

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 247114 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **443087**

(22) Data zgłoszenia: **2022.12.08**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2024.06.10 BUP 24/2024**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2025.05.19 WUP 20/2025**

(51) MKP:

C12N 5/0775 (2010.01)

A61K 35/28 (2015.01)

C12Q 1/6881 (2018.01)

G16B 35/00 (2019.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**POLSKI BANK KOMÓREK MACIERZYSTYCH
SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ
ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ, Warszawa, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**NATALIA ROZWADOWSKA, Złotniki, PL
MAGDALENA MURZYN, Warszawa, PL
EWELINA TOMECKA, Warszawa, PL
JOANNA ZYPRYCH-WALCZAK, Promnice, PL
ALICJA SZABELSKA-BERĘSEWICZ, Poznań, PL
KATARZYNA BOCIAN, Warszawa, PL
ANNA RÓŻYCKA, Warszawa, PL
TOMASZ KOLANOWSKI, Suchy Las, PL
TOMASZ ODŁAK, Wołomin, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Dorota Rzążewska, Warszawa, PL

(54) Tytuł:

Sposób klasyfikacji komórek MSC ze względu na właściwości terapeutyczne

PL 247114 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób klasyfikacji komórek MSC ze względu na właściwości terapeutyczne do zastosowania jako narzędzie do dopasowywania dawcy do biorcy. Dodatkowo, przedmiotem wynalazku jest również sposób klasyfikacji komórek MSC ze względu na właściwości terapeutyczne wspierany komputerowo.

Mezenchymalne komórki macierzyste/zrębowe (MSC) są przedmiotem badań klinicznych i narzędziem terapii regeneracyjnej od ponad pokolenia. Przede wszystkim wynika to z ich właściwości przeciwzapalnych i immunomodulujących. Wiele badań wykazało, że terapie MSC mogą być pomocne w leczeniu wielu różnych chorób i zaburzeń, takich jak choroba zwyrodnieniowa stawów, utrata chrząstki stawowej, wrodzona wada kości (OI), reumatoidalne zapalenie stawów, choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi (GVHD), cukrzyca, choroba Leśniowskiego-Crohna, stwardnienie rozsiane (MS), stwardnienie zanikowe boczne (ALS) i inne choroby o podłożu zapalnym. Możliwość wykorzystania MSC do leczenia tak szerokiej gamy chorób wynika z ich działania biologicznego, polegającego na wydzielaniu czynników parakrynych, takich jak cytokiny, chemokiny i egzosomy, co pozwala im modulować odpowiedź immunologiczną poprzez zmniejszenie stanu zapalnego. Co więcej, terapie MSC są uważane za bezpieczne (1) (2) (3). Ludzkie MSC można uzyskać z różnych tkanek, a ich potencjał terapeutyczny w leczeniu chorób może zależeć od ich pochodzenia. Najbardziej rozpoznawalnym źródłem jest szpik kostny (BM). Pobranie BM od dawcy jest zabiegiem inwazyjnym i bolesnym. Ponadto właściwości terapeutyczne MSC pochodzących z BM, liczba wyizolowanych komórek oraz ich potencjał do różnicowania są zależne od dawcy i maleją wraz z wiekiem. Alternatywnymi źródłami MSC są tkanka tłuszczowa, miazga zębowa, błona maziowa, krew obwodowa, ozębina, endometrium i tkanka płodowa, taka jak galareta Whartona z pępowiny, krew pępowinowa, owodnia, płyn owodniowy i łożysko. Co najważniejsze, tkanki okołoporodowe są dostępnym źródłem komórek do terapii komórkowej bez konieczności inwazyjnych procedur ich pobierania, ponieważ są traktowane jako odpady medyczne. Ponadto naukowcy udowodnili, że wczesne źródła płodowe MSC umożliwiają izolowanie większej liczby komórek o wysokiej multipotencji oraz zdolności do ekspansji niż ze szpiku kostnego od dorosłych dawców (4) (5) (6). Sztandarowymi i klasyfikacyjnymi cechami MSC według International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT), niezależnie od pochodzenia i sposobu izolowania komórek, jest zdolność przyczepiania się do plastiku. Ich morfologia jest podobna do fibroblastów i mają wspólne z nimi właściwości, takie jak ekspresja CD105, CD73 i CD90 przy braku CD11b lub CD14, CD19, CD34, CD45, CD79 i antygenu układu zgodności tkankowej klasy II (HLA-DR).

Wykazują zdolność do różnicowania się w trzy różne typy komórek (osteoblasty, chondroblasty i adipocyty) za pomocą specyficznych podłoży hodowlanych. Jednak ostatnio ISCT wezwał do poprawy charakterystyki komórek MSC, zalecając włączenie testów funkcjonalnych dla komórek (1) (7) (8).

Produkty komórkowe wytwarzane zgodnie z Dobrymi Praktykami Wytwarzania (GMP) w oparciu o MSC są obecnie oznaczone przez Europejską Agencję Leków (EMA) jako Produkty Lecznicze Terapii Zaawansowanej (ATMP). Wytyczne EMA podczas zwolnienia komórkowego produktu końcowego zapewniają potwierdzenie bezpieczeństwa, jakości i skuteczności terapii komórkowej. Potwierdzają to testy funkcjonalne, cytogenetyczne, potencji, sterylności i czystości, takie jak brak endotoksyn, czy mykoplazmy (2). W przypadku jakichkolwiek nieprawidłowości w testach dla produktu komórkowego, produkt zostaje zdyskwalifikowany. Głównym problemem terapii komórkowej jest słaba charakterystyka i rozbieżność w skuteczności terapeutycznej *in vivo* (1). Wytyczne ISCT, choć powszechnie akceptowane, nie gwarantują powtarzalności właściwości produktów MSC. Należy podkreślić iż produkty komórkowe MSC wykazują znaczną heterogeniczność pod względem dynamiki proliferacji, klonogenności, wydzielanych czynników (sekretomu) czy potencjału do różnicowania. Ta heterogeniczność nie jest brana pod uwagę w rutynowej charakterystyce komórek (5). Różnice, które mają udowodniony wpływ na produkt komórkowy, to różne podłoża hodowlane, w szczególności ich suplementacja, gęstość wysiewu komórek, liczba pasaży lub czas trwania hodowli, a nawet sposób zamrażania. W przypadku suplementacji podłoża potwierdzono, że obecność lizatu ludzkich płytek krwi (hPL) wpływa nie tylko na proliferację komórek, ale także na ich zróżnicowany potencjał i zdolności immunomodulacyjne (3). Istnieją różnice w protokołach zamrażania komórek w różnych obszarach produkcyjnych i pomimo utrzymywania podstawowych parametrów ISCT po rozmrożeniu komórek, potencjał immunomodulacyjny komórek może zmniejszyć się nawet

o 50%. Ze względu na różne zdolności immunomodulacyjne MSC, mają one różny wpływ na hamowanie odpowiedzi komórek T, dojrzewanie komórek prezentujących antygen, cytotoksyczność spoczynkowych komórek NK, różnicowanie monocytów w niedojrzałe komórki dendrytyczne, czy sekretom MSC (zwiększenie produkcji PGE2, TGF β i IL10), który pomaga w indukcji i różnicowaniu komórek w regulatorowe komórki T (Treg) (9).

Z dokumentu CN112748080 znany jest sposób charakteryzowania właściwości immunoregulacyjnych produktów terapii mezenchymalnymi komórkami macierzystymi, obejmujący hodowlę produktu w medium zawierającym interferony w celu stymulacji komórek, zebranie supernatanta hodowli i podanie go reakcji barwnej w celu zmierzenia aktywności 2,3-dioksygenazy indoloaminy 1 (IDO1), aby uzyskać ilość L-kinureniny, wytwarzanej przez badany produkt. Jeżeli względna aktywność biologiczna badanego produktu w stosunku do komórek referencyjnych wynosi $\geq 60\%$, określa się, że badany produkt spełnia wymagania dla produktów terapii mezenchymalnymi komórkami macierzystymi.

Podobne podejście, bazujące na szybkim oznaczeniu aktywności 2,3-dioksygenazy indoloaminy 1 w celu oznaczenia właściwości immunomodulacyjnych ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych jest opisane w dokumencie CN113278674A.

Z kolei opis CA2876499A1 ujawnia zastosowanie szeregu ponad 20 markerów do detekcji hES-MSK o stopniu klinicznym do leczenia chorób autoimmunologicznych, w szczególności stwardnienia rozsianego. Autorzy przyznają, że ograniczone źródła i zmienna jakość ludzkich tkanek od różnych dawców ograniczają badania i zastosowanie MSC i uniemożliwiają standaryzację MSC jako produktu terapeutycznego do zastosowania klinicznego na dużą skalę. Pochodzące z tkanek dorosłych MSC są wysoce wymieszane populacjami komórek i być może tylko część komórek wywiera działanie immunomodulujące. Sposób polega na oznaczeniu ponad 20 markerów (mi.in. CD73, CD90, CD105, CD146, CD166, CD44, CD13, CD29, CD54, CD49E, CD45, CD34, CD31, SSEA4, OCT4, NANOG, TRA-1-60) podzielonych na cztery grupy.

W artykule Petrenko i współpracowników (10). Autorzy porównali kinetykę wzrostu, właściwości immunofenotypowe i immunomodulacyjne, ekspresję genów i profil wydzielania MSC pochodzących ze szpiku kostnego dorosłego człowieka (BM-MSK), tkanki tłuszczowej (AT-MSK) i galarety Whartona (WJ-MSK) hodowanych klinicznie z naciskiem na potencjał neuroregeneracyjny. Zastosowano następujące markery: CD10, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, HLA-ABC, CD14, CD45, CD235a, CD271, HLA-DR, VEGFR2, CD34, CD133, CD146, SSEA-4, MSCA-1, CD271, HLA-DR. Podobnie, w artykule Li i współpracowników (11) porównano mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące z 4 różnych źródeł, ludzkiego szpiku kostnego, tkanki tłuszczowej, galarety Whartona i łożyska, w celu określenia która populacja MSC wykazywała najsilniejszy immunosupresyjny wpływ na proliferację limfocytów T indukowaną fitohemaglutyniną i która miała największy potencjał proliferacyjny i różnicujący. Ekspresję szeregu genów związanych z odpornością (mi.in. MHC II, TLR4, TLR3, JAG1, NOTCH2 i NOTCH3) analizowano za pomocą RT-PCR i RT-qPCR. Potencjał proliferacyjny i różnicujący MSCs określono standardowymi metodami.

W pracy Ouafy i współpracowników (12) opisano identyfikację i walidację markerów predykcyjnych związanych z właściwościami immunomodulacyjnymi WJ-MSK. W tym celu wybrano i zbadano CD119, CD200 i Notch1. Autorzy stwierdzili, że CD119 i Notch1 mogą być potencjalnie stosowane jako markery właściwości immunomodulujących WJ-MSK, jednak potrzebne są dalsze badania.

Głównym problemem w dziedzinie jest brak standaryzacji protokołu wytwarzania produktu komórkowego (7). Wszyscy wytwórcy prawdopodobnie nie zoptymalizują protokołu izolowania i wytwarzania produktu komórkowego opartego na MSC. Odpowiedzią na pilną potrzebę opracowania bardziej rygorystycznego sposobu charakteryzowania MSC pod kątem jakości, bezpieczeństwa i skuteczności produktów MSC jest sposób klasyfikacji komórek MSC ze względu na właściwości terapeutyczne według wynalazku, który znajduje zastosowanie jako standaryzowany rozszerzony sposób oceny produktu komórkowego do badań klinicznych lub eksperymentów medycznych poprzez podzielenie ich na klastry terapeutyczne w celu wyeliminowania zmienności partii. Klastry terapeutyczne mogą okazać się konieczne dla uniknięcia zmienności w produkcie komórkowym, ale także osiągnięcia przewidywalnych korzystnych wyników terapii komórkami macierzystymi *in vivo*. W celu przyporządkowania komórkowego produktu leczniczego do danego klastra z próbki referencyjnej zwalnianego produktu leczniczego, po rozmrożeniu próbki wykonano dodatkowe badania: rozszerzony panel cytometryczny z dodatkowymi markerami takimi jak CD119, CD200, CD120b, CD72, CD273, CD274, CD39, HO, test jednostek tworzących kolonie (CFU), test bezpieczeństwa molekularnego (zgłoszenie patentowe nr P.433374 pt. "Zastosowanie zestawu genów do

określania potencjału teratogennego komórek mezenchymalnych", które uzyskało patent 2 sierpnia 2022 r.), analizę sekretomu i opracowano technologię kohodowli MSC z produktu komórkowego z MNC (komórki jednojądrzaste) od zdrowego dawcy. Poszerzona charakterystyka i uzyskane wyniki pozwoliły stworzyć algorytm przypisujący serię produktów komórkowych (WJ-MSK) do jednego z trzech klastrów terapeutycznych. Serie produktów komórkowych przypisane do klastrów terapeutycznych na podstawie stworzonego algorytmu będą miały podobną aktywność biologiczną. Dodatkowym zastosowaniem sposobu według wynalazku będzie możliwość wybrania produktu komórkowego z klastra terapeutycznego dla danego obszaru chorobowego lub nawet dla konkretnego pacjenta. Takie podejście do produktu komórkowego i jego oceny jakościowej wychodzi naprzeciw silnej potrzebie standaryzacji protokołu wytwarzania produktu komórkowego.

ISTOTA WYNALAZKU

Sposób klasyfikacji komórek MSC ze względu na właściwości terapeutyczne według wynalazku obejmuje następujące etapy:

- a. pomiar poziomu obecności oksygenazy hemu, poziomu ekspresji POU5F1, zmiany udziału limfocytów Th pod wpływem komórek MSC; zmiany udziału limfocytów Th pozytywnych na CD69 pod wpływem komórek MSC oraz zmiany udziału limfocytów Th naiwnych pod wpływem komórek MSC, przy czym zmianę udziału limfocytów Th pod wpływem komórek MSC, zmianę udziału limfocytów Th pozytywnych na CD69 pod wpływem komórek MSC oraz zmianę udziału limfocytów Th naiwnych pod wpływem komórek MSC oznacza się po kohodowli komórek MSC z komórkami jednojądrzastymi w porównaniu do kontroli stanowiącej komórki jednojądrzaste, które hodowano w identycznych warunkach, ale bez kontaktu z komórkami MSC
- b. klasyfikacja komórek MSC jako należących do jednego z co najmniej trzech klastrów terapeutycznych: klastra terapeutycznego proregeneracyjnego o potencjale regeneracyjnym i potencjale do różnicowania albo klastra terapeutycznego nadaktywnego, który nie wykazuje efektu terapeutycznego albo klastra terapeutycznego antystresowego o potencjale do redukcji stresu oksydacyjnego na podstawie wyników pomiarów z etapu a.

Korzystnie, w etapie b:

- jeśli poziom komórek MSC wykazujących obecność oksygenazy hemu wynosi od 2% do 3,9% i poziom ekspresji POU5F1 wynosi od 0,5 CF do 1,01 CF i zmiana udziału limfocytów Th pozytywnych na CD69 pod wpływem komórek MSC wynosi od -17,83% do -13% i zmiana udziału limfocytów Th naiwnych wynosi od -0,35% do -0,15% i zmiana udziału limfocytów Th pod wpływem komórek MSC wynosi od 0,05% do 0,23%, komórki MSC klasyfikuje się do klastra nadaktywnego.
- jeśli poziom komórek MSC wykazujących obecność oksygenazy hemu wynosi od 11,4% do 17% i poziom ekspresji POU5F1 wynosi od 0,55 CF do 0,7 CF i zmiana udziału limfocytów Th pozytywnych na CD69 pod wpływem komórek MSC wynosi od -27,33% do -1,59% i zmiana udziału limfocytów Th naiwnych wynosi od -0,22% do 0,16% i zmiana udziału limfocytów Th pod wpływem komórek MSC wynosi od 0,09% do 0,12%, komórki MSC klasyfikuje się do klastra antystresowego.
- jeśli poziom komórek MSC wykazujących obecność oksygenazy hemu wynosi od 3,4% do 10,1% i poziom ekspresji POU5F1 wynosi od 0,84 CF do 1,4 CF i zmiana udziału limfocytów Th pozytywnych na CD69 pod wpływem komórek MSC wynosi od -10,6% do 0,59% i zmiana udziału limfocytów Th naiwnych wynosi od 0,08% do 0,31% i zmiana udziału limfocytów Th pod wpływem komórek MSC wynosi od -0,02% do 0,09%, komórki MSC klasyfikuje się do klastra proregeneracyjnego.

Korzystnie, w etapie a zmianę udziału limfocytów Th pod wpływem komórek MSC, zmianę udziału limfocytów Th pozytywnych na CD69 pod wpływem komórek MSC oraz zmianę udziału limfocytów Th naiwnych pod wpływem komórek MSC oznacza się po kohodowli komórek MSC z komórkami jednojądrzastymi w stosunku ilościowym odpowiednio 1:10.

Najkorzystniej, gdy kohodowlę prowadzi się w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO₂.

Kohodowlę można prowadzić przez 4 dni.

Korzystnie, komórki MSC pochodzą z galarety Whartona albo ze szpiku kostnego albo z tkanki tłuszczowej, korzystnie z galarety Whartona.

Korzystnie, etap b. jest wspierany komputerowo i obejmuje następujące etapy budowania klasyfikatora:

- a1. wyznaczanie co najmniej trzech klastrów terapeutycznych: klastra terapeutycznego proregeneracyjnego o potencjale regeneracyjnym i potencjale do różnicowania albo klastra terapeutycznego nadaktywnego, który nie wykazuje efektu terapeutycznego albo klastra terapeutycznego antystresowego o potencjale do redukcji stresu oksydacyjnego, przy czym wyznaczanie obejmuje pomiar parametrów komórek MSC obejmujący:
 - i. test jednostek tworzących kolonie CFU
 - ii. określenie fenotypu komórek MSC poprzez pomiar markerów genetycznych CDKN24, CLDN1, DNMT3B, ESM1, HAND2, HEY1, MYO3B, NANOG, PDGFRA, OOU5F1, TDGF1, TWIST1, ZBTB16
 - iii. określenie fenotypu komórek MSC poprzez pomiar markerów genetycznych CD119, CD120b, CD274, CD273, CD200, CD72, CD39, HO
 - iv. analizę sekretomu komórek MSC poprzez pomiar wydzielania BDNF, HGF, IL6, IL8, MCP1, RANTES, TGFb1, TGFb2
 - v. określenie immunomodulacji komórek MSC poprzez kohodowlę komórek MSC z komórkami jednojądrzastymi, przy czym kohodowlę prowadzi się korzystnie w stosunku ilościowym odpowiednio 1:10, w temperaturze 37°C oraz atmosferze 5% CO₂ przez 4 dni, przy czym po kohodowli określa się liczbę komórek jednojądrzastych, ich żywotność oraz zmianę udziału % limfocytów T, limfocytów B, NK, NKT, Th, Tc, Th naiwnych, Th pamięci, Tc naiwnych, Tc pamięci, Th CD69+, Th CD25+CD69+, Th CD25+, Th nieaktywowanych, Tc CD69+, Tc CD25+CD69+, Tc CD25+, Tc nieaktywowanych, Th1, Th2, Th17, cytokin wewnętrznych dla: Th1, Th2 i Th 17, oraz T regulatorowych komórek jednojądrzastych
 - vi. podział komórek MSC na co najmniej trzy klastry terapeutyczne: nadaktywny, antystresowy i proregeneracyjny na podstawie wyników z etapów i.-v.,
- b1. budowanie klasyfikatora, które obejmuje:
 - i. redukcję ilości parametrów do co najmniej parametrów poprzez identyfikację istotnych parametrów na podstawie współczynników błędu klasyfikacji lub na podstawie miary istotności zmiennych opartej na funkcji straty,
 - ii. przeprowadzenie korelacji parametrów z etapów a1. i.-v. i eliminację parametrów, które są ze sobą skorelowane
 - iii. określenie prawdopodobieństwa przynależności do określonego klastra na podstawie porównania wyników klasyfikacji z wykorzystaniem parametrów wybranych w etapie b1. i. z przynależnością do wyznaczonego klastra w etapie a1. vi.

oraz etapy klasyfikacji komórek MSC, obejmujące:

- c1. zapewnienie komórek MSC,
- d1. pomiar wybranych istotnych parametrów wyznaczonych w etapie b1. i. komórek MSC z etapu c1.,
- e1. klasyfikacja komórek MSC za pomocą klasyfikatora wyznaczonego w etapie b1. jako należących do jednego z klastrów terapeutycznych na podstawie wyników pomiarów z etapu d1., przy czym etapy a1. i b1. są wykonywane jednorazowo dla danej populacji komórek MSC, etap a1. vi., b1., e1. wykonywane są za pomocą obliczeń w systemie komputerowym, do którego przekazywane są dane z pomiarów w etapie a1. i.-v. lub d1.

Korzystnie, w etapie b1. i. wybierane są tylko te parametry, które zostały wskazane jako istotne. Korzystnie, w etapie a1. vi. podziału na klastry dokonuje się z zastosowaniem hierarchicznej analizy skupień.

Najlepiej, gdy w etapie b1. i. identyfikacji dokonuje się z zastosowaniem algorytmu Boruta z klasyfikatorem lasów losowych.

Dzięki zastosowaniu sposobu według wynalazku, 14 linii komórkowych MSC zaklasyfikowano do jednego z trzech klastrów terapeutycznych:

- klastra proregeneracyjnego – sub-populacji wykazującej się zwiększonym potencjałem proregeneracyjnym i o wyższym potencjale do różnicowania (w tym do transdiferencjacji) niż w pozostałych klastrach, jednak bez podwyższonego ryzyka nowotworzenia *in vivo*.
- klastra nadaktywnego – sub-populacji nie wywołującej oczekiwanego efektu terapeutycznego.

- klastra antystresowego – sub-populacji o wysokim potencjałem do redukcji stresu 10 oksydacyjnego (bardzo często połączonym ze stanem zapalnym) w miejscu chorobowo zmienionym.

Klasyfikowanie linii komórkowych MSC do jednego z wymienionych wyżej klastrow terapeutycznych pomaga w doborze odpowiedniego produktu komórkowego (linii komórek MSC) dla danego obszaru chorobowego oraz może służyć jako narzędzie dopasowania dawcy do biorcy. Redukcja liczby mierzonych parametrów linii komórkowych MSC skraca znacznie czas analiz oraz ich koszt.

OPIS FIGUR

Przedmiot wynalazku przedstawiono w przykładach wykonania na rysunku, na którym:

Figura 1 przedstawia stopień tworzenia kolonii zdefiniowany jako procent liczby kolonii do liczby wysianych komórek dla 14 linii komórkowych,

Figura 2 przedstawia ekspresję mRNA wybranych markerów genetycznych dla 14 linii komórkowych opartą na tzw. teście panelu bezpieczeństwa molekularnego. Ekspresję wyrażono w krotnościach zmiany (ang. fold change) do linii referencyjnej po normalizacji do ekspresji genu ACTB,

Figura 3 przedstawia korelację między wyselekcjonowanymi markerami genetycznymi z przykładu 2, przy czym wielkość punktów oznacza wartość bezwzględną korelacji, kształt okręgu pozytywną korelację, a kształt rombu ujemną, natomiast istotność korelacji na poziomie 0.05 oznaczona jest *, na poziomie 0.01 oznaczona jest **, a na poziomie 0.001 oznaczona jest ***,

Figura 4 przedstawia rozkład procentowy wybranych markerów genetycznych w panelu rozszerzonym dla 14 linii komórkowych,

Figura 5 przedstawia korelację między markerami panelu rozszerzonego z przykładu 3, przy czym wielkość punktów oznacza wartość bezwzględną korelacji, kształt okręgu pozytywną korelację, a kształt rombu ujemną, natomiast istotność korelacji na poziomie 0.05 oznaczona jest *, na poziomie 0.01 oznaczona jest **, a na poziomie 0.001 oznaczona jest ***,

Figura 6 przedstawia analizę sekretomu 14 linii komórkowych,

Figura 7 przedstawia korelację między analitami z przykładu 4, przy czym wielkość punktów oznacza wartość bezwzględną korelacji, kształt okręgu pozytywną korelację, a kształt rombu ujemną, natomiast istotność korelacji na poziomie 0.05 oznaczona jest *, na poziomie 0.01 oznaczona jest **, a na poziomie 0.001 oznaczona jest ***,

Figura 8 przedstawia hamowanie ekspansji komórek MNC w kohodowli dzięki immunomodulacyjnym właściwościom 14 linii komórkowych MSC (8A) oraz żywotność komórek MNC (8B), przy czym kolory słupków oznaczają: czarny-D0, szary-D4 kontrola, biały-D4 kohodowla,

Figura 9 przedstawia liczbę i żywotność komórek MNC po kohodowli z 14 liniami komórkowymi MSC z przykładu 5,

Figura 10 przedstawia procent poszczególnych subpopulacji komórek MNC dla markerów aktywacji: limfocyty T (10b), limfocyty B (10b), NK (10c), NKT (10d) w przypadku kohodowli z 14 liniami komórek MSC z przykładu 5, przy czym kolory słupków oznaczają: czarny-D0, szary-D4 kontrola, biały-D4 kohodowla z MSC,

Figura 11 przedstawia procent poszczególnych subpopulacji komórek MNC w tym: Th (11a), Tc (11b), Th naiwnych (11c), Th pamięci (11d), Tc naiwnych (11e), Tc pamięci (11f) w przypadku kohodowli z 14 liniami komórek MSC z przykładu 5, przy czym kolory słupków oznaczają: czarny-D0, szary-D4 kontrola, biały-D4 kohodowla MSC,

Figura 12 przedstawia procent poszczególnych subpopulacji komórek MNC: Th CD69+ (12a), Th CD25+ CD69+ (12b), Th CD25+ (12c), Th nieaktywne (12d) w przypadku kohodowli z 14 liniami komórek MSC z przykładu 5, przy czym kolory słupków oznaczają: czarny-D0, szary-D4 kontrola, biały-D4 kohodowla MSC,

Figura 13 przedstawia procent poszczególnych subpopulacji komórek MNC: Tc CD69+ (13a), Tc CD25+ CD69+ (13b), Tc CD25+ (13c), Tc nieaktywne (13d) w przypadku kohodowli z 14 liniami komórek MSC z przykładu 5, przy czym kolory słupków oznaczają: czarny-D0, szary-D4 kontrola, biały-D4 kohodowla MSC

Figura 14 przedstawia procent poszczególnych subpopulacji komórek MNC dla markera subpopulacji MNC: Th1 (14a), Th2 (14b), Th17 (14c), oraz ich cytokin wewnętrznych: IFN- γ (14d), IL4 (14e),

IL17 (14f), a także subpopulacji Treg (14g) w przypadku kohodowli z 14 liniami komórek MSC z przykładu 5, przy czym kolory słupków oznaczają: czarny-D0, szary-D4 kontrola, biały-D4 kohodowla MSC,

Figura 15 przedstawia zmiany kohodowli komórek MNC dla poszczególnych markerów aktywacji oraz subpopulacji MNC pod wpływem kohodowli z 14 liniami komórek MSC z przykładu 5,

Figura 16 przedstawia korelację między subpopulacjami komórek MNC, a także ich poziomem aktywacji, przy czym wielkość punktów oznacza wartość bezwzględną korelacji, kształt okręgu pozytywną korelację, a kształt rombu to ujemną, natomiast istotność korelacji na poziomie 0.05 oznaczona jest *, na poziomie 0.01 oznaczona jest **, a na poziomie 0.001 oznaczona jest ***,

Figura 17 przedstawia podział linii komórkowych MSC na klastry terapeutyczne przy pomocy hierarchicznej analizy skupień,

Figura 18 przedstawia rozmieszczenie linii komórkowych w nowych współrzędnych wyznaczonych przez analizę składowych głównych.

PRZYKŁADY WYKONANIA

Materiały i sposoby

Przygotowanie próbek do charakteryzowania komórek WJ-MS

Charakterystykę przeprowadza się tylko na produktach komórkowych zwolnionych do obrotu zgodnie z ATMP (ang. Advanced Therapy Medicinal Products). Z serii pochodzących od 14 różnych dawców (ALS393, ALS439, ALS613, ALS558, ALS628, ALS634, ALS397, ALS432, ALS366, ALS410, ALS502, ALS633, ALS414, ALS487) określanych dalej również jako „linie komórkowe” rozmrażano po jednym reprezentatywnym produkcie (linii komórkowej WJ-MS) wytworzonym przez Wytwórnę Farmaceutyczną PB KM, którego materiał komórkowy wykorzystano do uzyskania rozszerzonej charakterystyki, umożliwiającej uniwersalne grupowanie danego produktu terapii komórkowej. Po odwirowaniu roztworu krioprotektanta, komórki zawieszono w tym samym kompletnym podłożu, które zostało użyte do wytworzenia produktów komórkowych, a następnie określono liczbę i żywotność komórek. Natychmiast po rozmrożeniu komórek przeprowadzono test jednostek tworzących kolonie (CFU). Resztę żywych komórek wysiano na naczynia hodowlane (27 000 komórek/cm²) w tym samym kompletnym podłożu i warunkach hodowli, które zastosowano do wytwarzania produktów komórkowych. Po 3 dniach konfluencję sprawdzono z zastosowaniem mikroskopu inwersyjnego. Tam, gdzie konfluencja była mniejsza niż 75%, całe podłoże zastępowano świeżym. W przypadku, gdy konfluencja była większa niż 75%, komórki oddzielano za pomocą TrypLE™ Express Enzyme (1X) Gibco, Bleiswijk, Holandia). 10 milionów komórek wysiano na naczynia hodowlane (13 000 komórek/cm²) do kolejnego pasażu. Po kolejnych dwóch dniach hodowli komórki odczepiono za pomocą TrypLE™ Express Enzyme (1X) i określono liczbę i żywotność komórek. 5 milionów komórek zabezpieczono jako osad i zamrożono w -80°C do dalszej izolacji RNA w celu przeprowadzenia oceny bezpieczeństwa molekularnego przy pomocy metody ilościowego PCR w czasie rzeczywistym. Kolejne 3,5 miliona komórek przeznaczono do określenia fenotypu za pomocą rozszerzonego panelu. 0,5 miliona komórek wysiano do 3 dołek na 6-dołkowej płytce (167 000 komórek na dołek) w celu zmierzenia sekretomu 14 linii to komórkowych WJ-MS. Kolejne 0,5 miliona komórek wysiano do 3 dołek na 6-dołkowej płytce (167 000 komórek na dołek) i umieszczono w inkubatorze w standardowych warunkach tj. w temperaturze 37°C oraz atmosferze 5% CO₂ na 48 godzin w celu przygotowania testu kohodowli z aktywowanymi komórkami jednojądrzastymi (komórki MNC).

Przykład 1

Test komórkowy jednostek tworzących kolonie (CFU) z rozmrożonych produktów komórkowych

Do testu jednostek tworzących kolonie, 14 linii komórkowych WJ-MS z rozmrożonych komórek produktu dla każdego z 14 produktów komórkowych wysiano na 6-dołkowe płytki w liczbie 100 komórek/dołek w 3 powtórzeniach. Komórki hodowano przez 14 dni w tym samym kompletnym podłożu i warunkach hodowli, które stosowano do wytwarzania produktów komórkowych jak opisano powyżej. Po 14 dniach w celu uwidocznienia kolonii komórek, komórki przemyto PBS (Gibco, Bleiswijk, Holandia) 4 ml na dołek, utrwalono 4% roztworem paraformaldehydu (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 1 ml na dołek i inkubowano 20 minut w temperaturze pokojowej. W celu wizualizacji komórki barwiono 0,5% roztworem błękitu toluidynowego (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 1 ml na dołek i inkubowano 30 minut na wytrząsarce kołyskowej w temperaturze pokojowej. Barwnik wymyto przez dwukrotne przemycie DPBS (Gibco, Bleiswijk, Holandia) 1 ml na dołek. Stopień tworzenia kolonii zdefiniowano jako procent liczby kolonii do liczby wysianych komórek.

W przypadku serii produktu ALS628 i ALS634 nie zaobserwowano kolonii. Pozostałe WJ-MSK przedstawiały stopień tworzenia kolonii w zakresie 7–19% (Figura 1). Serie produktu opartego na WJ-MSK w zależności od dawcy różnią się procentem komórek tworzących kolonie.

Przykład 2

Ekspresja wybranych genów dla 14 linii komórkowych WJ-MSK opartego na tzw. teście panelu bezpieczeństwa molekularnego (zgłoszenie patentowe nr P.433374 pt. "Zastosowanie zestawu genów do określania potencjału teratogennego komórek mezenchymalnych", które uzyskało patent 2 sierpnia 2022 r.)

Pierwszym etapem testu było izolowanie materiału genetycznego (RNA) z rozmrożonych peletek 14 linii komórkowych WJ-MSK sposobem kolumnowym na złożu krzemowym. Materiał biologiczny wyizolowano i oczyszczono za pomocą zestawów Pure Link RNA_{ase} Mini Kit (Invitrogen) i Pure Link Dnase Kit (Invitrogen) zgodnie z protokołami producenta. Otrzymany w ten sposób kwas nukleinowy (RNA) był materiałem wyjściowym do odwrotnej transkrypcji RNA przy użyciu Maxima H Minus Kit do uzyskania wysokojakościowego cDNA pozbawionego genomowego DNA. Finalnie na uzyskanym cDNA przeprowadzono reakcje łańcuchową polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-PCR) do identyfikacji obecności jak i relatywnej ekspresji (poprzez porównanie siły sygnału fluorescencji) wyselekcjonowanych charakterystycznych markerów genetycznych CDKN2A, CLDN1, DNMT3B, ESM1, HAND2, HEY1, MYO3B, NANOG, PDGFRA, POU5F1, TDGF1, TWIST1, ZBTB16 (płytki niestandardowa PrimePCR 96W, Bio-Rad) zgodnie z protokołem przedstawionym w poniższej tabeli 1.

Tabela 1. Warunki protokołu reakcji RT-PCR.

Etap	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Aktywacja	95°C	2 min	1
Denaturacja	95°C	5 sek	40
Annealing/wydłużanie	60°C	30 sek	
Krzywa topnienia*	65-95°C (przyrost 0,5°C)	5 sek/etap	1

* Etap krzywej topnienia jest tylko dla analizy SYBR[®] Green

Komórki WJ-MSK w zależności od dawcy wykazały ekspresję na różnym poziomie dla wyselekcjonowanych markerów genetycznych w panelu pluripotencjalnym (TDGF1, NANOG, POU5F1, DNMT3B), panelu charakterystycznym dla MSC (CDKN2A, HAND2, PDGFRA, TWIST1, ZBTB16), panelu mezodermalnym (ESM1, HEY1), panelu ektodermalnym (MYO3B), panelu endodermalnym (CLDN1). Wyniki analizy pokazano na figurze 2. Korelację między wyselekcjonowanymi markerami genetycznymi przedstawiono na figurze 3.

Na wykresie wielkość punktów oznacza wartość bezwzględną korelacji, kształt okręgu pozytywną korelację, a kształt rombu ujemną. Dodatkowo istotność korelacji na poziomie 0.05 oznaczona jest *, na poziomie 0.01 oznaczona jest **, natomiast na poziomie 0.001 oznaczona jest ***.

Przykład 3

Określanie fenotypu WJ-MSK z zastosowaniem cytometrii przepływowej

Aby zdefiniować rozszerzony panel cytometrii, przygotowano komórki przemyto DPBS (Gibco, Bleiswijk, Holandia), a osad ponownie zawieszono w Brilliant Stain Buffer Plus (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) przy minimalnej gęstości 1 milion komórek/ml. Zawiesinę komórek inkubowano ze sprzężonymi z fluorochromem przeciwciałami (FITC, BV421, PE, AF647) przeciwko CD119, CD120b, CD274, CD273, CD200, CD72, CD39, HO (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) 30 min na lodzie w ciemności. Aby wykluczyć niespecyficzne wiązanie, jako kontrolę zastosowano odpowiednie przeciwciała izotypowe IgG2b κ i niewybarwione komórki. Analizę komórek przeprowadzono z zastosowaniem cytometru przepływowego Celesta i oprogramowania FACSDiva (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA). Wyniki przedstawiono jako procent komórek dodatnich dla odpowiednich markerów w stosunku do kontroli izotypowej i komórek niewybarwionych.

Komórki WJ-MSC w zależności od dawcy mają różny rozkład procentowy wybranych markerów genetycznych w panelu rozszerzonym. Wyniki przedstawiono na figurze 4. Na znikomym poziomie występuje u wszystkich dawców marker CD72 < 0,2%. Również na niskim poziomie występują markery CD119 < 3% oraz CD120b < 5%. W przypadku CD200 możemy wyróżnić 3 grupy CD200 przedział 12–14% (ALS393 i ALS439), przedział 30–50% (ALS613, ALS414, ALS487) i największa grupa przedział 59–88% (ALS366, ALS397, ALS410, ALS432, ALS558, ALS628, ALS633, ALS634, ALS502). Średni procent dla markera CD273 wśród wszystkich dawców to 76% (+/- 14). Procentowa zawartość CD39 również w zależności od dawcy równo podzieliła ich na dwie grupy. CD39 < 10% (ALS397, ALS393, ALS9, ALS628, ALS613, ALS414, ALS487) i CD39 przedział 12–30% (ALS66, ALS410, ALS432, ALS558, ALS633, ALS634, ALS502). Marker CD274 – jego średni procent wśród wszystkich dawców to 34% (+/- 12). Oksygenaza hemowa-1 (HO) podzieliła wszystkich dawców na 3 grupy. HO < 5% (ALS397, ALS393, ALS439, ALS628, ALS613, ALS414, ALS487), przedział 6–10% (ALS366, ALS432, ALS634) oraz przedział 11–17% (ALS410, ALS558, ALS633, ALS502).

Korelację między markerami panelu rozszerzonego przedstawiono na figurze 5.

Na wykresie wielkość punktów oznacza wartość bezwzględną korelacji, kształt okręgu pozytywną korelację, a kształt rombu ujemną. Dodatkowo istotność korelacji na poziomie 0.05 oznaczona jest *, na poziomie 0.01 oznaczona jest **, natomiast na poziomie 0.001 oznaczona jest ***.

Przykład 4

Analiza sekretomu WJ-MSC

Po wysianiu 0,5 miliona komórek w 3 studzienkach na 6-studzienkowej płytce (167 000 komórek na studzienkę), hodowlę umieszczono w inkubatorze na 48 godzin w standardowych warunkach tj. w temperaturze 37°C oraz atmosferze 5% CO₂. Hodowla była przeprowadzana w tym samym kompletnym podłożu, które zostało użyte do wytworzonych produktów komórkowych. Po 48 godzinach podłoże z komórek usunięto i dwukrotnie przepłukano DPBS. Do każdej studzienki dodano 4 ml kompletnego podłoża i hodowlę umieszczono w inkubatorze na 4 dni w standardowych warunkach tj. w temperaturze 37°C oraz atmosferze 5% CO₂. Po 4 dniach hodowli zebrano supernatant z każdej studzienki. Po 4 dniach hodowli supernatant z każdej studzienki zebrano i odwirowano 600 x g, 10 min. Otrzymane supernatanty poddano krioprezerwacji w -80°C do czasu analizy. Analizowano wydzielanie przez 14 linii komórkowych WJ-MSC następujących analitów: BDNF, HGF, IL6, IL8, MCP1, RANTES, TGFb1, TGFb2 i przeprowadzono przy użyciu testów Luminex Multiplex (Merck). Wszystkie testy przeprowadzono zgodnie z protokołem producenta i odczytano na aparacie Lminex. Otrzymane poziomy cytokin analizowano w programie Belysa® Software.

Komórki WJ-MSC w zależności od dawcy mają różny poziom wydzielania BDNF, HGF, IL6, IL8, MCP1, RANTES, TGFb1, TGFb2, co może świadczyć o ich zmienności biologicznej (figura 6). Korelację między analitami przedstawiono na figurze 7.

Na wykresie wielkość punktów oznacza wartość bezwzględną korelacji, kształt okręgu pozytywną korelację, a kształt rombu ujemną. Dodatkowo istotność korelacji na poziomie 0.05 oznaczona jest *, na poziomie 0.01 oznaczona jest **, natomiast na poziomie 0.001 oznaczona jest ***.

Zaobserwowano istotną korelację dla HGF i MCP1. Im więcej komórki wydzielają HGF, tym więcej wydzielają MCP1. Kolejną istotną korelacją to RANTES ver. MCP1. Im większe wydzielanie RANTES, tym większe wydzielanie MCP1. Ostatnią istotną korelacją to TGFb2 ver HGF. Im więcej TGF, tym mniejsze wydzielanie HGF.

Przykład 5

Test immunomodulacji oparty na kohodowli WJ-MSC z komórkami jednojądrzastymi

Jednym z elementów kohodowli były rozmrożone komórki jednojądrzaste MNC (wyzolowane przez wirowanie w gradiencie stężeń z jednojądrzastych komórek krwi obwodowej – PBMC pochodzących od zdrowego dawcy). Komórki jednojądrzaste rozmrożono (tego samego dnia co komórki WJ-MSC) w łaźni wodnej o temperaturze 37°C, a następnie usunięto podłoże do zamrażania przez odwirowanie i komórki zawieszono w podłożu do namnażania limfocytów to ImmunoCult™-XF T Cell Expansion Medium (StemCell Technologies) + 1% (obj./obj.) Antybiotyk/Antymykotyk (Gibco) + 56 UI/ml ludzka IL2 IS klasy premium (Miltenyi Biotec). Po określeniu liczby i żywotności komórek za pomocą automatycznego licznika komórek odebrano 8 milionów komórek w 4 ml (zachowując gęstość komórek 2 mln/ml) i wysiano na 12-studzienkową płytkę. Komórki aktywowano przez dodanie 25 µl/ml aktywatora ImmunoCult™ Human CD3/CD28/CD2 T Cell Activator (StemCell Technologies) i płytkę umieszczono w inkubatorze na 72 godziny w standardowych warunkach tj. w tem-

peraturze 37°C oraz atmosferze 5% CO₂. Po 72 godzinach aktywacji zawiesinę komórek rozcieńczono ośmiokrotnie i hodowlę umieszczono w inkubatorze na 48 godzin w 20 celu namnażania. Po 48 godzinach zawiesinę komórek rozcieńczono dwukrotnie w celu dalszego namnażania i umieszczono w inkubatorze na kolejne 48 godzin. Po 48 godzinach i 7-dniowym namnażaniu aktywowane komórki jednojądrzaste były gotowe do kohodowli z 14 liniami komórkowymi WJ-MSC. W przypadku 48-godzinnej hodowli WJ-MSC twórcy musieli określić ich liczbę w studzience 6-studzienkowej płytki. Ta informacja jest potrzebna do wysiewu prawidłowej liczby komórek jednojądrzastych, która ma być 10 razy większa w studzience niż liczba WJ-MSC. W tym celu odłączono komórki z jednej z czterech studzienek za pomocą TrypLE™ Express Enzyme (1X) (Gibco, Bleiswijk, Holandia). Komórki zliczono za pomocą automatycznego licznika komórek. Podłoże hodowlane WJ-MSC usunięto z pozostałych dwóch studzienek z komórkami i przemyto dwukrotnie DPBS. Kohodowlę prowadzono w podłożu dla limfocytów ImmunoCult (Stem Cell Technologies), aby zapewnić jak najlepsze warunki ich namnażania. Aby przetestować właściwości immunomodulacyjne WJ-MSC, komórki jednojądrzaste umieszczono na insercie 0,4 µm (Greiner Bio-One) do studzienki z WJ-MSC. Na insercie umieszczono dziesięć razy więcej komórek jednojądrzastych niż WJ-MSC. Inserter umożliwia kohodowanym komórkom pośrednią interakcję poprzez wydzielanie czynników wzrostu i cytokin w 4 ml podłoża dla limfocytów. Jedna ze studzienek z WJ-MSC działała jako kontrola namnażania limfocytów z 4 ml podłoża ImmunoCult™-XF T Cell Expansion Medium (StemCell Technologies) + 1% (obj./obj.) roztworu penicyliny/streptomycyny i amfoterycyny B (Gibco) + 56 UI/ml ludzka IL2 IS klasy premium (Miltenyi Biotec). Kolejną kontrolą była studzienka z identyczną liczbą samych komórek jednojądrzastych (w 4 ml podłoża dla limfocytów), do tej którą umieszczono w kohodowli. Wszystkie kontrole i kohodowlę na 6-studzienkowej płytce umieszczono w inkubatorze na 4 dni w standardowych warunkach tj. w temperaturze 37°C oraz atmosferze 5% CO₂. Po 4 dniach test immunomodulacyjny określono jako liczbę komórek jednojądrzastych i ich fenotyp. Liczbę i żywotność komórek jednojądrzastych z kontroli i kohodowli określono za pomocą automatycznego licznika komórek. Komórki jednojądrzaste przemywano jednokrotnie DPBS (Gibco, Bleiswijk, Holandia) i znakowano je oznaczając wybrane subpopulacje limfocytów i markery charakterystyczne dla poziomu aktywacji. Osad zawieszono w Brilliant Stain Buffer Plus (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) przy minimalnej gęstości 1 miliona komórek/ml. Zawiesinę komórek inkubowano z przeciwciałami sprzężonymi z fluorochromem (BV421, BV605, BV650, BV786, BB515, PE-CF594, BB700, APC, APC-R700, APC-H7, PE, PerCP, AF647) przeciwko CD25, HLA-DR, CD3, CD69, CD45RO, CD16, CD56, CD4, CD45RA, CD19, CD8, CD40, CD45, CD14, CD183, CD196, CD127, CD194 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) przez 30 min na lodzie w ciemności. Równocześnie wykonano oznaczenie cytokin wewnętrznych IFN-γ (dla Th1), IL-4 (dla Th2) i IL-17A (dla Th 17) przy pomocy zestawu Human Th1/Th2/Th17 Phenotyping Kit (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA). Milion komórek (D4 kontrola i D4 kohodowla) zawieszono w 3 ml podłoża ImmunoCult™-XF T Cell Expansion Medium (StemCell Technologies) + 1% (obj./obj.) roztworu penicyliny/streptomycyny i amfoterycyny B (Gibco) + 56 UI/ml ludzka IL2 IS klasy premium (Miltenyi Biotec) i wysiano na studzienkę płytki 6-studzienkowej. Następnie dodano GolgiStop Protein Transport Inhibitor – końcowe stężenie 1 µl/ml (element zestawu Human Th1/Th2/Th17 Phenotyping Kit Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA), PMA – końcowe stężenie 50 ng/ml (Sigma-Aldrich Saint Louis, Missouri, USA) oraz jonomycynę – końcowe stężenie 1 µg/ml (Sigma-Aldrich Saint Louis, Missouri, USA) i inkubowano przez 5 godzin w inkubatorze w standardowych warunkach tj. w temperaturze 37°C oraz atmosferze 5% CO₂. Po 5 godzinnej inkubacji zawiesiny komórek zwirowano przez 5 min przy 500 x g i jednokrotnie przemyto DPBS (Gibco, Bleiswijk, Holandia). Osady komórek zawieszono w 0,5 ml zimnego BD Cytotfix Fixation Buffer (element zestawu Human Th1/Th2/Th17 Phenotyping Kit Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) i inkubowano przez 15 min w temp. pokojowej. Po inkubacji zawiesiny zwirowano przez 5 min przy 500 x g, osad zawieszono w buforze Perm/Wash (element zestawu Human Th1/Th2/Th17 Phenotyping Kit Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA), a następnie dodano koktajl przeciwciał CD4 PerCP-Cy5.5, IL-17A PE, IFN-γ FITC, IL-4 APC (element zestawu Human Th1/Th2/Th17 Phenotyping Kit Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) i poddano inkubacji 30 min. w temp. pokojowej. Analizę komórek przeprowadzono przy użyciu cytometru przepływowego Celesta i oprogramowania FACSDiva (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA). Wyniki przedstawiono jako procent komórek dodatnich dla odpowiednich markerów w stosunku do izotypu komórki kontrolnej i niewybarwionej. Hamowanie ekspansji komórek MNC w kohodowli

dzięki immunomodulacyjnym właściwościom komórek WJ-MSC przedstawiono na figurze 8A. Żywotność komórek MNC przedstawiono na figurze 8B. Średnia żywotność komórek MNC w dniu założenia kohodowli (D0) wynosiła 84% (+/-5).

W dniu zakończenia kohodowli (D4) średnia żywotność komórek MNC w kontroli oraz kohodowli wynosiła 68% (+/-8).

Zgodnie z analizą statystyczną, wynik kohodowli przedstawiono na figurze 9 jako wartość

$$\frac{D4 \text{ KOHODOWLA} - D4 \text{ KONTROLA}}{D_0}$$

przy czym D4 kohodowla, D4 kontrola i D00 były wyrażone w %, natomiast wynik kohodowli został wyrażony jako współczynnik obrazujący trend wzrostu lub spadku w odniesieniu do punktu wyjściowego lub kontroli. Wszystkie MNC między dniem 0 (D0), a dniem 4 (D4) wykazały proliferację komórek. W D4 tylko jeden dawca – ALS613 nie spowodował zahamowania ekspansji komórek MNC w kohodowli. Procent poszczególnych subpopulacji oraz markerów aktywacji przedstawiono na figurach 10–14.

Zgodnie z analizą statystyczną, wynik kohodowli przedstawiono figurze 15 jako wartość

$$\frac{D4 \text{ KOHODOWLA} - D4 \text{ KONTROLA}}{D_0}$$

Limfocyty T, w wyniku kohodowli z WJ-MSC od większości dawców zwiększył się % CD3+ na MNC. Limfocyty B, w wyniku kohodowli z WJ-MSC od większości dawców zmniejszył się % CD19+ na MNC. NK, w wyniku kohodowli z WJ-MSC od większości dawców zmniejszył się % CD16+CD56+ na MNC. NKT, w wyniku kohodowli z WJ-MSC od większości dawców zmniejszył się % CD3+CD16+CD56+ na MNC. Limfocyty Th, w wyniku kohodowli z WJ-MSC od większości dawców wzrósł % CD4+ na MNC. Limfocyty Tc, w wyniku kohodowli z WJ-MSC od większości dawców spadł % CD8+ na MNC. Limfocyty Th naiwne, w wyniku kohodowli z WJ-MSC od większości dawców zwiększył się % CD4+CD45RA+ na MNC. Limfocyty Th pamięci, w wyniku kohodowli z WJ-MSC od 7 dawców zwiększył się % CD4+CD45RO+ na MNC, z jednym dawcą WJ-MSC procent nie uległ zmianie, z WJ-MSC od 6 dawców % zmniejszył się. Limfocyty Tc naiwne, w wyniku kohodowli z WJ-MSC od połowy dawców zwiększył się % CD8+CD45RA+ na MNC. Limfocyty Tc pamięci, w wyniku kohodowli z WJ-MSC od połowy dawców zmniejszył się % CD4+CD45RO+ na MNC lub pozostał bez zmian. Wczesna aktywacja na limfocytach Th, w wyniku kohodowli z WJ-MSC od większości dawców procent CD4+CD69+ zmniejszył się, tylko z WJ-MSC dawcy ALS628 nieznacznie zwiększył się. Właściwa aktywacja na limfocytach Th, w wyniku kohodowli z WJ-MSC od większości dawców procent CD4+CD25+CD69+ zwiększył się. Późna aktywacja na limfocytach Th, w wyniku kohodowli z WJ-MSC od większości dawców procent CD4+CD25+CD69+ zwiększył się. Limfocyty Th nieaktywowane, w wyniku kohodowli z WJ-MSC od większości dawców zwiększył się procent komórek Th nieaktywowanych, wyciszenie aktywacji przez WJ-MSC. Wczesna aktywacja na limfocytach Tc, w wyniku kohodowli z WJ-MSC od większości dawców procent CD8+CD69+ zmniejszył się. Właściwa aktywacja na limfocytach Th, w wyniku kohodowli z WJ-MSC od większości dawców procent CD8+CD25+CD69+ zwiększył się. Późna aktywacja na limfocytach Tc, w wyniku kohodowli z WJ-MSC od większości dawców procent CD8+CD25+CD69+ zwiększył się. Limfocyty Tc nieaktywowane, w wyniku kohodowli z WJ-MSC od większości dawców zwiększył się procent komórek Tc nieaktywowanych, wyciszenie aktywacji przez WJ-MSC. Limfocyty T regulacyjne, w wyniku kohodowli z WJ-MSC od większości dawców zmniejszył się procent komórek CD4+CD25+CD127^{low}Foxp3+. Limfocyty Th1, w wyniku kohodowli z WJ-MSC u połowy dawców zwiększył się procent komórek Th1. Limfocyty Th2, w wyniku kohodowli z WJ-MSC u wszystkich dawców zwiększył się dość znacznie procent komórek Th2. Limfocyty Th17, w wyniku kohodowli z WJ-MSC u większości dawców zwiększył się procent komórek Th17. W przypadku cytokin wewnętrznych w komórkach Th (CD4+) biorących udział w odpowiedzi Th1, zaobserwowano spadek % IFN- γ w kohodowli z dawcą WJ-MSC ALS 613 i ALS628. W pozostałych kohodowlach % IFN- γ nieznacznie wzrósł lub pozostał bez zmian. Procent IL-4 odpowiadającą za odpowiedź Th2 wzrósł dla kohodowli z WJ-MSC dla dawców ALS393, ALS439, ALS613, ALS397, ALS366, ALS487, w pozostałych kohodowlach zaobserwowano spadek % IL-4. Procent IL-17 biorącej udział w odpowiedzi Th17 zwiększył się w wyniku kohodowli z WJ-MSC z 7 dawcami (ALS393, ALS439, ALS628,

ALS634, ALS366, ALS633ALS414), pozostał bez zmian z ALS397 lub zmniejszył się z dawcami ALS613, ALS558, ALS432, ALS410, ALS502, ALS487.

Zmiany w ekspansji i fenotypie komórek MNC w kohodowli z WJ-MSc świadczą o immunomodulacji komórek MSC. Większe/mniejsze zdolności immunomodulacyjne są powiązane ze zmiennością biologiczną dawców MSC i przynależnością do różnych klastrów terapeutycznych.

Korelację między subpopulacjami komórek MNC, a także ich poziomem aktywacji przedstawiono na figurze 16.

Na wykresie wielkość punktów oznacza wartość bezwzględną korelacji, kształt okręgu pozytywną korelację, a kształt rombu ujemną. Dodatkowo istotność korelacji na poziomie 0.05 oznaczona jest *, na poziomie 0.01 oznaczona jest **, natomiast na poziomie 0.001 oznaczona jest ***.

Przykład 6

Analiza statystyczna

Analizowany problem wymaga przeprowadzenia procedury statystycznej, która obejmuje dwa ważne etapy. W pierwszym etapie określono podział na klastry (subpopulacje). Następnie, w drugim etapie wyznaczono pulę parametrów, które najlepiej charakteryzują wskazany podział.

Po wczytaniu wszystkich danych, niektóre z nich trzeba wstępnie przetworzyć. Wstępne przetwarzanie obejmuje przykładowo dane sekretomu. W ramach wstępnego przetwarzania usuwa się duplikaty. Inne czynności na tym etapie obejmują usuwanie wartości odstających, składowych stałych, lub innych zakłóceń. Następnie dla każdej zmiennej wyznacza się wartość średnią dla każdej próby (produktu komórkowego MSC).

Dla danych fenotypu MNC oraz danych liczby i żywotności MNC wartości zmiennych (parametrów) były wyznaczane zgodnie ze wzorem:

$$\frac{D_4 \text{ KOHODOWLA} - D_4 \text{ KONTROLA}}{D_0}$$

natomiast w przypadku, gdy nie było dostępnej wartości D_0 wyznaczana była tylko różnica. Wartości D_0 nie były dostępne dla zmiennych Th1, Th2, Th17 oraz ich cytokin wewnętrznych.

Przed przystąpieniem do analizy składowych głównych brakujące dane uzupełnione zostały dzięki zastosowaniu algorytmu regularyzowanego iteracyjnego PC A [Josse, J & Husson, F. (2013). Handling missing values in exploratory multivariate data analysis methods. Journal de la SFdS. 153 (2), pp. 79–99.]

Etap 1 (podział na klastry)

- 1) W celu określenia klastrów terapeutycznych dla podziału komórek banku MSC zastosowano hierarchiczną analizę skupień (metoda 'complete'), której wynik zilustrowano na fig. 17. Wyznaczono wstępny podział komórek MSC na 3 klastry. Parametry pogrupowano następująco:
 - a) fenotyp MSC,
 - b) fenotyp MNC,
 - c) żywotność MNC,
 - d) procent komórek tworzących kolonie – CFU,
 - e) ekspresja 12 genów,
 - f) aktywność sekrecyjna komórek MSC,
- 2) W celu sprawdzenia otrzymanego podziału zastosowano analizę składowych głównych (fig. 18).

Dane wejściowe do tego etapu przetwarza się na macierz, w której kolumny są kolejnymi zmiennymi (parametrami), natomiast w wierszach są próby (linie komórkowe MSC). Z macierzy tej wyznacza się macierz dystansów. Wynikiem tego etapu jest przyporządkowanie każdej z prób do jednego z 3 klastrów (podziału prób na 3 subpopulacje), które są używane w kolejnym etapie.

Etap 2 (wyznaczanie puli parametrów)

Tak jak w pierwszym etapie parametry łączy się w macierz o takich samych wymiarach. Każda próba jest przyporządkowana do jednego z trzech klastrów – proregeneracyjnego, nadaktywnego i antystresowego. Efektem końcowym tego etapu jest zestaw kilku parametrów, które najlepiej rozdzielają próby na określone klastry.

- 1) Użyto algorytmu Boruta w celu znalezienia istotnych parametrów. Algorytmu Boruta [Miron B. Kurasa, Witold R. Rudnicki (2010). Feature Selection with the Boruta Package. Journal of

Statistical Software, 36(11), p. 1–13.] stosuje się z klasyfikatorem lasów losowych dla znalezienia ważności każdego parametru. W tym celu wyznacza się algorytmem miarę istotności parametrów na podstawie współczynników błędu klasyfikacji każdego parametru. Algorytm Boruta obejmuje następujące etapy:

- a) Tworzenie zestawu danych opartego o wejściowe dane ze spermutowanymi etykietami dla grup (tzw. 'shadow features').
 - b) Użycie klasyfikatora lasów losowych na rozszerzonym zestawie danych i wyznaczenie miary ważności danej zmiennej (domyślnie jest to średnia dokładność spadku tzw. Mean Decrease Accuracy). Następnie to samo dzieje się dla danych bez spermutowanych etykiet. Różnice między tymi dwoma zbiorami są następnie uśredniane dla wszystkich drzew i normalizowane przez odchylenie standardowe różnic (jest to tzw. Z-score).
 - c) W każdej iteracji sprawdzane jest, czy wartość Z-score dla danych rzeczywistych jest wyższa niż dla danych rozszerzonych po spermutowaniu etykiety dla danej zmiennej (tj. czy zmienna predykcyjna ma wyższy wynik Z niż maksymalny wynik Z jej 'shadow features') i stale usuwane są zmienne, które są uważane za wysoce nieistotne.
 - d) Algorytm zatrzymuje się, gdy wszystkie zmienne zostaną potwierdzone lub odrzucone.
- 2) Po wytypowaniu istotnych parametrów, aby zweryfikować otrzymane wyniki zastosowano drugi algorytm do szukania istotnych parametrów – DALEX [Biecek P (2018). "DALEX: Explainers for Complex Predictive Models in R." *Journal of Machine Learning Research*, 19(84), 1–5]. Stosuje się go w przykładzie podobnie, jak w przypadku Boruty wraz z klasyfikatorem lasów losowych. Wytypowanie parametrów odbywa się tutaj przy pomocy miary istotności parametrów opartej na funkcji straty tzw. entropii krzyżowej.
 - 3) Tylko parametry, które są istotne w obu algorytmach brano do dalszych analiz. Następnie sprawdzono istotność korelacji pomiędzy wytypowanymi parametrami.
 - 4) Następnie wyłączono ze zbioru parametrów istotnych te, które są ze sobą mocno skorelowane. W ten sposób podniesiono efektywność procedury klasyfikacji i zmniejszono złożoność modelu.
 - 5) Bazując tylko na wytypowanych parametrach sprawdzono, czy zastosowanie hierarchicznej analizy skupień da ten sam podział na klastry, który otrzymano na początku procedury (Etap I) przy użyciu wszystkich parametrów.
 - 6) Efektywność parametrów sprawdzono w procesie klasyfikacji, do którego użyto klasyfikatora ensembl [Datta, Susmita, et al. "An adaptive optimal ensemble classifier via bagging and rank aggregation with applications to high dimensional data." *BMC Bioinformatics*, vol. 11, 18 Aug. 2010, p. 427] będącego złożeniem 3 klasyfikatorów: metody wektorów nośnych, lasów losowych oraz partycjonowania rekurencyjnego. Dla każdej linii komórkowej wzięto pod uwagę tylko wybrane parametry (5 najważniejszych: poziom HO, poziom ekspresji POU5F1 (OCT3/4), zmiana % komórek Th pod wpływem MSC; zmiana % komórek Th pozytywnych na CD69 pod wpływem MSC oraz zmiana % komórek ThN (naiwnych)) jako zbiór wejściowy dla klasyfikatora w celu predykcji, czy dana linia MSC należy do jednego z trzech wytypowanych wcześniej klastrów. Wynikiem końcowym tego etapu jest podanie prawdopodobieństw przynależenia linii komórkowej do danego klastra.

Przykład 7

Korzystając z procedury opisanej w przykładzie 6 wytypowano i scharakteryzowano 3 klastry. W analizie skupień przyjęto jako poziom odcięcia dla klastrów odległość równą 11.85 (fig. 17). Trzy wytypowane klastry potwierdzono dodatkowo bazując na analizie PCA. W skład pierwszego klastra wchodziły produkty to komórkowe MSC, dla których wartość współrzędnej y w nowym układzie współrzędnych jest ujemna, natomiast współrzędnej x jest dodatnia bądź ujemna (fig. 18). W skład drugiego klastra wchodziły linie komórkowe MSC, dla których wartość współrzędnej y w nowym układzie współrzędnych jest dodatnia, natomiast współrzędnej x jest ujemna. W skład trzeciego klastra wchodziły linie komórkowe MSAC, dla których wartości współrzędnych x i y w nowym układzie współrzędnych są dodatnie (fig. 18).

Podstawowe statystyki opisowe dla wybranych 5 parametrów zestawiono w Tabeli 2:

Tabela 2. Zestawienie podstawowych statystyk dla 5 najbardziej istotnych parametrów dla każdego z 3 rozważanych klastrów. Wyniki przedstawione są jako odsetek [%] lub krotność zmiany w odniesieniu do linii referencyjnej [FC]

Parametr	Grupa (klaster)	Mediana	Średnia	Minimum	Maksimum
HO [%]	0 (1)	3,7	5,27	3,4	10,1
HO [%]	1 (2)	2,9	2,93	2	3,9
HO [%]	2 (3)	15,2	14,7	11,4	17
POU5F1[FC]	0 (1)	1,12	1,1	0,84	1,4
POU5F1[FC]	1 (2)	0,84	0,78	0,5	1,01
POU5F1[FC]	2 (3)	0,68	0,65	0,55	0,7
Th.CD69+[%]	0 (1)	-5,2	-5,69	-10,6	0,59
Th.CD69+[%]	1 (2)	-17,5	-16,11	-17,83	-13
Th.CD69+[%]	2 (3)	-14,67	-14,56	-27,33	-1,59
Th.naiwne[%]	0 (1)	0,19	0,21	0,08	0,31
Th.naiwne[%]	1 (2)	-0,28	-0,26	-0,35	-0,15
Th.naiwne[%]	2 (3)	0,1	0,03	-0,22	0,16
Th[%]	0 (1)	0,06	0,05	-0,02	0,09
Th[%]	1 (2)	0,06	0,11	0,05	0,23
Th[%]	2 (3)	0,1	0,1	0,09	0,12

KLASTER 1 (grupa 0)

KLASTER PROREGENERACYJNY

(7 linii MSC)

Ogólna charakterystyka: wysoki POU5F1/niski Th[%]/wysoki dodatni Th.naiwne[%]/ najniższy spadek odsetka Th.CD69+[%]

Opierając się na oznaczonej średniej wyższej ekspresji genu *POU5F1* (OCT3/4) w klastrze 1 można założyć, iż ta sub-populacja potencjalnie wykazuje się zwiększonym potencjałem proregeneracyjnym. Wyższa ekspresja OCT3/4 jako to jednego z głównych czynników pluripotencji może być skorelowana z większą plastycznością, bardziej otwartą chromatyną, a tym samym charakteryzować populacje MSC o wyższym niż w klastrach 2 i 3 potencjale do różnicowania (w tym do transdyferencji). Należy zaznaczyć, iż mimo że ekspresja OCT3/4 jest oznaczana jako wyższa, nie sięga ona poziomów oznaczanych w liniach pluripotentnych, a tym samym nie jest związana z podwyższonym ryzykiem nowotworzenia *in vivo*. Dodatkowo należy wspomnieć, że populacja MSC z klastra proregeneracyjnego w kontakcie z MNC powodowała zwiększenie odsetka limfocytów T pomocniczych o fenotypie naiwnym (CD3+CD4+CD45RA+) jak opisano w literaturze taki zwiększony odsetek naiwnych Th jest skorelowany z lepszym rokowaniem dla pacjentów z ALS (13, 14 15, 16).

KLASTER 2 (grupa 1)

KLASTER NADAKTYWNY

(3 linie MSC)

Ogólna charakterystyka: niski HO/ ujemny Th.naiwne[%]

Subpopulacja MSC wyselekcjonowana na podstawie niskiego poziomu ekspresji HO, przy niskiej ekspresji *POU5F1* (OCT3/4) i w kontakcie z MNC powoduje obniżenie odsetka naiwnych limfocytów Th. Na podstawie wstępnych ocen z badania klinicznego produkt MSC pochodzący z linii z klastra 2 nie wywołał oczekiwanego efektu terapeutycznego (3 podania MSC z klastra 2 – dwóch pacjentów). Jak wykazano na mysim modelu sepsy, poziom HO produkowany przez MSC może mieć przełożenie na efekt terapeutyczny *in vivo* (17).

KLASTER 3 (grupa 2)

KLASTER ANTYSTRESOWY

(4 linie MSC)

Ogólna charakterystyka: wysoki HO/niski POU5F1/wysoki Th[%]

Subpopulacja wykazująca najwyższy odsetek komórek z błonową ekspresją genu oksygenazy hemu 1 (*HMOX1*). Białko *HMOX1* jest zaangażowane w komunikację międzykomórkową, immunomodulację oraz odpowiedź na stres oksydacyjny. W literaturze pojawiają się doniesienia o wprowadzeniu wymuszonej ekspresji tego genu do komórek MSC jako podejścia wzmacniającego efekt terapeutyczny komórek mezenchymalnych. W związku z tym populacja MSC z klastra 3 będzie charakteryzowała się stosunkowo wysokim potencjałem do redukcji stresu oksydacyjnego w miejscu chorobowo zmienionym. Należy wspomnieć iż stres oksydacyjny bardzo często jest połączony z aktywnym stanem zapalnym. Populacje z klastra 3 wykazują w interakcji z aktywowanymi MNC zwiększenie odsetka limfocytów Th, co również zostało przedstawione jako pozytywny czynnik prognostyczny dla pacjentów z ALS (16, 18, 19).

Tabela 3. Efektywność predykcji klasyfikacji – prawdopodobieństwa przynależności danej serii produktu komórkowego do odpowiedniego klastra terapeutycznego nr 1, 2 lub 3.

	Nr klastra prawdziwy	Nr klastra wyznaczony	Prawdopodobieństwo przynależności do klastra		
			Klaster 1	Klaster 2	Klaster 3
ALS366	1	1	0,98	0,00	0,02
ALS393	2	2	0,34	0,54	0,12
ALS397	1	1	1,00	0,00	0,00
ALS410	3	3	0,18	0,06	0,76
ALS414	1	1	1,00	0,00	0,00
ALS432	1	1	1,00	0,00	0,00
ALS439	2	2	0,18	0,60	0,22
ALS487	1	1	1,00	0,00	0,00
ALS502	3	3	0,25	0,00	0,75
ALS558	3	3	0,09	0,01	0,90
ALS613	2	1	0,84	0,13	0,03
ALS628	1	1	0,99	0,00	0,01
ALS633	3	3	0,37	0,00	0,63
ALS634	1	1	1,00	0,00	0,00

Bibliografia

1. DeVeaux SA, Ogle ME, Vyshnya S, Chiappa NF, Leitmann B, Rudy R, et al. Characterizing human mesenchymal stromal cells' immune-modulatory potency using targeted lipidomic profiling of sphingolipids. Godoy JAP, Paiva RMA, Souza AM, Kondo AT, Kutner JM, Okamoto OK. Clinical Translation of Mesenchymal Stromal Cell Therapy for Graft Versus Host Disease. *Front Cell Dev Biol.* 2019;7(listopad): 1–14.
2. Stroncek DF, Jin P, McKenna DH, Takanashi M, Fontaine MJ, Pati S, et al. Human Mesenchymal Stromal Cell (MSC) Characteristics Vary Among Laboratories When Manufactured From the Same Source Material: A Report by the Cellular Therapy Team of the Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Collaborative. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8(czerwiec):1–13.
3. Chen Y-S. Mesenchymal Stem Cell: Considerations for Manufacturing and Clinical Trials on Cell Therapy Product. *Int J Stem cell Res Ther.* 2016;3(1): 1–12.
4. Wilson A, Webster A, Genever P. Nomenclature and heterogeneity: Consequences for the use of mesenchymal stem cells in regenerative medicine. *Regen Med.* 2019;14(6):595–611.
5. Tomecka E, Lech W, Zychowicz M, Sarnowska A, Murzyn M, Oldak T, et al. Assessment of the neuroprotective and stemness properties of human wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells under variable (5% vs. 21%) aerobic conditions. *Cells.* 2021;10(4).

6. Munoz-Perez E, Gonzalez-Pujana A, Igartua M, Santos-Vizcaino E, Hernandez RM. Mesenchymal stromal cell secretome for the treatment of immune-mediated inflammatory diseases: Latest trends in isolation, content optimization and delivery avenues. *Pharmaceutics*. 2021; 13(11).
7. Viswanathan S, Shi Y, Galipeau J, Krampera M, Leblanc K, Martin I, et al. Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature. *Cytotherapy [Internet]*, 2019;21(10): 1019–24.
8. Garcia-Bernal D, Garcia-Arranz M, Yáñez RM, Hervás-Salcedo R, Cortés A, Fernández-García M, et al. The Current Status of Mesenchymal Stromal Cells: Controversies, Unresolved Issues and Some Promising Solutions to Improve Their Therapeutic Efficacy. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9(marzec):1–18.
9. Petrenko et al. (2020); A Comparative Analysis of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells derived from Different Sources, with a Focus on Neuroregenerative Potential; *Scientific Reports* volume 10, Article number: 4290.
10. Li et al. (2014) Comprehensive characterization of four different populations of human mesenchymal stem cells as regards their immune properties, proliferation and differentiation; *International Journal of Molecular Medicine*.
11. Ouafy et al. (2020); Evaluation of the therapeutic potential of mesenchymal stromal cells during in vitro production: search for markers related to immunomodulatory properties; *Cytotherapy*, vol. 22, nr 5, suplement, 2020, strony 80–88.
12. Igor Matic et al., Expression of OCT-4 and SOX-2 in Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stem Cells during Osteogenic Differentiation, *Open Access Maced J Med. Sci*. 2016 Mar 15; 4(1): 9–16.
13. Sei-Myoung Han et al., Enhanced proliferation and differentiation of Oct4- and Sox2-overexpressing human adipose tissue mesenchymal stem cells, *Exp Mol Med*. 2014 Jun; 46(6): e101.
14. Aleksandra Musiał-Wysocka et al., Molecular and Functional Verification of Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells (WJ-MSCs) Pluripotency, *Int J Mol Sci*. 2019 kwiecień 12;20(8):1807.
15. Michael P. Gustafson et al., Comprehensive immune profiling reveals substantial immune system alterations in a subset of patients with amyotrophic lateral sclerosis, *PLoS One*. 2017 lipiec 25;12(7):e0182002.
16. Yujun Xu et al., SPION-MSCs enhance therapeutic efficacy in sepsis by regulating MSC-expressed TRAF1-dependent macrophage polarization. *Stem Cell Res Ther*. 2021 Oct 9;12(1):531.
17. Jiwon Oh et al., Mesenchymal stem cells genetically engineered to express platelet-derived growth factor and heme oxygenase-1 ameliorate osteoarthritis in a canine model, *J Orthop Surg Res*. 2021 styczeń 11; 16(1):43.
18. Dimitrios Mouggiakakos et al., The impact of inflammatory licensing on heme oxygenase-1-mediated induction of regulatory T cells by human mesenchymal stem cells, *Blood*. 2011 maj 5; 117(18):4826–35.
19. Josse, J & Husson, F. (2013). Handling missing values in exploratory multivariate data analysis methods. *Journal de la SFdS*. 153 (2), pp. 79–99.
20. Miron B. Kursa, Witold R. Rudnicki (2010). Feature Selection with the Boruta Package. *Journal of Statistical Software*, 36(11), p. 1–13.
21. Biecek P (2018). "DALEX: Explainers for Complex Predictive Models in R." *Journal of Machine Learning Research*, 19(84), 1–5.
22. Datta, Susmita, et al. "An adaptive optimal ensemble classifier via bagging and rank aggregation with applications to high dimensional data." *BMC Bioinformatics*, vol. 11, 18 Aug. 2010, p. 427.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób klasyfikacji komórek MSC ze względu na właściwości terapeutyczne, **znamienny tym**, że obejmuje następujące etapy:
 - a. pomiar poziomu obecności oksygenazy hemu, poziomu ekspresji POU5F1, zmiany udziału limfocytów Th pod wpływem komórek MSC; zmiany udziału limfocytów Th pozytywnych na CD69 pod wpływem komórek MSC oraz zmiany udziału limfocytów Th naiwnych pod wpływem komórek MSC, przy czym zmianę udziału limfocytów Th pod wpływem komórek MSC, zmianę udziału limfocytów Th pozytywnych na CD69 pod wpływem komórek MSC oraz zmianę udziału limfocytów Th naiwnych pod wpływem komórek MSC oznacza się po kohodowli komórek MSC z komórkami jednojądrzastymi w porównaniu do kontroli stanowiącej komórkę jednojądrzastą, które hodowano w identycznych warunkach, ale bez kontaktu z komórkami MSC,
 - b. klasyfikacja komórek MSC jako należących do jednego z co najmniej trzech klastrów terapeutycznych: klastra terapeutycznego proregeneracyjnego o potencjale regeneracyjnym i potencjale do różnicowania albo klastra terapeutycznego nadaktywnego, który nie wykazuje efektu terapeutycznego albo klastra terapeutycznego antystresowego o potencjale do redukcji stresu oksydacyjnego na podstawie wyników pomiarów z etapu a.
2. Sposób według zastrzeżenia 1, **znamienny tym**, że w etapie b
 - jeśli poziom komórek MSC wykazujących obecność oksygenazy hemu wynosi od 2% do 3,9% i poziom ekspresji POU5F1 wynosi od 0,5 CF do 1,01 CF i zmiana udziału limfocytów Th pozytywnych na CD69 pod wpływem komórek MSC wynosi od -17,83% do -13% i zmiana udziału limfocytów Th naiwnych wynosi od -0,35% do -0,15% i zmiana udziału limfocytów Th pod wpływem komórek MSC wynosi od 0,05% do 0,23%, komórki MSC klasyfikuje się do klastra nadaktywnego,
 - jeśli poziom komórek MSC wykazujących obecność oksygenazy hemu wynosi od 11,4% do 17% i poziom ekspresji POU5F1 wynosi od 0,55 CF do 0,7 CF i zmiana udziału limfocytów Th pozytywnych na CD69 pod wpływem komórek MSC wynosi od -27,33% do -1,59% i zmiana udziału limfocytów Th naiwnych wynosi od -0,22% do 0,16% i zmiana udziału limfocytów Th pod wpływem komórek MSC wynosi od 0,09% do 0,12%, komórki MSC klasyfikuje się do klastra anty stresowego,
 - jeśli poziom komórek MSC wykazujących obecność oksygenazy hemu wynosi od 3,4% do 10,1% i poziom ekspresji POU5F1 wynosi od 0,84 CF do 1,4 CF i zmiana udziału limfocytów Th pozytywnych na CD69 pod wpływem komórek MSC wynosi od -10,6% do 0,59% i zmiana udziału limfocytów Th naiwnych wynosi od 0,08% do 0,31% i zmiana udziału limfocytów Th pod wpływem komórek MSC wynosi od -0,02% do 0,09%, komórki MSC klasyfikuje się do klastra proregeneracyjnego.
3. Sposób według zastrz. 1 albo 2, **znamienny tym**, że w etapie a zmianę udziału limfocytów Th pod wpływem komórek MSC, zmianę udziału limfocytów Th pozytywnych na CD69 pod wpływem komórek MSC oraz zmianę udziału limfocytów Th naiwnych pod wpływem komórek MSC oznacza się po kohodowli komórek MSC z komórkami jednojądrzastymi w stosunku ilościowym odpowiednio 1:10.
4. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że kohodowlę prowadzi się w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO₂.
5. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że kohodowlę prowadzi się przez 4 dni.
6. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że komórki MSC pochodzą z galarety Whartona albo ze szpiku kostnego albo z tkanki tłuszczowej, korzystnie z galarety Whartona.
7. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że etap b. jest wspierany komputerowo i obejmuje następujące etapy budowania klasyfikatora:
 - a1. wyznaczenie co najmniej trzech klastrów terapeutycznych: klastra terapeutycznego proregeneracyjnego o potencjale regeneracyjnym i potencjale do różnicowania albo klastra terapeutycznego nadaktywnego, który nie wykazuje efektu terapeutycznego albo klastra terapeutycznego antystresowego o potencjale do redukcji stresu oksydacyjnego, przy czym wyznaczenie obejmuje pomiar parametrów komórek MSC obejmujący:
 - i. test jednostek tworzących kolonie CFU

- ii. określenie potencjału teratogennego komórek MSC poprzez pomiar ekspresji markerów genetycznych CDKN2A, CLDN1, DNMT3B, ESM1, HAND2, HEY1, MYO3B, NANOG, PDGFRA, POU5F1, TDGF1, TWIST1, ZBTB16
 - iii. określenie fenotypu komórek MSC poprzez pomiar markerów genetycznych CD119, CD120b, CD274, CD273, CD200, CD72, CD39, HO
 - iv. analizę sekretomu komórek MSC poprzez pomiar wydzielania BDNF, HGF, IL6, IL8, MCP1, RANTES, TGFb1, TGFb2
 - v. określenie immunomodulacji komórek MSC poprzez kohodowlę komórek MSC z komórkami jednojądrzastymi, przy czym kohodowlę prowadzi się korzystnie w stosunku ilościowym odpowiednio 1:10, w temperaturze 37°C oraz atmosferze 5% CO₂ przez 4 dni, przy czym po kohodowli określa się liczbę komórek jednojądrzastych, ich żywotność oraz zmianę udziału % limfocytów T, limfocytów B, NK, NKT, Th, Tc, Th naiwnych, Th pamięci, Tc naiwnych, Tc pamięci, Th CD69+, Th CD25+CD69+, Th CD25+, Th nieaktywowanych, Tc CD69+, Tc CD25+CD69+, Tc CD25+, Tc nieaktywowanych, Th1, Th2, Th17, cytokin wewnętrznych dla: Th1, Th2 i Th17, oraz T regulatorowych komórek jednojądrzastych
 - vi. podział komórek MSC na co najmniej trzy klastry terapeutyczne: nadaktywny, anty stresowy i proregeneracyjny na podstawie wyników z etapów i.-v.,
- b1. budowanie klasyfikatora, które obejmuje:
- i. redukcję ilości parametrów do co najmniej 5 parametrów poprzez identyfikację istotnych parametrów na podstawie współczynników błędu klasyfikacji lub na podstawie miary istotności zmiennych opartej na funkcji straty,
 - ii. przeprowadzenie korelacji parametrów z etapów a1. i.-v. i eliminację parametrów, które są ze sobą skorelowane
 - iii. określenie prawdopodobieństwa przynależności do określonego klastra na podstawie porównania wyników klasyfikacji z wykorzystaniem parametrów wybranych w etapie b1. i. z przynależnością do wyznaczonego klastra w etapie a1. vi.
- oraz etapy klasyfikacji komórek MSC, obejmujące:
- c1. zapewnienie komórek MSC,
- d1. pomiar wybranych istotnych parametrów wyznaczonych w etapie b1. i. komórek MSC z etapu c1.,
- e 1. klasyfikację komórek MSC za pomocą klasyfikatora wyznaczonego w etapie b1. jako należących do jednego z klastrów terapeutycznych na podstawie wyników pomiarów z etapu d1.,
- przy czym etapy a1. i b1. są wykonywane jednorazowo dla danej populacji komórek MSC, etap a1. vi., b1., e1. wykonywane są za pomocą obliczeń w systemie komputerowym, do którego przekazywane są dane z pomiarów w etapie a1. i.-v. lub d1.
8. Sposób według zastrz. 7 **znamienny tym**, że w etapie b1. i. wybierane są tylko te parametry, które zostały wskazane jako istotne.
 9. Sposób według zastrz. 7 **znamienny tym**, że w etapie a1. vi. podziału na klastry dokonuje się z zastosowaniem hierarchicznej analizy skupień.
 10. Sposób według zastrz. 7 **znamienny tym**, że w etapie b1. i. identyfikacji dokonuje się z zastosowaniem algorytmu Boruta z klasyfikatorem lasów losowych.

Rysunki

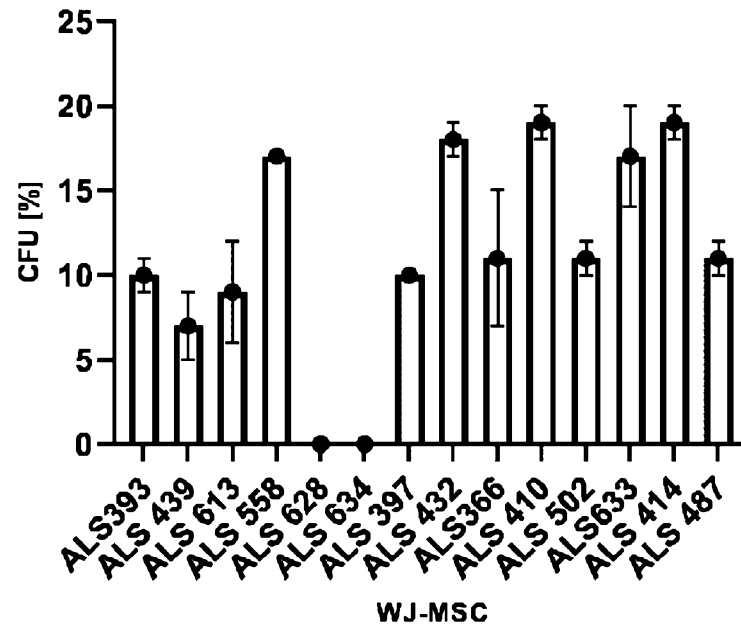


Fig.1

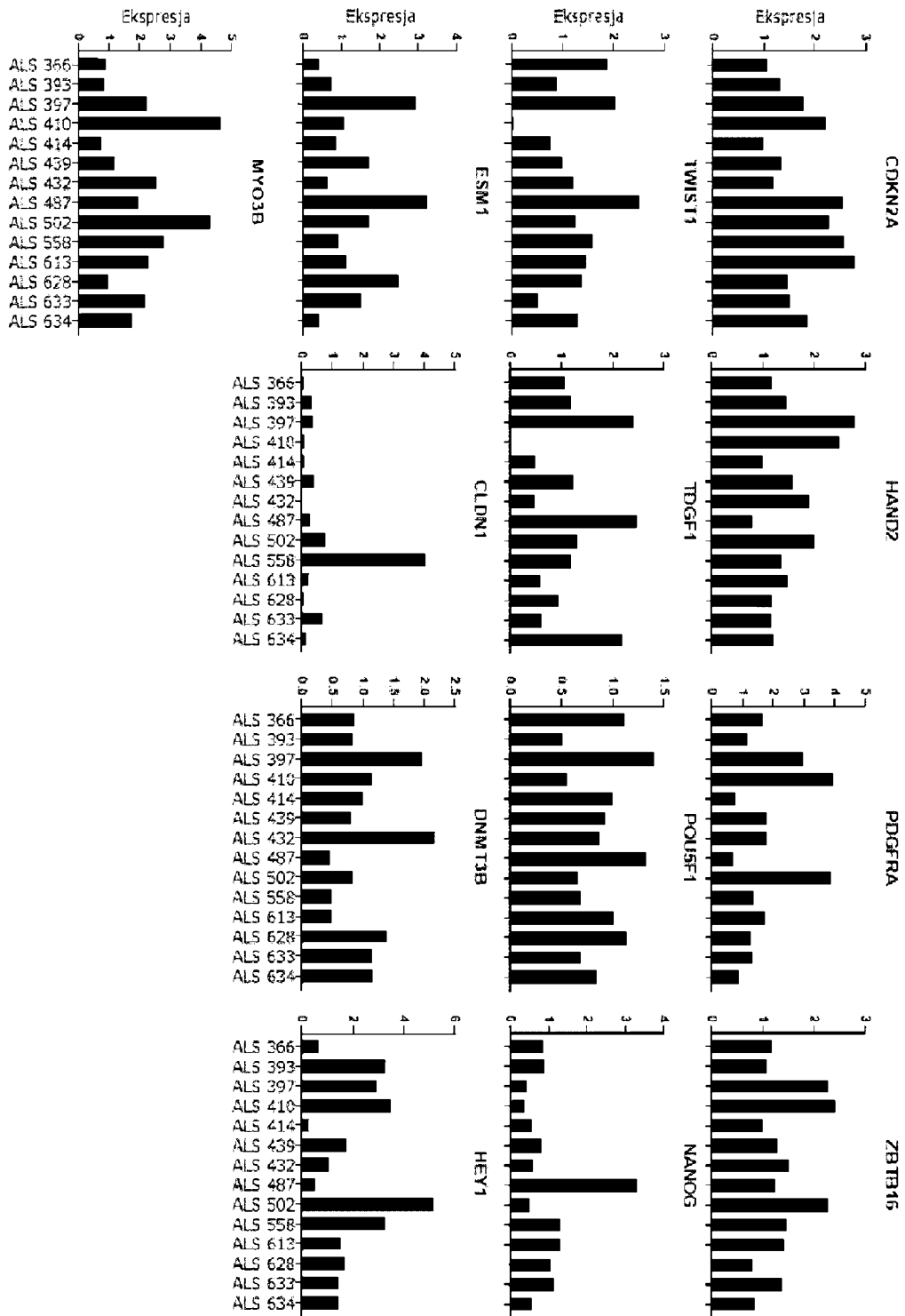


Fig. 2

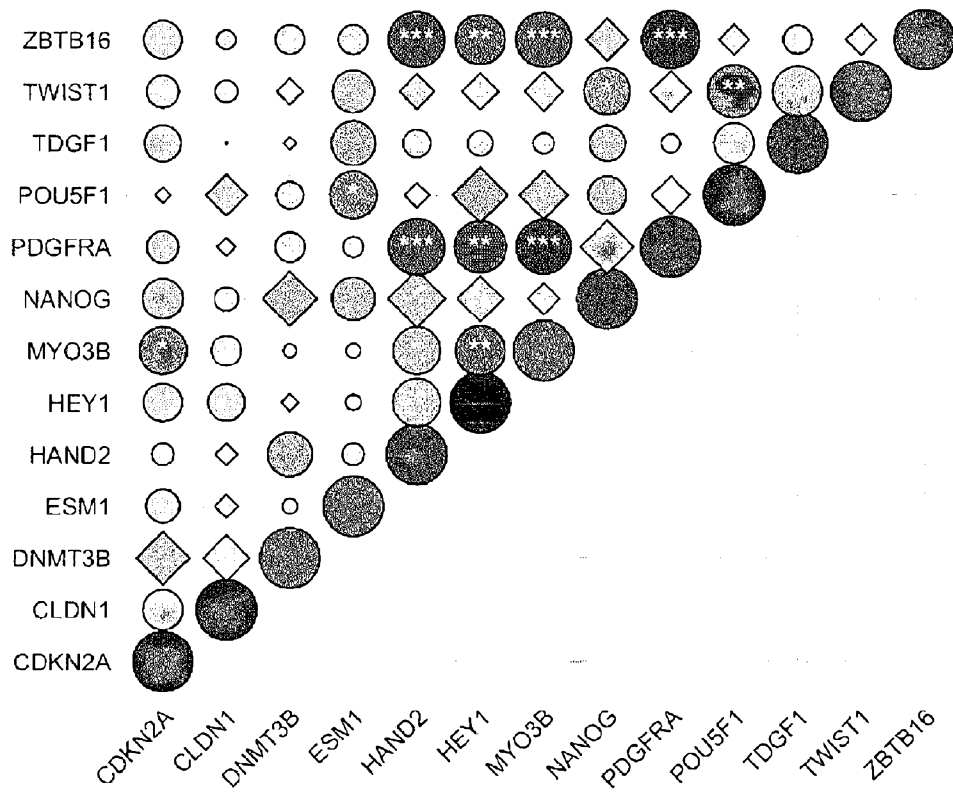


Fig. 3

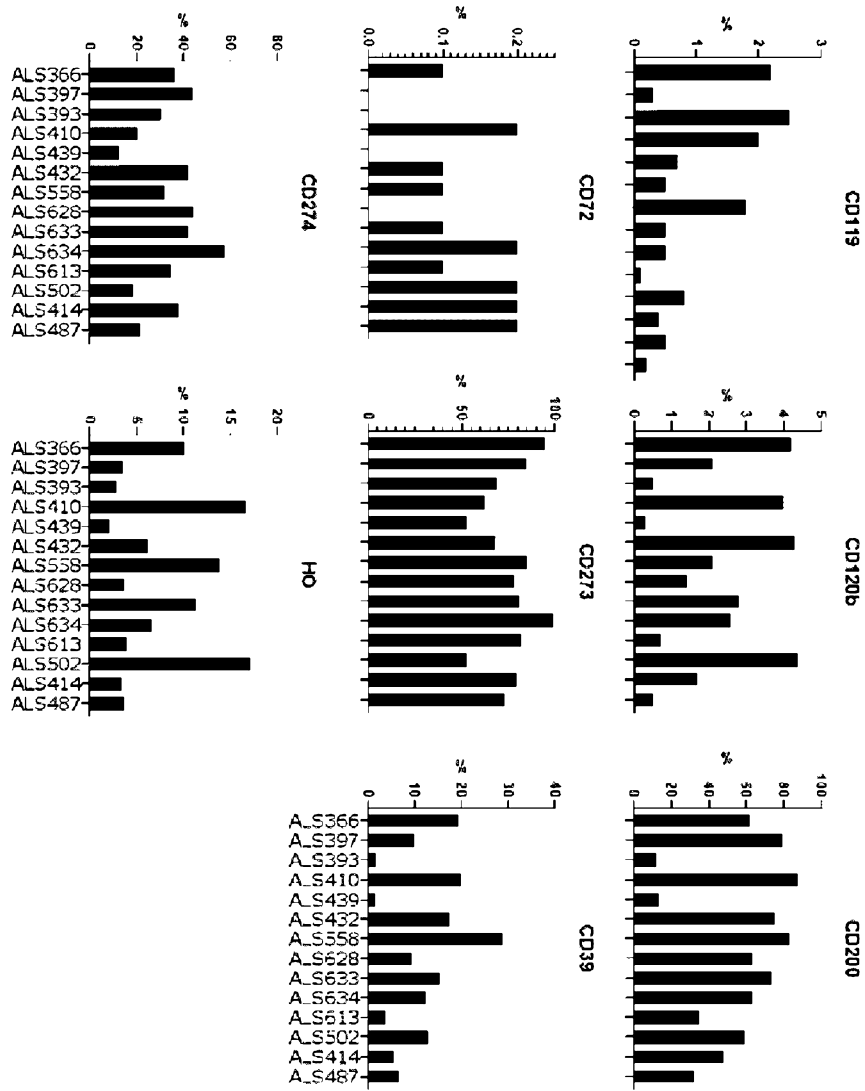


Fig. 4

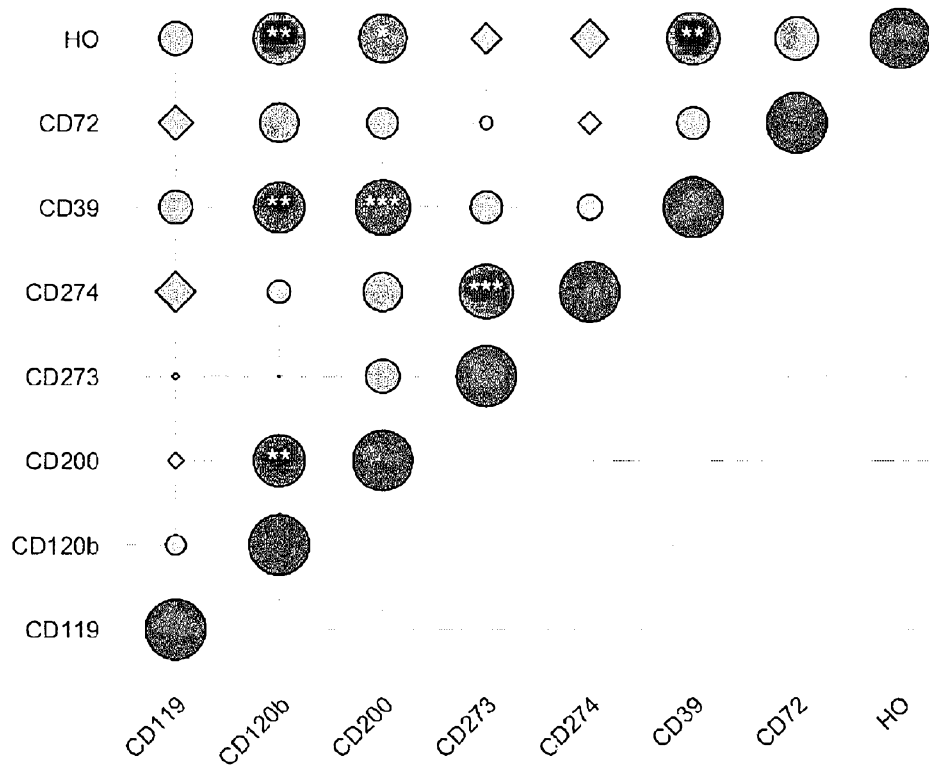


Fig. 5

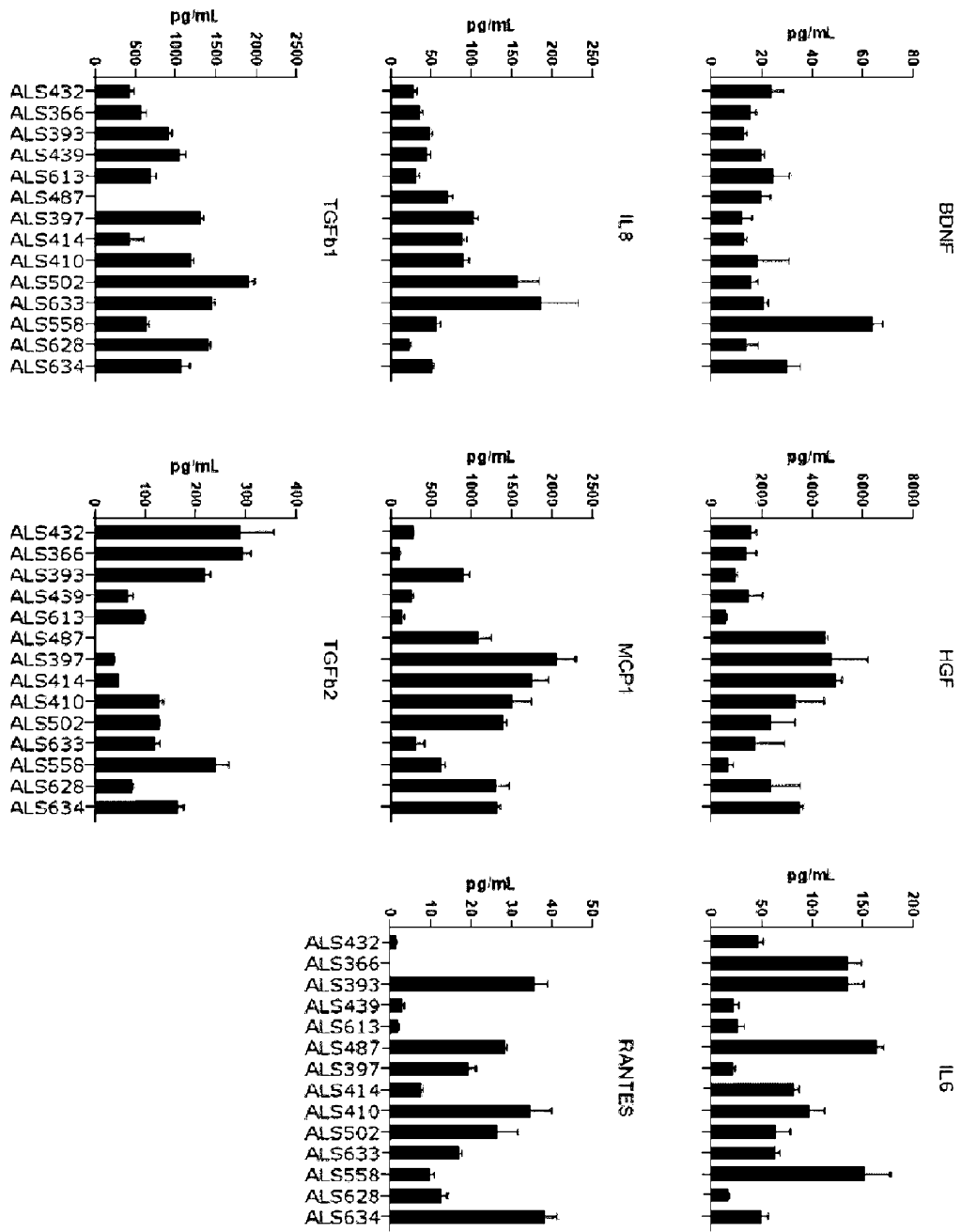


Fig. 6

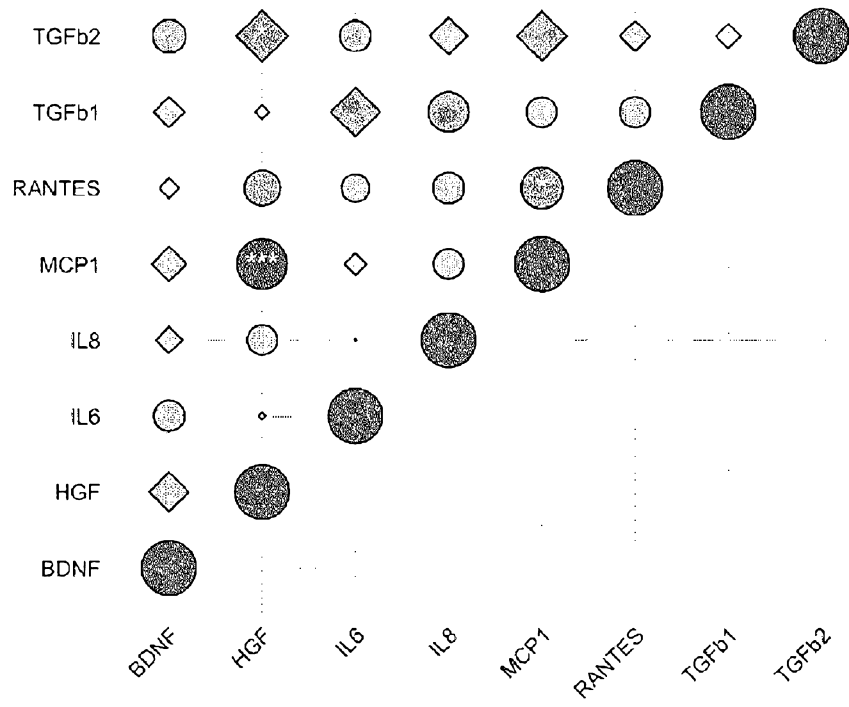


Fig. 7

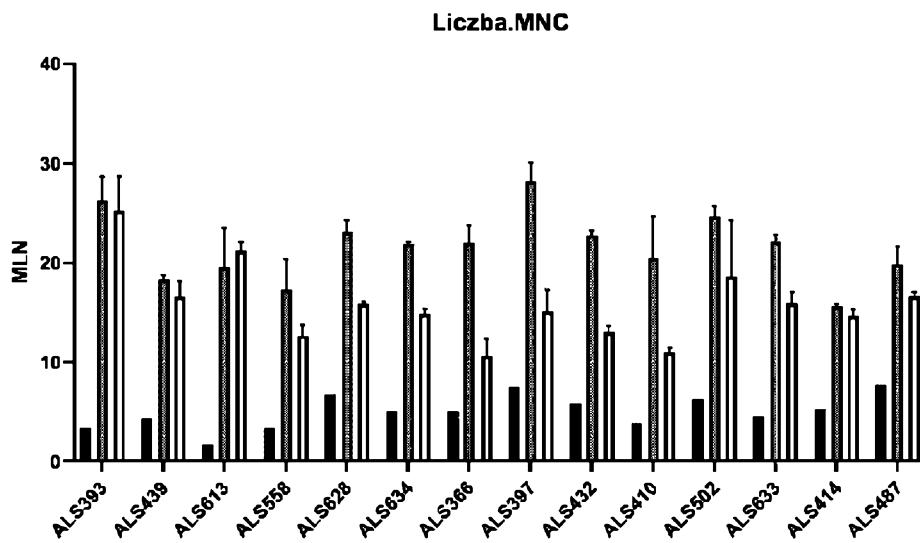


Fig. 8A

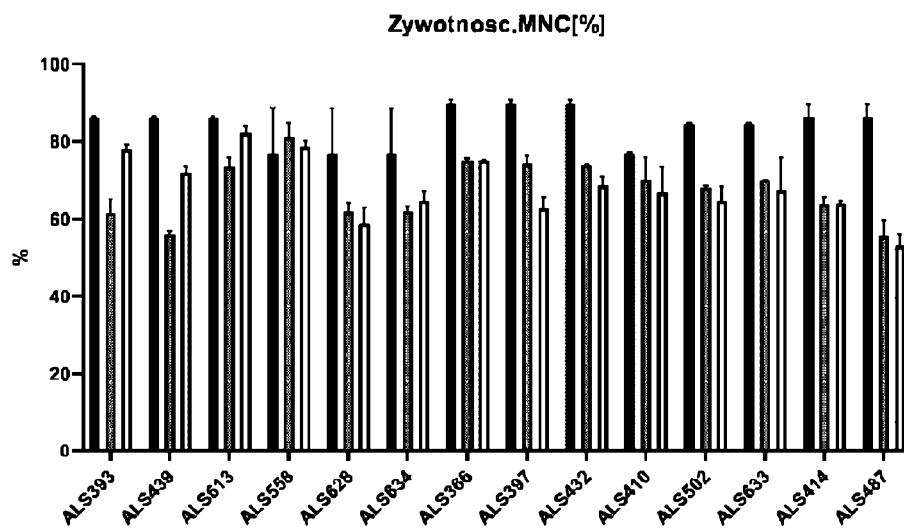


Fig. 8B

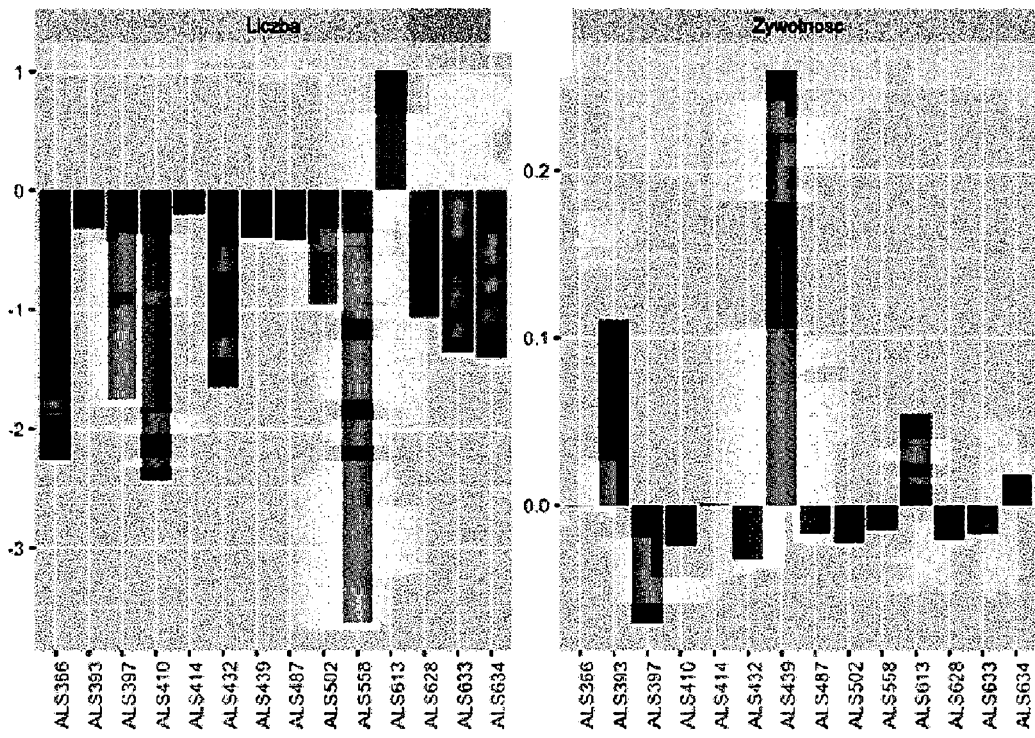


Fig. 9

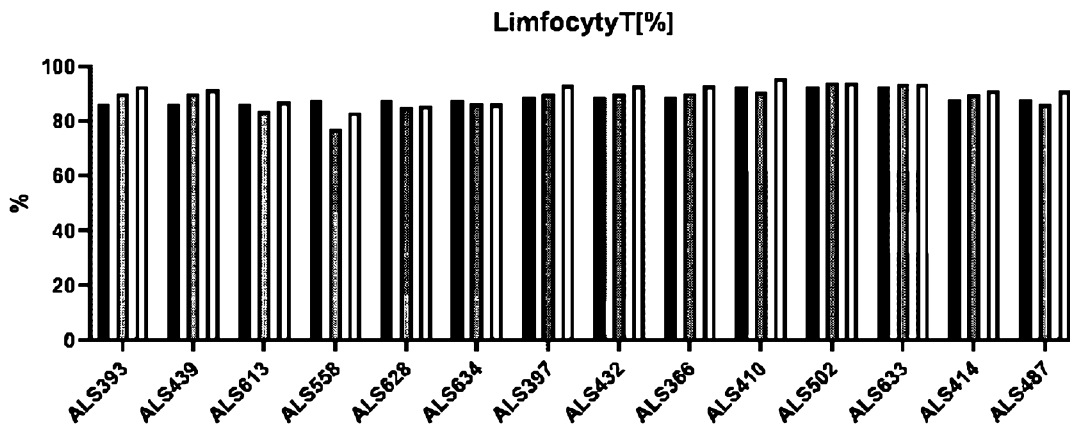


Fig. 10 A

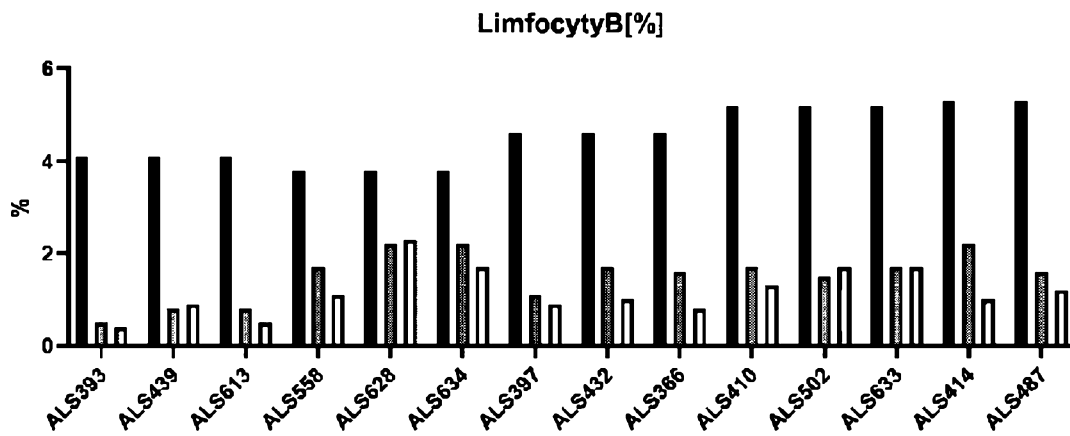


Fig. 10 B

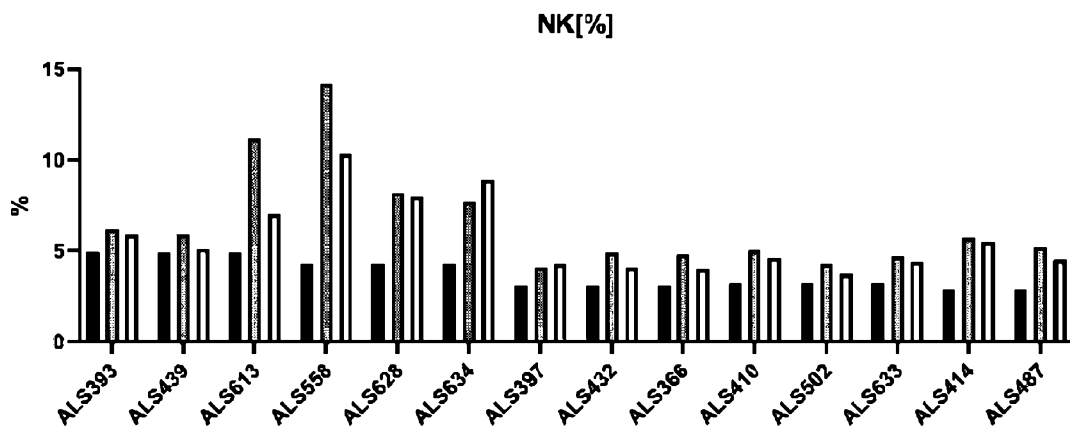


Fig. 10 C

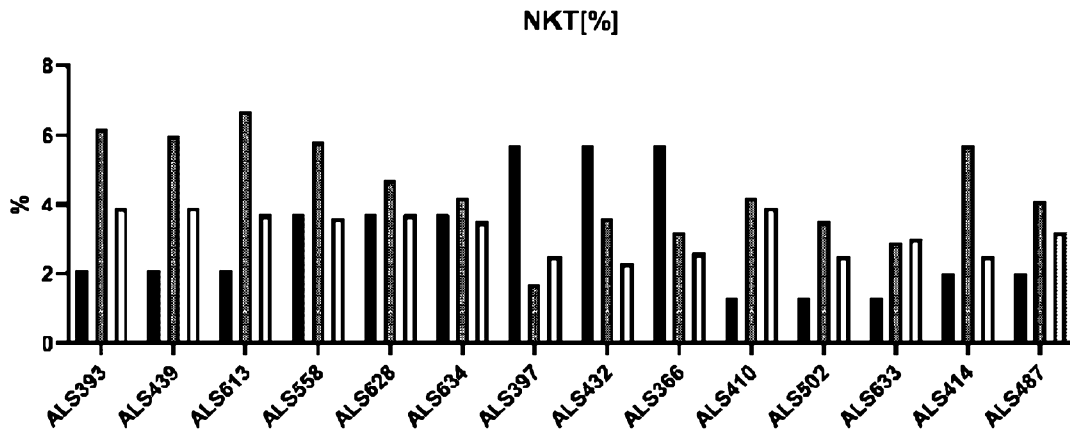


Fig. 10 D

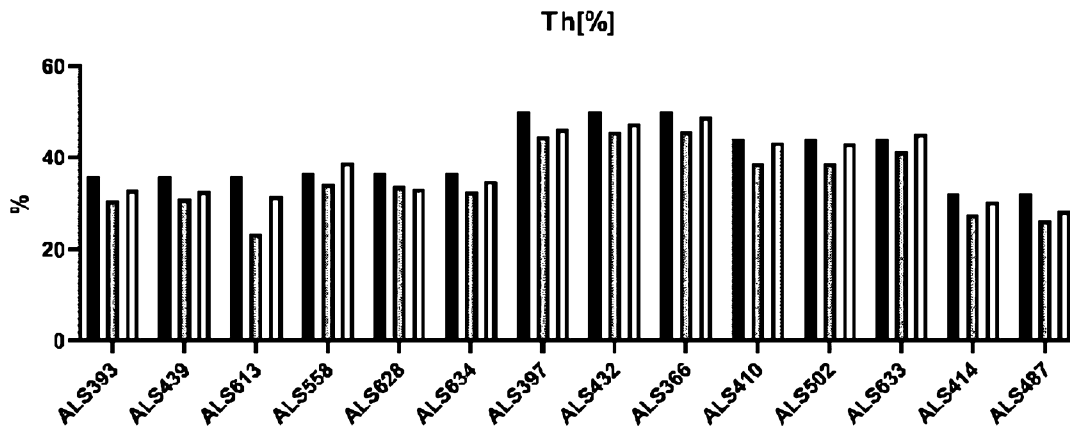


Fig. 11 A

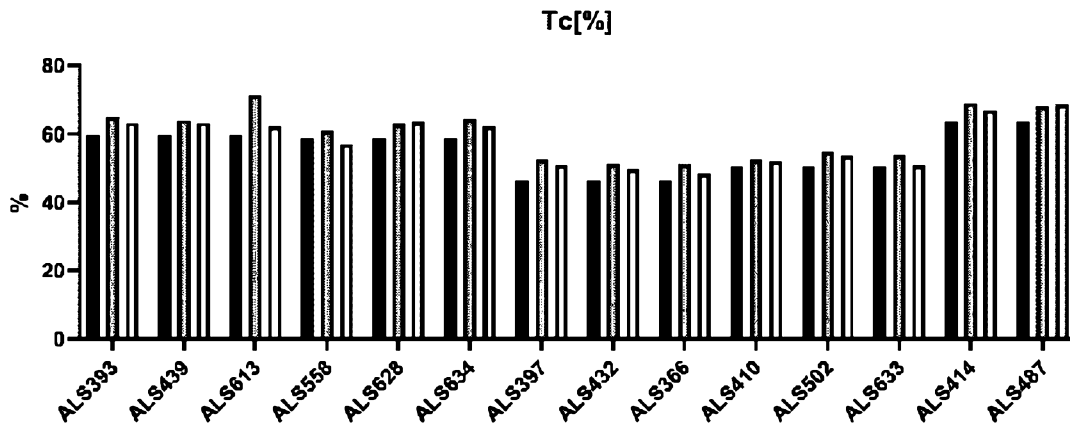


Fig. 11 B

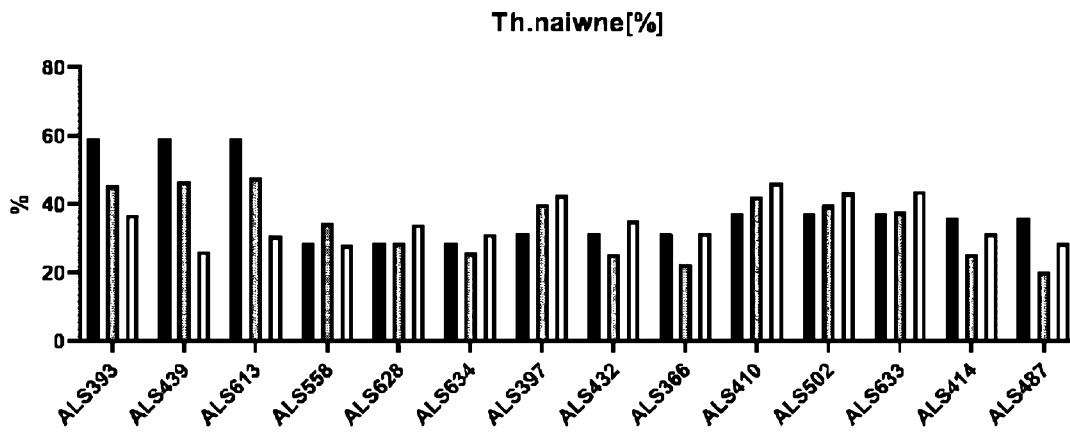


Fig. 11 C

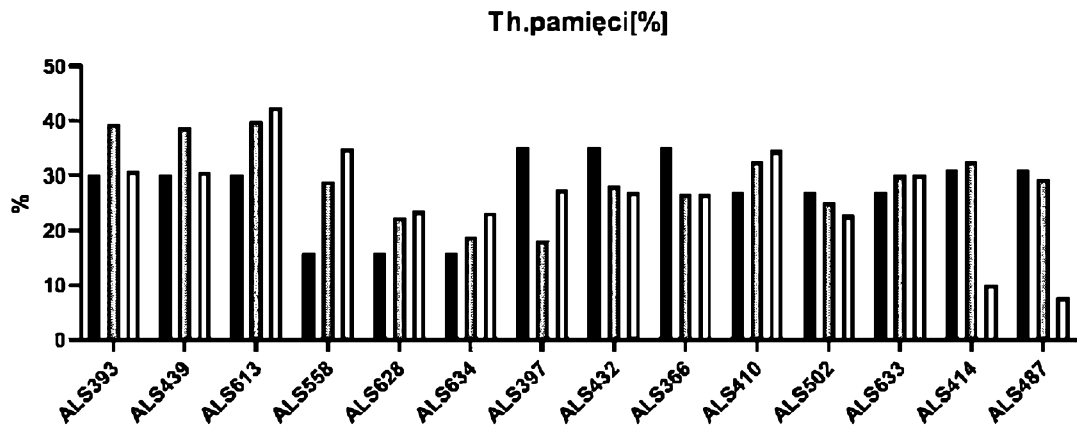


Fig. 11 D

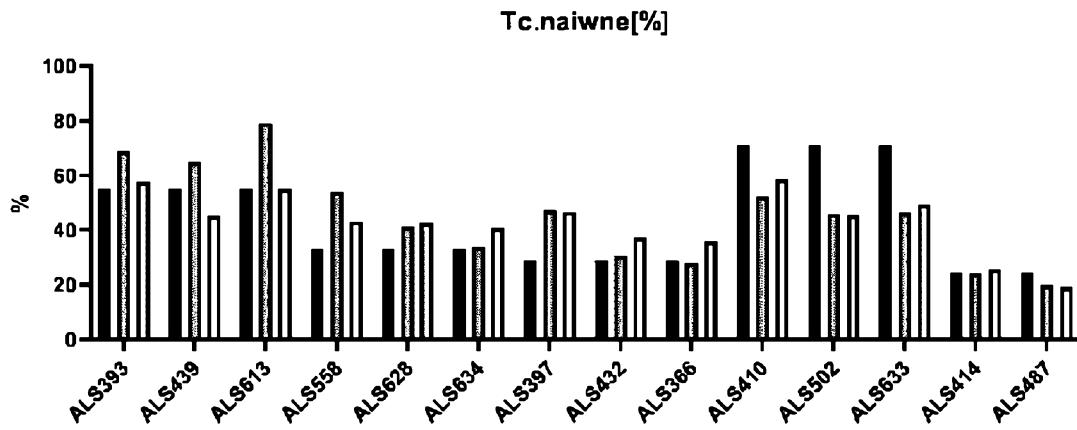


Fig. 11 E

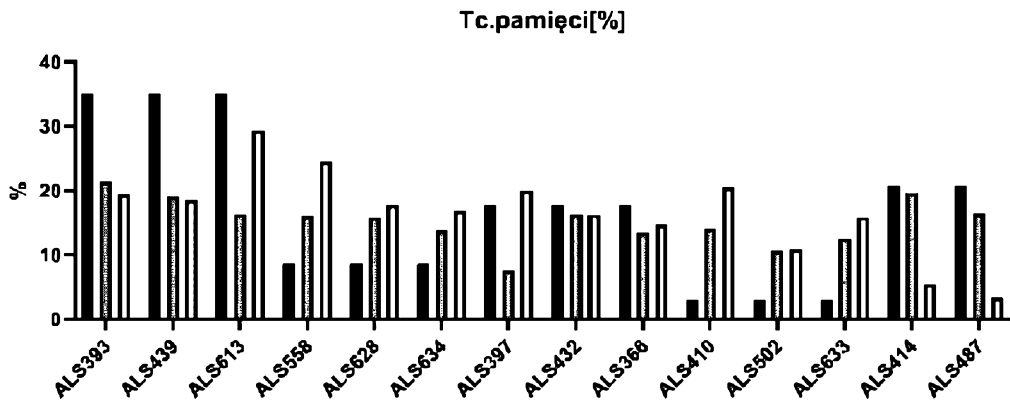


Fig. 11 F

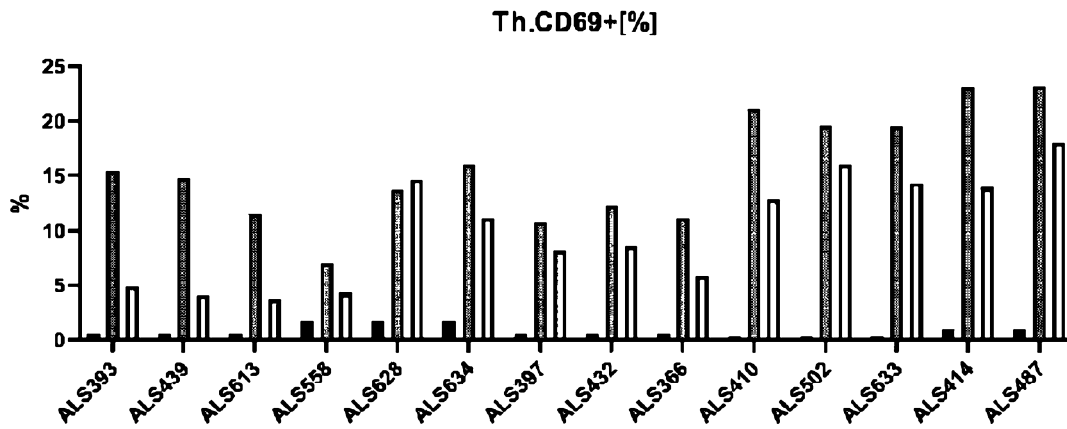


Fig. 12 A

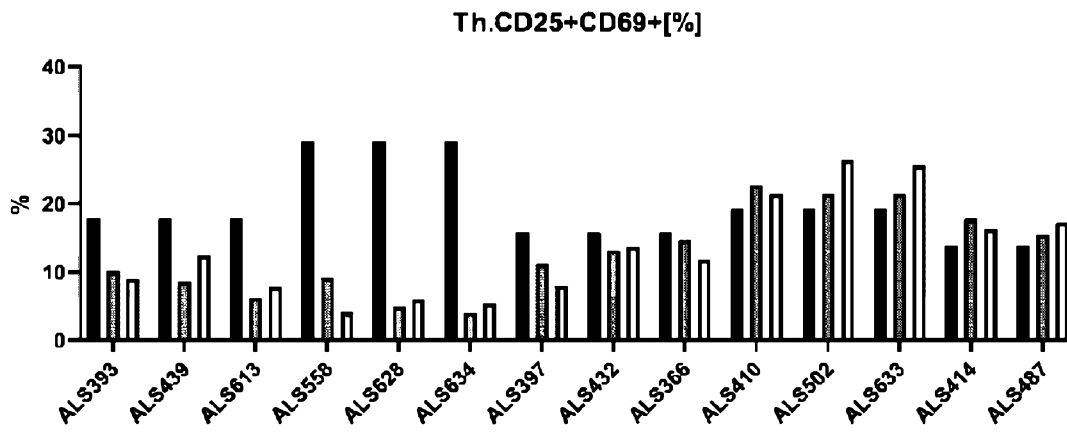


Fig. 12 B

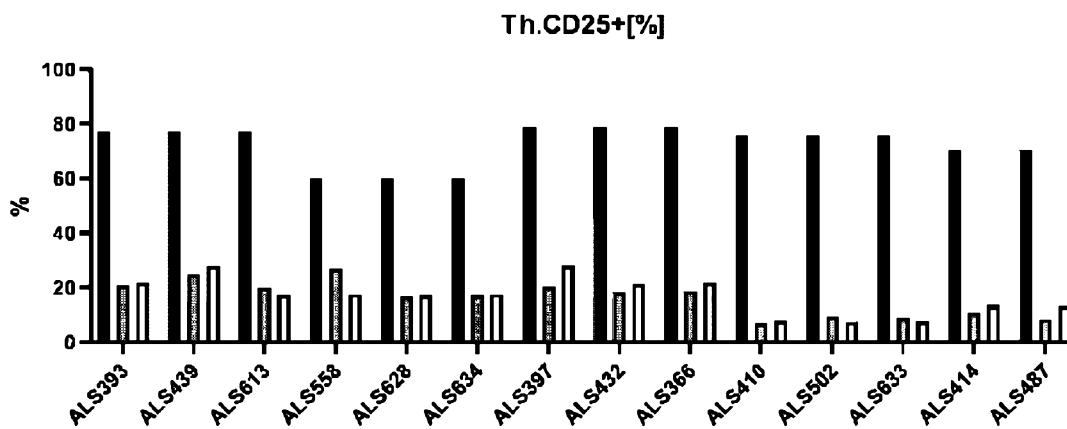


Fig. 12 C

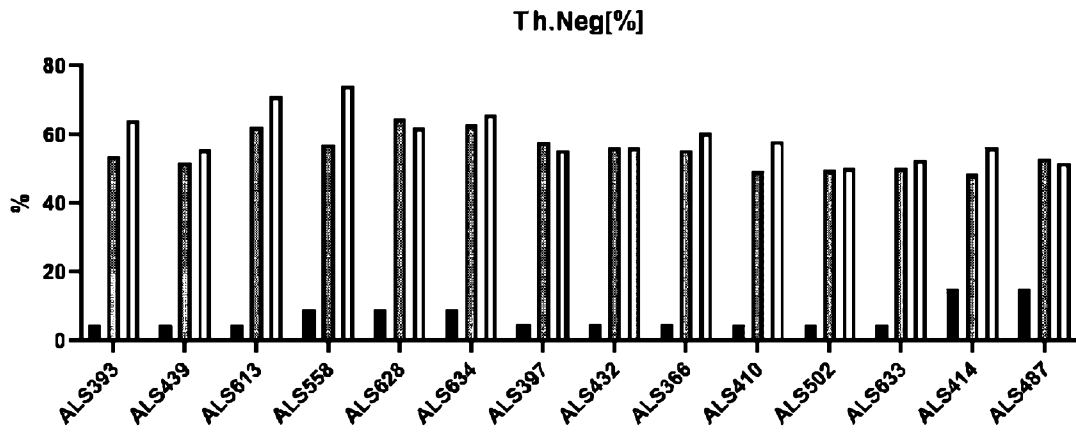


Fig. 12 D

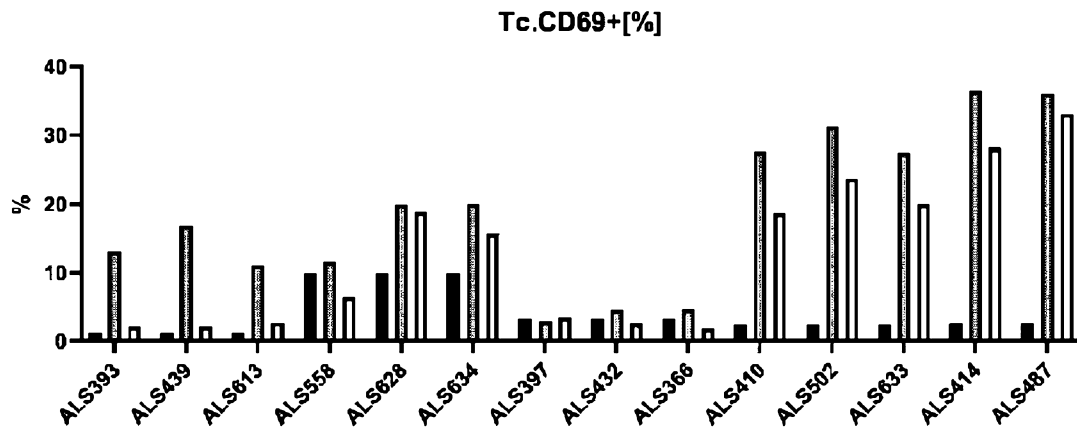


Fig. 13 A

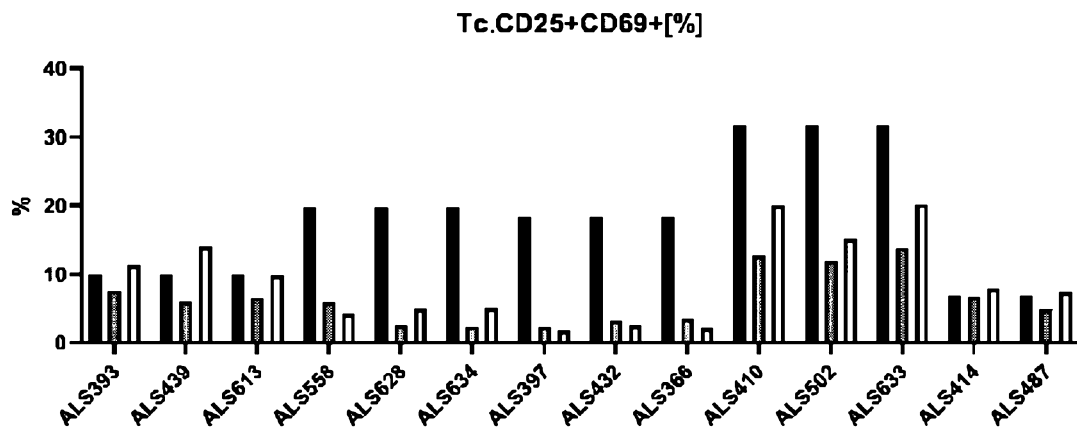


Fig. 13 B

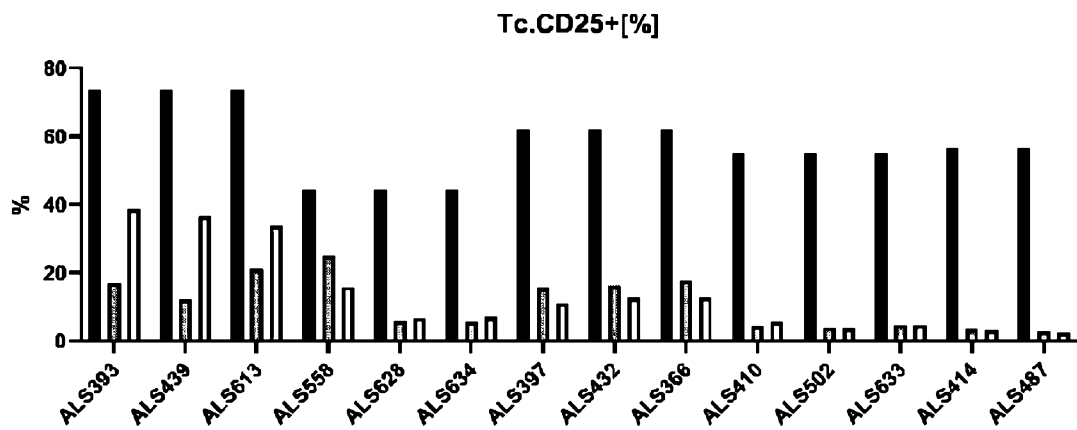


Fig. 13 C

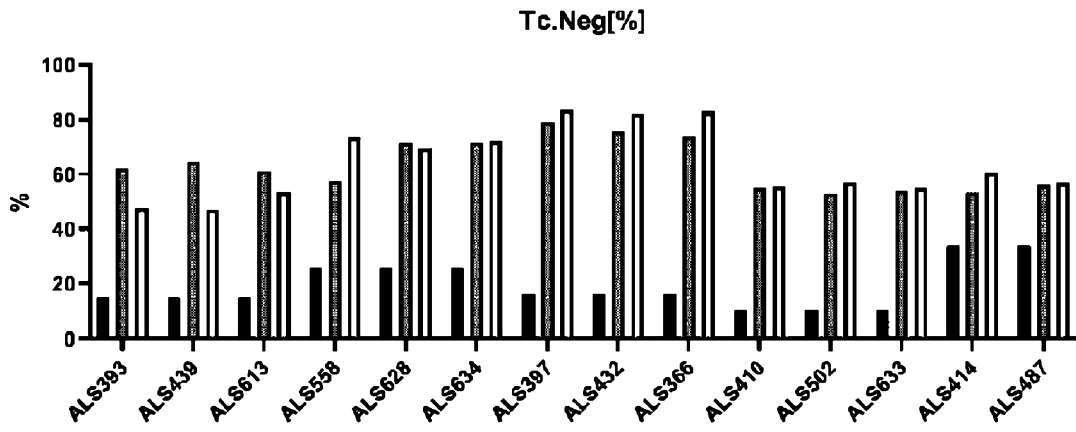


Fig. 13 D

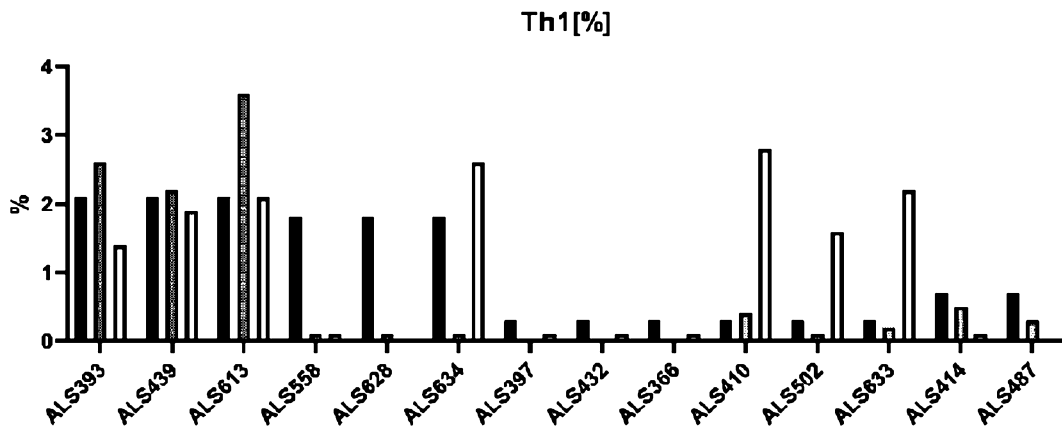


Fig. 14 A

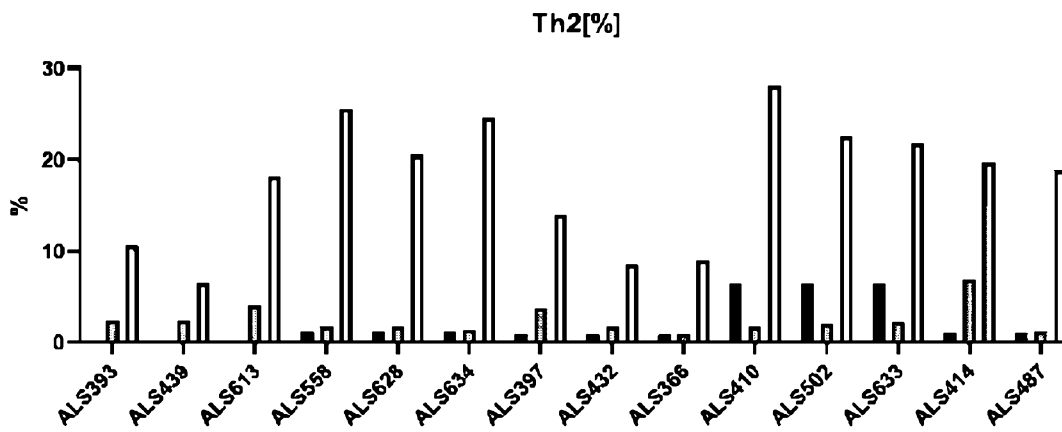


Fig. 14 B

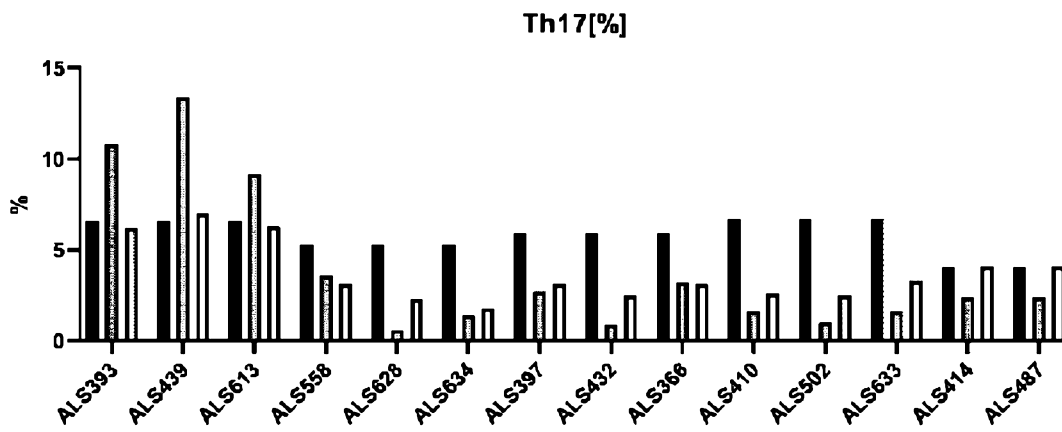


Fig. 14 C

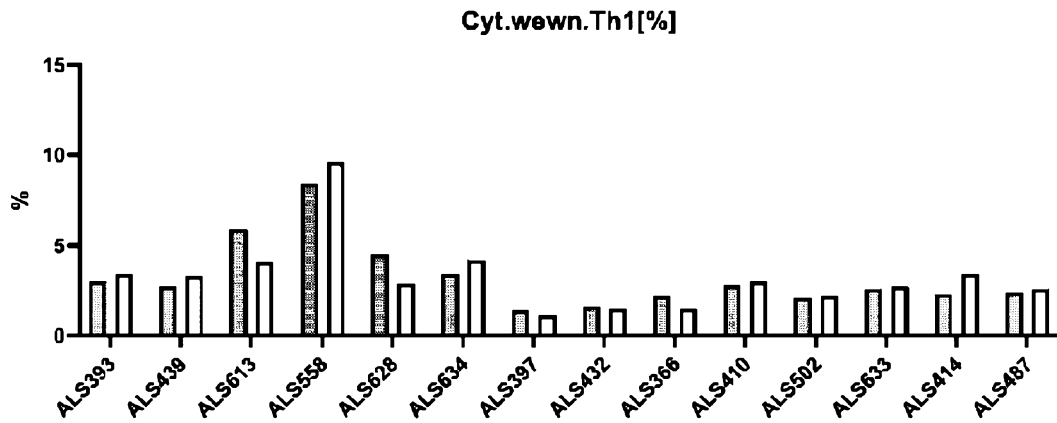


Fig. 14 D

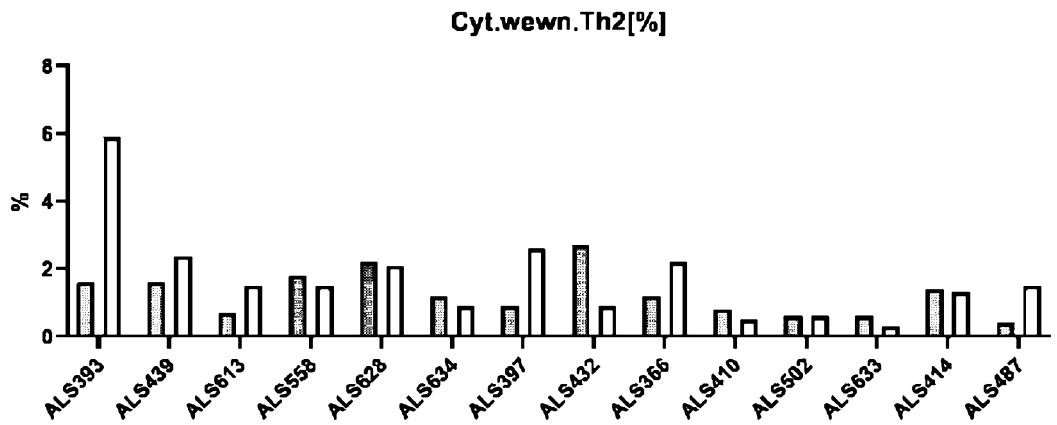


Fig. 14 E

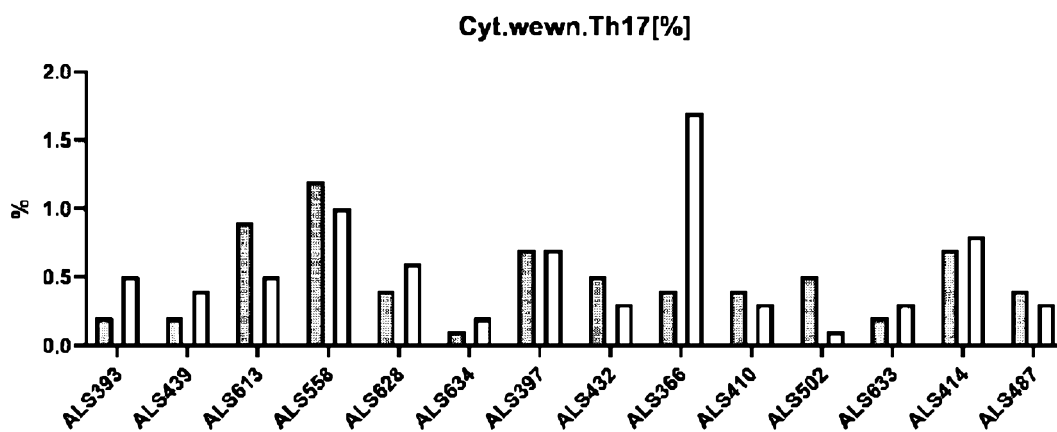


Fig. 14 F

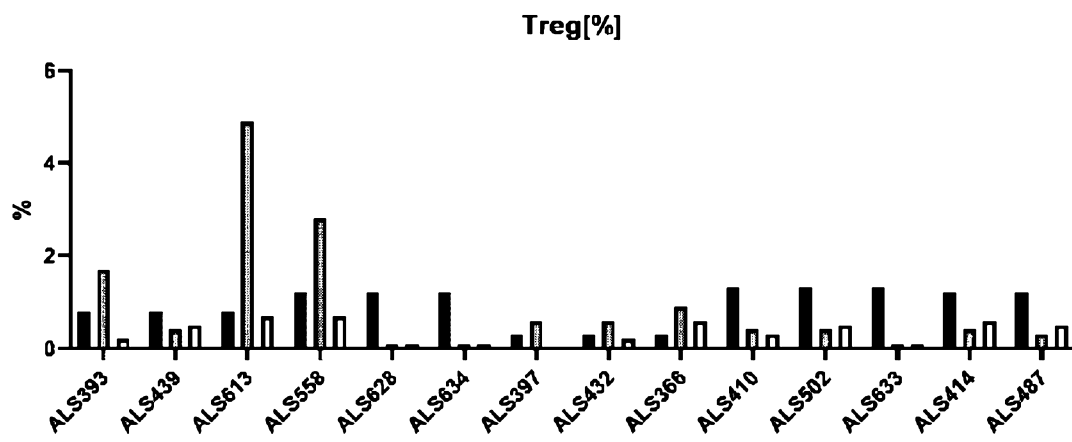


Fig. 14 G

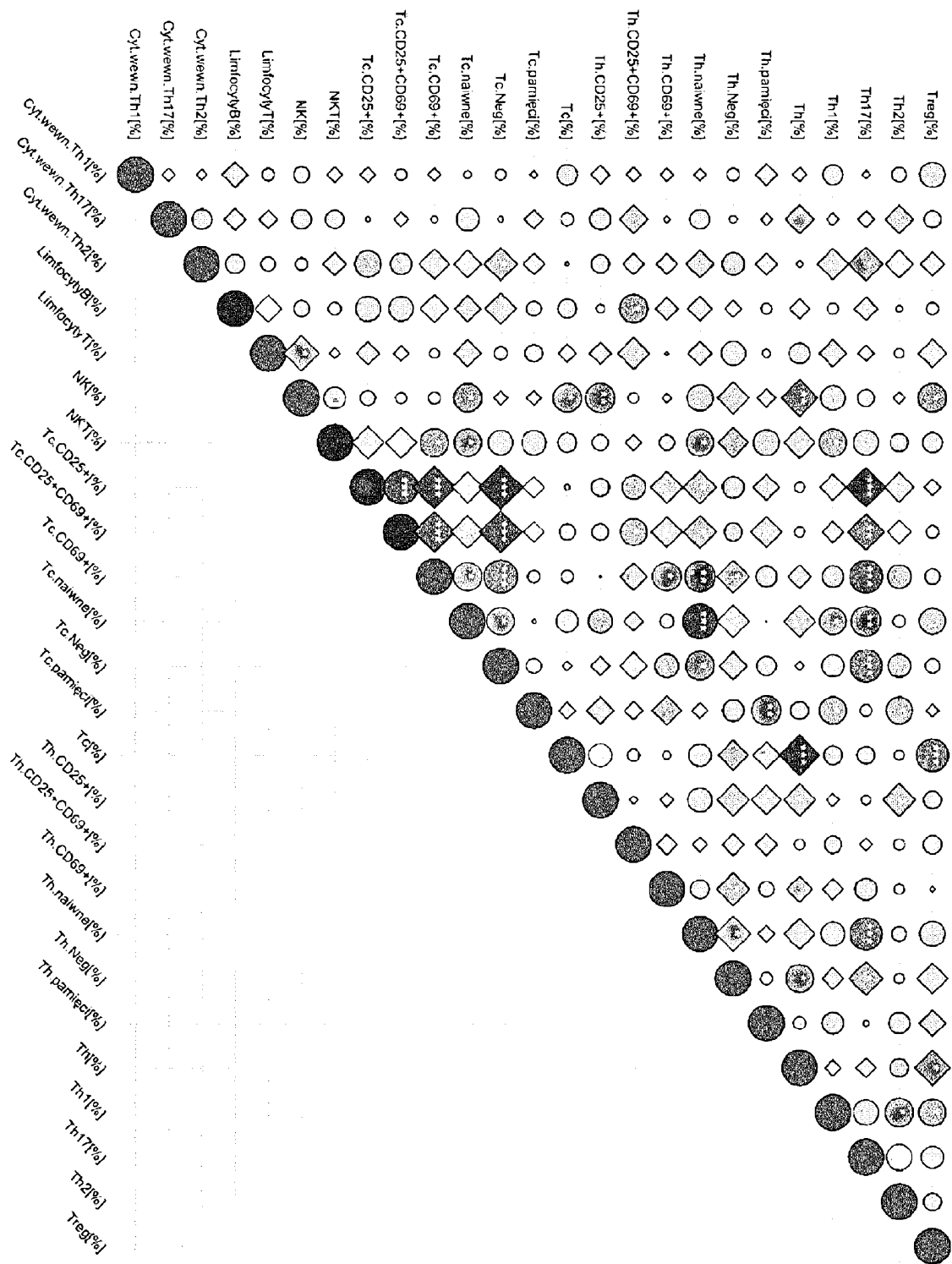


Fig. 16

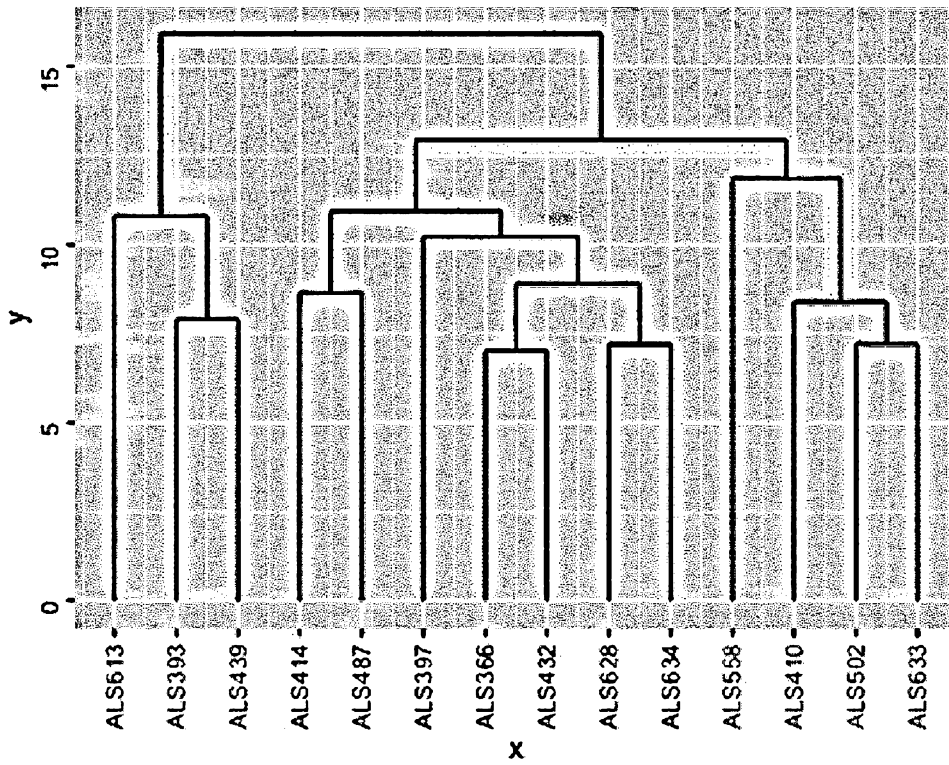


Fig. 17

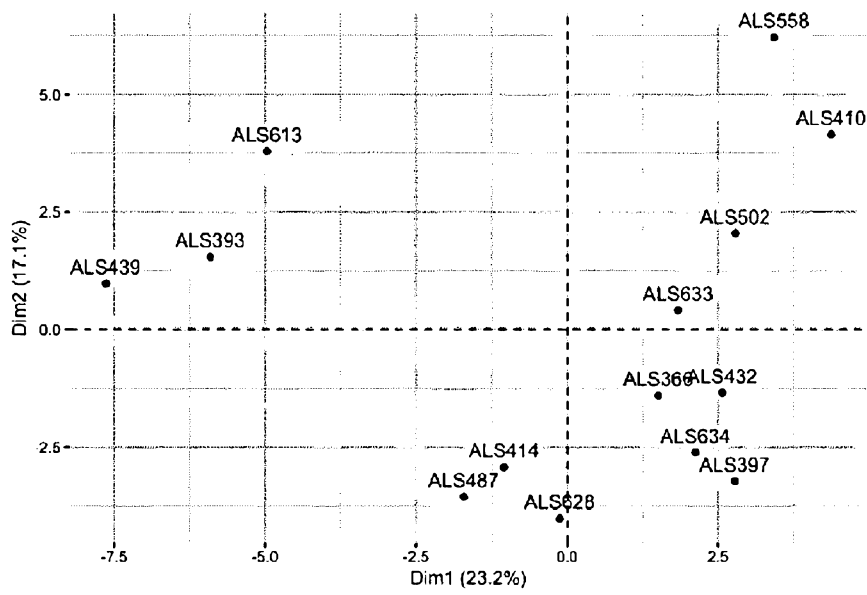


Fig. 18