

[文章编号] 1007-7669(2024)07-0481-08

[DOI号] 10.14109/j.cnki.xyylc.2024.07.01

## 肌萎缩侧索硬化细胞治疗研发现状和研发策略及评价标准关键要素的考量

李嘉桐<sup>1a,2</sup>, 孙搏<sup>3</sup>, 曹钰然<sup>1b</sup>, 王亚宁<sup>4</sup>, 马璟<sup>5</sup>, 张菁<sup>1b</sup>, 陈向军<sup>1a,2</sup>

(1. 复旦大学附属华山医院 a. 神经内科/复旦大学神经病学研究所, b. 临床药理研究中心, 上海 200040; 2. 国家神经疾病医学中心, 上海 200040; 3. 上海药品审评核查中心, 上海 201210; 4. 朗来科技发展有限公司, 上海 201700; 5. 上海泰楚生物技术有限公司, 上海 201413)

[关键词] 神经变性疾病; 肌萎缩侧索硬化; 细胞疗法

[摘要] 肌萎缩侧索硬化 (ALS) 是一种以上、下运动神经元退行性变为特征的神经系统罕见病, 临床表现为进行性发展的肌肉无力、萎缩, 最终导致死亡, 给患者家庭及社会带来沉重的负担。因 ALS 发病机制不明, 目前现有 ALS 治疗药物均无法显著延长生存期或改变生存结局。近年来, 多种不同种类干细胞的细胞治疗已被开发用于 ALS 的治疗, 并处于临床前研究和临床试验阶段。本文通过概述细胞治疗在 ALS 中的应用情况, 并详细介绍代表性细胞治疗 NurOwn 在 ALS 中的研究和发展历程, 分析了目前 ALS 细胞治疗取得的成果和存在的问题, 建议在未来 ALS 细胞治疗的相关研究中进一步优化细胞类型选择和疗效评价指标, 以指导 ALS 细胞治疗研发和获批上市, 惠及患者及其家庭。

[中图分类号] R744.8

[文献标志码] A

## Current status, research strategies, and evaluation criteria of cell therapy for amyotrophic lateral sclerosis: considerations of key elements

LI Jia-tong<sup>1a,2</sup>, SUN Bo<sup>3</sup>, CAO Yu-ran<sup>1b</sup>, WANG Ya-ning<sup>4</sup>, MA Jing<sup>5</sup>, ZHANG Jing<sup>1b</sup>, CHEN Xiang-jun<sup>1a,2</sup>

(1. a. Department of Neurology/Institute of Neurology, b. Clinical Pharmacology Research Center, Huashan Hospital, Fudan University, SHANGHAI 200040, China; 2. National Center for Neurological Disorders, SHANGHAI 200040, China; 3. Shanghai Center for Drug Evaluation and Inspection, SHANGHAI 201210, China; 4. Createrna Science and Technology Co. Ltd., SHANGHAI 201700, China; 5. Shanghai Taichu Biotechnology Co. Ltd., SHANGHAI 201413, China)

[KEY WORDS] neurodegenerative diseases; amyotrophic lateral sclerosis; cell therapy

[ABSTRACT] Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a rare neurodegenerative disease characterized by the degeneration of upper and lower motor neurons. Clinically, it manifests as progressive muscle weakness and atrophy, ultimately leading to death, imposing a significant burden on patients' families and society. The pathogenesis of ALS remains unclear. Currently, several ALS treatment drugs have failed to significantly extend survival or alter the outcome. In recent years, cell therapy has been increasingly applied to refractory or incurable diseases. Various types of stem cell therapies have been developed for ALS treatment, undergoing preclinical research and clinical trials. This article provides an overview of the application of

[收稿日期] 2024-02-08 [接受日期] 2024-05-30

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (82371431); 2020 年医疗服务与保障能力提升 (医疗卫生机构能力建设) 项目; 国家和省级重大疾病多学科合作诊疗能力建设项目

[作者简介] 李嘉桐, 女, 医师, 博士, 主要从事肌萎缩侧索硬化发病机制和治疗的研究, E-mail: 15301050256@fudan.edu.cn

[责任作者] 陈向军, E-mail: xiangjchen@fudan.edu.cn

cell therapy in ALS, with a detailed examination of the research and development history of the representative cell therapy NurOwn in ALS. And the achievements and challenges of current ALS cell therapy, suggesting the optimization of cell type selection and efficacy evaluation metrics in future ALS cell therapy research were further discussed. This optimization aims to guide the development, approval, and market entry of ALS cell therapies, benefiting patients and their families.

肌萎缩侧索硬化 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 是一种以上、下运动神经元损害为标志的神经系统退行性疾病, 临床上表现为进行性加重的全身骨骼肌无力、萎缩、痉挛, 最终大多数患者于起病后的 3~5 年内死于呼吸衰竭或肺部感染<sup>[1]</sup>。在世界卫生组织罗列的五大“绝症”中, ALS 与癌症及获得性免疫缺陷综合征齐名。ALS 已于 2018 年被纳入国家卫生健康委等五部门公布的《第一批罕见病目录》中。ALS 呈全球性分布, 发病年龄多集中于 40~60 岁, 平均发病年龄为 55 岁, 男女比例约为 1.5:1<sup>[1]</sup>。ALS 在不同国家和地区的发病率有所不同, 全世界范围内的发病率约为 (1~4)/10 万人<sup>[2]</sup>; 根据中国目前的流行病学数据, ALS 在中国的发病率约为 1.5/10 万人, 患病率约为 (4~6)/10 万人, 按此比例推算, 中国有超过 10 万~20 万 ALS 患者, 这给患者家庭以及社会带来沉重的疾病负担<sup>[2,3]</sup>。

在 ALS 中, 90%~95% 为散发性, 5%~10% 为家族性, 较常见的突变基因包括 *SOD1*、*C9orf72* 和 *FUS* 等<sup>[1]</sup>。与大多数神经系统退行性疾病一样, ALS 的发病机制至今尚未阐明, 目前认为其发病受基因和环境因素的共同影响, 可能涉及 DNA 修复异常、RNA 代谢改变、蛋白质稳态破坏、神经兴奋性毒性、线粒体氧化应激、神经营养因子缺乏、病毒感染等多种因素<sup>[4]</sup>。由于发病机制未知, ALS 目前尚无可以显著逆转疾病进展或改变生存结局的有效治疗手段。现阶段治疗 ALS 最常用的两种药物为利鲁唑和依达拉奉, 分别于 1995 年和 2017 年被美国食品和药物管理局 (FDA) 批准, 并分别于 1999 年和 2019 年在中国大陆批准上市。利鲁唑的临床研究结果表明其只能短暂延长 ALS 患者生存期 (1~1.5 个月)<sup>[5]</sup>, 而依达拉奉的临床疗效在部分研究中并未得到肯定<sup>[6,7]</sup>。近年来, FDA 又陆续批准苯丁酸钠-牛磺酸二醇 (AMX0035) 和 tofersen (Qalsody) 用于 ALS 的治疗。然而, AMX0035 在有效性方面未获充分证据支持, 其 III 期临床试验仍在进行中, 将于 2024 年中公布结果<sup>[8]</sup>; tofersen 的上市申请首次以实验室指标神经丝轻链 (neurofilament light chain, NFL) 的变化作为参考标准, 且仅适用于 *SOD1* 基因突变所致 ALS<sup>[9]</sup>。目前这两种新药尚未在国内上市。随着全球人口数量的

持续增长及人口老龄化的加重, ALS 的治疗需求将越来越大, 亟需新的、更为有效的治疗方案。

近年来, 细胞治疗作为一种新的技术手段, 越来越多地被用于治疗难治性或不可治愈的疾病。目前, 多种不同种类干细胞治疗已被开发用于 ALS 的治疗, 并处于临床前和临床研究阶段<sup>[10]</sup>。本文概述细胞治疗在 ALS 中的应用情况, 并探讨细胞治疗在 ALS 中的发展现状、存在问题及未来的方向与出路。

### ALS 开发细胞治疗的必要性和可行性

1 ALS 开发细胞治疗的理论基础 干细胞由于具有自我更新和分化能力, 被广泛地应用于细胞治疗之中。来自胚胎的干细胞和来自成人体的细胞的诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs) 具有产生所有细胞类型的能力 (全能性), 而来自脐带血或成人部分身体组织的干细胞具有分化成特定细胞类型的能力 (多能性)。根据来源和分化能力, 多能干细胞有不同的分类。造血干细胞来源于脐带血和骨髓, 可以分化形成包括淋巴细胞和单核细胞在内的血细胞, 目前研究认为这些细胞可能与神经系细胞的分化存在一定关系<sup>[11]</sup>。例如, 有研究表明人脐带来源的造血干细胞可以在体外分化为神经干细胞, 后者可继续在适宜的条件下分化为星形胶质细胞<sup>[12]</sup>。间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 根据移植入环境的不同分化为不同类型的细胞, 可以从成体组织 (包括骨髓、脂肪组织、肌肉、皮肤、脾脏) 和废弃的胎儿组织 (如羊膜和脐带) 中获得。神经干细胞 (neural stem cells, NSCs) 存在于胚胎脑和成体脑的颗粒下区或脑室下区, 通常只分化为有限的神经谱系细胞, 包括神经元、少突胶质细胞和星形胶质细胞等。

2 ALS 细胞治疗发展现状 近年来, 多种不同种类干细胞 (包括造血干细胞、MSCs、NSCs、iPSCs 以及经编辑后的干细胞等) 的细胞治疗已被开发用于 ALS 的临床前研究和临床试验中。在影响细胞治疗成功与否的众多因素中, 移植细胞进入宿主后的长期生存能力、定向迁移能力和特定分化能力十分关键。对于 ALS 的细胞治疗来说, 首要条件是移植细胞需要在体内长期生存, 此外, 移植细胞还应该具有向病变部位 (脊髓前角) 迁移的能力以及分化为神经系细胞 (尤其是运动神经元) 的能力。目前, 部分细胞治疗的临

床前研究已证实移植入 ALS 动物模型的不同种类干细胞具有部分或全部的上述能力, 为 ALS 的细胞治疗奠定了基础。MARCONI 等<sup>[13]</sup>通过静脉注射的方式向 *SOD1* G93A 转基因 ALS 小鼠模型移植入 MSCs, 发现移植后的 MSCs 具有在小鼠体内的长期生存能力以及向中枢神经系统、脾脏和肌肉组织定向迁移的能力。ZALFA 等<sup>[14]</sup>则利用 NSCs 作为移植细胞, 通过 L3-L4 脊髓内移植的方法将其植入 *SOD1* G93A 转基因 ALS 小鼠模型体内, 结果发现移植后的细胞具有良好的迁移能力, 同时具有自我更新和分化成星形胶质细胞、神经元及少突胶质细胞前体细胞的能力。尽管上述研究为 ALS 的细胞治疗带来一线曙光, 但截至目前的临床前研究发现并非所有研究都肯定了移植细胞的生存能力、迁移能力和分化能力, 而同时肯定这三种能力的研究则更为罕见。由图 1 可见, 以 ALS 的细胞治疗较常用的 MSCs<sup>[13, 15-31]</sup>和 NSCs<sup>[14, 32-35]</sup>为例, 证实 MSCs 具有在宿主体内长期生存<sup>[13, 15, 27]</sup>或向脊髓组织定向迁移能力<sup>[15, 17, 18]</sup>的临床前研究比例仅各有 16% 左右, 而 MSCs 不具有向神经系细胞定向分化的能力; 对于 NSCs, 尽管其在宿主体内的生存能力得到所有研究证实, 但作为神经系的祖细胞, 并非所有研究都肯定其具有向脊髓迁移<sup>[14]</sup>或向神经元分化的能力<sup>[14, 32, 33]</sup>。越来越多的临床前研究致力于探索 iPSCs 的应用价值<sup>[36-38]</sup>, 在理论上 iPSCs 是一种具有全能性的干细胞, 但仅有一篇临床前研究报道其移植入宿主体内后可以定向分化为神经元<sup>[36]</sup>, 其理论支撑仍有待后续实验进一步深入研究。

近年来已经开展或正在开展的有关 ALS 细胞治疗的临床试验数量可观, 但结果不尽如人意。通过对已经结束的 ALS 细胞治疗的临床研究进行总结, 发现大部分研究为 I / II 期临床试验<sup>[10, 22, 36, 39-55]</sup>, 仅有一项为较大规模的 III 期临床试验<sup>[56]</sup>。临床试验所应用的细胞类型与临床前研究相仿, 包括 MSCs (8 项研究)<sup>[39, 42, 43, 45-48, 56]</sup>、NSCs (2 项研究)<sup>[49, 50]</sup>、其他细胞 (如造血干细胞、编辑后的干细胞等, 4 项研究)<sup>[10, 40, 41, 44]</sup>, 还有 7 项研究直接以细胞产物 (如生长因子、营养因子等) 为治疗药物<sup>[22, 36, 51-55]</sup>, 通过外源性手段给予患者。临床试验的细胞移植方式各异, 大多数研究采用了可操作性较强的鞘内移植 (8 项研究)<sup>[42-48, 56]</sup>或静脉注射 (8 项研究)<sup>[22, 36, 43, 51-55]</sup>的方式, 也有部分研究采用手术直接脊髓内移植 (5 项研究)<sup>[10, 39, 40, 49, 50]</sup>或肌肉内注射 (3 项研究)<sup>[41, 47, 48]</sup>的方式。在最重要的结局指标方面, 目前绝大部分临床试验结果表明, 细胞治疗用于 ALS 是安全的, 其中最具创伤性的细胞移

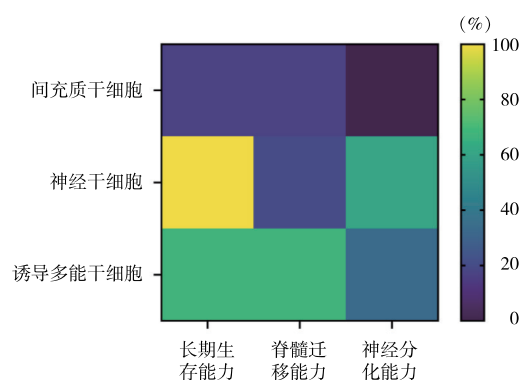


图 1 不同种类干细胞用于肌萎缩侧索硬化 (ALS) 细胞治疗的临床前研究结果

图示为在目前已发表的关于间充质干细胞、神经干细胞及诱导多能干细胞进行 ALS 细胞治疗的临床前研究中, 报道的细胞具有在宿主体内长期生存能力和 (或) 向脊髓病灶定向迁移能力和 (或) 向神经系细胞分化能力的文献比例。不同色块的颜色代表比例大小, 对应右侧图例

植方式 (脊髓内直接手术移植) 的安全性也得到了肯定<sup>[10, 39, 40, 49, 50]</sup>。目前, ALS 细胞治疗有效性评价的结局指标主要为生存指标或临床疾病进展速率, 也有少数研究以实验室标志物 (如炎症因子、神经退行性变的标志物等) 的变化为评价指标<sup>[46, 48, 56]</sup>。各临床试验在有效性方面结论存在一定的异质性, 截至目前已有 9 项临床试验发现细胞治疗不能改善 ALS 患者的结局指标<sup>[36, 40, 41, 49, 51-54, 56]</sup>, 而有 8 项研究结果则提示 ALS 的细胞治疗可能有效<sup>[22, 44-48, 50, 55]</sup>。例如, SYKOVA 等<sup>[45]</sup>在 2017 年开展的一项研究向 ALS 患者鞘内移植骨髓来源的 MSCs, 结果发现患者在接受治疗 3 个月后表现出改良 ALS 功能量表评分 (revised ALS functional rating score, ALSFRS-R) 下降速率的延缓, 部分患者上述效应可持续至接受治疗后 6 个月。此外, 部分以实验室指标为结局的研究发现, ALS 患者接受鞘内注射的 MSCs 或分泌神经营养因子的 MSCs 治疗后, 促炎性细胞因子的含量减少, 神经炎症、神经退行性变的生物标志物表达量有所改善。总结当前 ALS 细胞治疗临床试验的特点如下: (1) 近年来研究数量较多, 且仍有许多研究正在进行中, 但每项研究纳入的患者例数仍较少, 这可能影响研究结果的统计学检验效能; (2) 目前的研究尚未证实哪一种特定的干细胞类型对 ALS 的治疗明确有效; (3) 不同临床研究的细胞移植方式不一, 目前的研究尚未明确任何一种安全性及有效性最优的方式; (4) 目前的研究表明 ALS 的细胞治疗应用于患者基本安全, 但其有效性难以保证, 仍有待更大规模、更多临床研究加以验证。

#### 以 NurOwn 为例剖析 ALS 细胞治疗临床试验得失

1 NurOwn 简介及相关临床试验 NurOwn 是指自体

MSC-神经生长因子 (neurotrophic factor, NTF) 细胞, 即自体来源的、经过体外编辑的可分泌高水平 NTF 的 MSCs。NurOwn 的作用机制是将其移植入患者体内后, 可以有效地将多种 NTF 和免疫调节细胞因子送到损伤部位, 发挥特定的生物学效应, 从而减缓或逆转疾病的发展<sup>[48]</sup>。NurOwn 在 ALS 中应用的发展历程如图 2 所示。从 2007 年首次开展 NurOwn 的临床前研究以来, NurOwn 在 ALS 动物模型中的安全性和有效性得到了初步的验证<sup>[57-59]</sup>。在此基础上, 关于 NurOwn 在 ALS 患者中的临床试验也陆续展开。

2011 年, PETROU 等<sup>[47]</sup>首次在 ALS 患者中开展了基于 MSC-NTF 细胞治疗的临床 I / II 期开放标签的概念验证研究 (MSC-NTF-001-IL), 该项研究共纳入 12 例 ALS 患者, 其中 6 例较早期的 ALS 患者接受  $24 \times 10^6$  细胞肌内注射, 而另外 6 例进展期 ALS 患者接受  $60 \times 10^6$  细胞直接鞘内移植的方式。所有患者在接受细胞治疗前 3 个月开始随访, 一直随访至接受治疗后 6 个月。该研究的主要终点为 MSC-NTF 在 ALS 中应用的安全性和耐受性, 次要终点包括 ALSFRS-R 的下降速率及用力肺活量 (forced vital capacity, FVC) 的下降速率。该研究发现, MSC-NTF 用于 ALS 患者的治疗是安全的, 且接受鞘内移植的进展期患者其 ALSFRS-R 的每月进展率减慢、FVC 下降速率延缓。在该试验结果的基础之上, 团队在 2012 年又进一步开展了剂量递增的 II a 期临床研究 (MSC-NTF-002-IL), 14 例 ALS 患者被随机分配到三个剂量组, 分别接受低、中、高剂量的细胞治疗, 低剂量组接受  $1 \times 10^6$  细胞  $\cdot \text{kg}^{-1}$  鞘内注射以及  $24 \times 10^6$  细胞肌内注射, 中剂量组接受  $1.5 \times 10^6$  细胞  $\cdot \text{kg}^{-1}$  鞘内注射以及  $36 \times 10^6$  细胞肌内注射, 高剂量组接受  $2 \times 10^6$  细胞  $\cdot \text{kg}^{-1}$  鞘内注射以及  $48 \times 10^6$  细胞肌内注射。随访时间及结局指标与前期的 I / II 期临床研究一致。结果发现, 同时鞘内注射和肌内注射移

植 MSC-NTF 细胞后 ALS 患者的 ALSFRS-R 下降速率和 FVC 下降速率有更为明显的改善, 但不同剂量组间并无显著差异<sup>[47]</sup>。2014 年, BERRY 等<sup>[48]</sup>开展了 NurOwn 用于 ALS 患者治疗的临床 II 期随机对照试验 (randomized clinical trial, RCT) (BCT-001-US)。该研究共入组 48 例 ALS 患者, 按 3:1 随机分为治疗组和安慰剂组, 患者同时接受鞘内注射和肌内注射移植, 其中治疗组接受  $125 \times 10^6$  MSC-NTF 细胞鞘内注射以及每针  $48 \times 10^6$  MSC-NTF 细胞在 24 个不同部位肌内注射的单剂量细胞治疗, 对照组则接受相同方式和部位的安慰剂注射, 在接受治疗后共随访 6 个月时间。该研究的主要终点为 NurOwn 治疗 ALS 的安全性, 次要终点为 NurOwn 治疗的有效性, 包括 ALSFRS-R 和肺功能指标下降速率、肌力变化及脑脊液中 NTF 和生物标志物的变化等。研究发现, 尽管治疗组和安慰剂组的疾病进展率相似, 但在预先指定的快速进展亚组 ( $n=21$ ) 中, 与安慰剂组相比, 治疗组疾病进展率在早期时间点得到改善, 且治疗后的患者脑脊液 NTF 升高, 炎症生物标志物降低。在上述亚组研究结论基础上, 该团队于 2017 年进一步开展了大规模的 III 期 RCT (BCT-002-US), 共纳入 196 例快速进展型 ALS 患者, 患者按照 1:1 的比例随机分入治疗组 [接受  $(100-125) \times 10^6$  MSC-NTF 细胞鞘内注射, 共 3 次, 每 8 周 1 次] 和对照组 (接受相同方式、部位和时间间隔的安慰剂注射)。该研究的主要终点为 ALSFRS-R 的下降速率, 次要终点为经治疗后 ALSFRS-R 下降速率改善  $\geq 100\%$  的患者比例、从基线到第 28 周 ALSFRS-R 的变化以及患者生存情况和肺功能指标。结果表明, 该研究未达到主要终点, 但与对照组相比, 治疗组脑脊液中神经炎症和神经退行性变的标志物含量显著改善; 此外, 该研究进一步证明了 NurOwn 用于 ALS 治疗是安全和可耐受的<sup>[56]</sup>。

2 NurOwn 药物审批的发展历程 2011 年, NurOwn

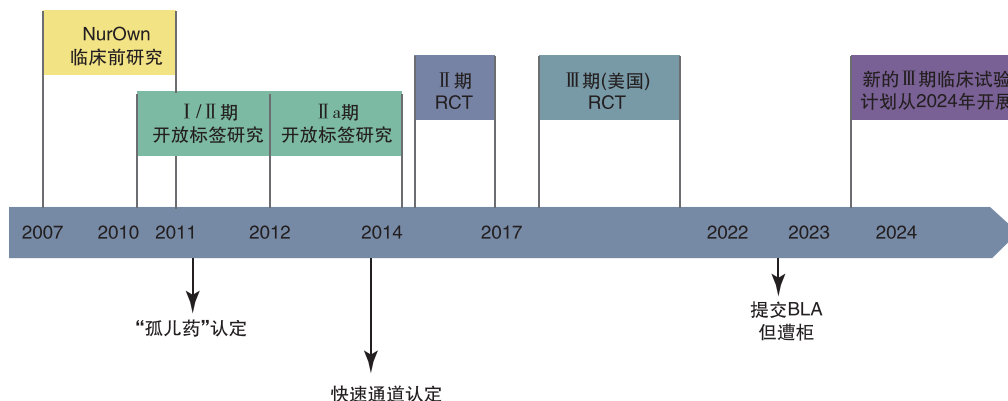


图 2 NurOwn 的临床前研究、临床试验和审批历程示意图

RCT: 随机对照试验, BLA: 生物制品许可申请

获得了美国 FDA 孤儿药的认定。在后续的 I / II 期和 II a 期临床试验结果基础之上<sup>[47]</sup>, FDA 再次于 2014 年批准 NurOwn 快速通道审批的资格。2014 年和 2017 年, NurOwn 用于 ALS 治疗的 II 期和 III 期临床试验陆续开展<sup>[48, 56]</sup>。在以上研究结果基础之上, 2022 年 9 月 9 日, NurOwn 作为 ALS 治疗的新药正式向 FDA 提出了生物制品许可申请 (biologics license application, BLA), 然而在 2022 年 11 月 8 日 FDA 方面做出了不审查该 BLA 的决定, 并向提出申请的 Brainstorm 公司发出了立卷审查拒收函。于是在 2023 年 1 月 11 日, Brainstorm 公司与 FDA 举行了 A 类会议, 讨论对递交的 BLA 发出立卷审查拒收函的内容。2023 年 2 月, Brainstorm 公司进一步通过提交抗议的途径提出对 BLA 的审查, 据此途径 NurOwn 的处方药用户费用法案 (Prescription Drug User Fee Act, PDUFA) 行动日期也定在了 2023 年 12 月 8 日, 即 FDA 将必须在 12 月 8 日之前发布批准审查决定。

在 FDA 对 NurOwn 药物发出的立卷审查拒收函中, 主要拒绝理由是现有的临床试验证据不足以证实 NurOwn 用于 ALS 治疗的有效性, 其中 III 期临床试验 (BCT-002-US) 在主要终点和所有次要终点方面均未显示出有效性, II 期临床试验 (BCT-001-US) 也未能证实其有效性, 而在上述阴性结果的试验中进行的亚组分析并不能提供亚组有效性的有力证据。此外, 在 2023 年 9 月 27 日举行的外部专家咨询会上 FDA 指出以下重要的不支持批准的缺陷: (1) 关键生产控制措施不到位和 / 或不完整, 妨碍实质性审查; (2) 没有建立足够的产品质量标准; (3) 生存结局资料较为有限, 且用药组比安慰剂组结果更差; (4) 亚组分析是探索性的; (5) 基于生物标志物的研究并未提示任何生物标志物与临床获益之间的相关性。最终在针对现有数据是否支持药物的疗效问题上, 19 名专家委员中有 17 名投反对票, 1 名投赞成票, 1 名投弃权票。而在专家咨询会后不久, NurOwn 于 2023 年 10 月主动撤回了该 BLA。因此, NurOwn 获批上市尚面临着诸多严峻的考验。

### ALS 细胞治疗的研发策略及临床评价标准的考量

#### 1 ALS 细胞治疗细胞类型的选择——寻找“最优解”

移植入患者体内的细胞发挥治疗作用需要具备在宿主体内长期生存、向病灶部位迁移以及分化为特定细胞这三种基本能力。然而, 目前临床前研究和临床试验中常用的干细胞类型各有一定的优缺点, 很难完全满足上述条件。例如, ALS 细胞治疗的临床试验中最常用的两种细胞是 MSCs 和 NSCs。NSCs 的优势在于具有向神经系细胞分化的能力, 可以与宿主的运动

神经元建立结构上的联系, 具有产生和分泌 NTF 的能力, 但是其来源于人类胚胎或胎儿脑组织, 存在一定的伦理问题, 自我更新和增殖能力有限, 且具有免疫排异和肿瘤形成的风险。MSCs 来源于成体组织或废弃的胎儿组织, 基本无伦理问题, 自我更新能力较强, 免疫排异较弱, 且价格相对低, 经编辑后也可具有分泌 NTF 的能力 (NurOwn 就是一个很好的例子), 然而, 其用于 ALS 治疗的最大缺点是不具有向神经系细胞分化的能力, 也有一定肿瘤形成的风险。近年来, iPSCs 应用于 ALS 治疗具有良好的发展前景, 因其由成体细胞去分化得到, 不会带来伦理问题, 具有向各种细胞分化的能力, 在目前的技术水平下易于获得, 且不会引起排异反应; 然而, 其仍会带来一定的注射部位肿瘤形成风险。未来 ALS 细胞治疗想要实现突破性发展的最重要一点, 在于寻找一种各项能力完善、获益大、风险小的细胞类型。因此, 利用新的技术手段将各种类型的现阶段可利用的干细胞的优点相结合, 发现或“制造”出新的细胞种类, 或进一步对 iPSCs 进行改良使其移植入体内后得以发挥想要的作用, 将是未来 ALS 细胞治疗研究领域的重要发展方向。

#### 2 ALS 临床疗效评价指标——探究“多维度”结局

长期以来, ALS 临床试验的疗效评价主要基于临床指标, 如患者的生存结局、生存期、疾病进展速率 (多以 ALSFRS-R 的月下降速率表示)、肺功能变化速率等。然而, 上述指标在临床应用中存在一定的问题。例如, ALS 患者的生存期一般为 3~5 年, 这使得许多以安慰剂为对照组的随访期较短的研究无法将生存时间作为结局指标; 而以 ALSFRS-R 评分的下降速率作为结局指标则可能受量表评分主观因素的影响, 导致结局评定不准确。由此可见, 目前 ALS 临床试验的疗效评价尚缺乏易测量、短期内可获得、较客观的结局指标。

越来越多的研究提示一些与神经炎症或神经退行性变性相关的实验室指标可能与 ALS 预后存在一定的关系。例如, 多项研究表明 NfL 在血浆和 (或) 脑脊液中水平升高可能与 ALS 预后较差相关<sup>[60-62]</sup>, 且对 ALS 临床前研究有一定的提示作用<sup>[63]</sup>。也有部分研究发现, 一些与免疫炎症反应相关的实验室标志物可能与 ALS 的发生、发展和预后存在一定的关系, 包括 C-反应蛋白<sup>[64]</sup>、巨噬细胞相关标记物<sup>[64]</sup>、细胞因子<sup>[66-68]</sup>等。在 ALS 细胞治疗的临床研究中, 例如前文提到的 NurOwn 的 RCT, 已尝试探索实验室标志物作为疗效评价指标的可能; 然而, 如前所述, FDA 拒绝批准 NurOwn 的其中一项的理由是其临床试验中的多项实

实验室数据并未提示任何生物标志物与临床获益之间的相关性。这提示建立既具有与预后相关联的临床意义, 又兼顾可测性、客观性的多个不同维度评价指标相结合的“复合结局指标”, 对于 ALS 的临床研究具有现实意义。目前已有研究进行了相关探索, 例如, 2021 年 BRODOVITCH 等<sup>[69]</sup>研究发现将脑脊液中的 NFL 和细胞间黏附分子-1 (ICAM-1) 浓度以及血清中的干扰素 (IFN)  $\gamma$  浓度组合可以将 ALS 患者与炎性周围神经病变患者区分开来, 且相对于单个生物标志物具有更高的灵敏度和特异度。据此, 未来开展更大规模的临床研究以探索更合适的“多维度”结局指标, 将为包括细胞治疗在内的 ALS 临床试验带来新的希望。

**结语** 作为一种进行性发展的神经系统退行性疾病, ALS 具有较高的致死率, 为患者及其家庭带来沉重的负担。然而, 目前为止 ALS 发病机制尚未明确, 尚无有效的治疗方案。近年来越来越多的临床前研究和临床试验致力于探究细胞治疗用于 ALS 的可行性, 发现细胞疗法基本安全, 但尚无充足证据证明其有效性。作为其中的代表性例子, NurOwn 历经了 10 余年的基础研究探索和多项临床试验, 最终还是因为有效性证据不足遭 FDA 多数外部专家建议拒绝批准。结合目前 ALS 细胞治疗研究存在的问题, 未来研究中最重要的是对于 ALS 病因和发病机制的探究。此外, 可以进一步优化细胞治疗的细胞种类, 使其兼具目前已有的各种细胞类型的优点, 同时具备在宿主体内长期生存、向病灶部位迁移和定向分化的能力; 同时, 未来研究也应进一步探究更适合于 ALS 临床试验的“多维度”复合研究终点, 以提高 ALS 临床试验疗效评价的准确性, 从而指导 ALS 细胞治疗产品研发和注册上市, 惠及患者及其家庭。

#### [ 参考文献 ]

- [ 1 ] OSKARSSON B, GENDRON TF, STAFF NP. Amyotrophic lateral sclerosis: an update for 2018 [ J ] . Mayo Clin Proc, 2018, 93 ( 11 ) : 1617–1628.
- [ 2 ] XU L, LIU T, LIU L, *et al.* Global variation in prevalence and incidence of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis [ J ] . J Neurol, 2020, 267 ( 4 ) : 944–953.
- [ 3 ] ZHOU S, ZHOU Y, QIAN S, *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis in Beijing: epidemiologic features and prognosis from 2010 to 2015 [ J ] . Brain Behav, 2018, 8 ( 11 ) : e1131.
- [ 4 ] KIERNAN MC, VUCIC S, CHEAH BC, *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis [ J ] . Lancet, 2011, 377 ( 9769 ) : 942–955.
- [ 5 ] LACOMBLEZ L, BENSIMON G, LEIGH PN, *et al.* Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic lateral sclerosis/riluzole study group II [ J ] . Lancet, 1996, 347 ( 9013 ) : 1425–1431.
- [ 6 ] ABE K, ITOYAMA Y, SOBUE G, *et al.* Confirmatory double-blind, parallel-group, placebo-controlled study of efficacy and safety of edaravone ( MCI-186 ) in amyotrophic lateral sclerosis patients [ J ] . Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener, 2014, 15 ( 7-8 ) : 610–617.
- [ 7 ] LUNETTA C, MOGLIA C, LIZIO A, *et al.* The Italian multicenter experience with edaravone in amyotrophic lateral sclerosis [ J ] . J Neurol, 2020, 267 ( 11 ) : 3258–3267.
- [ 8 ] PAGANONI S, MACKLIN EA, HENDRIX S. Trial of sodium phenylbutyrate-taurursodiol for amyotrophic lateral sclerosis [ J ] . N Engl J Med, 2020, 383 ( 10 ) : 919–930.
- [ 9 ] MILLER TM, CUDKOWICZ ME, GENGE A, *et al.* Trial of antisense oligonucleotide tofersen for SOD1 ALS [ J ] . N Engl J Med, 2022, 387 ( 12 ) : 1099–1110.
- [ 10 ] SIRONI F, de MARCHI F, MAZZINI L, *et al.* Cell therapy in ALS: An update on preclinical and clinical studies [ J ] . Brain Res Bull, 2023, 194: 64–81.
- [ 11 ] DEDA H, INCI MC, KUREKCI AE, *et al.* Treatment of amyotrophic lateral sclerosis patients by autologous bone marrow-derived hematopoietic stem cell transplantation: a 1-year follow-up [ J ] . Cytotherapy, 2009, 11 ( 1 ) : 18–25.
- [ 12 ] HAO HN, ZHAO J, THOMAS RL, *et al.* Fetal human hematopoietic stem cells can differentiate sequentially into neural stem cells and then astrocytes *in vitro* [ J ] . J Hematother Stem Cell Res, 2003, 12 ( 1 ) : 23–32.
- [ 13 ] MARCONI S, BONACONSA M, SCAMBI I, *et al.* Systemic treatment with adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorates clinical and pathological features in the amyotrophic lateral sclerosis murine model [ J ] . Neuroscience, 2013, 248: 333–343.
- [ 14 ] ZALFA C, ROTA NL, VACCHI E, *et al.* Transplantation of clinical-grade human neural stem cells reduces neuroinflammation, prolongs survival and delays disease progression in the SOD1 rats [ J ] . Cell Death Dis, 2019, 10 ( 5 ) : 345.
- [ 15 ] ZHAO CP, ZHANG C, ZHOU SN, *et al.* Human mesenchymal stromal cells ameliorate the phenotype of SOD1-G93A ALS mice [ J ] . Cytotherapy, 2007, 9 ( 5 ) : 414–426.
- [ 16 ] UCCELLI A, MILANESE M, PRINCIPATO MC, *et al.* Intravenous mesenchymal stem cells improve survival and motor function in experimental amyotrophic lateral sclerosis [ J ] . Mol Med, 2012, 18 ( 1 ) : 794–804.
- [ 17 ] CHIAROTTO GB, CARTAROZZI LP, PEREZ M, *et al.* Delayed onset, immunomodulation, and lifespan improvement of SOD1 ( G93A ) mice after intravenous injection of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue [ J ] . Brain Res Bull, 2022, 186: 153–164.
- [ 18 ] KIM KS, LEE HJ, AN J, *et al.* Transplantation of human adipose tissue-derived stem cells delays clinical onset and prolongs life

- span in ALS mouse model [J]. *Cell Transplant*, 2014, 23 ( 12 ) : 1585–1597.
- [ 19 ] SUN H, HOU Z, YANG H, *et al.* Multiple systemic transplantations of human amniotic mesenchymal stem cells exert therapeutic effects in an ALS mouse model [J]. *Cell Tissue Res*, 2014, 357 ( 3 ) : 571–582.
- [ 20 ] KOOK MG, LEE S, SHIN N, *et al.* Repeated intramuscular transplantations of hUCB-MSCs improves motor function and survival in the SOD1 G ( 93 ) A mice through activation of AMPK [J]. *Sci Rep*, 2020, 10 ( 1 ) : 1572.
- [ 21 ] REHOROVA M, VARGOVA I, FOROSTYAK S, *et al.* A combination of intrathecal and intramuscular application of human mesenchymal stem cells partly reduces the activation of necroptosis in the spinal cord of SOD1 ( G93A ) Rats [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2019, 8 ( 6 ) : 535–547.
- [ 22 ] ZHANG Y, WANG L, FU Y, *et al.* Preliminary investigation of effect of granulocyte colony stimulating factor on amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Amyotroph Lateral Scler*, 2009, 10 ( 5-6 ) : 430–431.
- [ 23 ] BOIDO M, PIRAS A, VALSECCHI V, *et al.* Human mesenchymal stromal cell transplantation modulates neuroinflammatory milieu in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Cytherapy*, 2014, 16 ( 8 ) : 1059–1072.
- [ 24 ] SIRONI F, VALLAROLA A, VIOLATTO MB, *et al.* Multiple intracerebroventricular injections of human umbilical cord mesenchymal stem cells delay motor neurons loss but not disease progression of SOD1G93A mice [J]. *Stem Cell Res*, 2017, 25: 166–178.
- [ 25 ] FOROSTYAK S, HOMOLA A, TURNOVCOVA K, *et al.* Intrathecal delivery of mesenchymal stromal cells protects the structure of altered perineuronal nets in SOD1 rats and amends the course of ALS [J]. *Stem Cells*, 2014, 32 ( 12 ) : 3163–3172.
- [ 26 ] CIERVO Y, GATTO N, ALLEN C, *et al.* Adipose-derived stem cells protect motor neurons and reduce glial activation in both *in vitro* and *in vivo* models of ALS [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2021, 21: 413–433.
- [ 27 ] VERCELLI A, MEREUTA OM, GARBOSSA D, *et al.* Human mesenchymal stem cell transplantation extends survival, improves motor performance and decreases neuroinflammation in mouse model of amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Neurobiol Dis*, 2008, 31 ( 3 ) : 395–405.
- [ 28 ] GUBERT F, DECOTELLI AB, BONACOSSA-PEREIRA I, *et al.* Intraspinal bone-marrow cell therapy at pre- and symptomatic phases in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7 : 41.
- [ 29 ] BURSCH F, RATH KJ, SARIKIDI A, *et al.* Analysis of the therapeutic potential of different administration routes and frequencies of human mesenchymal stromal cells in the SOD1 ( G93A ) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2019, 13 ( 4 ) : 649–663.
- [ 30 ] JEON GS, IM W, SHIM YM, *et al.* Neuroprotective effect of human adipose stem cell-derived extract in amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Neurochem Res*, 2016, 41 ( 4 ) : 913–923.
- [ 31 ] BONAFEDE R, BRANDI J, MANFREDI M, *et al.* The anti-apoptotic effect of ASC-exosomes in an *in vitro* ALS model and their proteomic analysis [J]. *Cells*, 2019, 8 ( 9 ) : 1087.
- [ 32 ] TENG YD, BENN SC, KALKANIS SN, *et al.* Multimodal actions of neural stem cells in a mouse model of ALS: a meta-analysis [J]. *Sci Transl Med*, 2012, 4 ( 165 ) : 164r–165r.
- [ 33 ] XU L, YAN J, CHEN D, *et al.* Human neural stem cell grafts ameliorate motor neuron disease in SOD-1 transgenic rats [J]. *Transplantation*, 2006, 82 ( 7 ) : 865–875.
- [ 34 ] XU L, SHEN P, HAZEL T, *et al.* Dual transplantation of human neural stem cells into cervical and lumbar cord ameliorates motor neuron disease in SOD1 transgenic rats [J]. *Neurosci Lett*, 2011, 494 ( 3 ) : 222–226.
- [ 35 ] HEFFERAN MP, GALIK J, KAKINOHANA O, *et al.* Human neural stem cell replacement therapy for amyotrophic lateral sclerosis by spinal transplantation [J]. *PLoS One*, 2012, 7 ( 8 ) : e42614.
- [ 36 ] NEFUSSY B, ARTAMONOV I, DEUTSCH V, *et al.* Recombinant human granulocyte-colony stimulating factor administration for treating amyotrophic lateral sclerosis: a pilot study [J]. *Amyotroph Lateral Scler*, 2010, 11 ( 1-2 ) : 187–193.
- [ 37 ] KONDO T, FUNAYAMA M, TSUKITA K, *et al.* Focal transplantation of human iPSC-derived glial-rich neural progenitors improves lifespan of ALS mice [J]. *Stem Cell Rep*, 2014, 3 ( 2 ) : 242–249.
- [ 38 ] POPESCU IR, NICAISE C, LIU S, *et al.* Neural progenitors derived from human induced pluripotent stem cells survive and differentiate upon transplantation into a rat model of amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Stem Cell Transl Med*, 2013, 2 ( 3 ) : 167–174.
- [ 39 ] MAZZINI L, FERRERO I, LUPARELLO V, *et al.* Mesenchymal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: a phase I clinical trial [J]. *Exp Neurol*, 2010, 223 ( 1 ) : 229–237.
- [ 40 ] BLANQUER M, MORALEDA JM, INIESTA F, *et al.* Neurotrophic bone marrow cellular nests prevent spinal motoneuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis patients: a pilot safety study [J]. *Stem Cells*, 2012, 30 ( 6 ) : 1277–1285.
- [ 41 ] GEIJO-BARRIENTOS E, PASTORE-OLMEDO C, de MINGO P, *et al.* Intramuscular injection of bone marrow stem cells in amyotrophic lateral sclerosis patients: a randomized clinical trial [J]. *Front Neurosci-Switz*, 2020, 14: 195.
- [ 42 ] STAFF NP, MADIGAN NN, MORRIS J, *et al.* Safety of intrathecal autologous adipose-derived mesenchymal stromal cells in patients with ALS [J]. *Neurology*, 2016, 87 ( 21 ) : 2230–2234.
- [ 43 ] KARUSSIS D, KARAGEORGIU C, VAKNIN-DEMBINSKY A, *et al.* Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Arch Neurol*, 2010, 67 ( 10 ) : 1187–1194.

- [ 44 ] PRABHAKAR S, RAJAN R, SHARMA R, *et al.* Autologous bone marrow-derived stem cells in amyotrophic lateral sclerosis: a pilot study [ J ] . *Neurol India*, 2012, 60 ( 5 ) : 465.
- [ 45 ] SYKOVA E, RYCHMACH P, DRAHORADOVA I, *et al.* Transplantation of mesenchymal stromal cells in patients with amyotrophic lateral sclerosis: results of phase I / II a clinical trial [ J ] . *Cell Transplant*, 2017, 26 ( 4 ) : 647–658.
- [ 46 ] OH KW, NOH MY, KWON MS, *et al.* Repeated intrathecal mesenchymal stem cells for amyotrophic lateral sclerosis [ J ] . *Ann Neurol*, 2018, 84 ( 3 ) : 361–373.
- [ 47 ] PETROU P, GOTHELF Y, ARGOV Z, *et al.* Safety and clinical effects of mesenchymal stem cells secreting neurotrophic factor transplantation in patients with amyotrophic lateral sclerosis [ J ] . *JAMA Neurol*, 2016, 73 ( 3 ) : 337.
- [ 48 ] BERRY JD, CUDKOWICZ ME, WINDEBANK AJ, *et al.* NurOwn, phase 2, randomized, clinical trial in patients with ALS: safety, clinical, and biomarker results [ J ] . *Neurology*, 2019, 93 ( 24 ) : e2294–e2305.
- [ 49 ] FELDMAN EL, BOULIS NM, HUR J, *et al.* Intraspinal neural stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: phase 1 trial outcomes [ J ] . *Ann Neurol*, 2014, 75 ( 3 ) : 363–373.
- [ 50 ] MAZZINI L, GELATI M, PROFICO DC, *et al.* Results from phase I clinical trial with intraspinal injection of neural stem cells in amyotrophic lateral sclerosis: a long-term outcome [ J ] . *Stem Cells Transl Med*, 2019, 8 ( 9 ) : 887–897.
- [ 51 ] TARELLA C, RUTELLA S, GUALANDI F, *et al.* Consistent bone marrow-derived cell mobilization following repeated short courses of granulocyte-colony-stimulating factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis: results from a multicenter prospective trial [ J ] . *Cytotherapy*, 2010, 12 ( 1 ) : 50–59.
- [ 52 ] CHIO A, MORA G, BELLA VL, *et al.* Repeated courses of granulocyte colony - stimulating factor in amyotrophic lateral sclerosis: clinical and biological results from a prospective multicenter study [ J ] . *Muscle Nerve*, 2011, 43 ( 2 ) : 189–195.
- [ 53 ] CASHMAN N, TAN LY, KRIEGER C, *et al.* Pilot study of granulocyte colony stimulating factor ( G - CSF ) - mobilized peripheral blood stem cells in amyotrophic lateral sclerosis ( ALS ) [ J ] . *Muscle Nerve*, 2008, 37 ( 5 ) : 620–625.
- [ 54 ] APPEL SH, ENGELHARDT JI, HENKEL JS, *et al.* Hematopoietic stem cell transplantation in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis [ J ] . *Neurology*, 2008, 71 ( 17 ) : 1326–1334.
- [ 55 ] MARTINEZ HR, MOLINA-LOPEZ JF, GONZALEZ-GARZA MT, *et al.* Stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis patients: methodological approach, safety, and feasibility [ J ] . *Cell Transplant*, 2012, 21 ( 9 ) : 1899–1907.
- [ 56 ] CUDKOWICZ ME, LINDBORG SR, GOYAL NA, *et al.* A randomized placebo-controlled phase 3 study of mesenchymal stem cells induced to secrete high levels of neurotrophic factors in amyotrophic lateral sclerosis [ J ] . *Muscle Nerve*, 2022, 65 ( 3 ) : 291–302.
- [ 57 ] WATANABE Y, KAZUKI Y, KAZUKI K, *et al.* Use of a human artificial chromosome for delivering trophic factors in a rodent model of amyotrophic lateral sclerosis [ J ] . *Mol Ther Nucleic Acids*, 2015, 4 ( 10 ) : e253.
- [ 58 ] NAKANISHI M, WATANABE Y, HONDA N, *et al.* Dynamics of host and graft after cell sheet transplantation: basic study for the application of amyotrophic lateral sclerosis [ J ] . *Brain Res*, 2019, 1724 : 146444.
- [ 59 ] KRAKORA D, MULCRONE P, MEYER M, *et al.* Synergistic effects of GDNF and VEGF on lifespan and disease progression in a familial ALS rat model [ J ] . *Mol Ther*, 2013, 21 ( 8 ) : 1602–1610.
- [ 60 ] SU WM, CHENG YF, JIANG Z, *et al.* Predictors of survival in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a large meta-analysis [ J ] . *Ebiomedicine*, 2021, 74 : 103732.
- [ 61 ] GAIANI A, MARTINELLI I, BELLO L, *et al.* Diagnostic and prognostic biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis: neurofilament light chain levels in definite subtypes of disease [ J ] . *JAMA Neurol*, 2017, 74 ( 5 ) : 525–532.
- [ 62 ] ZHOU YN, CHEN YH, DONG SQ, *et al.* Role of blood neurofilaments in the prognosis of amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis [ J ] . *Front Neurol*, 2021, 12 : 712245.
- [ 63 ] BENATAR M, WUU J, ANDERSEN PM, *et al.* Neurofilament light: a candidate biomarker of presymptomatic amyotrophic lateral sclerosis and phenocconversion [ J ] . *Ann Neurol*, 2018, 84 ( 1 ) : 130–139.
- [ 64 ] LUNETTA C, LIZIO A, MAESTRI E, *et al.* Serum C-reactive protein as a prognostic biomarker in amyotrophic lateral sclerosis [ J ] . *JAMA Neurol*, 2017, 74 ( 6 ) : 660–667.
- [ 65 ] THOMPSON AG, GRAY E, THEZENAS ML, *et al.* Cerebrospinal fluid macrophage biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis [ J ] . *Ann Neurol*, 2018, 83 ( 2 ) : 258–268.
- [ 66 ] LIU B, LYU L, ZHOU W, *et al.* Associations of the circulating levels of cytokines with risk of amyotrophic lateral sclerosis: a Mendelian randomization study [ J ] . *Bmc Med*, 2023, 21 ( 1 ) : 39.
- [ 67 ] HUANG F, ZHU Y, HSIAO-NAKAMOTO J, *et al.* Longitudinal biomarkers in amyotrophic lateral sclerosis [ J ] . *Ann Clin Transl Neurol*, 2020, 7 ( 7 ) : 1103–1116.
- [ 68 ] STAATS KA, BORCHELT DR, TANSEY MG, *et al.* Blood-based biomarkers of inflammation in amyotrophic lateral sclerosis [ J ] . *Mol Neurodegener*, 2022, 17 ( 1 ) : 11.
- [ 69 ] BRODOVITCH A, BOUCRAUT J, DELMONT E, *et al.* Combination of serum and CSF neurofilament-light and neuroinflammatory biomarkers to evaluate ALS [ J ] . *Sci Rep*, 2021, 11 ( 1 ) : 703.