



Cryo-Save
Save for Life
Europe's Leading Stem Cell Bank

**Una nuova
opportunità :
L'Autologo
Solidale**

Il Gruppo Cryo-Save - La banca delle cellule staminali



- Holding costituita nel 2000 in Olanda
- Sede centrale in Svizzera
- La più grande azienda in Europa (e terza al mondo) con più di 130.000 campioni conservati
- Quotata dal 2007 presso la Borsa di Amsterdam (Euronext)
- Operatività in 38 Paesi con quattro laboratori attivi in Belgio, Germania, Dubai, India ed un laboratorio di ricerca Francia (Lione).
- Profondo Know-How e competenza nel settore della cryo-conservazione

Visione & Missione

- V** Cryo-Save crede che le cellule staminali adulte contribuiscano, già oggi, e ancor di più nel prossimo futuro, alle attuali pratiche terapeutiche in un numero crescente di malattie e permetterà nel lungo periodo una migliore prospettiva di cura.
- M** Cryo-Save mira al riconoscimento globale come Centro di Eccellenza nella applicazione e nello sviluppo tecnologico della cryo-conservazione delle cellule staminali umane e dei tessuti umani.

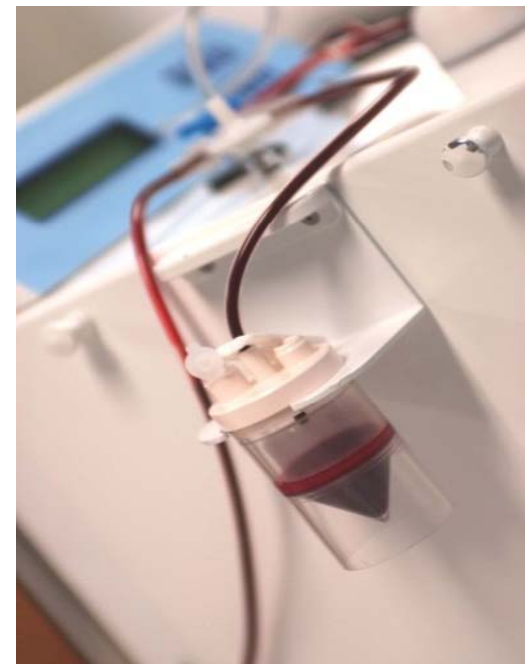
Per sviluppare la propria visione il gruppo Cryo-Save intende espandere la propria leadership europea nella conservazione familiare delle cellule staminali, anche attraverso la definizione di accordi strategici con organizzazioni sanitarie pubbliche e private.



Le collaborazioni correnti...

La nostra Società è impegnata nel miglioramento continuo delle tecniche di cryo-conservazione delle cellule staminali, attraverso la partecipazione a progetti finanziati dalla Commissione Europea, in stretta collaborazione con le migliori Università e Ospedali in tutto il territorio europeo:

- **Università di Anversa**
 - Studi Clinici (protocollo NASH)
- **Università di Köln: Dipartimento di Neurofisiologia**
 - Caratterizzazione delle Cellule Staminali
- **Fondazione Charcot**
 - Studi Clinici con pazienti MS
- **Istituto Fraunhofer (St. Ingbert)**
 - Tecniche di cryo-biologia
- **Progetti Europei sulla cryo-conservazione delle Cellule Staminali**
 - Progetto CRYSTAL
- **Membri del gruppo ITERA (International Tissue Engineering Research Association)**



CRYSTAL EU 6th FP



- **Cryo-banking of stem cells for human therapeutic application**
- **Partners:**
 - Fraunhofer IMBT, Germany
 - Medical Univ. of Vienna, Austria
 - Univ. Zürich, Switzerland
 - Catholic Univ. Leuven, Belgium
 - Univ. Antwerp, Belgium
 - Univ. Köln, Germany
- **Coordinator:**
 - Univ. Köln: Prof. Hescheler



Proposal full title	CRYo-banking of Stem cells for human Therapeutic AppLication
Proposal acronym	CRYSTAL
Research topic	LSH-2005-1.2.4.4:

addressed:	*Methodological research to underpin stem cell banking*
Proposal abstract (max. 2000 char.)	
<p>Stem cells are one of the most promising subjects of biomedical research. The development of human stem cell therapies will have to build on a safe and reliable supply of human stem cells which has to be assured by cell banking.</p> <p>Currently, the isolation, identification and culture of stem cells are not standardised between laboratories, and reproducibility of protocols is limited. Today's banking approaches still rely on storing sources of stem cells rather than on banking of defined, well-characterised stem cell populations (both somatic and embryonic). Cryopreservation of stem cells itself is not yet optimised and validated for the different cell types, and multiple challenges remain to be addressed during the definition of optimised cryopreservation protocols.</p> <p>The problems currently limiting the routine application of stem cell banking with a therapeutic perspective will be addressed by the CRYSTAL project. The consortium will develop tools and optimised procedures to enable cryopreservation of different stem cell types and allow safe production of sufficient numbers of high-quality cells for future human therapy. Five stem cell research laboratories providing four different sources of adult and embryonic stem cells have joined forces with two partners specialising in applied banking and fundamental cryobiological research. CRYSTAL is thus in a position to tackle existing problems in an integrated approach without limiting itself to either somatic or embryonic stem cells and to provide standardised, reproducible methods and tools to advance therapeutic stem cell research in Europe.</p>	



La procedura di conservazione

Trasporto verso il laboratorio

- Il campione di sangue placentare viene inviato, tramite corriere dedicato, presso i nostri laboratori dove deve arrivare nelle 48 ore successive al parto.

Trattamento

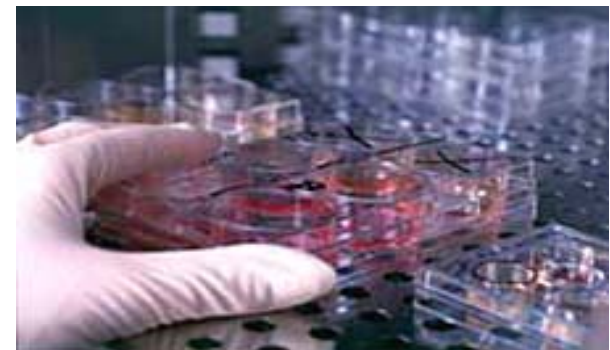
- Le cellule-staminali del sangue cordonale sono isolate e separate tramite procedure testate e validate
- Il campione è testato per evidenziare eventuali contaminazioni infettive virali e/o batteriologiche.
- Durante la fase di isolamento, le cellule staminali vengono separate in due microsacche
- Le cellule-staminali vengono quindi congelate in vapori di azoto a -196° con procedura lenta, prima di essere definitivamente stoccate

Sicurezza

- Stoccaggio dei due campioni conservati in due luoghi differenti per un periodo iniziale di 20 anni

Utilizzo delle cellule-staminali

- Su richiesta medica, il campione sarà inviato ad un centro di trapianto accreditato
- Nessun utilizzo delle cellule staminali senza richiesta medica ufficiale indicante il genere di applicazione terapeutica



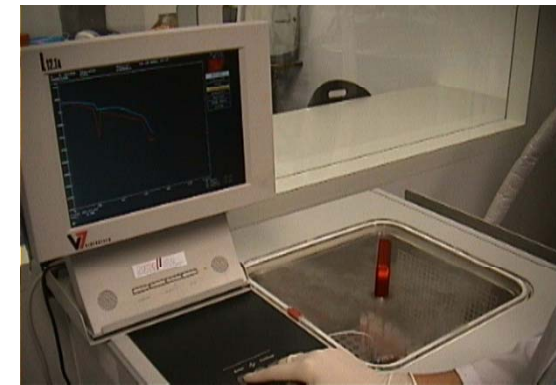
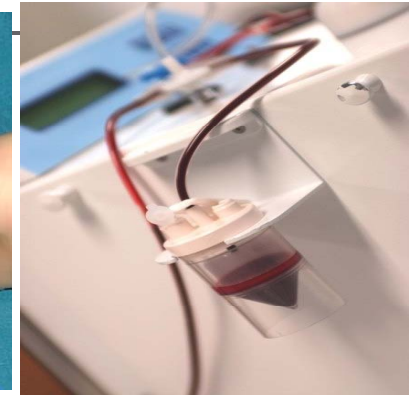
Cryo-Save è la sola Banca di cryo-conservazione a garantire due sacche di raccolta

Il trattamento in laboratorio

L'attività è focalizzata su:

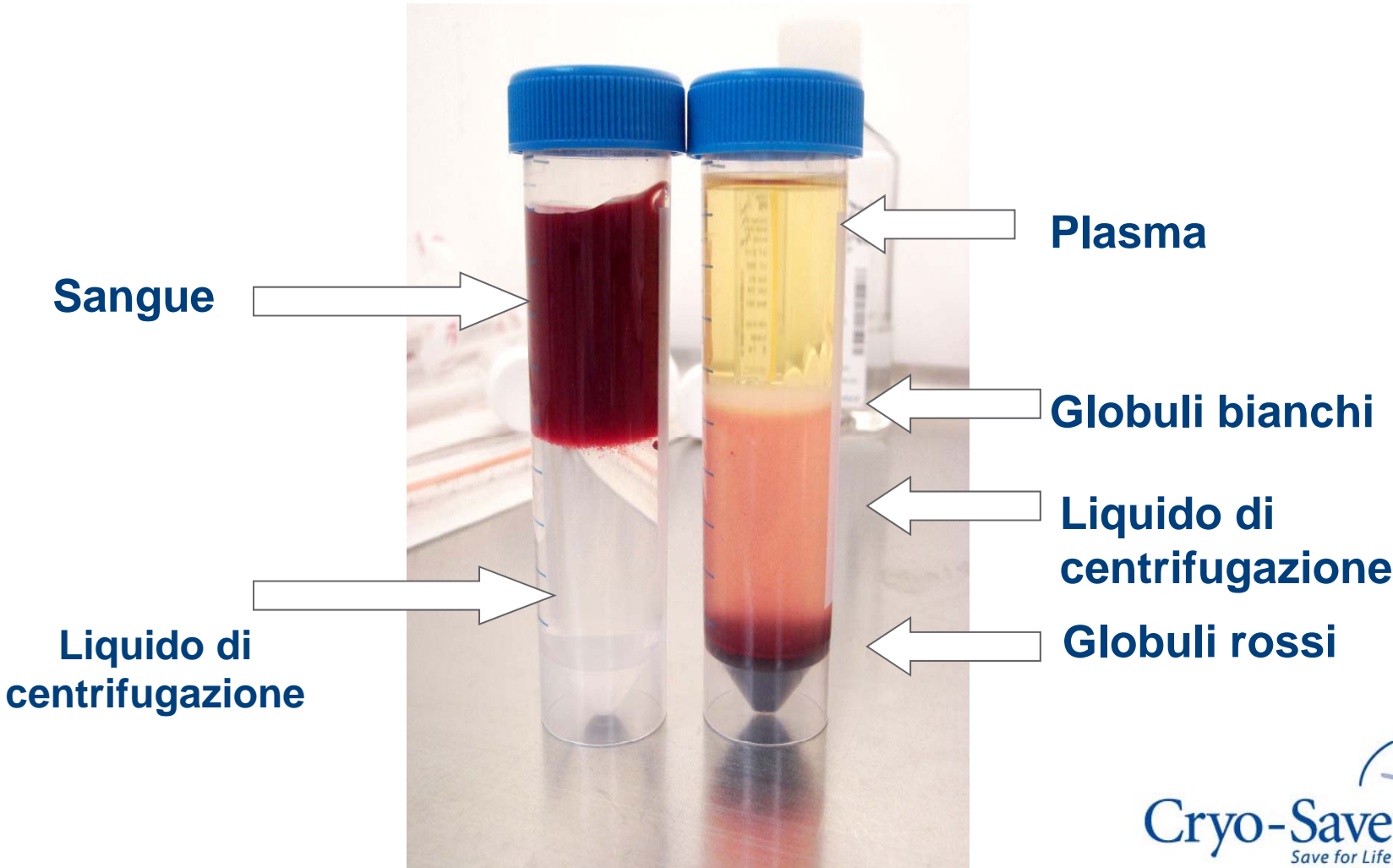
- ✓ isolamento
 - ✓ separazione
 - ✓ cryo-conservazione di HSCs da cordone ombelicale
-
- Processo:
 - Rimuovere le RBCs, ...
 - Concentrazione dei Mononucleotidi (centrifugation/density gradient)

 - Congelamento
 - Long term - > decennia
 - Slow Protocol $T^{\circ} = -196^{\circ}\text{C}$ (liquid nitrogen)

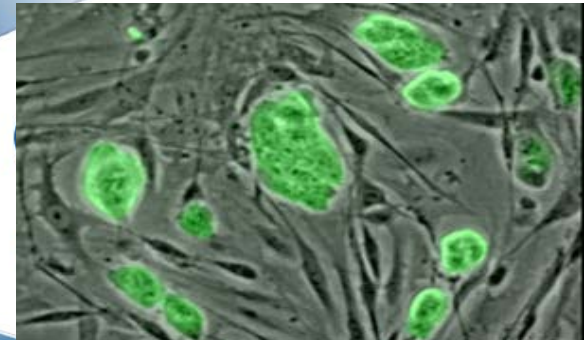


Sangue del cordone ombelicale

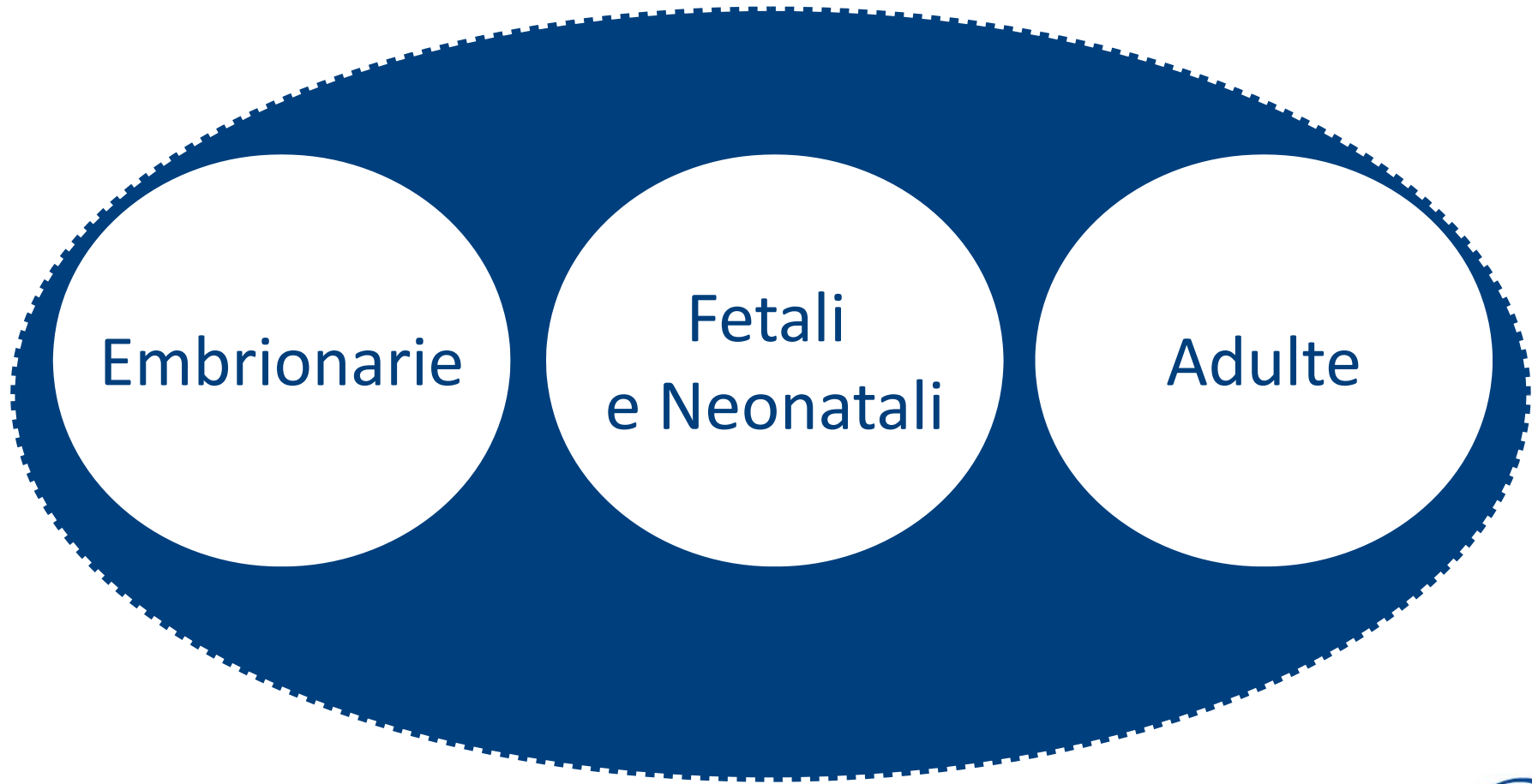
Estrazione delle cellule




Per definizione una cellula staminale è una cellula dotata di lunga sopravvivenza capace di autorigenerarsi e di differenziarsi in tutti gli elementi cellulari specializzati del tessuto al quale appartiene



Tipi di cellule staminali

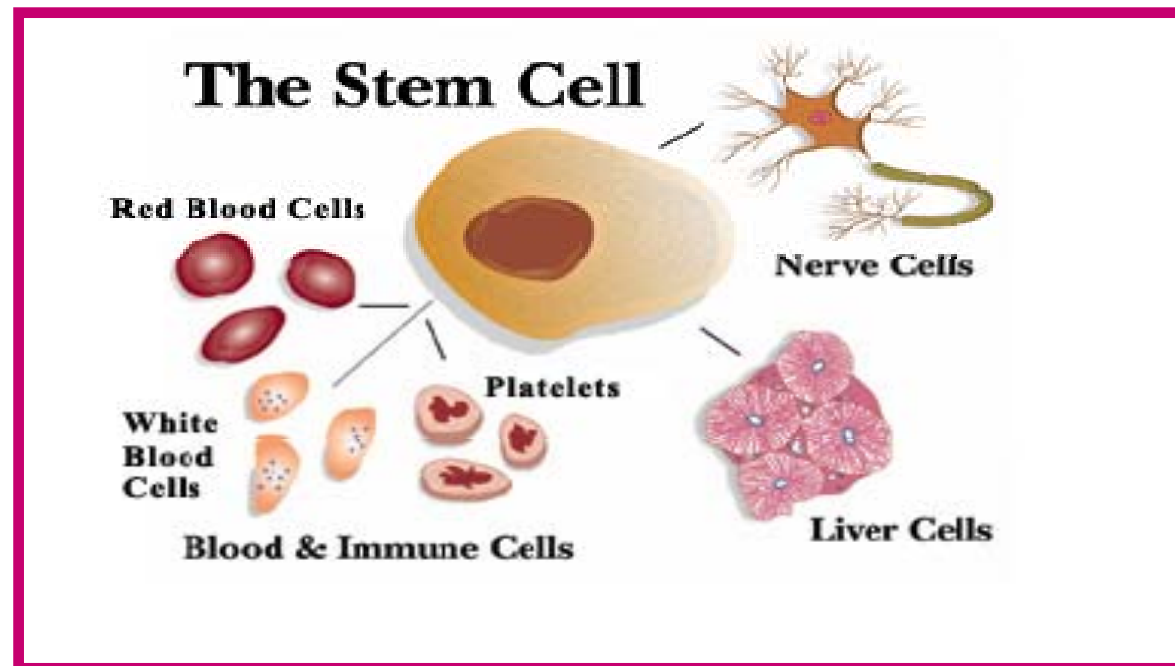


Cellule Staminali: quali scegliere?

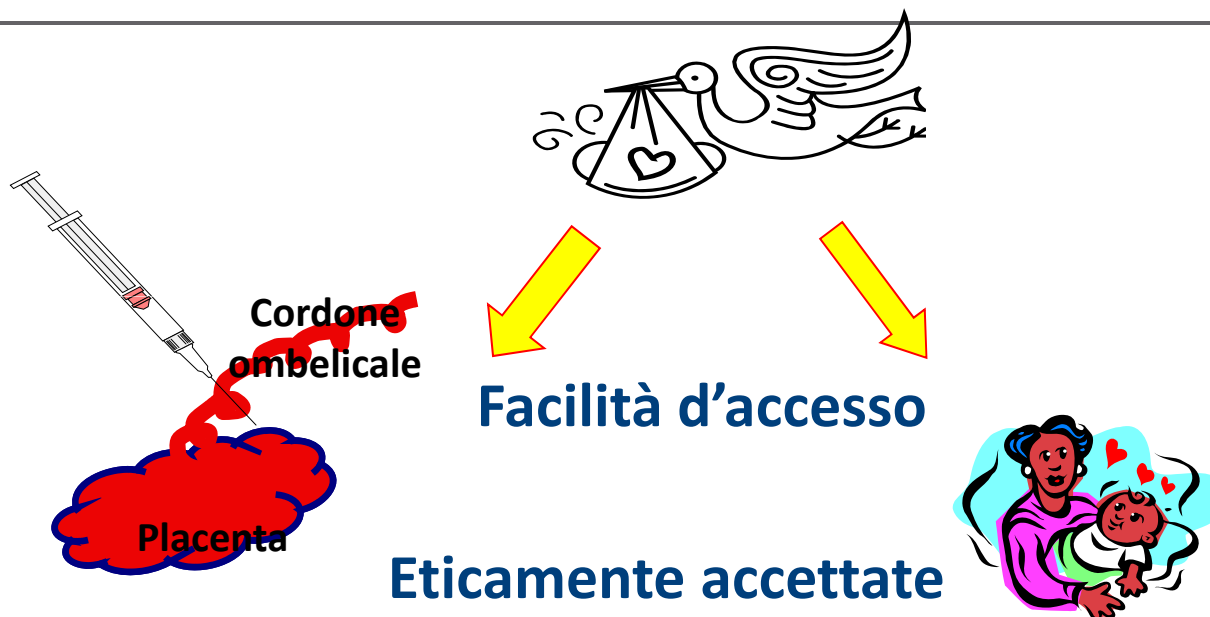
Tipi di cellule staminali	Caratteristiche e specificità
Cellule staminali embrionarie (4-5 giorni)	<ul style="list-style-type: none">• Sono Totipotenti• Altamente proliferative• Basso rischio di contaminazione ambientale e virale• Inconvenienti : Problemi di natura etica, riserva limitata, teratogenicità, ridotte esperienze cliniche
Cellule staminali fetali e neonatali 	<ul style="list-style-type: none">• Capacità dimostrata di differenziarsi in altri tipi di cellule (pluripotenti)• Immediatamente disponibili• Altamente proliferative• Immunologicamente immature• Basso rischio di contaminazione virale• 16 anni di esperienza clinica• Trapianti autologhi possibili• Basso rischio di rigetto in rapporto alle cellule adulte
Cellule staminali adulte	<ul style="list-style-type: none">• La più grande quantità di risultati clinici : 36 anni d'esperienza clinica• Inconvenienti : Rischio di rigetto (gvhd), prelievo più difficile e costoso, alta contaminazione ambientale

Cellule Staminali del Cordone

Sono i costituenti del sistema sanguigno e immunitario, e possono riprodursi in altri tipi di cellule, come ad esempio: cellule ossee, cardiache, muscolari, endoteliali



Cellule staminali del sangue del cordone ombelicale



>580 mila nascite annue in Italia

Cellule immature e « immuno-primitive »

Storia clinica et sperimentale: trapianto di midollo osseo

**IMPERATIVO:
NON GETTARLE!**



Perché conservare le staminali del Cordone?

High-efficiency recovery of functional hematopoietic progenitor and stem cells from human cord blood cryopreserved for 15 years.

Broxmeyer HE,

Department of Microbiology and Immunology, Walther Oncology Center, Indiana University School of Medicine, 1044 West Walnut Street, R4-302, Indianapolis, IN 46202, USA. hbroxmey@iupui.edu

Thus, immature human CB cells with high proliferative, replating, ex vivo expansion and mouse NODSCID engrafting ability can be stored frozen for >15 yr, can be efficiently retrieved, and most likely remain effective for clinical transplantation'.

Perché conservare le staminali del Cordone?

- L'uso delle cellule staminali prelevate dal Cordone Ombelicale e/o delle cellule staminali adulte in diverse terapie sta diventando sempre più importante nelle terapie mediche avanzate.
- Attualmente le terapie che utilizzano le cellule staminali sono diventate pratiche di routine per 85 malattie.
- Il bancaggio del sangue cordonale è una tecnologia consolidata:
 - Nel 2009 per la prima volta i trapianti con le cellule staminali da cordone hanno superato quelli da midollo osseo

EUROPE 2009

EBMT SURVEY ON TRANSPLANT ACTIVITY 2009

Report of the total number of patients transplanted in 2009 by indication.
 BM = bone marrow, PB = peripheral blood stem cells (includes cord blood transplants)
Table 1: first allogeneic and/or first autologous transplant per patient only

Number of teams: 469

Indication	NUMBER OF PATIENTS RECEIVING FIRST TRANSPLANTS ONLY IN 2009															Allo	Auto	Total	Allo after Auto
	allogeneic									autologous									
	HLA - id sib			family non - id			twin		unrelated										
	BM	PB	CB	BM	PB	CB	BM	PB	BM	PB	CB	BM	PB	CB					
AML 1st CR	155	792	2	9	49		2	5	116	556	60	17	295		1746	312	2058	6	
AML non 1st CR	63	321	1	14	70	2		1	86	634	89	5	48		1281	53	1334	17	
ALL 1st CR	114	333		3	18	1		1	118	326	52		56		966	56	1022	1	
ALL non 1st CR	96	158	8	8	43	1			100	185	75	3	32	1	674	36	710	6	
CML 1st cP	20	40			2				11	46	6		1		125	1	126		
CML non 1st cP	13	64		2	11			1	16	74	7	1			188	1	189		
MDS incl. Sec. AL	55	307	1	3	22			1	88	473	41	3	11		991	14	1005	17	
MPS	11	102	1	3	2				17	184	7		1		327	1	328		
CLL incl. PLL	10	96			6			2	10	173	13		29		310	29	339	9	
PCD - myeloma	17	196	1		13		1	4	21	209	6	11	5396	7	468	5414	5882	223	
PCD - other		12						1	2	2			191		17	191	208	8	
HD	9	105		1	13	1			18	105	9	18	1450	1	261	1469	1730	72	
NHL	37	315		6	22		1	4	51	372	27	22	4069	2	835	4093	4928	89	
Neuroblastoma	1	2			16				4	6		17	287		29	304	333	4	
Soft tissue	3	1			7					2		3	20		13	23	36	1	
Germ cell tumors		1										4	227		1	231	232	1	
Breast Ca.	1	1								1			63		3	63	66		
Ewing	1	2			5		1			1		10	178		10	188	198	5	
Renal Ca.													12			12	12		
Melanoma																			
Colon Ca.																			
Other solid tumors	1	2			5				3	6	1	3	214	1	18	218	236	1	
BM aplasia - SAA	104	135		12	12		1	3	65	66	13				411		411		
BM aplasia - other	29	21	2	4	6	1			21	23	7				114		114		
Hemo. - thalassemia	91	107	9	13	9		1		11	6	7				254		254		
Hemo. - other	23	9	3	10	5				3		1				54		54		
Prim. Immune deficie	69	19	7	24	36				56	37	47			2	295	2	297		
Inh. dis. of metabol.	22	4		9	5				26	11	28			1	105	1	106		
AI disease		4							2	2	1		94		9	94	103		
Others	11	6	1	2	2				5	18	7		13		52	13	65	1	
TOTAL	956	3155	36	123	379	6	7	23	850	3518	504	117	12687	15	9557	12819	22376	461	

Table 2: Allogeneic Transplants (non first)

	BM	PB	CB
Retransplants: allogeneic in 2009	98	571	37
Additional transplants: allogeneic in 2009	5	46	2

Table 3: Autologous Transplants (non first)

	BM	PB
Retransplants: autologous in 2009	5	758
Additional transplants: autologous in 2009	6	1093

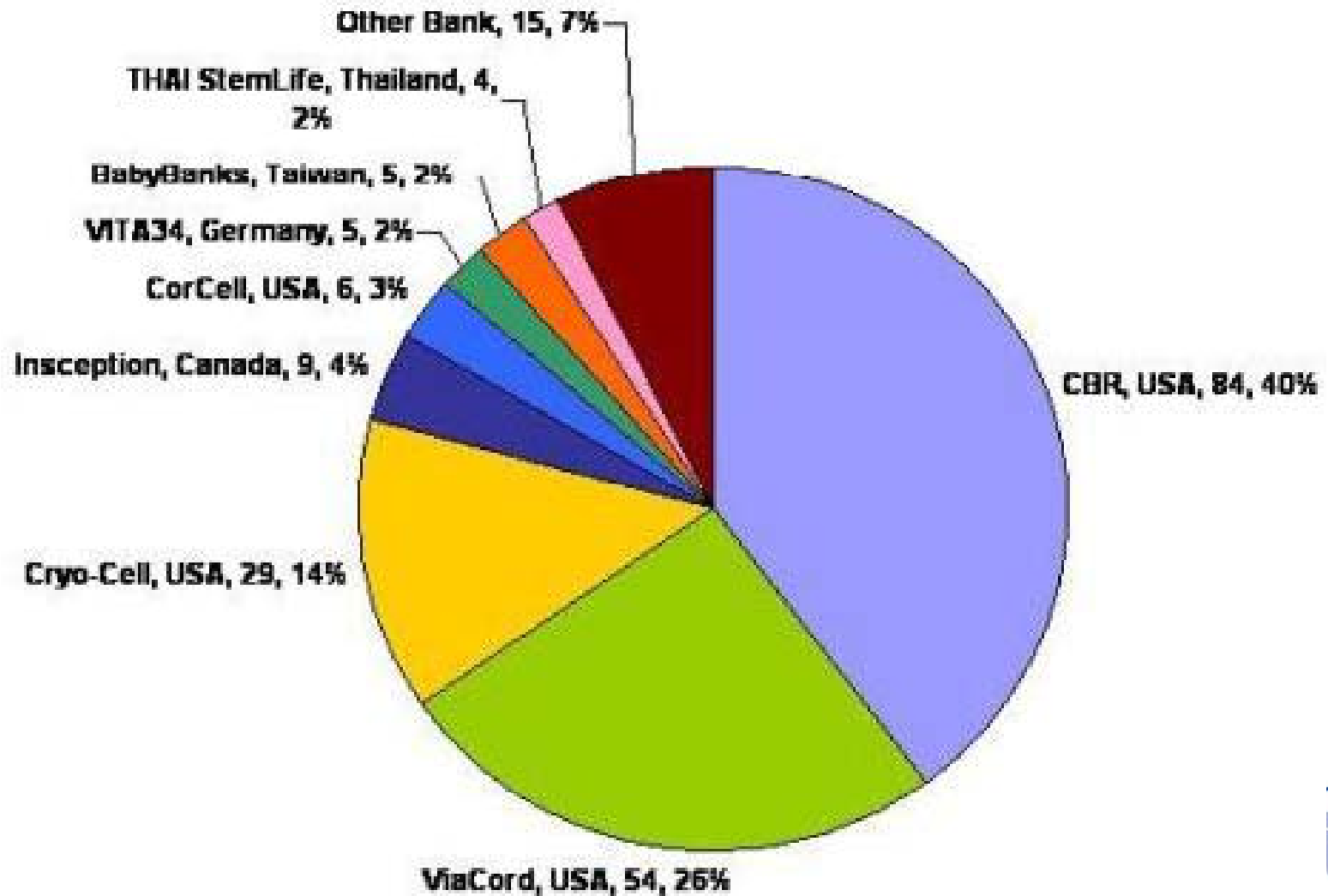
Table 4: General Information

	ALLO	AUTO
Cord Blood transplants in 2009	585	15
Reduced Intensity Conditioning transplants in 2009	3981	
Pat. receiving Donor Lymphocyte Infusions in 2009	1618	
Pat. receiving Mesenchymal stem cells (MSC) in 2009	259	8
Patients receiving Hematopoietic Stem Cells (HSC) for nonhematopoietic use in 2009		
cardiovascular	32	51
neurological	14	9
tissue repair	12	29

Table 5: Totals

Total No. of TRANSPLANTS in 2009	ALLO	AUTO	TOTAL
	10316	14681	24997

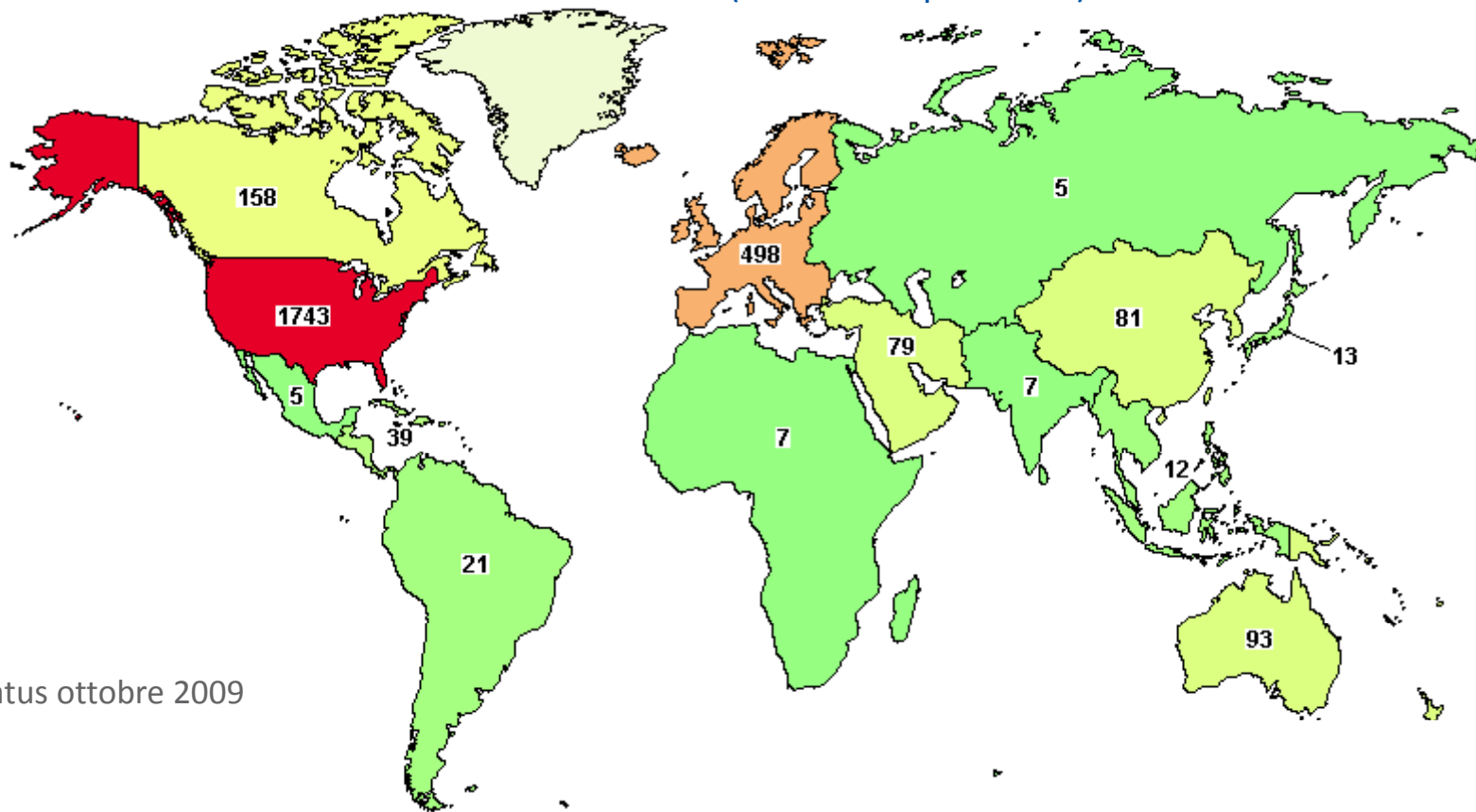
Trapianti Eseguiti



Le nuove frontiere della Medicina Rigenerativa

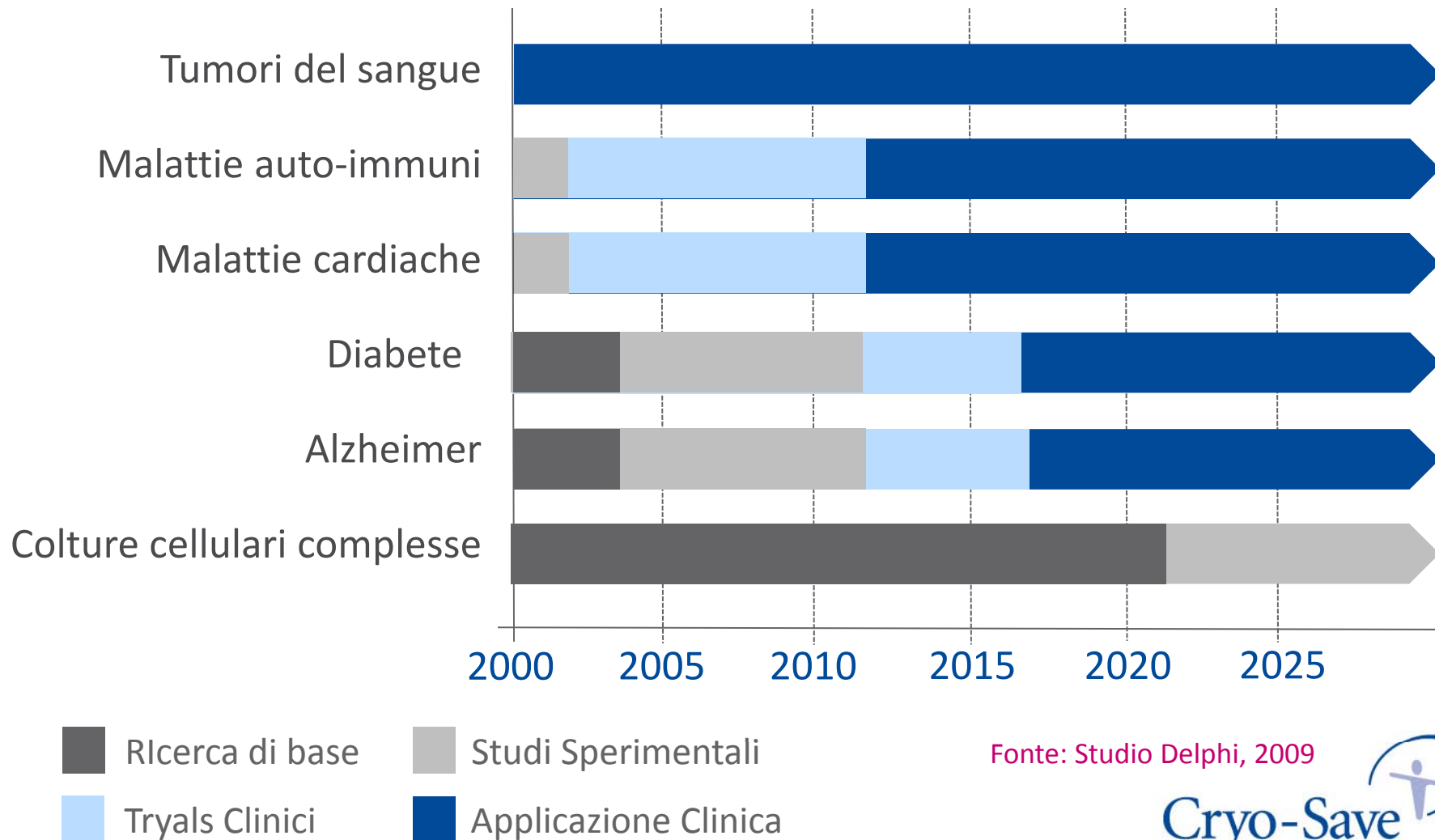
Le Cellule Staminali sono scientificamente un tema di **GRANDE** attualità

Ci sono **2.470** studi* nel mondo che utilizzano le **Cellule Staminali** (prelevate da diverse fonti) e **165** studi* sulle **Cellule Staminali Cordonali** (solo ematopoietiche)



*Status ottobre 2009

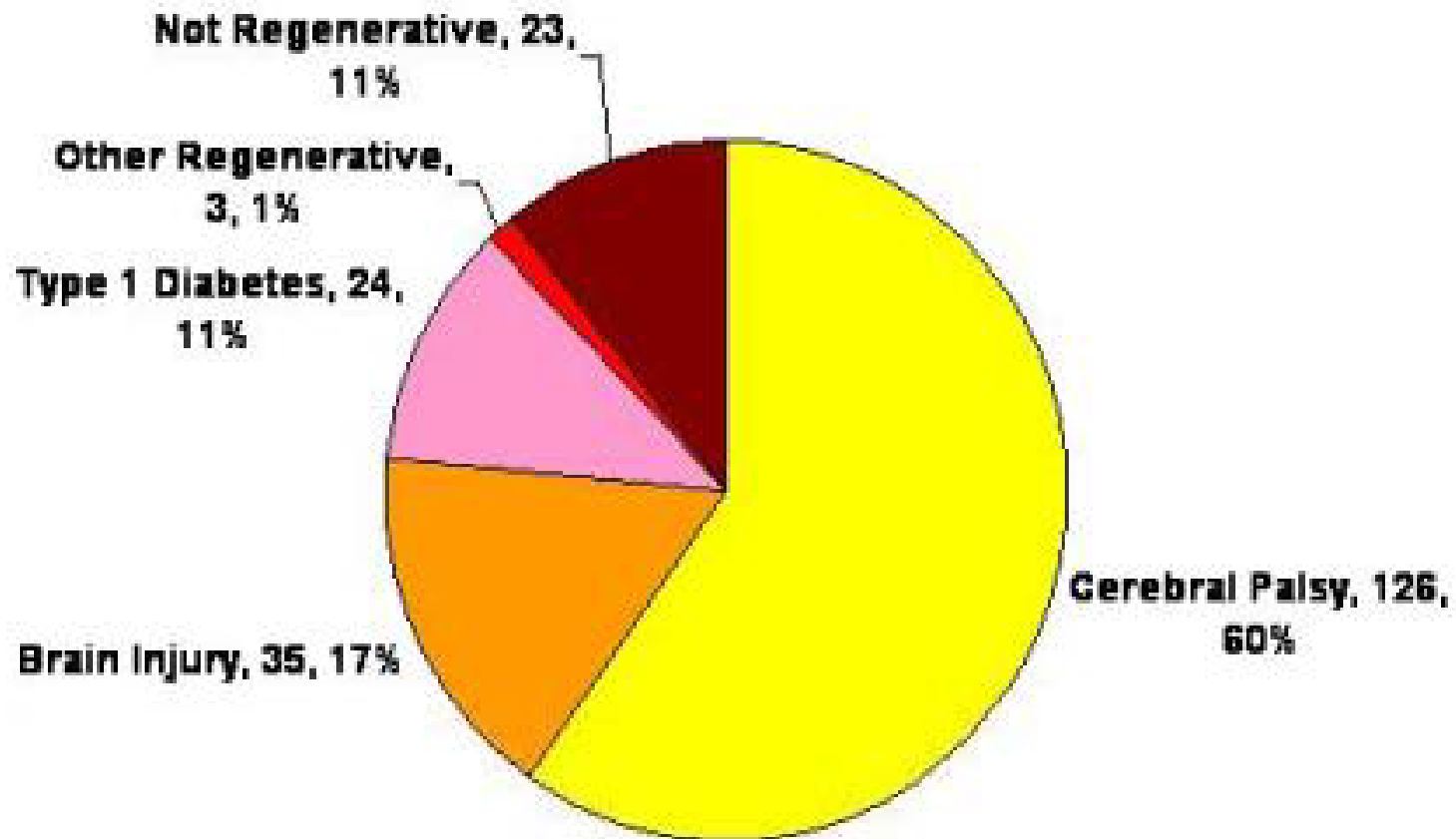
Stato dei trattamenti con Staminali



Fonte: Studio Delphi, 2009



Applicazioni Terapeutiche



Schmidt *et al*

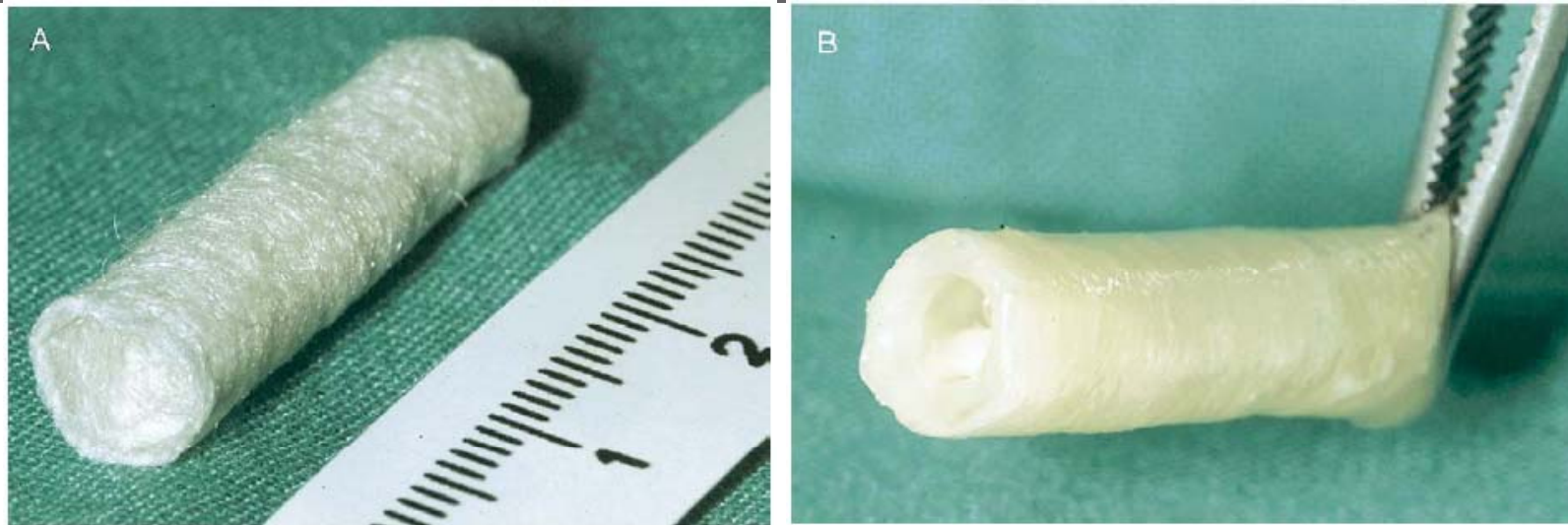


Fig 1. Macroscopic appearance of tissue-engineered blood vessels. Vascular scaffolds of 0.5 cm diameter and 3 cm length fabricated from nonwoven polyglycolic acid mesh and poly-4-hydroxybutyric acid before seeding (A) and after in vitro culturing (B). Tissue-engineered blood vessels were intact, pliable, and densely covered with cells (B). The lumen was open, and the wall thickness was homogeneous at about 0.3 cm.

Esempio di Medicina Rigenerativa

Attuale standard
di valvola cardiaca



Valvole cardiache biologiche
in fase di crescita



Le Valvole Cardiache Biologiche possono essere sviluppate da Cellule Staminali Mesenchimali che siano state espanse precedentemente in un Bioreattore.

Vantaggi: queste valvole cardiache crescono di dimensione insieme al corpo.

Bruno Dallapiccola: non c'è migliore donatore di sé stesso

L'ESPERIENZA ITALIANA E L'AUTOLOGO SOLIDALE



La situazione normativa italiana

- Dal 2001 in Italia viene reiterata dal Ministero della Salute una ordinanza che nel corso degli anni ha subito varie modificazioni la più importante delle quali nel 2005 in cui veniva regolamentata la possibilità dell'esportazione del campione per fini autologhi presso banche estere.
- Nel 2004 la Comunità Europea emana una Direttiva, la 23/CE nella quale viene sancito chiaramente che le cellule staminali da cordone ombelicale non fanno parte del sangue ma considerate al pari di tutte le altre cellule umane.
- Nel novembre del 2005 viene emanata una nuova legge sulla donazione del sangue e dei suoi derivati, la 219 in cui il legislatore sancisce che le cellule staminali da cordone ombelicale rientrano nella normativa sul sangue.

Le banche eterologhe

- La famiglia può decidere di donare le cellule staminali del cordone del loro bambino ad una banca pubblica. In Italia sulla carta ne esistono 18 (il 20% di tutte le banche mondiali) ma in realtà solo 2 sono accreditate FACT. Molte sono le difficoltà logistiche ed è impensabile raccogliere durante i week-end.
- Come con le banche di midollo osseo, le unità di sangue del cordone ombelicale sono disponibili solo per un uso pubblico. I dati relativi alla tipizzazione HLA sono disponibili su un sito web gestito dalle banche pubbliche che permette la ricerca di eventuali donatori compatibili anche se spesso i cordoni non vengono tipizzati.
- Il costo sociale per un Centro pubblico, per le spese iniziali, si aggira sui € 1.000 per unità immagazzinata. Nel caso di utilizzo del campione il costo sociale che viene pagato per ottenere il campione varia da € 15.000 a € 35.000 per unità

Le banche autologhe

- La famiglia del nascituro, legittimo proprietario delle cellule del suo cordone può decidere di conservare presso una Banca di conservazione delle cellule staminali (NBSC) per il neonato o l'altro membro di famiglia.
- La Banca provvede, in caso di bisogno, al rilascio immediato del campione conservato il cui trapianto non pone alcun tipo di problema relativo all'istocompatibilità.
- Nel caso di una terapia medica ed urgente, non c'è nessun bisogno di cercare donatori (a meno che l'unità non sia destinata ad un altro membro della famiglia) e il tempo necessario al trapianto stesso è ridotto.
- Il costo per la famiglia per la conservazione del Sangue del cordone prevede un costo di circa € 2.000, per un periodo di 20 anni.

Gli esempi internazionali: CORD:USE, leader nel campo della conservazione del sangue cordonale

- CORD:USE è una banca leader nella conservazione pubblica del sangue cordonale, che **consente ai genitori di donare** il sangue del cordone ombelicale dei loro neonati e **inserirlo in un registro pubblico** a disposizione dei pazienti che necessitano di un trapianto di sangue cordonale.
- Le unità di sangue cordonale di CORD:USE vengono utilizzate per eseguire trapianti in tutta la nazione e nel mondo.
- CORD:USE continuerà a svolgere la sua importante missione di aumento della quantità di campioni di alta qualità di sangue cordonale per i pazienti che necessitano di un trapianto offrendo nello stesso tempo ai futuri genitori anche **la possibilità di conservare privatamente** il sangue cordonale del loro bambino.
- Questo darà ai genitori la possibilità di scegliere **l'alternativa** migliore.

La situazione normativa italiana: Legge ‘Milleproroghe 2008’

E' prorogato al 30 giugno 2008 il termine di cui all'articolo 10, comma 3, della legge 21 ottobre 2005, n. 219, per la predisposizione, con decreto del Ministro della salute, di una Rete Nazionale di Banche per la conservazione di cordoni ombelicali:

“A tal fine, e per incrementare la disponibilità di cellule staminali del cordone ombelicale ai fini di trapianto, sono autorizzati la raccolta autologa, la conservazione e lo stoccaggio del cordone ombelicale da parte di strutture pubbliche e private autorizzate dalle Regioni e dalle Province autonome di Trento e di Bolzano, sentiti il Centro Nazionale Trapianti e il Centro Nazionale Sangue. La raccolta avviene senza oneri per il Servizio Sanitario Nazionale e previo consenso alla donazione per uso allogenico in caso di necessità per paziente compatibile.”

Il modello autologo solidale

- Soddisfa la vocazione solidaristica di molte famiglie italiane che considerano l'autologo come un atto egoistico

ma allo stesso tempo

- risponde alle criticità che si incontrano nel donare le cellule ad una banca pubblica:
 - sia per la difficoltà organizzativa oggettiva e per gli alti costi sociali attualmente non sostenibili
 - sia per la impossibilità futura all'utilizzo delle cellule staminali per il nascituro o per altri membri della famiglia per eventuali terapie future

Il modello autologo solidale

Una iniziativa che permetta alla famiglia di **sostenere il sociale** mettendo a disposizione, dopo la firma di un consenso informato, le cellule del proprio figlio, **senza perdere il diritto** di poterle utilizzare in caso di bisogno sia per il nascituro che per un membro della famiglia, in caso di bisogno.

I costi della **tipizzazione HLA** del campione vengono sostenuti dalla Banca Privata scelta dalla famiglia. I dati relativi alla tipizzazione del campione vengono gestiti on-line da una associazione No-Profit che li rende pubblici per la ricerca di eventuali donatori compatibili.

Il modello autologo solidale

- I costi della tipizzazione HLA del campione, circa € 200, vengono sostenuti dalla Banca Privata scelta dalla famiglia.
- I costi relativi al Servizio Autologo-Solidale sono gli stessi del Servizio Autologo.
- La sola differenza è, nel caso ci fosse necessità di quel campione e la famiglia decidesse di donarlo tutto o in parte, che si vedrebbe restituito l'intero importo pagato per la conservazione del campione stesso.
- Anche i costi sociali diminuiscono notevolmente dal momento che la Sanità pubblica non deve rimborsare le spese sostenute dai Centri che conservano e rilasciano le cellule da trapiantare, ma solo il costo di conservazione delle cellule realmente utilizzate.









**Grazie per la
vostra cortese
attenzione**

Prof. Stefano Grossi

Firenze 17-10-2010