



Informe Justificativo

Campaña Faster Future “Vamos a por el Parkinson”

Fecha de presentación del informe: 21 de Diciembre de 2020

DATOS DEL PROYECTO

TÍTULO: Nuevos anticuerpos para cruzar la barrera hematoencefálica para tratar Parkinson

COORDINADORA: Prof. Silvia Muro; *Targeted Therapies and Nanodevices*, Instituto de Bioingeniería de Cataluña (IBEC), Barcelona.

COLABORADORES EXTERNOS:

CIENTÍFICO-CLÍNICOS

Dr. Ricardo Feldman, experto en la bases moleculares y patología asociada a la función y deficiencia en glucocerebrosidasa, implicada en las enfermedades de Gaucher y Parkinson. Facultad de Medicina, Universidad de Maryland, USA.

ASOCIACIONES DE PACIENTES:

Asociación Catalana para el Parkinson.

EMPRESAS:

Genisphere LLC; empresa estadounidense interesada en desarrollar estrategias para liberar fármacos, entre otros, en el sistema nervioso central.

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson es un trastorno neurodegenerativo que afecta a 7-10 millones de personas. Recientemente, se ha observado que las mutaciones en una glucocerebrosidasa (GBA), una proteína que "digiere" las grasas en las células, constituyen el principal factor de riesgo de la enfermedad. Por tanto, se ha propuesto que la administración de GBA al cerebro de pacientes podría constituir un tratamiento para Parkinson. Sin embargo, esto no es posible ya que **la barrera hematoencefálica impide que el GBA inyectado acceda al cerebro**. La Prof. Muro ha **identificado una nueva ruta de transporte a través de la barrera hematoencefálica** que se activa mediante la unión de agentes externos (como los anticuerpos) al **receptor ICAM-1**. Estos anticuerpos anti-ICAM se podrían conjugar con GBA para permitir el paso al cerebro de esta molécula terapéutica. Desafortunadamente, los **anticuerpos anti-ICAM-1 disponibles solo se reconocen los receptores de una especie**, es decir, se dirigen a ICAM-1 de ratón o ICAM-1 de primates no humanos, o ICAM-1 humano, pero no a todos. Dado que cualquier nueva terapia necesita un largo proceso preclínico pasando por diferentes pruebas en animales de laboratorio para garantizar la seguridad de la terapia antes de que se aprueben las pruebas en humanos, la falta de un anticuerpo que reconozca el receptor ICAM-1 de todas estas especies dificulta el desarrollo de la terapia de Parkinson prevista. El objetivo de este proyecto es resolver este problema **desarrollando un anticuerpo universal que pueda unirse a ICAM-1 tanto en animales de laboratorio como en humanos**. A partir de ahí, se **podrán desarrollar formulaciones capaces de hacer llegar GBA al cerebro mediante una administración sistémica para el tratamiento del Parkinson**, y que se buscará en proyectos posteriores. Además, este anticuerpo podría usarse como una valiosa herramienta para otros científicos que estudian la biología y el papel en la patología del receptor ICAM-1, y **también podría servir para administrar muchas otras terapias al cerebro** que comparten esta misma problemática, teniendo un amplio impacto tanto en la ciencia, como en la industria farmacéutica y el tratamiento médico de afecciones neurológicas.

PALABRAS CLAVE

Enfermedad de Parkinson, liberación de fármacos al cerebro, barrera hematoencefálica, transporte a través de receptores, anticuerpo universal.

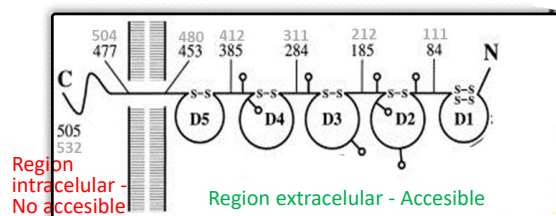
PRINCIPALES RESULTADOS OBTENIDOS

Los objetivos principales del proyecto son: (1) la identificación de un anticuerpo que reconozca ICAM-1 en varias especies relevantes para experimentación y traslación a la clínica, como el ratón, perro, primate y humano, (2) la fabricación de suficiente anticuerpo para caracterizar su especificidad y afinidad o fuerza de unión de ICAM-1, y (3) la verificación de la habilidad del anticuerpo de cruzar la barrera hematoencefálica en modelos de laboratorio.

La predicción original era de 18 meses para la realización de los tres objetivos planteados. Sin embargo, el cierre entre marzo y junio decretado en actividades no esenciales debido a la pandemia por COVID-19, las restricciones posteriores impuestas en cuanto al máximo número de investigadores permitidos por superficie de laboratorio, dos cuarentenas sufridas por los miembros del laboratorio implicados en el proyecto y la baja de la investigadora postdoctoral involucrada en él para aceptar un puesto laboral en una compañía biotecnológica, han causado un retraso acusado en el mismo. Asimismo, hemos encontrado dificultades técnicas en el primer objetivo que, si bien han sido solucionadas actualmente, han significado una dificultad añadida a la situación descrita. No obstante, se ha incorporado en el proyecto un estudiante de doctorado que ha obtenido una beca del Ministerio de Ciencia e Innovación, una estudiante ha podido escribir su tesis y obtener su título de máster gracias a su contribución al proyecto, se ha publicado un artículo de investigación relacionado con el proyecto y se ha obtenido financiación del Plan Estatal de I+D+i del Ministerio de Ciencia e Innovación por tres años garantizando la continuación y ampliación para alcanzar todos los objetivos propuestos, lo cual ha sido posible gracias a este proyecto. A continuación, se describen los avances realizados hasta el momento, que se corresponden a las actividades realizadas para la consecución del objetivo 1.

Objetivo 1-Identificación de un anticuerpo que reconozca ICAM-1 en varias especies relevantes para experimentación y traslación a la clínica, como el ratón, perro, primate y humano. Entre todos los objetivos, este es el que requiere un mayor tiempo por su complejidad y numerosos pasos involucrados y de él dependen el resto de objetivos. Varios pasos adicionales o alternativos a los originalmente planeados han sido necesarios para solventar las dificultades técnicas encontradas en su realización.

1.1-Identificación de regiones de ICAM-1 de máxima homología entre especies. Para obtener anticuerpos que reconozcan ICAM-1 en humanos y especies animales usadas en ensayos preclínicos para demostrar seguridad y eficacia y obtener aprobación para ensayos futuros en humanos, hay que inmunizar ratones con el fragmento de la proteína ICAM-1 que presente la mayor similitud posible entre todas las especies de interés, para así inducir al sistema inmune a producir anticuerpos específicos contra este fragmento para construir la librería. Se había propuesto investigar las secuencias de ratón, perro, primate y humano, a la que se añadió la de cerdo porque este animal se usa frecuentemente en experimentación preclínica. La comparación de las secuencias de ICAM-1 en estas especies resultó en la identificación de nueve regiones de gran similitud. Solo una de ellas no estaba localizada en la parte extracelular de ICAM-1, por tanto, no sería accesible para un anticuerpo y fue descartada (Figura 1). Las ocho restantes estaban localizadas así: una región de 11 aminoácidos en el dominio D1, dos regiones de 16 y 15 aminoácidos en el dominio D2, una región de 12 aminoácidos en el dominio D3, una región de 13 aminoácidos en el dominio D4, una región de 25 aminoácidos entre el pre-dominio y dominio D5, y dos regiones de 11 y 12 aminoácidos en el dominio D5. Con ellas se continuó hacia los pasos siguientes.



C = extremo carboxiterminal; D = dominios;
N = extremo aminoterminal; Números = posición
aminoacídica en la pre-proteína y proteína madura.

Figura 1: Esquema simplificado de la estructura de ICAM-1.

1.2-Comprobar que las regiones identificadas presentan mínima homología con otras ICAMs. En humanos, existen cuatro proteínas similares a ICAM-1 que pertenecen a la misma familia

estructural/funcional: ICAM-2, ICAM-3, ICAM-4 y ICAM-5 (Figura 2). Es clave que el anticuerpo a desarrollar no las reconozca para que sea específico de ICAM-1. Por tanto, las ocho regiones de similitud entre especies identificadas en el paso anterior no deberían ser similares a otras proteínas ICAMs. Desafortunadamente, la comparación de las secuencias entre las diferentes ICAMs indicó que las regiones previamente identificadas tenían una similitud importante y debían ser descartadas al correr el riesgo de no ser específicas para ICAM-1. Este problema científico-técnico, junto con la dificultad añadida única de la proteína ICAM-1 descrita en el punto 1.4, requirió varias rondas de repetición iterativa de los pasos 1.1 y 1.2 hasta poder identificar regiones candidatas adicionales que ofrecían un buen compromiso entre ambos requisitos, lo cual conllevó un retraso significativo de la estrategia. Esta representa la causa primaria junto con la situación debida a la COVID-19, del retraso del proyecto. Finalmente, todas las regiones identificadas en los dominios D1 y D2 de ICAM-1 fueron descartadas por ofrecer la mayor similitud entre todas las ICAMs y, por tanto, la menor especificidad. Las regiones en D3 y D4 también se descartaron porque, si bien no estaban presentes en ICAM-2 y ICAM-4, lo estaban en ICAM-3 y ICAM-5. La región más específica se identificó en el dominio intracelular que no sería accesible para un anticuerpo y, por ello, se decidió continuar con tres secuencias comprendidas entre los dominios D4 y D5 que mejor cumplían con los requisitos 1.1 y 1.2. Cabe explicar que las secuencias identificadas a cada paso iterativo entre 1.1 y 1.2 también se sometieron en paralelo a los análisis adicionales descritos en los puntos 1.3 y 1.4 para optimizar la secuencia más adecuada para dirigir el anticuerpo universal.

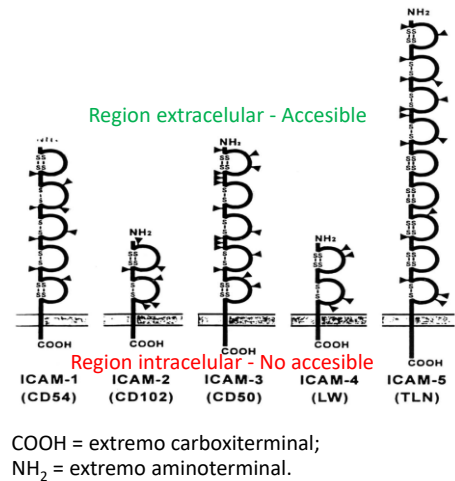
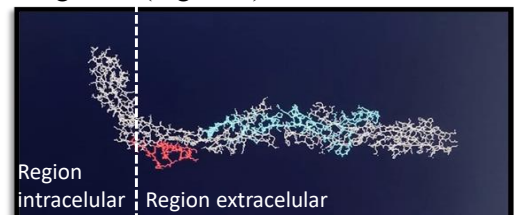


Figura 2: Esquema simplificado de la estructura de las proteínas ICAMs.

1.3-Validar que las regiones identificadas son accesibles en la superficie de ICAM-1. Los análisis anteriores están basados en la secuencia de aminoácidos que forman la proteína ICAM-1 y permiten además escoger regiones en los dominios extracelulares y no los intracelulares que no serían accesibles. Pero a través de la implementación de los análisis 1.1 y 1.2 no es posible saber si estas regiones están localizadas en la superficie de la proteína, donde pueden ser reconocidos por anticuerpos, o están plegadas en el interior de la estructura, donde estarían ocultos a los anticuerpos. Por tanto, en paralelo a los pasos 1.1 y 1.2, se realizó un estudio para localizar estas regiones (Figura 3). Como resultado, se descartaron varias regiones ocultas que se habían localizado en los dominios D1, D2, D3 y se continuó con aquellos expuestos en la superficie de la proteína. Cabe explicar que un problema científico-técnico encontrado en este punto fue que no se disponía de la estructura cristalizada de ICAM-1 en su totalidad, por ejemplo, la estructura tridimensional más conocida correspondía a los dominios D1 y D2, que como se explica fueron descartados en el punto 1.2, lo que requirió predicciones matemáticas con algoritmos de plegamiento complejos para poder identificar regiones superficiales y accesibles en los demás dominios, retrasando el estudio.

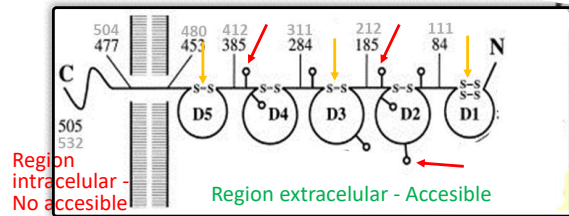


Blanco = estructura completa de ICAM-1;
Celeste = ejemplo de regiones semi-escondidas en la estructura; Rojo = ejemplo de region superficial.

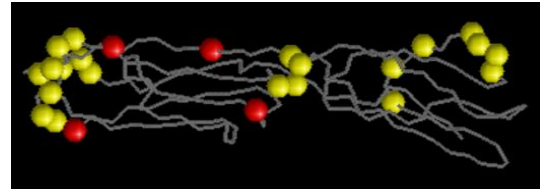
Figura 3: Ejemplo de simulación 3D de la estructura de la proteína ICAM-1.

1.4-Examinar que las regiones identificadas no están bloqueadas por modificaciones post-traduccionales. La proteína ICAM-1 posee modificaciones naturales consistentes en puentes disulfuro y glicosilaciones (Figura 4). Las primeras son enlaces entre aminoácidos llamados cisteínas que ayudan al plegamiento de la proteína durante su síntesis en las células del organismo y facilitan la formación de los dominios D1, D2, D3, D4 y D5. El segundo tipo de modificación consiste en enlaces que también se producen en las células del organismo, donde diferentes moléculas de azúcares complejos se unen a la superficie de la proteína para protegerla contra su degradación rápida, ayudar en su plegamiento y otras funciones naturales. Es importante que el anticuerpo universal a desarrollar no se diseñe en una

región de ICAM-1 con estas dos modificaciones porque su reconocimiento podría estar comprometido al verse bloqueado su acceso a la proteína debido a dichas modificaciones. Por tanto, en paralelo a los pasos anteriores, hubo que examinar este aspecto, lo que resultó en el descarte de varias de las secuencias identificadas y se continuó con aquéllas que no están afectadas por estas modificaciones. Este punto conllevó un retraso adicional ya que varias de las secuencias identificadas hasta aquí resultaron estar situadas en zonas donde podrían ocurrir estas modificaciones y, por tanto, hubo que repetir iterativamente los pasos anteriores.



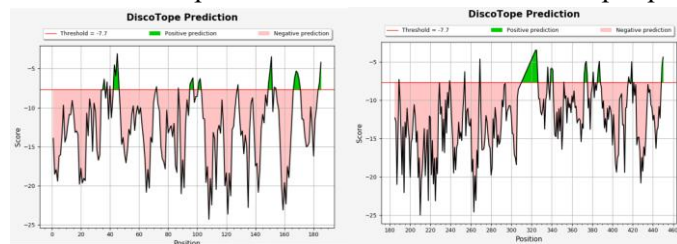
☯: glicosilaciones (ejemplos marcados con flechas rojas); S-S : puentes disulfuro (ejemplos marcados con flechas naranjas).



Gris = estructura de los dominios D1 y D2 de ICAM-1; Rojo = sitios modificados por glicosilación; Amarillo: predicción de regiones de alta accesibilidad.

Figura 4: Localización de modificaciones post-traduccionales en la proteína ICAM-1.

1.5-Estudiar que las secuencias identificadas son inmunogénicas. Para crear la librería de anticuerpos es necesario que al inyectar la secuencia más adecuada de las identificadas, ésta genere una respuesta inmune que lleve a la producción de anticuerpos. Por tanto, este estudio también incluyó un análisis para identificar regiones de posible antigenicidad (la propiedad de inducir la producción de anticuerpos; Figura 5) en la secuencia de ICAM-1 y éstas se cotejaron con las regiones identificadas anteriormente. Se usaron diferentes bases de datos y algoritmos matemáticos para analizar secuencialmente los epítotos lineares, su conformación, su escala de accesibilidad superficial, la escala antigénica y finalmente predictores de células B de producción de anticuerpos. Finalmente, después de todos los análisis de secuencias realizados, rondas de identificación y localización y análisis inmunogénicos (1.1-1.5), se concluyó que entre las secuencias candidatas, la más favorable se correspondía con una zona de 18 aminoácidos entre el pre-dominio y el dominio D5.



Línea horizontal roja = neutralidad en cuanto a antigenicidad. Verde = Regiones antigénicas; Rosado = regiones no antigénicas.

Figura 5: Predicción DiscoTope de secuencias antigénicas en ICAM-1 para linfocitos B productores de anticuerpos.

1.6-Optimización de la secuencia determinada. La secuencia determinada por todos los pasos anteriores es de 18 aminoácidos. Se estimó que podría ser optimizada para maximizar su especificidad y antigenicidad añadiendo un número variable de aminoácidos adyacentes, bien de la región inmediatamente aminoterminal o carboxiloterminal de la misma. Múltiples secuencias modificadas de esta manera fueron analizadas mediante reiteración de todos los pasos anteriores, especialmente 1.1, 1.2 y 1.5 hasta la identificación de tres candidatos finales.

1.7-Expresión recombinante de las secuencias finales para su uso como antígenos. Una vez identificadas y optimizadas las secuencias candidatas finales, éstas fueron clonadas en vectores plasmídicos de expresión, punto en el que esta parte se encuentra actualmente. Estos plásmidos de expresión se introducirán por transfección en células factoria, las cuales producirán *in vitro* estos fragmentos proteicos. Tras su recolección y purificación, estos fragmentos (antígenos) serán inyectados en ratones para la producción de anticuerpos (inmunización).

1.8-Creación de modelos celulares para la selección de la librería de anticuerpos. En paralelo al punto 1.7, se han de crear modelos celulares que expresen ICAM-1 de humano, ratón, cerdo, perro y primate.

Esto es necesario ya que la librería de anticuerpos tendrá que incubarse en procesos iterativos con estos modelos celulares para identificar aquellos anticuerpos de la librería que son capaces de reconocer estas dianas de manera “universal”. Esto conlleva la creación de RNA mensajero sintético o su aislamiento de muestras de tejidos con las secuencias de ICAM-1 estas especies, su retrotranscripción para formar DNA complementario, su secuenciación para la verificación de la integridad de su secuencia, inserción en vectores (plásmidos) de expresión, su introducción en células negativas para la expresión de ICAMs para evitar resultados confusos, y su expresión en estos modelos celulares para ser usados para la selección de la librería. Actualmente estamos comprobando la expresión de estos modelos celulares.

Entregables planificados durante este período (15 meses) dentro del Objetivo 1. Por los problemas científico- técnicos, la complejidad descrita y el cierre/restricciones debidos a la pandemia, este objetivo se halla al 80% de ser completado y se prevé que para los 18 meses se haya completado.

CONCLUSIONES GENERALES (M15)

Se ha identificado finalmente una región de ICAM-1 con homología alta entre las diferentes especies de animales y humano, con homología mínima entre ICAM-1 y otras ICAMs, localizadas en la superficie de la proteína y por tanto accesible a anticuerpos, no involucradas en modificaciones post-transcripcionales que también podrían afectar el acceso y con buenas predicciones de inmunogenicidad. Asimismo, que han clonado estas secuencias para su producción *in vitro* para inmunizar ratones y también se han clonado las ICAM-1 de humano, ratón, cerdo, perro y simio para la creación de modelos celulares necesarios para seleccionar la librería de anticuerpos. Aunque solo se ha completado el 80% del objetivo 1 y prevemos acabar solo este objetivo a la finalización del proyecto (18 meses), queremos expresar que se trata del objetivo más dificultoso y complejo y que ya hemos asegurado financiación adicional de fondos públicos competitivos para complementar los objetivos 2 y 3 que no podrán ser ejecutados en el plazo de este proyecto, pero que nos permitirá llevarlos a cabo durante 2021-22. Sin embargo, al cumplir el objetivo 1 podemos considerar que el proyecto ha sido exitoso al ser este el objetivo fundamental y necesario que proveerá de anticuerpos en los siguientes pasos.

EXPLICACIÓN DE LOS GASTOS

En la campaña Faster Future 2018 “Vamos a por el Parkinson” iniciada por el IBEC, se ha conseguido recaudar para este proyecto un total de 28.957,20 € provenientes de donaciones particulares y de empresas. Por otro lado, el grupo liderado por la Prof. Silvia Muro ha conseguido financiación adicional en la convocatoria competitiva “Proyectos I+D+i 2018, modalidad Retos Investigación” del Ministerio de Ciencia e Innovación, para el proyecto “CROSSTARGET: Desarrollo de nuevas herramientas traslacionales multi-especie para el direccionamiento de terapias con precisión de órgano y subcelular” (ref. RTI2018-101034-B-I00), cuyos objetivos se alinean y amplían los del presente proyecto. Este apoyo adicional confirma el interés de esta línea de investigación llevada a cabo por el grupo, y de manera particular, el desarrollo de anticuerpos universales que ayuden a acelerar las fases preclínicas de desarrollo de terapias dirigidas para que los pacientes puedan tener acceso a ellas en un menor rango de tiempo. De esta manera, se dispone de 170.000 € adicionales provenientes de financiación pública competitiva que han servido para co-financiar las actividades del presente proyecto, tal y como se ha descrito en la propuesta.

Gracias a la financiación conseguida, se ha podido contratar personal investigador (total 45.900 €). Esto incluye a una investigadora post-doctoral durante 9 meses, que ha realizado tareas de análisis del receptor ICAM-1 para la identificación de regiones útiles para la inmunización de animales y la creación de una librería de anticuerpos. Asimismo, se ha contratado a un asistente de investigación involucrado en la creación de varios modelos celulares que expresan el receptor ICAM-1 de cada una de las especies de animales de interés para la selección de anticuerpos usando dicha librería. Este asistente actualmente disfruta de una beca predoctoral del Ministerio de Ciencia e Innovación para desarrollar su tesis doctoral en la temática del proyecto.

Por otro lado, la mayor parte de los gastos incurridos hasta el momento han sido de material de laboratorio necesario para los experimentos desarrollados (36.500 €), como son material para cultivos celulares (placas, medios de cultivo y suplementos, líneas celulares de varias especies y peces cebra para su obtención, etc.), tubos, filtros, viales, columnas de separación, solventes, soluciones tamponadas, anticuerpos comerciales, plásmidos, nucleótidos y encimas, kits de aislamiento de ARN, síntesis de ADN complementario, reactivos para PCR, geles para separación de ácidos nucleicos y proteínas, y marcadores fluorescentes. También se han utilizado servicios científico-técnicos necesarios para el desarrollo de los experimentos (3.850 €) como son los análisis de citometría de flujo, purificación de anticuerpos, cromatografía, microscopía confocal y servicios de síntesis de genes a la carta y secuenciación.