



Presidio Ospedale dei Bambini

## **USO TERAPEUTICO DI CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI**

### **INFORMAZIONI E MODULO DI CONSENSO INFORMATO**

La terapia in oggetto, pur con diffida intimata all'Azienda Ospedaliera Spedali Civili di Brescia da parte dell'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) (n. 2166 del 29/11/201),  
deve essere attuata  
a seguito della pronuncia del Tribunale [REDACTED] – sez. Lavoro, in conformità alle  
determinazioni assunte dall'Azienda con deliberazione n. 718 del 14/11/2012.

PROTOCOLLO DI USO TERAPEUTICO DI CELLULE STAMINALI DI ORIGINE MESENCHIMALE  
PER TRATTAMENTO [REDACTED]

[REDACTED]

#### **PREMESSA**

[REDACTED]

La [REDACTED] è una malattia ereditaria a trasmissione autosomica recessiva. E' caratterizzata dal deficit dell'enzima arilsulfatasi A, un enzima che degrada un gruppo di lipidi (sulfatidi) della mielina, con conseguente accumulo di tali sostanze tossiche. Ciò determina cecità, convulsioni, disturbi motori, demenza e perdita della mielina nel SNC. E' la più frequente tra le malattie leucodistrofiche. I primi sintomi sono una diminuzione della memoria e problemi posturali.

#### **PROGNOSI**

La prognosi è variabile in base all'età di insorgenza della malattia. Infatti, la forma infantile che insorge tra i 12 e i 18 mesi di vita; è la forma a decorso più rapido. La forma giovanile che insorge tra i 4 e i 12 anni ha un decorso più lento. C'è poi una forma adulta, che inizia dopo i 16 anni, con disturbi psichiatrici fino alla demenza.

#### **TRATTAMENTI**

Per forme lievi e iniziali è stato sperimentalmente eseguito il trapianto di midollo osseo. Esiste un protocollo di fase II di trattamento della malattia mediante terapia genica. I medici del TIGET, principali investigatori per questo trattamento, hanno dichiarato Sofia non eleggibile alla terapia genica perché ormai fortemente sintomatica.

L'ipotesi di lavoro è, quindi, che cellule mesenchimali/stromali iniettate per via intratecale ed endovenosa abbiano l'abilità ad agire attraverso un meccanismo neurotropino-indipendente. La somministrazione di cellule mesenchimali staminali di origine midollare possano provocare un effetto a molti livelli sui neuroni targets diminuendo la neuropatia.

PROTOCOLLO CLINICO PER IL TRATTAMENTO DI [REDACTED]

## DIRITTO DI REVOCA DEL CONSENSO PER IL MINORE

Cognome .....Nome.....

Io sottoscritto padre Cognome .....Nome.....

.....  
Data Firma leggibile del padre

Io sottoscritta madre Cognome.....Nome.....

.....  
Data Firma leggibile della madre

## DICHIARO DI VOLERE REVOCARE IL CONSENSO

(I genitori di minore hanno il diritto di revocare in qualsiasi momento il consenso prestato, eventualmente anche nell'immediatezza della procedura sanitaria che si sta ponendo in essere: la natura contrattuale del consenso determina che per essere giuridicamente valido esso debba inoltre rispondere ai requisiti "libero" [esente da vizi, coercizioni, inganni, errori: non può essere esercitata alcuna pressione psicologica per influenzare la volontà del paziente, pena la nullità del consenso] e "relativo al bene disponibile" [l'integrità psicofisica non è un diritto di cui la persona può disporre senza alcun limite])



Protocollo e cronoprogramma inerente al percorso diagnostico terapeutico del paziente di cui al ricorso ex art. 700.

Paziente \_\_\_\_\_

Genitori: \_\_\_\_\_

Acquisizione di tutta la documentazione clinica (referti, cartelle, ecc.) del paziente.

Ricovero del paziente per valutazione delle condizioni.

Valutazione da parte della équipe plurispecialistica dei clinici ospedalieri del singolo caso e indicazioni alla terapia.

Identificazione del donatore, che si preferisce essere familiare, e solo in casi specifici lo stesso paziente.

Visita, controlli ed esami specifici del donatore e acquisizione del consenso.

Ricovero del donatore per l'esecuzione del carotaggio in sedazione presso la struttura ospedaliera.

Tempi tecnici: trattamento delle cellule dedicate presso il laboratorio e successivo congelamento. Conferma della negatività da contaminazioni e delle caratteristiche cellulari; il tutto indicativamente nell'arco di cinque settimane.

Ricovero del paziente per la terapia con degenza di almeno 12 ore.

Trattamento ripetuto per 5 infusioni con tempistica personalizzata  
Controllo clinico ed eventualmente strumentale per ogni ricovero ed in caso di eventuali Eventi Avversi.

Controlli clinici e strumentali specifici da ripetersi dopo la terza infusione per verifica della efficacia della terapia ed eventuale prosecuzione, e dopo la quinta infusione, come da protocollo.

Successivi controlli di follow up, clinici ed eventualmente strumentali periodici, dopo il termine della terapia per almeno 4 anni.

PER PRESA VISIONE ED ACCETTAZIONE DEI GENITORI:

PADRE \_\_\_\_\_  
Nome                      Cognome                      firma                      Data

MADRE \_\_\_\_\_  
Nome                      Cognome                      firma                      Data

MEDICO PRESCRITTORE \_\_\_\_\_  
Nome                      Cognome                      firma                      Data

Comuni:

- Cefalea (10%)
- Dolore alla schiena (30%)

Rari:

- Transitoria comunicazione (fistola) tra meningi e cute, con sgocciolamento di liquor all'esterno, o sottocute, con gonfiore nella sede dell'iniezione.
- Ematoma in sede di iniezione, prevalentemente in pazienti tendenti al sanguinamento. Questo evento pur non costituendo un rischio neurologico midollare, data la sede di iniezione, può in rarissimi casi comprimere le radici del nervo sciatico. Per tale motivo il paziente deve avvisare il medico responsabile della procedura se nelle ore seguenti l'iniezione dovesse avvertire dei forti dolori agli arti inferiori o una perdita di sensibilità o motilità.
- Infezione delle meningi, teoricamente possibile quando si iniettano sostanze. Il paziente deve avvertire il medico se nelle 12-24 ore dopo l'iniezione compare febbre  $>38^{\circ}\text{C}$ .

**Nome-Cognome numero di telefono del medico responsabile della procedura**

.....



SPEDALI CIVILI – BRESCIA  
Azienda Ospedaliera  
Presidio Ospedale dei Bambini  
ONCOEMATOLOGIA PEDIATRICA  
E TRAPIANTO MIDOLLO OSSEO  
"Monica e Luca Folonari"  
Responsabile: Dr. F. PORTA

**DICHIARAZIONE DI AVVENUTA INFORMAZIONE E CONSENSO AD  
ATTO SANITARIO SPECIFICO  
ATTO SANITARIO: INIEZIONE INTRATECALE DI CELLULE  
MESENCHIMALI**

**PROSECUZIONE DELLE CURE SECONDO SENTENZA EX ART.700**

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

La procedura consiste nell'inserire un ago tra una vertebra e l'altra sino a raggiungere lo spazio tra le meningi dov'è contenuto il liquor cefalo-rachidiano e nell'iniettare una sospensione cellulare.

**SCOPO:** Introdurre le cellule oltre quella che viene chiamata barriera ematoencefalica, che altrimenti impedirebbe il loro accesso ai tessuti nervosi.

Tali cellule sono cellule mesenchimali estratte dal midollo osseo.

Tutti i prodotti per infusione in un paziente sono controllati per escludere la presenza di contaminazioni virali o batteriche.

Le cellule iniettate, in base alla situazione clinica, possono cedere alle cellule nervose del paziente i loro enzimi in caso di malattia genetica, oppure facilitare la riparazione di lesioni nervose.

**PROCEDURA:**

Sede dell'Iniezione: spazio tra la terza e la quarta, oppure tra la quarta e la quinta vertebra lombare

Anestesia locale: l'iniezione intratecale può essere meno dolorosa di una iniezione intramuscolare; comunque abitualmente sulla sede dell'iniezione viene applicato un cerotto medicato con un anestetico locale, che ha effetto dopo circa 40-60'. In aggiunta o in alternativa si può iniettare un anestetico locale nel sottocute della sede identificata attraverso un ago sottile.

**Fasi:**

- il paziente viene posto rannicchiato su di un fianco oppure seduto sul letto in posizione semiflessa.
- Si disinfetta la sede dell'iniezione.
- Viene inserito l'ago da lombare nella sede sopracitata. L'introduzione dell'ago si arresta nel momento in cui refluisce del liquor. Si lascia uscire una quantità di liquor circa equivalente al volume della sospensione cellulare da iniettare. Il liquor estratto verrà conservato in laboratorio.
- Si inietta la sospensione cellulare già preparata in siringa sterile in circa 30 secondi.
- Al termine dell'iniezione si attendono una decina di secondi prima di estrarre l'ago.

Il paziente viene posizionato immediatamente supino. E' opportuno che dopo l'iniezione rimanga sdraiato per il tempo indicato dal medico, comunque per non meno di dodici ore. Questa postura è necessaria per evitare che la pressione idrostatica faccia uscire il liquor, causando la perdita di una parte delle cellule iniettate, e provocando disturbi quali cefalea e vomito.

**RISCHI E COMPLICANZE EVENTUALI DEL TRATTAMENTO**

L'iniezione intratecale di farmaci o cellule è gravata da una serie di rischi:

**ACQUISIZIONE DEL CONSENSO PER IL MINORE**

Cognome ..... Nome.....

Io sottoscritto padre Cognome ..... Nome.....

Io sottoscritta madre Cognome ..... Nome.....

**DICHIARO**

di essere stato/a informato/a in maniera chiara, completa e comprensibile dal Dr. \_\_\_\_\_  
riguardo alla procedura di iniezione intratecale di cellule come sopra esposto.

**DICHIARO di**

**ACCETTARE**

**NON ACCETTARE**

Liberamente, spontaneamente ed in piena coscienza la procedura proposta per mio/a figlio/a.  
Sono consapevole di poter revocare il presente consenso in qualsiasi momento prima della  
procedura sanitaria proposta.

.....  
Data Firma leggibile del padre

.....  
Data Firma leggibile della madre

.....  
Il Medico responsabile della procedura (timbro e firma leggibile)

Il quarto ciclo prevede:

Un quantitativo di cellule pari fino a  $2,5 \times 10^6$  per via lombare

Un quantitativo di cellule pari fino a  $2,5 \times 10^6$  per via endovenosa

Il quinto ciclo prevede:

Un quantitativo di cellule pari a  $2 \times 10^6$  per via lombare

Un quantitativo di cellule pari a  $2 \times 10^6$  per via endovenosa

Tra un ciclo e l'altro devono trascorrere almeno 60 giorni, ma, dal terzo ciclo in avanti, a seconda dello stato immunologico del paziente si può arrivare anche a 90 giorni o oltre.

#### RACCOLTA DATI PRE-TRATTAMENTO

1. visita neurologica e devono essere raccolti gli esami precedentemente svolti in relazione alla diagnosi ed all'avanzamento della patologia. La visita neurologica ha anche lo scopo di valutare la motilità residua ed il tono muscolare. Sarà riportato in cartella anche il dato anamnestico di eventuali fasi di progresso "plateau" di malattia o di miglioramenti occasionali, con la durata degli stessi.
2. Esami strumentali: valutazione clinica neurologica, elettromiografia
3. Sul paziente saranno effettuati inoltre i seguenti esami ematici, prima del trattamento e successivamente al terzo ciclo di iniezioni (da ripetersi anche successivamente al quarto ed al quinto ciclo).

#### RISCHI DELLA PROCEDURA E CONSENSO INFORMATO

I rischi della procedura vengono elencati nell'allegato modulo di consenso informato sia per quanto riguarda il donatore (All.1) che per il ricevente (All.2). I moduli di consenso informato devono essere sottoscritti prima dell'inizio della procedura.

#### INDICATORI PER LA VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DELLA PROCEDURA

1. La prima valutazione avviene a tre-quattro settimane dal primo ciclo, immediatamente prima dell'avvio del secondo ciclo. I parametri sono gli stessi della fase pre-terapia
2. La seconda fase di valutazione avviene ad un mese dal terzo ciclo di iniezioni. La terza fase di valutazione avviene un mese dopo il quarto ciclo e consiste nella sola tipizzazione immunitaria
3. La quarta fase di valutazione avviene un mese dopo il quinto ciclo e prevede la valutazione finale dei parametri già utilizzati in fase pre trattamento
4. È prevista una ulteriore fase di valutazione completa ad un anno dal termine del quinto ciclo.

A completamento della cultura le cellule vengono staccate dalle flask mediante tripsina e suddivise in provette. Vengono estratti da ogni provetta campioni di cellule per sottoporle ad analisi relative alla presenza di fattori contaminanti (funghi, batteri).  
Le provette contenenti le cellule vengono successivamente criopreservate in vapori di azoto liquido.

### Preparazione per l'iniezione

Convocato il paziente la/le provetta/e da utilizzare vengono scongelate e ne viene valutata la vitalità con citofluorimetro.

Se la vitalità è superiore all'80% si procede alla sospensione delle cellule in soluzione fisiologica per l'iniezione endovena ed alla differenziazione in linea neuronale per l'iniezione intratecale.

Le cellule differenziate, dopo circa due ore, vengono poste in sospensione in soluzione fisiologica.

Le due provette vengono etichettate con i dati del paziente e rispettivamente con il tipo di iniezione al quale sono dedicate (spinale e endovena) e consegnate al medico.

Viene sempre prelevato un campione di controllo dalle provette che viene riposto in cultura.

Le iniezioni devono avvenire entro due ore dalla preparazione.

### Somministrazione

La somministrazione avviene per via endovenosa attraverso flebo da 20cc.

Le cellule vanno inserite nella flebo una volta che questa abbia iniziato ad essere somministrata al paziente.

La somministrazione per via intratecale avviene attraverso una iniezione lombare attraverso un ago da lombare nello spazio intervertebrale tra 4° e 5° vertebra lombare. L'iniezione intratecale è meglio se è effettuata in sala operatoria, ma può avvenire anche in sala di degenza. Il medico aspira il contenuto della provetta nella siringa da lombare e procede con l'iniezione, sono, ovviamente previsti i presidi sanitari del caso (guanti, mascherina), sterilizzazione della cute nel sito di iniezione.

Il paziente deve rimanere sdraiato supino per almeno 12 ore dopo di che può essere dimesso.

Condizioni avverse possono prevedere febbre, vomito o forte mal di testa, in qual caso il paziente viene trattenuto in osservazione. È tollerabile, anche se non frequente, uno stato febbrile fino a 37,5°C che non deve durare più di 12 ore. In tal caso il paziente viene dimesso a sfebbramento avvenuto.

### Posologia

Per ogni paziente sono previsti 5 cicli di iniezioni (ottenibili da un solo carotaggio osseo).

Il primo ciclo prevede:

Un quantitativo di cellule pari fino a  $2,5 \times 10^6$  per via lombare

Un quantitativo di cellule pari fino a  $2 \times 10^6$  per via endovenosa

Il secondo ciclo prevede:

Un quantitativo di cellule pari fino a  $2,5 \times 10^6$  per via lombare

Un quantitativo di cellule pari fino a  $2,5 \times 10^6$  per via endovenosa

Il terzo ciclo prevede:

Un quantitativo di cellule pari fino a  $2,5 \times 10^6$  per via lombare

Un quantitativo di cellule pari fino a  $2,5 \times 10^6$  per via endovenosa



### Esami clinici

Essendo l'insieme delle SMA di origine genetica non è possibile il trapianto autologo, ma si dovrà utilizzare un donatore non affetto dalla patologia.

Il donatore dovrà essere sottoposto ai seguenti esami:

- HIV (sierologia, NAT)
- HCV (sierologia, NAT)
- HBV (HBsAg, HBcAg NAT)
- EBV (PCR)
- sifilide
- (eventuali: JCV, HHV6 in PCR)

Eventuali altri esami potranno essere richiesti e valutati in funzione della storia clinica del donatore. L'età del donatore e la compatibilità dell'HLA non sono fattori determinanti per la riuscita del trapianto.

Se non sono presenti infezioni e lo stato di salute del donatore è buono si eseguiranno, prima del prelievo alcuni ulteriori esami di controllo e relativa visita anestesiologicala:

- emocromo, glicemia, bilirubina, AST, ALT.

A tal punto si può procedere al prelievo dello stroma osseo.

### Prelievo di stroma osseo

Tale intervento, da eseguire in anestesia locale o in lieve sedazione con Propofol, prevede l'incisione di due centimetri della cute sovrastante la spina iliaca anteriore-superiore, e il prelievo mediante "carotatura" di un cilindro di stroma osseo del diametro di circa 0,5 mm. È da considerarsi una prestazione di tipo ambulatoriale, va eseguita, comunque, in sala operatoria.

Il donatore dopo il prelievo rimane in osservazione per alcune ore ed in seguito può essere dimesso. Ad alcuni giorni di distanza è prevista una visita chirurgica per valutare lo stato della ferita.

Il disagio per il donatore è minimo e può riprendere la propria attività a distanza di 12 ore dal prelievo.

### Il campione bioptico

Il campione prelevato viene posto dal chirurgo in contenitore sterile in soluzione salina (HBSS) già preparato sotto cappa a flusso laminare, mantenuto a temperatura ambiente ed etichettato con le indicazioni relative al paziente (nome, cognome, data di nascita).

Il campione viene consegnato, chiuso ermeticamente nel contenitore sterile e posto in un busta sterile sigillata al biologo che lo trasporta in laboratorio per lavorarlo. Il trasporto può avvenire a temperatura ambiente. Il campione deve essere lavorato entro 12 ore dal prelievo.

### In laboratorio

I contenitori del campione bioptico vengono aperti dal biologo in ambiente sterile (sotto cappa a flusso a laminare) e munito degli appositi presidi sanitari (guanti sterili, occhiali protettivi, mascherina).

Il campione viene lavorato per estrarre le cellule staminali stromali nella stessa soluzione salina utilizzata per il trasporto che successivamente viene posta in centrifuga per ricavarne un pellet composto da cellule mononucleate.

Le cellule così ottenute vengono poste in diverse flask da cultura cellulare etichettate con i dati del paziente e la data di prelievo e poste in incubatore CO2 a 37 gradi.

La cultura cellulare in flask dura 20/25 giorni ed è finalizzata a produrre un numero sufficiente di cellule per 10 iniezioni (5 spinali e 5 endovena).