



Informe Justificativo

Campaña Faster Future “Vamos a por el Parkinson”

Fecha de presentación del informe: 16 de Julio de 2021

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 glucocerebrosidasa (GBA), una proteína que "digiere" ciertas grasas en las células, constituyen el principal factor genético 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 la GBA inyectada 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) a algunos tipos de receptores endoteliales. Los anticuerpos contra esos receptores endoteliales se podrían conjugar con GBA para permitir el paso al cerebro de esta molécula terapéutica. Desafortunadamente, los **anticuerpos disponibles frente a esos receptores endoteliales sólo reconocen los receptores de una especie en concreto**, es decir, se dirigen al receptor de ratón o al receptor de primates no humanos, o al receptor humano, pero no al receptor de todas estas especies. Dado que cualquiera terapia nueva 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 los ensayos en humanos, la falta de un anticuerpo que reconozca el receptor endotelial 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 al receptor endotelial de interés 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**, lo que se buscará en proyectos posteriores. Además, este anticuerpo podría usarse como una valiosa herramienta para otros científicos que estudian la biología y patologías asociadas al receptor endotelial de interés 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 el receptor endotelial de interés 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 al receptor endotelial de interés, 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 e incidencias asociadas posteriores han causado un retraso acusado en el mismo. Asimismo, hemos encontrado dificultades técnicas impredecibles y significativas en el primer objetivo, que han triplicado el esfuerzo y tiempo requerido para el mismo, por lo que no se ha conseguido completar el proyecto. No obstante, se ha avanzado paralelamente en aspectos necesarios y valorizadores tanto para el punto 3 como para el avance posterior del proyecto, preparando el camino para la traslación clínica futura de la terapia propuesta. Por ejemplo, se han desarrollado nuevos modelos celulares que expresan receptores endoteliales de diferentes animales. Igualmente, se ha incorporado en el proyecto un estudiante de doctorado que ha obtenido una beca del Ministerio de Ciencia e Innovación y, adicionalmente, otra estudiante que ha obtenido una beca del programa de doctorado internacional de IBEC se ha incorporado con un contrato puente de asistente de investigación mientras su beca se activa. Asimismo, una estudiante ha podido escribir su tesis y obtener su título de máster gracias a su contribución al proyecto y dos estudiantes de grado están acabando su tesis también versada en el proyecto, lo que habilitará su graduación. 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, que se corresponden a las actividades llevadas a cabo para la consecución del objetivo 1 y avances paralelos conseguidos que lo complementan y valorizan.

Objetivo 1-Identificación de un anticuerpo que reconozca el receptor endotelial de interés 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 los objetivos. Un número significativo de pasos adicionales o alternativos a los originalmente planeados han sido necesarios para solventar las dificultades técnicas impredecibles encontradas en su realización.

1.1-Identificación de regiones del receptor endotelial de interés de máxima homología entre especies. Para obtener anticuerpos que reconozcan el receptor endotelial de interés en humanos y especies animales usadas en ensayos preclínicos, los cuales son necesarios para demostrar seguridad y eficacia y obtener aprobación para ensayos futuros en humanos, hay que inmunizar ratones con el fragmento de la proteína del receptor endotelial de interés 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 del receptor endotelial de interés en estas especies (Figura 1) resultó en la identificación de nueve regiones de gran similitud, con las que se continuó hacia los pasos siguientes.

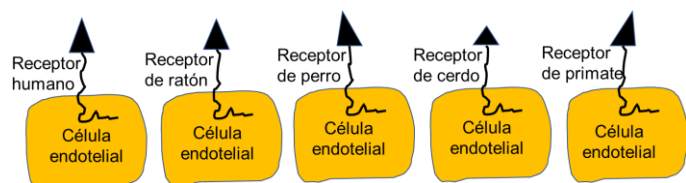


Figura 1. Esquema simplificado del receptor de interés en humano y otras especies, conteniendo regiones con diferente grado de similitud.

1.2-Comprobar que las regiones identificadas presentan mínima homología con otros receptores endoteliales. En humanos, existen varias proteínas muy similares, de la misma familia proteica, al receptor endotelial de interés. Es clave que el anticuerpo a desarrollar no las reconozca para que sea específico del receptor endotelial de interés y no de éstas otras proteínas parecidas. Por tanto, las regiones de similitud entre especies identificadas en el paso anterior no deberían ser similares a éstas otras proteínas de la misma familia del

receptor del interés (Figura 2). Desafortunadamente, la comparación de las secuencias indicó que las regiones previamente identificadas tenían una similitud importante con otras proteínas de la misma familia y debían ser descartadas, al correr el riesgo de no ser específicas para el receptor endotelial de interés. Finalmente, se decidió continuar con tres secuencias que mejor cumplieran 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.

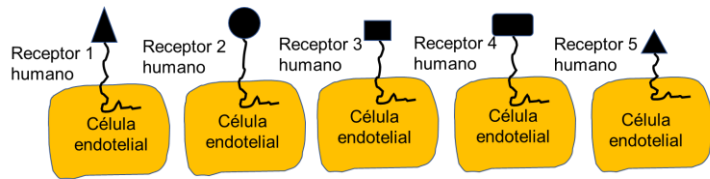


Figura 2. Esquema simplificado de la estructura de los receptores endoteliales humanos de la misma familia proteica.

1.3-Validar que las regiones identificadas son accesibles en la superficie del receptor endotelial de interés. A través de la implementación de los análisis 1.1 y 1.2, los cuales están basados en análisis de secuencias primarias, no es posible saber si estas regiones están localizadas en la superficie del receptor, donde pueden ser reconocidos por anticuerpos, o si están plegadas en el interior de su estructura, donde estarían ocultos a los anticuerpos (Figura 3). Por tanto, en paralelo a los pasos 1.1 y 1.2, se realizó un estudio para localizar estas regiones. Cabe explicar que un problema científico-técnico encontrado en este punto fue que no se disponía de la estructura cristalizada del receptor de interés, lo que requirió de predicciones matemáticas con algoritmos de plegamiento complejos para poder identificar regiones superficiales y accesibles en los demás dominios, alargando esta parte del estudio. Como resultado, se descartaron varias regiones ocultas y se continuó con aquellas expuestas en la superficie de la proteína.

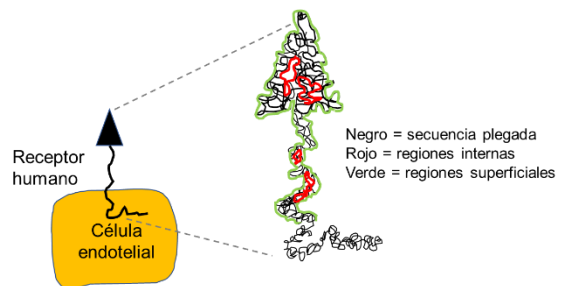


Figura 3. Ejemplo regiones en la superficie de un receptor endotelial y otras ocultas debido a su plegamiento.

1.4-Examinar que las regiones identificadas no están bloqueadas por modificaciones post-traduccionales. La proteína receptor de interés posee modificaciones naturales consistentes en puentes disulfuro y glicosilaciones. 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. 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 del receptor endotelial de interés donde ocurren estos dos tipos de modificaciones porque de ser así su reconocimiento estaría 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 aquellas que no están afectadas por estas modificaciones.

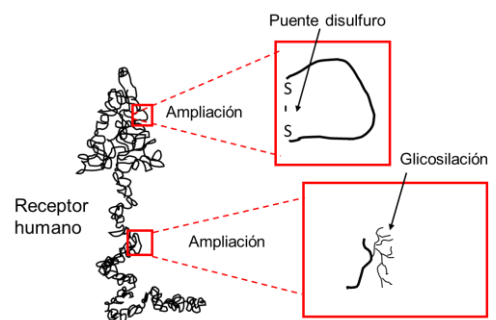


Figura 4. Modificaciones post-traduccionales en el receptor endotelial de interés.

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 entre 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 del receptor endotelial de interés y éstas se cotejaron con las regiones identificadas anteriormente. Se usaron diferentes bases de datos y algoritmos matemáticos para analizar secuencialmente los epítomos lineares, su conformación, su escala de accesibilidad superficial, la escala antigénica y finalmente predictores de

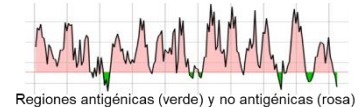


Figura 5. Ejemplo de predicción DiscoTop de secuencias antigénicas para linfocitos B productores de anticuerpos.

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 seleccionó una de las secuencias candidatas.

1.6-Optimización de la secuencia determinada para inmunización en ratón. La secuencia determinada por todos los pasos anteriores. 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 sintética y recombinante de las secuencias finales para su uso como antígenos. Una vez identificadas y optimizadas las secuencias candidatas finales y dependiendo de su longitud y características fisicoquímicas, éstas fueron bien sintetizadas *in vitro* o clonadas en vectores plasmídicos de expresión, para su introducción por transfección en células factoria, de manera que de ambas formas se podrían producir *in vitro* estos fragmentos proteicos (antígenos). Desafortunadamente, los resultados indicaron que, a pesar de las predicciones en el punto 1.5, estas secuencias no son lo suficientemente inmunogénicas para producir anticuerpos tras su inyección. Este problema es impredecible a priori y puede ocurrir por diferentes razones, por ejemplo, porque la secuencia de aminoácidos, cuando se produce independientemente del resto de la proteína, no se pliega en la conformación que tiene cuando ésta forma parte de la proteína completa. Esto, junto con las múltiples iteraciones necesarias en los puntos 1.1-1.5, ha impedido completar el proyecto. Actualmente estamos evaluando alternativas para solventar este problema, tal como expresar de manera recombinante estas secuencias como parte de otras proteínas cuya inmunogenicidad se conoce y es alta, ya que esta estrategia se ha usado en el pasado con problemas similares.

1.8-Creación de modelos celulares para la selección de la librería de anticuerpos. En este proyecto se han creado cinco nuevos modelos celulares que expresen, respectivamente, el receptor endotelial de interés de humano, ratón, cerdo, perro y primate. Este punto no estaba previsto originalmente dado que se preveía el uso de células comerciales aisladas de estas especies. Sin embargo, varias de las células disponibles no expresaron al receptor endotelial de interés en cultivo o sus niveles de expresión eran muy diferentes entre sí, además de proceder de diversos tejidos, lo que añadiría confusión a la interpretación de los resultados.

Tener modelos celulares adecuados es necesario para el proyecto ya que la librería de anticuerpos, una vez solventado el problema expuesto en el punto 1.6, tendrá que incubarse en procesos iterativos con estos modelos celulares para poder identificar aquellos anticuerpos de la librería que son capaces de reconocer estas dianas de manera “universal”. El proceso de creación de estos modelos celulares ha conllevado varios pasos. Primero, se identificó una línea celular que no expresara al receptor de interés (Figura 6), como plataforma de partida para después expresar al receptor endotelial de interés de diferentes especies bajo este patrón celular.

Posteriormente, se creó RNA mensajero sintético o se aisló de tejidos, con las secuencias del receptor endotelial de interés de todas estas especies. Dichos RNA mensajeros se retrotranscribieron para formar DNA complementarios, se secuenciaron para verificar de su integridad, se insertaron en vectores de expresión y se introdujeron en la plataforma celular que no expresaba al receptor endotelial de interés de forma intrínseca. Esto dio lugar a cultivos celulares donde las células expresaban el receptor de interés con las secuencias de humano (Figura 7), ratón, cerdo, perro o primate.

Dichos modelos se sometieron a un proceso de selección para establecer la expresión del receptor endotelial de interés de forma permanente y obtener cultivos donde todas las células expresaran el receptor endotelial de interés (Figura 8). Estos nuevos modelos que se han creado para las especies implicadas y permitirán

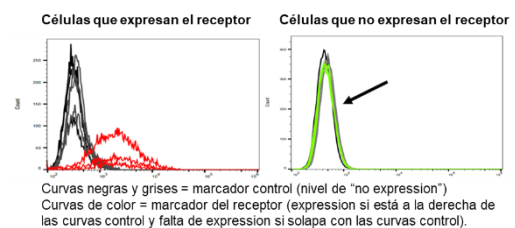


Figura 6. Identificación de una línea celular sin receptor para construir los modelos requeridos.



Figura 7. Identificación de una línea celular sin receptor para construir los modelos requeridos.

seleccionar de la librería aquellos anticuerpos que sirvan para reconocer universalmente tejidos y células del organismo donde se exprese el receptor endotelial de interés. Asimismo, estos modelos permitirán a la comunidad científica estudiar la función biológica del receptor endotelial de interés, su implicación en patología y el diseño de estrategias terapéuticas para otros muchos fines.

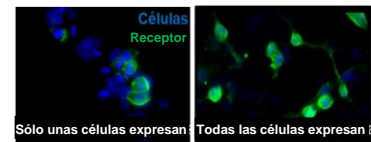


Figura 8. Modelos celulares de expresión del receptor de interés.

Objetivo 2-Fabricación de suficiente anticuerpo para caracterizar su especificidad y afinidad o fuerza de unión a al receptor endotelial de interés. Este objetivo no se ha podido abordar, pero se completará en el proyecto del Plan Estatal de I+D+i del Ministerio de Ciencia e Innovación. Se han establecido, sin embargo, métodos para la producción recombinante de los anticuerpos una vez identificados y la cuantificación de su afinidad.

Objetivo 3-Verificación de la habilidad del anticuerpo de cruzar la barrera hematoencefálica en modelos de laboratorio. Este objetivo no se ha podido cumplir, pero se completará dentro del proyecto activo del Plan Estatal de I+D+i del Ministerio de Ciencia e Innovación.

CONCLUSIONES GENERALES

Se ha identificado una región del receptor endotelial de interés con homología alta entre las diferentes especies de animales y humano, con homología mínima con otros receptores endoteliales, 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 se han derivado varias modificaciones de la misma. Asimismo, se han clonado estas secuencias para su producción *in vitro* para inmunizar ratones. Igualmente, se han producido modelos nuevos celulares que expresan al receptor endotelial de interés de humano, ratón, cerdo, perro y simio. Estos modelos son imprescindibles para la identificación y caracterización de anticuerpos “universales” y servirán de ayuda en el campo de la biología y la terapia dirigida al receptor endotelial de interés. Aunque solo se ha completado el 90% del objetivo 1, prevemos acabar este objetivo, así como los objetivos 2 y 3, gracias a la financiación pública extra obtenida durante el resto de 2021 y el 2022.

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 pública competitiva para el 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. Este proyecto se extenderá hasta el 31/12/2022 para finalizar las tareas indicadas anteriormente.

Gracias a los fondos provenientes de ambas fuentes de financiación, se ha podido contratar personal investigador (total 56.000 €). Esto incluye a una investigadora post-doctoral durante 9 meses, que ha realizado tareas de análisis del receptor endotelial de interés 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 durante 10 meses involucrado en la creación de varios modelos celulares que expresan el receptor de interés 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. Adicionalmente, una segunda asistente de investigación ha sido contratada, la cual acaba de conseguir una beca del programa de doctorado internacional de IBEC y que está ayudando con la re-derivación de los modelos celulares que expresan el receptor de interés y que hará el biopanning de la librería de anticuerpos. En resumen, el personal involucrado en el proyecto han sido una investigadora post-doctoral, y dos estudiantes de doctorado que continúan involucrados en el 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 (44.500 €), 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 RNA, síntesis de DNA 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 (4.540 €) como son los análisis de citometría de flujo, purificación de anticuerpos, cromatografía, microscopía confocal, servicios de síntesis de genes a la carta y secuenciación.