

Bi8120 Aplikovaná buněčná biologie – 24.4.2013

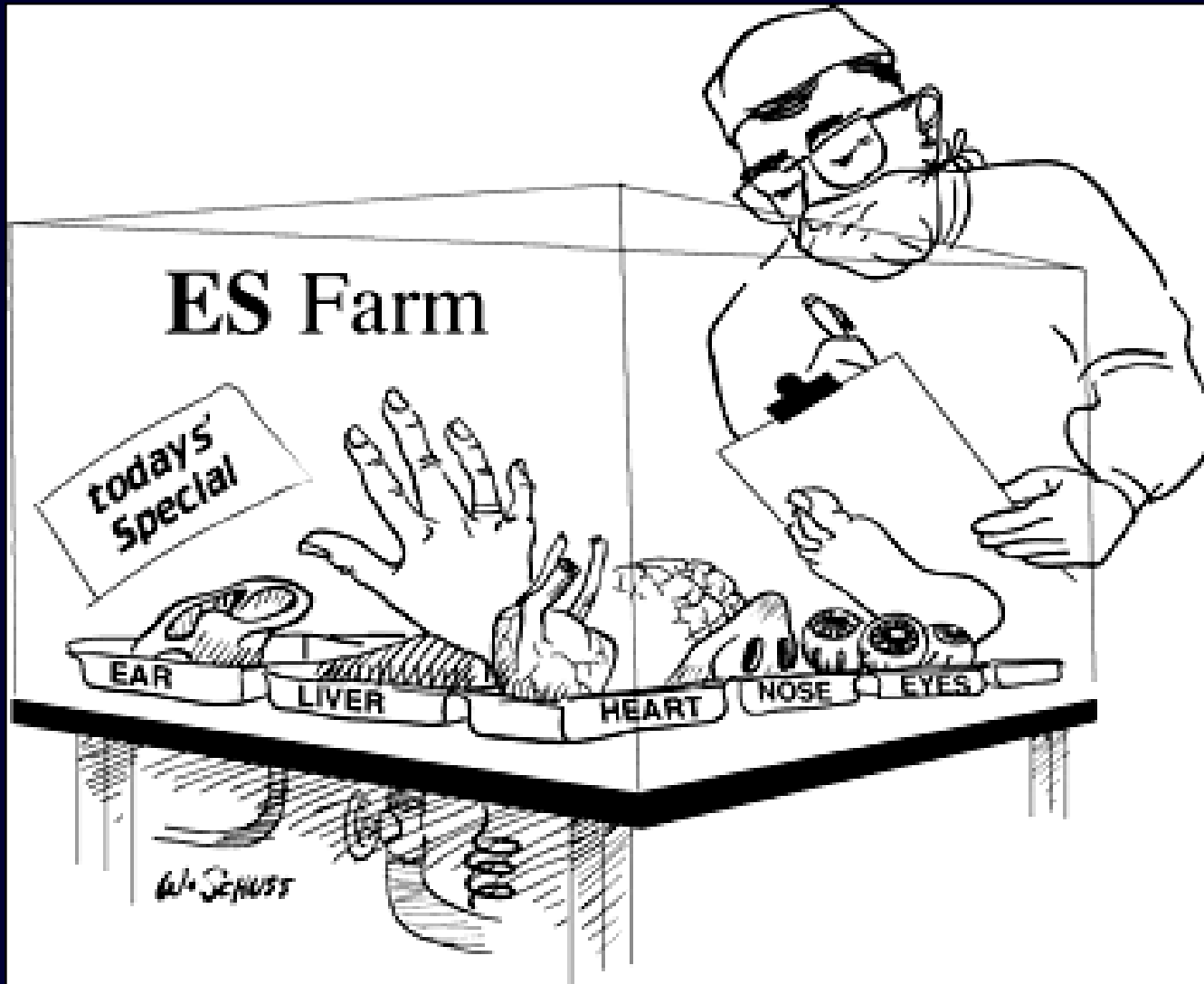
# Buněčné terapie

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, allogenních 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 patologické alely standardní alelou

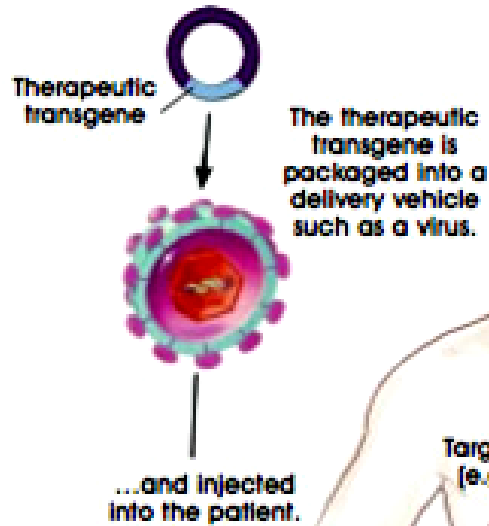
## Terapie *ex vivo* (cell-based delivery):

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

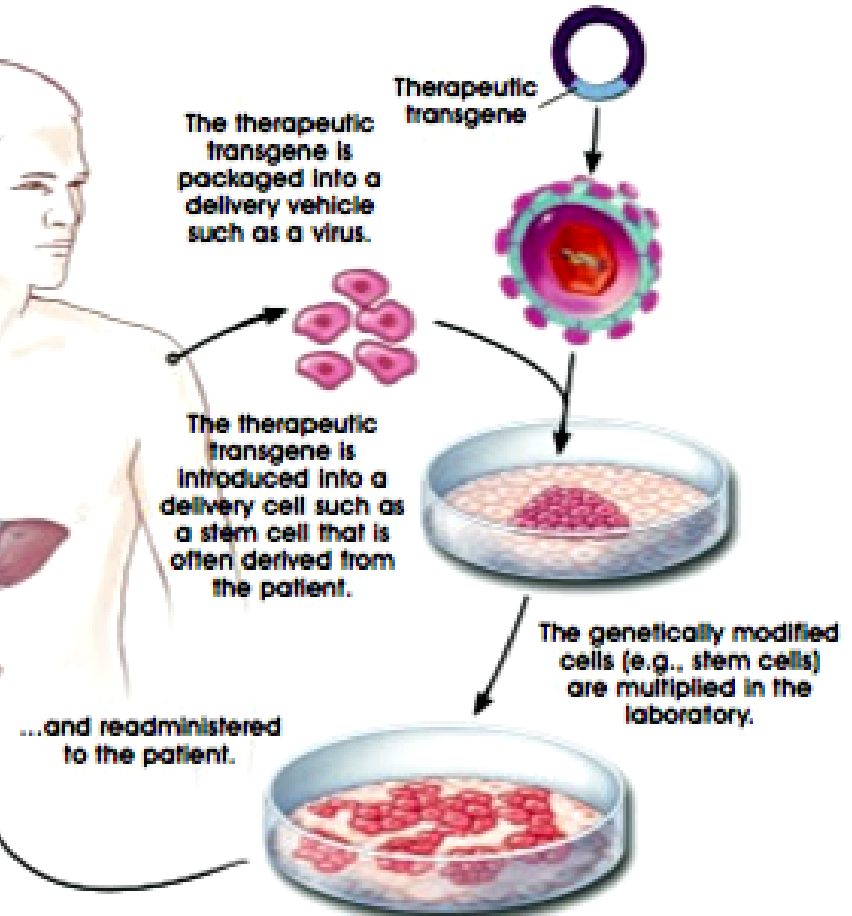
## Terapie *in vivo* (gene drugs, direct delivery):

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

## DIRECT DELIVERY



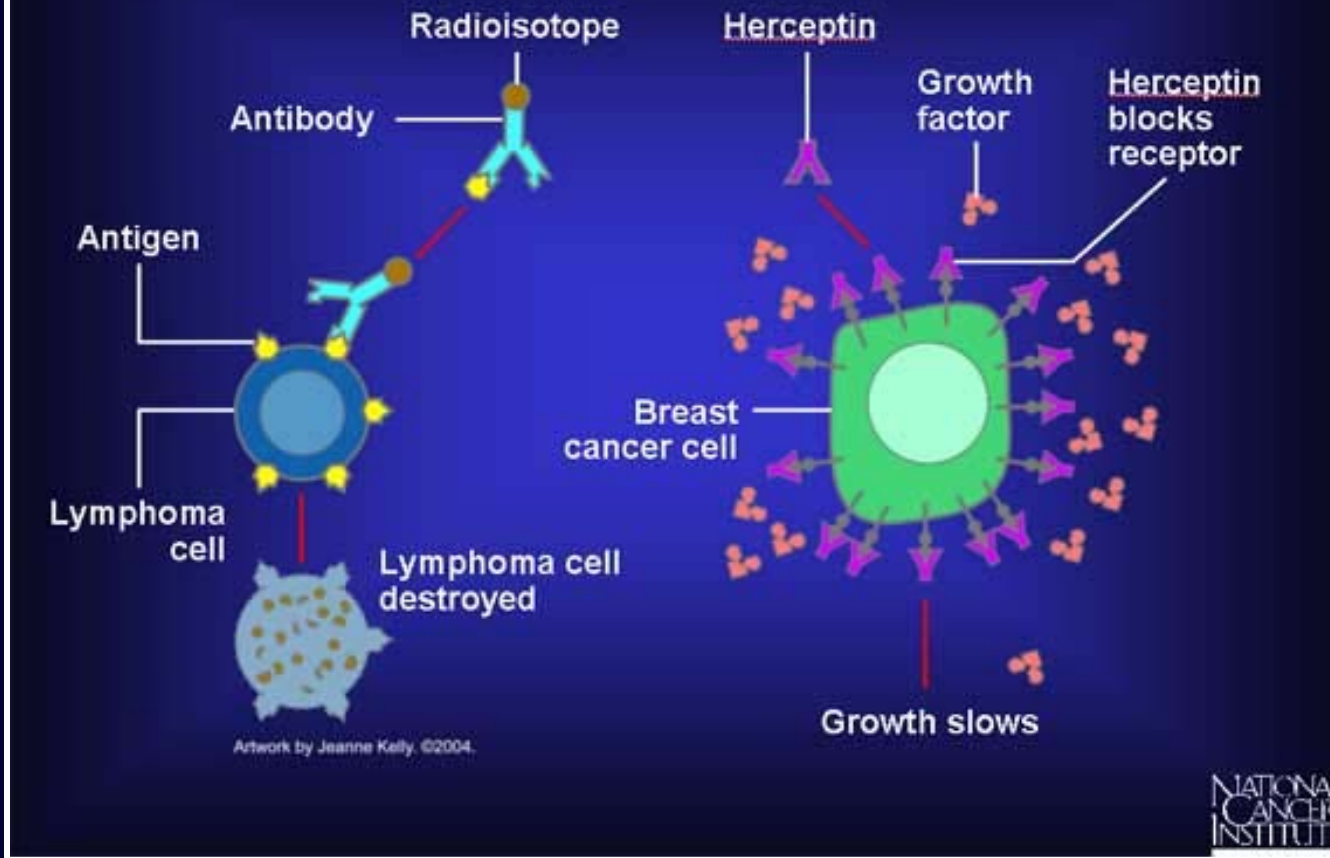
## CELL-BASED DELIVERY





# IMUNOTERAPIE NÁDORŮ A PROTINÁDOROVÉ VAKCÍNY

# Immunotherapy



**Herceptin** (trastuzumab)  
monoklonální protilátka proti receptoru HER2/neu

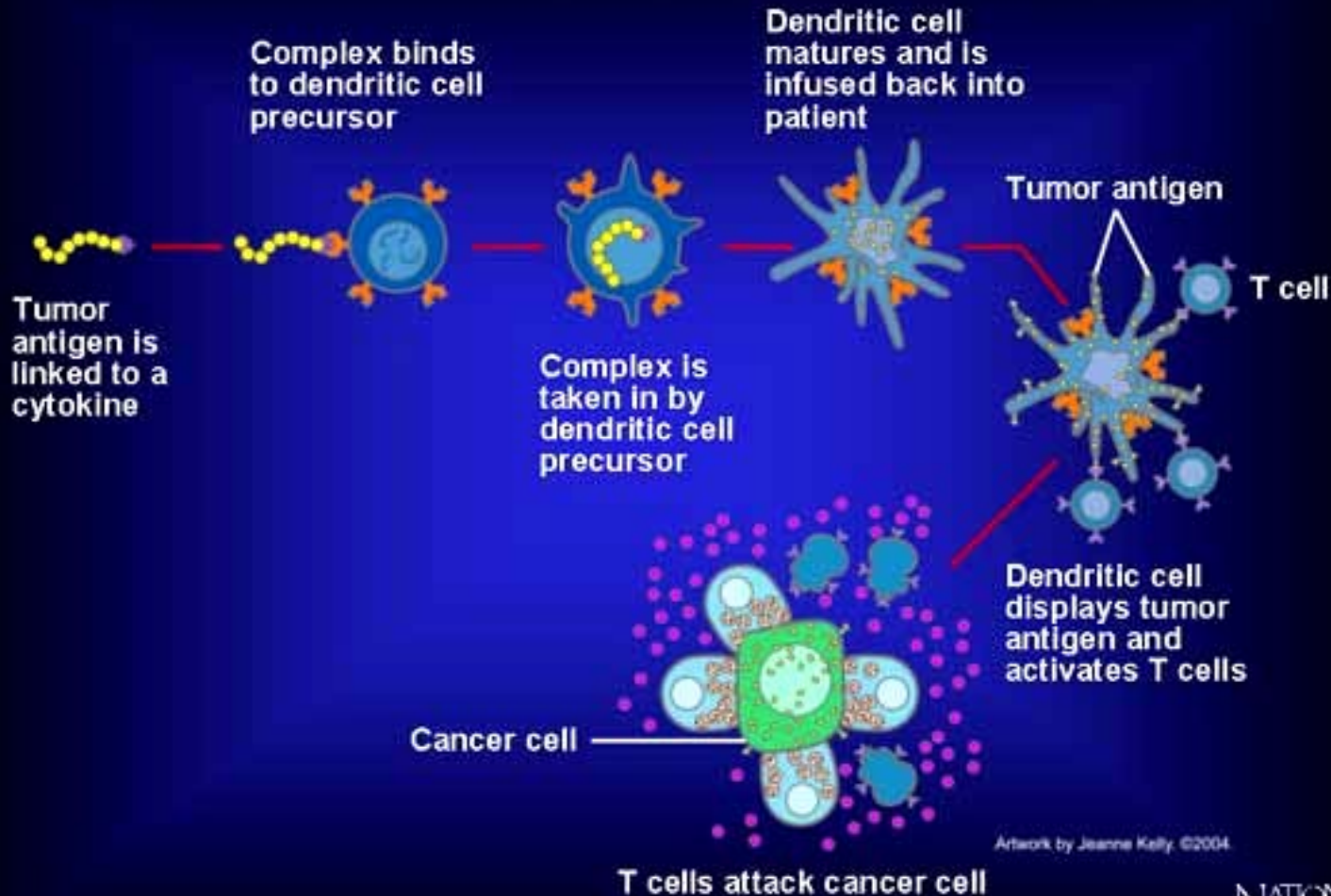
## Protinádorové vakcíny

- 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

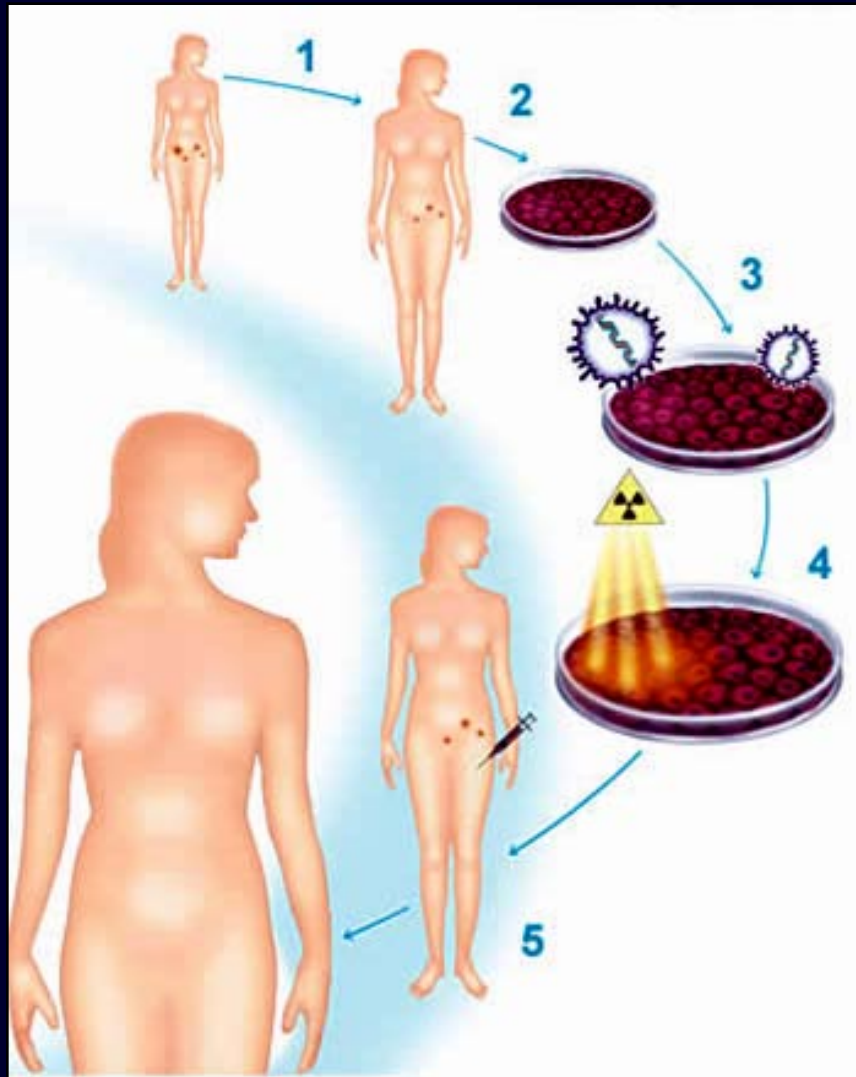
## Zvýšení imunitní odpovědi vůči nádoru

- 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. inserce 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)

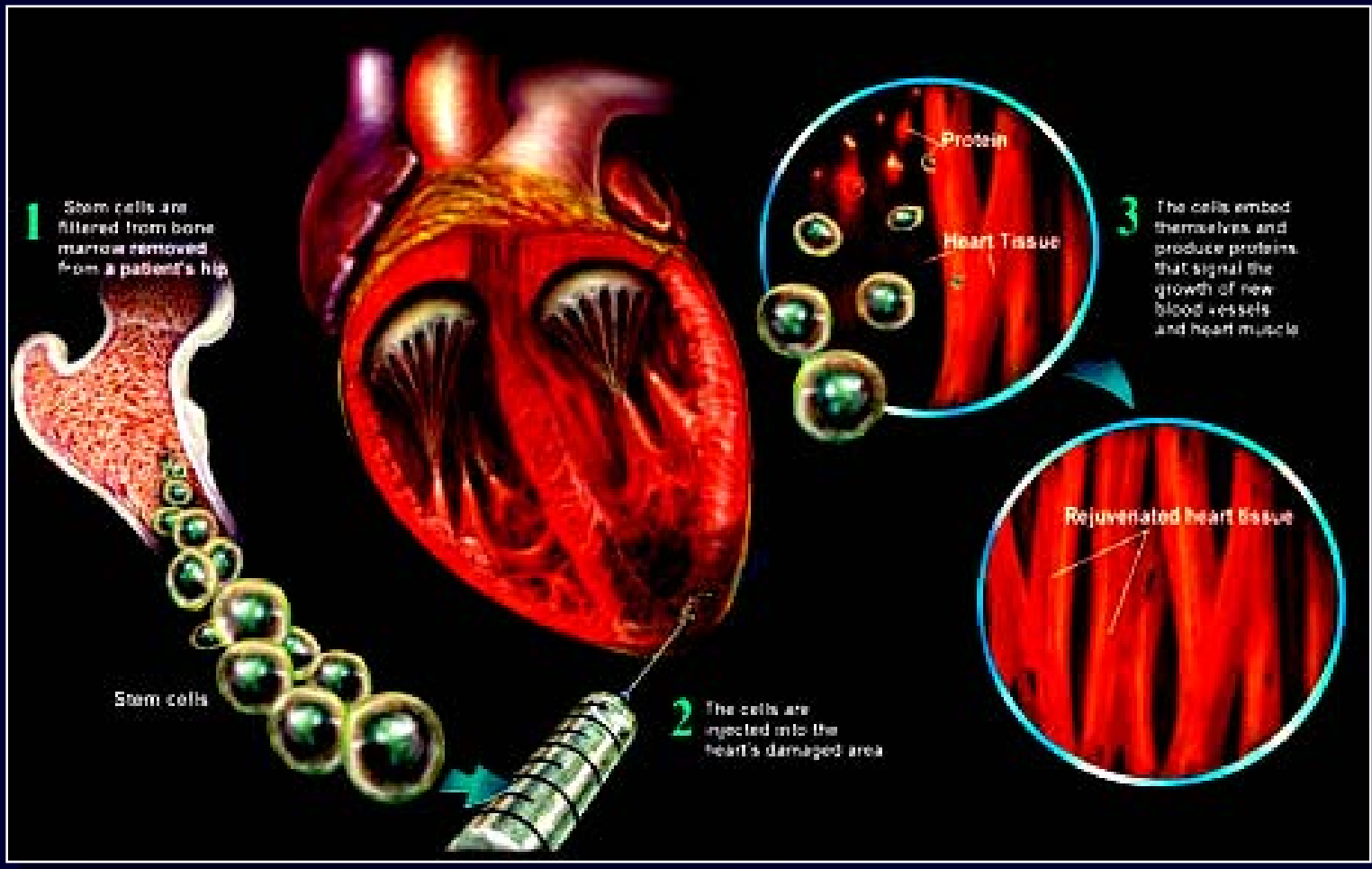
- **bioactive molecule-guided**

indukovaná proliferace a diferenciace 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

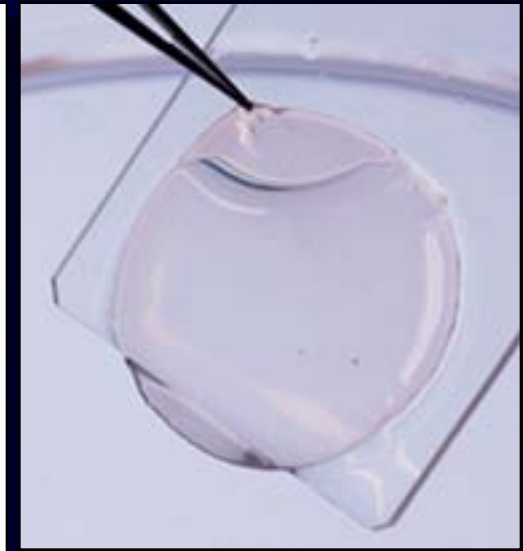
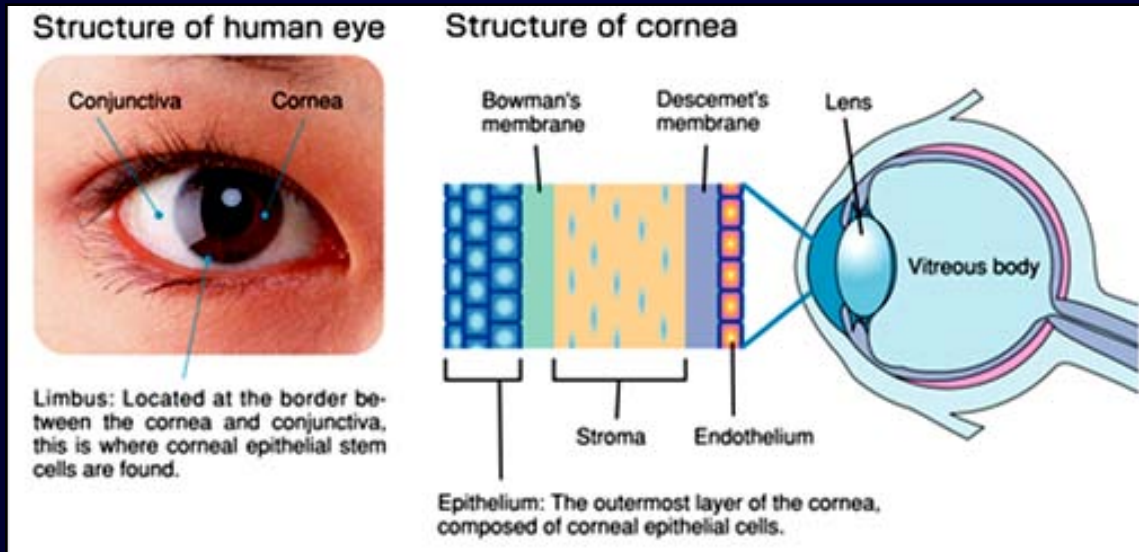




# cell-based strategie - léčba aterosklerózy

# Oprava poraněné rohovky:

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

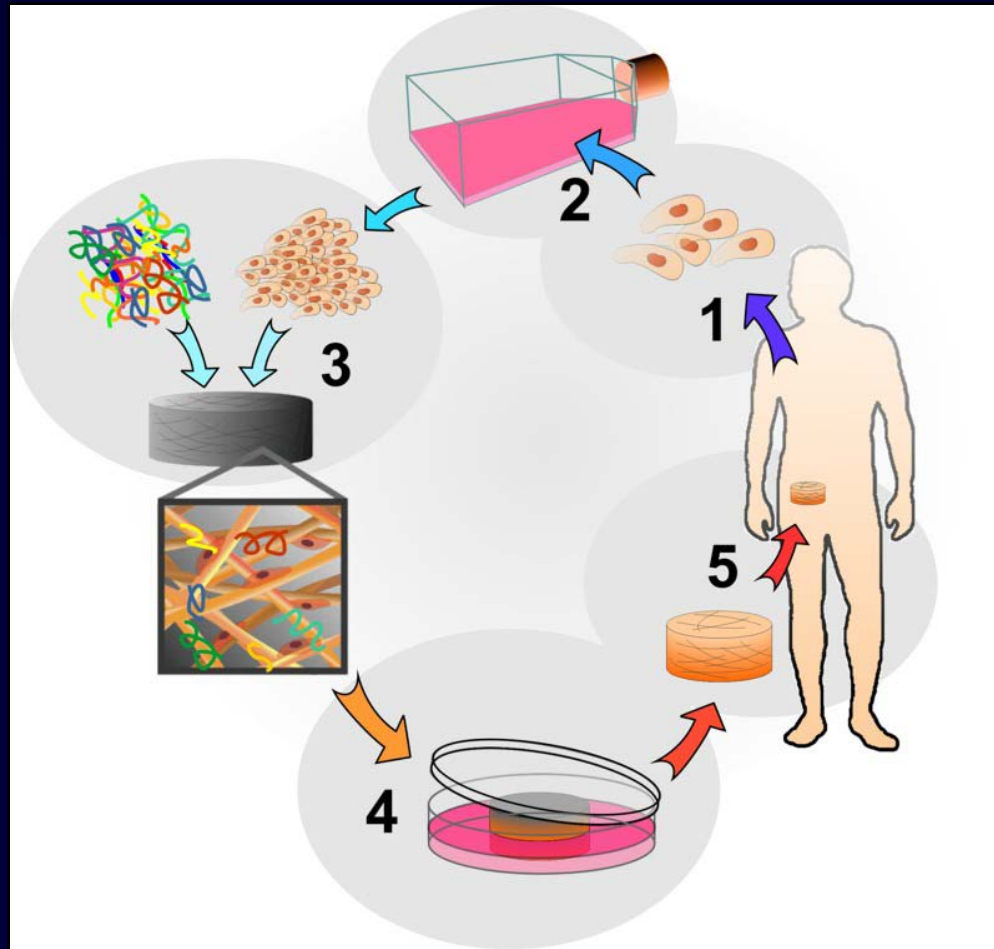


## Case of cultured corneal epithelium transplantation (chemical burn)



## Praktické využití "scaffold-guided" strategie:

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



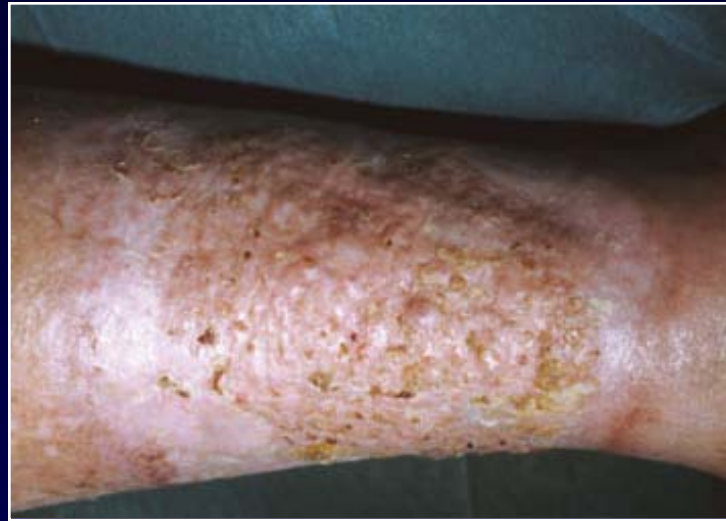
scaffold-guided strategie - obecné schéma  
(autologní provedení)



## Příprava umělé kůže (artificial skin):

- autologní, allogení
- keratinocyty z 1 cm<sup>2</sup>
  - → až 1000 cm<sup>2</sup> kůže během 2 týdnů

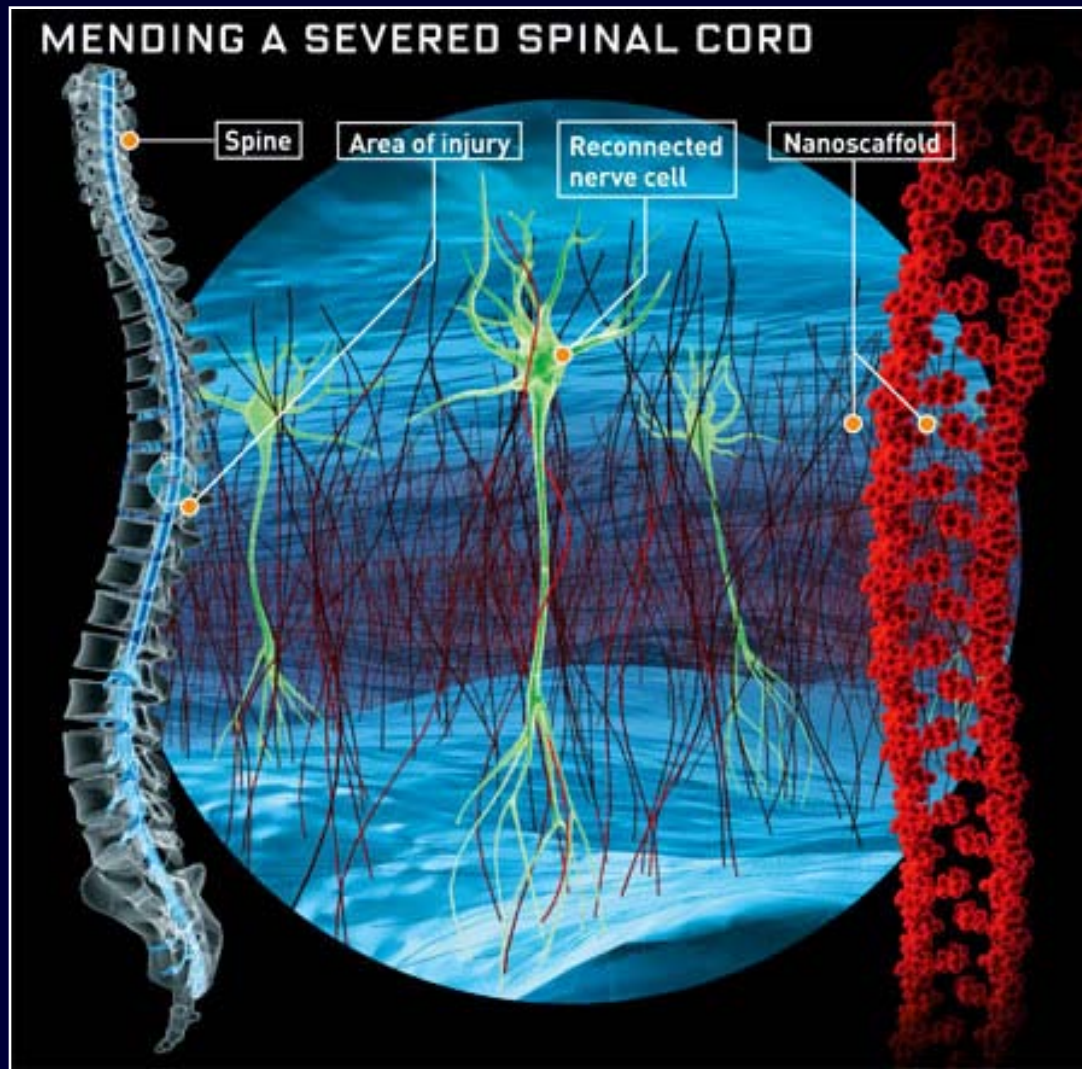




80letá žena  
autologní  
graft  
po 12 měs.



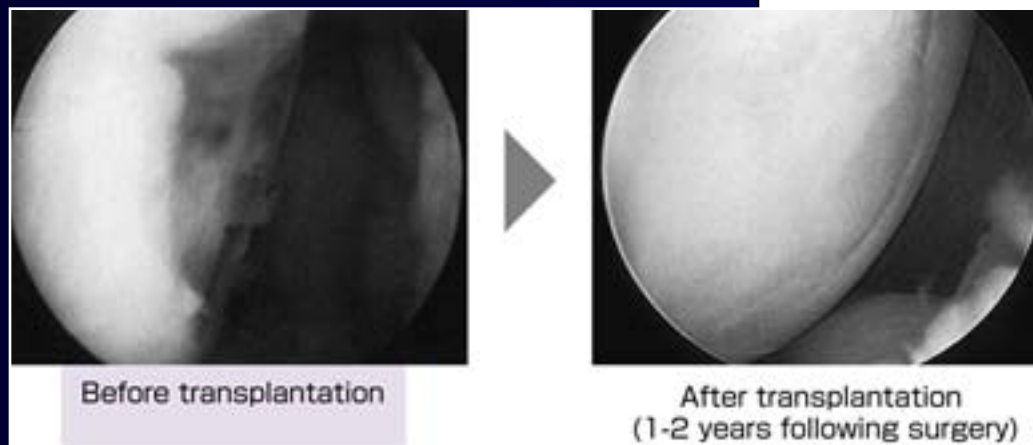
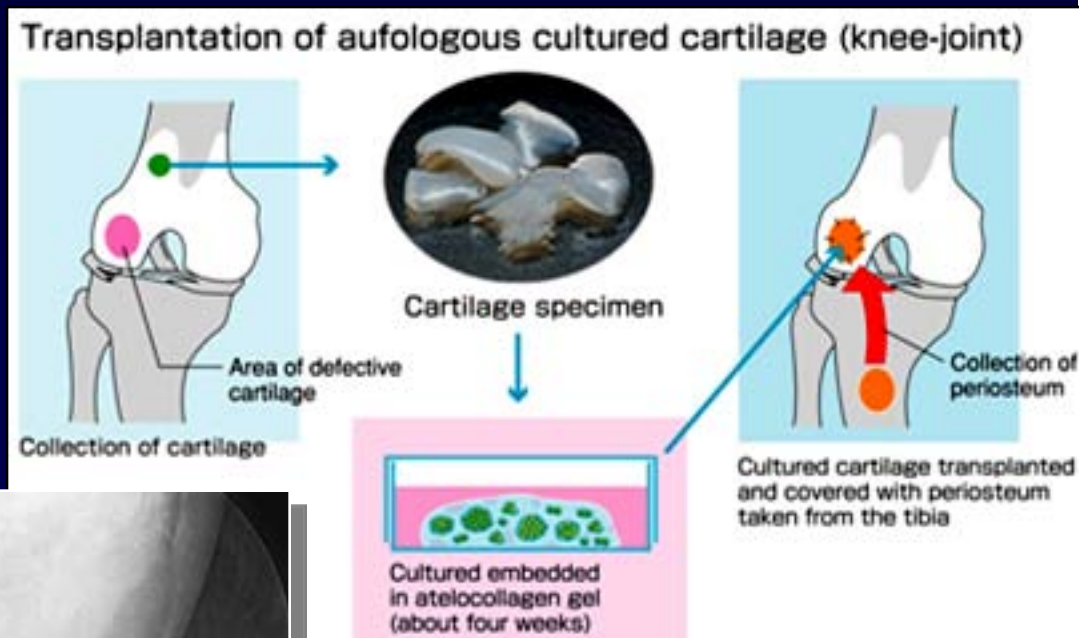
68letý muž  
allogenní  
graft a  
kultivovaná  
epidermis  
po 6 měs.



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



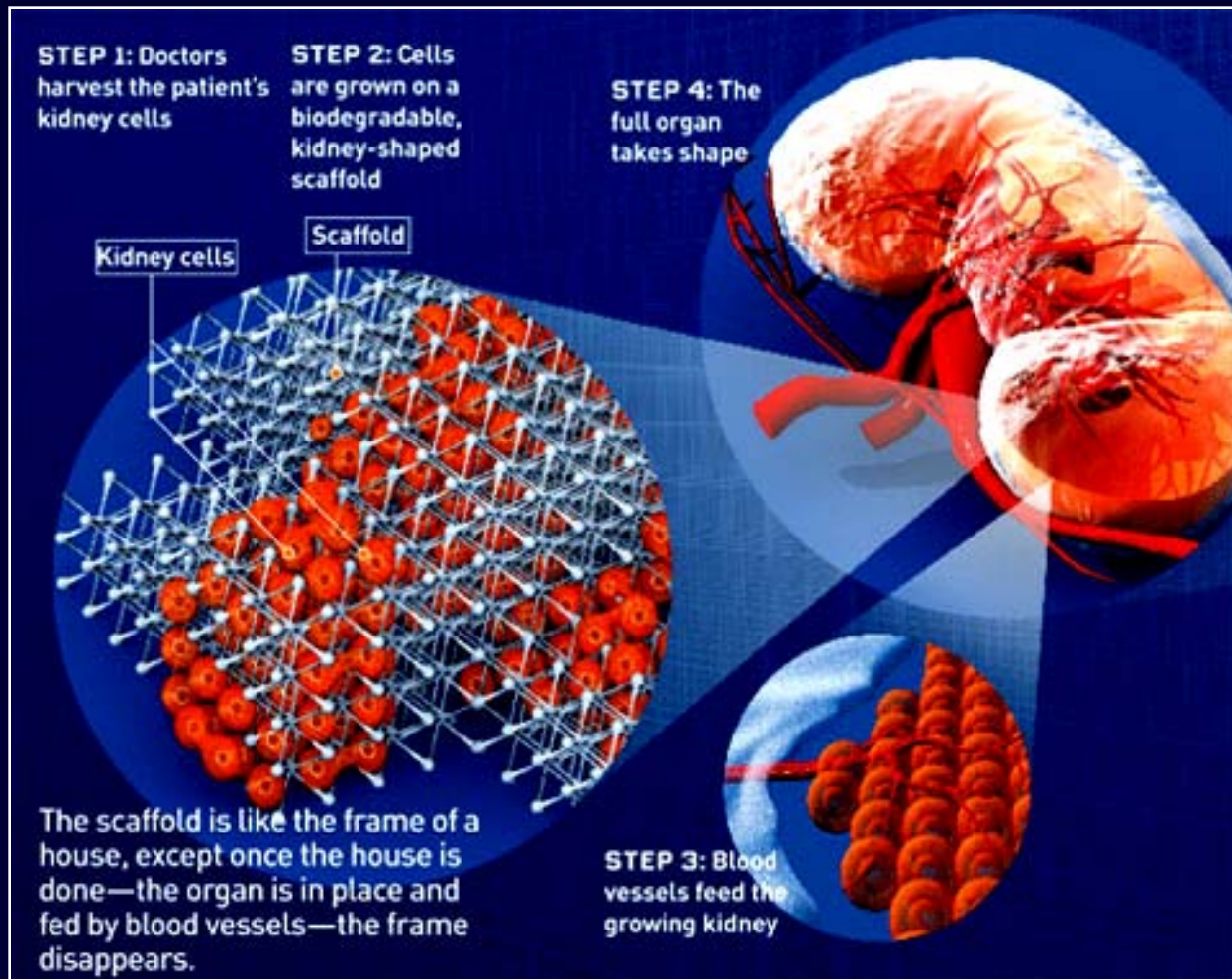




Current Opinion in Biotechnology

## Rekonstrukce močového měchýře:

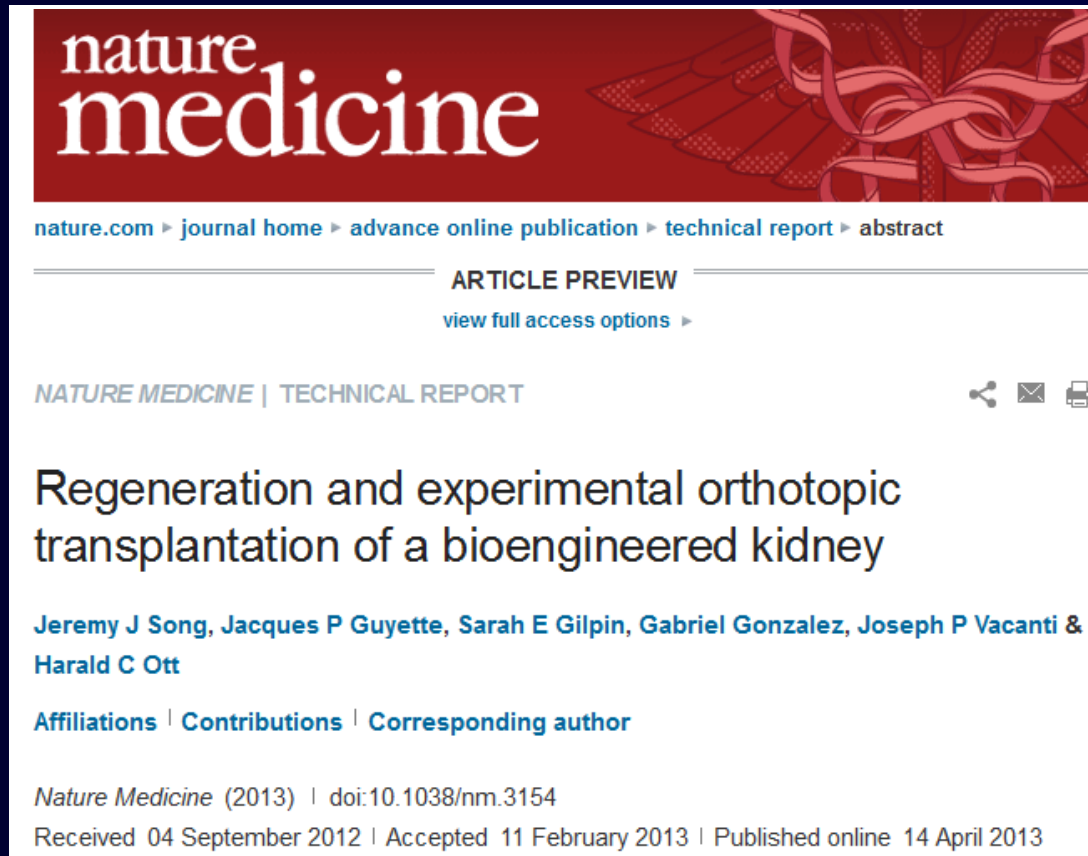
- a) scaffold s nasazenými buňkami
- b) spojení scaffold osazeného buňkami s původním měchýřem
- c) implantát je pokryt fibrinovou hmotou (připojení – omentum)



## scaffold-guided strategie – "umělá" ledvina

# Vytvoření funkční transplantovatelné ledviny:

- odstranění buněk z původní kadaverózní ledviny (decelularizace) • → osazení epiteliálními a endoteliálními buňkami • → kultivace v bioreaktoru • → transplantace pokusným zvířatům • → funkční ledvina



nature  
medicine

nature.com ▶ journal home ▶ advance online publication ▶ technical report ▶ abstract

ARTICLE PREVIEW  
view full access options ▶

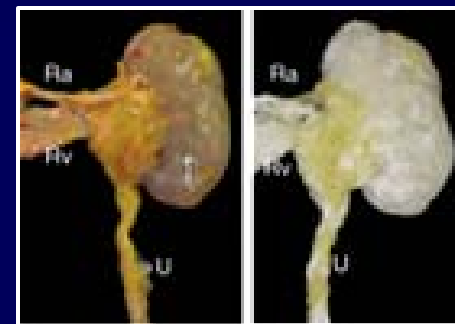
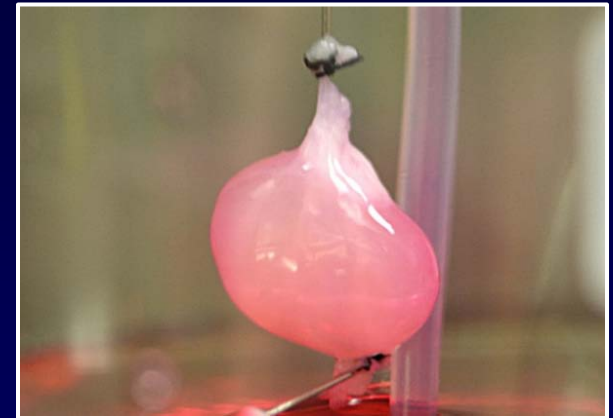
NATURE MEDICINE | TECHNICAL REPORT

Regeneration and experimental orthotopic transplantation of a bioengineered kidney

Jeremy J Song, Jacques P Guyette, Sarah E Gilpin, Gabriel Gonzalez, Joseph P Vacanti & Harald C Ott

Affiliations | Contributions | Corresponding author

Nature Medicine (2013) | doi:10.1038/nm.3154  
Received 04 September 2012 | Accepted 11 February 2013 | Published online 14 April 2013



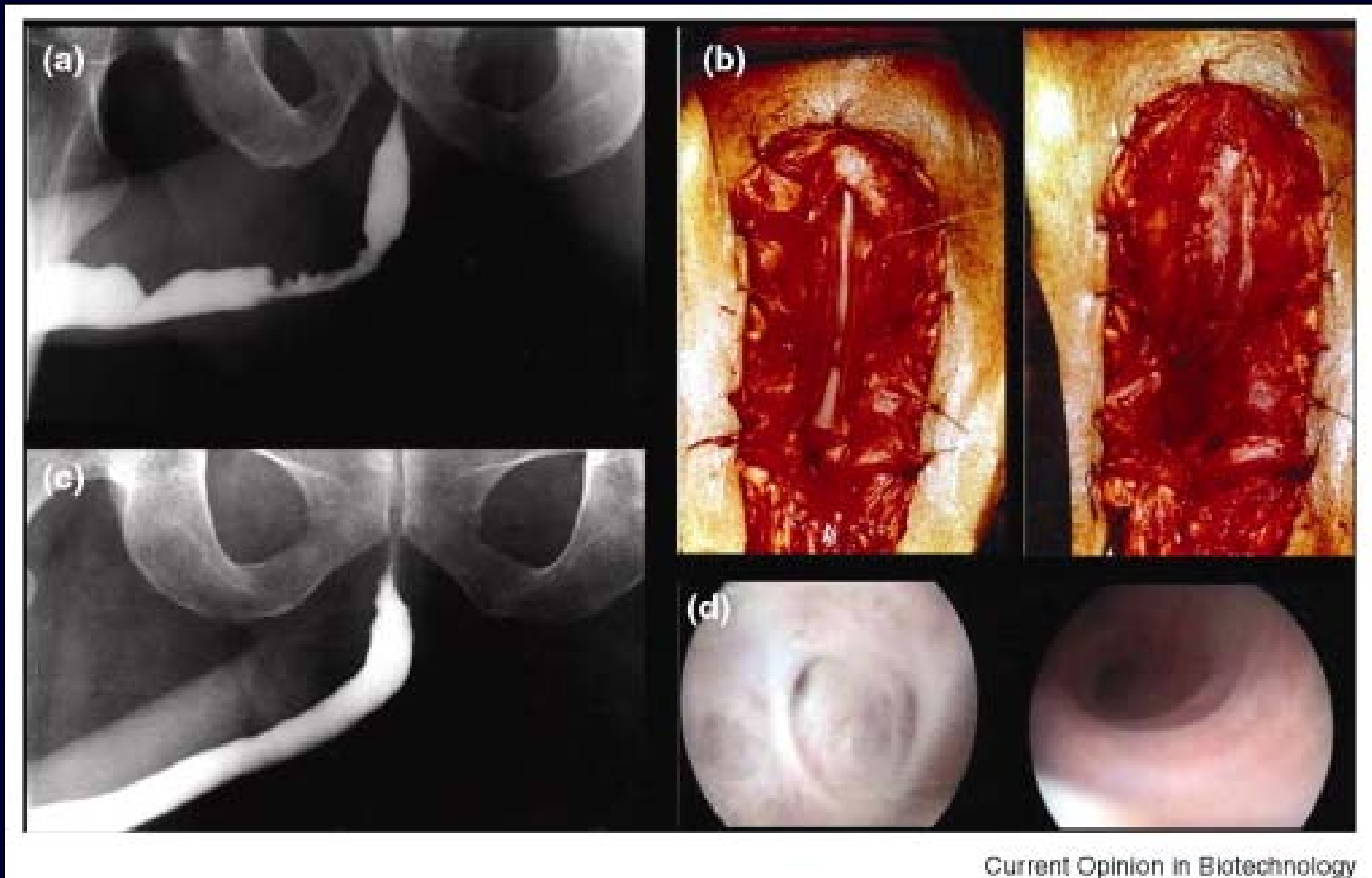
# Příklady nosičů (scaffolds) biologického původu



střevní submukózní tkáň



kolagenová matrix

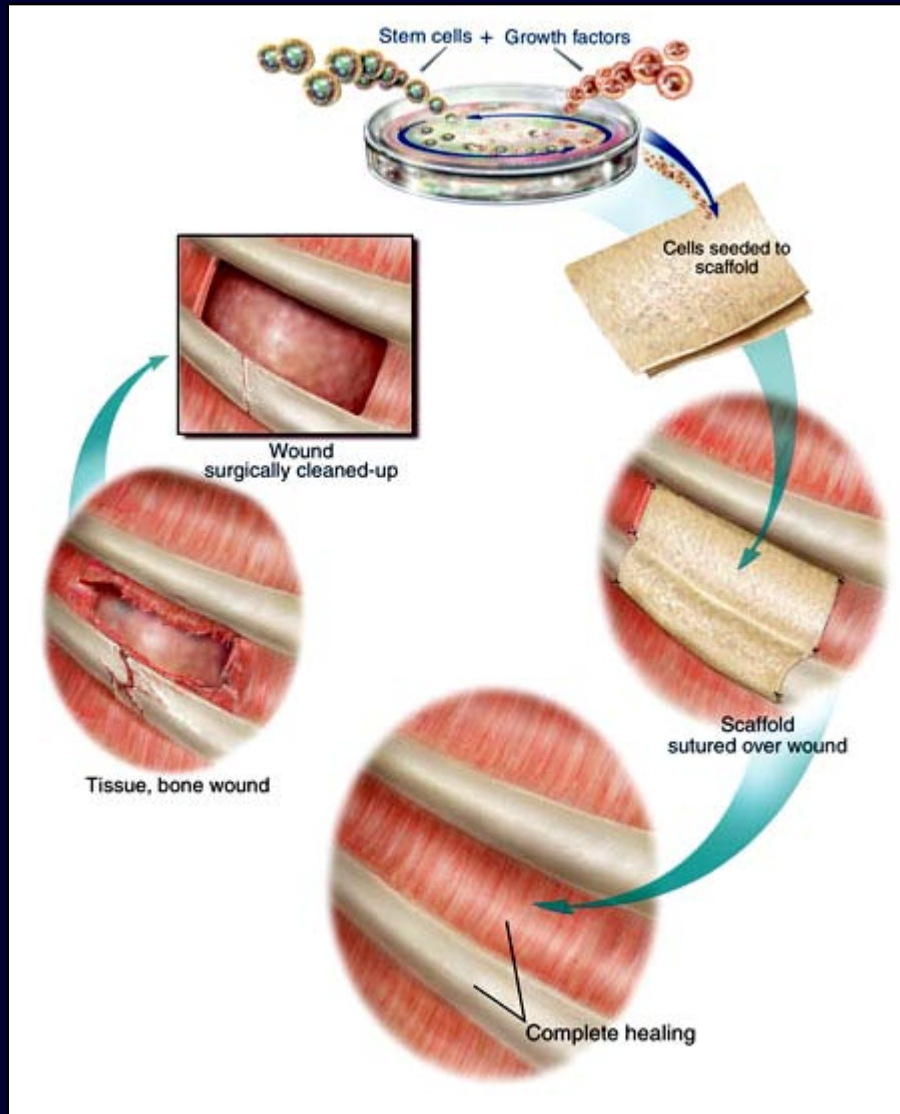


## Rekonstruovaná močová trubice s využitím kolagenové matrix

## Praktické využití

### "bioactive molecule-guided" strategie:

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



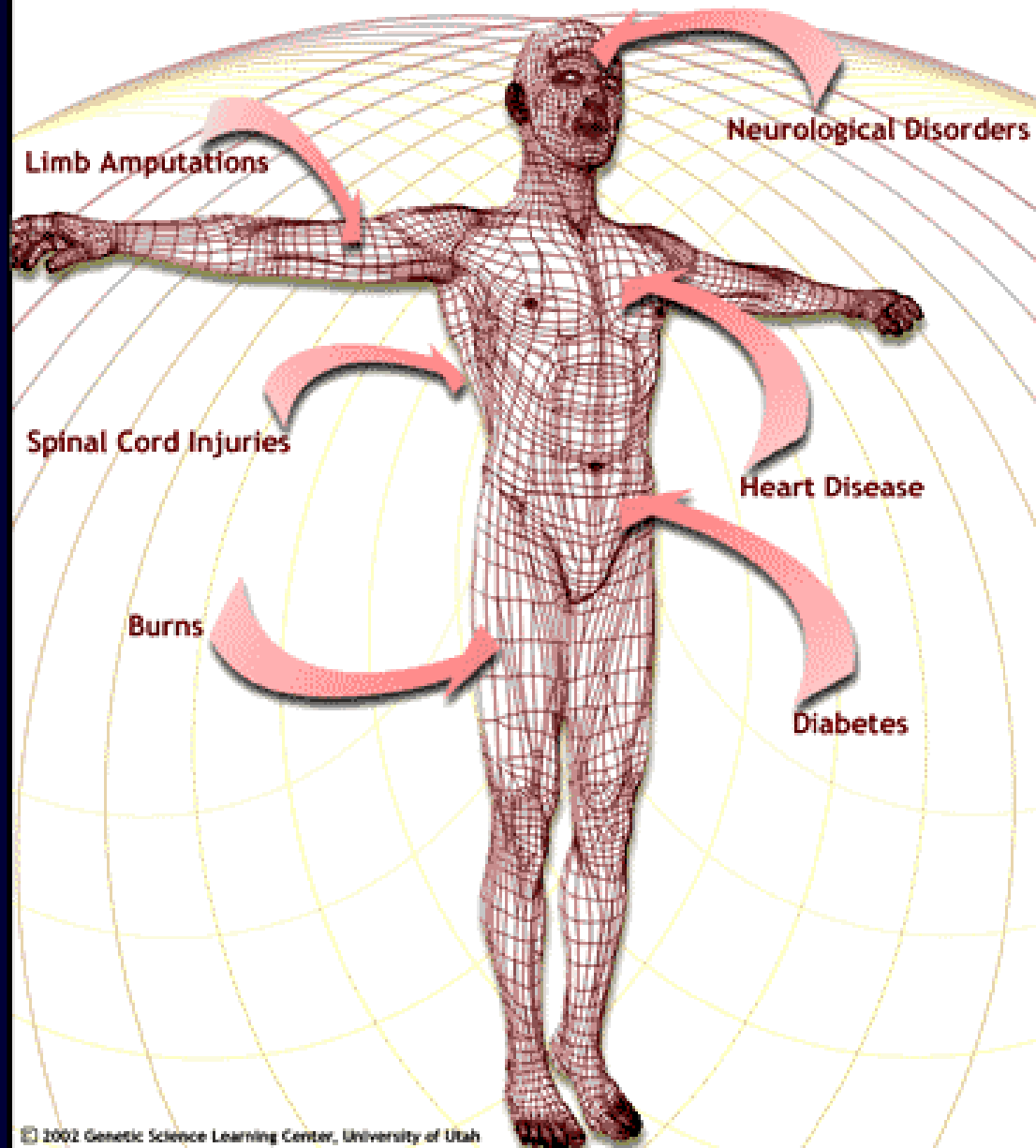
## Léčba hlubokých poranění (kombinace všech 3 strategií)





# VYUŽITÍ ADULTNÍCH A EMBRYONÁLNÍCH KMENOVÝCH BUNĚK

## Health Problems that Might be Treated by Stem Cells

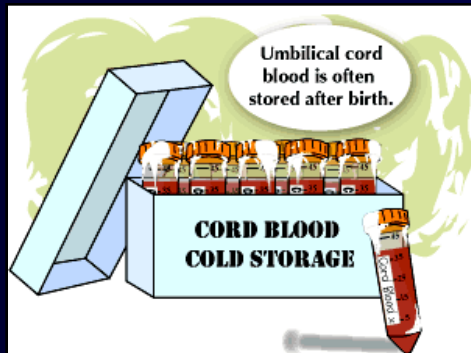


## Transplantace kostní dřeně

- 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

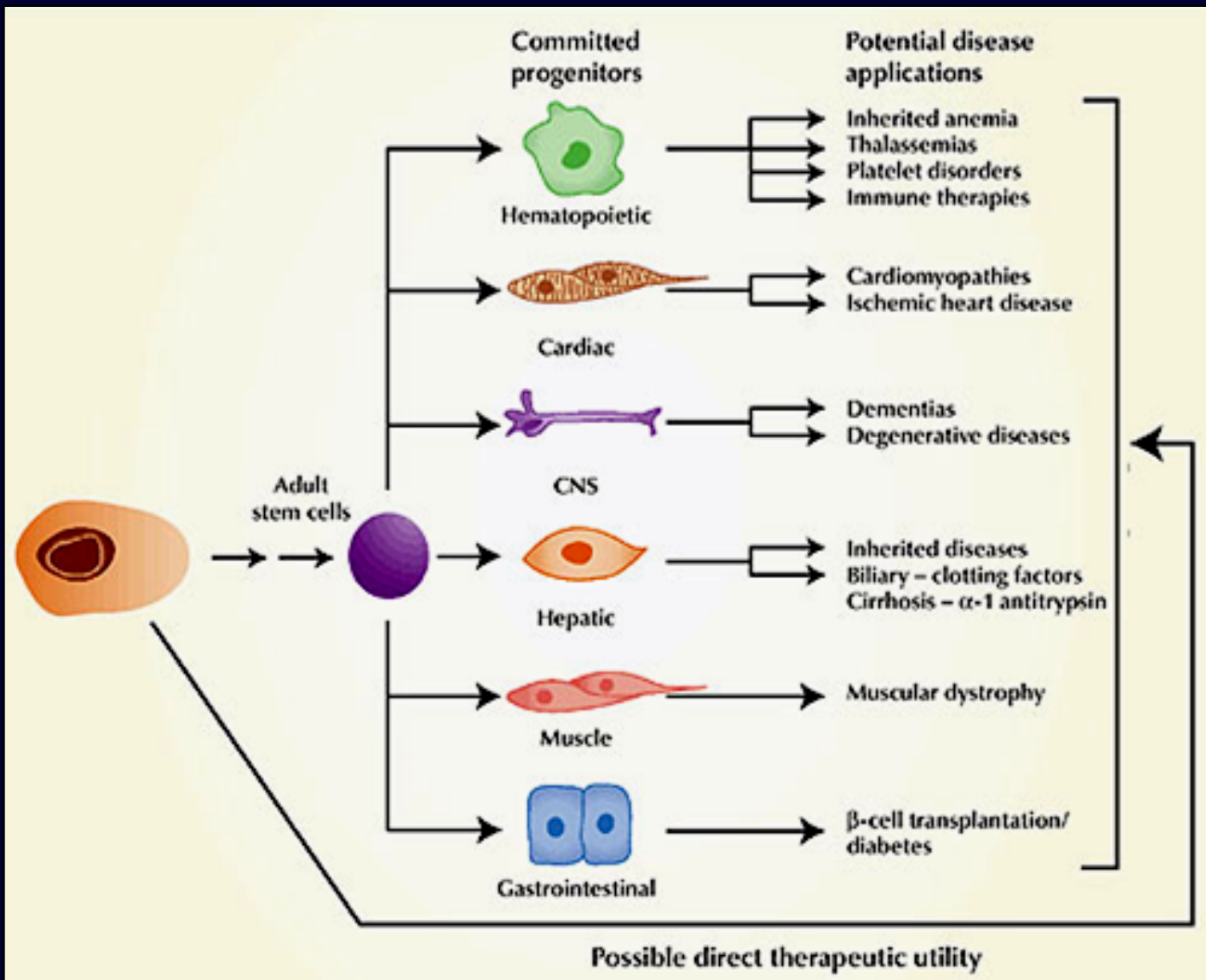
## SCs z pupečnickové krve (umbilical cord blood)

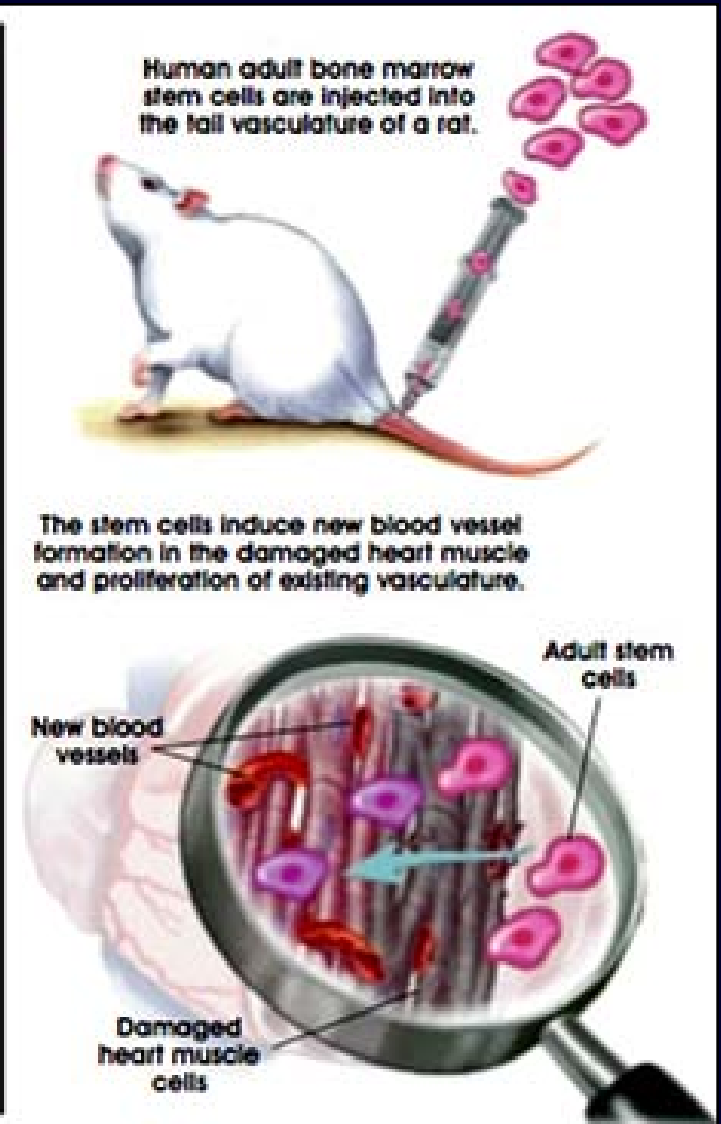
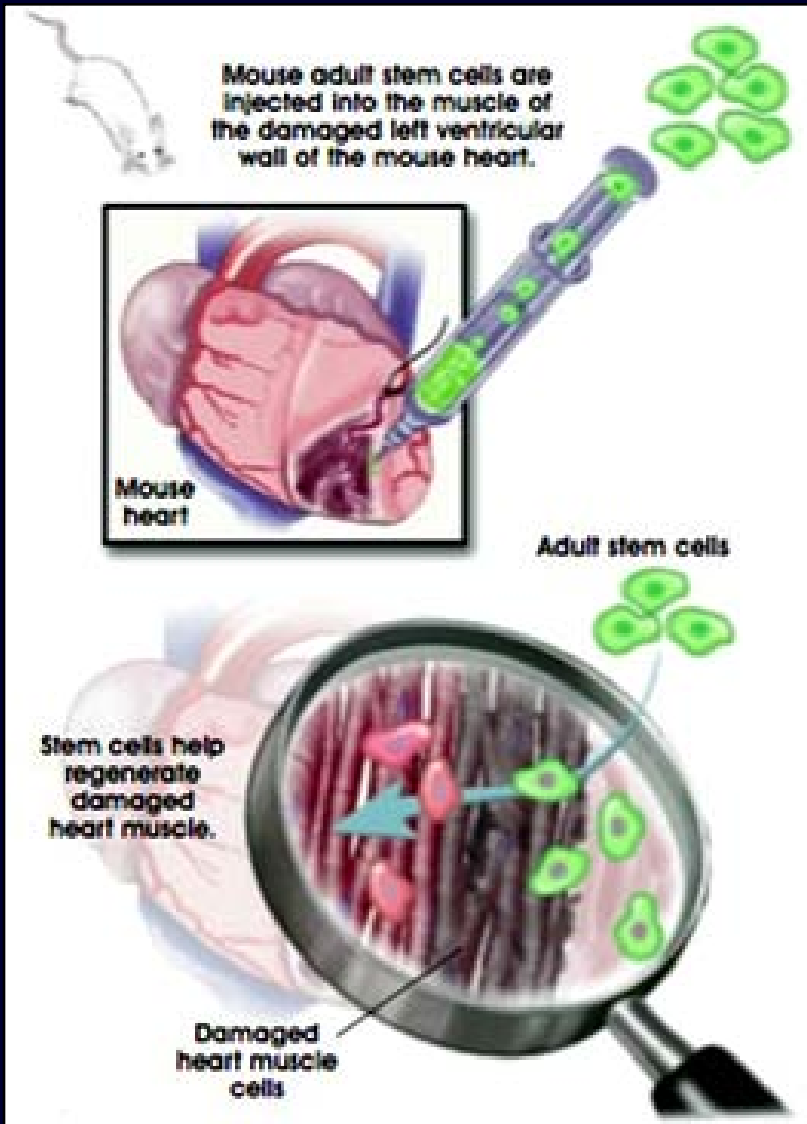
- možná alternativa k transplantaci kostní dřeně
- menší riziko komplikací při transplantaci od nepříbuzných dárců - tzv. GVHD (graft-versus-host disease)
- nižší nároky na příbuznost dárce
- nevýhodou relativně málo SCs v odebraném materiálu (řešení: možnost kombinace)
- darování vs. archivace pro vlastní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

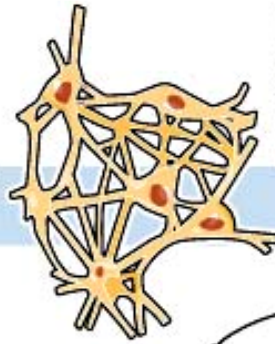
Up to 4 days after the fertilization the embryo reaches a size of 16 cells.



#### Blastocyst

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

### Neural cells



### Blood cells



### Muscle 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.

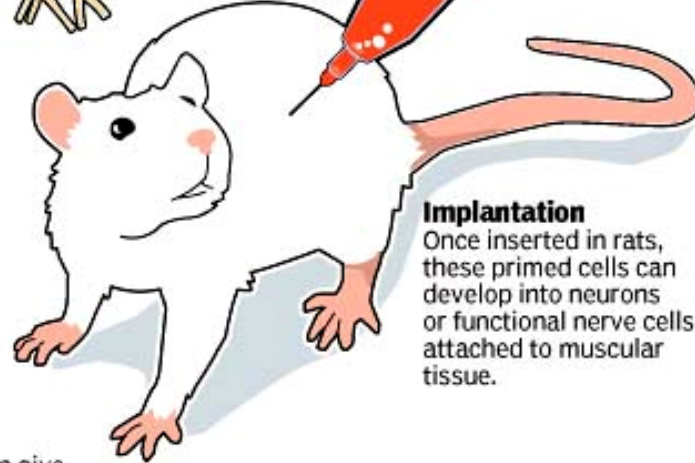
### Culture

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



### Treatment

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



### 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

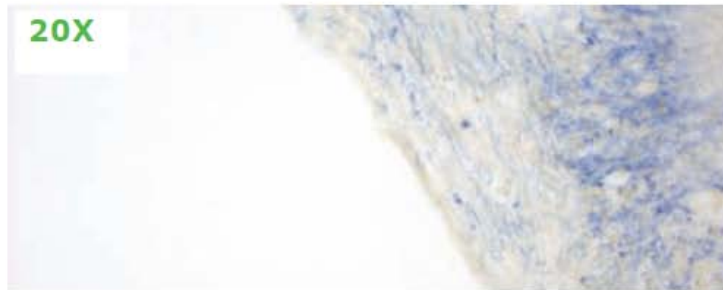
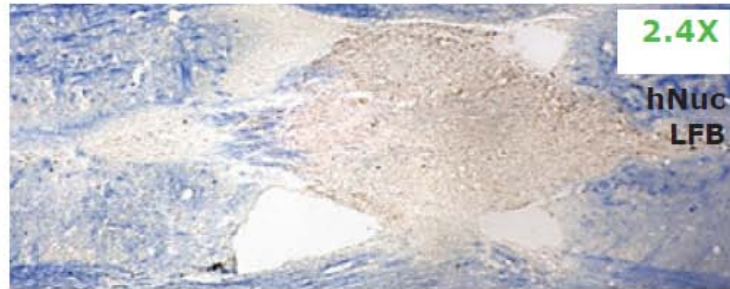
- dobré výsledky na testy toxicity i na tvorbu teratomů (pouze benigní cysty v místě poškození)
- žádná migrace buněk mimo nervový systém
- žádná imunitní odpověď vůči GRNOPC1

**9 Months After No Treatment**

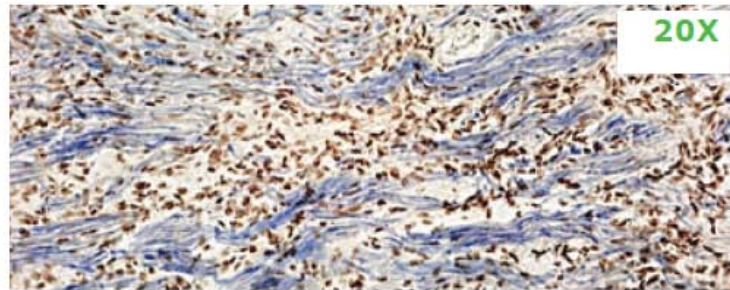


*(Damaged Zone)*

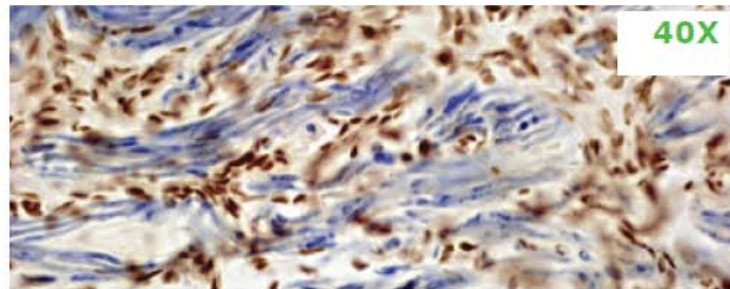
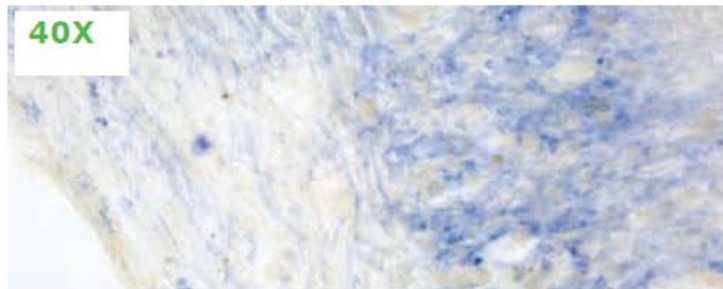
**9 Months After GRNOPC1 Treatment**



*(Loss of Neurons and Myelin)*



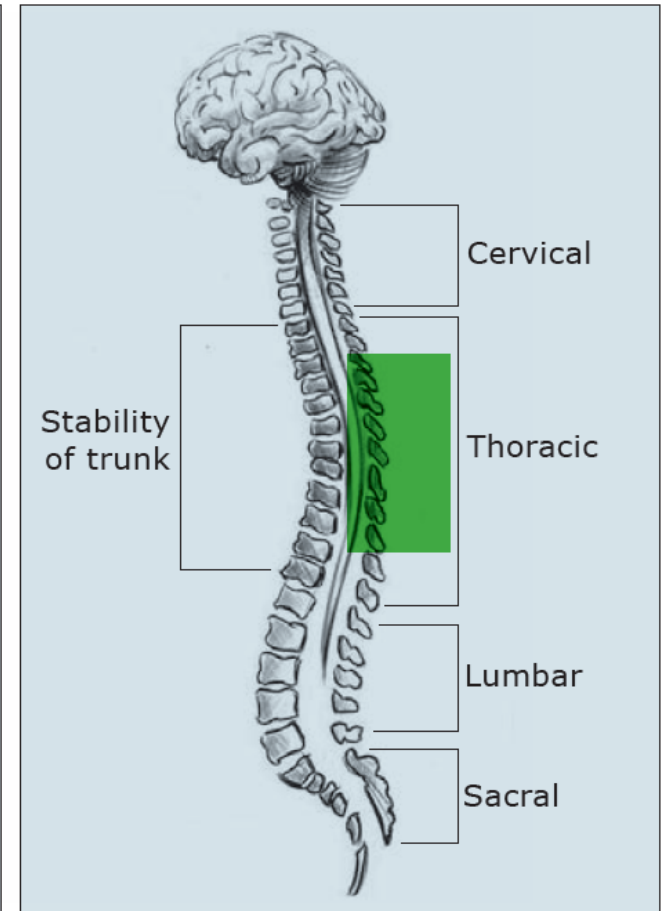
*(Myelinated Rat Axons)*



**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**
- **$2 \times 10^6$  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**

*Geron developed proprietary technologies for hESC differentiation, scalable manufacturing and therapeutic cell preparations*

### **WARF**

*Exclusively licensed fundamental patents for hESCs*

### **University of California**

*Exclusively licensed technology developed under Geron-UC Irvine collaboration for hESC-derived oligodendrocytes*



**GRNOPC1 CELL THERAPY FOR SPINAL CORD INJURY**



## News & Opinion

# First hESC Trial Kaput

Geron is terminating a clinical trial testing a human embryonic stem cell treatment for spinal cord injury.

By Jef Akst | November 15, 2011

13 Comments



Like 62

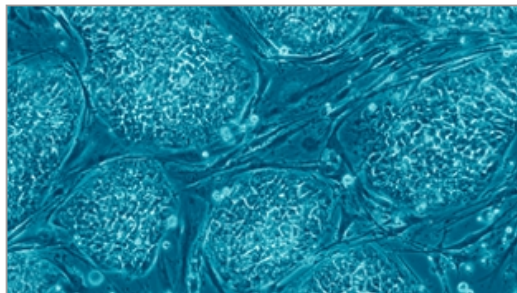
Link this



Stumble



Tweet this



WIKIMEDIA COMMONS, NISSIM BENVENISTY

The world's first clinical trial testing a human embryonic stem cell (hESC) therapy is closing to further enrollment after a long, rocky ride, according to the Geron Corporation. The company, which started the trial two years ago, announced the trial's shuttering Monday (November 14), along with its decision to withdraw from the stem cell sector altogether—not for lack of promise, but simply a strategic move to stay afloat during hard economic times.

## Follow The Scientist



## Subscribe to RSS feed



All



The Nutshell



News & Opinion

## Popular Posts

1. [The Dark Side of Working Nights](#)
2. [Plant RNA Paper Questioned](#)
3. [Best Places to Work](#)

## 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  
<http://www.advancedcell.com/>





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,<sup>a</sup> CHRISTOPHER MALCUT,<sup>b</sup> SHAOMEI WANG,<sup>a</sup> SERGEJ GIRMAN,<sup>a</sup> PETER FRANCIS,<sup>a</sup> LINDA LEMIEUX,<sup>b</sup> ROBERT LANZA,<sup>b</sup> RAYMOND LUND<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Casey Eye Institute, Oregon Health and Science University, Portland, Oregon; <sup>b</sup>Advanced 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](http://www.StemCells.com)



## Advanced Cell Technologies:

### 2 klinické studie s využitím lidských ESCs

- Sub-retinal Transplantation of hESC Derived RPE (MA09-hRPE) Cells in Patients With Stargardt's Macular Dystrophy
- Safety and Tolerability of Sub-retinal Transplantation of hESC Derived RPE (MA09-hRPE) Cells in Patients With Advanced Dry Age Related Macular Degeneration (Dry AMD)
- 4 kohorty, v každé 3 pacienti - rozdílné počty transplantovaných buněk (50 – 200 tisíc)
- zahájení: duben 2011, ukončení: 2013



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