



KBC Sestre milosrdnice  
Klinika za traumatologiju  
BANKA TKIVA

# Klinička primjena naprednih lijekova, ATMP

Listopad 2018.

Dr sc. Mirna Tominac Trcin,  
Voditeljica Banke tkiva



**Genska  
terapija**

**ATMP**

**(Advanced Therapy  
Medicinal Products)**

**Napredne terapije**

**Stanična  
terapija**

**Kombinirani  
ATMP**

**Tkivno  
inženjerstvo**

- Medicinski proizvodi bazirani na stanicama i genima
- Različiti od lijekova koji se temelje na kemijskim, biološkim ili biotehnološkim komponentama
- Slični zahtjevi u kvaliteti
- Male šarže
- Visoki troškovi proizvodnje



# SREDIŠNJA MARKETINŠKA DOZVOLA (MA)

- Postupak za dobivanje MA koja vrijedi u cijeloj EU obuhvaća postupak procjene koji traje 210 dana i uključuje:
  - Slanje opsežne dokumentacije o proizvodu u EMA gdje
  - CAT daje: znanstvenu procjenu, certificira (kvalitetu i ne-kliničke podatke), kategorizira napredni lijek, procijenuje kvalitetu, sigurnost i djelotvornost naprednog lijeka, daje upute o praćenju učinka lijeka, farmakovigilanciji, procjeni i analizi rizika
- Finalnu preporuku za MA daje Committee for Medicinal Products for Human Use, CHMP
- EC izdaje MA na osnovu CHMP preporuke
- *Iznimka od procedure- ATMP kao bolničko izuzeće, koje licencira nacionalno regulatorno tijelo, CA*



# ATMP-ovi U RAZLIČITIM FAZAMA RAZVOJA I STATUSA U EU

## ATMPs in Europe (2009- 2017)



EUROPEAN MEDICINES AGENCY

~ **500** clinical trials using ATMPs in EU

~ **290** ATMP classifications

~ **270** scientific advice requests

**19** MAAs reviewed



**10** ATMPs approved



**3** withdrawn  
**1** Suspended

Market

**6**  
licensed  
ATMPs



© co.don AG



# SAMO 10 ATMP JE DOBILO MA u EU



EUROPEAN MEDICINES AGENCY

## Marketing authorisations (until December 2017)

- 10 ATMPs authorised (3 GTMP, 3 CTMP, 4 TEP)
  - Chondrocelect – TEP – Comm Dec 5/10/09 / MA withdrawn July 2016
  - Glybera – GTMP – Comm Dec 25/10/12 / MA ended Oct 2017
  - MACI – TEP, combined ATMP – Comm Dec 27/6/13 / MA suspended Sept. 2014
  - Provenge – sCTMP - Comm Dec 6/9/13 / MA withdrawn May 2015
  - Holoclar – TEP – Comm Dec 17/2/15
  - Imlygic – GTMP – Comm Dec 16/12/15
  - Strimvelis – GTMP – Comm Dec 26/5/16
  - Zalmoxis – CTMP - Comm Dec 18/8/16
  - Chondrosphere – TEP – Comm Dec 10/7/17
  - Alofisel – CTMP – Opinion 12/17 (Comm Dec. Pending)



# KOMPLEKSAN REGULATORNI OKVIR ATMP-ova

- Opća regulativa o ATMP : EC 1394/2007, *lex specialis*
- Klasifikacija i tehnički zahtjevi: [Directive 2001/83/EC](#) (o medicinskim proizvodima ), [Commission Directive 2009/120/EC](#)
- Certifikacija podataka o kvaliteti i nekliničkim podacima za SME: [Commission Regulation \(EC\) No 668/2009](#)
- [Nadzor i autorizacija lijekova : Regulation \(EC\) No 726/2004](#)
- Dobra klinička praksa (GCP): direktive + nacrt smjernica GCP za ATMP
- cGMP , GMP smjernice za ATMP
- Pedijatrijska regulativa
- Farmakovigilancija –regulativa i direktive, smjernice vezano za ATMP
- Direktive vezane uz tkivno bankarstvo: [Directive 2004/23/EC](#), [Directive 2006/17/EC](#), t [Directive 2006/86/EC](#), [Directive 2015/565](#), [Directive 2015/566](#),
- GMO direktiva o utjecaju na okoliš
- Legislativa o Orphan lijekovima
- Legislativa o uvjetovanoj MA



# ATMP-ovi na TRŽIŠTU

Često dugo vrijeme razvoja ATMP-a:

- Strimvelis – gotovo 15 godina od početka prekliničkih *in vivo* studija
  - Kymriah (Novartis) CAR-T cell, terapija odobrena od FDA – 30 godina od koncepta usmjeravanja T–limfocita protiv tumorskih stanica
- Visoka cijena razvoja, proizvodnje i MA ATMP-a
- Glybera ,GTMP za liječenje deficijencije lipoprotein lipaze cijena \$1 m po liječenju
  - Kymriah oko 400 000 EUR
  - Alofisel \$60 000-\$120 000
- Astra Zeneca predlaže 5R okvir za R&D: right target, the right safety, the right tissue, the right patients, and the right commercial potential
- Upotreba novih tehnologija, npr. CRISPR-Cas9 editiranje gena
- Nova saznanja o imunoreakcijama u ljudskom tijelu



# DJELATNOSTI BANKE TKIVA

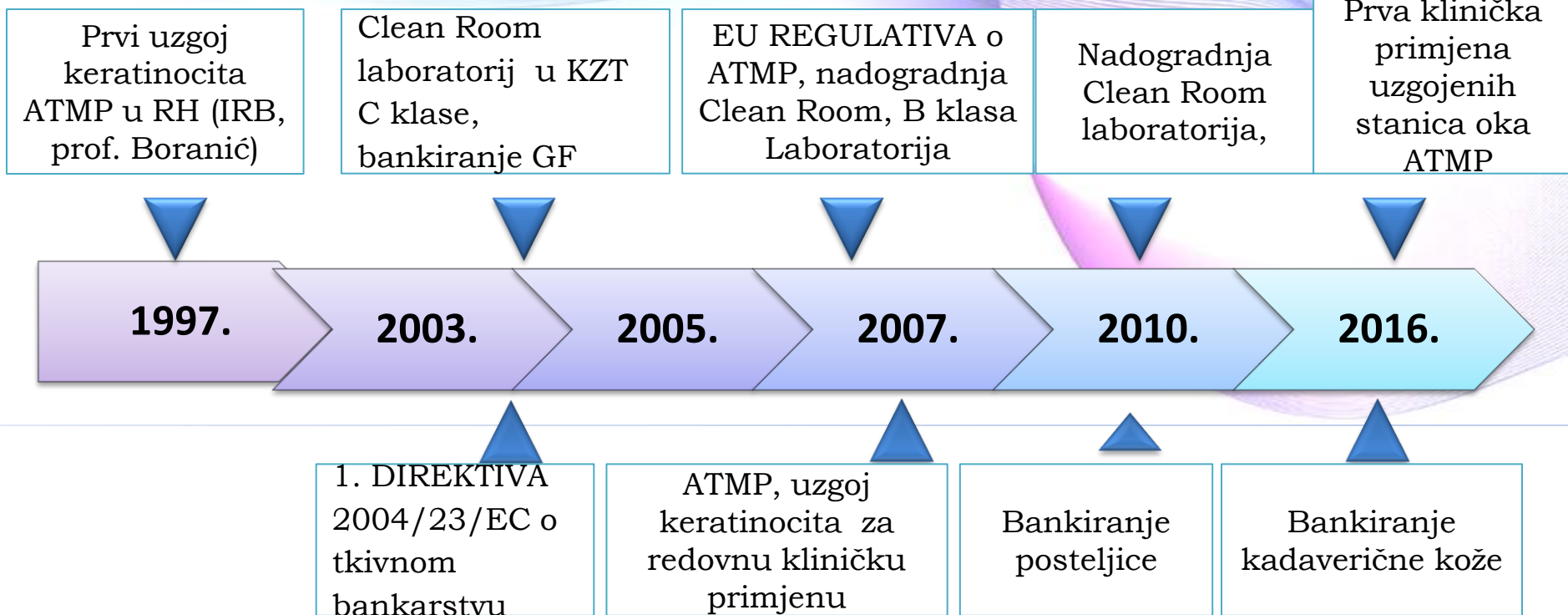
Napredni lijekovi, ATMP kao bolničko izuzeće: uzgoj stanica kože i rožnice

Tkivno bankarstvo: posteljica, bankiranje glave bedrene kosti, kadaverična koža





# RAZVOJ DJELATNOSTI BANKE TKIVA





# LABORATORIJ BANKE TKIVA

- A, B, C i D klase čistog prostora te nečisti prostor (N)
- Redovna kontrola fizikalnih i mikrobioloških parametara
- Mkb. kontrola A i B klase tijekom svakog radnog procesa
- Mkb. kontrola ulaznih sirovina (reagensa), međuproizvoda, alkvota i suplemenata za hranjive stanične medija (10%)

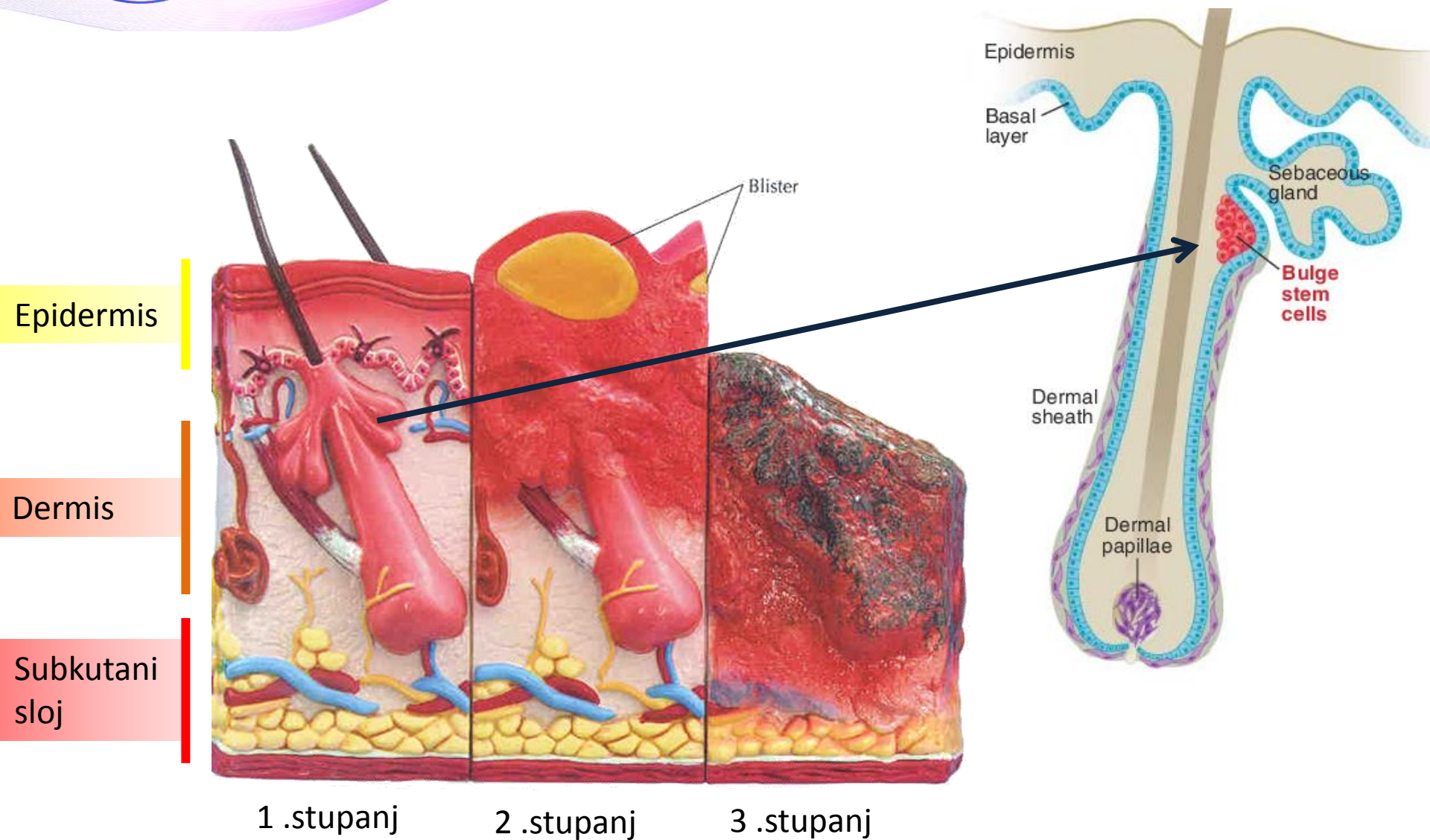




# UZGOJ STANICA KOŽE

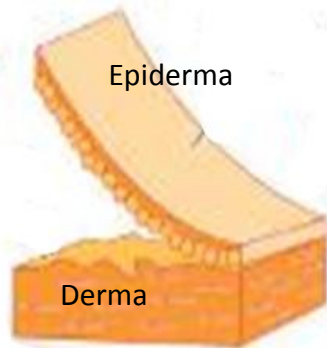
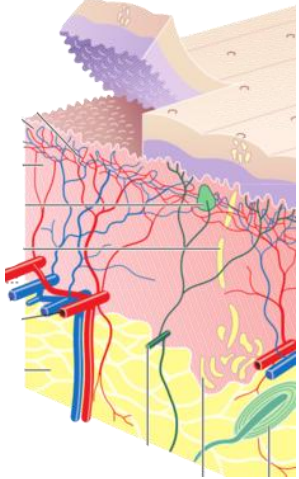
- Do sada smo uzgajali kožu za više od 60 teško opečenih pacijenata
- Dob pacijenata: 8 mjeseci starosti – 80 godina života
- TBSA: od 40 – 97% , II. b- III. stupanj
- Kontrola kvalitete bioloških uzorka tijekom uzgoja (kontrola sterilnosti proizvoda, endotoksini, vijabilnost stanica)
- Uzgoj traje od 3-4 tjedna
- Nedostatak dermalne komponente

# OPEKLINSKE OZLJEDE

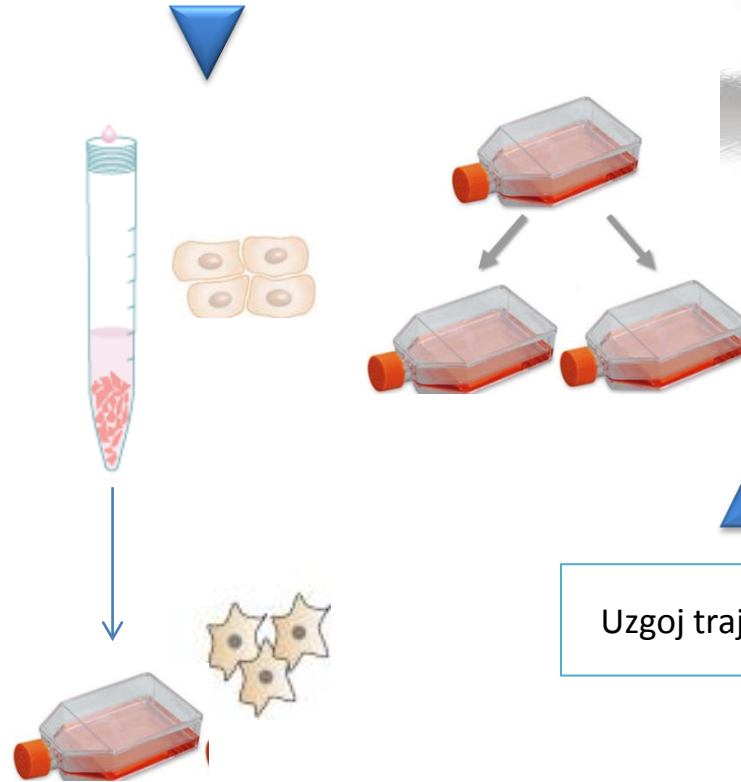


Keratinociti se „zasijavaju“ na umrtvljene mišje fibroblaste uz dodatak hranjivog staničnog medija, faktora rasta i ostalih biomolekula koje pospješuju diobu i diferencijaciju stanica.

Biopsija uzoka kože  
(2 cm<sup>2</sup>)



Enzimsko odvajanje  
epiderme od derme

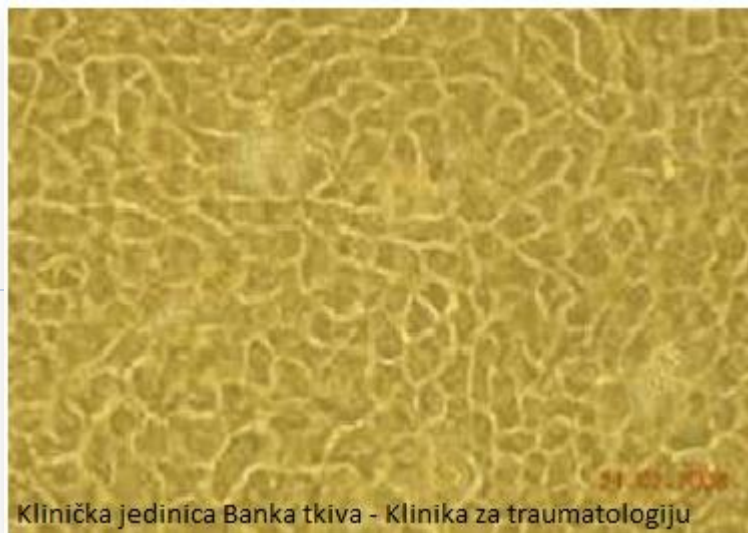


Uzgoj traje 3-4 tjedna





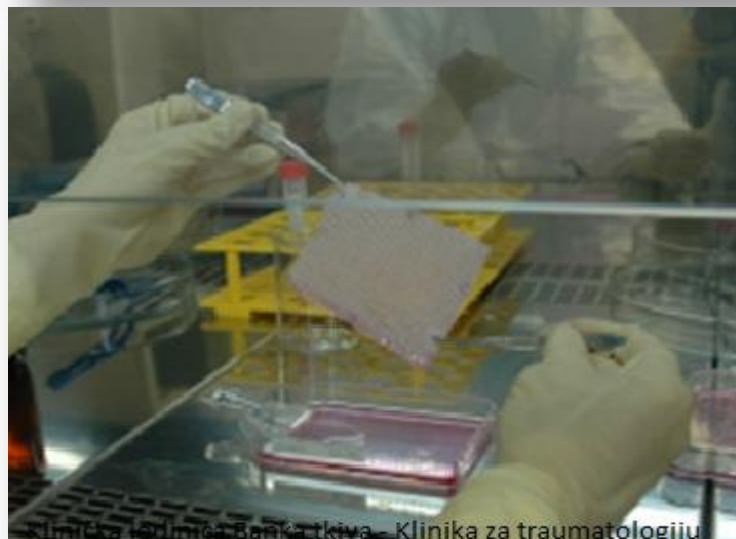
# METODA RHEINWALD I GREEN U PRAKSI



Klinička jedinica Banka tkiva - Klinika za traumatologiju



Klinička jedinica Banka tkiva - Klinika za traumatologiju



Klinička jedinica Banka tkiva - Klinika za traumatologiju



Klinička jedinica Banka tkiva - Klinika za traumatologiju



# NAŠA ISKUSTVA SA UZGOJEM KOŽNIH PRESADAKA



Klinička jedinica Banka tkiva - Klinika za traumatologiju

2 godišnji dječak : opekline vrućom vodom



Klinička jedinica Banka tkiva - Klinika za traumatologiju

15 godišnji dječak: opekline električnom strujom



# OSTALE METODE PRIMJENE – KOŽA U SPREJU

Klinička primjena epitelnih stanica uzgojenih u mediju bez seruma (tzv. koža u spreju)

## Prednosti

- ▶ Bez životinjskih komponenti
- ▶ Kraće vrijeme uzgoja
- ▶ Manji broj stanica je terminalno diferenciran
- ▶ Pokrivanje veće površine

## Nedostatci

- ▶ Način primjene
- ▶ Kapanje s rane







## OSTALE METODE PRIMJENE – KOŽA U FIBRINSKOM LJEPILU

Klinička primjena uzgojenih epitelnih stanica resuspendiranih u dvokomponentnom fibrinskom ljepilu Tisseel Kit VH – Baxter



Klinička jedinica Banka tkiva - Klinika za traumatologiju



Klinička jedinica Banka tkiva - Klinika za traumatologiju

Subkonfluentni keratinociti :

- Pomiješani s fibrinogenom Tisseel ljepila
- Aplicirani u šprici istovremeno s trombinskom komponentom



# OSTALE METODE PRIMJENE – KOŽA NA FIBRINSKOM GELU

U fibrinskom nosaču nalaze se ljudski fibroblasti (imitacija dermisa)

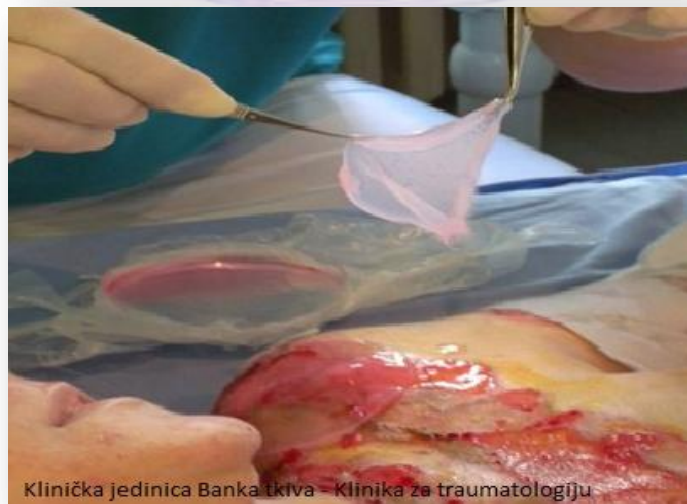
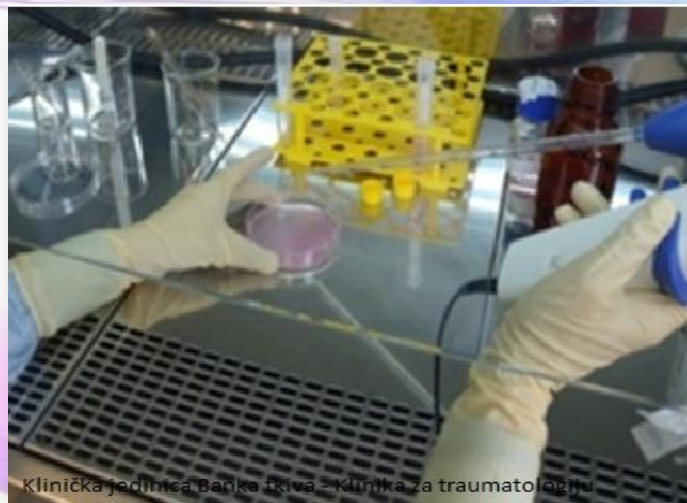
Na fibrinskom nosaču zasijani su keratinociti: melanociti = 50:1

## Prednosti

- ▶ Kraće vrijeme uzgoja
- ▶ Prisutnost dermalne komponente
- ▶ Olakšana manipulacija i primjena

## Nedostatci

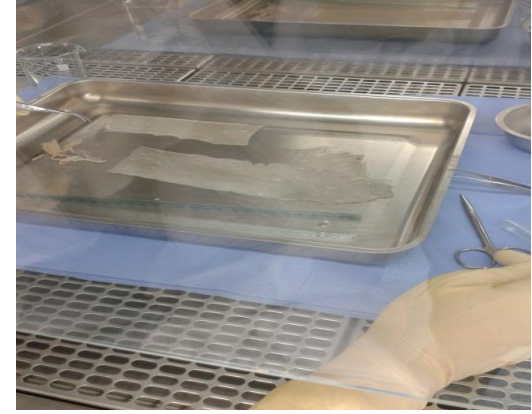
- ▶ Stanice pri kultivaciji razgrađuju fibrin
- ▶ Cijena fibrina
- ▶ Transparentnost gela





# BANKIRANJE KADAVERIČNE KOŽE

- Do sada smo obavili 3 eksplantacije kože na NHBD i HBD darivateljima
- Poštivanje etičkih i zakonskih normi
- Pregled darivatelj: krv, socijalna i medicinska dokumentacija i fizički pregled darivatelja
- Uzima se epidermis sa tankim dermisom ili debljim dermisom, koža se pohranjuje u 85% glicerol
- Kontrola kvalitete: sterilnost proizvoda





# OBRADA POSTELJICE I BANKIRANJE AMNIJSKIH PRESADAKA

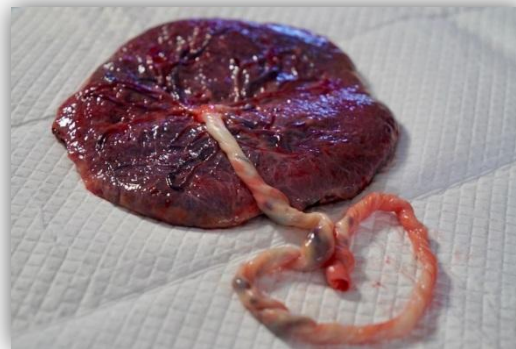
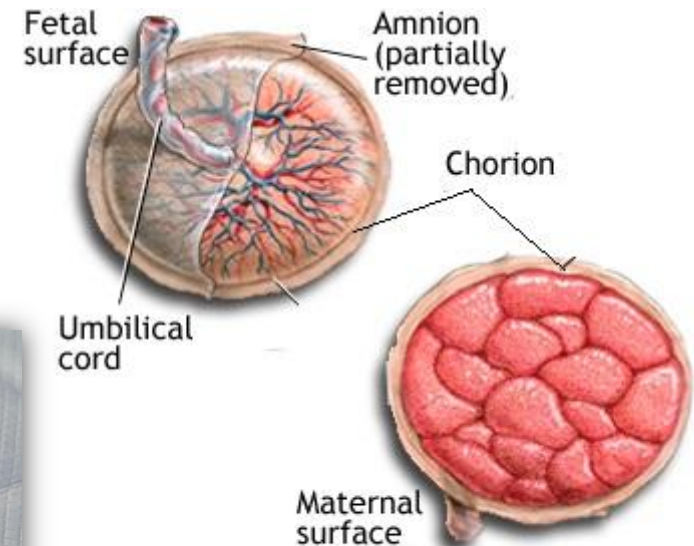


# UZIMANJE POSTELJICE



- Elektivni carski rez
- Procjena darivateljice
- Informirani pristanak darivateljice
- Testiranje uzoraka krvi darivateljice
- Mikrobiološka kontrola medija i tkiva u svim fazama obrade posteljice

Placenta

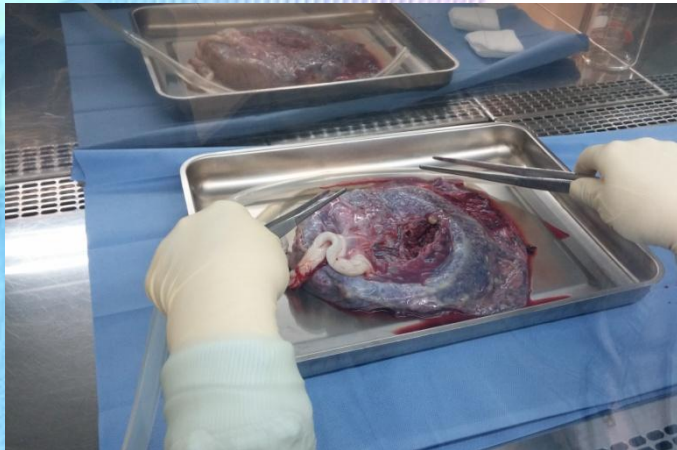




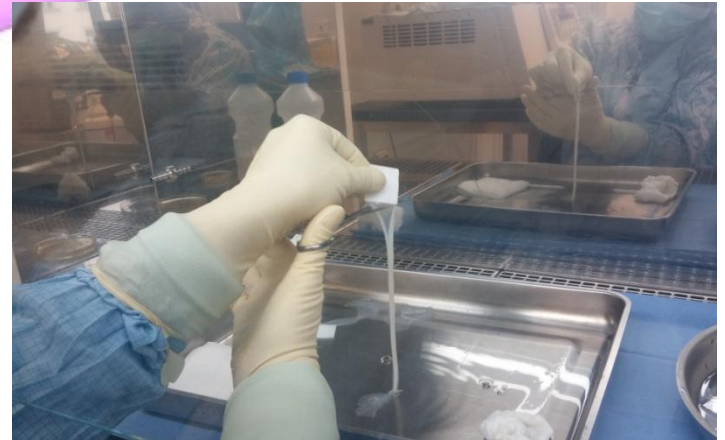
# OBRADA POSTELJICE

Odvajanje koriona od amnijske membrane

1



2



3



4





# SVOJSTVA AMNIJSKE MEMBRANE

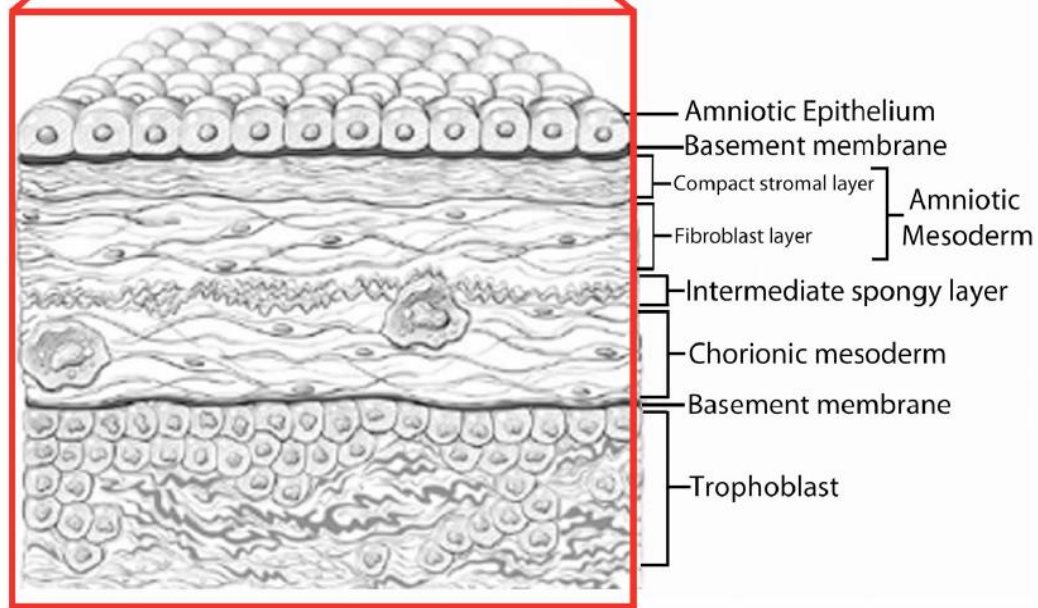
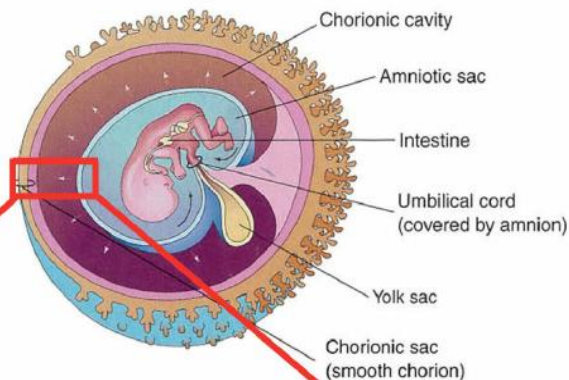
Protuupalna

Antifibrotična

Antimikrobna

Potiče epitelizaciju  
i cijeljenje rana

Izvor  
multipotentnih  
matičnih stanica





# SVOJSTVA AMNIJSKE MEMBRANE

Idealan nosač u TE

▶ Izvor faktora rasta, citokina, molekule ECM

Prednosti matičnih stanica amnijske membrane u odnosu na embrionalne stanice

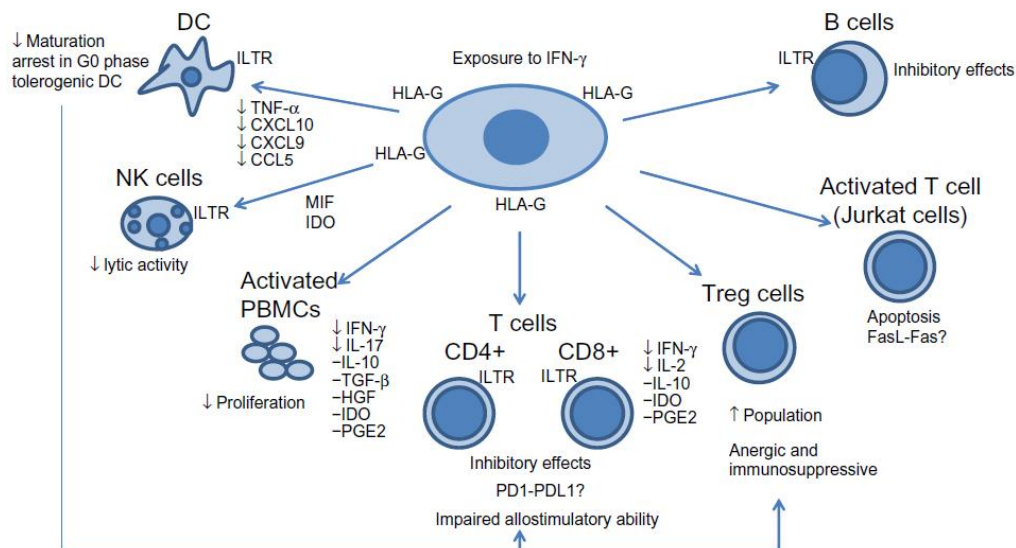
▶ Kirurški suvišno tkivo; manje etičke dvojbe

▶ Nisu teratogene

▶ Mala imunogeničnost

Diferencijacija: stanice oka, stanice kože, stanice hrskavice, periferne živčane stanice, hepatocite,  
AM-derived cells

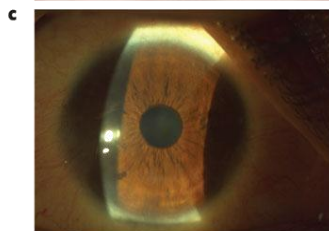
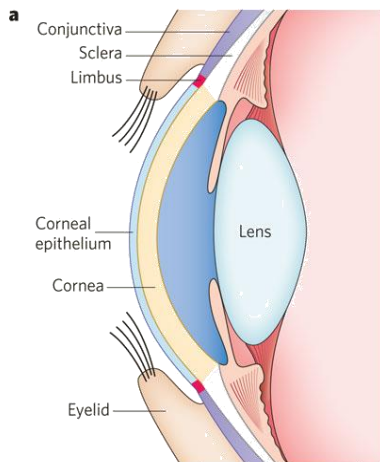
Izvor multipotentnih matičnih stanica





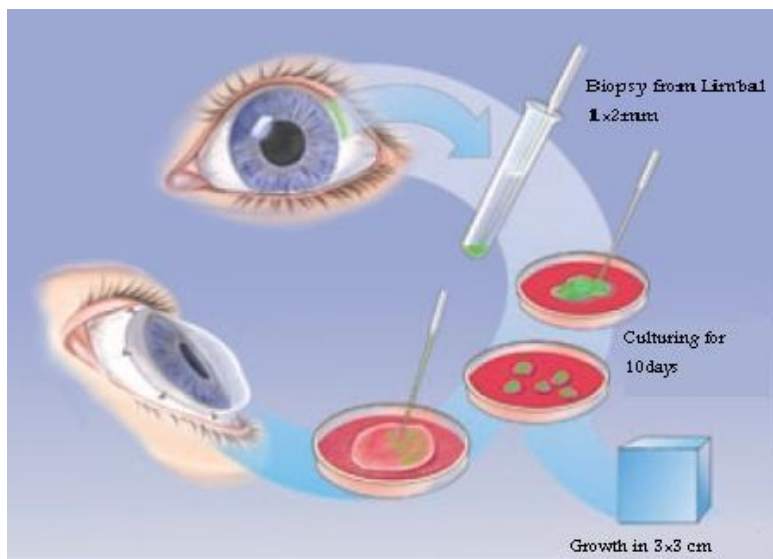


# STANIČNA TERAPIJA ROŽNICE



Rožnica je bitna za funkciju vida - omogućava prolazak i fokusiranje svjetla na mrežnicu smještenu u stražnjem dijelu oka

Limbalne matične stanice odgovorne su za regeneraciju epitela rožnice. Smještene su u limbusu (u Vogt palisadama), u uskom graničnom području između bjeloočnice i rožnice.



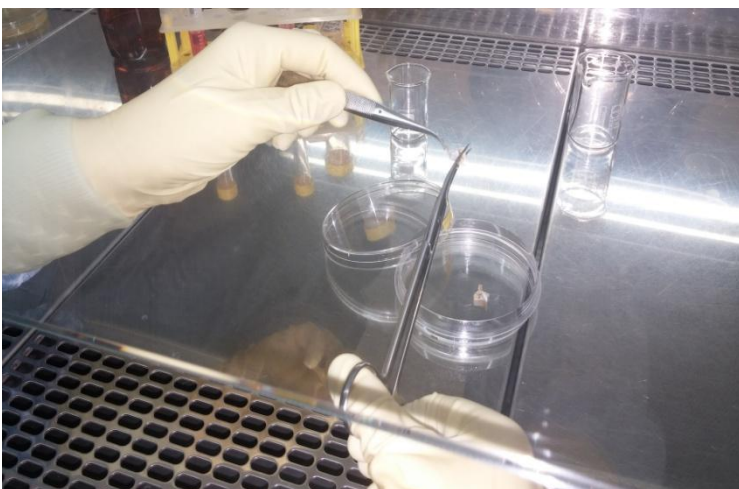
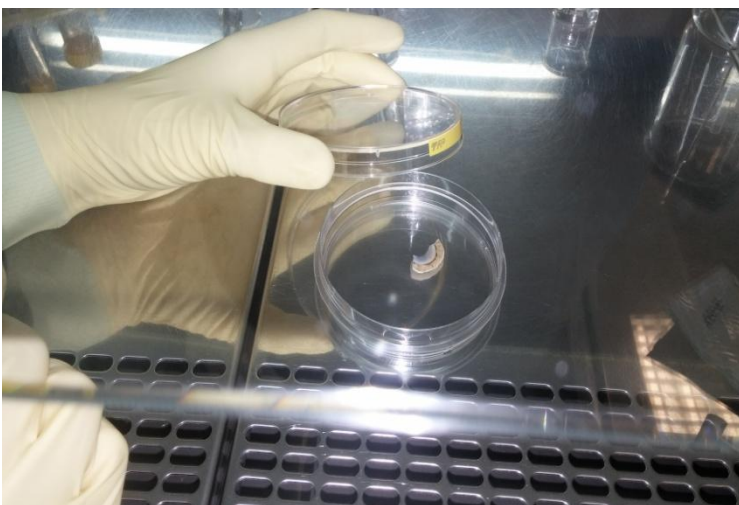
Deficijencija limbalnih matičnih stanica može nastati zbog opekline i trauma oka. Oštećenje limbalne regije dovodi do širenje konjunktive, nastaju bolni ožiljci, te gubitak vida

Za uzgoj se koristi bioptat limbalne regije 1-2 mm<sup>2</sup>



# UZGOJ STANICA ROŽNICE

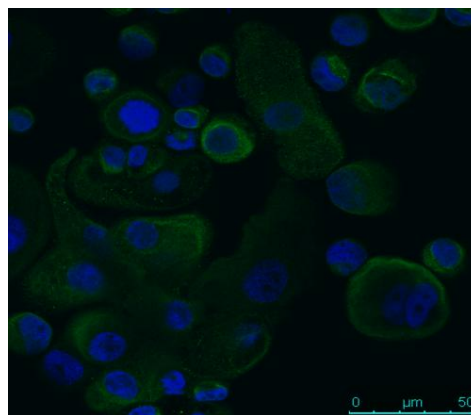
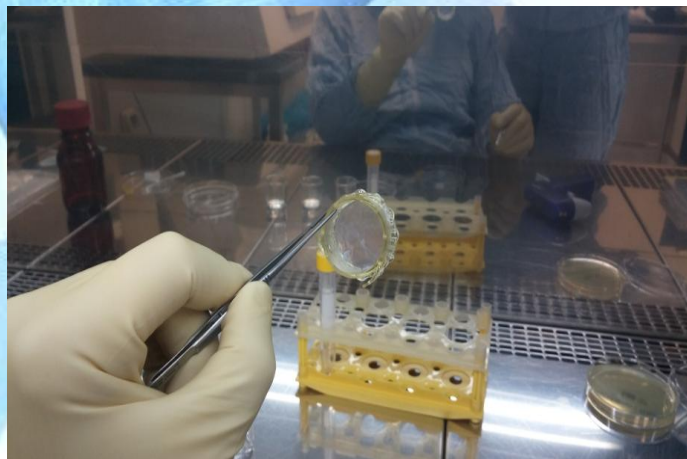
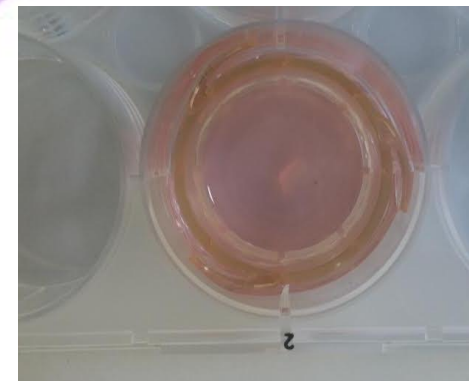
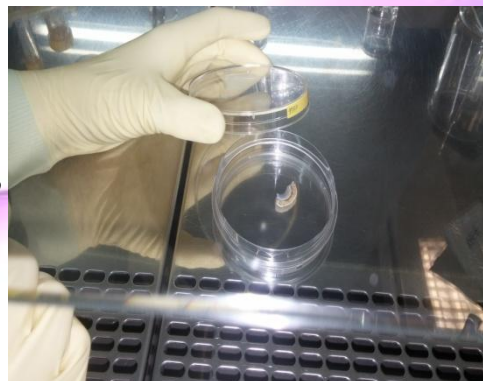
- Biopstat limbalne regije – izolacija matičnih stanica rožnice





# STANIČNA TERAPIJA ROŽNICE

Uzgoj limbalnih matičnih st.  
na nosačima: PU, PCL, plastika,  
fibrin, kontaktna leća, amnij



Kontrola kvalitete:  
kontrola sterilnosti  
proizvoda,  
endotoksini,  
vijabilnost, markeri  
matičnih i  
diferenciranih stanica  
(p63, CK3, CK12)



# STANIČNA TERAPIJA ROŽNICE

**Pretklinička testiranja** – u suradnji s Veterinarskim fakultetom Sveučilišta u Zg

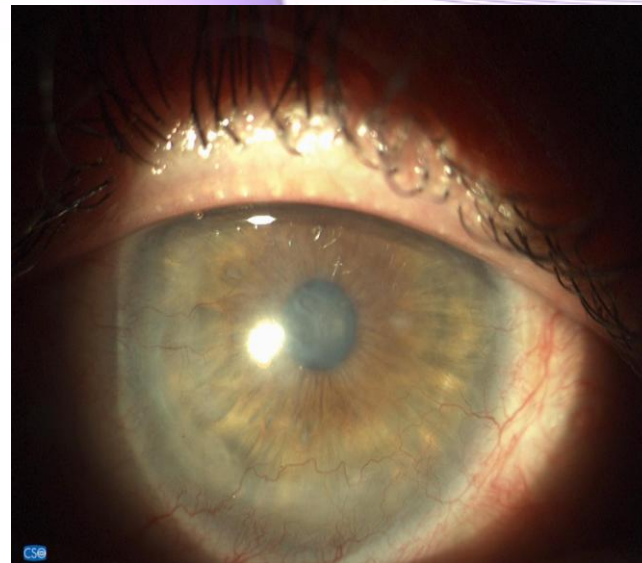
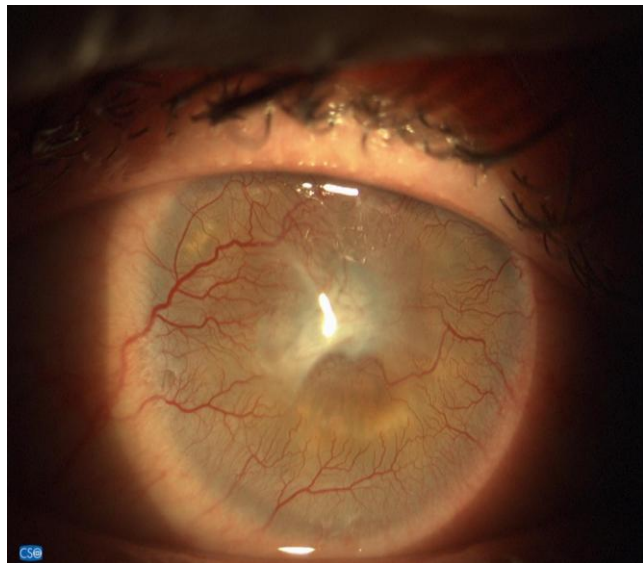


Klinička testiranja na 3 pacijenta, Klinika Svjetlost





# STANIČNA TERAPIJA ROŽNICE



Primjena u Klinici Svjetlost: Figure 5. Preoperative (limbal stem cell deficiency caused by tear gas burn) and 6-months postoperative appearance of the eye treated with *ex vivo* cultivated limbal epithelial stem cells. Visual acuity improved from preoperative value of light perception to 60% postoperatively.



# HVALA NA PAŽNJI!

