

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie - 4.5.2011

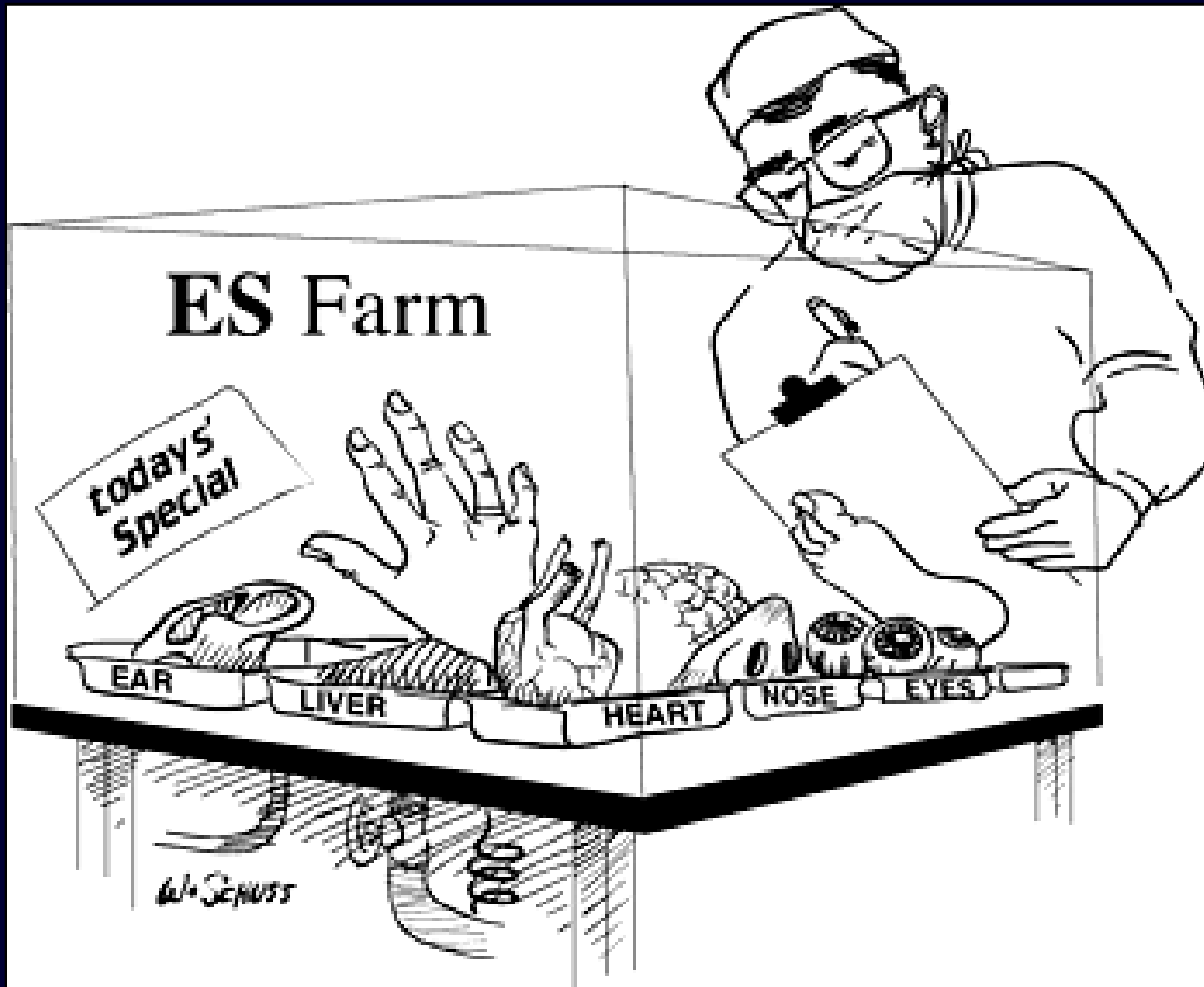
Buněčné terapie

doc. RNDr. Renata Veselská, Ph.D., M.Sc.
Ústav experimentální biologie
Přírodovědecká fakulta MU



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky



Regenerativní medicína

= lékařské postupy, které umožňují tělu opravit, nahradit nebo regenerovat poškozené nebo nemocné buňky, tkáně a orgány

- buněčné terapie
- tkáňové inženýrství
- biomateriálové inženýrství
- produkce růstových faktorů
- transplantační medicína

Buněčné terapie

Definice FDA (Federal Drug Agency, USA):

- prevence, léčba, odstranění nebo zmírnění onemocnění nebo poškození lidského organismu aplikací autologních, allogeních nebo xenogenních buněk, které byly zpracovány nebo změněny *ex vivo*
- **autologní buňky** = buňky téhož organismu
- **allogenní buňky** = buňky jiného organismu téhož živočišného druhu
- **xenogenní buňky** = buňky jiného živočišného druhu

Program přednášky:

- genové terapie
- imunoterapie nádorů
- příprava orgánových, tkáňových a buněčných derivátů *in vitro*
- využití adultních a embryonálních SCs

GENOVÉ TERAPIE

Metody:

- náhrada exprese patologického genu
- oprava defektního genu *in situ*
- náhrada patologického genu normálním genem

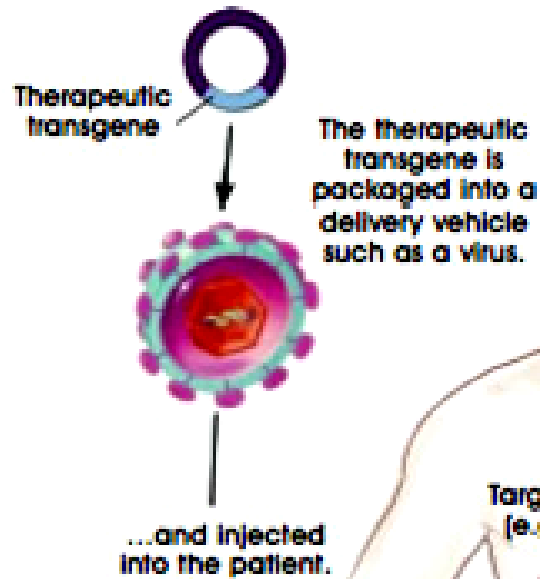
Terapie *ex vivo* (cell-based delivery):

- odběr buněk pacienta, kultivace, genetická změna *in vitro*, pomnožení, reimplantace
- deficit ADA, familiární hypercholesterolémie

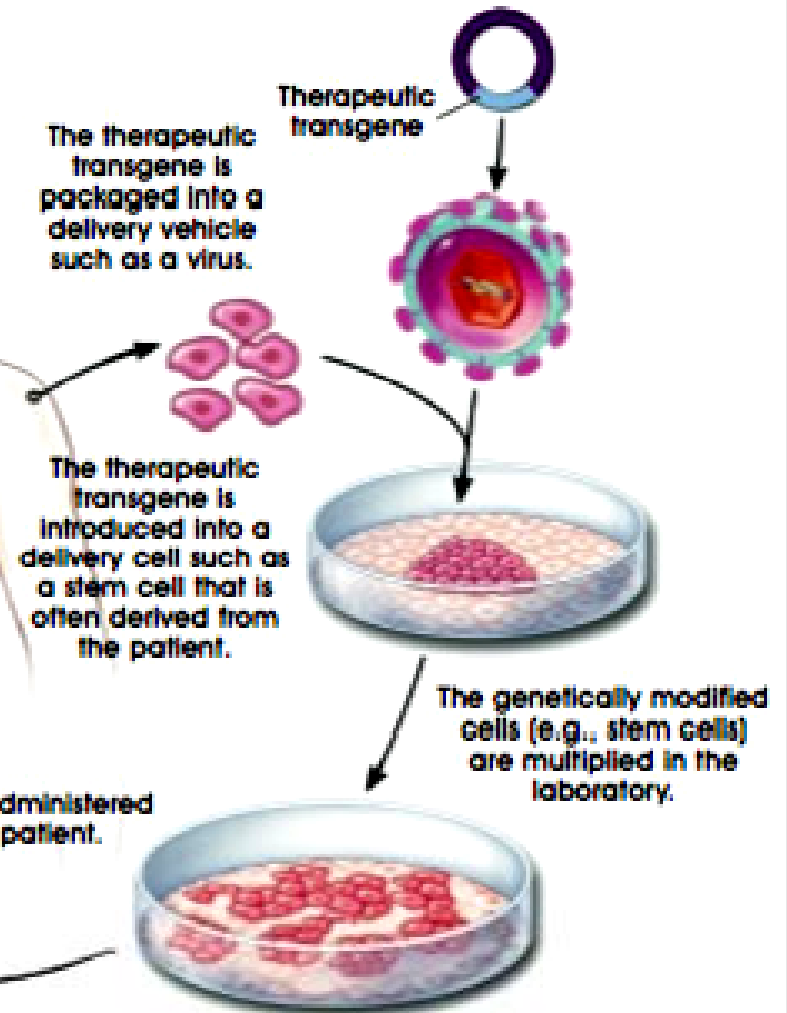
Terapie *in vivo* (gene drugs, direct delivery):

- aplikace vektoru do těla pacienta (injekce, aerosolový sprej)
- cystická fibróza

DIRECT DELIVERY



CELL-BASED DELIVERY



IMUNOTERAPIE



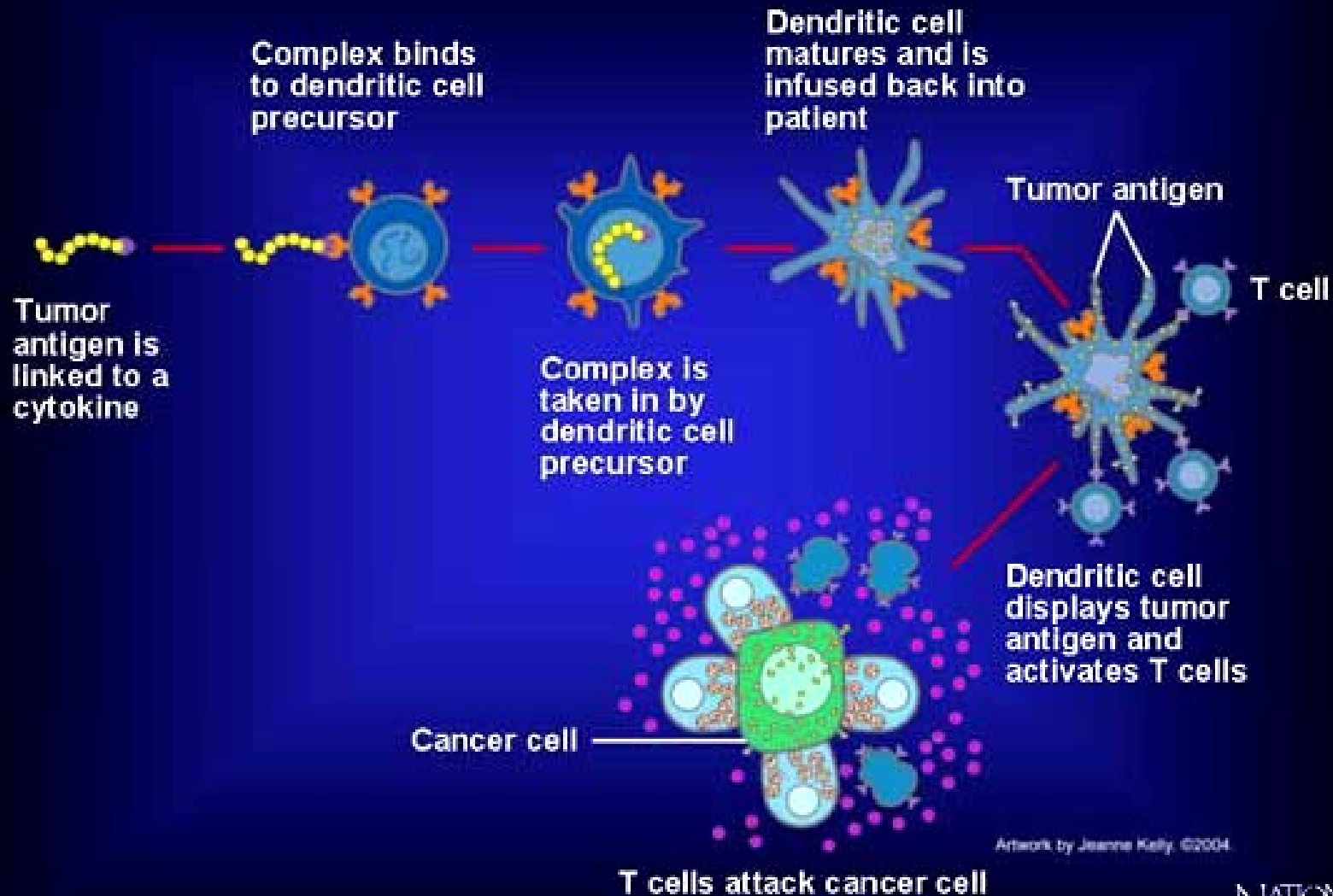
Protinádorové vakcíny

- klinické testy pro karcinomy prostaty, prsu, vaječníků a kolorektální karcinomy
- a) nádorové buňky pacienta + dendritické buňky → vakcína rozpoznává a likviduje specificky buňky nádoru
- b) nádorové buňky pacienta pozměněny *in vitro* → vyšší schopnost indukce imunitní odpovědi

Zvýšení imunitní odpovědi vůči nádoru

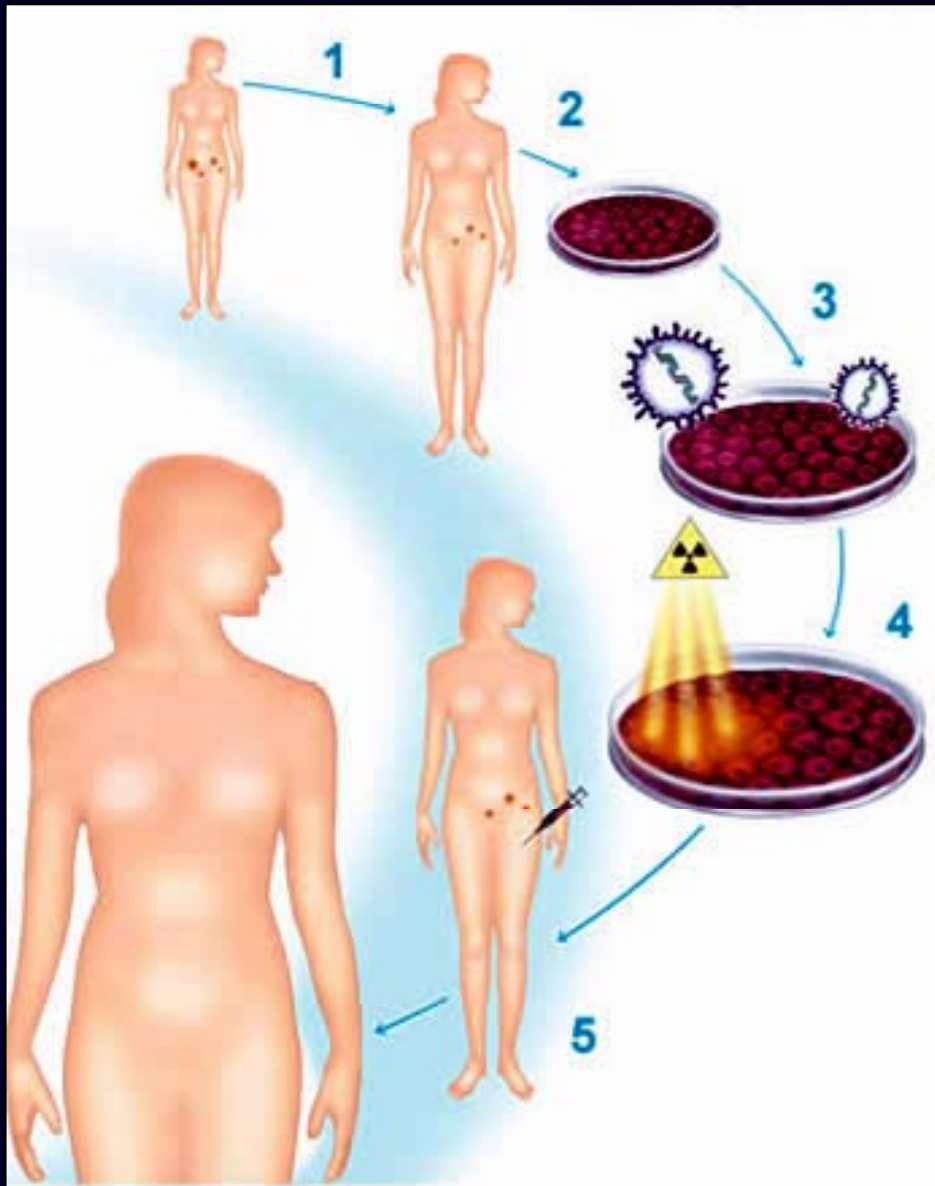
- odběr T-lymfocytů od pacienta s nádorem, jejich pomnožení *in vitro*, reimplantace pacientovi

Dendritic Cells That Attack Cancer

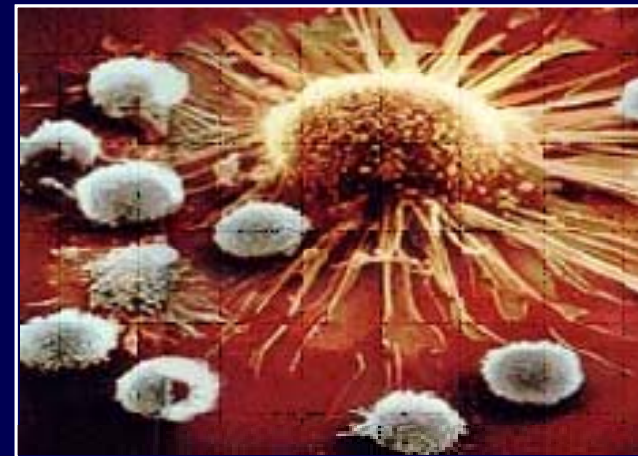


NATIONAL
CANCER
INSTITUTE





1. rozsev karcinomu vaječníků v břišní dutině
2. odběr nádorové tkáně, kultivace *in vitro*
3. inzerce genu pro GM-CSF pomocí virového vektoru
4. inaktivace nádorových buněk ozářením
5. reimplantace pozměněných nádorových buněk → aktivace imunitního systému vůči buňkám nádoru



PŘÍPRAVA ORGÁNOVÝCH, TKÁŇOVÝCH A BUNĚČNÝCH DERIVÁTŮ *IN VITRO*

3 základní strategie regenerace tkání

- **cell-based**

oprava tkáně transplantací zdravých buněk do místa poškození

- **scaffold-guided**

porézní biodegradovatelný materiál, který slouží jako „lešení“ pro dárcovské zdravé buňky; často aplikace v kombinaci s růstovými faktory

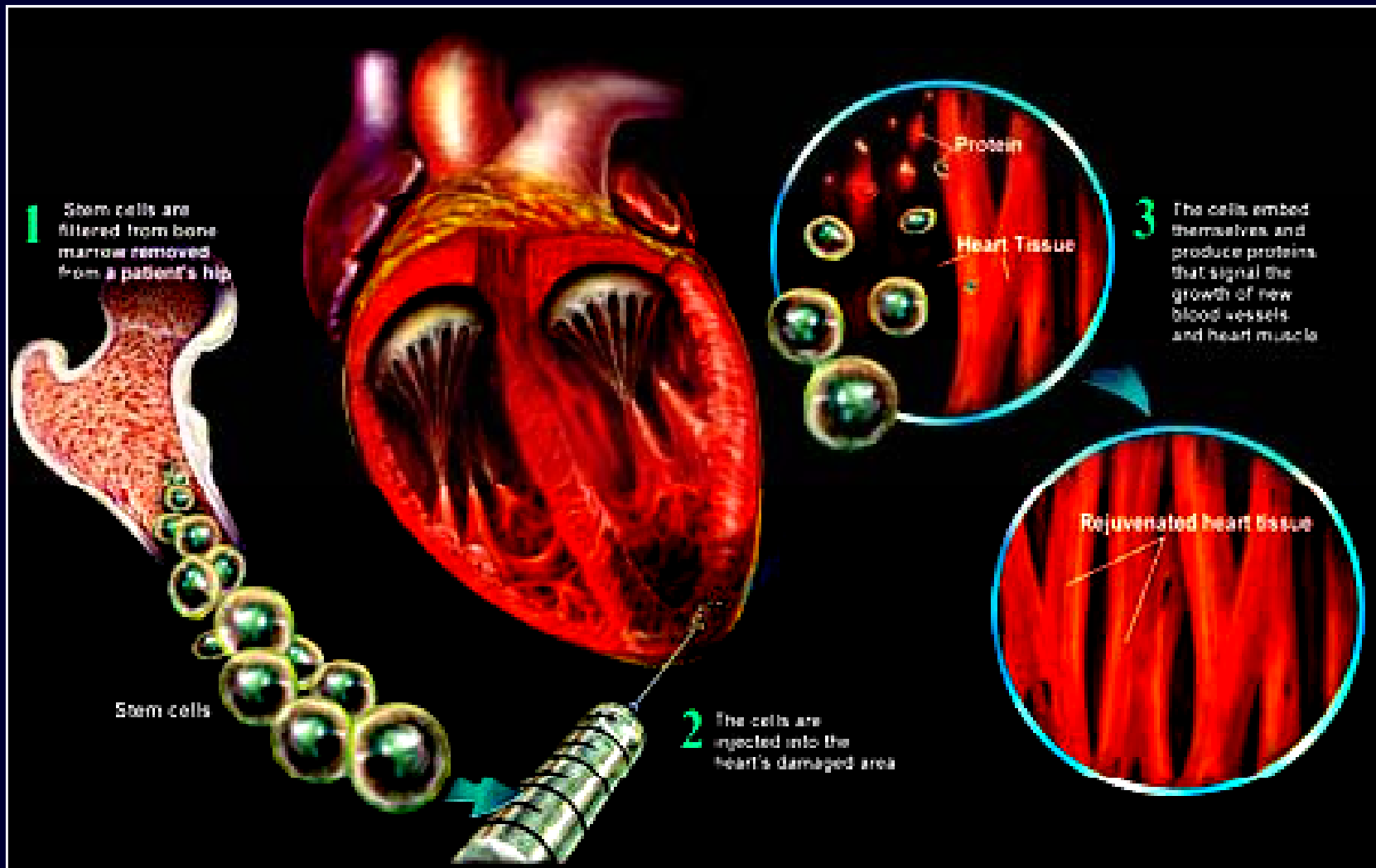
(ekvivalent extracelulární matrix)

- **bioactive molecule-guided**

indukovaná proliferace a diferenciací buněk v poškozené tkáni aplikací růstových faktorů

Praktické využití „cell-based“ strategie:

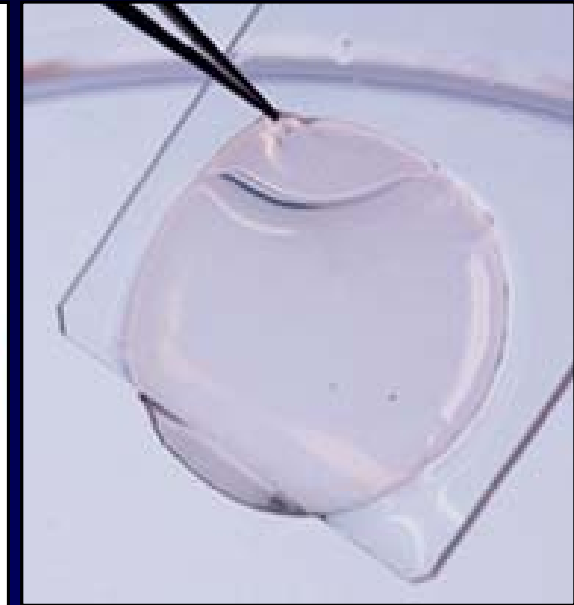
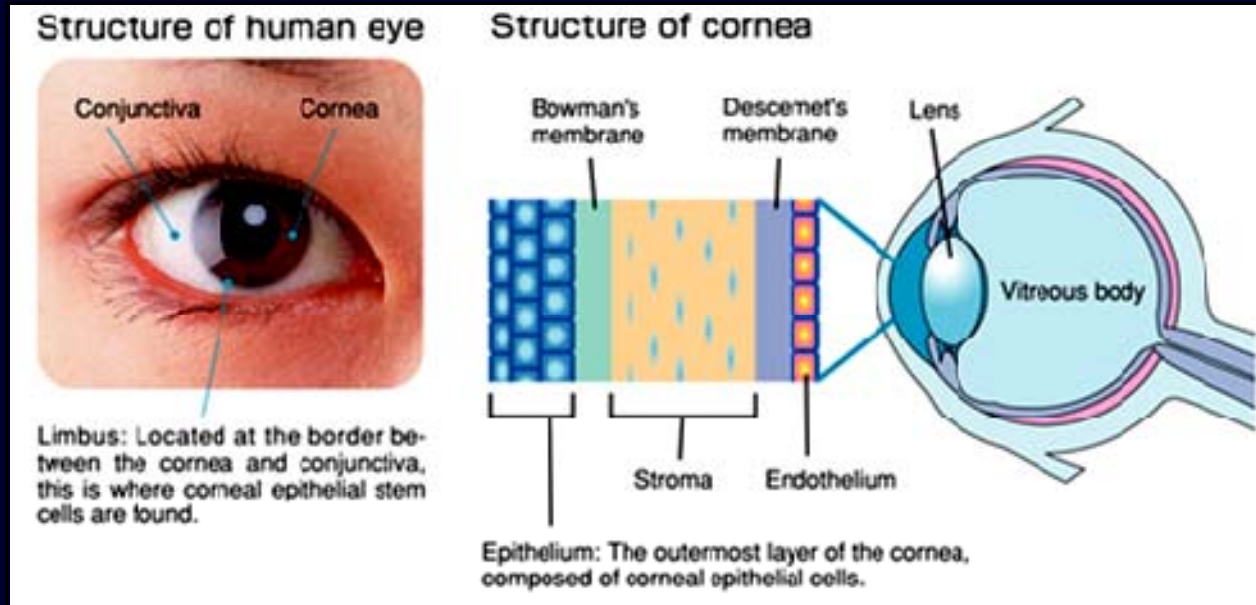
- oprava poškozených chrupavek v kloubech
- oprava poraněné rohovky
- oprava poraněné míchy
- posílení činnosti imunitního systému
- terapie autoimunitních onemocnění (AIDS)
- terapie neurodegenerativních onemocnění (Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba)
- léčba aterosklerózy



cell-based strategie - léčba aterosklerózy

Oprava poraněné rohovky:

- odběr buněk z oblasti limbu → kultivace na feeder-layer (myší fibroblasty) → kultivace na gelu → transplantace

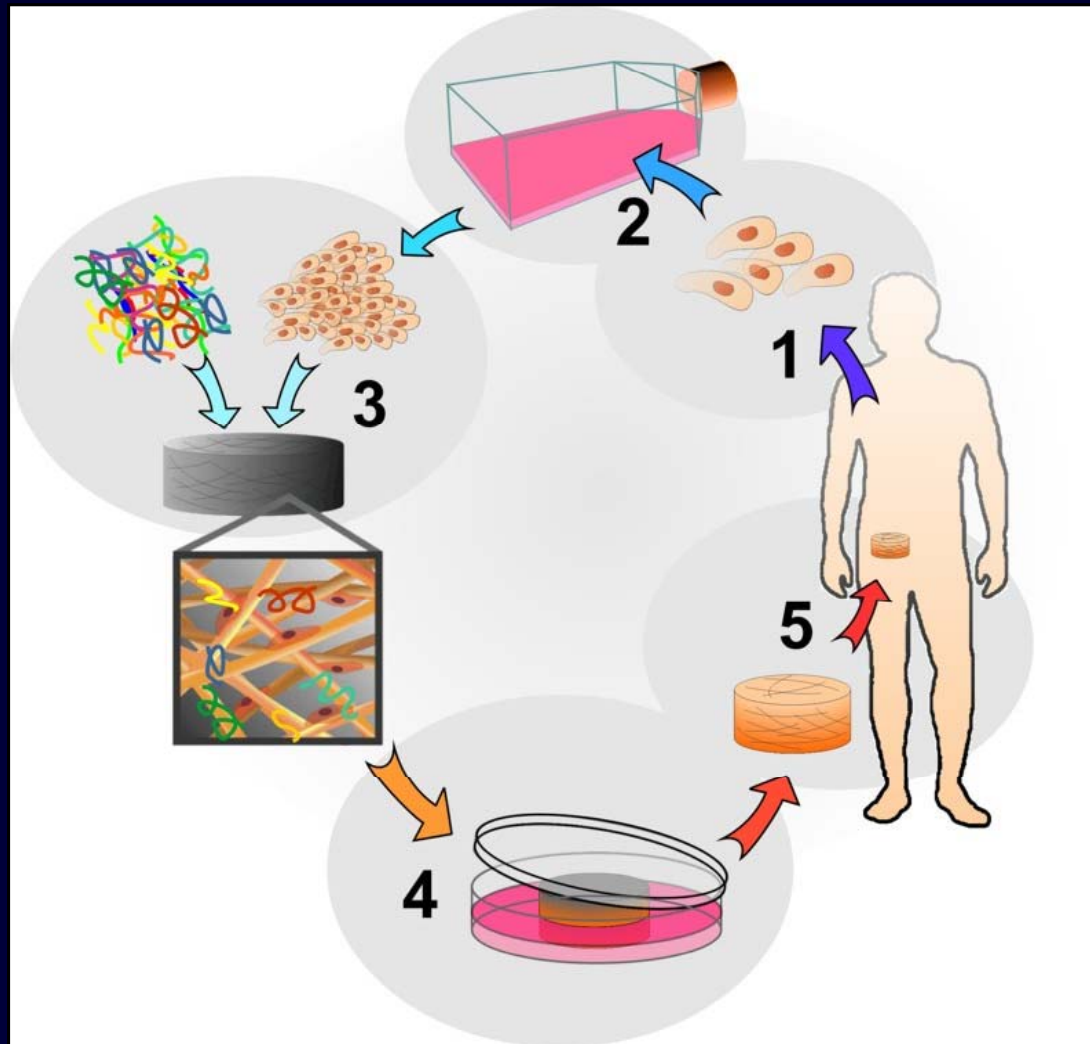


Case of cultured corneal epithelium transplantation (chemical burn)



Praktické využití „scaffold-guided“ strategie:

- komerčně dostupné:
kůže, chrupavka
- ve stádiu výzkumu:
chrupavka, kost, játra, cévy
oprava poraněné míchy
močový měchýř, ledvina

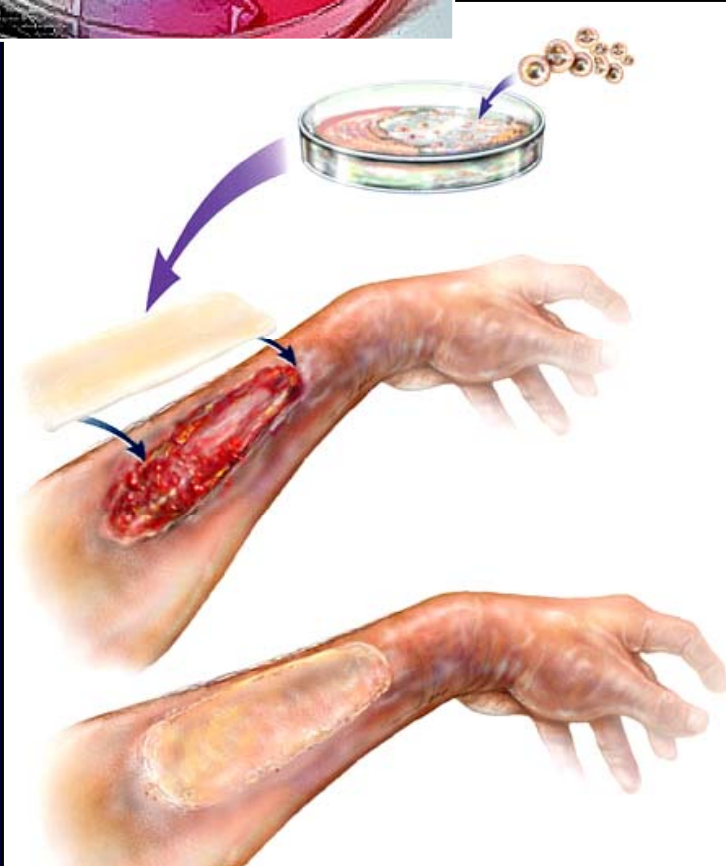


scaffold-guided strategie - obecné schéma



Příprava umělé kůže (artificial skin):

- autologní, allogení
- keratinocyty z 1 cm²
→ až 1000 cm² kůže
během 2 týdnů

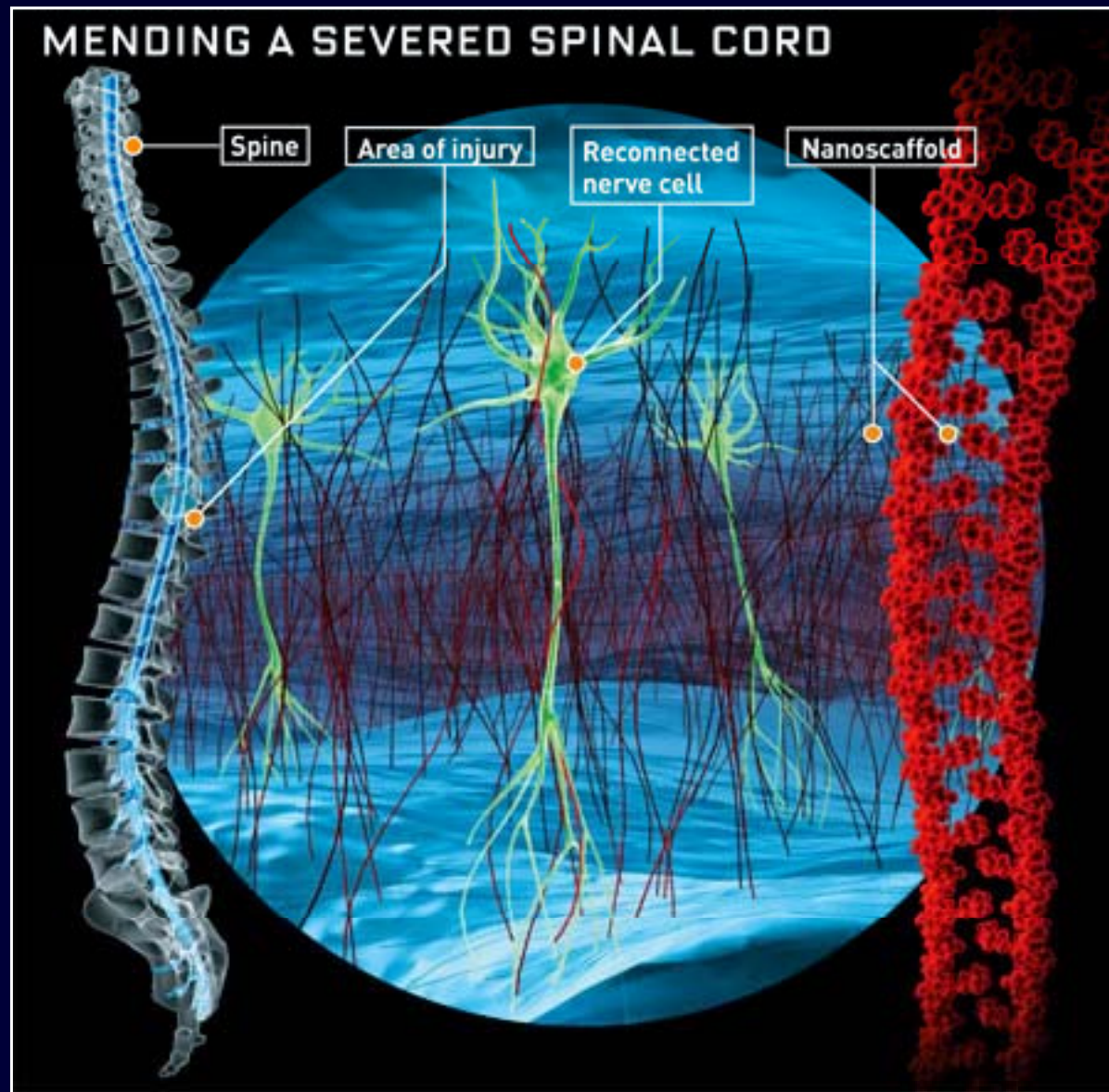




80letá žena
autologní
graft
po 12 měs.



68letý muž
allogenní
graft a
kultivovaná
epidermis
po 6 měs.



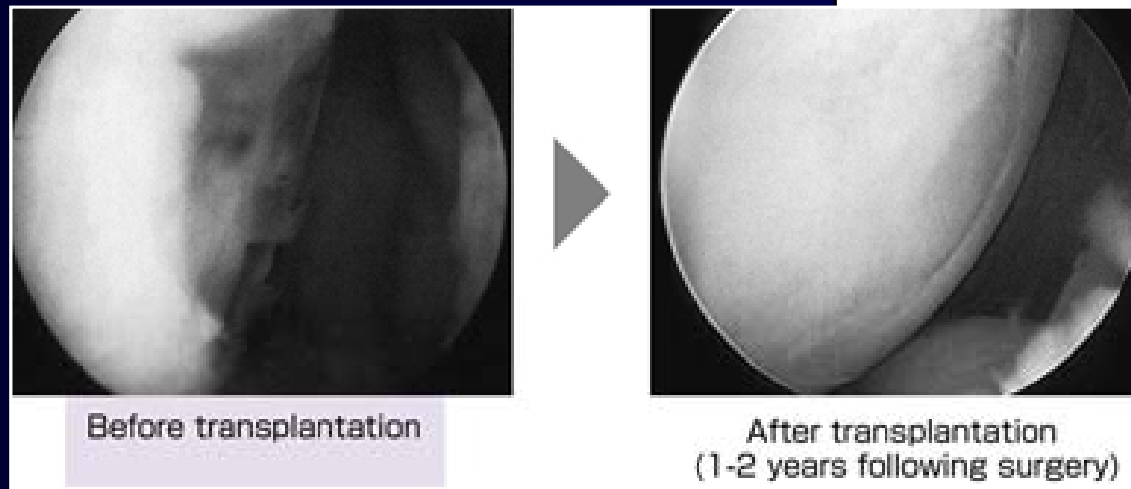
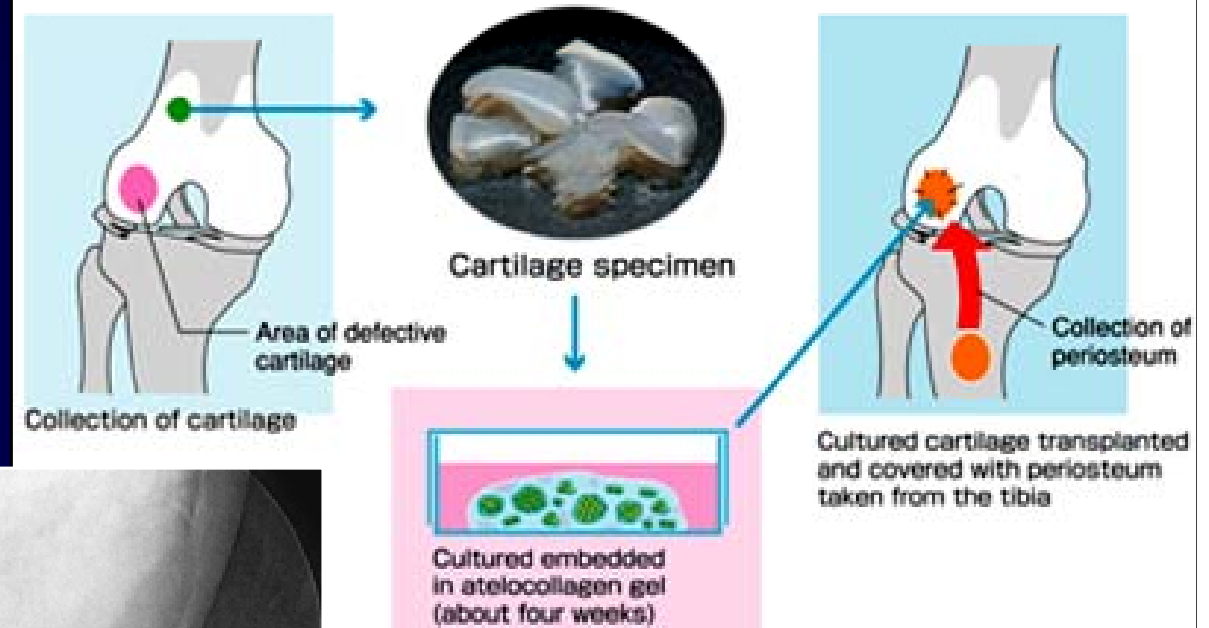
scaffold-guided strategie – poranění míchy

Oprava poškozené chrupavky v kolenním kloubu:

- odběr malého objemu chrupavky z kloubu → rozvolnění chondrocytů → smíchání s kolagenovým gelem → vytvarování → kultivace → transplantace



Transplantation of autologous cultured cartilage (knee-joint)

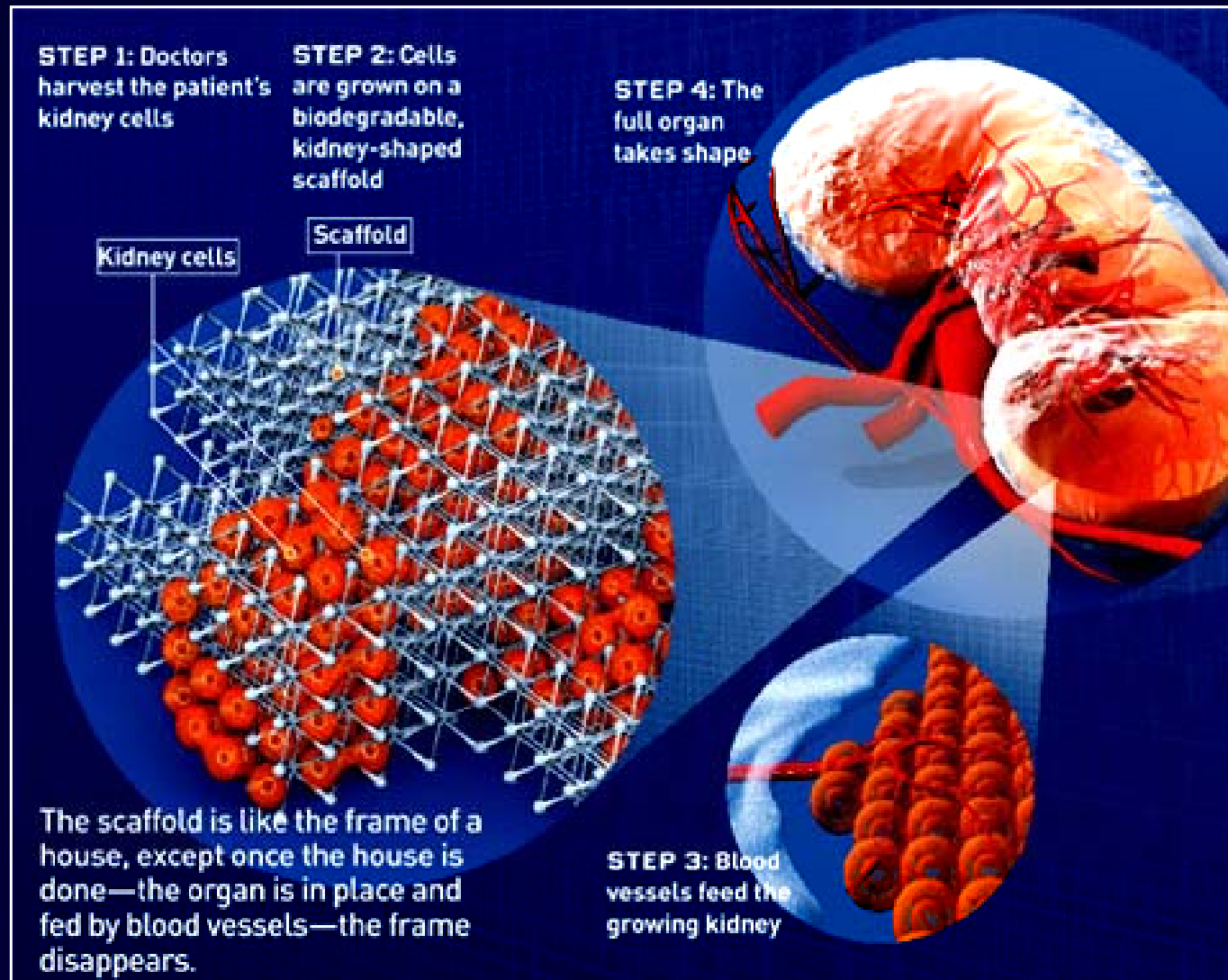




Current Opinion in Biotechnology

Rekonstrukce močového měchýře:

- a) scaffold s nasazenými buňkami
- b) spojení scaffold osazeného buňkami s původním měchýřem
- c) implantát je pokryt fibrinovou hmotou (připojení – omentum)

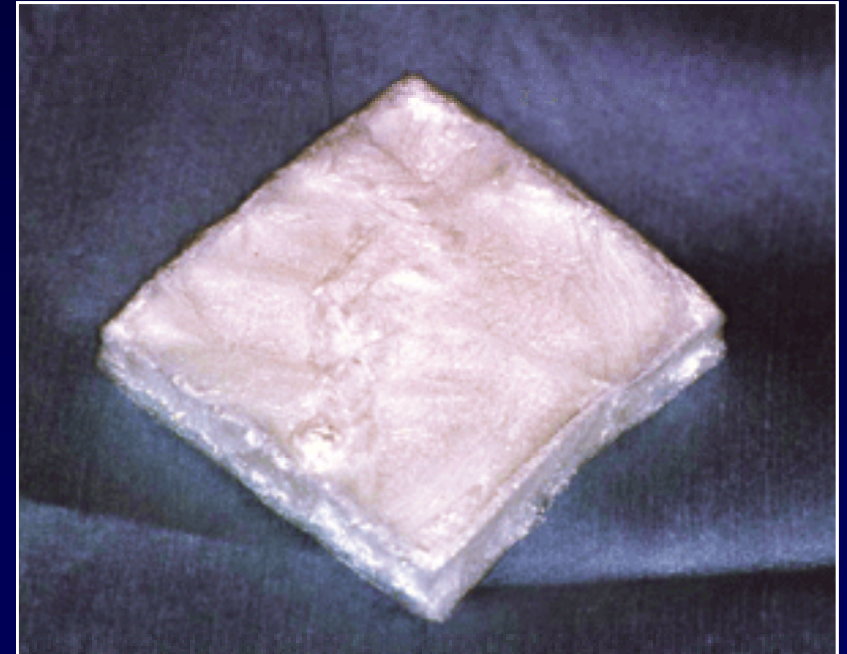


scaffold-guided strategie - „umělá“ ledvina

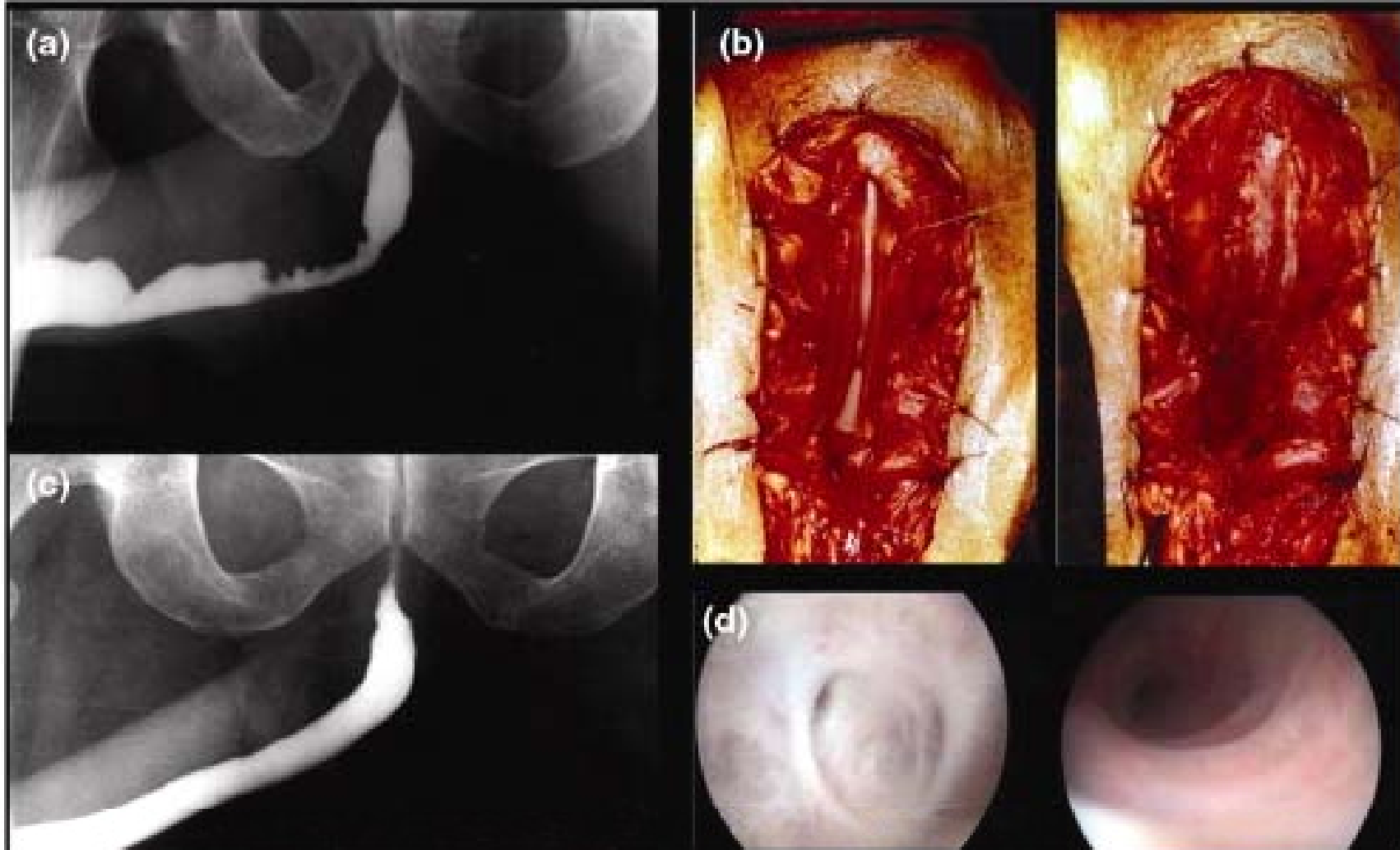
Příklady nosičů (scaffolds) biologického původu



střevní submukózní tkáň



kolagenová matrix



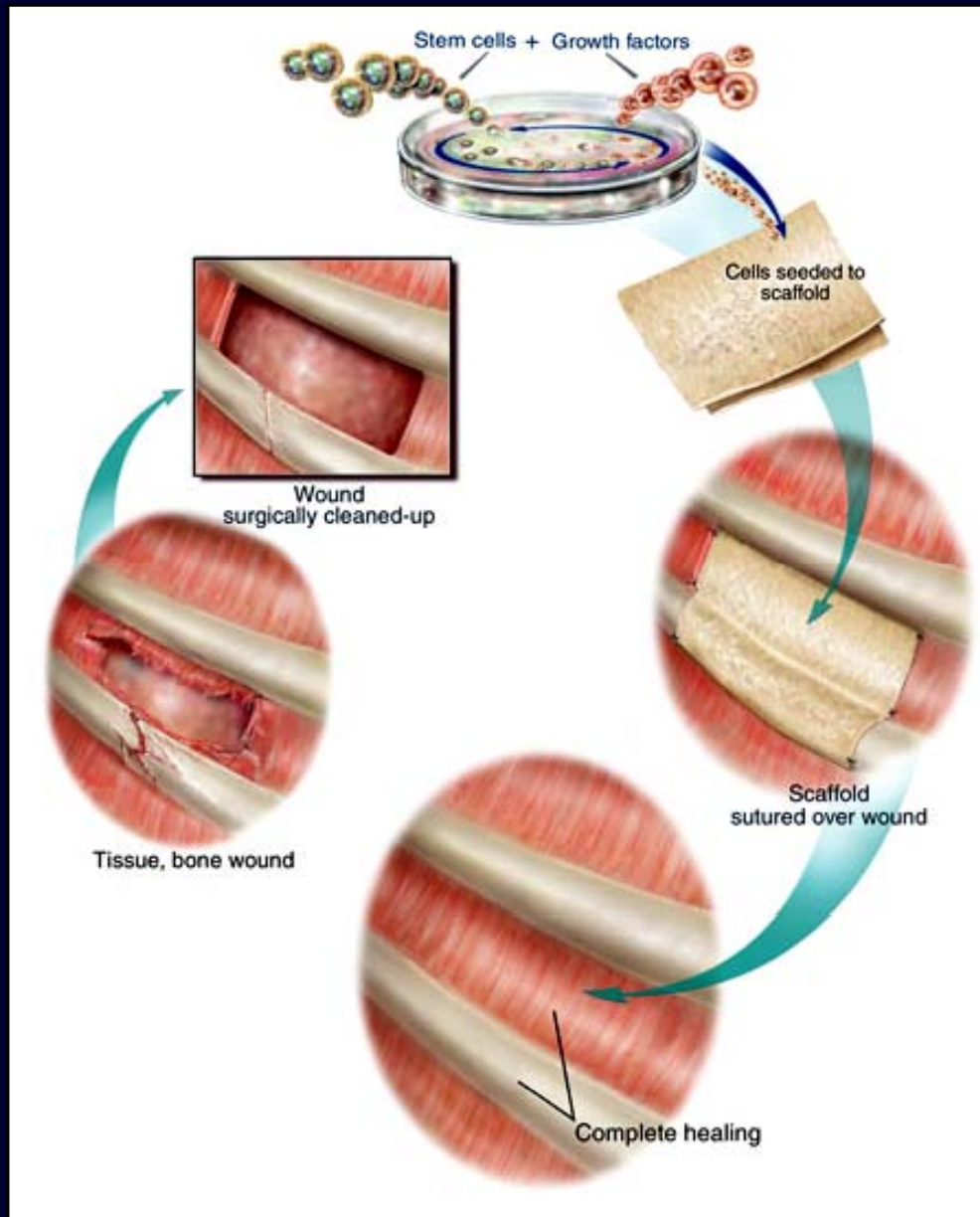
Current Opinion in Biotechnology

Rekonstruovaná močová trubice s využitím kolagenové matrix

Praktické využití „bioactive molecule-guided“ strategie:

- růstové faktory:
PDGF, BMP-2 (bone morphogenetic protein)
- chrupavka, kost
- hluboká poranění tkání

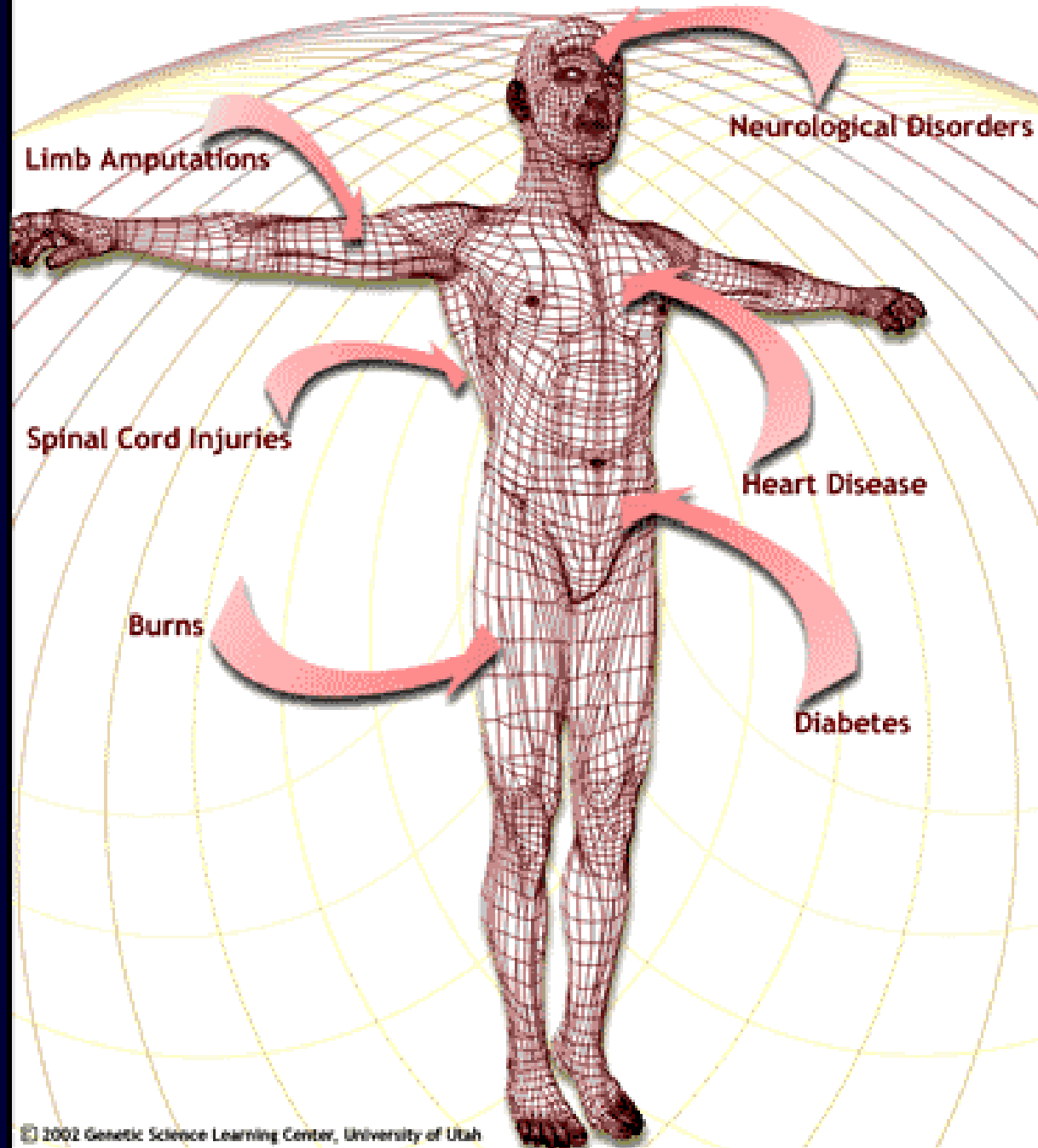
Léčba hlubokých poranění





VYUŽITÍ ADULTNÍCH A EMBRYONÁLNÍCH KMENOVÝCH BUNĚK

Health Problems that Might be Treated by Stem Cells

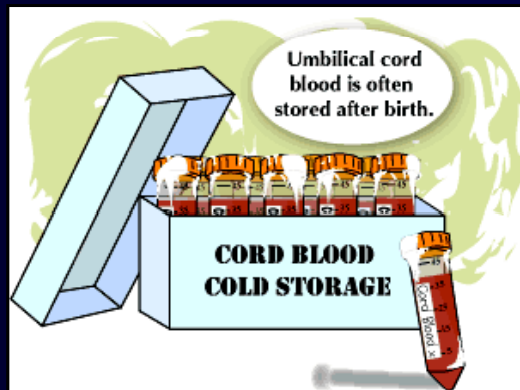


Transplantace kostní dřeně

- SCs hematopoetické, SCs mesenchymální, progenitorové buňky...
- leukémie, lymfomy, aplastické anémie, vrozené metabolické poruchy
- přímá transplantace nebo separace hematopoetických SCs
- klinicky využíváno od 60. let 20. století
- nedostatek vhodných dárců

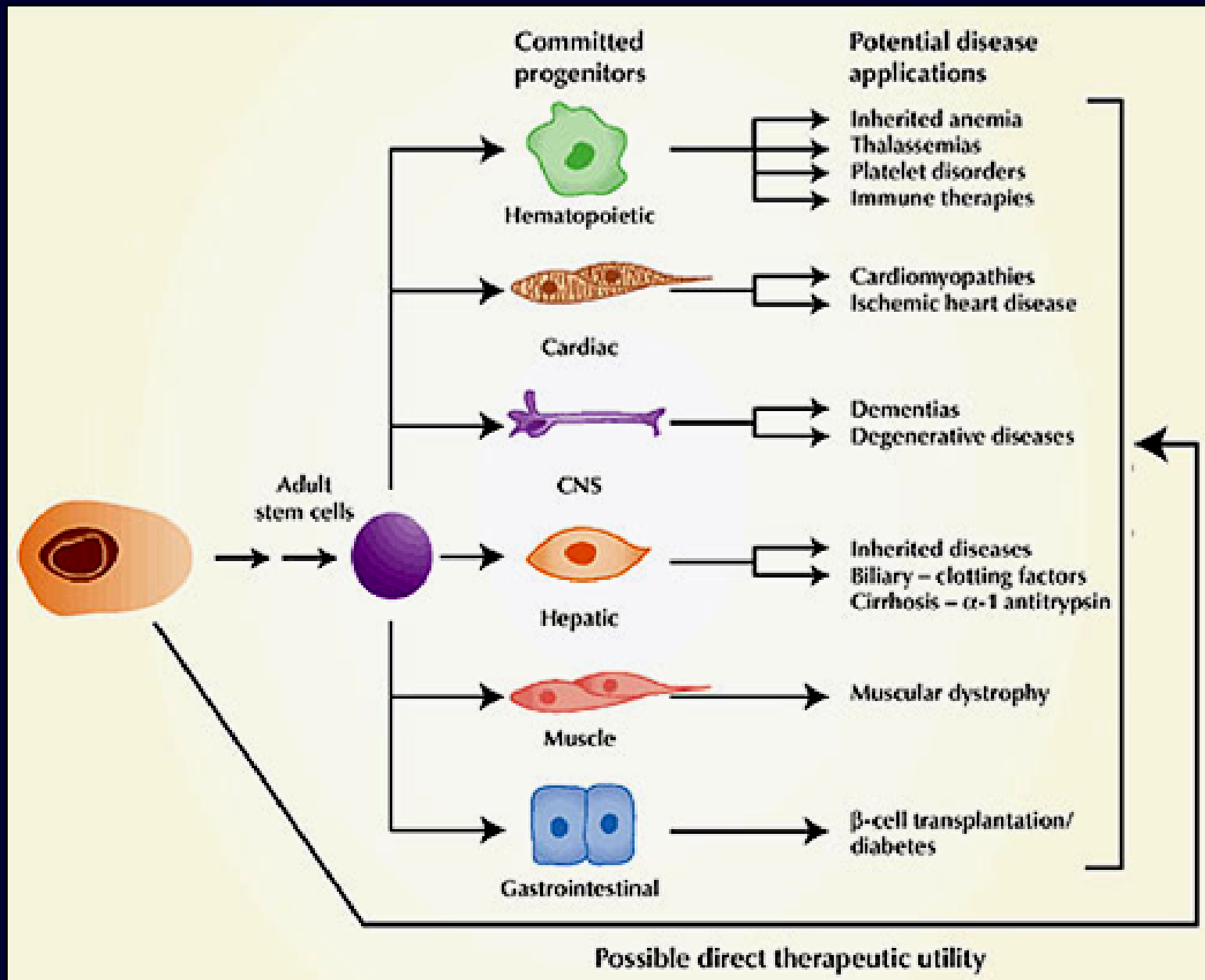
SCs z pupečnickové krve (umbilical cord blood)

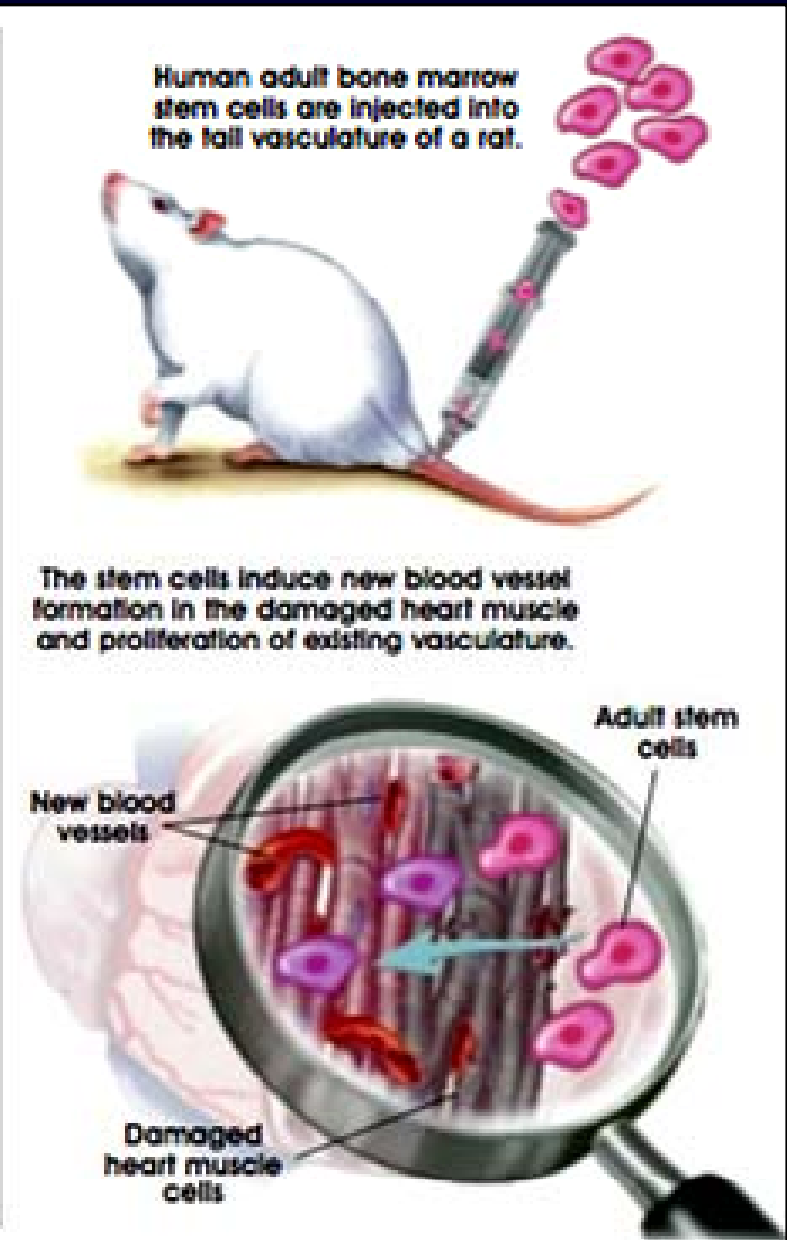
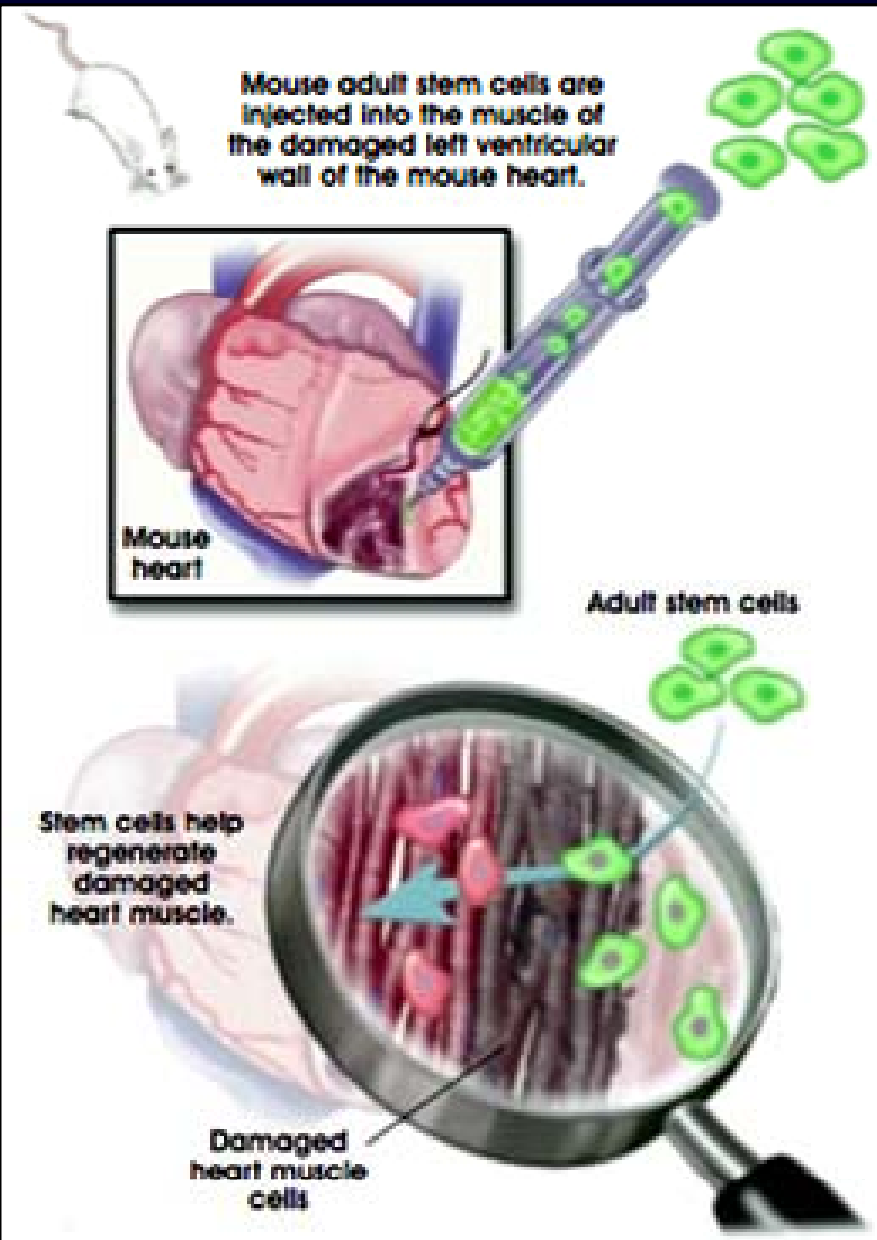
- možná alternativa k transplantaci kostní dřeně
- menší riziko komplikací při transplantaci od nepříbuzných dárců - tzv. GVHD (graft-versus-host disease)
- nižší nároky na příbuznost dárce
- nevýhodou relativně málo SCs v odebraném materiálu (řešení: možnost kombinace)
- darování vs. archivace pro vlastní potřebu



Terapeutický potenciál lidských ASCs

- dědičná forma anémie, thalasemie, poruchy tvorby krevních destiček, imunoterapie
- kardiomyopatie, ischemická choroba srdeční
- demence, degenerativní onemocnění CNS
- dědičná onemocnění jater, cirhóza (produkce α -1-antitrypsinu)
- svalové dystrofie
- diabetes





CUSTOM-MADE STEM CELLS

After discovering a reliable method for transforming human stem cells into nerve cells in rats, researchers have proved that those neurons can reach targeted muscles.

Embryonic cells



Fertilized egg
Researchers use human eggs fertilized in vitro.



Zygote
The embryo starts dividing into multiple cells.



Morula
Up to 4 days after the fertilization the embryo reaches a size of 16 cells.



Blastocyst
When the embryo reaches 200 cells or more its inner mass can be cropped for small groups of 30 stem cells.

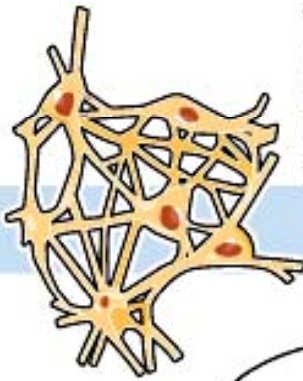


Differentiation
Embryonic stem cells can give rise to almost any kind of specialized cells by changing the chemical or thermic environment of the culture, or inserting specific sequences of genes into their nucleus.



Culture
Over the course of several days, the cells proliferate and begin to crowd a culture dish.

Neural cells

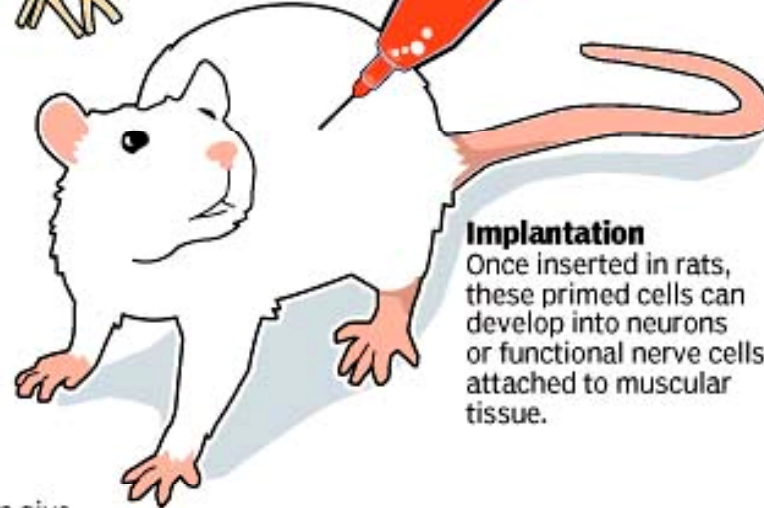


Treatment
Neural stem cells are treated with a cocktail of proteins that makes them functional.

Blood cells



Muscle cells



Implantation
Once inserted in rats, these primed cells can develop into neurons or functional nerve cells attached to muscular tissue.

Cold storage
Unspecialized cells can be kept in liquid nitrogen for long periods of time for further use.





První klinická studie s využitím lidských ESCs

- leden 2009 – schváleno FDA
- využití hESCů pro léčbu poškození míchy
- Geron Corporation



Geron Phase I Clinical Trial

- **GRNOPC1:**

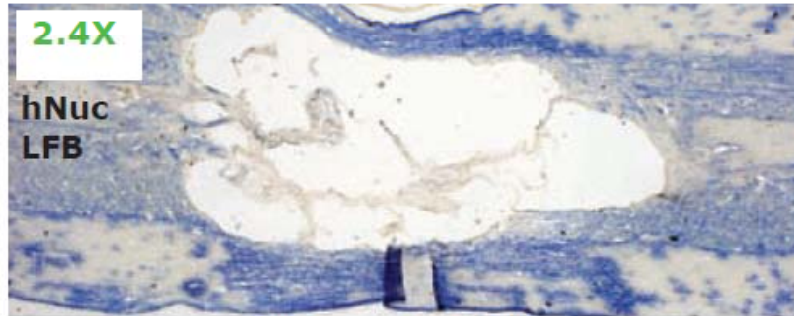
Geron's hESC-Derived Oligodendrocyte Progenitor Cells

- využití hESCs pro léčbu poškození míchy

Preklinické testy na hlodavcích

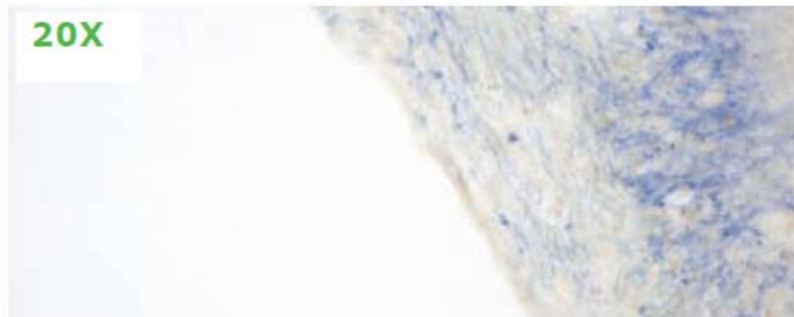
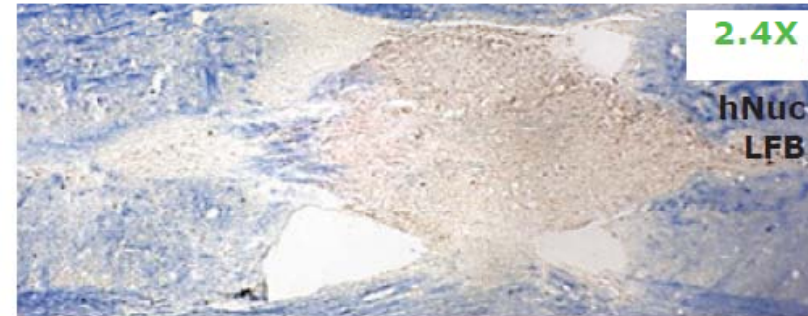
- dobré výsledky na testy toxicity i na tvorbu teratomů (pouze benigní cysty v místě poškození)
- žádná migrace buněk mimo nervový systém
- žádná imunitní odpověď vůči GRNOPC1

9 Months After No Treatment

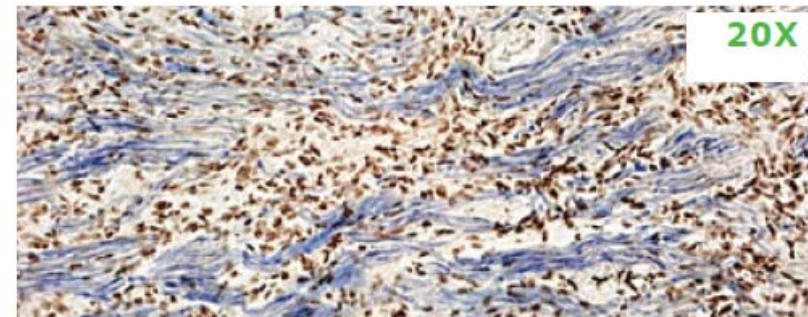


(Damaged Zone)

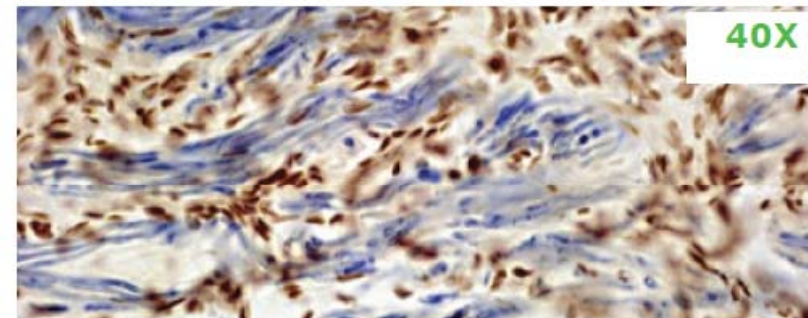
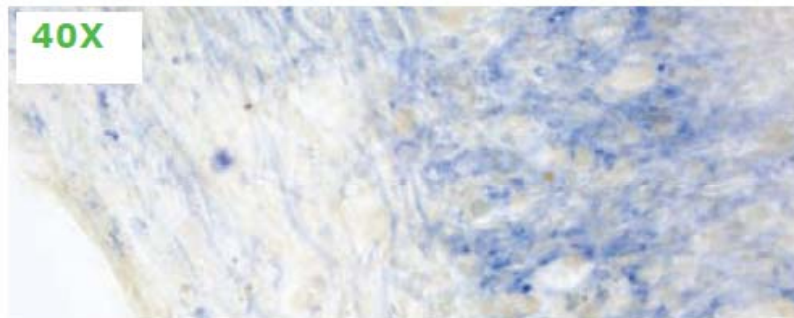
9 Months After GRNOPC1 Treatment



(Loss of Neurons and Myelin)



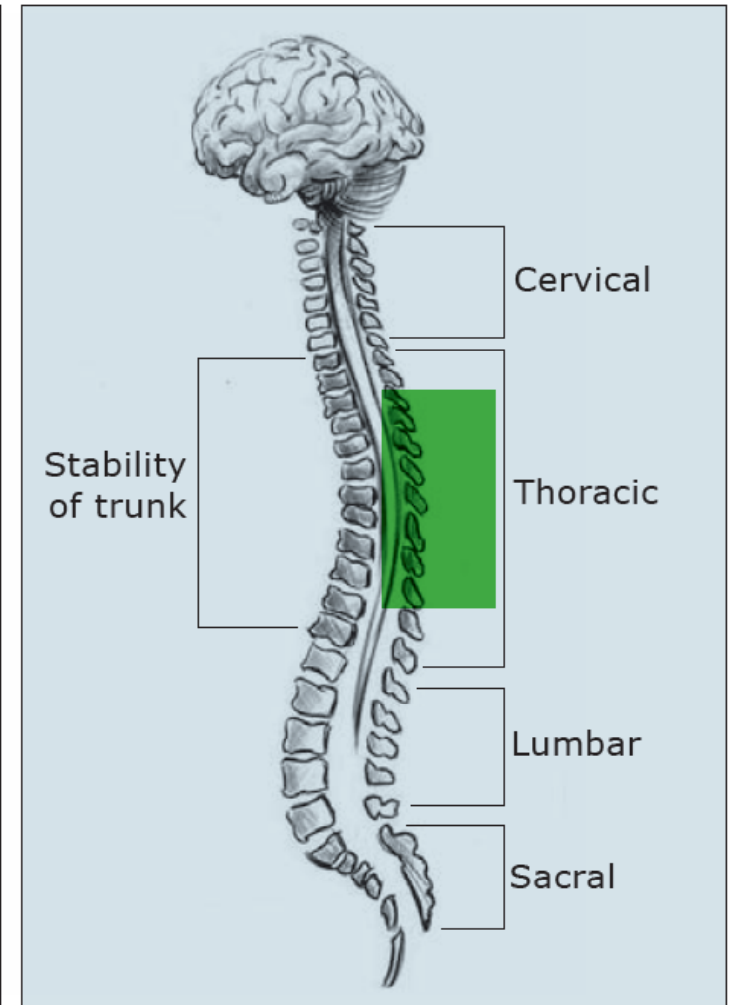
(Myelinated Rat Axons)



Výsledky preklinických testů na krysách

GRNOPC1 Phase 1 Multi-Center Spinal Cord Injury Trial

- **Open Label Trial**
- **Subacute, Functionally Complete Spinal Cord Injury with a Neurological Level of T3 to T10**
- **2×10^6 Cells**
- **Transplant 7-14 Days Post Injury**
- **Temporary Immunosuppression with Low Dose Tacrolimus**
- **Primary Endpoint: Safety**
 - *Neurological*
 - *Overall*
- **Secondary Endpoint: Efficacy**
 - *ASIA Sensory Score*
 - *Lower Extremity Motor Score*



Geron's Intellectual Property Portfolio

Geron <i>Geron developed proprietary technologies for hESC differentiation, scalable manufacturing and therapeutic cell preparations</i>	WARF <i>Exclusively licensed fundamental patents for hESCs</i>	University of California <i>Exclusively licensed technology developed under Geron-UC Irvine collaboration for hESC-derived oligodendrocytes</i>
--	--	---



GRNOPC1 CELL THERAPY FOR SPINAL CORD INJURY

Druhá klinická studie s využitím lidských ESCs

- listopad 2010 – schváleno FDA
- využití hESCs pro léčbu poškození Stargardtovy makulární dystrofie
(nejčastější forma makulární degenerace u dětí, neléčitelná, příznaky: 8-10 let, slepota: 30 let)
- ATC (Advanced Cell Technologies)
- retinal pigment epithelium (RPE) cells
- multicentrická studie (4), max. 12 pacientů

STEM CELLS®

EMBRYONIC STEM CELLS/INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS

Long-Term Safety and Function of RPE from Human Embryonic Stem Cells in Preclinical Models of Macular Degeneration

BIN LU,^a CHRISTOPHER MALCUIT,^b SHAOMEI WANG,^a SERGEJ GIRMAN,^a PETER FRANCIS,^a LINDA LEMIEUX,^b ROBERT LANZA,^b RAYMOND LUND^a

^aCasey Eye Institute, Oregon Health and Science University, Portland, Oregon; ^bAdvanced Cell Technology, Worcester, Massachusetts, USA

Key Words. Embryonic stem cells • Retinal pigment epithelium • Macular degeneration • Clinical trials

STEM CELLS 2009;27:2126–2135
www.StemCells.com





“You’re a selfish bastard, Lewis..! Those stem cell lines were meant for people who’ve LOST an organ!”