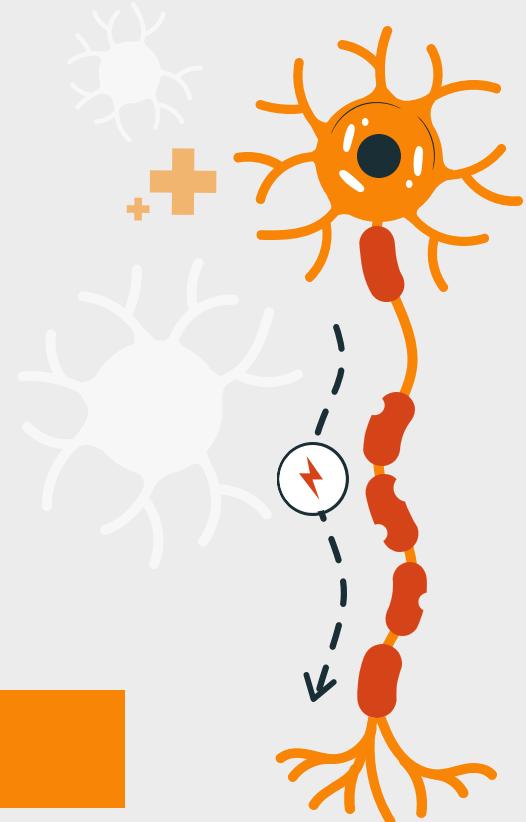


Trapianto di cellule staminali neurali in pazienti con sclerosi multipla progressiva

Medicina Rigenerativa
- Demartis Giulia (matricola: 202450)





Sclerosi Multipla



Si tratta di una **malattia autoimmune** che colpisce il **Sistema Nervoso Centrale (SNC)**.

In particolare, il sistema immunitario attacca erroneamente la guaina mielinica che ricopre gli assoni dei neuroni nel cervello e nel midollo spinale.

La **demielinizzazione** provoca:

- Debolezza muscolare o paralisi
- Disturbi visivi
- Formicolii ed Intorpidimento
- Problemi Cognitivi

Due forme di SM:

- **SM recidivante - remittente:** è la forma più comune all'inizio in cui si alternano periodi di ricadute a periodi di remissioni.
- **SM progressiva:** dopo anni il peggioramento della malattia diventa graduale e costante, senza remissioni.

Terapie Attuali



Le terapie attuali prevedono l'utilizzo di farmaci **immunomodulanti** e **immunosoppressori**, oltre alla terapia fisica e a misure riabilitative.

Queste presentano però dei *limiti*:

- ✖ **Efficacia limitata nelle forme progressive**, in quanto la neurodegenerazione non è più dovuta ad un'infiammazione acuta
- ✖ **Limitata capacità di riparare la mielina**, che comporta il progredire continuo della malattia.
- ✖ **Effetti collaterali e problemi di tollerabilità**, motivo per cui è richiesto un continuo monitoraggio per evitare danni agli organi o immunosoppressione eccessiva.
- ✖ **Somministrazione complessa e costosa**, in particolare per pazienti che necessitano di trattamenti a lungo termine.



Terapie Innovative



Le **terapie con cellule staminali** si sono distinte come una prospettiva promettente per una gestione più efficace della sclerosi multipla.

Il trapianto di cellule staminali facilita la rigenerazione tissutale

Le cellule staminali secernono fattori neurotrofici e hanno effetti immunomodulatori

Cellule staminali Ematopoietiche: permettono di ripristinare il sistema immunitario danneggiato e attenuare le risposte infiammatorie.

! Non sono in grado di differenziare in neuroni ma si limitano a modulare la risposta immunitaria

HSCs



Terapie Innovative



MSCs

Cellule staminali Mesenchimali: le MSC derivanti dal midollo osseo possiedono delle proprietà antinfiammatorie e stimolano la rigenerazione nelle aree danneggiate del SNC promuovendo la differenziazione delle NSC.

- ! Non sono in grado di differenziare in neuroni in vivo ma la loro applicazione clinica si basa su meccanismi indiretti

NSCs

Cellule staminali Neurali: hanno la capacità di differenziarsi nelle cellule del sistema nervoso e secernono fattori neurotrofici. Inoltre, mostrano una propensione a migrare verso le regioni demielinizzate ed infiammate.

- ! Il fattore limitante è la loro limitata riserva



Terapie Innovative



ESCs

Cellule staminali Embrionali: possono essere guidate in laboratorio a differenziarsi in neuroni per integrarsi nel tessuto nervoso e favorire la riparazione delle lesioni.



Non è semplice guidarne la differenziazione né ottenere cellule funzionali e mature

iPSCs

Cellule staminali pluripotenti indotte: sono cellule in stato pluripotente riprogrammate a partire da cellule somatiche adulte che mostrano promettenti capacità neuroprotettive e rigenerative.

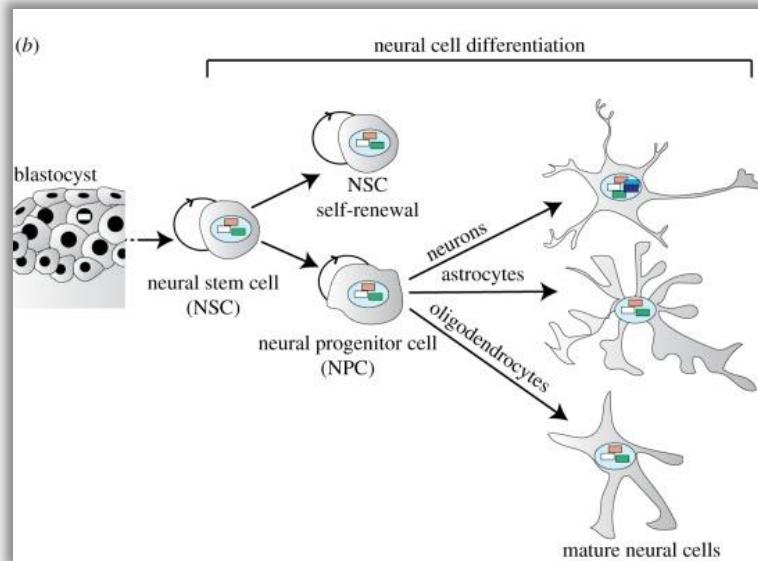


Potrebbero differenziarsi in modo aberrante o formare dei teratomi



Trapianto di NCSS in pazienti con SM progressiva (STEMS)

Si tratta di uno studio clinico di fase 1, condotto presso l'istituto scientifico San Raffaele di Milano per valutare la **fattibilità**, la **sicurezza** e la **tollerabilità** di un *trapianto intratecale* di **cellule progenitrici neurali fetal umane** (hfNPCs) in 12 pazienti affetti da **Sclerosi Multipla Progressiva** (PMS).



Perché le NPC?

- Sono progenitori **derivati dalle NSC**
- Mantengono un'**identità neurale stabile** durante l'espansione in vitro: questo le rende più affidabili rispetto alle ESC o alle iPSC
- Sono **già state utilizzate** su modelli animali ed è stato dimostrato che possono modulare la risposta infiammatoria e favoriscono la neuroprotezione

Origine delle cellule



Le cellule progenitrici neurali fetal umane utilizzate in questo studio sono state ottenute da una **singola corteccia cerebrale** di un **feto umano**.

Dopo che sono state escluse eventuali infezioni nel sangue materno:



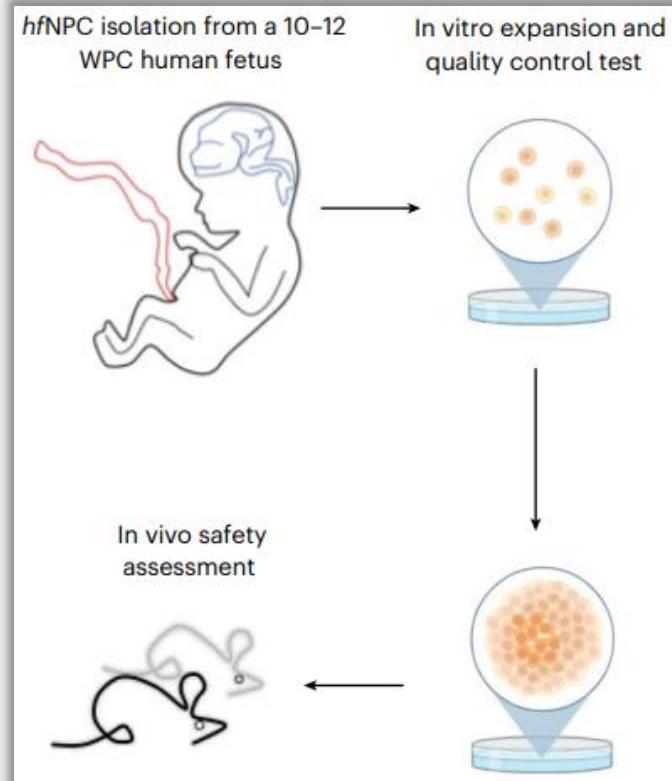
Ottenute cellule da tessuto cerebrale trattato con **enzimi proteolitici** (*Tripsina*)



Le cellule sono state coltivate in un terreno con **fattori di crescita**



Le cellule sono state **raccolte e ricoltivate** dopo 15-20 giorni: questo passaggio è stato successivamente ripetuto ogni 10-15 giorni.



Caratteristiche dei pazienti



I pazienti partecipanti allo studio erano adulti tra i 18 e i 55 anni affetti da sclerosi multipla progressiva, con una **durata media** della malattia di 14 anni e un **punteggio EDSS** medio di 7.25, indicatore di un livello di disabilità significativo.

Tutti avevano ricevuto terapie precedenti ma senza benefici clinici sostanziali.

	Treatment cohort (TC)				
	TC-A ($0.7 \times 10^6 \pm 10\%$ cells/kg)	TC-B ($1.4 \times 10^6 \pm 10\%$ cells/kg)	TC-C ($2.8 \times 10^6 \pm 10\%$ cells/kg)	TC-D ($5.7 \times 10^6 \pm 10\%$ cells/kg)	All TCs
	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=12)
Female sex, n (%)	1 (33.3)	2 (66.7)	3 (100)	2 (66.7)	8 (66.7)
Age (years), mean \pm s.d.	50.0 \pm 1	50.7 \pm 5.9	44.0 \pm 4.4	46.3 \pm 5.9	47.7 \pm 4.9
Disease type					
SPMS, n (%)	1 (33.3)	0	2 (66.7)	2 (66.7)	5 (41.7)
PPMS, n (%)	2 (66.7)	3 (100)	1 (33.3)	1 (33.3)	7 (58.3)
Baseline EDSS, median (IQR)	8.0 (6.5–8.0)	7.0 (6.5–8.0)	7.5 (7.0–8.0)	6.5 (6.5–7.5)	7.25 (6.5–8.0)
Disease duration (years), mean \pm s.d.	18.3 \pm 3.1	13 \pm 6.6	11.7 \pm 1.2	15.3 \pm 6.1	14.6 \pm 4.9
Previous DMT, n (%)					
AZA	1 (33.3)	1 (33.3)	0	0	2 (16.7)
MTX + CTX	1 (33.3)	0	0	0	1 (8.3)
FTY	1 (33.3)	1 (33.3)	1 (33.3)	1 (33.3)	4 (33.3)
RTX/OCR	0	1 (33.3)	1 (33.3)	0	2 (16.7)
CTX	0	0	1 (33.3)	0	1 (8.3)
DMF	0	0	0	2 (66.7)	2 (16.7)
SPMS, secondary progressive multiple sclerosis; IQR, interquartile range; DMT, disease-modifying therapy; AZA, azathioprine; MTX, methotrexate; CTX, cyclophosphamide; FTY, fingolimod; RTX, rituximab; OCR, ocrelizumab; DMF, dimethyl fumarate; MRI, magnetic resonance imaging; Gd, gadolinium; nBV, normalized brain volume; nWMV, normalized white matter volume; nGMV, normalized gray matter volume; CSA, cross-sectional area; nLThalV, normalized left thalamic volume; nRThalV, normalized right thalamic volume.					

Study Design



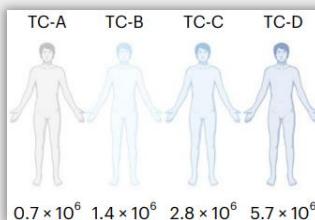
Sottoposti ad un **controllo basale** e puntura lombare per analizzare liquido cerebrospinale



Singola **somministrazione intratecale di hfNCP**, sospese in 10 ml di soluzione fisiologica con **dosaggi crescenti**



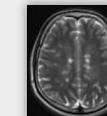
Analisi multimodali del liquido cerebrospinale (CSF) a 3 mesi dal trapianto



Somministrazione **pre medicazione** di 'Metilprednisolone' per ridurre eventuali **reazioni di ipersensibilità** di tipo I

Terapia immunosoppressiva, a partire da 7 giorni prima del trapianto fino alla settimana 96

Ulteriori esami **clinici, neurologici e neurofisiologici** per osservare evoluzione della condizione



Endpoint primario – Eventi Avversi (AE)

L'endpoint primario di sicurezza ha riportato che:

- **Non** sono state rilevate **differenze significative** negli AE tra le varie coorti di trattamento
- **Non** sono stati segnalati AE dose limitanti (**DLT**)
- Tutti gli AE sono stati **lievi** (grado 1) o **moderati** (grado 2), come cefalea di lieve entità e rigidità muscolare del collo.
- Non sono stati riportati AE gravi (grado 3 o +), fatta eccezione per un caso di **ricaduta di sclerosi multipla** con un peggioramento del punteggio EDSS da 6,5 a 7,5, risultato **non** correlato al trattamento.
- Ad almeno 3 anni dall'ultimo paziente trattato, la sopravvivenza dei pazienti è del 100%.

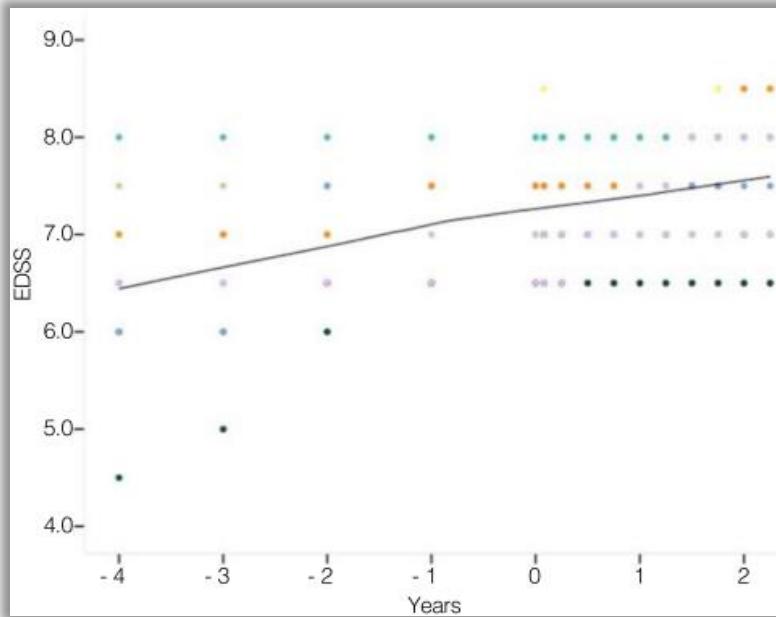
Number of AEs (%)	Treatment cohort (TC)				
	TC-A ($0.7 \times 10^6 \pm 10\%$ cells/kg) (n=3)	TC-B ($1.4 \times 10^6 \pm 10\%$ cells/kg) (n=3)	TC-C ($2.8 \times 10^6 \pm 10\%$ cells/kg) (n=3)	TC-D ($5.7 \times 10^6 \pm 10\%$ cells/kg) (n=3)	All TCs (n=12)
Short-term and mid-term AEs (within 14 days from hNPC transplantation)					
Headache	2 ^a	0	1 ^a	0	3
Neck pain	1 ^a	0	0	0	1
Muscle stiffness	1 ^a	0	1 ^a	0	2
Hypomagnesemia	1 ^b	0	0	0	1
Constipation	1 ^b	0	0	0	1
Herpes labialis	0	0	1 ^b	0	1
Flu	0	1 ^b	0	0	1
Long-term AEs (between 15 days and 96 weeks from hNPC transplantation)					
Gastritis	1 ^c	2 ^c	0	1 ^c	4
Urinary tract infection	1 ^c	1 ^c	0	1 ^c	3
Upper respiratory tract infection	4 ^c	3 ^c	3 ^c	0	10
Hypertransaminasemia	0	2 ^c	0	0	2
Skin infection	0	1 ^c	0	0	1
Renal colic	0	0	0	1 ^c	1
Creatinine increase	1 ^c	1 ^c	0	0	2
Accidental fall	0	3 ^d	0	0	3
Hyperglycemia	0	0	1 ^d	0	1
Anemia	0	0	0	1 ^d	1
Phlebitis	0	0	2 ^c	0	2
MS relapse	0	1 ^e (SAE)	0	0	1
Intestinal polyp	0	1 ^d	0	0	1
Renal angiomyolipoma	1 ^d	0	0	0	1
Constipation	0	0	0	1 ^c	1
Causality of AEs to hNPC					
Definitely related	0	0	0	0	0
Probably related	4	0	2	0	6
Possibly related	2	1	1	0	4
Unlikely related	7	10	5	4	26
Not related	1	5	1	1	8
Causality of SAE to hNPCs					
Not related	0	1	0	0	1

^aprobably related ^bpossibly related ^cunlikely related ^dnot related

(a) probably related (b) possibly related (c) unlikely related (d) not related

Endpoint secondario – Risultati neurologici e neurofisiologici

Nel gruppo di pazienti è stato osservata una **tendenza al rallentamento** del tasso medio di variazione del EDSS tra i 4 anni precedenti al trapianto e i 2 anni successivi.



- ↗ **Prima del trapianto:** disabilità aumentava con un ritmo di **+0,24 punti/anno**
- ↗ **Dopo il trapianto:** disabilità aumenta con un ritmo di **+0,13 punti/anno**

La differenza però **non** è risultata **statisticamente significativa** → **p-value=0.23**



Endpoint secondario – Valutazione MRI

Lo studio ha utilizzato la **risonanza magnetica funzionale** per monitorare nuove lesioni e cambiamenti nel volume cerebrale (*biomarcatore di neurodegenerazione*):



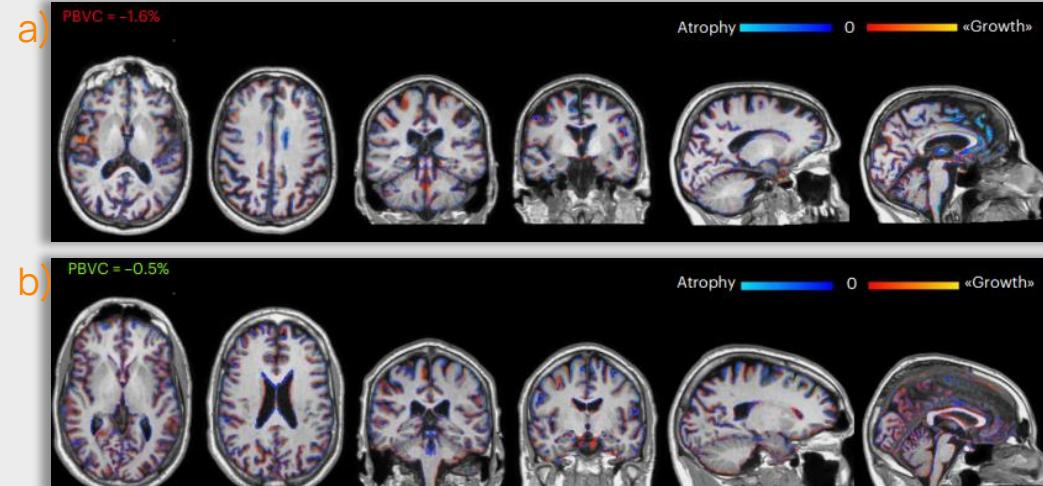
Sei pazienti (50%) ha sviluppato **nuove lesioni cerebrali in T2**



E' stata osservata una *correlazione statisticamente significativa* tra la **PBVC annuale ed il numero di hfNPC iniettate**

Nell'immagine si osservano aree di **atrofia** cerebrale (blu) e di **crescita** (rosso) che rappresentano la **percentuale di variazione del volume cerebrale (PBVC)** in 2 anni dal trapianto in due pazienti rappresentativi:

- Ricevente **bassa** dose di hfNPCs ($PBVC = -1.6\%$)
- Ricevente **alta** dose di hfNPCs ($PBVC = -0.5\%$)



Endpoint secondario – Analisi CSF

Dal confronto delle **analisi immunologiche e proteomiche** del CSF al *basale* e *dopo 3 mesi* dal trapianto, si è osservato:

-  Sovraregolazione di alcuni **fattori trofici** (*GDNF, VEGF-C, SCF*)
-  Sovraregolazione di **molecole immuno-correlate** (*FAS Ligand, IL-10*)
-  Riduzione di **chemochine pro infiammatorie** (*IL-8*)
-  Aumento di **citochine pro infiammatorie con funzioni pro rigenerative** (*IL-15, GM-CSF*)

GDNF	↑ (da 0.2 a 0.4 pg/ml)	Favorisce sopravvivenza, crescita e differenziazione
VEGF-C	↑ (da 137.8 a 175.5 pg/ml)	converte NCS quiescenti in cellule progenitrici
SCF (Stem Cell Factor)	↑ (da 23.2 a 27.3 pg/ml)	Contribuisce al mantenimento e proliferazione cellule staminali
FAS Ligand	↑ (da 6 a 11 pg/ml)	Elimina cellule immunitarie potenzialmente dannose
IL-10	↑ (da 2.2 a 5.7 pg/ml)	Riduce infiammazione del SN
IL-8	↓ (da 130.4 a 53 pg/ml)	Richiama cellule immunitarie al sito dell'infiammazione
IL-15	↑ (da 4.1 a 5 pg/ml)	Regola proliferazione e differenziazione delle NCS
GM-CSF	↑ (da 4.8 a 27 pg/ml)	Sopravvivenza e proliferazione dei neuroni

Da cui si può ipotizzare che le hfNPC abbiano esercitato un **ruolo neuroprotettivo**, anche se non è da escludere che i risultati possano essere influenzati dai **trattamenti immunomodulatori concomitanti** e dalla **risposta immunitaria** dovuta alla naturale *evoluzione della malattia*.

Endpoint secondario – Analisi CSF

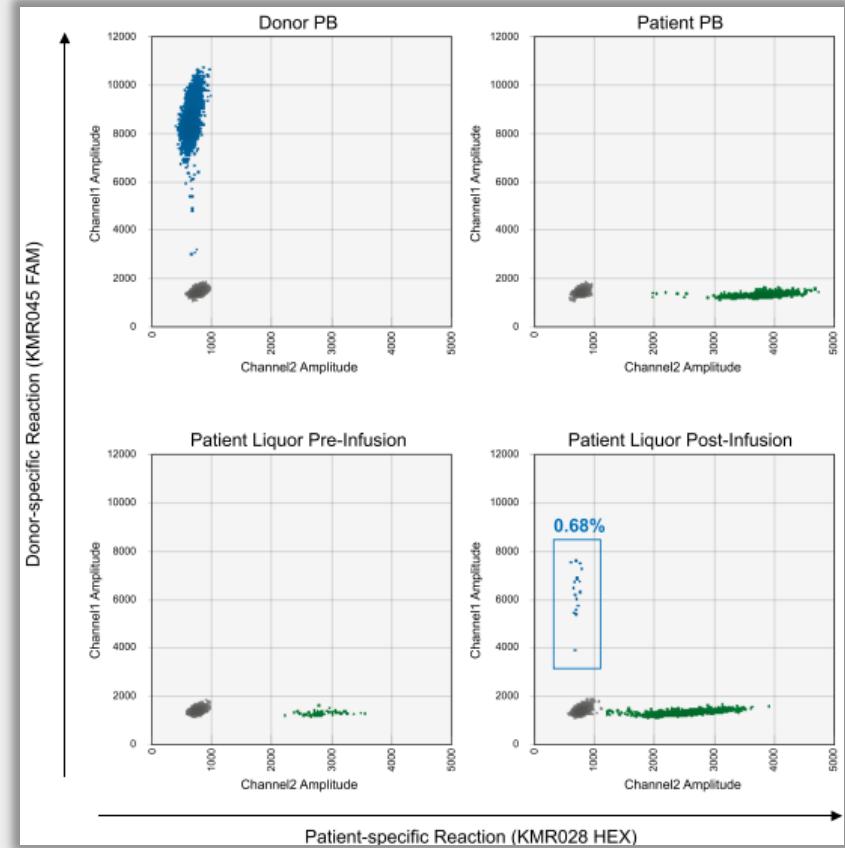


Presenza di **cellule** derivanti **dal donatore** nel SN del paziente tramite **analisi del microchimerismo**:

In cinque pazienti, dai campioni di CSF raccolti dopo 3 mesi dal trattamento, è stato possibile estrarre una quantità sufficiente di DNA genomico ed in uno di questi è stata rilevata una **presenza** pari allo **0,68%** del materiale analizzato di **cellule derivanti dal donatore**, grazie all'utilizzo di marker genetici:

- KMR045 per il donatore
- KMR028 per il paziente

Questo potrebbe dimostrare che le cellule possono mantenere la loro **vitalità** ed esercitare un **effetto paracrino** anche a mesi di distanza dal trapianto.



Conclusioni



La terapia è risultata
fattibile, sicura e
tollerabile



Realizzazione di studi
clinici futuri con **dose più**
alta di cellule su **coorte**
più ampia



Chiarire se trapianto
possa avere un **effetto**
paracrino duraturo