



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112020020288-6 A2



(22) Data do Depósito: 04/04/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 12/01/2021

(54) **Título:** MÉTODOS PARA TRATAR UM PACIENTE COM PARALISIA CEREBRAL E UM PACIENTE COM ENCEFALOPATIA HIPÓXICO-ISQUÊMICA

(51) **Int. Cl.:** A61K 35/12; A61K 35/28; A61K 35/35; A61K 35/51; A61P 19/02; (...).

(30) **Prioridade Unionista:** 04/04/2018 US 62/652,818.

(71) **Depositante(es):** DUKE UNIVERSITY.

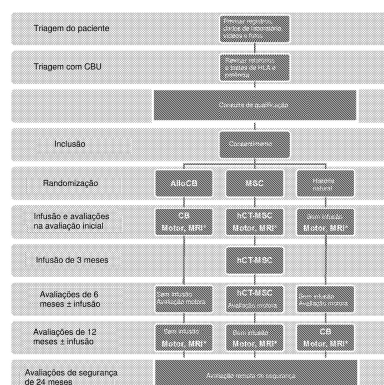
(72) **Inventor(es):** JOANNE KURTZBERG; JESSICA SUN; ALLEN SONG; CHARLES MICHAEL COTTEN.

(86) **Pedido PCT:** PCT US2019025796 de 04/04/2019

(87) **Publicação PCT:** WO 2019/195554 de 10/10/2019

(85) **Data da Fase Nacional:** 02/10/2020

(57) **Resumo:** A presente invenção refere-se aos métodos para tratar paralisia cerebral e encefalopatia hipóxico-isquêmica usando células estromais mesenquimais derivadas de tecido de sangue do cordão umbilical.



*A ressonância magnética será realizada em um subconjunto de indivíduos

MÉTODOS PARA TRATAR UM PACIENTE COM PARALISIA CEREBRAL E UM PACIENTE COM ENCEFALOPATIA HIPÓXICO-ISQUÊMICA

DECLARAÇÃO SOBRE PESQUISA OU DESENVOLVIMENTO PATROCINADA PELO GOVERNO FEDERAL

[001] Esta invenção foi feita com apoio do governo no âmbito do Programa *Clinical and Translational Science Award* (CTSA), prêmio número UL1TR002553, através do Centro Nacional de Avanço em Ciências Translacionais (NCATS), do Instituto Nacional de Saúde. O governo dos Estados Unidos possui determinados direitos sobre a invenção.

PRIORIDADE

[002] Este pedido reivindica o benefício do número de série provisório Norte-Americano 62/652.818, depositado em 4 de abril de 2018, que é incorporado na presente invenção por referência em sua totalidade.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Campo da Invenção

[003] A presente descrição se refere aos métodos de tratamento de paralisia cerebral e encefalopatia hipóxico-isquêmica (HIE). Mais particularmente, a presente descrição se refere aos métodos de uso de células estromais mesenquimais derivadas de tecido do sangue do cordão umbilical para tratar paralisia cerebral e HIE.

Descrição da Arte Relacionada

[004] Crianças com paralisia cerebral enfrentam uma vida inteira de incapacidade, resultando em enormes fardos físicos, emocionais e financeiros aos pacientes afetados, seus pais e à sociedade em geral. Tipicamente causada por uma lesão no útero ou perinatal no cérebro em desenvolvimento, a paralisia cerebral é o mais comum – e mais caro – distúrbio motor crônico da infância. A base do tratamento da paralisia cerebral compreende incontáveis horas de terapias físicas e ocupacionais que são inteiramente de suporte. Não

há tratamento disponível para reparar os danos cerebrais que causaram as deficiências. Assim, uma nova terapia que poderia promover a reparação do tecido cerebral danificado tem potencial para reduzir o fardo social e melhorar muito a sobrevivência, função e qualidade de vida de pacientes com paralisia cerebral.

[005] Durante o período intraparto, a liberação comprometida de oxigênio e fluxo sanguíneo para o cérebro fetal pode causar uma lesão cerebral significativa, que é clinicamente evidente nas primeiras horas pós-natal, descrita como encefalopatia hipóxico-isquêmica (HIE). A encefalopatia hipóxico-isquêmica de moderada a grave (HIE) pode levar à morte ou a prejuízos significativos de comprometimento de desenvolvimento neuronal (Kurinczuk et al., *Early Hum Dev.* 2010, 86(6):329-38; Lee et al., *Pediatr Res.* 2013, 74 (Suppl 1): 50–72). Ensaio clínico de resfriamento do corpo inteiro demonstraram ser seguros e eficazes, e a hipotermia terapêutica (TH) tornou-se padrão para recém-nascidos com HIE (ensaio de NICHD: Shankaran et al., *NEJM* 2005, 353(15):1574-1584; ensaio de TOBY: Azzopardi et al., *NEJM* 2009, 361(14):1349-1358; ensaio nEURO: Simbruner et al. *Pediatrics* 2010, 126(4):e771-778; ensaio de ICE: Jacobs et al., *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine* 2011, 165(8):692-700; declaração sumária do seminário sobre NICHD: Higgins et al., *J Pediatr.* 2011, 159(5): 851-858). Apesar da hipotermia, de um quarto a metade dos bebês tratados com hipotermia para encefalopatia moderada a grave morrem ou sobrevivem com deficiência neurológica (Higgins et al., *J Pediatr.* 2011, 159(5):851-858; Shankaran et al., *JAMA* 2014, 312(24):2629–2639). Os resultados compostos de estudos de hipotermia de corpo inteiro indicam uma redução no risco de morte ou comprometimento quando a hipotermia é iniciada nas primeiras 6 horas pós-natal e continua por 72 horas; no entanto, o efeito neuroprotetor é incompleto. Nesses estudos, de 44 a 51% dos bebês morreram ou sobreviveram com deficiência, de 24 a 38% dos bebês com HIE e que foram

resfriados morreram, e de 13 a 28% dos sobreviventes foram posteriormente diagnosticados com paralisia cerebral (Shankaran et al., *NEJM* 2005, 353(15):1574-1584; Azzopardi et al., *NEJM* 2009, 361(14):1349-1358; Simbruner et al. *Pediatrics* 2010, 126(4):e771-778; Jacobs et al., *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine* 2011, 165(8):692-700). Embora o resfriamento seja útil, os resultados desses ensaios proveem um forte incentivo para o desenvolvimento de terapias auxiliares.

[006] As células estromais mesenquimais (MSCs) são um grupo heterogêneo de células pluripotentes indiferenciadas que podem ser isoladas de vários tecidos diferentes, incluindo da medula óssea, tecido adiposo e tecidos de nascimento (tecido do cordão umbilical, placenta). Embora as MSCs possam dar origem a tipos de tecidos mesodérmicos, incluindo osso, cartilagem e gordura, acredita-se que seu mecanismo primário de ação resulte de efeitos imunomodulatórios e outros efeitos parácrinos. As MSCs demonstraram uma infinidade de efeitos imunomodulatórios nas respostas imunes humorais e mediadas pelas células. Estas incluem, mas não se limitam, a inibição das células B, T, NK e dendríticas, e proliferação das micróglia, diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias e bloqueio do recrutamento de neutrófilos. Além disso, inúmeros estudos pré-clínicos utilizando transplante de MSC para doenças do sistema nervoso central sugerem que as MSCs podem atuar através da liberação de diferentes fatores neurotróficos, anti-inflamatórios e antiapoptóticos para promover a recuperação da área lesada e evitar danos adicionais (Dori et al., *Histol Histopathol.* 2017, 32(10):1041-1055; Mueller et al., *Stem Cells Dev.* 2017, 26(4):239-248; Pishiutta et al., *Crit Care Med.* 2016, 44(11):e1118-e1131; Xie et al., *Med Sci Monit.* 2016, 22:3552-3561; Cameron et al., *Mol Cell Neurosci.* 2015, 68:56-72). Apesar de sua capacidade de modular a resposta imune, as próprias MSCs apresentam baixa imunogenicidade. As MSCs expressam baixos níveis de moléculas do MHC classe I sobre as suas

superfícies e não expressam MHC classe II nem várias moléculas coestimulatórias. Isso permite que as MSCs sejam usadas em um cenário alogênico através das barreiras HLA, sem a necessidade de compatibilidade de HLA entre doador e receptor. De fato, em uma revisão de 13 estudos em humanos da administração de MSC alogênica intravenosa, incluindo 1.012 pacientes na maioria adultos, não houve relatos de toxicidade infusional (Lalu et al., *PLoS One*. 2012, 7(10):e47559), apoiando a noção de que as MSCs são “imunoprivilegadas” e podem evitar o alorreconhecimento imunológico. Quando utilizadas como células terapêuticas, as MSCs exercem efeitos através da sinalização trófica. Estima-se que, após a infusão, as MSCs sobrevivam no receptor por até 4 meses. As MSCs não enxertam no receptor.

[007] Os atuais inventores e outros já demonstraram anteriormente que o sangue do cordão umbilical (CB) e as células estromais mesenquimais (MSCs) diminuem o impacto clínico e radiográfico da lesão cerebral causada por hipóxia e acidente vascular cerebral em modelos animais. As células do CB também se enxertam e diferenciam no cérebro, facilitando a reparação das células neurais, em modelos animais e pacientes humanos com erros inatos do metabolismo submetidos a transplante de CB de doador não relacionado alogênico. Os inventores acreditam que as células do CB ou MSCs derivadas do tecido do cordão umbilical humano (hCT-MS), agindo principalmente através de mecanismos parácrinos, poderiam servir como veículos para terapias celulares emergentes em pacientes com lesões cerebrais.

[008] Em estudos anteriores, os inventores realizaram estudos de segurança e um ensaio de fase II, randomizado, duplo cego e controlado por placebo de CB autólogo em crianças com paralisia cerebral. Nesse estudo, as crianças que foram infundidas com $\geq 2 \times 10^7$ células/kg apresentaram maior grau de melhoria motora do que as crianças que receberam doses mais baixas ou placebo. Esse estudo foi limitado pelo pequeno tamanho amostral, uma vez que muitas crianças com paralisia cerebral não possuem uma unidade de

sangue do cordão umbilical autóloga em banco e pela inclusão de crianças de 1 a 2 anos de idade para as quais a análise da pontuação de alterações motoras previstas não pôde ser realizado. Os inventores também realizaram um estudo de segurança de fase I da infusão de CB em irmãos em 15 pacientes com paralisia cerebral, indicando que a infusão alogênica de CB com HLA parcialmente compatível é segura nesta população de pacientes.

[009] Em modelos animais neonatais de HIE, as infusões de células sanguíneas do cordão umbilical nucleadas humanas com volume e número de hemácias reduzidos (células do sangue do cordão umbilical (CB) humano), resultou em melhora anatômica e funcional. Os modelos animais de lesão hipóxico-isquêmica neonatal indicam que o mecanismo parece ser parácrino, com aumentos nos níveis de fatores neurotróficos e anti-inflamatórios no cérebro (Rosenkranz K and Meier C., *Annals of Anat* 2011, 193:371-379; Tsuji et al., *Neuroscience* 2014, 263:148-158; Drobyshevsky et al., *Dev Neurosci.* 2015, 37(4-5):349-62). Em estudos anteriores, os inventores relataram os desfechos de bebês inscritos em um ensaio de fase I de células autólogas apoiado pelo CTSI. Nesse estudo, e em um estudo de fase II, o sangue do cordão umbilical é coletado e o número de hemácias e o seu volume são reduzidos. Na fase II, duas doses de células ou placebo são infundidas nas primeiras 48 horas pós-parto. Na fase I, 51 bebês receberam células. Dois bebês morreram (após alta hospitalar). Vinte e cinco (64%) dos 39 bebês com desfechos conhecidos sobreviveram com um ano de pontuações de desenvolvimento > 85, o que se compara favoravelmente com os ensaios de hipotermia em que aproximadamente 50% dos bebês resfriados sobreviveram sem prejuízo moderado ou grave (Higgins et al., *J Pediatr.* 2011, 159(5): 851-858). No entanto, um desafio à generalização dos ensaios clínicos e ao uso futuro potencial de células do sangue do cordão umbilical para recém-nascidos com HIE tornou-se evidente: a coleta de células sanguíneas do cordão umbilical em partos difíceis. Coletar sangue do cordão

umbilical não faz parte da rotina na maioria das instituições. Ter um produto à base de células alogênicas pronto para uso possibilitaria uma intervenção celular prontamente disponível para bebês recém-nascidos com HIE moderada a grave que não tiveram sangue do cordão umbilical coletado.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0010] A presente invenção oferece um método de tratamento de pacientes com paralisia cerebral ou HIE através da administração de células estromais mesenquimais derivadas de tecido do cordão umbilical humano alogênicas (hCT-MSCs). A presente invenção provê o benefício de eliminar a restrição de ter uma unidade de CB autóloga.

[0011] Em um aspecto a presente invenção compreende um método para tratar um paciente com paralisia cerebral, que compreende administrar uma quantidade terapêuticamente eficaz de células estromais mesenquimais derivadas de cordão umbilical humano alogênico (hCT-MSCs) ao paciente. Em certas modalidades deste aspecto da invenção, as hCT-MSCs são administradas sistemicamente. Em certas modalidades, elas são administradas por via intravenosa. Em algumas modalidades deste aspecto da invenção, são administradas hCT-MSCs três vezes em um período de seis meses ao paciente. Em certas modalidades, a administração ocorre na avaliação inicial, em três meses e em seis meses. Em outras modalidades deste aspecto da invenção, ao paciente são administradas hCT-MSCs a uma dose de pelo menos cerca de 2×10^6 células/kg.

[0012] Em um aspecto adicional, a presente invenção compreende um método para tratar um paciente com HIE, que compreende administrar uma quantidade terapêuticamente eficaz de células estromais mesenquimais derivadas de cordão umbilical humano alogênico (hCT-MSCs) ao paciente. Em certas modalidades deste aspecto da invenção, as hCT-MSCs são administradas sistemicamente. Em certas modalidades, elas são administradas por via intravenosa. Em algumas modalidades deste aspecto da invenção, são

administradas hCT-MSCs três vezes em um período de seis meses ao paciente. Em certas modalidades, a administração ocorre na avaliação inicial, em três meses e em seis meses. Em outras modalidades deste aspecto da invenção, ao paciente são administradas hCT-MSCs a uma dose de pelo menos cerca de 2×10^6 células/kg.

[0013] Ainda em um aspecto adicional, a presente invenção compreende um método para tratar um paciente com HIE, que compreende administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de células estromais mesenquimais derivadas de cordão umbilical humano alogênico (hCT-MSCs) ao paciente. Em certas modalidades deste aspecto da invenção, o paciente com HIE é um recém-nascido com 36 semanas de gestação ou mais, que sofre de encefalopatia neonatal hipóxico-isquêmica moderada a grave. Em certas modalidades deste aspecto da invenção, as hCT-MSCs são administradas sistemicamente. Em certas modalidades, elas são administradas por via intravenosa. Em algumas modalidades deste aspecto da invenção, são administradas hCT-MSCs em uma única dose nas primeiras 48 horas pós-natal ao paciente. Em algumas modalidades desse aspecto da invenção, são administradas duas doses de hCT-MSCs ao paciente. Em certas modalidades em que o paciente recebe duas doses, a primeira dose é dada nas primeiras 48 horas pós-parto, e a segunda dose é dada aproximadamente dois meses após a primeira dose. Em outras modalidades deste aspecto da invenção, ao paciente são administradas hCT-MSCs a uma dose de pelo menos cerca de 2×10^6 células/kg. Em certas modalidades deste aspecto da invenção, as hCT-MSCs são administradas juntamente com a hipotermia terapêutica.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0014] A Figura 1 é um fluxograma que resume o ensaio da Fase I/II para determinar o tamanho do efeito da alteração na pontuação GMFM-66 em indivíduos tratados com hCT-MSC em comparação com o CB alogênico.

[0015] A Figura 2 é um fluxograma que resume o estudo de fase I da

hCT-MSK, um produto celular estromal mesenquimal derivado do cordão umbilical, em bebês recém-nascidos com encefalopatia neonatal hipóxico-isquêmica moderada ou grave.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0016] Antes dos processos e materiais verificados serem descritos, deve-se entender que os aspectos aqui descritos não se limitam às modalidades, aparelhos ou configurações específicas, os quais podem, naturalmente, variar. Também deve ser compreendido que a terminologia utilizada nesse documento tem apenas o propósito de descrever aspectos particulares, a menos que seja definido especificamente na presente invenção, e não se destina a ser limitativo.

[0017] Deve-se também entender que, a menos que seja claramente indicado de outra forma pelo contexto, as modalidades descritas para um aspecto ou modalidade da invenção também podem ser usadas em outros aspectos ou modalidades da invenção, e/ou em combinação com as modalidades descritas nos mesmos ou em outros aspectos da invenção. Assim, a descrição pretende incluir, e a invenção inclui tais combinações, mesmo quando elas não foram explicitamente definidas.

Definições

[0018] Para fins de promoção da compreensão dos princípios da presente descrição, será agora feita referência às modalidades particulares, e uma linguagem específica será usada para descrevê-las. Entende-se, no entanto, que não se pretende limitar o escopo da descrição por qualquer maneira, sendo tais alterações e modificações adicionais da descrição, aqui ilustradas, contempladas como normalmente seria compreendido por um versado na técnica a quem a descrição se relaciona.

[0019] Ao longo desse relatório descritivo, a menos que o contexto claramente especifique de outra forma, as palavras “compreende” e “inclui”, e variações (por exemplo, “compreendem”, “compreendendo”, “incluem” ou

incluindo”) serão compreendidas como indicando a inclusão de um componente, recurso, elemento ou etapa ou grupo de componentes, recursos, elementos ou etapas, mas não a exclusão de qualquer outro número inteiro ou etapa ou grupo de números inteiros ou etapas.

[0020] Conforme usado no relatório descritivo e nas reivindicações anexas, as formas no singular “um”, “uma” e “o/a” incluem referências no plural, a menos que o contexto claramente estabeleça de outra forma.

[0021] “Cerca de” é usado para prover flexibilidade a um parâmetro de faixa numérica, desde que um determinado valor possa estar “ligeiramente acima” ou “ligeiramente abaixo” do parâmetro sem afetar o resultado desejado.

[0022] A citação de faixas de valores destina-se meramente a servir como um método de abreviação de referência individual a cada valor separado dentro da faixa, salvo indicação em contrário neste documento, e cada valor separado é incorporado no relatório descritivo como se ele fosse individualmente citado neste documento. A citação também se destina a referir-se individualmente a cada subfaixa que se enquadra na faixa mais ampla citada, e cada subfaixa separada é incorporado no relatório descritivo como se fosse citada individualmente na presente invenção. Por exemplo, se uma faixa for declarada como de 1% a 50%, pretende-se que valores como 2% a 40%, 10% a 30%, ou 1% a 3% etc., e valores como 2%, 10%, 30%, 40% e 50% etc. sejam expressamente enumerados neste relatório descritivo. Estes são apenas exemplos do que é especificamente pretendido, e todos os números possíveis, e combinações de valores numéricos entre e incluindo o valor menor e o maior valor enumerados devem ser considerados para serem expressamente declarados nesta descrição.

[0023] Conforme utilizado na presente invenção, “tratamento”, “terapia” e/ou “regime terapêutico” se referem à intervenção clínica feita em resposta a uma doença, distúrbio ou condição fisiológica manifestada por um

paciente ou a qual um paciente pode ser suscetível. O objetivo do tratamento inclui o alívio ou a prevenção de sintomas, retardo ou interrupção da progressão ou agravamento de uma doença, distúrbio ou condição, e/ou a remissão da doença, distúrbio ou condição. Em algumas modalidades, a doença compreende paralisia cerebral. Em outras modalidades, a doença compreende encefalopatia hipóxico-isquêmica.

[0024] O termo “quantidade eficaz” ou “quantidade terapeuticamente eficaz” se refere a uma quantidade suficiente para causar resultados biológicos e/ou clínicos benéficos ou desejáveis.

[0025] Conforme utilizado na presente invenção, os termos “indivíduo” e “paciente” são usados de modo intercambiável na presente invenção e se referem a animais humanos e não humanos. O termo “animais não humanos” da descrição inclui todos os vertebrados, por exemplo, mamíferos e não mamíferos, como primatas não humanos, ovelhas, cães, gatos, cavalos, vacas, galinhas, anfíbios, répteis e similares. De preferência, o indivíduo é um paciente humano que tem, ou está sofrendo de paralisia cerebral ou uma lesão cerebral hipóxico-isquêmica.

[0026] Conforme utilizado na presente invenção, o termo “doença” se refere a qualquer condição anormal, como um distúrbio ou uma estrutura ou função que afeta parte ou a totalidade de um indivíduo. Em algumas modalidades, a doença compreende um distúrbio neurológico. Em certas modalidades, o distúrbio neurológico compreende paralisia cerebral; em outras modalidades, o distúrbio neurológico compreende uma lesão cerebral hipóxico-isquêmica.

[0027] Conforme utilizado na presente invenção, o termo “paralisia cerebral” (CP) se refere a qualquer um de uma série de distúrbios neurológicos que aparecem na infância ou na primeira infância e afetam permanentemente o movimento do corpo e a coordenação muscular, mas não pioram com o tempo. Embora a paralisia cerebral afete o movimento

muscular, ela não é causada por problemas nos músculos ou nervos, mas sim por anormalidades em partes do cérebro que controlam os movimentos musculares. A maioria das crianças com paralisia cerebral nasce com ela, ou a desenvolve como resultado de uma lesão cerebral associada ao processo de parto ou no período neonatal (por exemplo, encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal), embora ela não possa ser detectada até meses ou anos depois. Os primeiros sinais de paralisia cerebral geralmente aparecem antes de uma criança chegar aos 3 anos de idade. Os mais comuns são falta de coordenação muscular na realização de movimentos voluntários (ataxia); músculos rígidos ou tensionados e reflexos exagerados (espasticidade); andar com um pé ou perna arrastando; andar sobre os dedos dos pés, caminhar de cócoras ou caminhar com movimento de tesoura; e tônus muscular que é muito rígido ou muito frouxo.

[0028] Conforme utilizado na presente invenção, o termo “encefalopatia hipóxico-isquêmica” (HIE) se refere à lesão cerebral que resulta da liberação comprometida de oxigênio e fluxo sanguíneo para o cérebro fetal durante o período intraparto. A HIE neonatal moderada a grave pode levar à morte ou causar prejuízo significativo de comprometimento de desenvolvimento.

[0029] A menos que seja definido de outra forma, todos os termos técnicos utilizados neste documento têm os mesmos significados como comumente compreendidos por um técnico no assunto, para a qual essa descrição pertence.

Tratamento de paralisia cerebral ou encefalopatia hipóxico-isquêmica

[0030] Tendo em vista a presente descrição, os métodos aqui descritos podem ser configurados pelo técnico no assunto para atender à necessidade desejada. Em geral, os materiais, métodos e aparelhos descritos proveem métodos de tratamento de um indivíduo com paralisia cerebral ou HIE compreendendo, consistindo em ou consistindo essencialmente em

administrar ao indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz de hCT-MSCs e/ou um componente ou mistura de componentes dos mesmos, de modo a tratar a paralisia cerebral ou HIE.

[0031] Deve-se entender que, conforme utilizado na presente invenção, e salvo indicação em contrário, o termo “hCT-MSCs” tem o propósito de abranger qualquer formato e/ou um componente ou mistura de componentes dos mesmos, sejam especificamente assim declarados ou não.

[0032] O paciente pode ser qualquer animal humano ou não humano. Em uma modalidade, o paciente é um ser humano. Em outra modalidade, o paciente é uma criança humana menor de 18 anos de idade, ou com em qualquer faixa etária que esteja dentro dessa faixa etária mais ampla. Em exemplos não limitativos, o paciente pode ser um recém-nascido, um bebê de 1 a 12 meses de idade, de 1 mês a 2 anos de idade, de 1 ano a 18 anos de idade, de 1 ano a 17 anos de idade, de 1 ano a 16 anos de idade, de 1 ano a 15 anos de idade, de 1 ano a 14 anos de idade, de 1 ano a 13 anos de idade, de 1 ano a 12 anos de idade, de 1 ano a 11 anos de idade, de 1 ano a 10 anos de idade, de 1 ano a 9 anos de idade, de 1 ano a 8 anos de idade, de 1 ano a 7 anos de idade, de 1 ano a 6 anos de idade, de 1 ano a 5 anos de idade, de 1 ano a 4 anos de idade, de 1 ano a 3 anos de idade, de 1 ano a 2 anos de idade, de 2 anos a 18 anos de idade, de 2 anos a 17 anos de idade, de 2 anos a 16 anos de idade, de 2 anos a 15 anos de idade, de 2 anos a 14 anos de idade, de 2 anos a 13 anos de idade, de 2 anos a 12 anos de idade, de 2 anos a 11 anos de idade, de 2 anos a 10 anos de idade, de 2 anos a 9 anos de idade, de 2 anos a 8 anos de idade, de 2 anos a 7 anos de idade, de 2 anos a 6 anos de idade, de 2 anos a 5 anos de idade, de 2 anos a 4 anos de idade, de 2 anos a 3 anos de idade, de 3 anos a 18 anos de idade, de 3 anos a 17 anos de idade, de 3 anos a 16 anos de idade, de 3 anos a 15 anos de idade, de 3 anos a 14 anos de idade, de 3 anos a 13 anos de idade, de 3 anos a 12 anos de idade, de 3 anos a 11 anos de idade, de 3 anos a 10 anos de idade, de 3 anos a 9 anos de idade, de 3 anos a 8 anos

de idade, de 3 anos a 7 anos de idade, de 3 anos a 6 anos de idade, de 3 anos a 5 anos de idade, de 3 anos a 4 anos de idade, de 4 anos a 18 anos de idade, de 4 anos a 17 anos de idade, de 4 anos a 16 anos de idade, de 4 anos a 15 anos de idade, de 4 anos a 14 anos de idade, de 4 anos a 13 anos de idade, de 4 anos a 12 anos de idade, de 4 anos a 11 anos de idade, de 4 anos a 10 anos de idade, de 4 anos a 9 anos de idade, de 4 anos a 8 anos de idade, de 4 anos a 7 anos de idade, de 4 anos a 6 anos de idade, de 4 anos a 5 anos de idade, de 5 anos a 18 anos de idade, de 5 anos a 17 anos de idade, de 5 anos a 16 anos de idade, de 5 anos a 15 anos de idade, de 5 anos a 14 anos de idade, de 5 anos a 13 anos de idade, de 5 anos a 12 anos de idade, de 5 anos a 11 anos de idade, de 5 anos a 10 anos de idade, de 5 anos a 9 anos de idade, de 5 anos a 8 anos de idade, de 5 anos a 7 anos de idade, de 5 anos a 6 anos de idade, de 6 anos a 18 anos de idade, de 6 anos a 17 anos de idade, de 6 anos a 16 anos de idade, de 6 anos a 15 anos de idade, de 6 anos a 14 anos de idade, de 6 anos a 13 anos de idade, de 6 anos a 12 anos de idade, de 6 anos a 11 anos de idade, de 6 anos a 10 anos de idade, de 6 anos a 9 anos de idade, de 6 anos a 8 anos de idade, de 6 anos a 7 anos de idade, de 7 anos a 18 anos de idade, de 7 anos a 17 anos de idade, de 7 anos a 16 anos de idade, de 7 anos a 15 anos de idade, de 7 anos a 14 anos de idade, de 7 anos a 13 anos de idade, de 7 anos a 12 anos de idade, de 7 anos a 11 anos de idade, de 7 anos a 10 anos de idade, de 7 anos a 9 anos de idade ou 7 anos a 8 anos de idade.

[0033] Em algumas modalidades, o paciente é um ser humano de até cerca de 45 anos de idade, ou em qualquer faixa etária que esteja dentro da faixa etária mais ampla de cerca de 1 ano a cerca de 45 anos de idade. Por exemplo, de cerca de 18 a cerca de 45 anos de idade, de cerca de 20 a cerca de 45 anos de idade, de cerca de 25 a cerca de 45 anos de idade, de cerca de 30 a cerca de 45 anos de idade, de cerca de 35 a cerca de 45 anos de idade ou de cerca de 40 a cerca de 45 anos de idade. Em certas modalidades, o paciente é um ser humano de qualquer idade entre 1 e 45 anos de idade. Por exemplo,

com 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 ou 45 anos de idade.

[0034] Em algumas modalidades, o paciente é um ser humano de até cerca de 90 anos de idade, ou em qualquer faixa etária que esteja dentro da faixa etária mais ampla de cerca de 1 ano de idade a cerca de 90 anos de idade. Por exemplo, de cerca de 18 a cerca de 90 anos de idade, de cerca de 20 a cerca de 90 anos de idade, de cerca de 45 a cerca de 90 anos de idade ou de cerca de 60 a cerca de 90 anos de idade. Em certas modalidades, o paciente é um ser humano de qualquer idade com valor entre 45 e 90 anos, mesmo que não seja especificamente enumerado na presente invenção, como por exemplo, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 ou 90 anos.

[0035] Em certas modalidades, o paciente é um recém-nascido de 36 semanas de gestação ou mais, de 37 semanas de gestação ou mais, de 38 semanas de gestação ou mais, de 39 semanas de gestação ou mais, ou de 40 semanas de gestação ou mais.

[0036] As hCT-MSCs podem ser administradas a um indivíduo por qualquer técnica conhecida na arte, incluindo administração local ou sistêmica. As vias de administração incluem, mas não se limitam, a injeção ou implante subcutâneo, intracutâneo, intramuscular, intraperitoneal, intravenoso, intratecal, intracerebral, intraventricular ou epidural; administração tópica; intratraqueal; e administração intranasal. As hCT-MSCs podem ser administradas por técnicas de infusão. Normalmente, infusão significa que as hCT-MSCs são administradas por via intravenosa ou subcutânea. Em algumas modalidades, as hCT-MSCs são administradas sistemicamente. Em outras modalidades, as hCT-MSCs são administradas por injeção intravenosa.

Preparação de hCT-MSCs

[0037] As células estromais mesenquimais derivadas de cordão

umbilical humano alogênico podem ser preparadas, preservadas e preparadas para a administração por quaisquer métodos conhecidos na técnica. Em alguns casos, as hCT-MSCs podem ser preparadas em uma sala limpa cortando tecido do cordão umbilical em pedaços e picando e digerindo com hialuronidase, DNase, colagenase e papaína. A suspensão celular resultante pode, em seguida, ser plaqueada em cultura, cultivada até a confluência para estabelecer a cultura P0, e criopreservada. As culturas P1 e P2 podem ser cultivadas em condições semelhantes e removidas do material de cultivo. O produto final pode ser derivado das culturas P2, que são coletadas em plasmalite com albumina de soro humano a 5%, lavadas e criopreservadas em criobolsas compartimentadas contendo 50 a 100 milhões de células em uma concentração final de 10% de DMSO com dextrana. No dia da administração, um compartimento pode ser descongelado, diluído em 10 a 40 ml de solução IV de plasmalite, colocado em uma seringa ou bolsa e transportado para o leito para administração.

Administração de hCT-MSCs

[0038] A via de administração do sangue do cordão umbilical pode ser selecionada por um versado na técnica com base nas doenças tratadas e nos resultados desejados. Assim, em certas modalidades, as hCT-MSCs são administradas através de infusão intravenosa periférica (IV).

[0039] Em algumas modalidades, as hCT-MSCs podem ser administradas como uma única dose. Em certas modalidades, as hCT-MSCs podem ser administradas em múltiplas doses (por exemplo, duas, três ou quatro ou mais doses únicas por tratamento) durante um período de tempo (por exemplo, de dias ou meses). Em alguns casos, o paciente pode receber hCT-MSCs três vezes, e em alguns casos, três vezes em um período de seis meses. Em certos casos, a administração pode ser feita na avaliação inicial, em três meses e em seis meses. Em certos casos, a administração pode ser feita na avaliação inicial, em dois meses e em quatro meses. Um versado na

técnica será capaz de derivar variâncias no protocolo de dosagem, conforme aqui previsto, e entender que tais variâncias são englobadas pela presente invenção.

[0040] Em alguns casos, para um paciente recém-nascido com HIE, o paciente pode ser administrado com hCT-MSCs uma vez, ou o paciente pode ser administrado com hCT-MSCs duas vezes. Em alguns casos, o recém-nascido pode ser administrado hCT-MSCs três vezes ou mais. Em certos casos, uma primeira dose é administrada nas primeiras 48 horas pós-parto. Em certos casos onde uma segunda dose é administrada, a primeira dose é dada nas primeiras 48 horas pós-parto, e a segunda dose é dada aproximadamente dois meses após a primeira dose. Um versado na técnica será capaz de derivar variâncias no protocolo de dosagem, conforme aqui previsto, e entender que tais variâncias são englobadas pela presente invenção.

[0041] Antes da administração das hCT-MSCs, o paciente pode ser pré-medicado, conforme apropriado, por exemplo, com um anti-histamínico e/ou um esteroide.

[0042] Quando administradas por via intravenosa, as hCT-MSCs podem ser administradas durante um período de tempo que varia de 20 minutos a cerca de 75 minutos, por exemplo, durante cerca de 20 minutos a cerca de 60 minutos, ou durante cerca de 20 minutos a cerca de 50 minutos, ou durante cerca de 20 minutos a cerca de 40 minutos, ou durante cerca de 20 minutos a cerca de 30 minutos, ou durante cerca de 25 minutos a cerca de 70 minutos, ou durante cerca de 25 minutos a cerca de 60 minutos, ou durante cerca de 25 minutos a cerca de 50 minutos, ou durante cerca de 25 minutos a cerca de 40 minutos, ou durante cerca de 30 minutos a cerca de 70 minutos, ou durante cerca de 30 minutos a cerca de 60 minutos, ou durante cerca de 30 minutos a cerca de 50 minutos, ou durante cerca de 30 minutos a cerca de 40 minutos. Em algumas modalidades, a dose é administrada durante 30 minutos.

[0043] Um versado na técnica será capaz de derivar um regime de dosagem adequado para a invenção. Em algumas modalidades, uma dose terapeuticamente eficaz das hCT-MSCs compreende uma dose de cerca de 1×10^6 a cerca de 6×10^6 células/kg de peso do paciente, por exemplo, de cerca de 1×10^6 a cerca de 3×10^6 células/kg, de cerca de 1×10^6 a cerca de $2,5 \times 10^6$ células/kg, de cerca de $1,5 \times 10^6$ a cerca de 3×10^6 células/kg ou de cerca de $1,5 \times 10^6$ a cerca de $2,5 \times 10^6$ células/kg. Em alguns casos, as hCT-MSCs podem ser administradas a uma dose de pelo menos 2×10^6 células/kg de peso do paciente.

[0044] Um versado na técnica reconhecerá que o volume adequado da dose pode ser selecionado com base na via de aplicação desejada. Por exemplo, a administração intravenosa pode usar volumes de dose na faixa de cerca de 5 ml a cerca de 50 ml; por exemplo, de cerca de 5 ml a cerca de 40 ml, ou de cerca de 5 ml a cerca de 30 ml, ou de cerca de 5 ml a cerca de 20 ml, ou de cerca de 5 ml a cerca de 15 ml, ou de cerca de 10 ml a cerca de 40 ml, ou de cerca de 10 ml a cerca de 30 ml, ou de cerca de 10 ml a cerca de 20 ml, ou de cerca de 10 ml a cerca de 15 ml, ou de cerca de 20 ml a cerca de 50 ml, ou de cerca de 20 ml a cerca de 40 ml, ou de cerca de 20 ml a cerca de 30 ml, ou de cerca de 30 ml a cerca de 50 ml, ou de cerca de 30 ml a cerca de 40 ml, ou de cerca de 40 ml a cerca de 50 ml.

[0045] Em certas modalidades, as hCT-MSCs são administradas por infusão de 3 doses de 2×10^6 células/kg de peso corporal, sendo cada infusão administrada, por exemplo, com três meses de diferença, por exemplo, uma primeira dose na avaliação inicial, uma segunda dose em 3 meses, e uma dose de 3ª dose em 6 meses. Em outras modalidades, as hCT-MSCs são administradas pela infusão de 2 doses de 2×10^6 células/kg de peso corporal, uma ao nascer (isto é, nas primeiras 48 horas pós-parto) e uma segunda dose aos 2 meses.

[0046] Quando a administração IV periférica é usada, os fluidos IV

podem ser administrados em cerca de 1,0 a cerca de 2,0 vezes a dose de manutenção. Por exemplo, os fluidos IV podem ser administrados após a infusão em cerca de 1,0 a cerca de 1,5 vez a dose de manutenção, ou de cerca de 1,5 a cerca de 2,0 vezes a dose de manutenção. Os fluidos IV de manutenção podem ser administrados por cerca de 30 minutos a cerca de 60 minutos após a infusão de hCT-MSCs. Por exemplo, os fluidos IV de manutenção podem ser administrados após a infusão, por exemplo, por cerca de 30 minutos a cerca de 60 minutos, ou cerca de 30 minutos a cerca de 45 minutos, ou cerca de 45 minutos a cerca de 60 minutos.

[0047] Quaisquer fluidos intravenosos adequados podem ser usados para a infusão pós-manutenção das hCT-MSCs. Em certas modalidades, o fluido IV de manutenção é uma solução salina ou solução de Ringer com lactato. Em certas modalidades, o fluido IV de manutenção é uma solução comum a 0,25%. Em certas modalidades, o fluido IV de manutenção é uma solução comum a 0,5%.

[0048] Em certas modalidades, onde a administração de hCT-MSCs é em um paciente com HIE, as hCT-MSCs podem ser administradas juntamente com a hipotermia terapêutica. Por “juntamente com” se entende antes de, ao mesmo tempo/durante ou após a hipotermia terapêutica. Em certas modalidades, as hCT-MSCs são administradas ao mesmo tempo que/durante a hipotermia terapêutica.

[0049] Certos aspectos da descrição serão agora explicados posteriormente através dos exemplos não limitativos a seguir.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Ensaio de fase I/II para determinar o tamanho do efeito da alteração na pontuação GMFM-66 em indivíduos tratados com hCT-MSc em comparação com o CB alogênico.

Visão geral

[0050] Este estudo é um ensaio de fase I/II, prospectivo, randomizado

e aberto projetado para determinar a dimensão do efeito da mudança na pontuação GMFM-66 em indivíduos tratados com hCT-MSC ou CB alogênico e para avaliar a segurança de doses repetidas de hCT-MSC em crianças com paralisia cerebral. Crianças de 2 a 5 anos com paralisia cerebral devido à encefalopatia hipóxico-isquêmica, acidente vascular cerebral ou leucomalacia periventricular podem ser elegíveis para participar. Todos os indivíduos serão, em última análise, tratados com um produto de células alogênicas em algum momento durante o estudo. Os indivíduos serão randomizados para um dos três braços: (1) o braço “AlloCB” receberá uma infusão de CB alogênica na consulta de avaliação inicial; (2) o braço “MSC” receberá três infusões hCT-MSC, uma na avaliação inicial, uma em três meses e uma em seis meses; (3) o braço de “História Natural” não receberá uma infusão na avaliação inicial, mas receberá uma infusão de CB alogênica em 12 meses. As medidas dos resultados motores serão avaliadas nos pontos de tempo da avaliação inicial, em seis meses e em um ano. A segurança será avaliada em cada consulta de infusão e remotamente por mais 12 meses após a consulta final. A duração da participação no estudo será de 24 meses a partir do momento da consulta de avaliação inicial. A randomização dos braços de tratamento será estratificada por idade e nível de GMFCS na avaliação inicial.

[0051] O desfecho primário é a diferença entre as mudanças observadas e esperadas de um indivíduo na pontuação GMFM-66 12 meses após a infusão inicial do estudo. As estimativas de intervalo serão relatadas separadamente para os braços hCT-MSC, AlloCB e História Natural. As pontuações esperadas de GMFM-66 aos 12 meses serão calculadas com base na idade na avaliação inicial do indivíduo, no nível de GMFCS e na pontuação GMFM-66 na avaliação inicial, usando percentis de referência publicados (Hanna et al., *Phys Ther.* 2008, 88(5): 596-607).

Finalidade

[0052] O principal objetivo deste estudo é estimar a mudança na

função motora 12 meses após o tratamento com uma única dose de sangue do cordão umbilical alogênico (AlloCB) ou doses repetidas de células estromais mesenquimais derivadas do tecido do cordão umbilical (hCT-MSC) em crianças com paralisia cerebral. Além disso, este estudo contribuirá com dados muito necessários para a comunidade de ensaios clínicos sobre o histórico natural da função motora no CP ao longo de períodos de curto prazo (menos de 1 ano) relevantes para a realização de ensaios clínicos, e avaliará a segurança da infusão de AlloCB e hCT-MSC em crianças com paralisia cerebral.

Fonte de unidades CB não relacionadas para este ensaio

[0053] O Carolinas Cord Blood Bank - CCBB é um dos maiores bancos públicos de sangue do cordão umbilical do país. Fundado em 1998 com apoio do National Heart and Blood Institute do NIH, o CCBB possui mais de 30 mil unidades de CB em estoque e já distribuiu mais de 2.500 unidades de CB para transplante até o momento. Em 2012, o CCBB recebeu aprovação da FDA para sua solicitação de BLA ao mercado DUCORD, um produto de células-tronco derivado do sangue do cordão umbilical, para uso em transplantes entre doadores e receptores não relacionados. O DUCORD é aprovado para uso na reconstituição de células-tronco hematopoiéticas para pacientes com distúrbios que afetam o sistema hematopoiético que são herdados, adquiridos ou resultantes do tratamento mieloablativo. Atualmente, o CCBB coleta de 10 locais hospitalares (8 na Carolina do Norte, 1 em Atlanta, GA, e 1 em Boston, MA). Ele também aceita doações de CB de mães que dão à luz em qualquer hospital na Carolina do Norte e Atlanta através de um programa de doação de kits.

Especificações para Qualificação de Unidades de CB

[0054] Com base em critérios estabelecidos utilizando o CB alogênico para transplante de células-tronco hematopoiéticas e nossa experiência no tratamento de mais de 600 crianças com CB autólogo para condições

neurológicas, estabelecemos os seguintes critérios para qualificar unidades de CB no banco para estudos de terapia celular. Todas as unidades de CB utilizadas para este estudo atual serão obtidas do Carolinas Cord Blood Bank.

[0055] A unidade de CB deve ter:

1. Contagem de células nucleadas totais pré-criopreservação (TNCC) documentada e pelo menos $12 \times 10^7/\text{kg}$

2. Viabilidade na pré-criopreservação $\geq 85\%$ do total de células e $\geq 70\%$ das células CD34+

3. Cultura de esterilidade pré-criopreservação realizada e com resultado negativo

4. Rastreamento de doenças infecciosas maternas da seguinte forma: Os testes devem incluir resultados negativos para hepatite B, hepatite C, HIV, HTLV e sífilis. A triagem adicional, que depende do tempo de coleta de CB, pode ser realizada com base nas regulamentações locais e nacionais. Podem ser utilizadas unidades de mães que tenham uma tiragem positiva de anticorpos para CMV.

[0056] 5. Amostra de teste disponível para teste de confirmação de identidade e potência

6. Tipagem de HLA realizada e atendendo a parâmetros específicos do estudo

7. Viabilidade de CD45+ $\geq 40\%$ e viabilidade de CD34+ $\geq 70\%$ na amostra de teste descongelada

Fonte de MSCs para este estudo: hCT-MS

[0057] hCT-MS é um produto de MSC de terceiros fabricado a partir de tecido do cordão umbilical digerido de doadores alogênicos que é expandido para duas passagens na cultura, criopreservado, armazenado na fase de vapor de nitrogênio líquido e guardado em banco. O tecido do cordão umbilical é doado por mães saudáveis que fazem partos saudáveis a termo após uma gravidez normal com consentimento informado por escrito. As

células são produzidas, criopreservadas e armazenadas no laboratório Robertson CT2 GMP (Duke University, Durham, NC).

[0058] O tecido do cordão umbilical é uma fonte atraente de MSCs, pois é prontamente disponível e facilmente obtido sem consequência para o doador, não é controverso, e tem um potencial proliferativo maior do que os MSCs de outras fontes pós-natal (Drela et al., *Cytotherapy*. 2016, 18(4): 497-509). Vários estudos pré-clínicos não demonstraram qualquer evidência de tumorigenicidade ou toxicidade de MSCs derivadas de tecido do cordão umbilical (Park et al. *Toxicol Res*. 2016, 32(3): 251-258). Nos estudos clínicos de fase inicial publicados em inglês que utilizaram MSCs derivados de tecido do cordão umbilical, nestes 36 estudos, incluindo 695 pacientes e pelo menos 1.416 doses de MSCs derivados do tecido do cordão umbilical com acompanhamento que variou de três meses a seis anos, nenhum evento adverso grave foi relatado. Vários outros ensaios clínicos de MSCs derivados de tecido do cordão umbilical em várias condições da doença estão em andamento (clinicaltrials.gov).

Justificativa do Estudo e Hipóteses

[0059] Estudos anteriores sugerem que a infusão de CB autólogo adequadamente dosado pode melhorar a função motora em crianças com paralisia cerebral. Como não é viável que toda criança com paralisia cerebral tenha acesso ao seu CB autólogo, este estudo avaliará a eficácia de duas fontes alogênicas de células que podem estar disponíveis para todos os pacientes necessitados. O principal objetivo deste estudo é investigar a mudança na função motora 12 meses após o tratamento com duas fontes de células alogênicas, hCT-MSCs e CB alogênico.

[0060] Este estudo irá gerar dados importantes sobre a magnitude do efeito da mudança na função motora dessas duas fontes celulares e uma coorte de História Natural para ajudar no planejamento de futuros ensaios. A justificativa para o estudo e para o potencial benefício da terapia celular na

paralisia cerebral se baseia nas seguintes hipóteses:

- Demonstramos segurança e eficácia dependente da dose de infusões de CB autólogo em crianças com paralisia cerebral.

[0061] • É possível que diferentes tipos celulares, por exemplo, células mononucleares do sangue versus MSCs do tecido do cordão umbilical, podem influenciar a conectividade cerebral por diferentes mecanismos.

[0062] • Várias doses de células podem ser superiores a uma única dose de células.

[0063] • O cérebro em desenvolvimento exibe notável plasticidade, tornando as crianças pequenas candidatas ideais para obter o máximo de benefícios terapêuticos de terapias restaurativas, incluindo CB.

[0064] • As células do CB, agindo através de mecanismos parácrinos, podem facilitar mecanismos de reparação endógena e promover a formação de novas conexões neurais do córtex motor, resultando em melhorias clínicas significativas.

[0065] • A conectividade cerebral desempenha uma função importante na fisiopatologia, e potencialmente no mecanismo de reparação, de lesão cerebral em crianças com paralisia cerebral. Especificamente, nós desenvolvemos a hipótese de que (1) os prejuízos na conectividade cerebral são responsáveis pelos déficits motores em crianças com paralisia cerebral, (2) o aumento da conectividade cerebral tem impacto direto sobre as melhorias funcionais, (3) crianças com paralisia cerebral que recebem infusões de CB apresentarão maiores aumentos na conectividade cerebral do que as crianças que recebem infusões de placebo e (4) a gravidade das anormalidades da conectividade cerebral na avaliação inicial base prevê o potencial para o benefício da terapia com CB.

Desenho do estudo

[0066] Este estudo é um ensaio de fase I/II, prospectivo, randomizado e aberto projetado para avaliar a dimensão do efeito da mudança na pontuação

GMFM-66 em indivíduos tratados com hCT-MSC ou CB alogênico e para avaliar a segurança de doses repetidas de hCT-MSC em crianças pequenas com paralisia cerebral. Crianças de 2 a 5 anos com paralisia cerebral devido à encefalopatia hipóxico-isquêmica, acidente vascular cerebral ou leucomalacia periventricular podem ser elegíveis para participar. Todos os indivíduos serão, em última análise, tratados com um produto de células alogênicas em algum momento durante o estudo. Os indivíduos serão randomizados para um dos três braços: (1) o braço “AlloCB” receberá uma infusão de CB alogênico na consulta de avaliação inicial; (2) o braço “MSC” receberá três infusões hCT-MSC, uma na avaliação inicial, uma em três meses e uma em seis meses; (3) o braço de “História Natural” não receberá uma infusão na avaliação inicial, mas receberá uma infusão de CB alogênica em 12 meses. Todos os indivíduos terão uma avaliação clínica inicial para verificar e classificar o diagnóstico de paralisia cerebral e determinar a aptidão. Eles retornarão para consultas de estudo mais duas (braços de AlloCB e de História Natural) ou três (braço de MSC) vezes. As medidas dos resultados serão avaliadas nos pontos de tempo da avaliação inicial, em seis meses e em um ano. Os parâmetros de segurança adicionais serão avaliados remotamente por 12 meses após a consulta final presencial.

Objetivos do estudo

[0067] Objetivo primário: determinar o tamanho do efeito da mudança na pontuação GMFM-66 em crianças com paralisia cerebral tratada com uma única dose de 10×10^7 células/kg de CB alogênico ou três doses de 2×10^6 células/kg de hCT-MSC.

[0068] Objetivo secundário: avaliar a segurança das doses repetidas de hCT-MSC em crianças com paralisia cerebral.

[0069] Objetivos exploratórios: (1) determinar a mudança na pontuação na escala de desenvolvimento motor de Peabody 2 (PDMS-2) em 6 e 12 meses em crianças tratadas com CB alogênico ou hCT-MSC. (2) analisar

a mudança na conectividade cerebral total normalizada, medida pela ressonância magnética cerebral com DTI, desde a avaliação inicial até 12 meses. (3) avaliar as mudanças funcionais e as medidas de qualidade de vida aos 6 e 12 meses.

Desenho do estudo – Desenho Geral

[0070] Este estudo é um ensaio de fase I/II, prospectivo, randomizado e aberto projetado para determinar a dimensão do efeito da mudança na pontuação GMFM-66 em indivíduos tratados com hCT-MSC ou CB alogênico e para avaliar a segurança de doses repetidas de hCT-MSC em crianças com paralisia cerebral. Crianças de 2 a 5 anos com paralisia cerebral devido à encefalopatia hipóxico-isquêmica, acidente vascular cerebral ou leucomalacia periventricular podem ser elegíveis para participar.

[0071] Todos os indivíduos serão, em última análise, tratados com um produto de células alogênicas em algum momento durante o estudo. Os indivíduos serão randomizados para um dos três braços: (1) o braço “AlloCB” receberá uma infusão de CB alogênico na consulta de avaliação inicial; (2) o braço “MSC” receberá três infusões hCT-MSC, uma na avaliação inicial, uma em três meses e uma em seis meses; (3) o braço de “História Natural” não receberá uma infusão na avaliação inicial, mas receberá uma infusão de CB alogênica em 12 meses. As medidas dos resultados motores serão avaliadas nos pontos de tempo da avaliação inicial, em seis meses e em um ano. A segurança será avaliada em cada consulta de infusão e remotamente por mais 12 meses após a consulta final. A duração da participação no estudo será de 24 meses a partir do momento da consulta de avaliação inicial. A randomização dos braços de tratamento será estratificada por idade e nível de GMFCS na avaliação inicial.

[0072] Um fluxograma do estudo é provido na figura 1.

Desenho do estudo - desfechos do estudo

[0073] Desfecho primário: o desfecho primário é a diferença entre as

mudanças observadas e esperadas de um indivíduo na pontuação GMFM-66 12 meses após a infusão inicial do estudo. As estimativas de intervalo serão relatadas separadamente para os braços hCT-MSK, AlloCB e História Natural. As pontuações esperadas de GMFM-66 aos 12 meses serão calculadas com base na idade na avaliação inicial do indivíduo, no nível de GMFCS e na pontuação GMFM-66 na avaliação inicial, usando percentis de referência publicados (Hanna et al., *Phys Ther.* 2008, 88(5): 596-607).

[0074] Desfechos secundários: o desfecho secundário é o número de eventos adversos que ocorrem durante o período de 12 meses após a infusão com hCT-MSK ou AlloCB.

[0075] Análises exploratórias:

- Pontuação GMFM-66 observada na avaliação inicial, em 6 e em 12 meses

- Mudança na pontuação na escala de desenvolvimento motor de Peabody 2 (PDMS-2) em 6 e em 12 meses.

[0076] • Mudança na conectividade cerebral total normalizada, medida pela ressonância magnética cerebral com DTI, desde a avaliação inicial até 12 meses.

[0077] • Mudanças funcionais e as medidas de qualidade de vida em 6 e 12 meses.

Seleção e Retirada de Indivíduos da Pesquisa – População do Estudo

[0078] Noventa crianças de 2 a 5 anos com paralisia cerebral espástica.

Seleção e Retirada de Indivíduos da Pesquisa – Critérios de inclusão

[0079] 1. Idade ≥ 24 meses e ≤ 60 meses de idade ajustada no momento da admissão. A idade do paciente será ajustada devido à prematuridade, se o paciente nasceu com < 37 semanas de gestação.

[0080] 2. Diagnóstico: paralisia cerebral espástica unilateral ou bilateral secundária para acidente vascular cerebral/hemorragia uterina ou

perinatal, encefalopatia hipóxico-isquêmica (incluindo, mas sem se limitar, a asfixia no parto) e/ou leucomalacia periventricular.

[0081] 3. Status de desempenho: Classificação da função motora grossa, Níveis de pontuação de I a IV

4. A análise da captura de imagem cerebral (obtida como padrão de cuidado antes da admissão no estudo) não sugere uma condição genética ou malformação cerebral.

[0082] 5. Consentimento de representante autorizado legalmente.

Seleção e Retirada de Indivíduos da Pesquisa – Critérios de inclusão

[0083] Unidade de sangue do cordão umbilical autólogo qualificado disponível.

[0084] 2. Paralisia cerebral hipotônica ou atáxica sem espasticidade.

[0085] 3. Autismo e transtornos do espectro autista sem deficiência motora.

[0086] 4. Hipsarritmia.

[0087] 5. Convulsões intratáveis causando encefalopatia epiléptica.

[0088] 6. Evidência de uma doença neurológica progressiva.

[0089] 7. Tem uma infecção sistêmica ativa e descontrolada ou documentação do estado de HIV+.

[0090] 8. Doença genética conhecida ou evidência fenotípica de uma doença genética em exame físico.

[0091] 9. Doença genética ou adquirida ou comorbidade(s) simultânea(s) que poderia(m) exigir um futuro transplante de células-tronco alogênicas.

[0092] 10. Requer suporte de ventilação, incluindo ventilador doméstico, CPAP, BiPAP ou oxigênio suplementar.

[0093] 11. Função renal ou hepática prejudicada determinada pelos níveis de creatinina no soro > 1,5mg/dl e/ou bilirrubina total > 1,3mg/dL, exceto em pacientes com síndrome de Gilbert conhecida.

[0094] 12. Possível imunossupressão, definida como WBC < 3.000 células/ml ou contagem absoluta de linfócitos (ALC) < 1.500 com subconjuntos anormais de células T.

[0095] 13. A condição médica do paciente não permite deslocamentos seguros.

[0096] 14. Anteriormente, recebia alguma forma de terapia celular.

Seleção e Retirada dos Indivíduos da Pesquisa – Recrutamento de Indivíduos da Pesquisa e Triagem

[0097] Os pacientes podem ser recrutados através de publicidade aprovada pelo IRB para o estudo nos sites dos bancos de CB, em sites patrocinados pelos pais, no site do NMDP, em sociedades de paralisia cerebral selecionadas, em provedores médicos locais e através de um registro de consultas para estudos anteriores (banco de dados de lesões cerebrais). A aprovação separada pelo IRB será obtida para quaisquer anúncios.

[0098] A triagem deste estudo é conduzida sob um protocolo de triagem separado aprovado pelo IRB (Pro00063563). Sob este protocolo, após o consentimento informado por escrito ser obtido de um pai/responsável, os prontuários, vídeos e resultados de imagens cerebrais do paciente são obtidos e revisados. A revisão médica é realizada por uma equipe de enfermeiros pediátricos, enfermeiros e médicos para identificar a presença de quaisquer critérios de exclusão. Se nenhum critério de exclusão for identificado, os laboratórios realizarão a triagem e uma busca pode ser realizada para identificar uma unidade de CB adequadamente compatível.

Produtos do Estudo - Sangue do Cordão Umbilical Alogênico

[0099] Unidades de CB do doador alogênico não relacionadas utilizadas para esta triagem serão obtidas do Carolinas Cord Blood Bank, um Banco de Sangue do Cordão Umbilical Público licenciado pela FDA no Duke University Medical Center. Os doadores de CB devem ser elegíveis para doação a um banco público de sangue do cordão umbilical para uso

alogênico. A triagem de elegibilidade do doador por meio de questionários é realizada de acordo com a CFR 1271.75, e o teste de doenças infecciosas é realizado de acordo com a CFR 1271.80 e 1271.85. A unidade também deve ter um grau adequado de correspondência de HLA e atender às especificações do produto, conforme detalhado abaixo.

[00100] Todos os indivíduos do estudo em potencial serão submetidos a tipagem HLA de alta resolução em HLA-A, B e HLA-DRB1, através de sangue ou zaragatoa bucal. Os pacientes que recebem CB alogênico terão a tipagem HLA realizada em duas amostras separadas para confirmação. As unidades alogênicas que são potenciais correspondências serão inicialmente identificadas a partir de uma busca no Carolinas Cord Blood Bank. O melhor HLA correspondente disponível ($\geq 4/6$), usando correspondência de nível intermediário nas classes HLA I A e B, e correspondência de nível de alelo de alta resolução no HLA classe II, DRB1, unidade CB com uma dose de células nucleadas pré-criopreservação $\geq 12 \times 10^7$ células/kg será selecionado. Uma vez selecionada uma unidade, a tipagem HLA será usada para confirmar a tipagem HLA original e selecionar a melhor unidade de correspondência. Quando possível, pelo menos 1 correspondência em cada loci de HLA será priorizada. Uma unidade de CB deve ter uma correspondência HLA de pelo menos 4/6 com o paciente.

[00101] A tipagem sanguínea ABO/Rh dos recebedores será obtida. As unidades de CB não serão selecionadas com base na tipagem ABO. No entanto, uma unidade de CB rh negativo será selecionada para indivíduos do sexo feminino rh negativo, para evitar a sensibilização Rh em mulheres jovens.

[00102] Os resultados dos testes iniciais no banco de sangue do cordão umbilical devem incluir uma TNCC pré-criopreservação, viabilidade e cultura de esterilidade. A pré-criopreservação de TNCC deve ter $\geq 12 \times 10^7$ células/kg para a administração-alvo de 10×10^7 células/kg pós-descongelamento, as

culturas de esterilidade devem ter apresentado resultados negativos, a viabilidade total deve ter sido $\geq 85\%$ e a viabilidade de células CD34+ deve ter sido $\geq 70\%$.

[00103] Um frasco ou segmento de teste deve estar disponível em cada unidade de CB para testes de potência e tipagem HLA confirmatória. O segmento será retirado da unidade candidata e testado quanto à potência e identidade (tipagem confirmatória de HLA) por procedimentos operacionais padrão no CCBB da Duke. As unidades serão consideradas aceitáveis para o ensaio se a viabilidade da população de células CD45 for $\geq 40\%$ e a viabilidade da população de células CD34 for $\geq 70\%$. O crescimento de UFC, a expressão de aldeído desidrogenase e CD34 serão descritos, mas não será uma especificação para a admissão do estudo.

[00104] Antes da chegada dos pacientes, sua unidade de CB designada será transferida do Carolinas Cord Blood Bank para o Duke STCL, localizado no mesmo edifício, onde será armazenada em um freezer de nitrogênio líquido até o dia da infusão. No dia da infusão, o CB será descongelado e lavado com dextrana/albumina e ressuspenso em um volume apropriado, com base no peso do receptor para administração ao paciente de forma padrão (Rubinstein et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995, 92(22):10119-10122) de acordo com o POP STCL-PROC-036. No momento do descongelamento, os estudos padrão listados (consulte a tabela 1) serão realizados. Apenas a TNCC é utilizada para liberação. Uma dose máxima de 10×10^7 TNC/kg será preparada para infusão em uma seringa ou bolsa, e infundida durante 2 a 25 minutos.

Tabela 1: Teste da unidade de sangue do cordão umbilical após o descongelamento

Teste	Especificações
Contagem total de células nucleadas (TNCC)	Relatório; usado para calcular a dose final
Viabilidade	Relatório
Viabilidade da população de CD34+*	$\geq 70\%$
Viabilidade da população de CD45+	$\geq 40\%$
Esterilidade**	Ausência de crescimento

Crescimento da unidade formadora de colônia (UFC)	Relatório
ALDH ^{br} como porcentagem de células CD45+	Relatório

*A viabilidade das células CD34+ após o descongelamento foi anteriormente testada em um segmento e precisou atender a especificação de $\geq 70\%$. Portanto, para o produto clínico, informaremos, mas não usaremos a viabilidade pós-descongelamento como critério de liberação.

**Se uma cultura positiva for obtida após a administração do produto, um plano é colocado em prática para notificar as equipes clínicas e de estudo e tratar o paciente, se for indicado.

Produtos do estudo - Células estromais mesenquimais derivadas do tecido do cordão umbilical humano (hCT-MSc)

[00105] hCT-MSCs são produzidas de acordo com as BPF em uma instalação de sala limpa 7, e são um produto de células alogênicas fabricadas a partir do tecido de cordão umbilical digerido, que é expandido em cultura, criopreservado e colocado no banco. As hCT-MSCs são fabricadas no laboratório de produção de células Duke CT2 de acordo com as BPF, a partir de tecido do cordão umbilical coletado da placenta de partos normais a termo, onde o sangue do cordão umbilical do bebê foi doado para o Carolinas Cord Blood Bank, um banco de sangue de cordão umbilical público licenciado pela FDA e credenciado pela FACT na Duke University Medical Center, após obter o consentimento informado por escrito da mãe do bebê doador. O tecido do cordão é colhido das placentas de bebês do sexo masculino, nascidos por cesariana eletiva após uma gravidez normal e a termo. Os questionários de triagem de doadores são preenchidos pela doadora materna, e o sangue materno é testado para doenças transmissíveis pelo laboratório de triagem de doadores certificado pela CLIA na Cruz Vermelha Americana em Charlotte, NC. Os doadores devem ser elegíveis para doação a um banco de sangue do cordão umbilical público para uso alogênico. Após a entrega da placenta e do cordão umbilical, o sangue do cordão é drenado assepticamente da placenta. Em seguida, o cordão é seco e limpo com cloropreps, separado da base da placenta, colocado em uma garrafa estéril contendo plasmalite A e transportado para o laboratório de processamento de células Robertson Clinical and Translational Cell CT2 que segue as BPF, à temperatura ambiente em um recipiente validado

[00106] No ambiente de fabricação de salas limpas, em uma cabine de biossegurança, o tecido do cordão umbilical é removido do meio, colocado em pratos estéreis, cortado em pequenos pedaços e depois picado e digerido no dissociador Miltenyi Biotec GentleMacs Octo com enzimas de grau BPF: hialuronidase, DNase, colagenase, papaína. A suspensão celular resultante é colocada em cultura em meio Prime XV MSC Expansion XSBM (Irvine Scientific) com 1% de lisado de plaquetas, e foi cultivada até a confluência (~ 7 a 14 dias) para estabelecer a cultura P0. Para estabelecer o banco de células mestre, a P0 é coletada e criopreservada em criofrascos com meio Cryostor 10 (BioLife), e armazenada na fase de vapor de nitrogênio líquido. As culturas P1 e P2 são cultivadas em condições semelhantes, em *HYPERFlasks* ou *HYPERStacks* sem plaquetas, conforme necessário, para criar o banco de células de trabalho e o produto para administração, respectivamente. As células de P1 e P2 são removidas do aparato de cultivo usando TrypLE (Gibco). O produto final é derivado das culturas P2, que são coletadas em plasmalite com albumina de soro humano a 5%, lavadas e criopreservadas em criobolsas compartimentadas contendo 50 a 100 milhões de células em uma concentração final de 10% de DMSO com dextrana (Akron Scientific). No dia da administração, um compartimento pode ser descongelado, diluído em 10 a 40 ml de solução IV de plasmalite, colocado em uma seringa ou bolsa e transportado para o leito para administração.

[00107] Em cada passagem, o produto celular é distinguido pela avaliação do fenótipo de superfície celular por citometria de fluxo e ensaios funcionais através da proliferação de células T e modelos organotípicos de ativação da micróglia. Cada lote, antes da criopreservação de P2, também será testado quanto à esterilidade, endotoxina e micoplasma, e esses testes devem atender às especificações. Para dosagem, os testes de liberação após o descongelamento e diluição incluirão TNCC e viabilidade via celômetro. Os pacientes serão dosados com 2×10^6 hCT-MSCs/kg, com base na contagem

pós-descongelamento.

Processo e formulação final

[00108] hCT-MSD é fabricado a partir de um único tecido de cordão umbilical em uma série de três etapas que geram um banco de células mestre, um banco de células de trabalho e o produto do estudo. O produto para cada etapa é criopreservado em um congelador de taxa controlada e armazenado na fase de vapor de nitrogênio líquido. Em P2, uma criobolsa representativa é descongelada e qualificada antes do tratamento de qualquer paciente com esse lote de produto. O teste para a liberação do produto inclui a contagem total de células nucleadas, viabilidade, fenótipo, ensaios funcionais, endotoxina, micoplasma, coração de gram e esterilidade. Cada lote de células também é testado para vírus adventícios antes da criopreservação.

[00109] No dia do tratamento, as células são descongeladas por SOP STCLAOP-028 JA2 e depois diluídas em 10 a 40 ml de plasmalite A + 5% de albumina de soro humano (HSA). Uma alíquota é removida para a realização da contagem de células, viabilidade e cultura de esterilidade. Se as células forem $\geq 70\%$ viáveis, o volume final do produto é ajustado para prover 2×10^6 células/kg ao indivíduo do estudo. As células são entregues ao leito em uma seringa contendo plasmalite A, HSA 5% e DMSO residual. Qualquer suspensão celular removida é inoculada em garrafas de cultura aeróbica e anaeróbica para testes de esterilidade. As células têm um prazo de validade de quatro horas em temperatura ambiente após o descongelamento.

[00110] O produto final de HCT-MSD será liberado condicionalmente para administração ao paciente após o teste de contagem de células e viabilidade após o descongelamento. A liberação final ocorrerá após o período de cultura de esterilidade de 14 dias para o produto do estudo. Caso uma cultura de esterilidade se tornar positiva após a administração do produto, o organismo será identificado e as sensibilidades a antibióticos serão realizadas. A família do paciente será contatada para determinar se são

sintomáticos (isto é, se apresentam febre ou outros sinais de infecção). Os pacientes assintomáticos serão observados, mas não serão tratados com antibióticos. Os pacientes sintomáticos serão avaliados e tratados conformemente, com hemoculturas e antibióticos, conforme apropriado. Todos os pacientes que recebem um produto com teste de esterilidade positivo subsequente serão acompanhados com contato diário por um profissional de enfermagem do estudo por 14 dias após o teste positivo de esterilidade ser notado.

[00111] Mais detalhes de fabricação e teste podem ser verificados no Pedido Provisório Norte-Americano S/N 62/652.722, depositado em 4 de abril de 2018, cujo conteúdo é incorporado por referência em sua totalidade.

Produtos do Estudo - Triagem de Doadores para CB e hCT-MS

[00112] A triagem e o teste de doadores são realizados por procedimentos operacionais padrão do Carolinas Cord Blood Bank para atender a todos os requisitos na Parte 1271 do 21CFR. A triagem e o teste estão atualizados com recomendações e aprovados pela FDA sob o número de licença biológica 1870. As doadoras maternas de sangue do cordão umbilical são triadas e testadas para HIV-1, HIV-2, HIV-O, vírus da hepatite B (HBV, antígeno superficial e anticorpo principal), anticorpo do vírus da hepatite C (HCV), *Treponema pallidum* (sífilis), Doença de Creutzfelds-Jakob (CJD, apenas triagem), Doença de Chagas, vírus T-linfotrópico humano tipos 1 e 2 (HTLV-1, HTLV-2) e anticorpos totais contra CMV. Testes de ácido nucleico para HIV-1/2/O, HBV, vírus do Nilo Ocidental e HCV também são realizados no sangue materno. A triagem para o zika vírus também pode ser realizada.

[00113] Como o tecido do cordão umbilical utilizado para este estudo será obtido de doadores consentidos para doação de sangue do cordão umbilical ao Carolinas Cord Blood Bank, eles serão submetidos a triagem de doadores e teste de doenças infecciosas, de acordo com os procedimentos operacionais padrão do Carolinas Cord Blood Bank. As amostras maternas

associadas ao sangue do cordão umbilical e as amostras de MSC de tecido do cordão umbilical serão retidas como amostras de referência para testes futuros como parte deste estudo.

Produtos do Estudo - Embalagem de Produtos do Estudo

[00114] Todos os produtos celulares recebem um número de identificação exclusivo (código de barras ISBT Demand 128) para garantir a integridade do produto e manter a cadeia de custódia. A instalação clínica ou banco de sangue do cordão umbilical atribui um rótulo de código de barras ISBT Demand 128 para a unidade de CB ou produto hCT-MSC, que é colocado na bolsa de produto/seringa diretamente ou através da etiqueta de vinculação. Os produtos são transportados do STCL para o local de infusão em um refrigerador validado por um transportador treinado.

Produtos do Estudo - Administração do Produto do Estudo

[00115] Os pacientes chegarão à clínica na manhã de sua infusão programada. Uma injeção IV periférica será aplicada por um anestesista, equipe clínica ou equipe do estudo, e será administrada uma pré-medicação com Benadryl, a 0,5mg/kg/dose IV e solumedrol, a 0,5 a 1 mg/kg IV. Os produtos de CB alogênicos serão administrados por via intravenosa durante 5 a 25 minutos sob supervisão direta do médico. Os produtos hCT-MSC serão administrados por via intravenosa ao longo de 30 a 60 minutos sob supervisão direta. Os sinais vitais (frequência cardíaca, pressão arterial, temperatura, frequência respiratória) serão verificados na chegada à clínica e como for clinicamente indicado. A oximetria de pulso será monitorada continuamente durante toda a infusão e por pelo menos 5 minutos após a infusão. Os pacientes serão hidratados com fluidos intravenosos padrão, como tolerado e observado por pelo menos uma hora após a infusão.

Plano do Estudo - Visão Geral

[00116] Os pais/responsáveis que já entraram em contato com nosso programa e têm um filho que pode atender aos critérios de elegibilidade deste

estudo serão notificados de que este estudo está disponível. Após o contato inicial, os pais/responsáveis dos potenciais indivíduos da pesquisa terão uma entrevista por telefone inicial com a equipe do estudo para descrever o estudo, verificar critérios básicos de elegibilidade e confirmar seu interesse na participação. A elegibilidade do indivíduo será, em seguida, examinada por meio da revisão de prontuários médicos, vídeo, testes laboratoriais e imagens sob um protocolo de triagem separado.

[00117] Uma vez concluída a triagem e o paciente atender aos critérios do estudo, uma unidade de CB de doador não relacionado adequada será identificada no Carolinas Cord Blood Bank. A unidade CB será examinada conforme descrito na seção 6. Em seguida, os indivíduos se deslocarão para o Duke para sua primeira consulta. No primeiro dia, será obtido o consentimento informado por escrito. A elegibilidade do paciente será confirmada por meio de observação física e verificação do diagnóstico de paralisia cerebral e nível de GMFCS. Se não forem constatados critérios de exclusão, o indivíduo será randomizado para um braço de tratamento. Durante sua primeira consulta, todos os indivíduos terão avaliações de fisioterapia, e um subconjunto de pacientes será submetido a ressonância magnética cerebral. Os indivíduos receberão infusões de estudo, conforme determinado pelo braço de tratamento atribuído (apenas para AlloCB; em 12 meses apenas para História Natural; na avaliação inicial, em 3 e 6 meses para MSCs).

[00118] Os indivíduos serão avaliados no dia seguinte a cada infusão, e os pais serão contatados para acompanhamento por telefone ~ 2 semanas após cada infusão. Todos os indivíduos retornarão ao Duke seis (avaliações motoras) e 12 meses (avaliações motoras e ressonância magnética cerebral) após a consulta de avaliação inicial. Os indivíduos do braço de MSC também retornarão em três meses para uma infusão de hCT-MS. Uma avaliação remota de segurança será realizada por telefone ou e-mail aos 24 meses após a infusão.

Plano do Estudo - Triagem do Paciente

[00119] A triagem inicial do paciente será realizada com consentimento esclarecido sob um protocolo separado e incluirá uma revisão de prontuários médicos, vídeos e testes laboratoriais iniciais. Se nenhum critério de exclusão for identificado, o consentimento esclarecido será obtido por telefone e o paciente será randomizado para o braço de tratamento. Se for indicado (braços AlloCB e História Natural), uma unidade de CB de doador não relacionada será identificada no Carolinas Cord Blood Bank. Os indivíduos se deslocarão para o Duke para a avaliação inicial. As avaliações e os tratamentos serão realizados em escala ambulatorial. Um exame físico e uma avaliação de GMFCS inicial serão realizados para confirmar a elegibilidade, e o indivíduo realizará o restante das avaliações do estudo.

Plano do Estudo - Seleção de Unidade de CB

[00120] Para os indivíduos randomizados para os braços AlloCB e História Natural, uma unidade de CB de doador alogênico não relacionada será identificada no Carolinas Cord Blood Bank. A tipagem HLA será obtida no paciente, e a melhor unidade de CB disponível com correspondência de HLA com uma dose de células nucleadas pré-criopreservação $\geq 12 \times 10^7$ células/kg será escolhida. Quando possível, pelo menos 1 correspondência em cada loci de HLA será priorizada. Uma unidade de CB rh negativa será selecionada para indivíduos do sexo feminino rh negativo, para evitar a sensibilização Rh em mulheres jovens.

[00121] Uma vez que uma unidade de CB alogênica adequada tenha sido considerada uma correspondência aceitável, uma amostra da unidade de CB será testada quanto à potência no Duke STCL. Se os resultados desses testes forem satisfatórios, a unidade de CB será entregue ao Duke STCL no estado congelado.

Plano do Estudo - Infusão do Produto do Estudo

[00122] No dia da infusão, as células CB ou o produto hCT-MSK será

preparado pelo STCL e provido para infusão do paciente no ambulatório clínico sob a supervisão da equipe de estudo e da equipe do Programa pediátrico de transplante de sangue e medula. Uma injeção IV periférica será aplicada pela equipe clínica, anestesista ou por um membro da equipe de estudo. Antes da infusão do estudo, serão administradas pré-medicações (Benadryl e Solumedrol). As células do CB têm um prazo de validade de quatro horas em temperatura ambiente após o descongelamento.

[00123] A infusão de CB Allo será dada ao longo de aproximadamente 5 a 25 minutos e as infusões de hCT-MSD ao longo de 30 a 60 minutos usando práticas correntes. A criança receberá fluidos IV de manutenção de 1-1,5x, conforme descrito abaixo, e ficará sob observação na clínica por pelo menos uma hora após a infusão. Os pacientes terão alta da clínica após pelo menos uma hora, desde que todos os sinais vitais estejam tal como em sua avaliação inicial e estejam acordados e assintomáticos com nenhuma evidência de toxicidade. Os pacientes serão avaliados pela equipe do estudo no dia seguinte após a infusão para avaliar quaisquer reações adversas ou complicações relacionadas à infusão. Uma ligação telefônica para os pais/responsáveis pela equipe de estudo para avaliar a segurança da infusão será feita duas semanas após a infusão.

Taxa de Fluido IV de Manutenção (Método Holliday-Segar do Harriet Lane Handbook)		
Peso corporal	ml/kg por dia	
1º 10 kg	100	dividido por 24 horas/dia
2º 10 kg	50	dividido por 24 horas/dia
adicionar 1 kg para cada	20	dividido por 24 horas/dia

[00124] Se um paciente tiver sintomas de doença no dia da infusão planejada, incluindo, mas sem se limitar, a febre > 38,5° C, vômito, diarreia ou problemas respiratórios, a infusão será adiada.

Plano do Estudo - Cuidados durante eventos inesperados

[00125] Caso o paciente desenvolva sinais ou sintomas de anafilaxia, incluindo urticária, dificuldade para respirar, tosse, chiado ou vômito durante a infusão de CB, a infusão será interrompida e a terapia médica apropriada

iniciada

Plano do Estudo - Avaliações motoras

[00126] Medição da função motora grossa-66 (GMFM-66): GMFM-66 é um instrumento observacional padronizado projetado e validado para medir a mudança da função motora grossa ao longo do tempo em crianças com paralisia cerebral. Curvas de desenvolvimento de progressão esperadas foram publicadas para crianças de 2 a 12 anos (Hanna et al. *Phys Ther.* 2008, 88(5):596-607; Rosenbaum et al. *Jama.* 2002, 288(11): 1357-1363) permitindo o cálculo de pontuações futuras esperadas com base na idade na avaliação inicial, o nível de GMFCS e a pontuação GMFM-66. O GMFM-66 consiste em 66 itens, divididos em cinco categorias: deitado e rolando, sentado, engatinhando e ajoelhando-se, em pé, e andando, correndo e pulando.

[00127] Cada item é pontuado em uma escala de Likert de quatro pontos. O GMFM-66 é um subconjunto do GMFM-88, que contém 22 itens adicionais, principalmente na categoria deitado e rolando. Ambas as medidas foram validadas em crianças com paralisia cerebral de 5 meses a 16 anos de idade. Uma criança de 5 anos de idade sem deficiência motora é capaz de atingir a pontuação máxima (Russell et al. *Gross Motor Function Measure (GMFM-66 & GMFM-88) User's Manual.* Londres: Mac Keith Press; 2013). Um programa de computador, o Gross Motor Ability Estimator, é usado para calcular as pontuações totais do GMFM-66. O desfecho primário deste estudo é a diferença entre as mudanças observadas e esperadas de um indivíduo na pontuação GMFM-66 12 meses após a infusão inicial do estudo. Os pacientes de controle (placebo) e tratados serão comparados.

[00128] Quando possível, todo o GMFM-88 será realizado, e subconjuntos poderão ser analisados como desfechos exploratórios.

[00129] Escalas de desenvolvimento motor de Peabody (PDMS-2): A PDMS-II é uma avaliação padronizada do desenvolvimento motor na infância

que avalia tanto as habilidades motoras grossas quanto as finas. É projetado para crianças desde o nascimento até 5 anos de idade. A avaliação é composta por seis subtestes, que medem habilidades motoras interrelacionadas que se desenvolvem no início da vida (isto é, reflexos, estacionárias, locomoção, manipulação de objetos, pegar com as mãos e integração visual-motora). São obtidas pontuações do quociente motor grosso, quociente motor fino e quociente motor total. Para este estudo, o quociente motor grosso será obtido e analisado como um desfecho secundário.

Plano do Estudo - Avaliações funcionais e de qualidade de vida

[00130] Avaliação pediátrica de incapacidade-testagem computadorizada adaptativa (PEDI-CAT): A PEDI-CAT mede habilidades em três domínios funcionais: atividades diárias, mobilidade e social/cognitiva. A versão computadorizada adaptativa destina-se a prover uma avaliação exata e precisa das habilidades de uma criança, aumentando a eficiência e reduzindo a carga do respondente utilizando modelos estatísticos da teoria da resposta ao item para determinar quais itens são avaliados em cada domínio com base nas respostas a itens anteriores.

[00131] Inventário Pediátrico de Qualidade de Vida 4.0, Escala Genérica e Módulo de Paralisia Cerebral (PedsQL) (Varni et al. *Developmental medicine and child neurology*. 2006, 48(6): 442-449). As escalas genéricas e de módulo de paralisia cerebral do PedsQL são compostos por formatos paralelos de autorrelato infantil e relatório proxy dos pais. O Módulo de paralisia cerebral do PedsQL de 35 itens abrange sete escalas e gera uma pontuação padrão: (1) Atividades Diárias (9 itens), (2) Atividades Escolares (4 itens), (3) Movimento e Equilíbrio (5 itens), (4) Dor e Machucado (4 itens), (5) Fadiga (4 itens), (6) Atividades Alimentares (5 itens) e (7) Fala e Comunicação (4 itens).

Plano do Estudo - Avaliações de imagem

[00132] A imagem dos cérebros dos indivíduos obtida anteriormente

como padrão de cuidado será revisada por um membro da equipe do Centro de Análise de Imagens Cerebrais (Brain Imaging Analysis Center - BIAC) para determinar se o parcelamento preciso da imagem anatômica seria possível em uma ressonância magnética cerebral. Os indivíduos para os quais os dados utilizáveis provavelmente serão obtidos (estimados como aproximadamente dois terços dos indivíduos elegíveis) serão submetidos a ressonância magnética cerebral com imagem do tensor de difusão (DTI). As imagens ponderadas por difusão serão adquiridas com um escâner 3 Tesla GE (Waukesha, WI). As imagens ponderadas T1 serão obtidas com uma sequência de pulsos de inversão com resolução de alto contraste. Essas imagens serão analisadas para obter as medidas de conectividade cerebral total.

Considerações estatísticas - Desenho do estudo

[00133] Este estudo é um ensaio de fase I/II, prospectivo, randomizado, e aberto projetado para prover estimativas de intervalo da mudança de 12 meses na função motora após o tratamento com AlloCB e hCT-MSK, prover dados adicionais à comunidade de ensaios clínicos sobre o histórico natural da função motora em CP ao longo de períodos de curto prazo (menos de 1 ano) relevantes para a realização de ensaios clínicos, e para avaliar a segurança de doses repetidas de hCTMSK e de uma única dose de AlloCB em crianças com paralisia cerebral.

[00134] Crianças de 2 a 5 anos com paralisia cerebral devido à encefalopatia hipóxico-isquêmica, acidente vascular cerebral ou leucomalacia periventricular serão elegíveis para participar. Todos os indivíduos serão, em última análise, tratados com um produto de células alogênicas em algum momento durante o estudo. Os indivíduos serão randomizados (1:1:1) para um dos três braços: (1) o braço “AlloCB” receberá uma infusão de CB alogênica na consulta de avaliação inicial; (2) o braço “MSK” receberá três infusões hCT-MSK, uma na avaliação inicial, uma em três meses e uma em

seis meses; o braço de “História Natural” não receberá uma infusão na avaliação inicial, mas receberá uma infusão de CB alogênica em 12 meses. A ocorrência de eventos adversos será avaliada em 3, 6, 12 e 24 meses após a randomização em todos os indivíduos. As medidas dos resultados motores serão avaliadas nos pontos de tempo da avaliação inicial, em seis meses e em um ano, em todos os indivíduos. A duração da participação no estudo será de 24 meses a partir do momento da consulta de avaliação inicial. A randomização será estratificada por idade (2 a 3 anos vs. 4 a 5 anos) e pelo nível de GMFCS (I/II ou III/IV).

Considerações Estatísticas – Admissões

[00135] Estima-se que até 8 a 12 indivíduos da pesquisa serão admitidos por mês e que aproximadamente 12 a 15 meses de admissões serão necessários para inscrever 90 indivíduos.

Considerações estatísticas - Duração do estudo

[00136] Cada participação do indivíduo do estudo será de 24 meses, com consultas clínicas ocorrendo durante os primeiros 12 meses e uma avaliação remota de segurança aos 24 meses. Dado que os acréscimos levarão até 15 meses, estima-se que a avaliação de segurança remota será realizada no último paciente 39 meses (3,25 anos) após o início do estudo.

Considerações estatísticas - Desfechos primários e secundários

[00137] O desfecho primário deste estudo é a diferença entre as mudanças observadas e esperadas de uma criança na pontuação GMFM-66 12 meses após a infusão inicial do estudo. Este estudo proverá estimativas de intervalo separadas da média dessa medida de desfecho em pacientes atribuídos aos braços HC-MS, AlloCB e História Natural aos 12 meses. O desfecho secundário deste estudo é o número de eventos adversos ocorridos ao longo de um período de 12 meses após o tratamento com hCT-MS ou AlloCB.

Considerações estatísticas - Tamanho da amostra e cálculos de potência

[00138] O tamanho da amostra deste estudo foi selecionado para prover um alto nível de precisão para estimar a média da alteração observada menos a esperada em 12 meses no GMFM-66 em cada um dos braços de estudo, e para prover uma alta probabilidade de detectar eventos adversos comumente ocorridos após a infusão com AlloCB ou hCT-MSK.

[00139] Como mostrado na tabela 2 abaixo, um tamanho de amostra de 30 pacientes por grupo provê uma probabilidade de 95,8% de detectar eventos adversos comuns que ocorrem em 10% das infusões (com hCT-MSK ou AlloCB). Esse tamanho de amostra também provê uma probabilidade de 78,5% de observar eventos que ocorrem em 5% das infusões, e uma probabilidade de 26,0% de observar eventos raros que ocorrem em 1% das infusões.

Tabela 2: probabilidade de observar um ou mais eventos com vários tamanhos de amostra*

Probabilidade real de um evento (%)	Probabilidade (%)*			
	N=20	N=30	N=40	N=50
1	18,25	26,0	33,1	39,5
5	64,2	78,5	87,1	92,3
10	87,8	95,8	98,5	99,5
20	98,8	99,9	100,0	100,0
50	100,0	100,0	100,0	100,0

*Probabilidade binomial de 1 ou mais eventos independentes.

[00140] O tamanho da amostra deste estudo também deve apoiar a estimativa da pontuação de alteração de GMFM-66 médio observado menos o esperado aos 12 meses após a intervenção com o braço MSC, AUCB e História Natural. Assim, três estimativas de intervalo serão construídas utilizando a distribuição t da seguinte forma.

$$\left(\bar{x} - t_{\alpha/2} * \frac{s}{\sqrt{n}}, \bar{x} + t_{\alpha/2} * \frac{s}{\sqrt{n}} \right)$$

[00141] A margem de erro E é o intervalo de confiança a meia-largura:

$$E = t_{\alpha/2} * \frac{s}{\sqrt{n}}$$

[00142] A margem de erro deste estudo foi selecionada como 2 pontos

com nível de confiança de 95%. A fórmula a seguir foi resolvida iterativamente para obter o tamanho da amostra para cada grupo de tratamento.

$$N = \left(\frac{t_{\alpha/2} * s}{E} \right)^2$$

[00143] O desvio padrão, s , foi estimado utilizando 36 indivíduos no ensaio CP-AC que atenderam aos critérios de inclusão de idade e GMFCS para o presente estudo: 5,16 (IC de 95%: 4,18, 6,13). Começando com um tamanho de amostra de 20, e assumindo um desvio padrão de 5,16, um total de 3 iterações foram necessárias para atingir um tamanho de amostra de grupo final de 28, como mostrado na tabela 3 abaixo.

Tabela 3:

nº de iteração	N inicial	Graus de liberdade	$t_{\alpha/2}$	N final
1	20	19	2,093	29
2	29	28	2,048	28
3	28	27	2,052	27

[00144] Portanto, um tamanho de grupo de 28 pacientes permite 95% de confiança na estimativa da pontuação de GMFM-66 médio observado menos o esperado aos 12 meses em um dos braços do estudo (História Natural, MSC ou AUCB) com uma margem de erro de no máximo 2. Este tamanho de amostra também é concordante com o que é necessário (N=30) para obter uma probabilidade razoável de detecção de eventos adversos que ocorrem com frequência, como descrito acima. Finalmente, se o desvio padrão da medida de desfecho secundário for tão alto quanto o indicado pelo limite superior do intervalo de confiança de 95% do estudo CP-AC (6,13 pontos) então uma amostra de 126 pacientes permite uma margem de erro não maior que ~2,5 pontos para cada uma das três estimativas de intervalo.

[00145] Portanto, o tamanho total da amostra deste estudo é fixado em 90 pacientes (30 por grupo).

Considerações estatísticas - Plano de análise

[00146] *Populações de análise:* As seguintes populações são definidas para apoiar as análises dos desfechos primários e secundários.

População com intenção de tratamento

[00147] Essa população incluirá todos os indivíduos admitidos e randomizados de acordo com o tratamento atribuído. O desfecho primário será avaliado nesta população.

População de segurança

[00148] A população de segurança define os pacientes em quem o desfecho secundário será avaliado e incluirá todos os indivíduos que receberam pelo menos 1 infusão. As análises da população de segurança será realizada utilizando uma abordagem tratada, que considera cada paciente de acordo com o tratamento efetivamente recebido em vez do tratamento que foi atribuído.

Calendário de análises

[00149] A análise das medidas dos desfechos primário e secundário será realizada quando o último paciente atingir sua consulta de 12 meses. Será feita uma atualização para as análises de segurança quando o último paciente atingir sua consulta de 24 meses.

Características demográficas e do início do estudo, e Distribuição

[00150] As características demográficas e do início do estudo serão resumidas para todos os indivíduos da pesquisa e separadamente por atribuição randomizada. As características a serem examinadas incluem idade, sexo, raça/etnia, pontuação GMFM-66 na avaliação inicial, nível de GMFCS e etiologia da CP. O número de indivíduos que ingressarem e concluíram o estudo será diagramado de acordo com as diretrizes do CONSORT.

Análise dos Desfechos Primário e Secundário

[00151] A ocorrência de eventos adversos na população de segurança será resumida descritivamente nas tabelas e figuras para todos os indivíduos, e separadamente por tratamento recebido. As estimativas da pontuação de

alteração de GMFM-66 médio observado menos o esperado aos 12 meses serão relatadas na população com intenção de tratamento, juntamente com os intervalos de confiança de 95%, conforme descrito acima.

Exemplo 2: Estudo de fase I da hCT-MSC, um produto celular estromal mesenquimal derivado do cordão umbilical, em bebês recém-nascidos com encefalopatia neonatal hipóxico-isquêmica moderada ou grave.

Finalidade

[00152] O objetivo deste estudo de Fase 1 é avaliar a segurança de uma e duas infusões intravenosas de células estromais mesenquimais derivadas do tecido do cordão umbilical humano (hCT-MSC), sendo a primeira administrada nas primeiras 48 horas pós-parto e a segunda aos dois meses de idade pós-parto, em recém-nascidos quase a termo e a termo, com encefalopatia hipóxico-isquêmica (HIE) neonatal de moderada a grave. Os três primeiros bebês inscritos receberão apenas a primeira dose inicial. Os três segundos bebês inscritos receberão as duas doses.

Justificativa do Estudo e Hipóteses

[00153] A justificativa mecanicista e a teoria abrangente dessa linha de investigação é que as HCT-MSCs podem agir através de mecanismos parácrinos e alócrinos para modular a inflamação em andamento e/ou a patologia imunológica no cérebro e, possivelmente, proteger os neurônios de danos adicionais. A hipótese deste ensaio clínico de fase I é que a administração de hCT-MSCs em uma ou duas doses de células será segura em recém-nascidos nascidos em 36 semanas de gestação ou posteriormente, que sofrem de encefalopatia neonatal hipóxico-isquêmica moderada a grave.

[00154] Em muitos contextos, as MSCs atenuam, ao invés de aumentar, as respostas imunológicas e inflamatórias. Os mecanismos documentados incluem alterações nas células T efetoras, como a geração de populações de células T regulatórias e alterações na geração de citocinas de monócitos/células dendríticas que levam a citocinas anti-inflamatórias.

Portanto, é plausível considerar uma população de MSCs como um agente imunológico e/ou anti-inflamatório. Modelos animais de HIE neonatal descreveram evidências de aumento da ativação da micróglia. Além disso, os neutrófilos se acumulam na vasculatura do sistema nervoso central. Células mieloides, células T e células natural killer se infiltram em áreas feridas do cérebro durante a fase de recuperação, sugerindo que danos cerebrais imunológicos e/ou mediados pela inflamação desempenham uma função na etiologia do TEA, como discutido acima (Hagberg 2015). Assim, AS HCT-MSCs podem ser uma terapia candidata ao HIE por causa das atividades imunomoduladoras das MSCs. Além disso, um regime de dosagem múltipla pode melhorar a taxa global e a duração da resposta.

Objetivos do estudo

[00155] Para determinar a segurança de doses intravenosas únicas e repetidas de hCT-MSC em recém-nascidos com HIE.

Riscos e benefícios

[00156] Os riscos potenciais associados à infusão de hCT-MSC incluem uma reação ao produto (erupção cutânea, falta de ar, chiado, dificuldade para respirar, hipotensão, inchaço ao redor da boca, garganta ou olhos, taquicardia, diaforese), transmissão de infecção e sensibilização HLA. Os riscos teóricos que devem ser considerados, mas não foram associados à administração do MSC em seres humanos, incluem a possibilidade de imunossupressão e formação de tecido ectópico. O sangue do cordão umbilical coletado com o tecido do cordão do doador usado na produção de hCT-MSC é rastreado em relação à infecção, e o produto deve atender aos critérios de liberação antes da infusão (descritos abaixo). Além de uma única dose de hidrocortisona antes da dose de hCT-MSC nos primeiros dias pós-parto, ou de metilprednisolona e difenidramina antes da 2ª infusão de hCT-MSC, os indivíduos não receberão terapia imunossupressora antes ou após a infusão de células hCT-MSC.

[00157] Os benefícios potenciais dessa intervenção incluem a possibilidade de que a HCT-MSC pode, por meio de mecanismos diretos ou indiretos, induzir alterações que resultem na redução das patologias relacionadas à HIE do indivíduo e na melhoria das habilidades afetadas pela lesão hipóxico-isquêmica, em particular, a função motora e/ou cognitiva.

Desenho do estudo – Desenho geral

[00158] Este estudo é um ensaio de fase I, prospectivo e aberto projetado para avaliar a segurança de uma ou duas doses intravenosas de hCT-MSC em recém-nascidos com HIE moderada a grave, que receberam hipotermia terapêutica. Crianças nascidas com 36 semanas de gestação ou mais que tenham encefalopatia hipóxico-isquêmica moderada a grave e que estejam recebendo hipotermia terapêutica serão elegíveis para participar. Todos os indivíduos receberão infusão(ões) intravenosa(s) de hCT-MSCs. A primeira coorte de três pacientes receberá uma única dose nas primeiras 48 horas pós-parto. Se não houver questões de segurança, a segunda coorte de três pacientes receberá duas doses, com a primeira dose dada nas primeiras 48 horas pós-parto e a segunda dose dada aproximadamente dois meses após a primeira dose. Todos os indivíduos serão tratados com hipotermia para encefalopatia neonatal moderada a grave, como indicado pelos consagrados critérios do Duke Intensive Care Nursery, com base nos critérios utilizados em ensaio clínico multissítio de otimização de hipotermia da rede de pesquisas neonatais do Eunice Kennedy Shriver NICHD (Shankaran et al., *JAMA*2014, 312(24):2629-2639). O principal desfecho é a segurança, para a qual serão avaliadas as reações agudas de infusão e incidência de infecções. As medidas de desfecho específicas da HIE, descritas abaixo, serão avaliadas na avaliação inicial e seis meses e um ano a partir da avaliação inicial, e os resultados serão descritos.

[00159] Um fluxograma do estudo é provido na figura 2.

Desenho do estudo - Desfechos do estudo

[00160] O desfecho primário deste estudo é a segurança, que incluirá a avaliação da incidência de reações agudas de infusão e infecções.

[00161] Além disso, as complicações relacionadas à HIE e a HIE serão avaliadas para descrever quaisquer alterações na condição após a administração do produto. Morte ou comprometimento moderado-grave será registrado coletado desfecho secundário. Isso será determinado com pontuações de Bayley III em todos os três domínios. Informaremos todas as pontuações de todos os bebês inscritos, e também informaremos quantos bebês sobreviveram com todas as três pontuações dos domínios da escala Bayley III maiores ou iguais a 85. Os desfechos de NICU também serão considerados desfechos secundários, incluindo a mortalidade, convulsões, hipertensão pulmonar, necessidade de óxido nítrico e necessidade de ECMO, necessidade de alimentação por tubos-G na alta e alta com prescrição de medicamentos antiepilépticos.

[00162] Desfechos primários de segurança: serão avaliados por:

1. Incidência de reações de infusão: para este estudo, as reações de infusão são definidas como reações anafiláticas ou anafilactoides com sinais clínicos incluindo erupções cutâneas, broncoespasmo, angioedema, enfartes do miocárdio, arritmias e lesão pulmonar aguda

2. Incidência de infecções: para este estudo, as infecções registradas como desfechos de segurança serão definidas como infecções bacterianas, virais ou fúngicas identificadas por cultura ou metodologias moleculares dentro de duas semanas após a administração da HCT-MSD.

[00163] Desfechos secundários/exploratórios:

Além das medidas de segurança, serão avaliados os seguintes desfechos específicos da HIE:

1. Morte antes da alta da internação hospitalar inicial

2. Necessidade de medicamentos antiepilépticos na alta em

casa

3. Necessidade de tubo-g ou outras alimentações não orais em alta em casa

4. Hipertensão pulmonar (definida pelo uso clínico de óxido nítrico inalado, iniciado após a infusão da HCT-MSD)

5. Necessidade de oxigenação extracorpórea por membrana (ECMO) por qualquer motivo, após infusão de hCT-MSD.

[00164] 6. Avaliações de 1 ano (12 a 16 meses pós-parto) na escala de Bayley III em relação ao desenvolvimento cognitivo, linguístico e motor.

Seleção e Retirada de Indivíduos da Pesquisa – População do Estudo

Seis recém-nascidos com HIE moderada a grave, recebendo hipotermia terapêutica para tratar HIE.

Seleção e Retirada de Indivíduos da Pesquisa – Critérios de inclusão

[00165] 36 0/7^a semanas de gestação ou mais velhos no momento do parto.

[00166] 2. Capaz de receber uma dose de hCT-MSDs nas primeiras 48 horas pós-parto, e para a segunda coorte de 3 bebês, estar disponível para a segunda infusão de células dois meses após a primeira infusão (alguns bebês podem estar internados neste momento).

[00167] 3. Disponibilidade para retornar para as avaliações de um ano.

[00168] 4. Sinais de encefalopatia dentro de 6 horas de idade utilizando a abordagem de duas etapas (A e B) utilizada no Estudo Network's Optimizing Hypothermia, com a decisão do médico de iniciar hipotermia terapêutica para tratar encefalopatia hipóxico-isquêmica moderada ou grave, conforme determinado pelo exame utilizado clinicamente para determinar a elegibilidade para a hipotermia terapêutica (Shankaran et al., *JAMA*2014, 312(24): 2629-2639). Os exames em Duke que são usados para determinar o uso de hipotermia são feitos por NNPs ou MDs que foram treinados e certificados para o ensaio Network's Optimizing Cooling, ou são discutidos e revisados por um examinador treinado. Os exames são documentados usando

uma “frase inteligente” no Duke Electronic Health Record.

[00169] Critérios detalhados de elegibilidade para hipotermia terapêutica:

- Os bebês serão avaliados em duas etapas; avaliação por critérios clínicos e bioquímicos (Etapa A, que é A1 ou A2, dependendo das informações disponíveis e gravidade das anormalidades de gasometria arterial), seguido de um exame neurológico (Etapa B)

- Uma vez que o bebê se encontre em A1 ou A2, prossiga para o exame neurológico. (Consulte a parte B)

- A presença de encefalopatia moderada/grave (um “2” ou um “3”), definida como convulsões OU presença de sinais em 3 das 6 categorias na tabela abaixo. Para as categorias com mais de um item, como REFLEXOS PRIMITIVOS, o item (SUCK, MORO) com a maior pontuação determina o nível de encefalopatia atribuído para essa categoria

- O exame neurológico será realizado por um médico legista, ou por um examinador não médico que revisou o exame de qualificação com o médico decidindo sobre o uso de hipotermia terapêutica.

[00170] Etapas A1 e A2. Todos os bebês serão avaliados quanto aos seguintes critérios:

1. O bebê está com pelo menos 36 semanas de gestação?

2. Existe um histórico de um evento perinatal agudo (descolamento da placenta, prolapso do cordão, anormalidade grave da FHR: desacelerações variáveis ou tardias)?

3. A pontuação do Apgar é menor que 5 em 10 minutos ou há uma necessidade contínua de ventilação iniciada ao nascer e continuada por pelo menos 10 minutos?

4. Qual é o pH do cordão umbilical ou o primeiro pH do gás sanguíneo pós-natal em menos de 1 hora?

5. Qual é o déficit base de gás no cordão umbilical ou no

primeiro gás sanguíneo pós-natal em menos de 1 hora?

[00171] Se o bebê atender aos critérios A1 ou A2 (consulte as tabelas 4 e 5 abaixo) e os critérios B, e se não atender aos critérios de exclusão, o bebê é elegível e, portanto, é elegível para a inclusão no estudo.

Tabela 4:

SE GÁS SANGUÍNEO ESTIVER DISPONÍVEL:	SE GÁS SANGUÍNEO NÃO ESTIVER DISPONÍVEL OU pH entre 7,0 e 7,15, OU DÉFICIT BASAL de 10 a 15,9 mEq/L
A1	A2
A resposta para o nº 1 é “SIM” E <input type="checkbox"/> pH do cordão umbilical ou primeiro gás sanguíneo pós-natal dentro de 1 hora com pH < 7,0 (nº 4) OU Déficit base de gás no cordão umbilical ou no primeiro gás sanguíneo pós-natal em 1 hora a > 16 mEq/l (nº 5)	A resposta para o nº 1 é “SIM” E <input type="checkbox"/> Evento perinatal agudo (nº 2) e <input type="checkbox"/> Uma pontuação de Apgar < 5 aos 10 minutos (nº 3) OU <input type="checkbox"/> Necessidade contínua de ventilação iniciada ao nascer e continuada por pelo menos 10 minutos (nº 3)

Tabela 5: Parte B: Avaliação Neurológica

CATEGORIA	SINAIS DE HIE EM CADA NÍVEL		
	Normal/HIE leve	HIE MODERADA	HIE GRAVE
1. NÍVEL DE CONSCIÊNCIA	1	2 = Letárgico	3 = Estupor/coma
2. ATIVIDADE ESPONTÂNEA	1	2 = Diminuição da atividade	3 = Sem atividade
3. POSTURA	1	2 = Flexão distal, extensão completa	3 = Descerebrado
4. TÔNUS	1	2a = Hipotonia (focal ou geral) 2b = Hipertonia	3a = Flácido 3b = Rígido
5. REFLEXOS PRIMITIVOS			
Chupa	1	2 = Fraco ou tem reflexo de mordida	3 = Ausente
Reflexo de Moro	1	2 = Incompleto	3 = Ausente
6. SISTEMA AUTÔNOMO			
Pupilas	1	2 = Constrito	3 = Desvio/dilatado/não reativo à luz
Frequência cardíaca	1	2 = Bradicardia	3 = FC variável
Respiração	1	2 = Respiração periódica	3 = Apneia ou requer ventilador 3a = em ventilação com respirações espontâneas 3b = em ventilação sem respirações espontâneas

Seleção e Retirada de Indivíduos da Pesquisa – Critérios de inclusão

- [00172]
1. Principais anormalidades congênicas ou cromossômicas
 2. Restrição grave de crescimento (peso ao nascer < 1800 g)

3. Opinião do neonatologista indivíduo de que o estudo pode interferir no tratamento clínico ou na segurança do indivíduo

4. Recém-nascidos moribundos para os quais nenhum tratamento adicional é planejado

5. Bebês cujas mães têm sorologias desconhecidas para hepatite B ou HIV

6. Bebês nascidos de mães que são conhecidas por terem HIV, hepatite B, hepatite C ou que têm sífilis ativa ou infecção por CMV na gravidez

7. Bebês suspeitos de sepse esmagadora

8. ECMO iniciado ou provável nas primeiras 48 horas de vida

9. TODOS os gases no sangue (cordão e pós-parto) feitos nos primeiros 60 minutos tiveram um pH > 7,15 E déficit basal < 10 mEq/L (a fonte pode ser arterial, venosa ou capilar)

10. Mãe com infecção por zika documentada durante esta gravidez

11. Disponibilidade de sangue do cordão umbilical autólogo coletado e utilizável no ensaio randomizado de células do sangue do cordão umbilical com quantidade de hemácias e volume reduzidos autólogo (clinicaltrials.gov identificador NCT02612155)

[00173] Sabendo que outras condições podem se desenvolver, e que as condições congênitas (herdadas ou adquiridas) podem se tornar evidentes antes da segunda infusão, os seguintes critérios de exclusão são adicionados aos 11 critérios listados acima e são aplicados à segunda infusão.

[00174] 1. Quadro infeccioso:

a. Infecção ativa conhecida do SNC

b. Evidência de infecção descontrolada com base em registros ou avaliação clínica

c. Conhecida positividade para o HIV

2. Quadro clínico:

- a. Distúrbio metabólico conhecido
 - b. Função de tireoide anormal conhecida (pacientes com hipotireoidismo tratado com TSH normal podem ser incluídos)
 - c. Disfunção mitocondrial conhecida
 - d. Histórico de epilepsia instável ou transtorno convulsivo descontrolado, espasmos infantis, síndrome de Lennox-Gastaut, síndrome de Dravet ou outro distúrbio de convulsão crônica semelhante
 - e. Malignidade ativa ou malignidade prévia que foi tratada com quimioterapia
 - f. Histórico de um distúrbio primário de imunodeficiência
 - g. Histórico de citopenias autoimunes (isto é, ITP, AIHA)
 - h. Condição médica coexistente que colocaria a criança em maior risco para complicações dos procedimentos de estudo
 - i. Doença genética ou adquirida ou comorbidade(s) simultânea(s) que poderia(m) exigir um futuro transplante de células-tronco
 - j. Problemas sensoriais significativos conhecidos (por exemplo, cegueira, surdez, deficiência auditiva não corrigida) ou deficiência motora
 - k. Função renal ou hepática prejudicada determinada pelos níveis de creatinina no soro $> 1,5$ mg/dl e/ou bilirrubina total $> 1,3$ mg/dl, exceto em pacientes com síndrome de Gilbert conhecida.
- [00175] 1. Anormalidades hematológicas significativas definidas como: hemoglobina $< 10,0$ g/dL, WBC < 3.000 células/ml, ALC $< 1000/ \mu$ l, plaquetas $< 150 \times 10^9/\mu$ l
- m. Evidências de dismorfologia física clinicamente relevante indicativas de uma síndrome genética avaliada pelos PIs ou outros pesquisadores, incluindo um geneticista médico e psiquiatras treinados na identificação de características dismórficas associadas a condições do

neurodesenvolvimento.

- [00176] 3. Terapia atual/anterior:
- a. Histórico de terapia celular prévia
 - b. Uso atual ou prévio de IVIG ou outros medicamentos anti-inflamatórios, com exceção de AINEs
 - c. Terapia imunossupressora atual ou anterior
 - d. Nenhuma terapia esteroide sistêmica que tenha durado > 2 semanas; esteroides tópicos e inalados são permitidos.

Seleção e Retirada dos Indivíduos da Pesquisa – Recrutamento de Indivíduos da Pesquisa e Triagem

[00177] Vamos examinar todos os bebês inscritos no Berçário de Terapia Intensiva do hospital universitário Duke que têm > 35 6/7^a semanas de gestação, para quem a equipe clínica decidiu de oferecer hipotermia terapêutica para tratar encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal moderada a grave, e o resfriamento foi ou será iniciado nas primeiras 6 horas pós-parto.

[00178] Se o sangue do cordão umbilical não foi coletado para o ensaio randomizado com admissão aberta de células do sangue do cordão umbilical autólogas para HIE neonatal (ver critérios de exclusão acima), os membros da equipe de cuidados clínicos introduzirão os conceitos básicos deste estudo de fase I de hCT-MSCs alogênicas à família do recém-nascido elegível. Caso a família tenha interesse em aprender mais sobre o estudo, os membros da equipe clínica entrarão em contato com a equipe de pesquisa. Um membro da equipe de pesquisa entrará em contato com a família do bebê potencialmente elegível para discutir o estudo em profundidade, e discutir o consentimento para a participação do bebê no estudo.

Seleção e Retirada do Indivíduo na Pesquisa – Retirada Antecipada da Pesquisa

Indivíduos

[00179] Critérios para remoção da terapia protocolar:

1. Diagnóstico de doença genética ou infecciosa enquanto estiver em avaliação ou no estudo.

[00180] 2. Alteração na condição médica que impede a participação no estudo.

[00181] Os pacientes recebendo terapias fora do protocolo devem ser acompanhados até atenderem aos critérios de saída do estudo (veja abaixo). Os dados de acompanhamento serão obtidos de indivíduos fora do protocolo, a menos que o consentimento seja retirado. Os indivíduos retirados do estudo antes do primeiro ou, caso pertençam à segunda coorte, da segunda infusão de hCT-MSC não serão avaliáveis e poderão ser substituídos por outros indivíduos.

[00182] Critérios de saída do estudo:

1. Morte.

[00183] 2. Perda de contato para acompanhamento

[00184] 3. Retirada do consentimento para qualquer coleta de dados adicional.

[00185] 4. Conclusão da consulta final do estudo.

Produtos do estudo - Células estromais mesenquimais derivadas do tecido do cordão umbilical humano (hCT-MSC)

[00186] hCT-MSCs são um produto de células alogênicas fabricadas a partir de tecido do cordão umbilical digerido que é expandido em cultura, criopreservado e colocado em banco. hCT-MSCs são fabricados a partir de tecido do cordão umbilical doado ao banco de sangue do cordão umbilical Carolinas Cord Blood Bank, um banco de sangue do cordão umbilical público, licenciado pela FDA e acreditado pela FACT do Duke University Medical Center, após obter o termo de consentimento informado por escrito da mãe do bebê. O tecido do cordão é colhido das placentas de bebês do sexo masculino, nascidos por cesariana eletiva após uma gravidez normal e a termo. Os questionários de triagem de doadores são preenchidos pela doadora

materna, e o sangue materno é testado para doenças transmissíveis pelo laboratório de triagem de doadores certificado pela CLIA na Cruz Vermelha Americana em Charlotte, NC. Os doadores devem ser elegíveis para doação a um banco de sangue do cordão umbilical público para uso alogênico. Após a entrega da placenta e do cordão umbilical, o sangue do cordão é drenado assepticamente da placenta. Em seguida, o cordão é seco e limpo com cloropreps, separado da base da placenta, colocado em uma garrafa estéril contendo plasmalite A e transportado para o laboratório de processamento de células Marcus Center for Cellular Cures (MC3) que segue as BPF, à temperatura ambiente em um recipiente validado.

[00187] No ambiente de fabricação de salas limpas, em uma cabine de biossegurança, o tecido do cordão umbilical é removido do meio, colocado em pratos estéreis, cortado em pequenos pedaços e depois picado e digerido no dissociador Miltenyi Biotec GentleMacs Octo com enzimas de grau BPF: hialuronidase, DNase, collagenase, papaína. A suspensão celular resultante é colocada em cultura em meio Prime XV MSC Expansion XSFM (Irvine Scientific) com 1% de lisado de plaquetas, e foi cultivada até a confluência (~ 7 a 14 dias) para estabelecer a cultura P0. Para estabelecer o banco de células mestre, a P0 é coletada e criopreservada em criofrascos com meio Cryostor 10 (BioLife), e armazenada na fase de vapor de nitrogênio líquido. As culturas P1 e P2 são cultivadas em condições semelhantes, em *hyperflasks* ou *hyperstacks* sem plaquetas, conforme necessário, para criar o banco de células de trabalho e o produto para administração, respectivamente. As células de P1 e P2 são removidas do aparato de cultivo usando TrypLE (Gibco). O produto final é derivado das culturas P2, que são coletadas em plasmalite com albumina de soro humano a 5%, lavadas e criopreservadas em 5 criobolsas compartimentadas (Syngen) em 5 ml contendo 50 a 100 milhões de células em uma concentração final de 10% de DMSO com dextrana (Akron Scientific). No dia da administração, um compartimento é descongelado,

diluído em 6 a 9 ml de solução IV de plasmalite-A + HSA 5%, colocado em uma seringa ou bolsa e transportado para o leito para administração durante 30 a 60 minutos.

[00188] Em cada passagem, o produto celular é distinguido pela avaliação do fenótipo de superfície celular por citometria de fluxo e ensaios funcionais através da proliferação de células T e modelos organotípicos de ativação da micróglia. Cada lote, antes da criopreservação de P2, também será testado quanto à esterilidade, endotoxina e micoplasma, e esses testes devem atender às especificações. Para dosagem, os testes de liberação após o descongelamento e diluição incluirão TNCC e viabilidade via celômetro, coloração de gram e análise de endotoxinas. Os pacientes serão dosados com 2×10^6 hCT-MSCs/kg, com base na contagem pós-descongelamento.

[00189] Um lote de hCT-MSCs será selecionado para este ensaio clínico. O lote será testado em 1 a 2 pacientes em cada nível de dose, de acordo com a tabela 6 abaixo. Um total de 6 indivíduos serão tratados com 2 regimes de dosagem. Para os três indivíduos que estão previstos para receber duas doses, cada dose será composta por 2×10^6 hCT-MSCs/kg, e as doses serão dadas com dois meses de intervalo.

Tabela 6

	Nº do Paciente	Nº de Doses	Nº do Lote de hCT-MSC
Coorte 1	1	1	1
	2	1	1
	3	1	1
Coorte 2	4	2	1
	5	2	1
	6	2	1

Produto do estudo - Triagem e Teste de Doadores

[00190] Como o tecido do cordão umbilical utilizado para este estudo será obtido de doadores consentidos para doação de sangue do cordão umbilical ao Carolinas Cord Blood Bank, eles serão submetidos a triagem de doadores e teste de doenças infecciosas, de acordo com os procedimentos operacionais padrão do Carolinas Cord Blood Bank. As amostras maternas

associadas ao sangue do cordão umbilical e as amostras de MSC de tecido do cordão umbilical serão retidas como amostras de referência para testes futuros como parte deste estudo.

[00191] A triagem e o teste de doadores são realizados por procedimentos operacionais padrão do Carolinas Cord Blood Bank para atender a todos os requisitos na Parte 1271 do 21CFR. A triagem e o teste estão atualizados com recomendações e aprovados pela FDA sob o número de licença biológica 1870. As doadoras maternas de sangue do cordão umbilical são triadas e testadas para HIV-1, HIV-2, vírus da hepatite B (HBV, antígeno superficial e principal), vírus da hepatite C (HCV), *Treponema pallidum* (sífilis), CJD (apenas triagem), Doença de Chagas, vírus T-linfotrópico humano tipos 1 e 2 (HTLV-1, HTLV-2) e CMV. Os testes de ácido nucleico para HIV-1/2/O, HBV, WNV e HCV também são realizados no sangue materno. Também são realizadas a triagem e o teste das doadoras maternas para o Zika vírus.

Produto do estudo – Processo e formulação final

[00192] hCT-MSD é fabricado a partir de um único tecido de cordão umbilical em uma série de três etapas que geram um banco de células mestre, um banco de células de trabalho e o produto do estudo. O produto para cada etapa é congelado e armazenado em fase de vapor em um congelador de nitrogênio líquido. Em P2, uma criobolsa representativa será descongelado e qualificada antes da infusão nos indivíduos do estudo com esse lote de produto. Os testes incluirão contagem de células, viabilidade, fenótipo, ensaios funcionais, endotoxina, micoplasma, coração de gram e esterilidade.

[00193] No dia da infusão, as células são descongeladas de acordo com o POP CT2-MSD-006, diluídas em 10 a 40 ml de plasmalite-A + HSA 5%, e uma alíquota é removida para a contagem de células e análises de viabilidade e cultura de esterilidade. Se as células forem $\geq 70\%$ viáveis, o volume final do produto é ajustado para prover 2×10^6 células/kg ao indivíduo do estudo. As

células são entregues ao leito em uma bolsa ou seringa contendo plasmalite A, HSA 5% e DMSO residual. Qualquer suspensão celular removida é inoculada em garrafas de cultura aeróbica e anaeróbica para testes de esterilidade. As células têm um prazo de validade de quatro horas após o descongelamento.

[00194] O produto final de HCT-MSD será liberado condicionalmente para administração ao paciente após o teste de contagem de células e viabilidade após o descongelamento. A liberação final ocorrerá após o período de cultura de esterilidade de 14 dias para o produto do estudo. Caso uma cultura de esterilidade se tornar positiva após a administração do produto, o organismo será identificado e as sensibilidades a antibióticos serão realizadas. Os clínicos que cuidam dos bebês no estudo serão informados dos resultados da cultura pela equipe do estudo. Para a 2ª infusão, que para alguns bebês poderia ocorrer em um ambiente ambulatorial, a família do paciente será contatada para determinar se eles são sintomáticos (por exemplo, têm febre). Os médicos que prestarem assistência básica aos indivíduos avaliarão a necessidade de avaliação clínica e tratamento. Todos os pacientes que recebem um produto com teste de esterilidade positivo subsequente serão acompanhados com contato diário por um membro da equipe de estudo por 14 dias após o teste positivo de esterilidade ser notado.

Produtos do Estudo - Embalagem de Produtos do Estudo

[00195] Todos os tecidos do cordão umbilical receberão um rótulo de código de barras ISBT Demand 128 ou identificador exclusivo, que será utilizado nos produtos de hCT-MSD em processo e finais. Além disso, a instalação MC3 que adota as BPF proverá um rótulo final do produto para cada produto de hCT-MSD. O rótulo do produto incluirá um espaço para fixar o rótulo do código de barras, bem como um espaço para o número do indivíduo, data e hora do vencimento do produto e quaisquer outras informações pertinentes. Quando um indivíduo é inscrito, ele recebe um número de indivíduo que o vinculará ao número de código de barras ISBT de

12 dígitos atribuído ao tecido de sangue do cordão umbilical. O produto final receberá um número de lote (número de operação de fabricação), bem como a data e hora de validade que serão informados no Certificado de Análise e no rótulo do produto. O número do indivíduo e o número do código de barras ISBT do produto também serão listados no Certificado de Análise. Todos os produtos serão transportados do laboratório que segue as BPF do Marcus Center for Cellular Cures para o berçário de terapia intensiva (para a primeira dose) ou para o Hospital Valvano Day (2ª dose se o bebê for dosado como um paciente ambulatorial) em um refrigerador validado pela transportadora.

Produto do estudo – Triagem da Mãe do Receptor

[00196] Como os bebês inscritos no estudo receberão um produto de células, as regulamentações exigem que as mães de bebês receptores de células sejam examinadas como se seu filho estivesse doando para o banco de sangue do cordão umbilical. Todos os testes descritos para as mães doadoras de tecido de cordão umbilical também são necessários para as mães dos bebês inscritos (amostras de sangue para HIV-1, HIV-2, vírus da hepatite B (HBV, antígeno de superfície e núcleo), vírus da hepatite C (HCV), *Treponema pallidum* (sífilis), CJD (somente triagem), Chagas, vírus T-linfotrópicos humanos tipos 1 e 2 (HTLV-1, HTLV-2) e CMV. Testes de ácido nucleico para HIV-1/2/O, HBV, WNV e HCV e zika vírus). As mães de bebês inscritos também devem responder e preencher o questionário de saúde preenchido pelas mães que proveem permissão para que o sangue do cordão umbilical ou o tecido do cordão umbilical seja coletado, processado e armazenado e/ou utilizado alogenicamente. AS amostras obtidas serão retidas como amostras de referência para testes futuros como parte deste estudo.

Produtos do Estudo - Administração do Produto do Estudo

[00197] Para os bebês que atenderem aos critérios de admissão, a primeira dose das células será infundida por via intravenosa o mais rápido possível, com o objetivo sendo nas primeiras 48 horas pós-natal, durante a

hipotermia terapêutica. Para a primeira infusão, os bebês serão pré-tratados com hidrocortisona, a 1 mg/kg IV durante 30 a 60 minutos antes de cada infusão, caso o indivíduo não esteja recebendo hidrocortisona para fins clínicos. Os sinais vitais (frequência cardíaca, pressão arterial, temperatura, frequência respiratória) serão monitorados no berçário de cuidados intensivos, conforme for clinicamente indicado. A oximetria de pulso será monitorada continuamente durante toda a infusão e por pelo menos 60 minutos após a infusão. Os indivíduos serão observados e os sinais vitais serão registrados a cada 15 minutos após a infusão durante a primeira hora, e em seguida documentados quanto ao padrão de cuidado pelas próximas quatro horas.

[00198] Para a segunda infusão, alguns indivíduos do estudo podem ter recebido alta para suas casas. Esses pacientes serão admitidos no centro de infusão no dia de sua infusão programada. Os pacientes podem necessitar de alguma sedação antes da colocação IV, se não conseguirem permanecer parados ou cooperar. Uma injeção IV periférica será aplicada pela equipe clínica ou do estudo. Os pacientes serão pré-medicados com difenidramina 0,5 mg/kg/dose IV e metilprednisolona 0,5 a 1mg/kg IV, por procedimentos padrão para infusões de células pós-neonatais. As hCT-MSCs serão administradas por via intravenosa ao longo de 30 a 60 minutos. Os sinais vitais (frequência cardíaca, pressão arterial, temperatura, frequência respiratória) serão monitorados na chegada à clínica e como for clinicamente indicado. A oximetria de pulso será monitorada continuamente durante toda a infusão e por pelo menos 5 minutos após a infusão. Os pacientes serão observados durante pelo menos uma hora após a infusão.

Produtos do Estudo – Acompanhamento de Segurança

[00199] No primeiro dia após cada infusão, o indivíduo será atendido pela equipe do estudo para avaliar qualquer reação adversa relacionada à infusão ou complicações. Para os indivíduos recebendo a 2ª infusão, a equipe de estudo acompanhará o pai ou responsável por telefone ou e-mail 1 dia após

a infusão. Aos 14 dias após cada administração de hCT-MSK, um membro da equipe de estudo entrará em contato com a equipe clínica (caso o paciente ainda esteja internado no berçário de cuidados intensivos), bem como com os pais ou responsáveis por telefone ou e-mail para avaliar o estado do paciente e quaisquer eventos adversos. Um questionário será aplicado em 2 semanas e 2, 6 e 12 meses após a dose inicial para avaliar eventos adversos graves.

Plano do Estudo - Visão Geral

[00200] Os pais/responsáveis que tiverem um recém-nascido que atendam aos critérios de inclusão serão notificados pela equipe clínica que cuida do seu bebê de que este estudo está disponível. Após o contato inicial, os pais/responsáveis dos potenciais indivíduos da pesquisa terão uma entrevista por telefone ou presencial inicial com a equipe do estudo para descrever o estudo, verificar critérios básicos de elegibilidade e confirmar seu interesse na participação.

[00201] Uma vez concluída a triagem e o paciente atender aos critérios do estudo, o estudo será apresentado à família pela equipe clínica. A equipe de estudo tentará obter o consentimento esclarecido pela equipe de pesquisa se os pais manifestaram interesse no estudo para a equipe clínica. Se a criança for considerada elegível e os pais concordarem, ele/ela será matriculado(a) no estudo e programado(a) para receber infusão(ões) de hCT-MSK(s). Os indivíduos serão avaliados no dia seguinte após cada infusão pessoalmente ou por telefone e os cuidadores de leito e/ou pais serão contatados 14 dias após cada infusão para fins de avaliação de segurança de acompanhamento. Os três segundos indivíduos, se receberem alta hospitalar, retornarão ao Duke para receberem a infusão programada de HCT-MSK e para fins de monitoramento 2 meses após a infusão de células nas primeiras 48 horas pós-parto. Todos os indivíduos retornarão à Clínica de Cuidados Especiais Infantis do Hospital Duke para realizarem avaliações de acompanhamento aos seis meses e um ano após receberem a dose inicial para repetidas avaliações de

neurodesenvolvimento e de acompanhamento de segurança.

Plano do Estudo - Triagem do Paciente

[00202] Uma renúncia à autorização da HIPAA e consentimento informado serão solicitados para permitir que a equipe do estudo faça a triagem das admissões no berçário de cuidados intensivos para bebês que atendem aos critérios de inclusão e não apresentam os critérios de exclusão. Se não forem identificados critérios de exclusão, a equipe do estudo entrará em contato com os médicos que cuidam do potencial indivíduo para discutir a elegibilidade do ensaio clínico. Um paciente deve ser aprovado tanto pela equipe de estudo quanto pela equipe clínica para prosseguir com a inclusão no estudo. Caso surja uma preocupação com uma condição não diagnosticada ou um achado genético anteriormente não diagnosticado durante o processo de triagem, isso será discutido com os pais/guardiões do paciente e um encaminhamento será feito para um provedor de cuidados médicos ou psiquiátricos adequado para avaliação e tratamento, se for indicado.

Plano de Estudo – Infusão de hCT-MSC

[00203] Todos os indivíduos receberão pelo menos uma infusão de células hCT-MSC alogênicas. No dia da infusão, as células hCT-MSC serão descongeladas e preparadas pelo laboratório MC3 que segue as BPF de acordo com o procedimento operacional padrão e preparadas para infusão do paciente no berçário de cuidados intensivos do hospital Duke, ou na clínica sob a supervisão da equipe de estudo e da equipe do programa pediátrico de transplante de sangue e medula. Serão obtidos sinais vitais na avaliação inicial (frequência cardíaca, pressão arterial, temperatura, frequência respiratória). Se uma injeção IV não estiver disponível para uso para infusão dos hCT-MSCs, uma IV periférica será colocada pelo corpo clínico, anestesista ou um membro da equipe de estudo.

[00204] Antes da infusão das células, serão administradas pré-medicações (hidrocortisona para a primeira infusão em 48 horas pós-natal, e

difenidramina e metilprednisolona para a infusão em dois meses). As hCT-MSCs serão infundidas ao longo de 30 a 60 minutos. A criança será observada no berçário de cuidados intensivos, ou na clínica por um mínimo de 1 hora após a infusão. Serão providos fluidos IV (D5 1/2 NS) em 1,5 da dose de manutenção.

[00205] Os pacientes recebendo a dose de dois meses terão alta da clínica após pelo menos uma hora, desde que todos os sinais vitais estejam tal como em sua avaliação inicial e estejam assintomáticos com nenhuma evidência de toxicidade. Os pacientes serão avaliados pela equipe do estudo no dia seguinte após a infusão para avaliar quaisquer reações adversas ou complicações relacionadas à infusão. Uma ligação telefônica para os pais/responsáveis pela equipe de estudo para avaliar a segurança da infusão será feita 14 dias após a infusão.

[00206] Para a infusão de dois meses, se um paciente tiver sintomas de doença no dia da infusão planejada, incluindo, mas sem se limitar, a febre > 38,5° C, vômito, diarreia ou problemas respiratórios, a infusão será adiada.

Plano do Estudo - Cuidados durante eventos inesperados

[00207] Caso o paciente desenvolva sinais ou sintomas de anafilaxia, incluindo urticária, dificuldade para respirar ou agravamento do estado respiratório (aumento no suporte respiratório, aumento absoluto de fiO_2 de mais de 10% durante a infusão; necessidade de iniciar óxido nítrico inalado durante a infusão), tosse, chiado ou vômito durante sua infusão de hCT-MSCs, a infusão será interrompida e a terapia médica apropriada será iniciada.

Plano de Estudo – Testes de laboratório na avaliação inicial

[00208] Serão realizadas as seguintes avaliações laboratoriais iniciais:

Avaliação inicial materna

- [00209]
- Sangue materno para teste do painel de doadores ARC
 - Questionário de história médica da doadora materna ARC

Avaliação inicial de todos os indivíduos antes da dose administrada nas

primeiras 48 horas pós-natal

- [00210] • Tipagem HLA do indivíduo (por zaragatoa bucal)
- CBC com contagem diferencial (parte do padrão de cuidados)
- Quadro químico, incluindo bilirrubina (parte do padrão de cuidados)
- Tipo e triagem (parte do padrão de cuidados)

Coorte 2 de indivíduos – Segunda infusão; exames laboratoriais elaborados antes da segunda infusão aos 2 meses de idade.

- [00211] • CBC com contagem diferencial
- Quadro metabólico completo
- Quadro de anticorpos reativos

Monitoramento durante e após as infusões – sinais vitais

[00212] Os sinais vitais serão avaliados antes da infusão, durante 60 minutos após a infusão e, posteriormente, de acordo com a rotina hospitalar.

Monitoramento durante e após as infusões – estado metabólico

[00213] Os perfis químicos são obtidos rotineiramente em bebês com HIE moderada a grave, quando são tratados com hipotermia. As análises de eletrólitos de soro, hemograma, ureia e creatinina, e os testes frequentes de função hepática são monitorados na avaliação inicial e, em seguida, diariamente. Registraremos os resultados dos laboratórios metabólicos coletados para fins clínicos durante o período de resfriamento e nas primeiras 24 horas após o reaquecimento nos formulários de relato de caso.

Monitoramento durante e após as infusões – estado respiratório

[00214] O monitoramento dos níveis de gás sanguíneo diário é padrão em bebês com HIE moderada a grave. Os resultados dos gases sanguíneos diários obtidos para fins clínicos durante o resfriamento e nas primeiras 24 horas após o reaquecimento serão coletados nos formulários de relato de caso.

Monitoramento durante e após as infusões – estado neurológico

[00215] Uma avaliação neurológica será realizada na avaliação inicial, diariamente durante o resfriamento e na alta. Ela será realizada por um examinador treinado.

Monitoramento durante e após as infusões – estado hematológico

[00216] O monitoramento dos estudos de coagulação é considerado rotineiro para bebês com HIE. Os resultados de PT/PTT obtidos para fins clínicos durante o resfriamento e nas primeiras 24 horas após o reaquecimento serão registrados nos formulários de relato de caso.

Monitoramento durante e após as infusões – neurovisualização

[00217] Uma ressonância magnética é obtida rotineiramente em bebês com HIE. Os resultados da ressonância magnética de padrão de cuidado serão registrados para o estudo, e registraremos e relataremos os resultados em termos de pontuações de lesões desenvolvidas pela rede de pesquisas neonatais NICHD (NRN) a serem extraídas das interpretações clínicas das imagens (Shankaran et al., *Archives of Disease in Childhood, Fetal and Neonatal Edition* 2012, 97(6):F398-404).

Monitoramento durante e após as infusões – avaliações pós-infusão

[00218] Avaliações pós-infusão:

- Avaliação 24 horas pós-infusão
- 14 dias após cada infusão: questionário (por telefone ou pessoalmente).

[00219] • 2 meses de idade: questionário (por telefone ou pessoalmente).

[00220] • 6 meses de idade: na avaliação presencial, incluindo estudos laboratoriais em amostras obtidas de todos os indivíduos (CBC c/diff, CMP, Coombs direto e indireto, PRA) e questionário.

[00221] • 12 a 16 meses de idade: na avaliação presencial, incluindo o exame na escala Bayley III, e exames laboratoriais (CBC c/diff, CMP, Coombs direto e indireto, PRA) e questionário.

Considerações estatísticas - Desenho do estudo

[00222] Este estudo é um ensaio de fase I, prospectivo e aberto projetado para avaliar a segurança de uma e duas doses intravenosas de hCT-MSD em recém-nascidos com HIE moderada a grave. Os recém-nascidos com HIE neonatal moderada a grave, que são tratados com hipotermia terapêutica, podem ser elegíveis para participar. Todos os indivíduos receberão infusão(ões) intravenosa(s) de hCT-MSD. A primeira coorte de três pacientes receberá uma única dose. Se não houver preocupações de segurança, a segunda coorte de três pacientes receberá uma segunda dose, dada com aproximadamente dois meses de idade. O principal desfecho é a segurança, para a qual as reações agudas de infusão e incidência de infecções serão avaliadas a partir de dados coletados durante a internação hospitalar, e a partir de levantamentos feitos por telefone e presenciais. Serão avaliados os sinais vitais, bem como os desfechos metabólicos, respiratórios, neurológicos e hematológicos, descritos acima. Assim como os desfechos de neurodesenvolvimento em doze (12 – 16) meses após a infusão inicial de hCT-MSD, e os resultados serão descritos.

Considerações Estatísticas – Admissões

[00223] Estima-se que aproximadamente um indivíduo da pesquisa será inscrito por mês, e que uma admissão durante 6 a 8 meses será necessária para inscrever 6 indivíduos. Para garantir que os potenciais riscos aos indivíduos relacionados ao tratamento do estudo sejam minimizados, um intervalo de pelo menos um mês será observado após a dose final em uma coorte antes que a dose final seja dada ao primeiro indivíduo na coorte subsequente. Por exemplo, haverá pelo menos um mês entre o momento em que o indivíduo nº 3 (último indivíduo na coorte 1) recebe a infusão de hCT-MSD e o momento em que o indivíduo nº 4 (primeiro indivíduo na coorte 2) recebe a segunda infusão de hCT-MSD.

Considerações estatísticas - Duração do estudo

[00224] Os indivíduos da pesquisa serão acompanhados por motivos de segurança por 10 a 12 meses após a administração de sua dose final de hCT-MSD. Eles responderão a questionários de acompanhamento em 14 dias após cada infusão e em 2 meses para avaliar os resultados de segurança e o progresso geral, se alguma consulta de rotina for perdida ou remarcada. Há avaliações presenciais aos 6 e 12 (12 a 16 meses), que são as épocas para consultas clínicas habituais com a clínica de cuidados especiais infantis, para avaliar o progresso.

Considerações estatísticas – Características demográficas e do início do estudo

[00225] As características demográficas e do início do estudo serão resumidas para todos os indivíduos da pesquisa. Serão registradas características maternas, incluindo idade da mãe, estado paritário/raça da grávida. As complicações da gravidez a serem registradas incluem hipertensão crônica, diabetes tipo 1 ou tipo 2, hiper ou hipotireoidismo, pré-eclâmpsia e hemorragia pré-parto).. Serão registrados medicamentos tomados pela mãe (crônicos e intraparto). Serão registradas complicações do parto materno (desaceleração da frequência cardíaca fetal, prolapso do cordão umbilical, ruptura uterina, descolamento prematuro da placenta, pirexia materna, distocia de ombro e hemorragia materna). As características dos indivíduos do estudo a serem examinadas incluem idade gestacional, sexo, raça/etnia e nível básico de encefalopatia (moderada ou grave, com base nos critérios do estudo NICHD), estado inato vs. adquirido, pontuações de Apgar aos 1, 5, 10, 15 e 20 minutos, dados de avaliação de gás sanguíneo e avaliação neurológica. Detalhes da ressuscitação também serão registrados (necessidade de pressão positiva e ventilação mecânica, necessidade de medicamentos durante ressuscitação, resfriamento e infusões celulares). Serão registradas necessidades de medicação e ventilação durante o resfriamento, com suporte respiratório específico e uso de medicamentos no momento da primeira

infusão.

Considerações estatísticas - Desfecho primário

[00226] A principal medição de segurança será a incidência de reações de infusão e infecções pós-infusão. Isso será avaliado no momento da infusão, 24 horas após cada infusão, 14 dias após cada infusão, após qualquer avaliação de retorno pela equipe clínica e aos seis meses após cada uma das infusões finais dos seis indivíduos (os três primeiros terão apenas uma infusão, de modo que as infecções e reações de infusão serão coletadas e relatadas por 12 meses após esta única infusão, com o segundo registro na consulta de avaliação do neurodesenvolvimento de 12 a 16 meses. Para os três segundos bebês que recebem uma segunda infusão aos 2 meses, as reações de infecções e de infusão serão coletadas e relatadas até o indivíduo ter 12 a 16 meses de idade. Os resultados dos desfechos primários e secundários serão relatados descritivamente.

Considerações estatísticas - Tamanho da amostra e cálculos de potência

[00227] Dado o desenho do estudo, o tamanho amostral selecionado baseia-se no julgamento clínico, e não em considerações estatísticas.

Considerações estatísticas - Desfechos secundários

[00228] Os desfechos de eficácia secundária incluem avaliações de sobrevivência e neurodesenvolvimento doze meses (12 a 16 meses de idade) após a primeira/última dose, idade na alta, exame neurológico na alta, necessidade de administração de antiepiléticos na alta hospitalar, alimentação não oral na alta hospitalar, hipertensão pulmonar confirmada por ecocardiograma e definida pela necessidade de óxido nítrico inalado e necessidade de ECMO.

[00229] Para avaliações de neurodesenvolvimento, os bebês terão avaliações de neurodesenvolvimento na escala de Bayley III em 3 domínios: desenvolvimento motor, cognitivo e linguístico.

[00230] Os desfechos exploratórios serão relatados usando as tabelas

de resumo, números e listas de dados. Os resultados serão resumidos utilizando estatísticas descritivas e testes estatísticos, conforme apropriado. Os desfechos secundários contínuos serão resumidos utilizando a média, desvio padrão, CV%, mediana, o mínimo e o máximo. Também serão providos resumos de alterações a partir da avaliação inicial para incluir intervalos de confiança de 95% e valores de p associados ao teste t pareado. Se os dados não forem normalmente distribuídos, usaremos uma transformação para aproximar uma distribuição normal ou usar um teste não paramétrico. As alterações em relação à avaliação inicial serão avaliadas quanto aos sinais vitais antes, durante e depois das infusões celulares.

[00231] Os desfechos exploratórios categóricos serão resumidos apresentando o número (frequência) e a porcentagem em cada categoria. Os dados categóricos serão apresentados nas tabelas como frequências e porcentagens. Podem ser providas tabelas de desvio para alterações em relação à avaliação inicial dos resultados categóricos, sempre que for necessário. As características a serem avaliadas para mudanças ao longo do tempo incluem se os bebês que não foram mecanicamente ventilados antes das células precisaram de ventilação mecânica ou não, se os bebês que não receberam óxido nítrico receberam óxido nítrico e se os bebês que não tomaram medicamentos anticonvulsivos foram posteriormente diagnosticados com convulsões e foram tratados com medicamentos anticonvulsivos.

[00232] Todos os testes estatísticos usarão um nível alfa de 0,05 para declarar a significância. Para os desfechos de eficácia secundários, não há ordem hierárquica pré-especificada para avaliação, e não serão realizados ajustes do nível de significância para testes múltiplos.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para tratar um paciente com paralisia cerebral, caracterizado pelo fato de que compreende administrar uma quantidade terapêuticamente eficaz de células estromais mesenquimais derivadas de cordão umbilical humano alogênico (hCT-MSCs) ao paciente.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as hCT-MSCs são administradas sistematicamente.

3. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que as hCT-MSCs são administradas por via intravenosa.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as hCT-MSCs são administradas três vezes em um período de seis meses ao paciente.

5. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que as hCT-MSCs são administradas na avaliação inicial, em três meses, e em seis meses ao paciente.

6. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as hCT-MSCs são administradas em uma dose de pelo menos cerca de 2×10^6 /kg ao paciente.

7. Método para tratar um paciente com encefalopatia hipóxico-isquêmica (HIE), caracterizado pelo fato de que compreende administrar uma quantidade terapêuticamente eficaz de células estromais mesenquimais derivadas de cordão umbilical humano alogênico (hCT-MSCs) ao paciente.

8. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que as hCT-MSCs são administradas sistematicamente.

9. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que as hCT-MSCs são administradas por via intravenosa.

10. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que as hCT-MSCs são administradas três vezes em um período de seis meses ao paciente.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que as hCT-MSCs são administradas na avaliação inicial, em três meses, e em seis meses ao paciente.

12. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que as hCT-MSCs são administradas em uma dose de pelo menos cerca de 2×10^6 /kg ao paciente.

13. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o paciente com HIE é um recém-nascido com 36 semanas de gestação ou mais, que sofre de encefalopatia neonatal hipóxico-isquêmica moderada a grave.

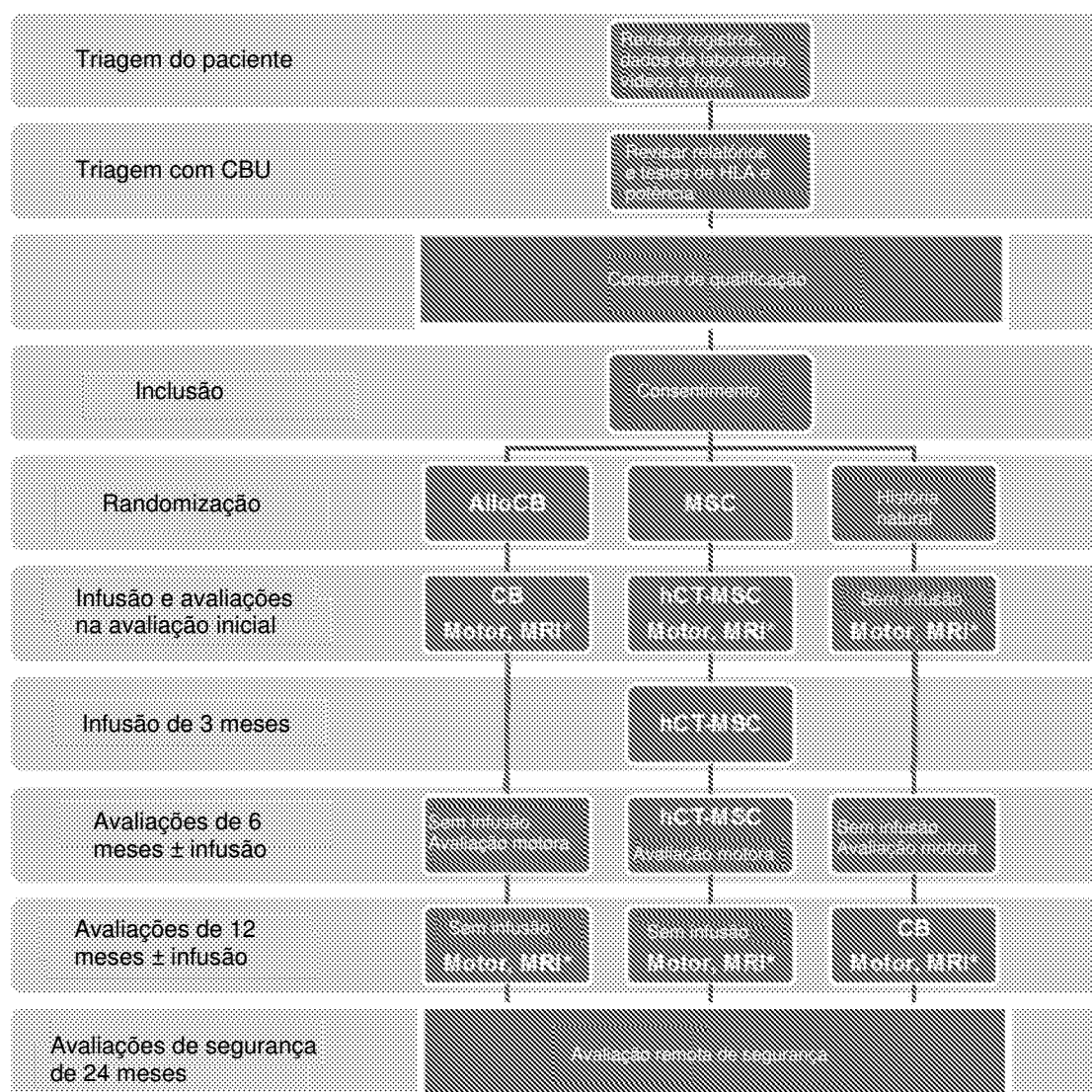
14. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que as hCT-MSCs são administradas em uma dose única nas primeiras 48 horas pós-natal ao paciente.

15. Método de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que uma segunda dose de hCT-MSCs aproximadamente dois meses após a primeira dose é administrada ao paciente.

16. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que as hCT-MSCs são administradas sistematicamente.

17. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que as hCT-MSCs são administradas por via intravenosa.

18. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que as hCT-MSCs são administradas em uma dose de pelo menos cerca de 2×10^6 /kg ao paciente.



*A ressonância magnética será realizada em um subconjunto de indivíduos

Figura 1.

hCT-MSD em HIE

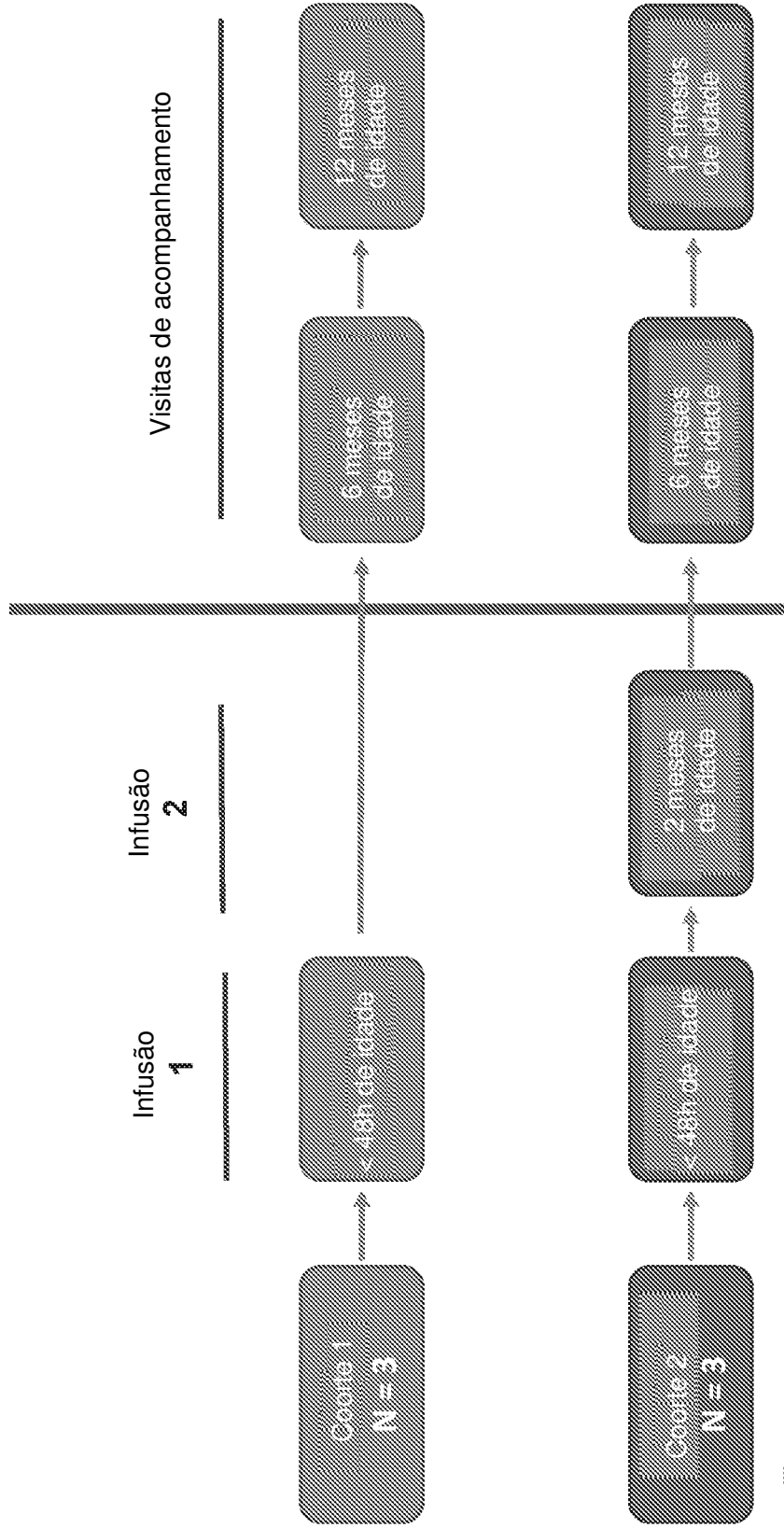


Figura 2.

RESUMO

MÉTODOS PARA TRATAR UM PACIENTE COM PARALISIA CEREBRAL E UM PACIENTE COM ENCEFALOPATIA HIPÓXICO-ISQUÊMICA

A presente invenção refere-se aos métodos para tratar paralisia cerebral e encefalopatia hipóxico-isquêmica usando células estromais mesenquimais derivadas de tecido de sangue do cordão umbilical.