali Competenti e dei Comitati Etici include tutta la documentazione, quindi cover letter, n° EudraCT, protocollo, elenco e affiliazioni dei partecipanti, dossier sul prodotto medicinale, istruzioni operative standard su prelievo-raccolta-concentrazione-reimpianto di MSC, procedure di rintracciabilità dei materiali, schede tecniche di raccolta dati e consenso informato per singolo paziente, ecc. Inoltre molti di questi documenti devono essere presentati in copie multiple e/o ulteriore versione sintetica. In caso di studi multicentrici e multinazionali si aggiungono documenti specifici per particolari procedure, schede tecniche e autorizzazioni per ogni centro partecipante. Da ciò si evince quanto sia complesso organizzare un trial multicentrico, imbattendosi spesso in difficoltà di accordo e divergenze che compromettono la possibilità di attuazione dello studio^{8 32}. Una strategia di recente implementazione per ridurre la complessità di approvazione degli studi multi-nazionali è la procedura

denominata *Voluntary Harmonization Procedure* (VHP), una procedura europea condivisa che, attraverso 3 fasi, permette l'approvazione, da parte dei rappresentanti dei diversi NCA (*National Competent Authorities*), della serie di documenti previsti in un tempo massimo di 2,5-3 mesi. Oltre alla complessità di approcciare le norme vigenti in merito all'impiego di terapie avanzate combinate, allo stato attuale non vi sono linee guida nazionali né direttive nazionali che regolamentino le modalità con cui il chirurgo deve richiedere ed utilizzare questi prodotti e medicinali, se non rivolgendosi alle normative della propria Regione. La scarsità di ATMP approvati da EMA ad oggi conferma la complessità delle procedure e la necessità di conferme inequivocabili. Sono 4 infatti gli ATMP approvati in Europa: ChondroCelect, un prodotto che contiene cellule derivate dalla cartilagine, *approvato nel 2009*; Glybera, un prodotto derivato dalla terapia genica approvato nel 2012, che migliora lo stato di salute dei pazienti affetti da alcune forme di pancreatite; *Maci*, approvato nel 2013, una sorta di cerotto su cui si fanno crescere le cellule della cartilagine del paziente, successivamente impiantato nel ginocchio; Provenge, che prevede il prelievo di cellule del sistema immunitario che vengono reinfuse, dopo essere state appositamente trattate, per attaccare le cellule metastatiche del cancro della prostata.

Obiettivi della sperimentazione clinica con MSC: sicurezza, applicabilità ed efficacia

Le MSC sono oggetto di studio di più di 273 trial clinici di fase I e II (www.clinicaltrials.gov), tuttavia non tutti soddisfano a pieno i criteri regolatori, gli studi preclinici sono spesso deboli e insufficienti, i prodotti cellulari sono difficili da riprodurre in maniera standardizzata, e i risultati sono supportati da scarse pubblicazioni¹.

È quindi evidente che la sperimentazione clinica delle MSC richiede la definizione di normative unitarie in merito alle procedure di preparazione e mantenimento delle MSC, con metodi e tecniche standardizzate e condivise tra i laboratori. Altrettanto evidente è la difficoltà di ottenere procedure standard di riferimento proprio a causa della eterogeneità sia dei pazienti, che dei campioni tissutali di prelievo, come anche delle colture espanse.

Il prodotto cellulare oggetto di studio deve soddisfare gli standard di qualità richiesti dalla legislazione europea, di dati preclinici in vitro in coltura e in vivo su modelli animali, che provino la sicurezza delle cellule, della procedura e dell'ospite ricevente, la capacità effettiva delle MSC di produrre osso, cartilagine o il tessuto desiderato sia in laboratorio che nell'ospite ricevente, e fornire dati in merito

alla dose di tossicità, tossicità riproduttiva e carcinogenesi. Tutte queste fasi, in realtà, rappresentano solo il primo passo per procedere a studi clinici di fase I/IIa per testare la sicurezza, l'applicabilità e l'efficacia delle MSC in vivo^{8,10}. Questo comporta un percorso scientifico lento, meticoloso e non scevro di ostacoli. Innanzitutto, gli studi possono coinvolgere solo una popolazione ristretta ed omogenea (a fronte dell'eterogeneità dei pazienti che nella nostra pratica clinica potrebbero giovare di tale trattamento). I criteri di inclusione/esclusione sono quanto mai ristretti per età, comorbidità quali comuni malattie cardiovascolari o diabete; per tutta la durata dello studio, i pazienti non possono assumere farmaci di largo consumo quali corticosteroidi, bifosfonati, ecc. In secondo luogo, gli studi di sicurezza si devono estendere alla risoluzione dei problemi tecnici, alla valutazione di possibili complicanze a livello locale, ma anche agli effetti sistemici, e questi ultimi necessitano di un periodo di osservazione piuttosto lungo.

In terzo luogo, l'efficacia va provata con differenti sistemi di valutazione clinica, oggettivi e soggettivi, che nel campo prettamente ortopedico prevedono lunghi follow-up con imaging integrato, dosaggio di numerosi marker osteometabolici, diversi test e questionari di funzionalità meccanica, indagini sul dolore e sulla qualità della vita. Inoltre, può sussistere una oggettiva difficoltà di organizzare sale operatorie, farmacia, radiologia, *Cell Factory*, rintracciarne le procedure e i rispettivi costi. Infine, la necessità di divulgazione dello studio e di maggior reclutamento dei pazienti, l'elevato turnover di coordinatori e personale dedicato, l'eventuale proroga del periodo di reclutamento pazienti e di follow-up, sono tutte cause di ulteriore impegno ma anche di costi aggiuntivi. Non a caso un buon numero di studi clinici è promosso da *companies* o case farmaceutiche in grado di sopportare i costi elevati.

In questo contesto, con i due trial OrthoCT1 e OrthoCT2, il progetto europeo REBORNE sta verificando l'efficacia di protocolli di rigenerazione ossea che vanno dalla preparazione del 'prodotto biologico' al concreto impiego clinico delle MSC nelle pseudoartrosi e nelle osteonecrosi. Raccolti e analizzati i dati di questa prima fase, il consorzio si propone il confronto delle due possibili alternative di impiego delle cellule: soggette a manipolazione in vitro ed espansive in *Cell Factory* autorizzate vs procedure *one step* che utilizzano la componente cellulare midollare prelevata e subito reimpiantata nel paziente. Il confronto dell'efficacia clinica di tali procedure, quella tradizionale e quelle innovative ortobiologiche, è stato oggetto di una nuova *proposal* presentata in febbraio 2015 nell'ambito del programma europeo H2020 (H2020-PHC-15-2015: *Clinical research on regenerative medicine*).

Conclusioni

Il progresso della terapia medica basata su MSC genera molteplici aspettative ma necessita di un approccio metodologico rigoroso. L'esperienza clinica e scientifica di Centri Specializzati che si occupano di terapie avanzate, di cellule staminali e di difetti muscolo scheletrici maggiori è necessaria per affrontare un argomento così complesso e non completamente esplorato, ai confini della scienza, anche per evitare un utilizzo improprio e non efficace, per indicazioni errate, metodologia poco accurata, aspettative miracolistiche. Nello scenario delle delicate e avverse condizioni in cui riversa oggi la chirurgia ortopedica, in termini di sempre maggiori richieste funzionali e performanti dei pazienti, di ricerca di innovazione, competitività aziendale, di rischi medico-legali, tagli delle risorse, è altrettanto imperativo che l'esperienza e la ricerca nazionale in questo campo venga raccolta e unificata, pur nella molteplicità dei suoi aspetti, sotto lo sguardo attento e lo spirito unitario di sorveglianza della S.I.O.T.

Bibliografia

- 1 Gómez-Barrena E, Rosset P, Lozano D, et al. *Bone fracture healing: cell therapy in delayed unions and nonunions*. Bone 2015;70:93-101.
- 2 Commissione Rigenerazione Tissutale S.I.O.T. *Rigenerazione Tissutale in Ortopedia: stato dell'arte in Italia*. Fascicolo monografico GIOT 2010;36:171-242.
- 3 Derubeis AR, Cancedda R. *Bone marrow stromal cells (BMSCs) in bone engineering: limitations and recent advances*. Ann Biomed Eng 2004;32:160-5.
- 4 Caplan AI, Dennis JE. *Mesenchymal stem cells as trophic mediators*. J Cell Biochem 2006;98:1076-84.
- 5 Drosse I, Volkmer E, Capanna R, et al. *Tissue engineering for bone defect healing: an update on a multi-component approach*. Injury 2008;39:9-20.
- 6 Khan Y, Yaszemski MJ, Mikos AG, et al. *Tissue engineering of bone: material and matrix consideration*. J Bone Joint Surg Am 2008;90:36-42.
- 7 Ciapetti G, Granchi D, Devescovi V, et al. *Enhancing osteoconduction of PLLA-based nanocomposite scaffolds for bone regeneration using different biomimetic signals to MSCs*. Int J Mol Sci 2012;13:2439-58.
- 8 Gómez-Barrena E, Avendano-Solá C, Bunu CP. *Regulatory authorities and orthopaedic clinical trials on expanded mesenchymal stem cells*. Int Orthop 2014;38:1803-9.
- 9 Zigdon-Giladi H, Rudich U, Michaeli Geller G, et al. *Recent advances in bone regeneration using adult stem cells*. World J Stem Cells 2015;7:630-40.
- 10 Prockop DJ, Prockop SE, Bertoncello I. *Are clinical trials with mesenchymal stem/progenitor cells too far ahead of the science? Lessons from experimental hematology*. Stem Cells 2014;32:3055-61.

- ¹¹ Murphy MB, Moncivais K, Caplan A. *Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine*. *Exp Mol Med* 2013;45:54.
- ¹² Heino TJ, Hentunen TA. *Differentiation of osteoblasts and osteocytes from mesenchymal stem cells*. *Curr Stem Cell Res Ther* 2008;3:131-45.
- ¹³ Fiorentini E, Granchi D, Leonardi E, et al. *Effects of osteogenic differentiation inducers on in vitro expanded adult mesenchymal stromal cells*. *Int J Artif Organs* 2011;34:998-1011.
- ¹⁴ Bloom DD, Centanni JM, Bhatia N, et al. *A reproducible immunopotency assay to measure mesenchymal stromal cell-mediated T-cell suppression*. *Cytotherapy* 2015;17:140-51.
- ¹⁵ Melchiorri AJ, Nguyen BN, Fisher JP. *Mesenchymal stem cells: roles and relationships in vascularization*. *Tissue Eng Part B Rev* 2014;20:218-28.
- ¹⁶ Petite H, Viateau V, Bensaid W, et al. *Tissue engineered bone regeneration*. *Nat Biotechnol* 2000;18:959-963.
- ¹⁷ Chanda D, Kumar S, Ponnazhagan S. *Therapeutic potential of adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells in diseases of the skeleton*. *J Cell Biochem* 2010;111:249-57.
- ¹⁸ Fekete N, Rojewski MT, Lotfi R, et al. *Essential components for ex vivo proliferation of mesenchymal stromal cells*. *Tissue Eng Part C Methods* 2014;20:129-39.
- ¹⁹ Singh J, Onimowo JO, Khan WS. *Bone marrow derived stem cells in trauma and orthopaedics: a review of the current trend*. *Curr Stem Cell Res Ther* 2014;10:37-42.
- ²⁰ Pereira RF, O'Hara MD, Laptev AV, et al. *Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:1142-7.
- ²¹ Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, et al. *Transplantability and therapeutic effects of bone marrow derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta*. *Nat Med* 1999;5:309-13.
- ²² Hernigou P, Mathieu G, Poignard A, et al. *Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Surgical technique*. *J Bone Joint Surg Am* 2006;88:322-7.
- ²³ Gómez-Barrena E, Rosset P, Muller I, et al. *Bone regeneration: stem cell therapies and clinical studies in orthopaedics and traumatology*. *J Cell Molec Med* 2011;15:1266-86.
- ²⁴ Rosset P, Deschaseaux F, Layrolle P. *Cell therapy for bone repair*. *Orthop Traumatol Surg Res* 2014;100:107-12.
- ²⁵ Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, et al. *Percutaneous autologous bone marrow grafting for non-unions. influence of the number and concentration of progenitor cells*. *J Bone Joint Surg Am* 2005;87:1430-7.
- ²⁶ Laitinen A, Oja S, Kilpinen L, Kaartinen T, et al. *A robust and reproducible animal serum-free culture method for clinical-grade bone marrow-derived mesenchymal stromal cells*. 2015 Mar 17 [Epub ahead of print].
- ²⁷ Nombela-Arrieta C, Ritz J, Silberstein LE. *The elusive nature and function of mesenchymal stem cells*. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011;12:126-31.
- ²⁸ Plant AL, Parker GC. *Translating stem cell research from the bench to the clinic: a need for better quality data*. *Stem Cells Develop* 2013;22:2457-8.
- ²⁹ Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. *Bone tissue engineering: recent advances and challenges*. *Crit Rev Biomed Eng* 2012;40:363-408.
- ³⁰ Bara JJ, Richards RG, Alini M, et al. *Bone marrow-derived mesenchymal stem cells change phenotype following in vitro culture: implications for basic research and the clinic*. *Stem Cells* 2014;32:1713-23.
- ³¹ Regulation (EC) No 1394/2007 of the European Parliament and of the Council of 13 November 2007 on advanced therapy medicinal products and amending Directive 2001/83/EC and Regulation (EC) No 726/2004. Retrieved 12/03/2014, from http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-1/index_en.htm#reg
- ³² Headlee D. *The paper trail: CFRs, source documents and data collection tools*. *SoCRA Source*, 2004;30.

Gli Autori dichiarano di non avere alcun conflitto di interesse con l'argomento trattato nell'articolo.