

# PROGETTO

## LA TERAPIA CON CELLULE STAMINALI SECONDO PROTOCOLLI THANKSTEM SRL

### STORIA DELLA SOCIETA' THANKSTEM SRL

Dal 2006, Thankstem Srl si dedica allo sviluppo della terapia con cellule staminali autologhe del sangue.

Grazie alla qualificazione e alla quantificazione in vitro delle cellule presso l'Università di Tor Vergata (Roma), Thankstem Srl è diventata l'unica proprietaria di brevetti, approvati in 34 paesi, che si basano su una metodologia sicura e ben studiata che semplifica l'acquisizione di cellule staminali autologhe in tutte le fasi del processo che utilizza :

- Sangue autologo
- Sangue intero
- Sostanze deprogrammanti in quantità omeopatica
- Tempo 72 ore
- Inoculazione endovenosa, intramuscolare o sottocutanea locale o generale
- Nessuna logistica: solo un kit costituito da 4-6 provette

### Caratteristiche del trattamento

Il trattamento consiste nella somministrazione nei pazienti di **cellule staminali pluripotenti** autologhe non indotte, una tipologia di cellule considerate impossibili da ottenere in natura, utilizzando un semplice prelievo di sangue venoso periferico, pochi millilitri, che viene deprogrammato in apposite provette preparate in "camera bianca".

Il nostro articolo "La plasticità delle cellule staminali di origine ematica: differenziazione epatica in vitro", pubblicato su The Journal of Cellular Physiology, dimostra che le cellule staminali pluripotenti che otteniamo possono essere riprogrammate in cellule epatiche, il che risulta impossibile con cellule staminali mesenchimali o ematopoietiche.

Le cellule staminali che otteniamo, identificate attraverso Sorter e approvate da alcuni dei maggiori esperti mondiali di cloni cellulari, hanno solo recettori di staminalità che sono stati quantificati e qualificati, il che ci ha permesso di brevettare il nostro sistema e renderlo adatto per un processo sperimentale umano legale e sicuro.

Ulteriori vantaggi rispetto ad altri tipi di cellule staminali sono la non invasività del prelievo di sangue (sono sufficienti pochi millilitri di sangue venoso periferico) e la completa assenza di effetti collaterali grazie ad una corretta applicazione del nostro protocollo di trattamento.

## **Cellule staminali adulte autologhe ottenute da sangue intero**

Le cellule staminali adulte pluripotenti autologhe sono state da noi ottenute da sangue venoso periferico per de-programmazione.

Il metodo è stato brevettato in tutte le sue parti.

Tali cellule sono state identificate attraverso caratterizzazione effettuata mediante analisi citofluorimetrica tramite fotometro a flusso Facsan Becton-Dickinson e validate da esperti in cloni cellulari. Avendo solo recettori di staminalità, sono state qualificate e quantificate, permettendo di brevettare il nostro sistema.

Si tratta di **tre tipologie di staminali adulte**: staminali **ematopoietiche**, staminali **mesenchimali** e staminali **pluripotenti adulte non indotte**. Il seguente lavoro: "Blood-derived Stem Cells (BDSCs): in Vitro Hepatic Differentiation." Journal of Cellular Physiology, 228:1249-1254, Alaimo G, Cozzoli E, Marfe G, Esposito L, Ranalli M, Hmada D, Giordano A, Gambacurta A 2013 dimostra che alcune delle staminali che otteniamo dal sangue, le pluripotenti, possono essere riprogrammate in cellule epatiche, cosa che risulta impossibile per cellule staminali ematopoietiche o mesenchimali, ma possibile per staminali con questa caratteristica.

L'inoculazione di staminali, oltre ad essere autologa, è anche omologa perché il sangue è presente in ogni tessuto. Nella preparazione viene usato il siero autologo del paziente contenuto nel sangue per mantenere le cellule in vita evitando così la possibilità di reazione al Non-Self.

Il metodo di espansione in vitro di cellule staminali da sangue venoso periferico consente l'ottenimento di cellule staminali pluripotenti autologhe non indotte che una volta

somministrate nel mammifero adulto **non danno luogo ad effetti collaterali** come fenomeni di rigetto, di infezione ( non sono cellule eterologhe, non sono tenute in terreni di coltura di origine animale) o sviluppo di teratomi ( non sono eterologhe modificate con retrovirus, tecnica di Yamanaka).

La metodica sviluppata dalla Thankstem Srl consente di preparare staminali adulte autologhe in qualunque struttura medica evitando qualsiasi tipo di manipolazione cellulare fatta in laboratorio.

Infatti, non vi è la necessità di effettuare trattamenti, come l'eliminazione dei globuli rossi o la purificazione delle staminali rispetto a tutte le altre componenti del sangue o l'ottenimento di una maggior quantità di staminali pluripotenti rispetto alle altre due componenti di staminali, le ematopoietiche e le mesenchimali, o la messa in coltura o la differenziazione in altre tipologie cellulari.

Tali trattamenti aggiuntivi possono stressare le staminali ottenute, lasciandole vive, ma con meno potenziale rigenerativo.

La preparazione di staminali secondo il nostro metodo evita la complessa preparazione in un laboratorio, permettendo ad un qualsiasi ospedale, clinica o studio medico di preparare staminali attraverso il possesso di un kit di provette arricchite con fattori di deprogrammazione .

In altre parole, attraverso un'unica provetta, contenente tali fattori, in cui mettere pochi ml di campione di sangue venoso periferico con anticoagulante per 72 ore a temperatura di 4/8 gradi centigradi è possibile ottenere staminali pluripotenti autologhe non indotte atte a migliorare patologie ortopediche, cardiache, dermatologiche, oftalmiche, neurologiche, metaboliche ,etc.....

Ulteriori vantaggi rispetto agli altri tipi di cellule staminali sono la non invasività del prelievo e la garanzia di un protocollo terapeutico sicuro ottenuto da 50.000 inoculazioni in 10 anni su animali vicini nella scala zoologica all'uomo e su patologie non provocate. Inoltre è stato constatato che l'applicazione frequente di questa terapia per periodi lunghi (fino a 10 anni) in decine di cani e cavalli non ha dato esito ad alcun effetto collaterale.

## **STEP SCIENTIFICI EFFETTUATI:**

- 10 ANNI DI RICERCA IN CAMPO VETERINARIO IN CANI E CAVALLI SU PATOLOGIE NON PROVOCATE SIMILI A QUELLE UMANE. (UNICO CASO DI VIDEO PRESENTI SU YOUTUBE E FACEBOOK CHE MOSTRANO UN PRIMA E UN DOPO TERAPIA, digitare: staminali e polettini),
- 3 BREVETTI DEPOSITATI ED ACCETTATI IN 34 PAESI E KNOWHOW TERAPEUTICO DELINEATO,
- NUMEROSI STUDI, PUBBLICATI SULLE PRINCIPALI RIVISTE SCIENTIFICHE, ATTESTANTI LA VALIDITA' DELLA TERAPIA E CONVALIDANTI LE SPECIFICHE DI PLURIPOTENZA DELLE CELLULE STAMINALI OTTENUTE. (pagina 5-6),
- AVVIATO PERCORSO SCIENTIFICO ISTITUZIONALE IN ITALIA PER LA VALIDAZIONE DI TALE TERAPIA NELLA CARDIOMIOPATIA DILATATIVA TRAMITE SOCIETA' DI CONSULENZA E CELL FACTORY (pagina 7-8-9).

## **LA TERAPIA VERRA' EFFETTUATA PER :**

- PATOLOGIE NEURODEGENERATIVE ( Alzheimer, Parkinson, Sclerosi Multipla...)
- PATOLOGIE ORTOPEDICHE ( Tendinopatie, Condropatie, Artrosi, Traumi...)
- ANTIAGING
- CARDIOPATIE
- MALATTIE AUTOIMMUNITARIE
- MALATTIA DI LYME
- PATOLOGIE OCULARI

## Pubblicazioni:

Polettini M, Zohar G, Gabbiani C, et al. "Application of stem cells obtained from peripheral blood in therapy of tendons, ligaments and skin's injuries", in Proceedings. 16th Annual Meeting of the Italian Association of Equine Practitioners (SIVE) 2010;321-322

Polettini M, Cagni G, Gabbiani C, Zohar G and Gambacurta A. "Prospects of the use of stem cells obtained from peripheral blood in degenerative myocardial pathologies. Presented at : World conference on regenerative medicine. Leipzig Germany 2-4 november 2011

Spaas JH, Gambacurta A, Polettini M, et al. Purification and expansion of stem cells from 240 equine peripheral blood, with clinical applications. Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift. 241; 80:129-135 (2011)

Spaas J, Gambacurta A, Polettini M, Broeckx S, Van Hoeck F, De Schauwer C, Van de Walle G. Purification and expansion of stem cells from equine peripheral blood, with clinical applications. Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift, 2011, vol. 80; p. 129-135, ISSN: 0303-9021

Marfe G, Massaro-Giordano M, Ranalli M, Cozzoli E, Di Stefano C, Malafoglia V, Polettini M, Gambacurta A. "Blood Derived Stem Cells: An ameliorative therapy in ophthalmologic field. Journal of Cellular Physiology, March 2012, vol. 227, ISSN: 0021-9541, doi: 10.1002/jcp. 22953

Spaas, J., Broeckx, S., Van de Walle, G., & Polettini, M. (2012). The effects of equine peripheral blood stem cells (PBSC) on cutaneous wound healing : a clinical evaluation in four horses. CLINICAL AND EXPERIMENTAL DERMATOLOGY

Polettini M, Gambacurta A. Thankstem. Thank you stem cells! The peripheral blood stem cells cure, improve metabolism and quality of life. Therapeutic deduction by more than 1500 injections in horses and dogs. Edizioni Altea, Rome, Italy (2006)

Polettini M. Peripheral blood derived stem cells, treatment in touch with the future. Edizioni Altea, Rome, Italy (2011)

Polettini, "Blood Stem Cell Therapy for Eye Diseases in Horses" Edizioni Altea 2012

Poster presentation in NARMVA Congress, in Georgia, U.S.A, November 7-8-9, 2012

"How to use Stem Cells Obtained from Peripheral Blood in Dermatology and Ophthalmology" presented in Orlando at the Florida Association Equine Practitioners Congress in November 2010

"Prospects of the use of stem cells obtained from peripheral blood in degenerative myocardial pathologies" presented at the World conference on regenerative medicine, Leipzig Germany 2-4 november 2011

“The Role of the Horse Treating Vet” presented at Siena in “ Siena Cavalli Congress” in August 2012

Marfe G, Rotta G, De Martino L, Tafani M Fiorito F, Di Stefano C, Poletini M, Ranalli M Russo M.A., Gambacurta A. “A New Clinical Approach: Use of Blood Derived Stem Cells (BDSCs) for Superficial Flexor Tendon Injuries in Horses.” *ELSEVIER Life Sciences* 90 (2012) 825-830

Alaimo G, Cozzoli E, Marfe G, Esposito L, Ranalli M, Hmada D, Giordano A, Gambacurta A “ Blood-derived Stem Cells (BDSCs): in Vitro Hepatic Differentiation.” *Journal of Cellular Physiology*,228:1249-1254, 2013.

“Blood Derived Stem Cells: Why and How they work according to quantistic concepts in some horses and dogs’ pathologies irresponsive to treatments” presented at World Regenerative Medicine 2013 Congress in Leipzig.

“Regenerative Medicine: a New Theoretical and Clinical Approach” presented at Regenerative Medicine Veterinary Congress in Bonn February 2014

“The navicular syndrome: a new pathogenetic theory and therapy with blood stem cells” presented at Regenerative Medicine Veterinary Congress in Bonn February 2014

Poletini M.,Zohar G., gabbiani C.“The “non local” bio-physics effects in the Central Nervous System after treatment with stem cells obtained from de-programmed blood in veterinary clinical cases.” presented at the World conference on regenerative medicine, Leipzig Germany 21-23 October 2015.

# **Cellule Staminali Adulte Ottenute da Sangue Periferico Per il Trattamento Autologo di Pazienti con Cardiomiopatia Dilatativa**

## **Relazione Riassuntiva per Audizione “Pre-Submission” Sperimentazione Clinica di Fase I e I/II**

### **1. RAZIONALE**

La cardiomiopatia dilatativa (CMPD) è una malattia del muscolo cardiaco che si manifesta con riduzione della contrattilità e da dilatazione e disfunzione ventricolare sinistra, associate a eventuali segni e sintomi di scompenso cardiaco, aritmie e rischio tromboembolico. L'incidenza annuale di CMPD è di circa 5-8 persone su 100.000 individui, anche se recentemente è stata riportata essere più alta.

In passato la prognosi della CMPD era considerata estremamente sfavorevole con una mortalità di circa il 50% nei due anni successivi alla diagnosi. Negli ultimi trenta anni il miglioramento delle conoscenze sulla fisiopatologia dello scompenso cardiaco cronico, la diagnosi sempre più precoce, il consolidarsi di validate terapie farmacologiche (inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina [ACE]/sartani, betabloccanti e antialdosteronici, valsartan-sacubitril) e di dispositivi impiantabili (cardioverter-defibrillatore [ICD] e terapia di resincronizzazione cardiaca [CRT]) hanno drasticamente migliorato l'outcome a lungo termine dei pazienti con CMPD. Attualmente l'incidenza annuale di eventi maggiori (morte o trapianto cardiaco urgente) è <2%/anno con una sopravvivenza libera da trapianto cardiaco a otto anni superiore all'85%, mentre l'incidenza di morte improvvisa è scesa a meno dello 0.5%/anno.

Nonostante questi dati incoraggianti si è riscontrato nel lungo termine una certa percentuale di pazienti con un significativo declino dei parametri funzionali e rimodellamento ventricolare con ricadute significative sulla prognosi. Per queste ragioni, la necessità di terapie innovative per la CMPD con una maggiore efficacia a lungo termine è stato uno dei campi in cui si è focalizzata recentemente la ricerca scientifica.

Uno dei più recenti campi di sperimentazione riguarda la terapia rigenerativa con cellule mesenchimali staminali (MSC) autologhe ottenute da sangue periferico.

Le cellule mesenchimali staminali (mesenchymal stem cells MSC) vennero descritte originariamente da Fridenstein negli anni 70 come una popolazione di cellule aderenti, di forma fibroblastoide, isolate dal midollo osseo, che aveva la capacità di differenziare in tessuto osseo, cartilagineo e di supportare la crescita delle cellule staminali ematopoietiche in-vitro e in-vivo.

Probabilmente presenti in tutti i tessuti le MSC sono state identificate in midollo osseo, tessuto adiposo, placenta, liquido amniotico, sangue di cordone ombelicale. Presenti solitamente in numero limitato, per essere utilizzate a fini di studio o terapeutici le MSC possono essere isolate ed espanse in laboratorio fino a raggiungere il numero clinicamente rilevante, anche se hanno una capacità proliferativa limitata.

Lo sviluppo della terapia cellulare e dell'ingegneria tissutale, ha reso queste cellule di estremo interesse con numerose possibili applicazioni e sono in valutazione in numerosi studi pre-clinici e clinici in diverse patologie ma soprattutto nella rigenerazione dei tessuti osseo-cartilaginei, nervoso e cardiaco.

In campo veterinario, l'utilizzo di cellule staminali da tessuto adiposo o midollo osseo è diventata negli ultimi anni una strategia promettente per il trattamento di patologie che non rispondono alle terapie tradizionali. Le cellule staminali da sangue periferico sono in grado di differenziarsi in una varietà di tipi cellulari e possono spontaneamente ripopolare organi diversi come muscolo, osso, fegato o cuore, e generare cellule differenziate come risposta a un danno acuto o cronico. Proprio per queste caratteristiche, l'utilizzo di queste cellule staminali nella medicina rigenerativa è apparso molto promettente.

L'efficacia del trattamento autologo di cellule staminali da sangue periferico è stata utilizzata in cavalli affetti da diverse patologie (oftalmiche, tendinee o cutanee) con buoni risultati. La somministrazione locale e/o intravenosa delle cellule staminali autologhe da sangue di cavallo si è dimostrata in grado di ridurre fortemente l'infiammazione nel caso di patologie oftalmiche e di riparare le lesioni tendinee e cutanee.

Dati sperimentali di letteratura evidenziano come cellule staminali pluripotenti possano essere ottenute da sangue periferico mediante un metodo relativamente semplice di deprogrammazione delle cellule del sangue. Si possono ottenere così cellule staminali di tre tipi diversi: ematopoietiche, mesenchimali e pluripotenti. In un lavoro recente pubblicato da Marfe et al [2], la caratterizzazione fenotipica di queste cellule mediante FACS Aria II cell sorter, ha evidenziato l'espressione dei recettori CD90, CD105 e CD117, tipica delle cellule staminali ematopoietiche e/o mesenchimali. Inoltre, una piccola frazione di cellule (circa il 15%) esprimeva marcatori embrionali come Sox2, Oct3/4 e Nanog.

Inoltre è stato dimostrato che le cellule staminali ottenute da sangue periferico umano sono in grado di differenziarsi in cellule epatiche dopo incubazione con diversi fattori di crescita (EGF, IGF-1 e FGF-4). Le cellule così ottenute mostravano caratteristiche sia morfologiche sia funzionali tipiche delle cellule epatiche ed esprimevano marcatori funzionali epatici come l' $\alpha$ -fetoproteina.

Thankstem ha brevettato un metodo meno complesso per ottenere cellule staminali da sangue periferico che non prevede l'eliminazione dei globuli rossi, la purificazione delle cellule staminali e la messa in coltura per lunghi periodi. Questo metodo utilizza kit di provette contenenti anticoagulante o il fattore di crescita. Il sangue, una volta prelevato, è introdotto in provette contenenti sodio citrato come anticoagulante. Il contenuto di ogni provetta è poi trasferito in un'altra provetta contenente il fattore di crescita e mantenuto per 72 ore a 4-8 °C prima di venire ri-inoculato.

Questa tecnica è stata utilizzata nella pratica professionale veterinaria per il trattamento autologo in totale di 40 cani, 18 femmine e 22 maschi di varie razze (maggiore frequenza di dobermann, alani e terranova), affetti da cardiomiopatia dilatativa. La malattia è stata divisa per gravità in 5 fasi monitorate attraverso la contrattilità miocardica all'ecocardiografia. Il sangue deprogrammato era inoculato dopo asepsi locale per via sottocutanea nella zona cardiaca, nella zona muscolare perivertebrale dalla quinta alla decima vertebra toracica e, nei casi più gravi, anche per via endovenosa. Può essere aggiunta, durante le prime 24 ore del processo di de-programmazione cellulare, una miscela ossigeno ozono per eliminare possibili infezioni endogene di origine batterica o virale. Dopo il trattamento con cellule staminali autologhe da sangue periferico, in alcuni dei casi trattati, si otteneva una riduzione del grado di patogenicità in 1-2 mesi. Nella maggior parte dei casi c'è stato un miglioramento e un aumento della longevità rispetto all'evoluzione dei casi di cardiomiopatia dilatativa del cane riportati in letteratura.

Negli animali più giovani, dove la componente congenita è maggiore, il risultato e la longevità sono stati inferiori rispetto agli animali adulti. Il trattamento è avvenuto senza effetti collaterali ed i cani hanno avuto un allungamento del periodo di sopravvivenza dal doppio a 5 volte di più della media. Il trattamento è stato ripetuto ogni 2/3 mesi circa per i primi periodi, poi le inoculazioni sono state ridotte ad una ogni 6 mesi/un anno. In alcuni casi dove la diagnosi è stata precoce nella razza alano il trattamento è stato fatto annualmente per oltre sei anni. La terapia farmacologica non è mai stata interrotta nei primi 2 anni, ma modificata secondo le esigenze. In alcuni casi dopo la prima o dopo alcune inoculazioni non sono più state riscontrate aritmie come fibrillazioni atriali e ventricolari.

La maggiore efficacia della terapia con cellule staminali rispetto a quella tradizionale è stata dimostrata in due cuccioli di dobermann della stessa cucciolata che ad un anno hanno mostrato sintomi di cardiomiopatia dilatativa e sono stati trattati: il primo con la terapia farmacologica ed il secondo con la terapia farmacologica coadiuvata con le staminali del sangue. La longevità è stata di un anno maggiore nel secondo cucciolo.

Il trattamento con cellule staminali da sangue comporta anche un netto miglioramento delle aritmie cardiache, in molti casi anche la totale scomparsa. Un altro importante risultato evidenziato è l'inibizione e la riduzione degli effetti collaterali della terapia farmacologica sull'apparato epatorenale a base di diuretici, inotropi positivi, ACE inibitori e beta bloccanti adrenergici, che è continuata in tutti i casi trattati ma modificata in base all'evoluzione della patologia. Ciò permette una terapia prolungata ed allunga il tempo stimato di sopravvivenza.

Dati i risultati promettenti della terapia autologa con cellule staminali da sangue periferico nel cane con cardiomiopatia dilatativa, una strategia preclinica e clinica è stata sviluppata per supportare il trattamento di persone affette da cardiomiopatia dilatativa con cellule staminali autologhe ottenute da sangue periferico trattato con il metodo brevettato da Thankstem.