



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Zakład Medycyny Regeneracyjnej



Prof. dr hab. Magdalena Kucia

Warszawa, 06.05.2024

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej pt:

Opracowanie produktu leczniczego terapii zaawansowanej opartego na mezenchymalnych komórkach stromalnych w leczeniu stwardnienia zanikowego bocznego

Autor: mgr Magdalena Murzyn

Dynamiczny rozwój badań nad mezenchymalnymi komórkami macierzystymi (MSC) na przełomie XX i XXI wieku wzbudził zainteresowanie naukowców i klinicystów potencjałem terapeutycznym MSC oraz potencjalnym wykorzystaniem tych komórek w medycynie regeneracyjnej. Terapie oparte na mezenchymalnych komórkach stromalnych (MSC, ang. Mesenchymal Stem Cells) stanowią jedną z najbardziej obiecujących strategii w leczeniu różnorodnych schorzeń, w tym zaawansowanych stadiów wielu chorób. Poznanie właściwości biologicznych MSC dało nadzieję na ich zastosowanie w medycynie regeneracyjnej u chorych, u których konwencjonalne możliwości leczenia zostały wyczerpane. Aby zapewnić odpowiednią jakość MSC i jednolity charakter biologiczny MSC, *International Society for Cellular Therapy (ISCT)* opracowało ujednoczone kryteria biologiczne, które powinny spełniać komórki nazywane „mezenchymalnymi komórkami macierzystymi”.

Prof. dr hab. Magdalena Kucia
Kierownik
ul. Banacha 1B, 02-097 Warszawa
e-mail: medycyna.regeneracyjna@wum.edu.pl
www.wum.edu.pl

MSCs można pozyskać z wielu tkanek i narządów dorosłego organizmu, jednakże, przed zastosowaniem klinicznym, ich właściwości powinny zostać udokumentowane spełnieniem podstawowych cech biologicznych rekomendowanych przez ISCT.

MSC można pozyskać ze szpiku kostnego, tkanki tłuszczowej, krwi pępowinowej, pępowiny, miazgi zębowej, mięśni gładkich, szkieletowych i mięśnia sercowego, okostnej, błony maziowej, skóry właściwej, pericytów, łożyska, krwi obwodowej, więzadeł przyzębia i płynu owodniowego. Wśród nich najpopularniejszy jest szpik kostny, tkanka tłuszczowa, krew pępowinowa oraz galareta Whartona. Podczas izolacji MSC przez plastyczne przyleganie i hodowlę *in vitro* mogą różnicować się w linie komórkowe mezodermalne, takie jak: osteocyty (komórki kostne), chondrocyty (komórki chrząstki) oraz adipocyty (komórki tłuszczowe).

W ostatnich latach można zaobserwować gwałtowny wzrost liczby doniesień naukowych demonstrujących w modelach przedklinicznych oraz klinicznych rolę MSC w leczeniu szeregu schorzeń. Na stronie *clinicaltrials.gov* można znaleźć ponad 1000 prób klinicznych opartych na wykorzystaniu MSC w postępowaniu terapeutycznym. Pomimo, iż MSC są jednym z głównych narzędzi używanych obecnie w terapii komórkowej, mechanizm ich działania nie do końca został poznany. Wyniki uzyskane podczas badań przedklinicznych i klinicznych przeprowadzonych w ostatnich dziesięcioleciach wyraźnie wskazują, że MSC posiadają wysoką zdolność do immunomodulacji, regeneracji i gojenia uszkodzonych tkanek. MSC regulują wydzielanie parakrynych czynników wzrostu, cytokin, czynników antyfibroskopowych i mediatorów angiogennych

Obecnie MSC uważa się za terapeutyczną alternatywę w leczeniu wielu zaburzeń, takich jak choroby odpornościowe, zwyrodnieniowe lub traumatyczne. Pomimo udowodnionego bezpieczeństwa, nadal istnieje wiele przeszkód, aby wprowadzić te rodzaje komórek jako leki w terapii komórkowej. Ich natura, zastosowanie i regulacja poprzez niszę lub mikrośrodowiska powinny być dogłębnie przebadane, ponieważ ich funkcjonalność może zmieniać się w zależności od bezpośredniej interakcji z innymi komórkami. Istotne jest zbadanie zachowania różnych populacji MSC w odniesieniu do konkretnych nisz, a nie uogólnienie jej terapeutycznego zastosowania.

Przedstawiona mi do oceny praca *Opracowanie produktu leczniczego terapii zaawansowanej opartego na mezenchymalnych komórkach stromalnych w leczeniu stwardnienia zanikowego bocznego* obejmuje 202 stron maszynopisu. Układ rozprawy jest typowy i podzielony na wstęp zakończony podaniem celu pracy, opis wykorzystanych materiałów i metod, prezentację wyników przedstawionych na 125 rycinach, dyskusję zakończoną podsumowaniem oraz wnioskami końcowymi. W rozprawie autorka odwołuje się do 103 pozycji piśmiennictwa anglojęzycznego.

Na 18 stronach wstępu mgr Murzyn wprowadza czytelnika w patogenezę stwardnienia zanikowego bocznego (ALS) oraz przedstawia mechanizmy rozwoju schorzenia związane z dysfunkcją mitochondriów, stresem oksydacyjnym, zaburzeniami gospodarki wapniowej, zaburzeniami autofagii, oraz transportem aksonalnym. W kolejnych punktach Doktorantka prezentuje udział komórek układu odpornościowego w patogenezie choroby, w szczególności omawia rolę mikrogleju w aspektach neuroprotektoryjnych oraz neurotoksycznych. Mikroglej pełni funkcje ochronne w zdrowym mózgu i

rdzeniu kręgowym, uczestnicząc w procesach takich jak fagocytoza, odpowiedź immunologiczna i usuwanie zanieczyszczeń. Jednak w kontekście ALS, rola mikrogleju jest bardziej złożona i może przyczyniać się zarówno do ochrony, jak i do uszkodzeń neuronów motorycznych, poprzez wydzielanie cytokin prozapalnych, produkcję reaktywnych form tlenu i azotu, interakcja z astrocytami.

W dalszej części wstępu mgr Murzyn przedstawia zaburzenia immunologiczne, zarówno wrodzone, jak i adaptacyjne, które przyczyniają się do degeneracji neuronów motorycznych w ALS oraz po krótko opisuje diagnostykę oraz schematy terapeutyczne ALS. Doktorantka wstęp kończy bardzo dojrzałym i wnikliwym opisem mezenchymalnych komórek macierzystych skupiając się na przybliżeniu cech komórek MSC z galarety Whartona (WJ-MSC) pochodzących ze sznura pępowiny zakwalifikowanego jako odpad medyczny, które stanowią atrakcyjne źródło pozyskiwania allogenicznego produktu komórkowego do terapii.

Podział na rozdziały jest przeprowadzony w sposób przejrzysty, umożliwiając zrozumienie i uzasadnienie podjęcia badań będących przedmiotem prezentowanej rozprawy. Uwzględniając, iż analizy przedłożonej rozprawy dotyczyły oceny bezpieczeństwa podawania mezenchymalnych komórek macierzystych z galarety Whartona oraz oceny pacjentów ze stwardnieniem zanikowym bocznym w badaniu klinicznym ALSTEM na podstawie ich odpowiedzi terapeutycznej na badany produkt leczniczy (allogeniczne komórki WJ-MSC), na podkreślenie zasługuje krytyczne przedstawienie przez Doktorantkę restrykcyjnych kryteriów włączenia i wyłączenia produktu komórkowego do banku komórek.

Cele pracy zostały jasno i logicznie sformułowane. Doktoranta za główny cel przedstawionej rozprawy podjęła się opracowania produktu leczniczego terapii zaawansowanej opartej na komórkach mezenchymalnych galarety Whartona w terapii ALS. Realizowała ten cel na dwóch etapach: poprzez przygotowanie i wnikliwą charakterystykę produktu komórkowego, obejmującą przygotowanie banku komórek i ich podziału na klastry terapeutyczne, gdzie głównymi elementami była weryfikacja potencjału komórek WJ-MSC pod względem immunologicznym oraz genetycznym. W drugim etapie zostało przeprowadzone badanie kliniczne ALSTEM oraz przeprowadzenie wnikliwych analiz materiału biologicznego pozyskanego od pacjentów włączonych do badania, co stanowiło podstawę do selekcji czynników predykcyjnych przy ocenie pacjentów w badaniu.

Przedstawiony opis materiałów użytych do badań jest drobiazgowy i nie budzi żadnych zastrzeżeń. Dobór metod badawczych obejmujący techniki cytometrii przepływowej, hodowli komórkowych *in vitro*, badania sekretomu, technik kariotypowania oraz PCRU w czasie rzeczywistym jest adekwatny do obranej tematyki dysertacji i pozwala na eksperymentalną weryfikację obranych celów pracy. Doktorantka bardzo starannie i szczegółowo opisała etapy tworzenia banku produktów ATMP zgodnie z obowiązującymi normami Dobrej Praktyki Produkcyjnej cGMP do kwalifikacji materiału, izolacji WJ-MSC, ekspansji *ex vivo*, kriokonserwacji, poprzez charakterystykę morfologiczną, ocenę fenotypu zgodnie z wytycznymi ISCT, badania kariotypu, testy tworzenia kolonii CFU-E, aż do poszerzonej analizy wybranych genów metodą qRT-PCR, sekretomu, oceny potencjału immunomodulacyjnego komórek WJ-MSC i klasteryzacji. W rozdziale 3.4. opisu badania klinicznego brakuje objaśnienia skali ALSFS-R, która jest skorygowaną funkcjonalną skalą stwardnienia zanikowego bocznego używaną u pacjentów z ALS, zarówno w celu ustalenia wyjściowego nasilenia objawów w chwili rozpoznania, jak i oceny postępu choroby w czasie oraz

umożliwia lepsze prognozowanie rozwoju choroby u pacjentów. Skala ta jest również używana do pomiaru wyników skuteczności leczenia w badaniach klinicznych. W rozdziale materiały i metody brakuje również objaśnienia skali ECAS oraz EQ-5D, które były oceniane podczas wizyt pacjentów w badaniu klinicznym ALSTEM.

Doktorantka podjęła się ambitnego tematu, którego realizację przeprowadziła z dużą starannością. W pierwszym etapie ustanowiono bank produktów komórkowych WJ-MSC zgodnie z obowiązującymi normami cGMP, które zostały podane w badaniu klinicznym ALSTEM. W celu wytworzenia produktów komórkowych zostało pobranych około 300 sznurów pępowinowych, spośród których do dalszej preparatyki zakwalifikowano około 60 sznurów. Ostatecznie do badania klinicznego zakwalifikowano produkty ATMP wytworzone z 14 linii WJ-MSC, spełniające ściśle zdefiniowane i opisane wytyczne specyfikacji produktu końcowego, co zostało przedstawione w Tabeli 3. Mgr Murzyn zrealizowała cel rozprawy jakim była rozszerzona charakterystyka banku produktów komórkowych WJ-MSC opartych na analizie funkcjonalnej testu jednostki tworzącej kolonie, analizę fenotypową poszerzonego panelu antygenów powierzchniowych obejmujący ekspresję białek CD119, CD200, CD120b, CD72, CD273, CD274, CD39, HO-1, panelu wybranych genów komórek pluripotencjalnych oraz multipotencjalnych określanym panelem „bezpieczeństwa”. Doktorantka oceniła właściwości immunomodulacyjne produktu w teście ko-hodowli komórek WJ-MSC z komórkami jednojądrowymi dawcy zdrowego. Wyniki uzyskane w tej części rozprawy zobrazowała Rycinami (Rycina 13 do Ryciny 42) oraz 2 Tabelami (Tabela 3 oraz Tabela 4). Mgr Murzyn podjęła się ambitnego celu zaproponowania protokołu umożliwiającego klasteryzację i podział ze względu na potencjał terapeutyczny produktu komórkowego WJ-MSC z wykorzystaniem algorytmów uczenia maszynowego. Klasteryzacja miała na celu wykorzystanie danych wygenerowanych na etapie szczegółowej charakterystyki ustanowionego banku WJ-MSC do nienadzorowanego podziału produktów komórkowych na podstawie ich właściwości biologicznych oraz aktywności. Uzyskane wyniki analiz 14 linii WJ-MSC pozwoliły na identyfikację 58 czynników, które na podstawie analizy statystycznej nienadzorowanej klasteryzacji pozwoliły wyodrębnić 3 klastry – proregeneracyjny, nadaktywny oraz antystresowy. Uzyskane linie WJ-MSC zostały przypisane do danego klastra, co Autorka przedstawiła w Tabeli 5.

Najbardziej cenne wyniki przedstawionej rozprawy doktoratu wdrożeniowego dotyczą analiz odpowiedzi terapeutycznej pacjentów w badaniu klinicznym fazy I/II ALSTEM na allogeniczne komórki WJ-MSC. ALSTEM było badaniem jednoramiennym, niezaślepieniem, oceniającym bezpieczeństwo podania badanego produktu leczniczego (BPL) do płynu mózgowo-rdzeniowego 19 pacjentów z rozpoznaniem stwardnienia zanikowego bocznego. Projekt został zrealizowany na podstawie zgody Urzędu Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (URLP) oraz na podstawie pozwolenia na prowadzenie badań klinicznych (EudraCT: 2018-004171-12). Zestawienie pacjentów zakwalifikowanych do badania Doktorantka przedstawiła w Tabeli 6. W Tabeli 7 przedstawiła podział pacjentów na grupy Responders, Null oraz Non-Responders według skali ALSFRS-R. Na podstawie wyliczonego trendu skali ALSFRS-R wyróżniono 8 pacjentów, którzy zareagowali na terapię komórkami WJ-MSC w sposób pozytywny, 7 pacjentów, którzy nie wykazali reakcji oraz 4 pacjentów z reakcją neutralną (Rycina 48). Rozkład podstawowych parametrów życiowych pacjentów Doktorantka przedstawiła na Rycinach 52-58. Szczegółowy rozkład parametrów biochemicznych krwi pacjentów

obejmujący wartości mocznika, kwasu moczowego, kreatyniny, albuminy, CRP, ALT, AST, GGTP, kinazy kreatynowej, ilości białka całkowitego, parametrów morfotycznych krwi, czasu protrombinowego, wartości INR, chlorków, magnezu, sodu, potasu, fosforu Doktorantka przedstawiła na łącznie 23 rycinach. Autorka poddała również szczegółowej analizie cytometrycznej odsetki limfocytów T, B, Th, Tc, Th2, monocytów, limfocytów Th pamięci, naiwnych Tc pamięci oraz aktywacji późnej na limfocytach Th oraz Tc w krwi obwodowej pacjentów po podaniu WJ-MSC. Mgr Murzyn oceniła również poziom szeregu cytokin w osoczu krwi pacjentów podczas poszczególnych wizyt, które obejmowały pomiary stężenia IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-12, IL-13, TGF β 2, TNF- α , VEGF-2, dla których nie zanotowała statystycznie istotnych różnic. W kolejnym etapie oceniła stężenie chlorków, glukozy, białka całkowitego, IL-6, IL-8, G-CSF, IFN- γ , IL-4, MCP-1, MIP-1 β , RANTES, TGF- β 1, TGF- β 2 w płynie mózgowo rdzeniowym pacjentów badania ALSTEM. Dla TGF- β 2 zanotowała najbardziej znaczące zmiany dla wszystkich badanych grup (Rycina 134). W ostatnim etapie rozprawy Doktorantka przeprowadziła ocenę poziomu p75^{ECM}. Receptor neurotrofiny p75 stanowi potencjalny biomarker stwardnienia zanikowego bocznego. p75 bierze udział w procesach neurodegeneracyjnych m.in. podczas apoptozy, zwyrodnieniu aksonów i odpowiedzi na uszkodzenie nerwów. W ostatniej części Dysertacji, Autorka podjęła się selekcji istotnych biopskaźników odpowiedzi na terapię MSC. Na podstawie 123 zmiennych i z wykorzystaniem algorytmu Boruta, całościowa analiza kliniczna pacjentów objętych badaniem klinicznym pozwoliła na utworzenie algorytmu predykcyjnego odpowiedzi pacjentów na terapię komórkową WJ-MSC, min. rozkład subpopulacji limfocytów B, komórek M2 oraz komórek Tc pamięci, białka w CSF oraz pomiaru siły mięśniowej.

W dyskusji dysertacji Doktorantka dojrzałe omawia uzyskane przez siebie wyniki zestawiając je z obserwacjami innych autorów. Według danych dostępnych w 2023 roku w badaniach klinicznych z wykorzystaniem MSC na świecie zarejestrowanych było 1120 pacjentów cierpiących na ALS. Uwzględniając wytyczne Europejskiej Sieci Referencyjnej ds. chorób nerwowo-mięśniowych dotyczących planu leczenia w rozpoznaniu ALS priorytetowe jest prowadzenie badań oraz prób klinicznych nad identyfikacją nowych biomarkerów diagnostycznych, prognostycznych oraz predykcyjnych umożliwiających identyfikację celów terapeutycznych podejmowanych terapii. Mgr Murzyn podkreśla w dyskusji, że podjęła się rozszerzonej charakterystyki linii WJ-MSC celem opracowania wstępnego algorytmu przyporządkowującego daną serię produktu komórkowego WJ-MSC do klastra terapeutycznego. Swoje założenie zrealizowała w sposób imponujący. Należy podkreślić dojrzałość naukową Doktorantki, która w dyskusji zauważa, iż *„uzyskane wyniki są pilotażowe i ze względu na ich ograniczony charakter należy traktować ich interpretację jako założenie do szerszych badań”*. Na tym etapie brakuje w dyskusji próby odpowiedzi na pytanie czy przynależność do danego klastra terapeutycznego WJ-MSC skutkowałą zmianą stanu zdrowia pacjenta oraz progresją ALS. Również brakuje omówienia grupy pacjentów Non-Responders, którzy stanowili 37% badania klinicznego i szerszego omówienia stanu klinicznego tej grupy. Jednakże te uwagi, nie wpływają na bardzo wysoką ocenę przedstawionej mi do recenzji rozprawy.

Podsumowując, złożona rozprawa doktorska Pani mgr Magdaleny Murzyn pt. *„Opracowanie produktu leczniczego terapii zaawansowanej opartej na mezenchymalnych komórkach stromalnych w leczeniu stwardnienia zanikowego bocznego”* w pełni zasługuje na pozytywną ocenę ze względu na wybór tematu, przeprowadzenie wnikliwej analizy dostępnego materiału badawczego, jasnego przedstawienia

wyników oraz dojrzałej dyskusji uzyskanych wyników w kontekście dostępnych danych literaturowych. Przedstawiona rozprawa jest bardzo istotnym elementem pozwalającym na opracowanie lepszych terapeutycznie biologicznych produktów leczniczych terapii zaawansowanych wpartych na allogenicznych komórkach WJ-MSC.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2022 r. poz. 574) i wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Murzyn do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnioskuje do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Instytutu Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu o przyznanie wyróżnienia.

Z poważaniem,



Prof. dr hab. Magdalena Kucia
Kierownik Laboratorium Medycyny Regeneracyjnej
Warszawski Uniwersytet Medyczny