TRATAMIENTO COMBINADO DE LAS CÉLULAS PRECURSORAS NEURALES Y UN NANOCONJUGADO DE FASUDIL PARA APLICACIÓN CLÍNICA EN LESIÓN AGUDA DE MÉDULA ESPINAL

Dr. Ferran Pellisé Urquiza
Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebron - VHIR
Dra. Maria Jesús Vicent Docón
Centro de Investigación Príncipe Felipe - València

1. Resumen

En este trabajo hemos generado un tratamiento combinatorio de células precursoras neuronales derivadas del tejido de la médula espinal (NPC) condicionadas por el tratamiento con un nuevo nanoconjugado de fasudil (PGA-SS-FAS) para el tratamiento de lesiones agudas de la médula espinal (LM) en condiciones de grado clínico. Para ello, en primer lugar, generamos un banco de células de NPCs humanas a partir de tejido fetal (hfNPCs) de médula espinal procedente de interrupciones gestacionales legales durante el segundo semestre (19-21 semanas) y fabricamos PGA-SS-FAS de grado clínico y a gran escala. Las hfNPCs expandidas *in vitro* conservaron las características neuronales y de multipotencia manteniendo una suficiente capacidad de autorrenovación, lo que permitió la generación de un banco de células para la aplicación en tratamientos alogénicos. En segundo lugar, establecimos un procedimiento simple para estimular las hfNPCs mediante un tratamiento el día previo a la administración celular, con 50 μM de PGA-SS-FAS, que induce una mejor diferenciación neuronal y ayuda a superar la retracción de las neuritas que ocurre tras el estímulo lesivo posterior al daño de la médula espinal, mediante la activación de Rho-Rock. Las HfNPCs estimuladas y trasplantadas en un ratón inmunodeficiente (NU(*NCr*)-Foxn1nu) inmediatamente después de una LM por compresión torácica, en comparación con células no estimuladas previamente, inducen: 1) una mayor migración de las células trasplantadas en todo el tejido lesionado; 2) un aumento de la preservación de las interneuronas somatosensoriales Lbx1 inhibidoras GABAérgicas y Tlx3 excitatorias glutamatérgicas; 3) un aumento del número de neuronas conservadas y activadas, positivas para c-fos, que rodean el epicentro de la lesión. En general, las nuevas líneas de hfNPC generadas, estimuladas con un tratamiento previo, *in vitro*, con un nuevo polímero conjugado de fasudil, proporcionaría un tratamiento mejorado para el tratamiento de LMs agudas.

2. Resultados

Fabricación pseudo-GMP del conjugado PGA-SS-FAS, un nanoconjugado con propiedades inhibidoras de rock-2

Se implementó un proceso de fabricación similar a GMP para la producción de nanoconjugado PGA-SS-Fasudil. El protocolo de fabricación consta de 3 pasos: 1) la

polimerización y desprotección del ácido poli-L-glutámico; 2) la síntesis y purificación del ligador disulfuro-Fas, y 3) la conjugación covalente del resto del ligador Fas al poli-L-portador de ácido glutámico. Se obtuvo una muestra de prueba de 5 g con la síntesis optimizada siguiendo este proceso como validación. También se sintetizó un lote de 20 g del enlace autoinmolativo de fasudil como parte más sensible, fasudil no GMP, y se almacenó sin degradación. Se incluyó una evaluación previa de riesgos en un entorno no GMP, producción de lotes no GMP para estudios preclínicos, controles en proceso y liberación de lotes. Después del estudio de análisis de riesgo (AR) bajo las pautas Quality-Risk Management ICH Q9 siguiendo una metodología FMECA ejecutada con el apoyo de PTS basada en la síntesis optimizada de PGA-SS-Fasudil, el enlace de fasudil autoinmolativo es el paso crítico debido a su inestabilidad.

Además, todos los métodos de análisis (MoA), incluidos los MoA calificados, el conjunto de estándares de referencia, los controles en proceso y los MoA de productos intermedios y finales, se han desarrollado y ajustado para su uso en futuros ensayos clínicos con nanoconjugados. Finalmente, también se ha elaborado un paquete técnico de transferencia de procesos a fabricación GMP para acelerar el proceso de traducción.

Las hfNPCs aisladas desde médula espinal fetal proliferan, se expanden *in vitro* y expresan marcadores neurales característicos de células progenitoras neurales: Los homogenados de la médula espinal fetal humana completa sirvieron para aislar y expandir hfNPCs con una intervención mínima en cultivos formadores de neuroesferas que permiten aislar precursores neurales y favorecen su autorrenovación de forma (Reynolds y Rietze, 2005) en condiciones de flotación, tal y como se aprecia en la Fig. 1A, a 2 DIV (días *in vitro*) en presencia de los factores mitóticos bFGF, EGF y LIF. Sin embargo, tal como se ha descrito anteriormente para NPCs de humanos adultos (Mothe, Zahir, Santaguida, Cook y Tator, 2011), encontramos que la propagación de hfNPCs a largo plazo fue más eficiente cuando las hfNPCs se cultivan como una monocapa adherente que en suspensión (Figura 1B).

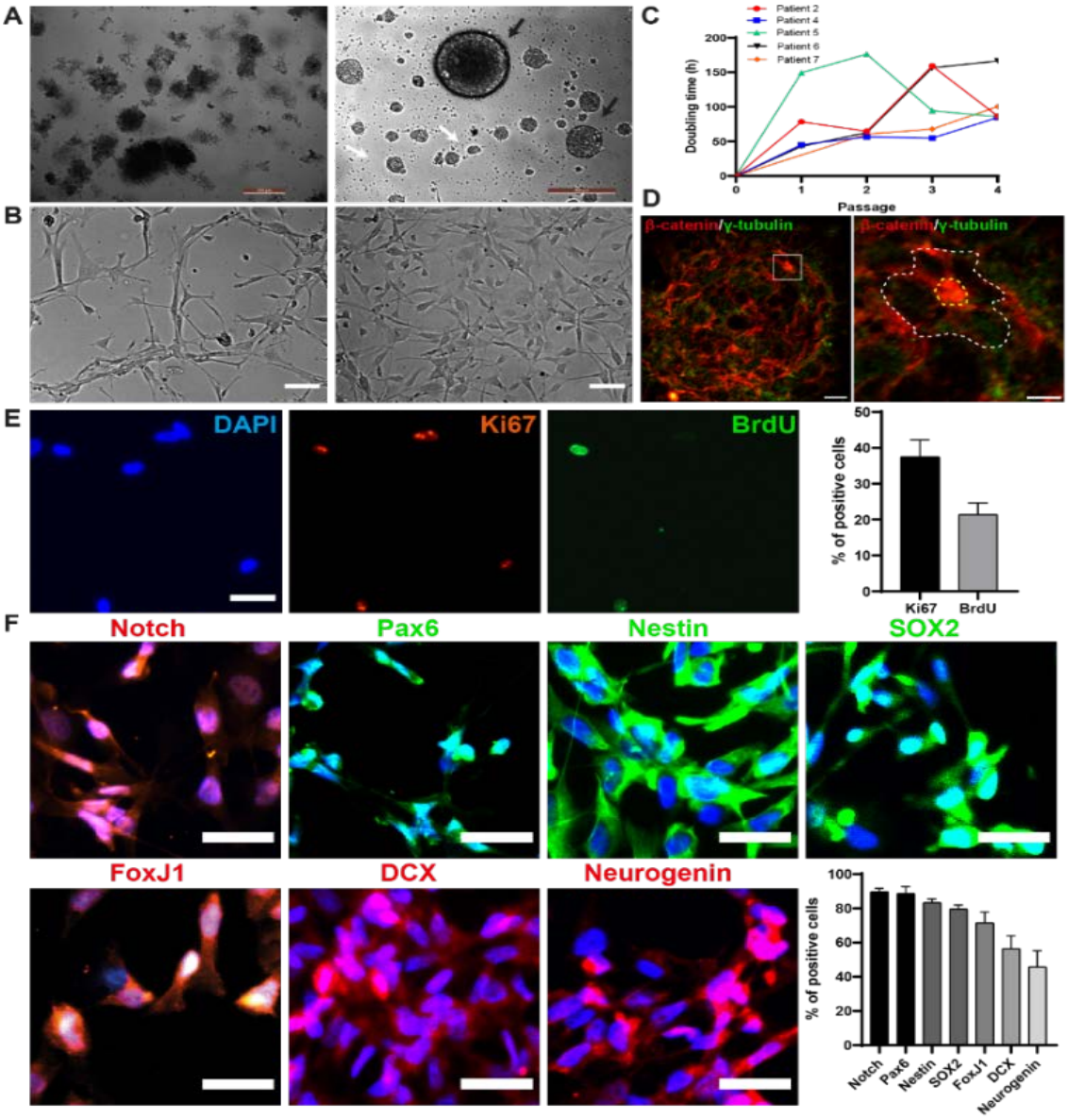

Figura 1. Expansión in vitro de hfNPCs pansion.

Después del subcultivo al alcanzar el 80% de confluencia, se calculó el tiempo de duplicación celular (PDL-t) para la población de NPCs hasta durante al menos cuatro pases (Figura 1C). Para estudiar si nuestras hfNPCs también forman estructuras similares a nichos neurogénicos, realizamos inmunotinciones contra γ-tubulina, que reconoce centros organizadores de microtúbulos, centrosomas y cuerpos basales y β-catenina para delinear los bordes celulares tal y como se describió previamente en otros modelos (Rodríguez-Jiménez, Clemente, Moreno-Manzano y Erceg, 2019). Por primera vez, describimos que el cultivo *in vitro* de neuroesferas hfNPC derivadas de la médula espinal humana adopta estructuras de molinete y muestra características neuronales durante las etapas de desarrollo fetal (Figura 1D). Los cultivos de hfNPCs mostraron capacidad proliferativa, 21,4 ± 3,3% de las células se hallaban en proceso

de mitosis, ya que incorporaron BrdU, y alrededor del 37,5 ± 4,7% fueron positivas para Ki67 (Figura 1E). Para determinar si las hfNPCs expresaban marcadores neurales canónicos (Figura 1F), examinamos la expresión de Notch1, Pax6, nestina, Sox2, FoxJ1, doublecortin (DCX) y neurogenina.

Las hfNPCs en cultivo expresaron mayoritariamente Notch1 y Pax6 (90,5 ± 13,8% y 91,7 ± 4,4% de células positivas, respectivamente). Pax6 regula la proliferación y la autorrenovación de las NPCs (Sansom *et al.*, 2009) y Notch, al activarse, se traslada al núcleo y lidera el mantenimiento de la troncalidad (Imayoshi, Sakamoto, Yamaguchi, Mori y Kageyama, 2010). Las hfNPCs son positivas para nestina en un 83,4 ± 2% y para Sox2 en un 79,7 ± 2,2%, tal como estaba previamente descrito en otros modelos de NPCs (Collignon *et al.*, 1996; Lendahl, Zimmerman y McKay, 1990). También determinamos la expresión de FoxJ1, que está específicamente involucrado en el mantenimiento de las células madre neurales en la médula espinal (X. Li *et al.*, 2018) y representa el 65 ± 6,4% de las células positivas. Además, la mitad de las hfNPCs de la población fueron positivas para DCX, lo que representó el 56,4 ± 7,4% de las células positivas, y para neurogenina, el 45,8 ± 9,5% de las células positivas, y tanto la neurogenina como el DCX estaban involucrados en la promoción de la neurogénesis (Brown *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2001).

El tratamiento previo con PGA-SS-FAS promueve la migración del trasplante y la diferenciación a estirpe neuronal de hfNPC: En primer lugar, para determinar la seguridad de la terapia, estudiamos la capacidad tumorígena e invasiva de los trasplantes de hfNPCs tratadas o con el conjugado, 4 semanas después del trasplante en tejido sano de la médula espinal. No encontramos ningún crecimiento tumorígeno o transformación fenotípica de las células trasplantadas en la médula espinal (Fig. 2A) y no detectamos ninguna invasión de células que expresan eGFP positivas en el cerebro, el corazón o el hígado (Fig. 2B). El análisis de inmunotinción demostró que las hfNPCs sobrevivieron en el sitio de la lesión, migraron y se integraron dentro de la médula espinal del huésped 4 semanas después del trasplante en animales no lesionados (Figura 2B) y lesionados (Figura 2F-G). Las hfNPCs estimuladas o no mostraron niveles de supervivencia similares en animales lesionados y no lesionados, lo que indica que el entorno de la lesión no afectaba a su supervivencia en animales inmunodeprimidos. Aunque PGA-SS-FAS no mostró ningún efecto sobre la supervivencia celular en animales lesionados (Figura 2H), las hfNPCs tratadas con PGA-SS-FAS mostraron una

mayor colocalización de c-fos (células GFP+/c-Fos+) (Figura 2I), y c-fos es un marcador asociado con la actividad neuronal (Hudson, 2018), lo que sugiere una integración funcional en el circuito de la médula espinal del huésped. Además, el tratamiento con PGA-SS-FAS mejoró la migración de hfNPCs en el parénquima de la médula espinal (Figura 2F) y también encontramos un porcentaje significativamente mayor de hfNPCs trasplantadas (PGA-SS-FAS hfNPC) en las áreas ventrales de la médula espinal (Figura 2G) en comparación con el grupo no tratado (hfNPCs). Además, el análisis realizado en animales no lesionados (datos no mostrados) reveló que el entorno de la lesión no influía en los patrones de supervivencia o migración de hfNPCs y, en este caso, las hfNPCs tratadas con PGA-SS-FAS también se distribuyeron de manera más uniforme. Una parte de las células trasplantadas expresaron los marcadores neuronales de las interneuronas somatosensoriales inhibidoras GABAérgicas positivas para Lbx1 y excitadoras glutamatérgicas positivas para Tlx3 (Figura 2J-L). Estos marcadores están involucrados en la determinación del destino neuronal de las poblaciones de interneuronas ubicadas en las astas dorsales de la médula espinal, y las interneuronas Lbx1 y Tlx3 modulan e integran las entradas somatosensoriales periféricas (Monteiro *et al.*, 2021). Encontramos que tanto Lbx1+ como Tlx3+ cercanas a las hfNPCs estaban localizadas en áreas dorsales de la médula espinal como poblaciones endógenas en astas dorsales.

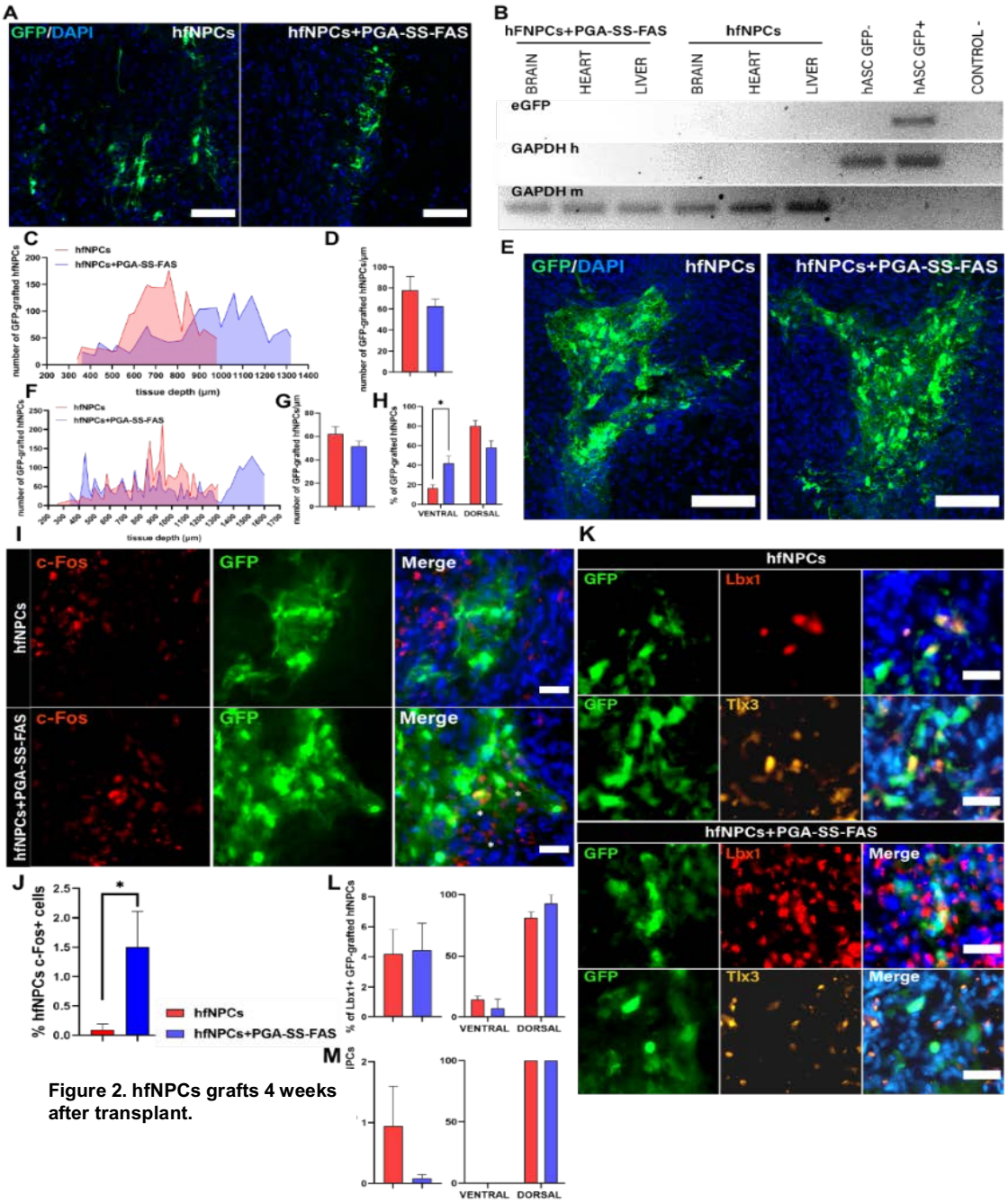

Figure 2. hfNPCs grafts 4 weeks after transplant.

3. Relevancia y posibles implicaciones futuras

La compleja naturaleza patológica de las lesiones medulares traumáticas requiere la implementación de una perspectiva terapéutica multifacética y versátil en cuanto al desarrollo de tratamientos. La aplicación única de estrategias únicas basadas en el trasplante de células, incluido el uso de células precursoras neurales (NPCs), ya ha mostrado efectos beneficiosos en aplicaciones clínicas. Hemos logrado una nueva estrategia para mejorar la terapia celular individual mediante una combinación de la NPC con un nuevo compuesto PGA-SS-FAS que ha demostrado ser un buen candidato para reforzar las capacidades regenerativas de las NPCs. Hemos implementado una metodología para estimular las células antes del trasplante con el fin de lograr una aplicación de tratamiento única con características mejoradas, como una mayor migración al área trasplantada y lesionada y una mayor activación celular, en un modelo de LM por compresión severa. Esta estrategia contribuirá a proporcionar un enfoque versátil y clínicamente relevante con potencial para su implementación en un futuro próximo en el tratamiento de la LM aguda.

4. Bibliografía científica generada

Giraldo E, Bonilla P, Mellado M, García-Manau P, Rodó-Rodríguez C, Alastrue A, López E, Carreras Moratonas E, Pellisé F, Đorđević S, Vicent MJ, Moreno V. *Primed Human Neural Precursor Cells with a Polymer-conjugate of Fasudil, a Rho/Rock inhibitor, for the treatment of acute spinal cord injuries*. (Manuscrito en preparación).

Moreno-Manzano V. *Ependymal cells in the spinal cord as neuronal progenitors*. Curr Opin Pharmacol. 2019 Dec 31;50:82-87. doi: 10.1016/j.coph.2019.11.008. Revisión.

Rojas-Márquez R, Giraldo-Reboloso E, Mellado-López M, Querol S, Moreno-Manzano V, Vives J. "Combinatory treatment of Neural precursor cells and a new nanoconjugate of Fasudil for the clinical application in Acute Spinal Cord Injury". Reunión anual TerCel, Red de Terapia Celular, ISCIII. Santiago de Compostela, 28-29 de noviembre de 2019. Póster.

Moreno-Manzano V, Giraldo E, Nebot V, Alastrué-Agudo A, Zagorodko O, Armiñán A, Mellado M, López E, Dordevic S, Vicent MJ. "Fasudil polyglutamate conjugate enhanced

neural stem cells survival and neurite elongation for cell therapy in spinal cord injury". SENC Conference, septiembre de 2019.

Giraldo E, Nebot V, Alastrué-Agudo A, Zagorodko O, Armiñán A, Mellado M, López E, Dordevic S, Vicent MJ, Moreno-Manzano V. "Fasudil polyglutamate conjugate enhanced neural stem cells survival and neurite elongation for cell therapy in spinal cord injury". Gordon Conference, junio de 2019.

Giraldo E, Nebot V, Zagorodko O, Alastrué-Agudo A, Martínez B, Dordevic S, Vicent MJ, Moreno-Manzano V. "A New Nanoconjugate Of Fasudil, For Spinal Cord Injury Treatment In Combination With Neural Precursor Cells". Comunicación oral y póster, ISCORE19, Barcelona, 13-14 de diciembre de 2019.

Vicent MJ. Ponente invitado. "Rationally Design Polypeptide-based Therapeutics. Gordon Research Conference on Cancer Nanotechnology". Juny de 2019.

Vicent MJ. Ponente invitado. PAPER ID: 3196043. "Polypeptide-based conjugates as versatile therapeutics as single agents or in combination therapy" (final paper number: PMSE 199). American Chemical Society (ACS) Annual Meeting & Exposition, San Diego, California, 25-29 de agosto de 2019.

European Patent Application: no. EP19382225.1 and PCT Application: PCT/EP2020/058940. WO2020193802A1. Coinventores: MJ Vicent, V Moreno, E Giraldo, VJ Nebot, R Requejo, A Armiñán, A Alustre, O Zagorodko, JJ Arroyo-Crespo, por "Conjugados poliméricos y usos de los mismos", a nombre de Fundación de la Comunidad Valenciana Centro de Investigación Príncipe Felipe y Fundación Step By Step.

Giraldo E, Nebot VJ, Đorđević S, Requejo-Aguilar R, Alastrué-Agudo A, Zagorodko O, Armiñán A, Martínez-Rojas B, Vicent MJ, Moreno-Manzano V. *A rationally designed self-immolative linker enhances the synergism between a polymer-rock inhibitor conjugate and neural progenitor cells in the treatment of spinal cord injury*. Biomaterials. 2021;276:121052. doi: 10.1016/j.biomaterials.2021.121052. Epub 2021 Jul 2.

Tesis doctoral:

"Human-Induced Neural and Mesenchymal Stem Cell Therapy Combined with a Curcumin Nanoconjugate as a Spinal Cord Injury Treatment". Estudiant doctoral: Pablo Bonilla (en preparación, fecha prevista de defensa: noviembre de 2021).