

44°

CONVEGNO NAZIONALE
di Studi di Medicina Trasfusionale

Rimini | Palacongressi, 3-5 maggio 2022



CELLULE STROMALI MESENCHIMALI NEL TRATTAMENTO DELLA GvHD E DELLA POLMONITE DA SARS-CoV-2

Giuseppe Astori

Laboratorio di Terapie Cellulari Avanzate (LTCA)

Unità Operativa Complessa di Ematologia

Ospedale di Vicenza

Il sottoscritto, in qualità di Relatore
dichiara che

nell'esercizio della Sua funzione e per l'evento in oggetto, NON È in alcun modo portatore di interessi commerciali propri o di terzi; e che gli eventuali rapporti avuti negli ultimi due anni con soggetti portatori di interessi commerciali non sono tali da permettere a tali soggetti di influenzare le sue funzioni al fine di trarne vantaggio.

CELLULE STROMALI MESENCHIMALI DEFINIZIONE

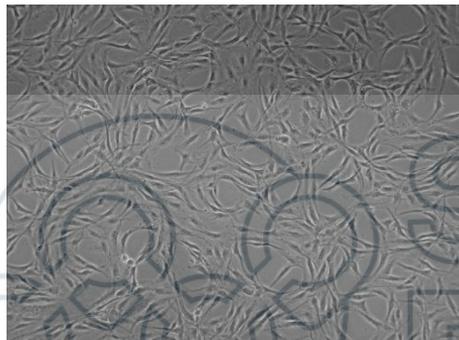
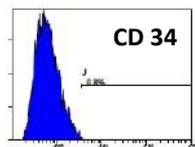
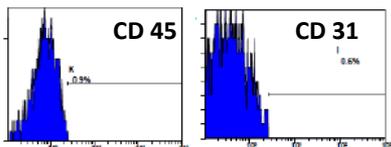
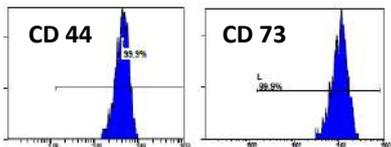
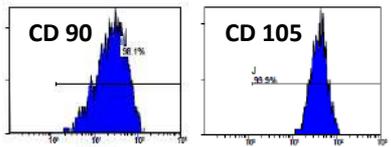
International Society for Cellular Therapy
ISCT

Cytotherapy (2006) Vol. 8, No. 4, 315–317

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

POSITION PAPER
Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement

M Dominici¹, K Le Blanc², I Mueller³, I Slaper-Cortenbach⁴, FC Marini⁵, DS Krause⁶, RJ Deans⁷, A Keating⁸, DJ Prockop⁹ and EM Horwitz¹⁰



ADERENZA ALLA PLASTICA

NEGATIVE PER MARKER
EMATOPOIETICI (CD45/CD34)

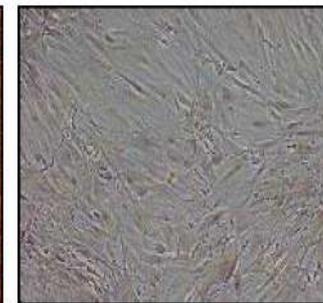
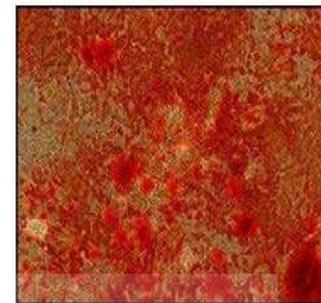
POSITIVO PER CD105, CD90,
CD73

NEGATIVE PER HLA-DR

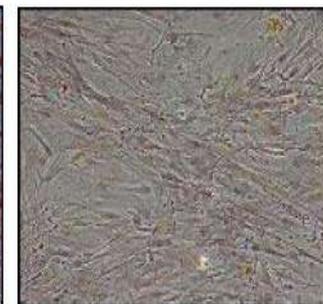
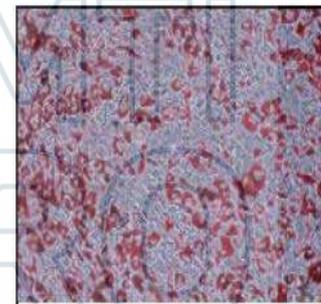
MSC INDOTTE

MSC NON INDOTTE

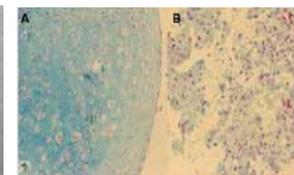
OSSO



GRASSO



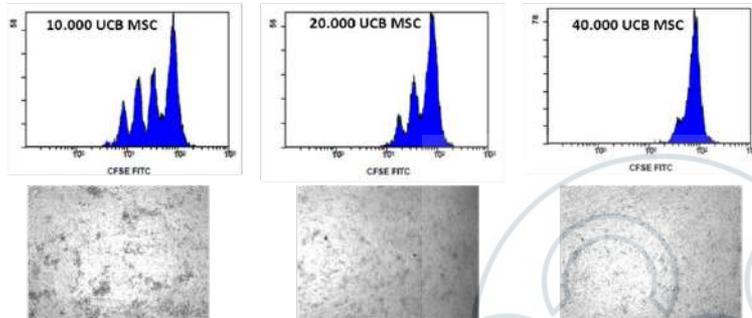
CARTILAGINE



DIFFERENZIAMENTO IN TESSUTI
MESODERMICI

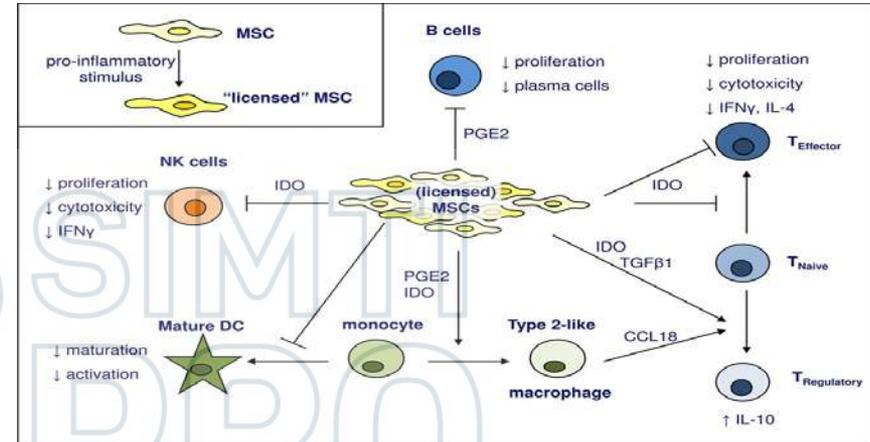
MECCANISMI DI IMMUNOMODULAZIONE MSC-INDOTTA

SAGGIO DI IMMUNOMODULAZIONE "IN VITRO"



Le MSC inibiscono la proliferazione dei linfociti T in presenza di stimoli infiammatori (es. IL2+ anti-CD3)

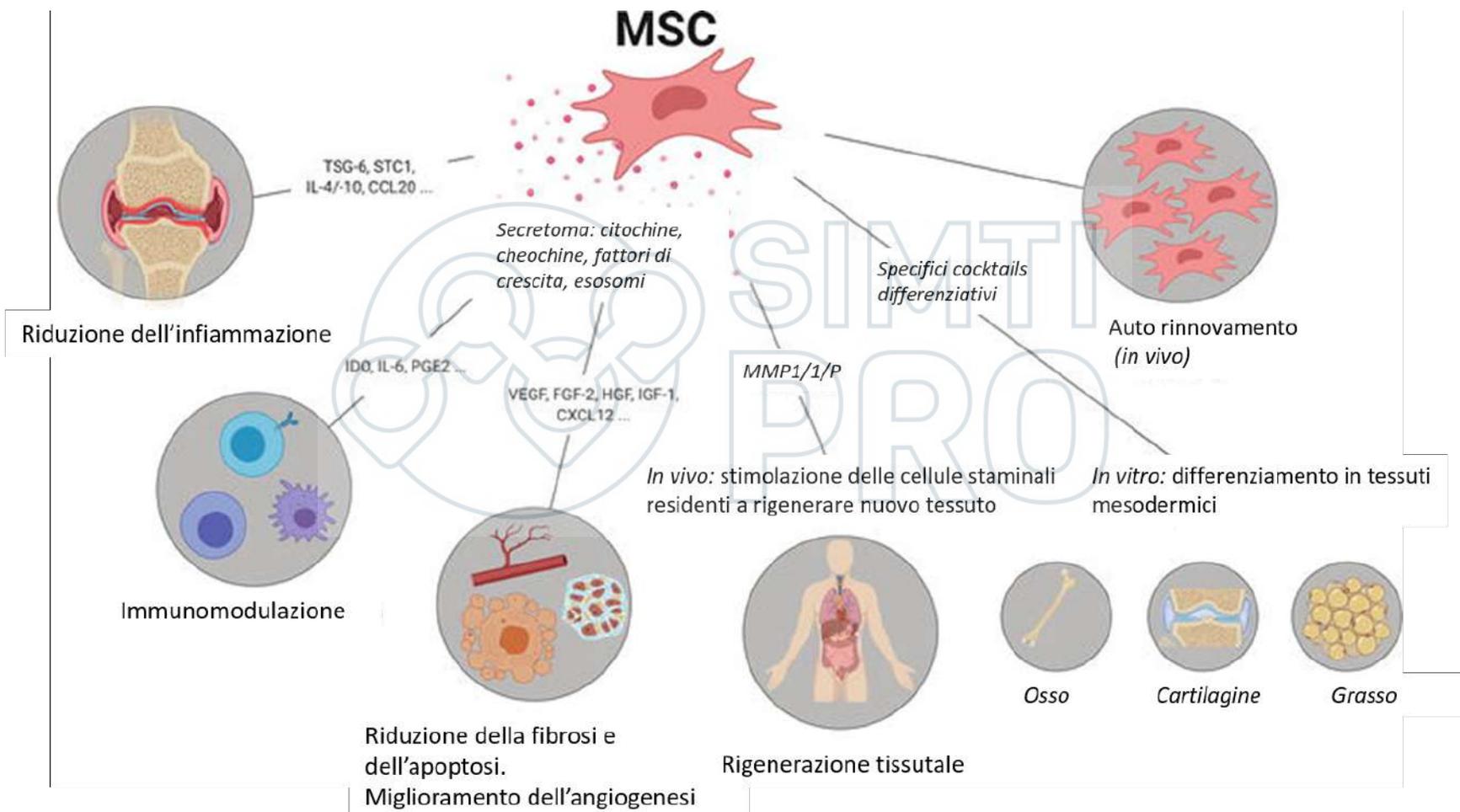
"IN VIVO"



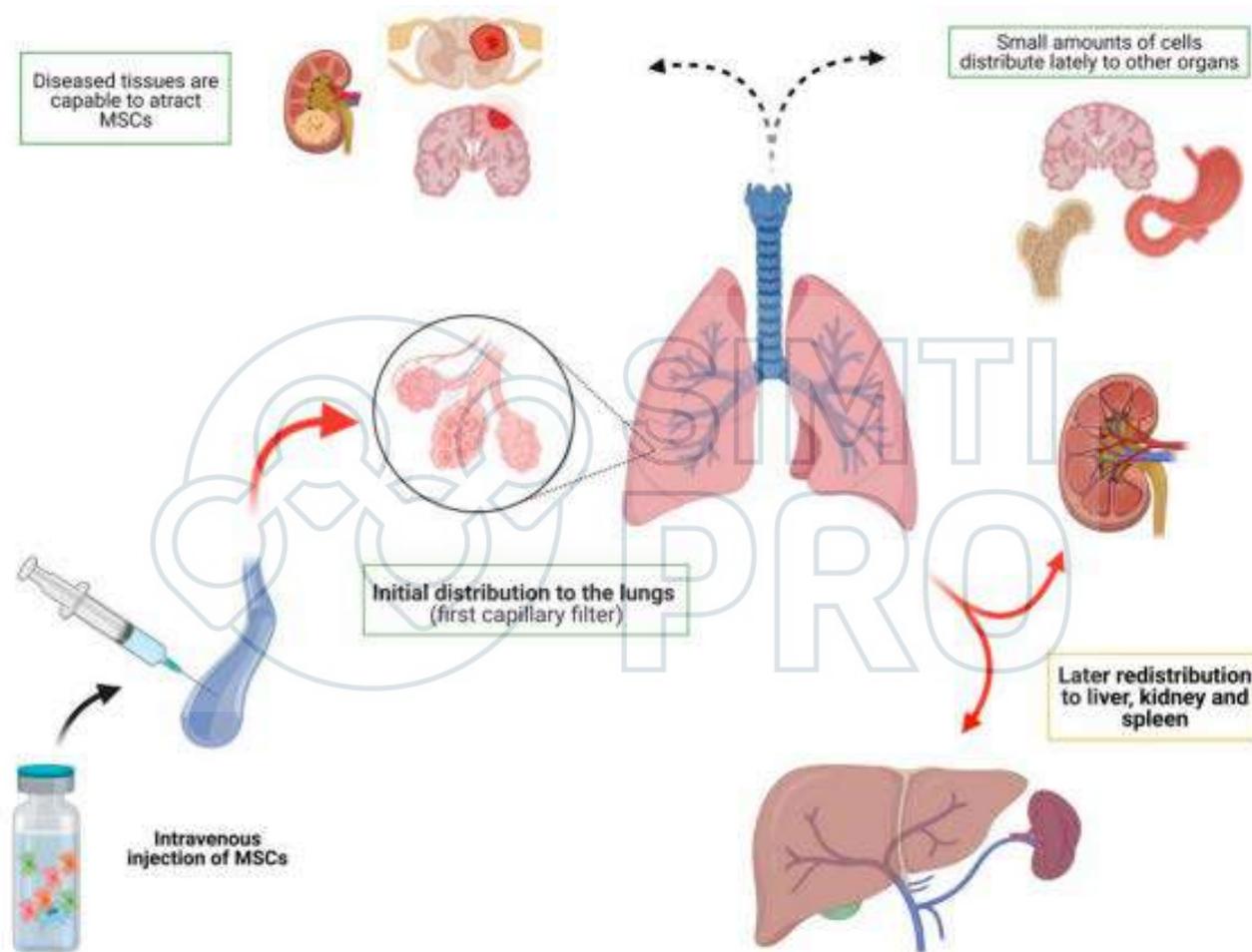
(IDO) Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)
SOPPRIME LA PROLIFERAZIONE dei linfociti T

- L'attività enzimatica di IDO nelle MSC è indotta a seguito di stimoli infiammatori (IFN)- γ
- IDO catalizza la degradazione del triptofano in kynurenine

PROPRIETA' DELLE MSC



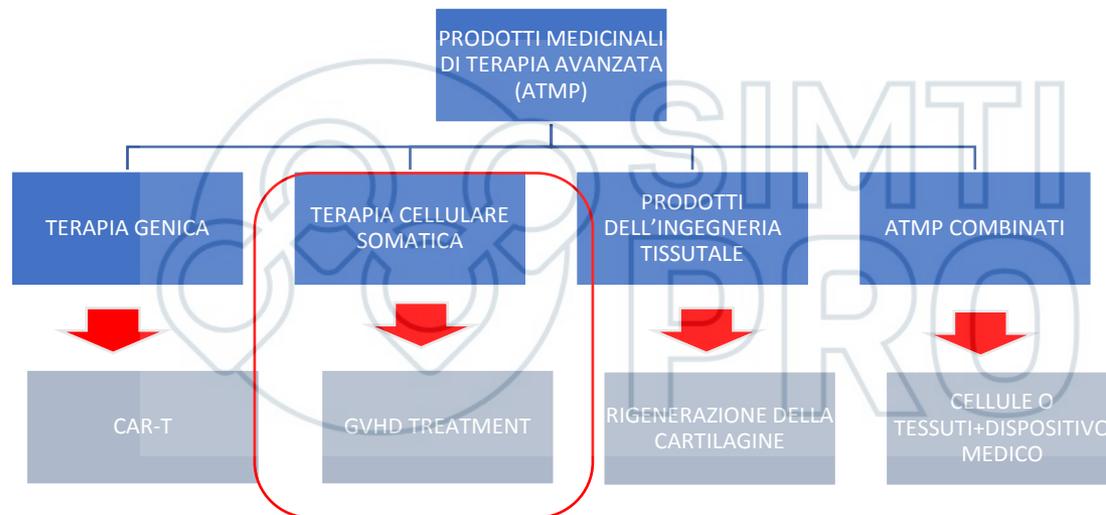
BIODISTRIBUZIONE DELLE MSC «IN VIVO»



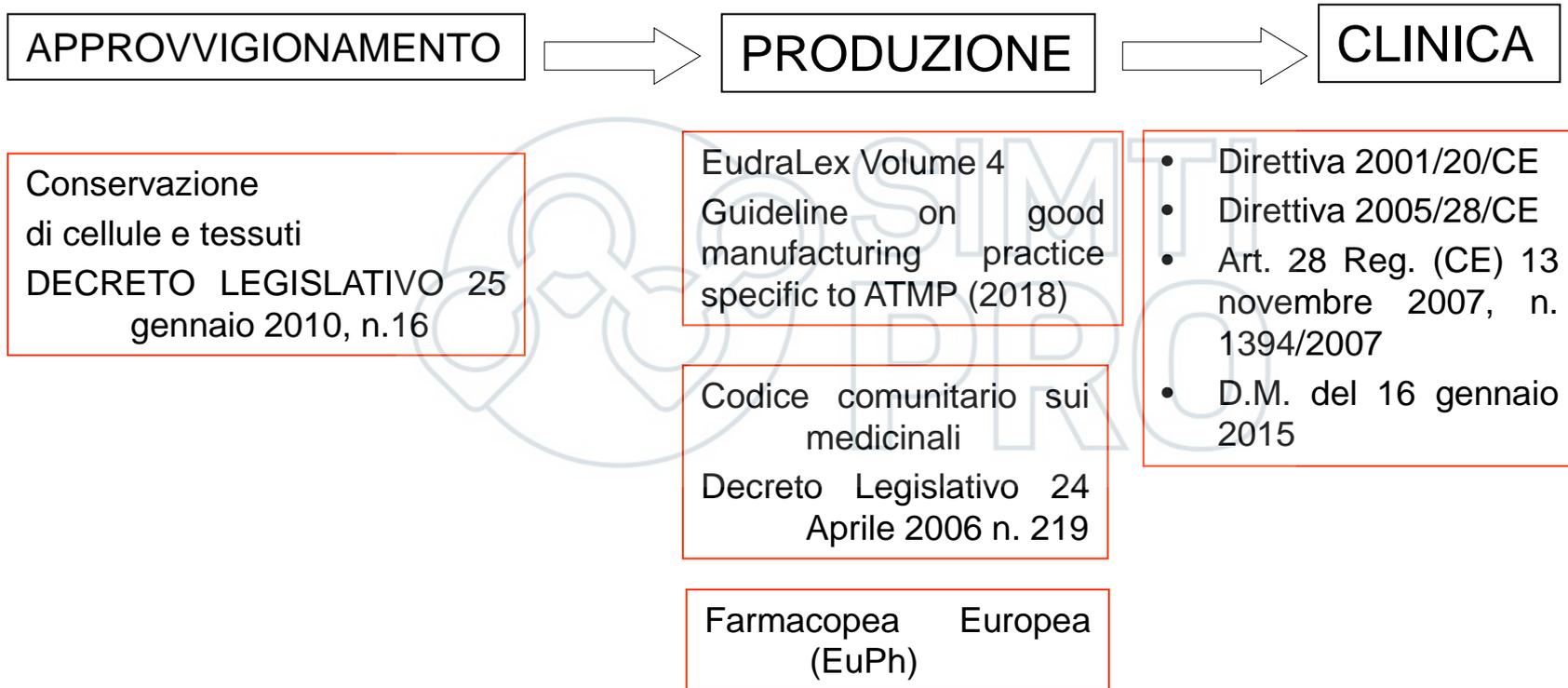
MSC non più identificabili *in vivo* dopo alcune ore!
Nessuna evidenza di «engraftment».

Sanchez-Diaz et al, *J Clin Med* 2021
Gao et al, *Cells Tissues Organs*, 2001

LE MSC SONO PRODOTTI MEDICINALI DI TERAPIA CELLULARE AVANZATA



BASI REGOLATORIE IN ITALIA





LABORATORIO DI
PRODUZIONE O
«CELL FACTORY»



AREA PRODUZIONE
4 laboratori in classe A/B

CONTROLLO QUALITA'
Batteriologia
Endotossine
Mycoplasma
Monitoraggio ambientale
Caratterizzazione cellulare

CRIOBIOLOGIA

**RICERCA
TRASLAZIONALE**
Biologia cellulare
Biologia molecolare

LE MSC SONO OTTENIBILI DA FONTI DIFFERENTI



MIDOLLO OSSEO

- 1 MSC IN 1×10^5 MNC
- Fonte storica
- Collection procedure invasive



TESSUTO ADIPOSO

- 5×10^3 MSC in 1g of adipose tissue
- Si isolano e si espandono con successo dalla frazione stromovascolare



SANGUE DAL CORDONE OMBELICALE

- 0-3 MSC IN 10^8 MNC
- Isolamento estremamente difficile



CORDONE OMBELICALE

Si isolano e si espandono con successo

FONTI
ADULTE

FONTI
PERINATALI

Kern et al, Stem Cells, 2006

Astori, SCRT, 2018

Astori, BCMD, 2012

PROCESSO PRODUTTIVO DI MSC ISOLATE DAL CORDONE OMBELICALE – IL NOSTRO PROTOCOLLO



Raccolta in ostetricia

SCREENING
HbsAg; Anti-HCV
Treponema Pallidum
Anti-HIV1-2
NAT HIV-HBV-HCV

Istituto dei tessuti



In cell factory: frazionamento



Semina per isolamento cloni



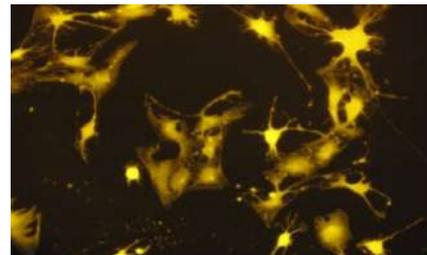
Risemina



Criopreservazione



Controllo qualità



RILASCIO



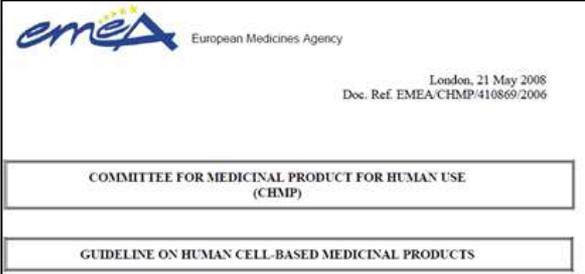
RILASCIO DELL' ATMP

TEST	METODO	REFERENZA	CRITERII DI ACCETTAZIONE
CONTA CELLULARE	Trypan blue exclusion test	Non compendial	NA
IMMUNOFENOTIPO	Citometria a flusso	Non compendial	% CD90+ \geq 90% %CD105+ \geq 90%
VITALITA' CELLULARE	Citometria a flusso	Non compendial	% 7AAD- \geq 80%
IMPUREZZE	Citometria a flusso	Non compendial	%CD45+ \leq 2%
ENDOTOSSINE BATTERICHE	LAL Test	Eu. Ph. 2.6.14	< 2 EU/ML
MICOPLASMA	DNA detection (PCR)	Eu. Ph. 2.6.7	Assente
STERILITA'	Crescita batterica	Eu. Ph. 2.6.27	Sterile
CARIOTIPO	GTG banding	Non compendial	46, XY 46, XX



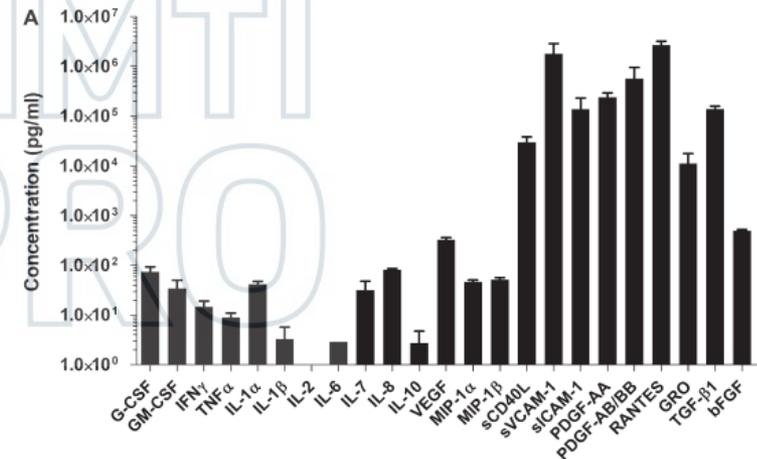
«I metodi analitici devono essere validati secondo i metodi descritti nella farmacopea europea (quando disponibili)»

SOSTITUZIONE DEL SIERO FETALE BOVINO CON LISATO PIASTRINICO

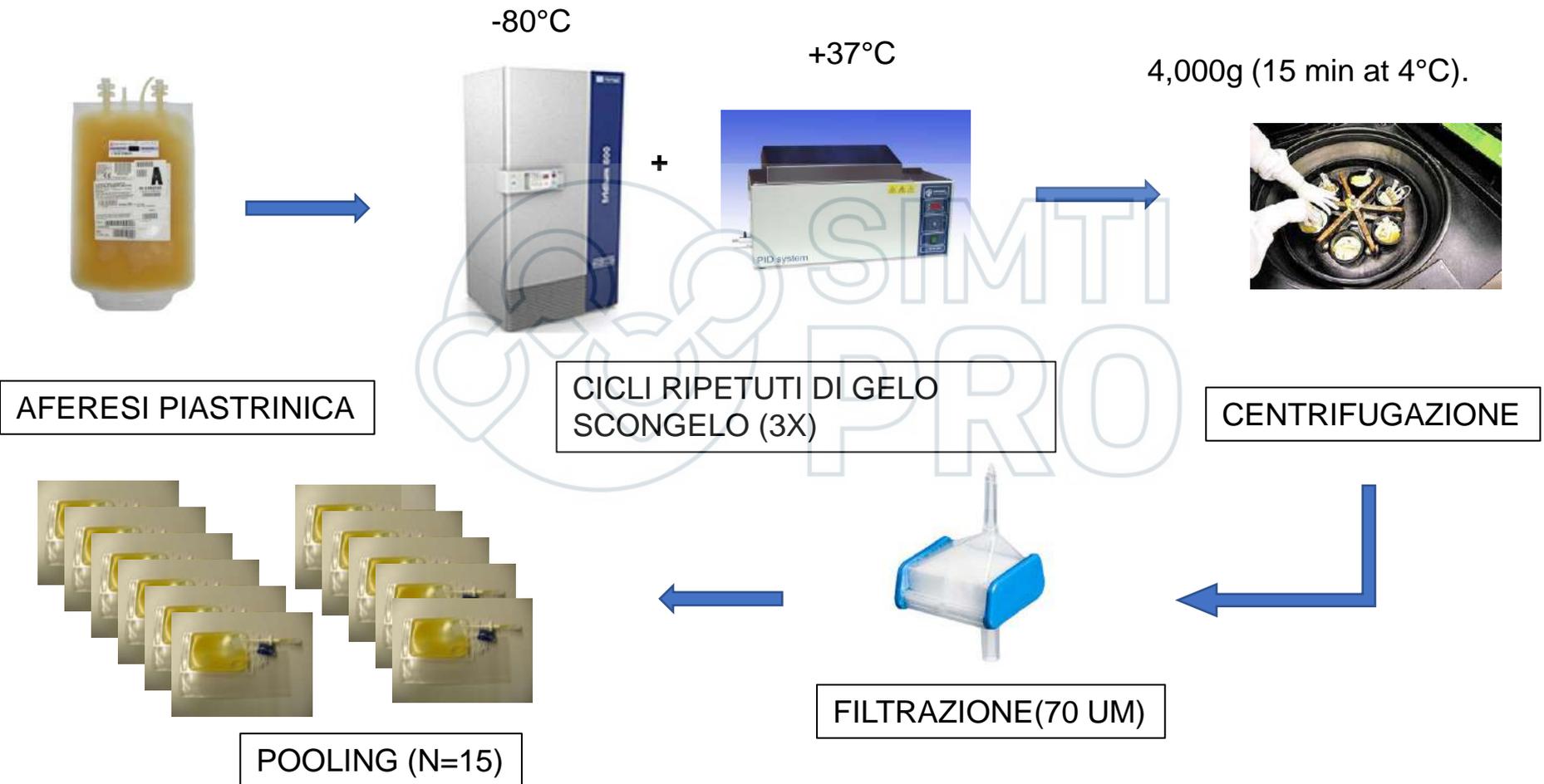


PERCHE' SOSTITUIRE IL SIERO FETALE BOVINO?

- Rischio di trasmissione di zoonosi (prioni)
- Reazioni immuno xenogeniche
- Variabilità da lotto a lotto
- Considerazioni etiche (benessere animale)
- Il lisato piastrinico è ricco in fattori di crescita



PRODUZIONE DI LISATO PIASTRINICO MEDIANTE CICLI DI GELO-SCONGELO



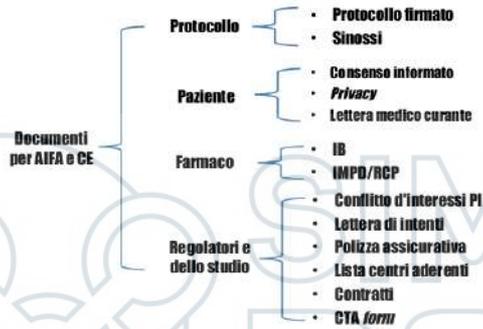
Doucet et al., J Cell Physiol, 2005
Schallmoser et al., J Vis Exp. 2009.

MODALITA' DI UTILIZZO IN CLINICA DEGLI ATMP

SPERIMENTAZIONE CLINICA

- Regolamento 1394/2007
- Direttiva 2001/20/CE
- Direttiva 2005/28/CE

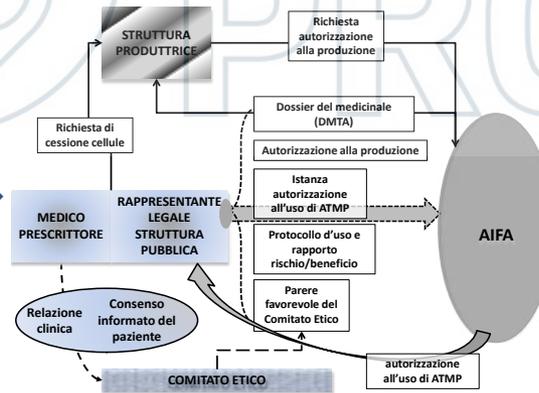
DOCUMENTAZIONE ESSENZIALE



PREPARAZIONE DELL' IMPD

USO NON RIPETITIVO (HOSPITAL EXEMPTION)

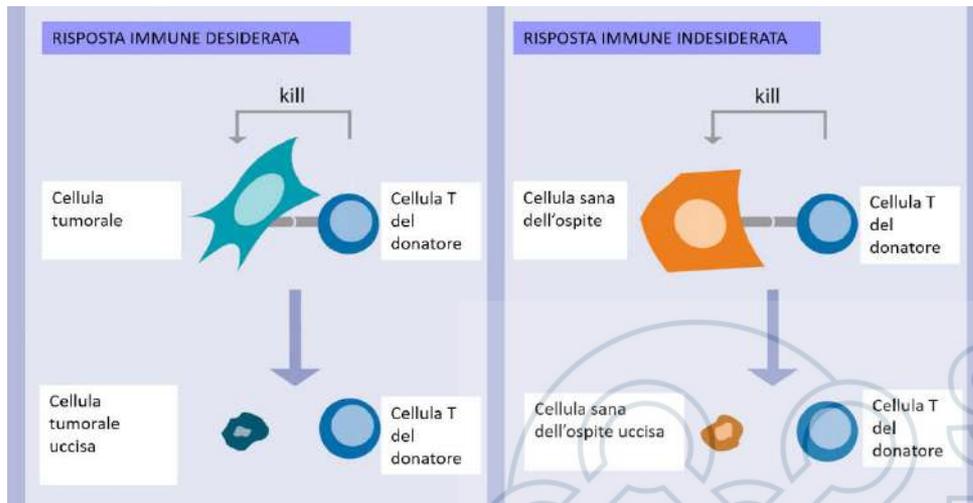
- Art. 28 Reg. (CE) 13 novembre 2007, n. 1394/2007
- D.M. del 16 gennaio 2015 (Decreto Lorenzin)



PREPARAZIONE DEL DMTA

CELLULE STROMALI MESENCHIMALI
NELLA TERAPIA DELLA MALATTIA DA TRAPIANTO CONTRO
L'OSPITE (GvHD)

LA MALATTIA DEL TRAPIANTO CONTRO L'OSPITE (GvHD)



GvHD acuta della pelle di grado I

- La GvHD è associata al trapianto di cellule staminali ematopoietiche.
- Le cellule immunitarie nel tessuto donato riconoscono il destinatario (l'host) come estraneo (nonself).
- Le cellule immunitarie trapiantate attaccano le cellule del corpo dell'ospite.

Forma acuta: nei primi 100 giorni dalla data del trapianto e coinvolge cute, fegato e tratto gastrointestinale

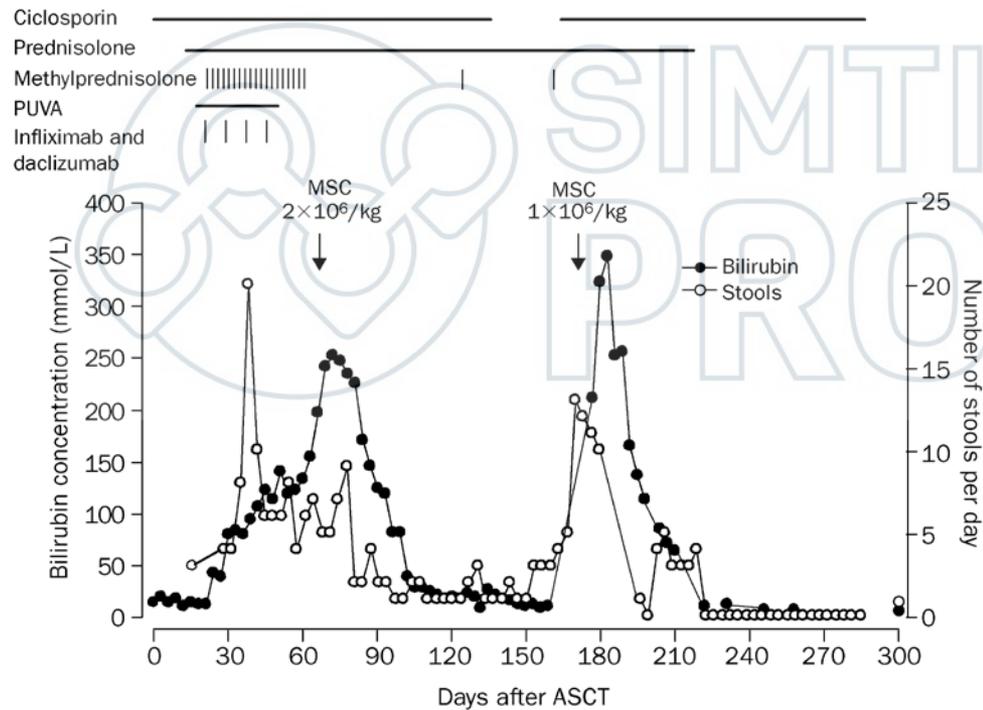
Forma cronica: decorre dopo tale periodo. Caratterizzata da fibrosi e atrofia degli stessi organi colpiti dalla GvHD acuta.

MSC NELLA GvHD SEVERA REFRATTARIA-PRIMA EVIDENZA

Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells

Katarina Le Blanc, Ida Rasmusson, Berit Sundberg, Cecilia Götherström, Moustapha Hassan, Mehmet Uzunel, Olle Ringdén

Lancet 2004; 363: 1439-41



MSC IN GvHD ACUTA – TRIAL CLINICI CON PIU' DI 30 PAZIENTI

Publication	Patients		MSC infusion		Outcome		
	N	Median age (range)	Dose (x 10 ⁶ /Kg)	Median (range)	CR (%)	PR (%)	NR (%)
LeBlanc et al. (72)	55	22 (0.5–64)	0.40–9.00	2 (1–5)	54	16	29
Ball et al. (73)	37	7 (0.7–18)	0.90–3.00	2 (1–13)	65	22	13
Kurtzberg et al. (74)	75	8 (0.2–17)	2.00	NRe (8–12)	NRe	NRe	NRe
TeBoom et al. (75)	48	44.9 (1.3–68.9)	1.80 (0.90–2.50)	3 (1–4)	25	50	25
Kebriaei et al. (76)	31	52 (34–67)	2.00–8.00	2 (2)	77	16	7
Erbey et al. (77)	33	7 (3–18)	0.50–2.80	2 (1–4)	54	21	25
Servais et al. (78)	33	58 (5–69)	NRe (1.00–4.00)	1 (1–2)	22	41	37
vonDalowski et al. (79)	58	55 (19–71)	0.99 (0.45–2.08)	2 (1–6)	9	38	53
Dotoli et al. (80)	46	28 (1–72)	6.81 (0.98–29.78)**	3 (1–7)	7	43	50
Bader et al. (81)	69	8.2 (6 mo–18) 45.5 (18.9–65.5)	NRe (1.00–2.00)	NRe (1–4)	32	51	14*
Introna et al. (82)	37	27.8 (1–65)	NRe (0.80–3.10)	NRe (2–11)	30	43	27
Fernandez-Mazqueta et al. (83)	33	46 (18–61)	1.06 (0.66–1.76)	1.06 (0.66–1.76)	34	50	16
Resnick et al. (84)	50	19 (1–69)	1.00 (0.3–3.10)	NRe (1–4)	34	32	34
Galleu et al. (85)	60	40 (4 mo–68)	2.60 (0.60–15.60)	1 (1–4)	2	52	46

CR, Complete Response; NRe, Not reported; NR, No Response; PR, Partial Response; *3%, no data available at day 28; **cumulative dose.

Risposta completa+risposta parziale: 47-93%

Nessun impatto di HLA-matching

Nessuna differenza significativa tra diverse fonti di MSC

Mesenchymal stromal cells as treatment or prophylaxis for acute or chronic graft-versus-host disease in haematopoietic stem cell transplant (HSCT) recipients with a haematological condition (Review)

Fisher SA, Cutler A, Doree C, Brunskill SJ, Stanworth SJ, Navarrete C, Girdlestone J

Review question

In people who receive a stem cell transplant for a haematological condition, can an additional infusion of mesenchymal stromal cells (MSCs) prevent the development of graft-versus-host disease (GvHD)? In people who have already developed GvHD as a result of their stem cell transplant, can MSCs improve their clinical outcome?

Key results

MSCs may have little or no difference in the risk of death or relapse of malignant disease, in either GvHD prevention or treatment trials, as the quality of evidence was low. MSCs were well-tolerated, no infusion-related toxicity or ectopic tissue formation was reported. No study reported health-related quality-of-life. In trials where MSCs were administered to prevent GvHD, MSCs may reduce the risk of developing chronic GvHD, but may make little or no difference to the risk of developing acute GvHD. In GvHD treatment trials, we are very uncertain whether MSCs improve complete response of either acute or chronic GvHD as the quality of evidence is very low. We found no differences in outcomes between participants who received a higher dose of MSCs when compared with those who received a lower dose of MSCs.

Quality of the evidence

The quality of evidence is low or very low for all outcome measures, due to the small number of trials and low number of study participants included in this review. One trial started in 2008, but its results are unknown as it is not yet published. It is therefore difficult to draw conclusions or provide recommendations on the use of MSCs, either to prevent or treat GvHD. More trials with large numbers of study participants are needed to improve the quality of evidence.

IL DILEMMA IRRISOLTO: LA RICERCA DI UN BIOMARKER DI EFFICACIA PER LE MSC

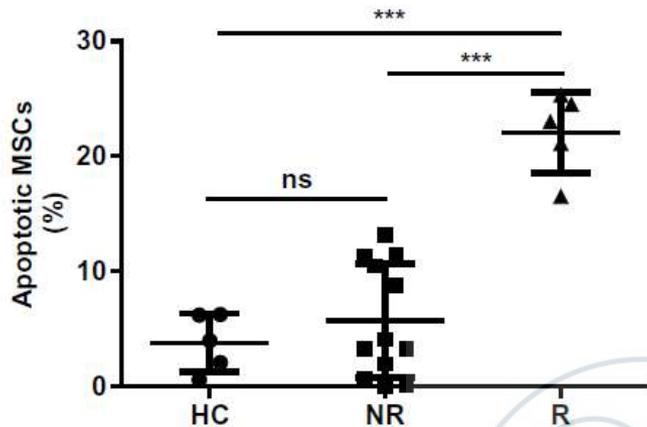


Fig. 3. Cytotoxic activity against MSCs predicts clinical responses to MSCs in GvHD patients. (A and B) PBMCs obtained from healthy controls (HC) or patients with GvHD receiving MSCs in the following 24 hours were incubated in 24-well plates with MSCs at a PBMC/MSc ratio of 20:1 for 4 hours. Apoptosis was measured in MSCs assessing the percentage of annexin-V⁺/7-AAD⁻ cells by flow cytometry. (A) Representative plots for HC, clinical responders (R), and nonresponders (NR).



Saggio di citotossicità «in vitro»

SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE | RESEARCH ARTICLE

TRANSPLANTATION

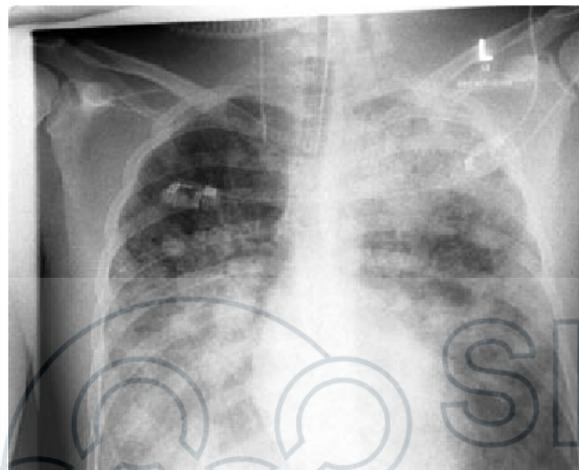
Apoptosis in mesenchymal stromal cells induces in vivo recipient-mediated immunomodulation

Antonio Galleu,¹ Yanira Riffo-Vasquez,² Cristina Trento,¹ Cara Lomas,^{3,4} Luigi Dolcetti,¹ Tik Shing Cheung,¹ Malte von Bonin,⁵ Laura Barbieri,¹ Krishma Halai,¹ Sophie Ward,^{3,4} Ling Weng,¹ Ronjon Chakraverty,^{3,4} Giovanna Lombardi,⁶ Fiona M. Watt,⁷ Kim Orchard,⁸ David I. Marks,⁹ Jane Apperley,¹⁰ Martin Bornhauser,^{1,5} Henning Walczak,^{4*} Clare Bennett,^{3,4*} Francesco Dazzi^{1,10†}

- 1) Le MSC sono indotte a subire apoptosi da parte delle cellule citotossiche del ricevente e questo processo è essenziale per avviare l'immunosoppressione indotta da MSC.
- 2) Dopo l'infusione, i fagociti del ricevente «fagocitano» le MSC apoptotiche e rilascianoIDO, che è necessario per effettuare l'immunosoppressione.
- 3) «In vitro», solo pazienti con elevata attività citotossica contro le MSC hanno risposto all'infusione.
- 4) Si propone che i pazienti siano «stratificati» per il trattamento con MSC in base alla capacità di lisare le MSC.

CELLULE STROMALI MESENCHIMALI
NELLA TERAPIA DELLA
SINDROME DA DISTRESS RESPIRATORIO ACUTO

COSA E' LA SINDROME DA DISTRESS RESPIRATORIO ACUTO (ARDS)?

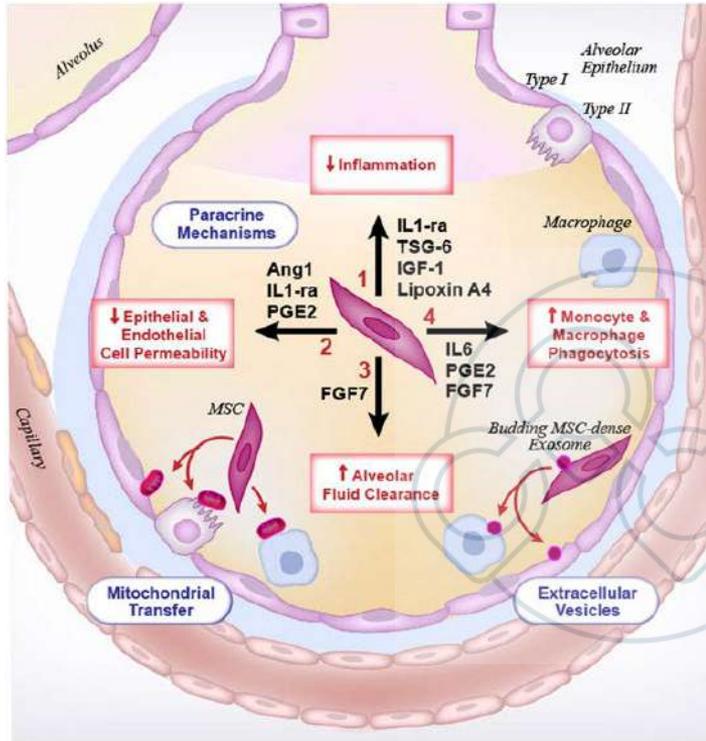


TERAPIA

- Supporto ventilatorio
- Cicli di prono-supinazione
- Sedazione, diuretici
- ECMO
- Altro (Ab anti IL-6, plasmafiltrazione,

- L'ARDS è una condizione respiratoria pericolosa per la vita caratterizzata da ipossiemia;
- Fra le cause: polmonite, traumi, sepsi, ustioni, pancreatiti
- L'ARDS evolve dal danno capillare alveolare fino a una fase fibrotica;
- Esistono pochissime terapie efficaci per l'ARDS diverse dall'uso di strategie di protezione polmonare.
- La mancanza di terapie efficaci è correlata alla sua complessa patogenesi.

MSC NEL TRATTAMENTO DELLA ARDS

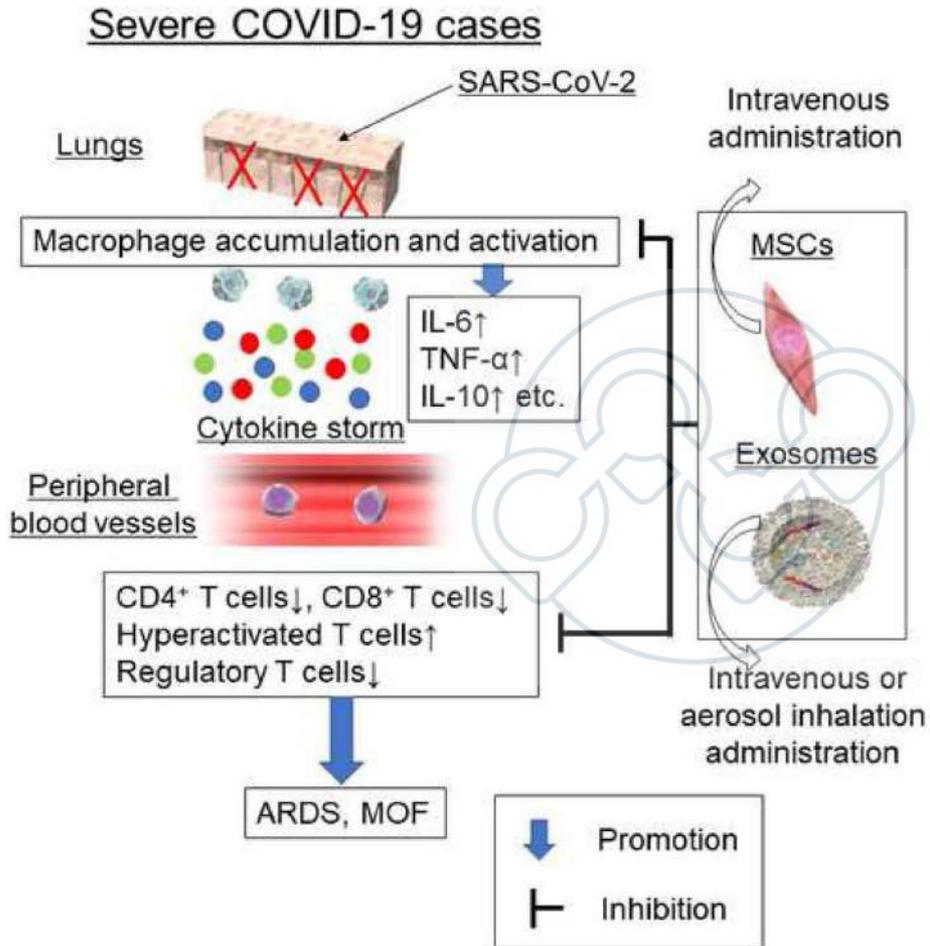


L'immagine illustra i compartimenti intestinali, capillari ed alveolari del polmone. Il liquido da edema riempie l'alveolo danneggiato in un setting di ARDS

Le MSC secernono fattori paracrini che modulano la riparazione dei tessuti attraverso numerosi meccanismi:

- 1) effetto antinfiammatorio.
- 2) effetto antibatterico
- 3) Riduzione della fibrosi polmonare
- 4) riduzione della permeabilità dell'epitelio alveolare nel polmone.
- 5) aumento del tasso di clearance del fluido alveolare.

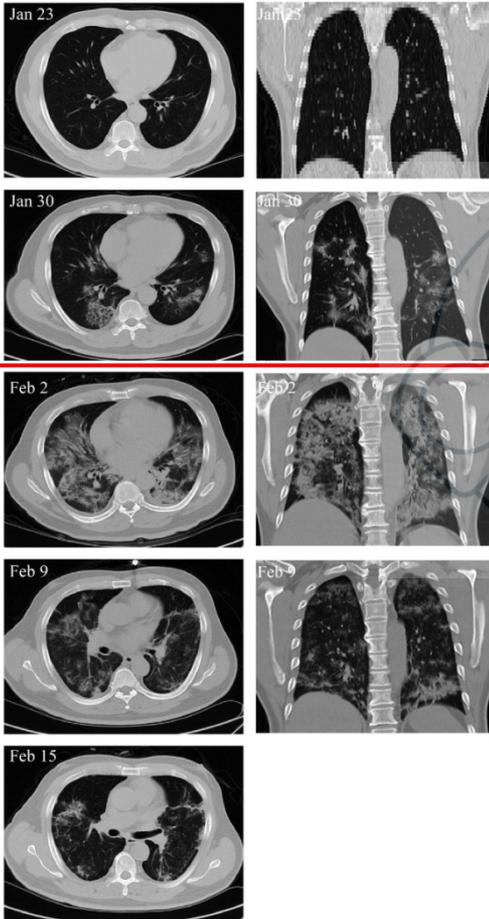
MSC NEL TRATTAMENTO DELLA SINDROME DA DISTRESS RESPIRATORIO ACUTO (ARDS) INDOTTA DALL'INFEZIONE DA SARS-CoV-2



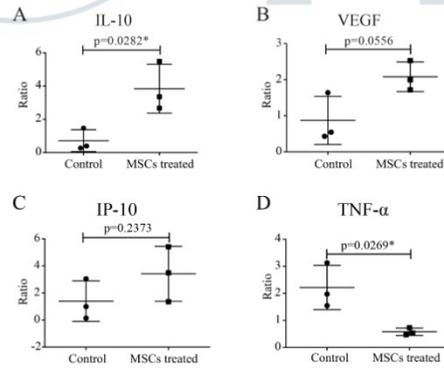
1. In risposta all'infezione, vi è un rilascio sistemico di citochine proinfiammatorie (IFN- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, IL-33, TNF- α and TGF- β)
2. Lo storm citochinico risulta in ARDS, danno multiorgano ed infine morte.

Original Article

Transplantation of ACE2⁻ Mesenchymal Stem Cells Improves the Outcome of Patients with COVID-19 Pneumonia



	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Case 5	Case 6	Case 7	Ctrl 1	Ctrl 2	Ctrl 3
Gender	M	F	F	F	M	M	M	F	F	F
Age (years)	65	63	65	51	57	45	53	75	74	46
COVID-19 type	Critically severe	Severe	Severe	Common	Common	Severe	Severe	Severe	Severe	Severe
Fever (°C, baseline)	38.6	37.7	38.2	38.5	38.4	39.0	39.0	36.0	38.9	37.7
Shortness of breath	+++	+++	++	+	+	+++	+++	+++	++	+
Oxygen saturation at rest state	89%	93%	92%	95%	94%	92%	90%	91%	92%	93%
Cough, weak, poor appetite	++	+	++	+	++	++	++	+	++	+
Diarrhea	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Date of diagnosed	Jan 23	Jan 27	Jan 25	Feb 3	Feb 2	Jan 27	Feb 3	Feb 3	Feb 6	Feb 5
Date of intervention (MSCs or Placebo)	Jan 31	Feb 2	Feb 4	Feb 4	Feb 4	Feb 6	Feb 6	Feb 8	Feb 6	Feb 6
Date of recovery	Feb 3	Feb 4	Feb 6 Discharged	Feb 6 Discharged	Feb 5 Discharged	Feb 7	Feb 7	Dead	ARDS	Stable



Una singola infusione di MSC derivate dal cordone ombelicale alla dose di 1x10e6/kg

PRIMO PAZIENTE EUROPEO TRATTATO CON MSC PER ARDS L'ESPERIENZA DI VICENZA-VERONA

Ciccocioppo et al. *Stem Cell Research & Therapy* (2021) 12:316
<https://doi.org/10.1186/s13287-021-02376-9>

Stem Cell Research & Therapy

SHORT REPORT

Open Access

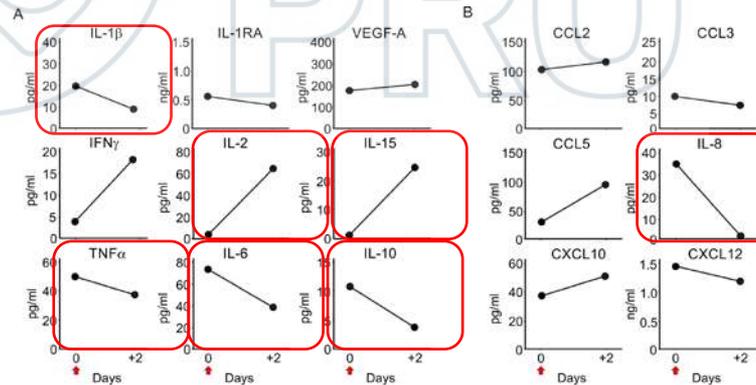
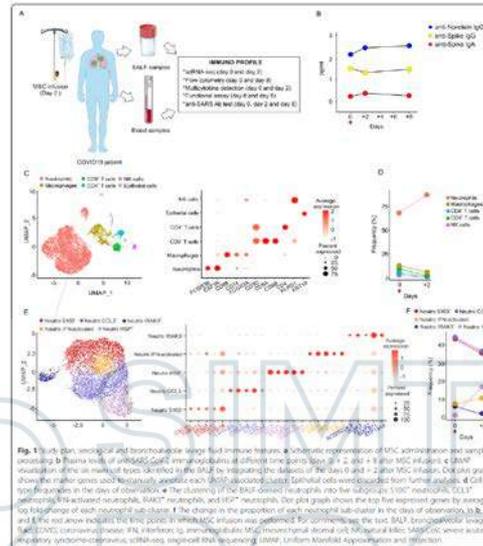


The immune modulatory effects of umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells in severe COVID-19 pneumonia

Rachele Ciccocioppo^{1†}, Davide Gibellini^{2†}, Giuseppe Astori³, Martina Bernardi³, Angela Bozza³, Katia Chiaregato³, Francesca Elice⁴, Stefano Ugel⁵, Simone Caligola⁶, Francesco De Sanctis⁶, Stefania Cane⁶, Alessandra Fiore⁶, Rosalinda Trovato⁷, Antonio Vella⁸, Varvara Petrova⁸, Giuseppe Amodeo⁹, Monica Santimaria⁹, Annarita Mazzaroli⁹, Luca Frulloni¹, Marco Ruggeri¹, Enrico Polati¹ and Vincenzo Bronte²

Table 1 Clinical parameters

	Day 0	Day + 2	Day + 8
SOFA score	4	3	3
Creatinine	2.27	0.99	0.90
HCO ₃ ⁻	28.7	32.9	41.4
D-Dimer	3.83	2.68	1.32
Prothrombin time	1.18	1.09	0.96
P/F	168	136	114
FiO ₂	0.50	0.50	0.70
pH	7.31	7.34	7.38
Base excess	1.70	5.90	14.2
White blood cells	11.19	10.14	8.62
Neutrophils	9.29	8.28	6.59
Lymphocytes	1.01	1.11	1.21
Monocytes	0.37	0.44	0.40
Basophils	0.06	0.05	0.04
Eosinophils	0.46	0.26	0.38
Red blood cells	4.16	4.13	3.91
Platelet	365	327	287
C-reactive protein	201	139	61

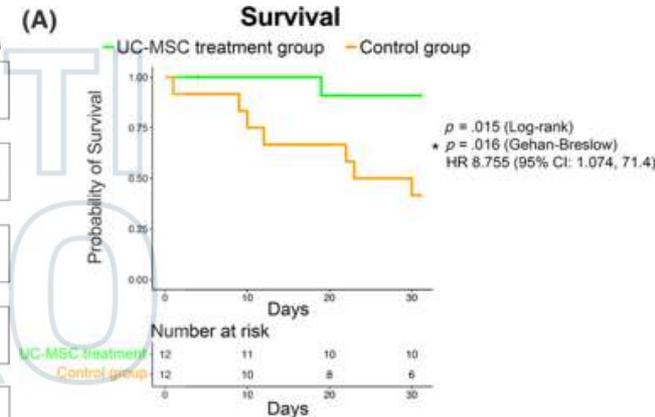
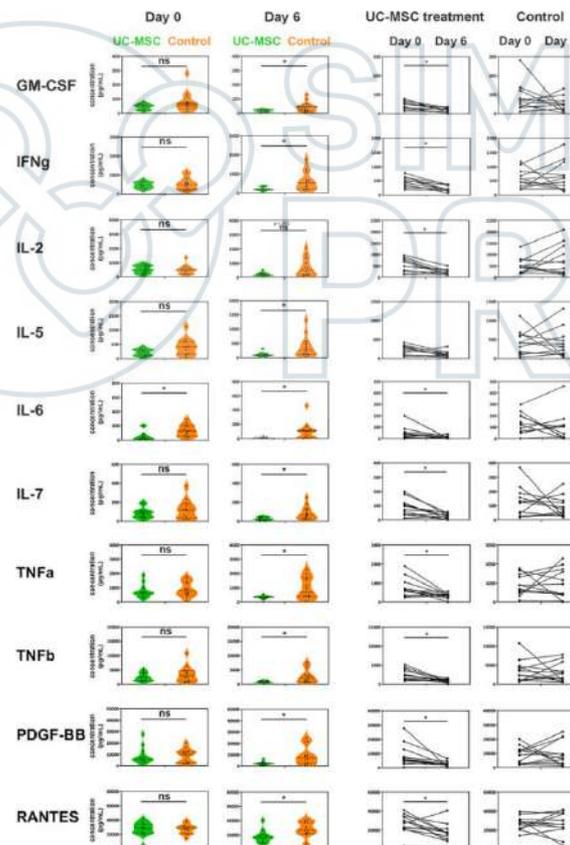
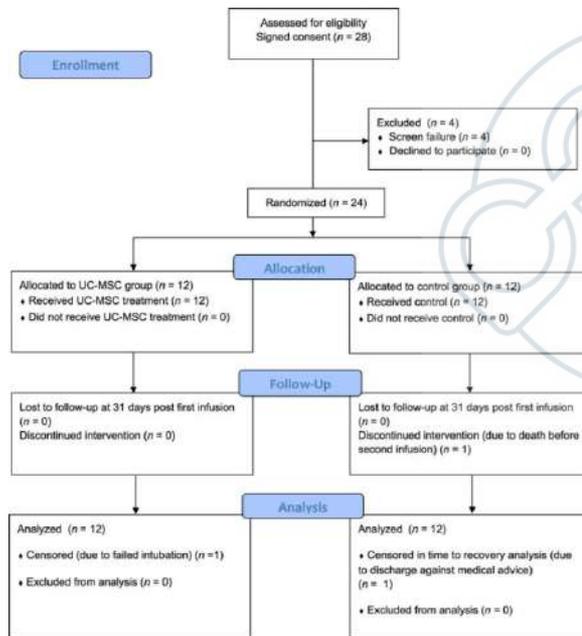


Umbilical cord mesenchymal stem cells for COVID-19 acute respiratory distress syndrome: A double-blind, phase 1/2a, randomized controlled trial

Giacomo Lanzoni^{1,2} | Elina Linetsky^{1,3} | Diego Correa^{1,4} | Shari Messinger Cayetano⁵ | Roger A. Alvarez^{5,7} | Dimitrios Kouroupis¹ | Ana Alvarez Gil¹ | Raffaella Poggioli¹ | Phillip Ruiz³ | Antonio C. Marttos^{6,7,8} | Khemraj Hirani^{1,6} | Crystal A. Bell⁶ | Halina Kusack⁶ | Lisa Rafkin¹ | David Baidal^{1,6,7} | Andrew Pastewski⁸ | Kunal Gawri^{6,7} | Clarissa Leñero¹ | Alejandro M. A. Mantero⁵ | Sarah W. Metalonis⁵ | Xiaojing Wang¹ | Luis Roque¹ | Burlett Masters¹ | Norma S. Kenyon¹ | Enrique Ginzburg^{3,7,8} | Xiumin Xu¹ | Jianming Tan⁹ | Arnold I. Caplan¹⁰ | Marilyn K. Glassberg¹¹ | Rodolfo Alejandro^{1,6,7} | Camillo Ricordi^{1,3}

CRITERI DI INCLUSIONE

- Saturazione (SpO₂) ≤ 94% o con necessità di ossigeno all'arruolamento
- P/F ratio < 300 mmHg
- Infiltrati bilaterali alla radiografia/TC torace



Gruppo di trattamento: due infusioni di 100×10⁶ UC-MSCs al giorno 0 e 3.

Gruppo di controllo; due infusioni di “soluzione di veicolo” al giorno 0 e 3.

STUDIO CLINICO «RESCAT»

Studio prospettico randomizzato multicentrico di fase I/IIa sull'impiego di cellule stromali mesenchimali allogeniche nel trattamento di pazienti affetti da polmonite da SARS-CoV-2

EudraCT Number: 2020-001577-70



CENTRI CLINICI:

Careggi
Monza
Milano Policlinico
Modena
Vicenza
Verona

CELL FACTORY

Firenze Meyer (midollo osseo)
Milano (sangue cordonale)
Modena (grasso)
Monza (midollo osseo)
Vicenza (cordone ombelicale)

OBIETTIVO PRIMARIO: fattibilità e sicurezza.

OBIETTIVI SECONDARI: efficacia di due infusioni di MSC effettuate a distanza di 5 giorni in termini di

- Mortalità
- Andamento del rapporto P/F
- Tempo all'intubazione,
- Tempo all'indipendenza dalla ventilazione meccanica non invasiva,
- Tempo all'indipendenza dall'ossigenoterapia,
- Durata dell'ospedalizzazione,
- Risposta radiologica.

OBIETTIVO TERZIARIO: stabilire quale sia tra le tipologie di MSC la migliore

CONCLUSIONI

Le MSC sono un medicinale di terapia cellulare avanzata che va prodotto in Officine Farmaceutiche autorizzate

Le proprietà immunosoppressive delle MSC forniscono la spiegazione della loro efficacia nel trattamento dei pazienti con GvHD acuta ed ARDS

L'efficacia delle MSC nella GvHD resta da dimostrare in uno studio randomizzato

Individuazione di un biomarker di efficacia

L'utilizzo delle MSC nel trattamento della ARDS si sta rivelando una terapia efficace su pazienti selezionati.

Questioni irrisolte: quante infusioni? quale la dose ottimale? sinergie con altre terapie di seconda linea?

LABORATORIO DI TERAPIE CELLULARI AVANZATE OSPEDALE DI VICENZA



Giuseppe Astori



Angela Bozza



Martina Bernardi



Katia Chierigato



REGIONE DEL VENETO



ULSS8
BERICA



Daniela Catanzaro



Anna Merlo

giuseppe.astori@aulss8.veneto.it

<https://ltca.aulss8.veneto.it/>