

## RESUMEN

### INTRODUCCIÓN:

Seralutinib es un inhibidor inhalado de tirosina quinasas que bloquea PDGFR $\alpha/\beta$ , CSF1R y c-KIT, con propiedades antiinflamatorias, antiproliferativas y antifibróticas. Actualmente se investiga en pacientes con hipertensión arterial pulmonar (HAP). Los beneficios clínicos observados en los estudios TORREY (fase 2, NCT04456998) y su extensión abierta (NCT04816604), junto con datos de tomografía computarizada, biomarcadores y estudios preclínicos, respaldan un efecto de remodelado inverso. Dado que PDGFR regula el tono vascular pulmonar mediante señalización de calcio, se buscó aclarar el mecanismo de acción (MOA) evaluando efectos agudos en modelos preclínicos de vasoconstricción.

### MÉTODOS:

Se estimularon células musculares lisas de arteria pulmonar (PASMC) con PDGF-BB y se trataron con seralutinib (0.1 y 1  $\mu$ M) o vehículo, midiendo flujo de calcio. En un modelo de vasoconstricción inducida por hipoxia en ratas, con monitoreo continuo de presión arterial pulmonar media (PAPm), se administró seralutinib (0.2 y 2 mg/kg), treprostinil (6  $\mu$ g/kg) o vehículo por vía intratraqueal. El efecto sobre tono vascular se evaluó en anillos de arteria pulmonar de ratón con seralutinib (hasta 10  $\mu$ M).

### RESULTADOS:

En PASMC, seralutinib inhibió el flujo de calcio inducido por PDGF-BB en todas las concentraciones. En el modelo de hipoxia, seralutinib produjo un efecto vasodilatador débil y transitorio, mientras que treprostinil normalizó PAPm durante todo el estudio. Ni PDGF-BB (50 ng/mL) ni seralutinib (10  $\mu$ M) modificaron la tensión en anillos arteriales.

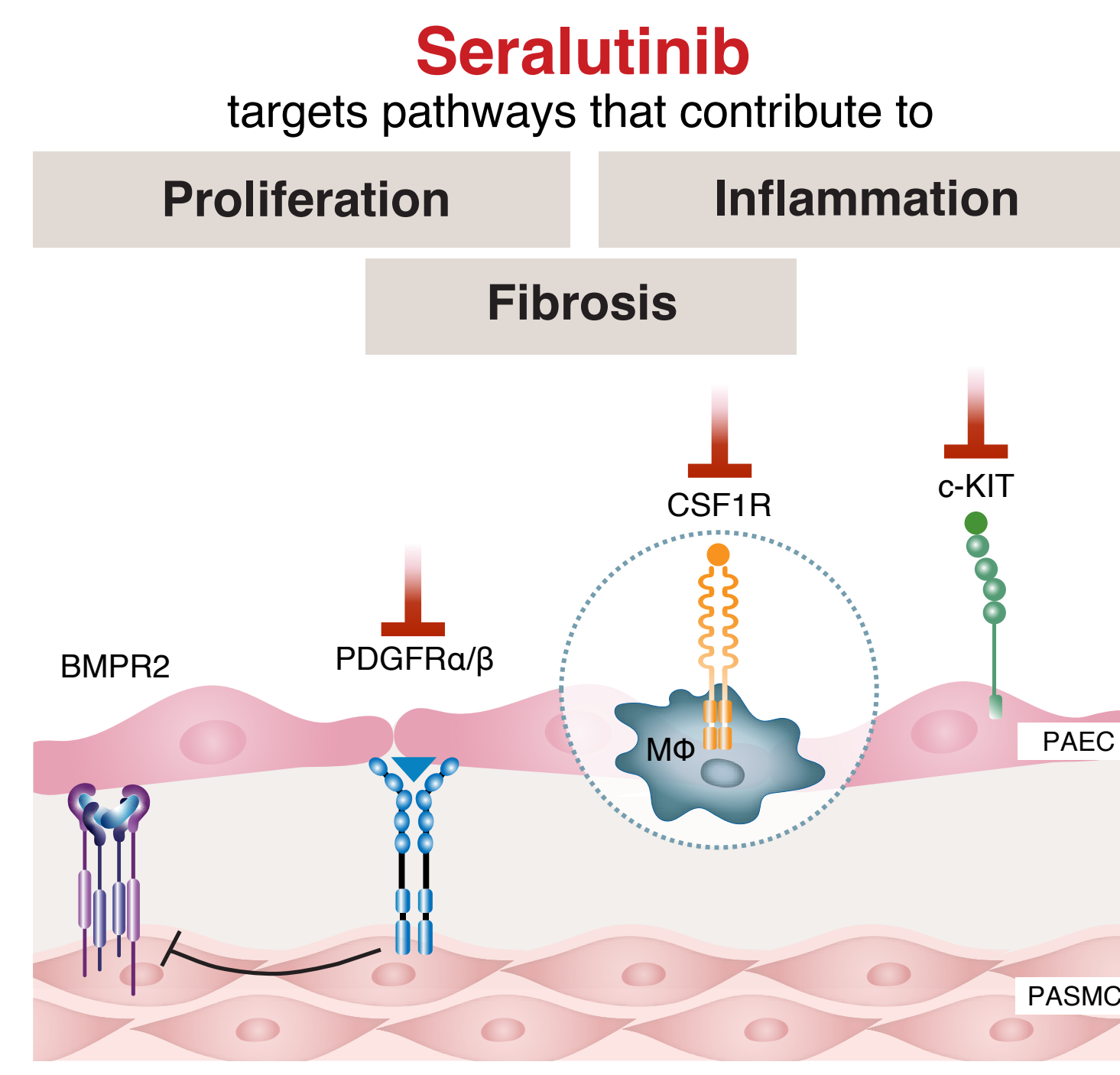
### CONCLUSIONES:

Aunque seralutinib inhibió eficazmente el flujo de calcio inducido por PDGF, no mostró efectos vasodilatadores significativos. Estos hallazgos sugieren que su MOA principal en HAP es el remodelado inverso, más que la vasodilatación, respaldando su papel como agente antiproliferativo y antifibrótico, diferenciado de terapias vasodilatadoras tradicionales.

## ANTECEDENTES

- Seralutinib es un inhibidor de tirosina cinasa inhalado dirigido a PDGFR $\alpha/\beta$ , CSF1R y c-KIT, con propiedades antiinflamatorias, antiproliferativas y antifibróticas<sup>1</sup> (Figura 1)
- Estudios de imagen por tomografía computarizada (CT), biomarcadores y estudios preclínicos de seralutinib apoyan de manera consistente una remodelación inversa de la vasculatura pulmonar en HAP<sup>2-4</sup>
- Los datos de la extensión abierta del estudio TORREY (NCT04816604) corroboran el potencial de un efecto de remodelación inversa, evidenciado por una mejoría continua en la resistencia vascular pulmonar y cambios en biomarcadores vasculares<sup>5,6</sup>
- La señalización mediada por PDGFR puede regular el flujo de calcio, lo cual podría modular el tono vascular *in vivo*<sup>7</sup>
- Buscamos profundizar en el mecanismo de acción de seralutinib investigando su efecto sobre la señalización de calcio y sus efectos agudos en modelos preclínicos de vasoconstricción

Figura 1. Mecanismo de acción de seralutinib



Las flechas atenuadas indican inhibición. BMPR2: receptor de proteína morfogenética ósea tipo 2; c-KIT receptor kit del factor de crecimiento de mastocitos/células madre; CSF1R: receptor del factor estimulante de colonias 1; M $\phi$ : macrófago; PAEC: célula endotelial de la arteria pulmonar; PASMC: célula de músculo liso de la arteria pulmonar; PDGFR: receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas.

## MÉTODOS

### Flujo de calcio en células de músculo liso de la arteria pulmonar humana (hPASMCs)

- Las hPASMC se pretrataron con seralutinib o bosentan y posteriormente se estimularon con PDGF-BB o endotelina-1, respectivamente
- Los niveles de Ca<sup>2+</sup> citosólico se midieron utilizando el ensayo Fura-2; las células se cargaron con el colorante Fura-2 y el colorante extracelular se eliminó mediante lavado

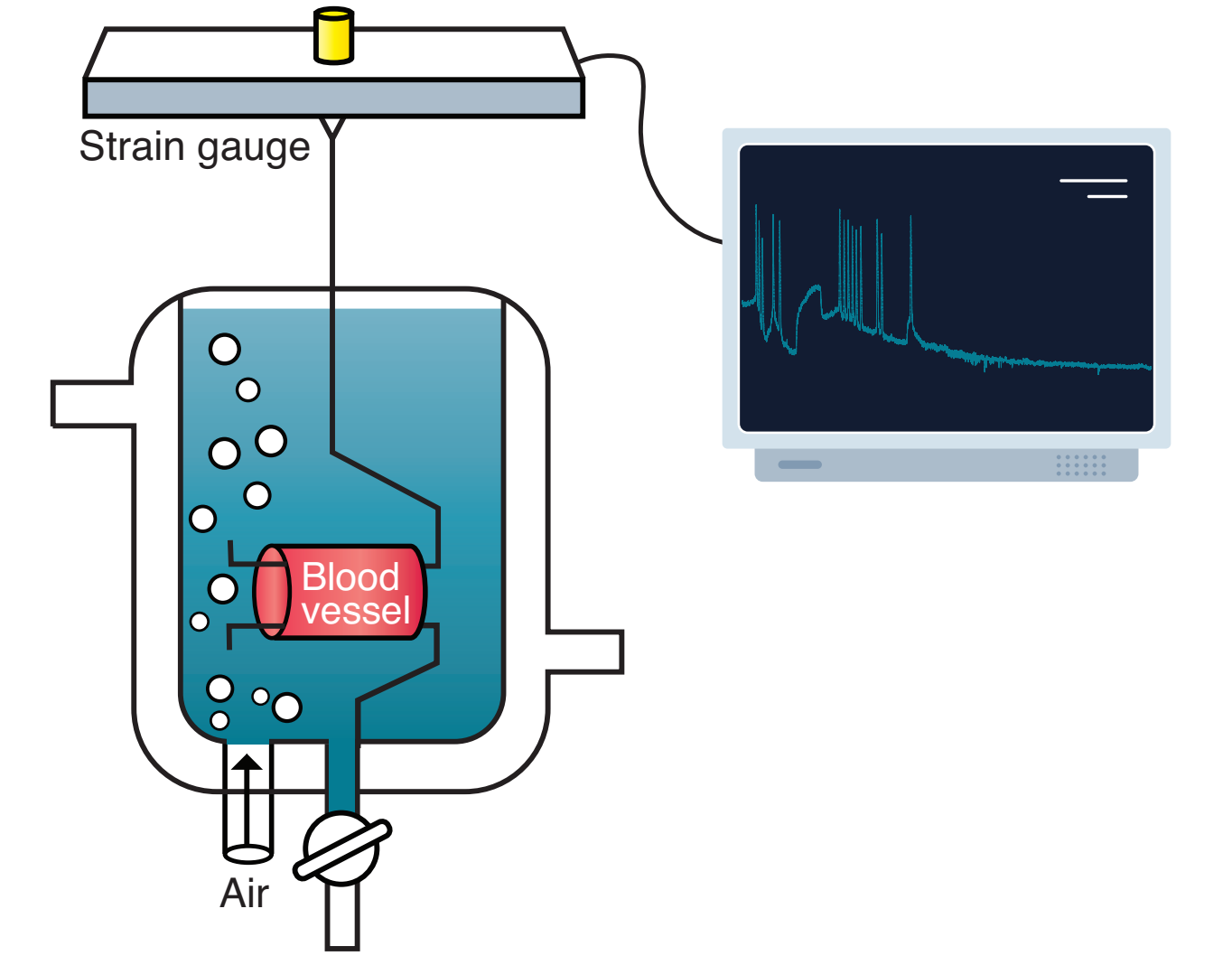
### Tono vascular en anillos de arteria pulmonar (PA) de ratón

- Los ratones C57BL/6 fueron eutanizados y se disecaron las arterias extrapulmonares
- Los segmentos vasculares se montaron en cámaras de miografía de hilo para medir la tensión del vaso (Figura 2)
- Se evaluaron los efectos de PDGF-BB sobre la tensión vascular con y sin seralutinib

### Presión arterial pulmonar media (PAPm) y presión arterial sistémica (SAPm) en un modelo de vasoconstricción pulmonar inducida por hipoxia aguda en ratas

- Se anestesiaron ratas macho Sprague-Dawley (275–300 g), se intubaron y se colocaron en ventilación mecánica asistida
- Se insertó un catéter en las arterias pulmonar y femoral para medir de manera continua la PAPm y la SAPm, respectivamente
- La hipoxia se indujo reduciendo la concentración de oxígeno inspirado a ~10 %
- Una vez que se estableció un pO<sub>2</sub> estable del 60%, se administró seralutinib, treprostinil o vehículo por vía intratraqueal utilizando un microsyrayer
- Las variaciones hemodinámicas se monitorizaron durante 45 minutos

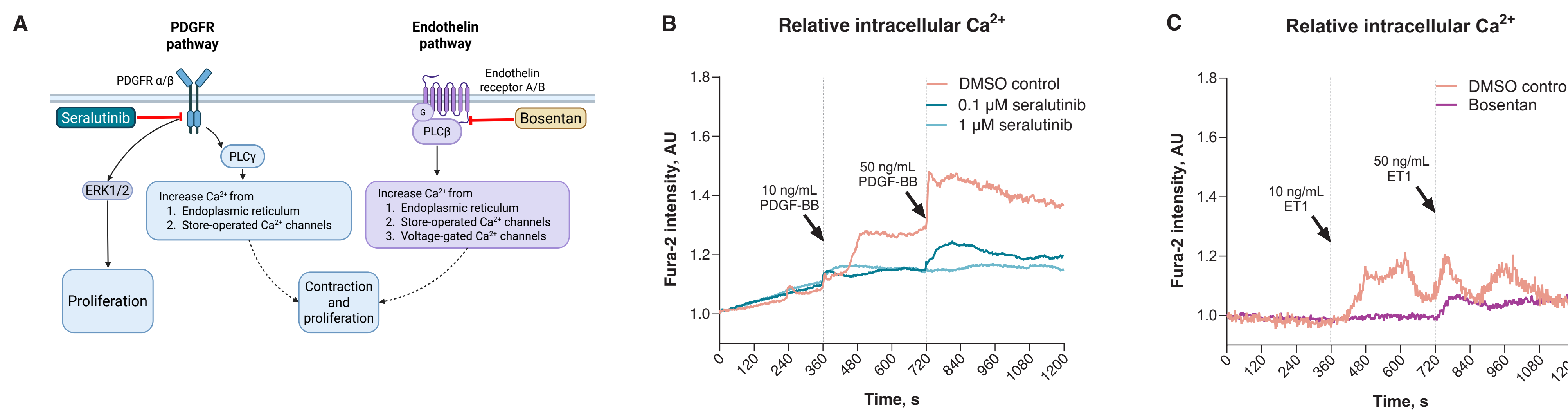
Figura 2. Configuración experimental de miografía de hilo



Los anillos de arteria pulmonar (PA) de ratón aislados se expusieron a los agentes, y se midió el cambio en la tensión vascular.

## RESULTADOS

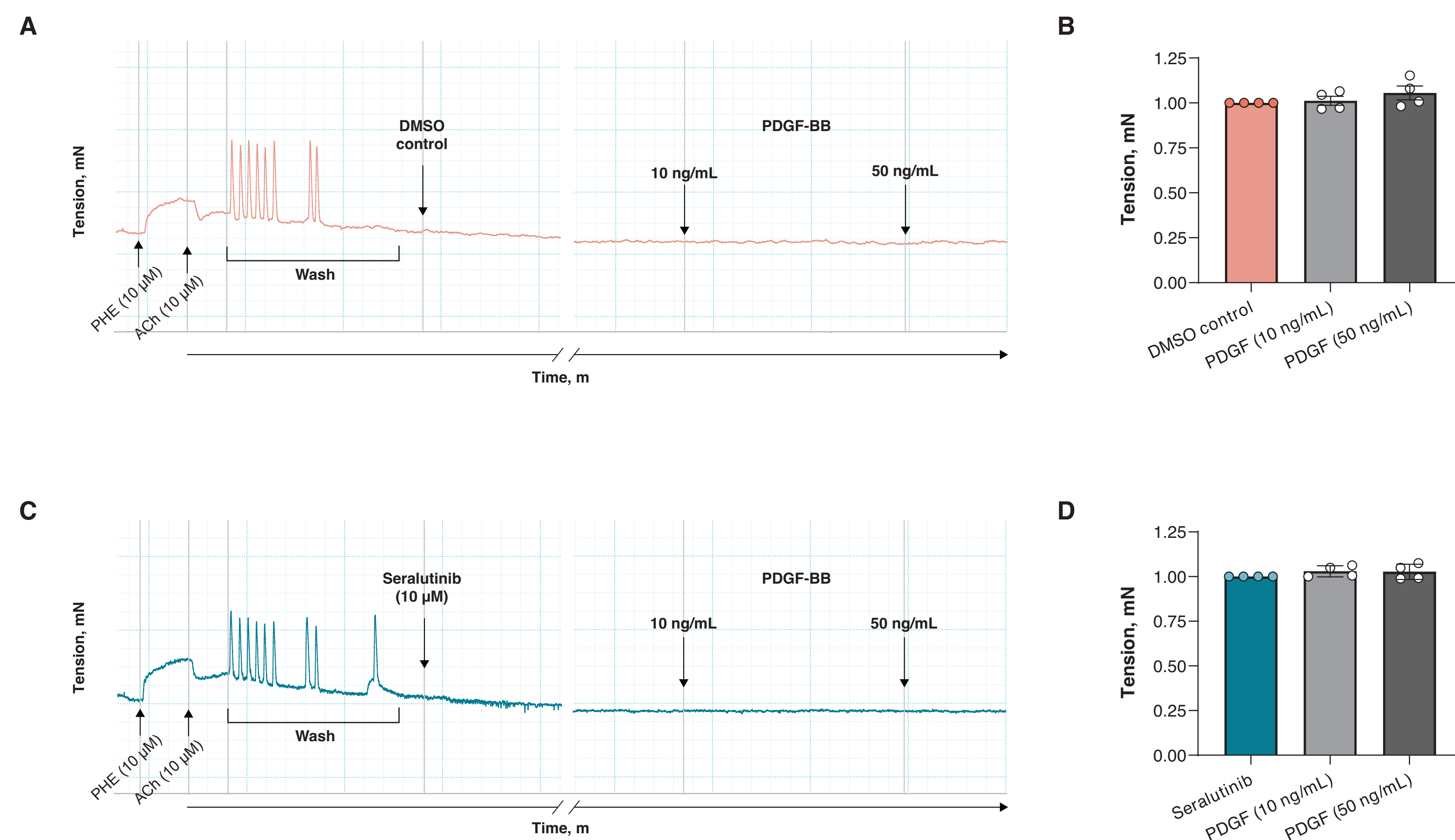
Figura 3. Seralutinib y bosentan inhiben el influjo de calcio (Ca<sup>2+</sup>) inducido por PDGF-BB y endotelina, respectivamente, en hPASMCs



(A) Diagrama del influjo de Ca<sup>2+</sup> inducido por PDGF-BB y endotelina-1, y de las vías de señalización aguas abajo. (B) El efecto de PDGF-BB, con o sin pretratamiento con seralutinib, sobre los niveles intracelulares de Ca<sup>2+</sup> se evaluó midiendo la intensidad de Fura-2 (relación 340/380 nm vs basal). (C) El efecto de la endotelina-1, con o sin pretratamiento con bosentan, sobre los niveles intracelulares de Ca<sup>2+</sup> se evaluó midiendo la intensidad de Fura-2 (relación 340/380 nm vs basal).

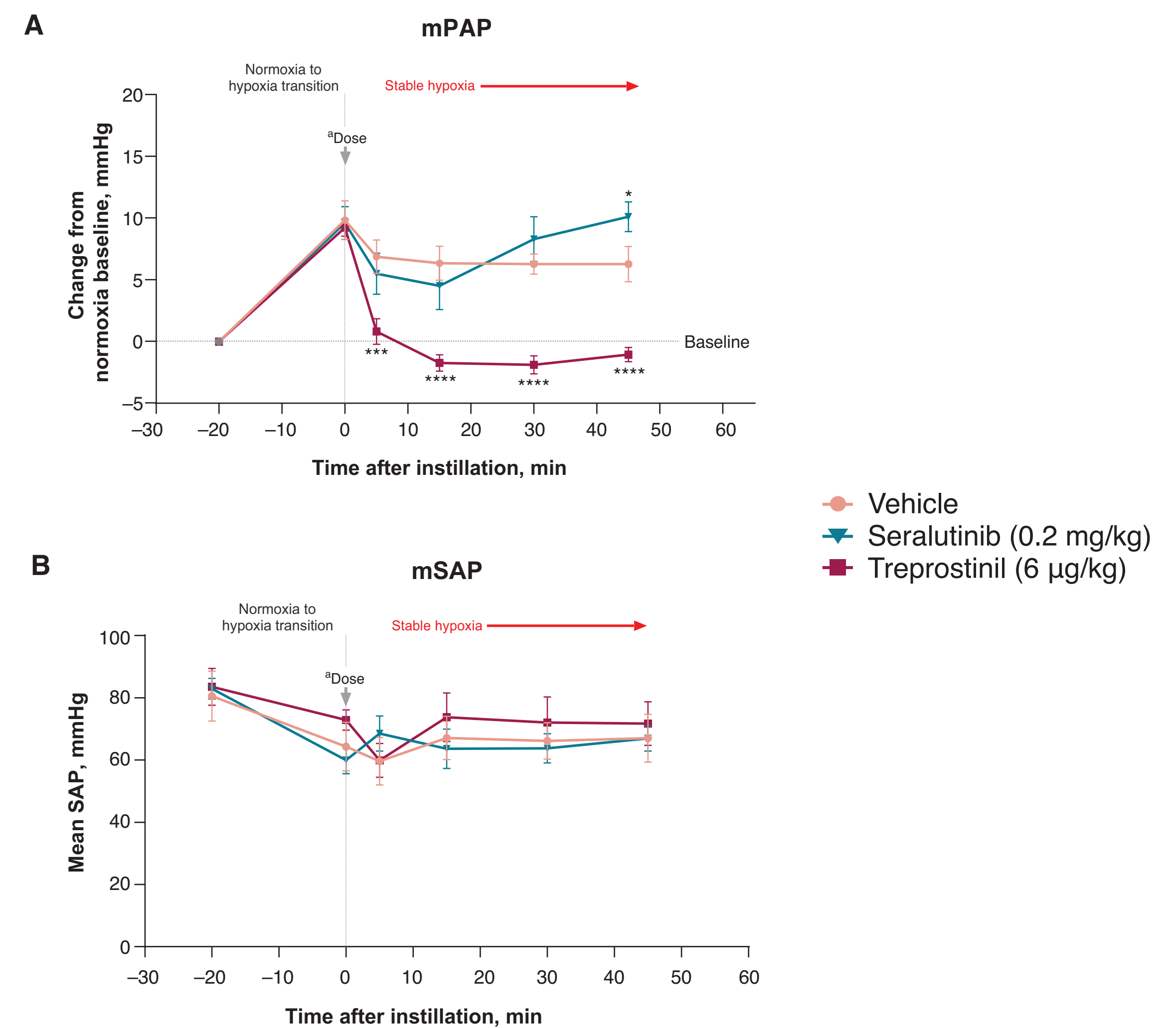
Los datos se expresan como media (n=7–9 para PDGF-BB y seralutinib; n=4 para ET1 y bosentan). AU: unidades arbitrarias; Ca<sup>2+</sup>: calcio; DMSO: dimetilsulfóxido; ERK: cinasa regulada por señales extracelulares; ET1: endotelina-1; G: receptor acoplado a proteína G; hPASMC: célula de músculo liso de la arteria pulmonar humana; PDGF(R): (receptor de) factor de crecimiento derivado de plaquetas; pERK: cinasa regulada por señales extracelulares fosforilada; PLC: fosfolipasa C.

Figura 4. Ni PDGF-BB ni seralutinib afectan el tono vascular en anillos de arteria pulmonar (PA) de ratón aislados



Cambio en la tensión de los vasos pulmonares tras el tratamiento con PDGF-BB, sin (A, B) y con (C, D) seralutinib. El estado funcional de los anillos de PA se verificó mediante pretratamiento con PHE y ACh. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM (n=2). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía con la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. ACh: acetilcolina; ANOVA: análisis de varianza; DMSO: dimetilsulfóxido; mN: miliNewton; PA: arteria pulmonar; PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas; PHE: fenilefrina.

Figura 5. Seralutinib no muestra efectos vasodilatadores en un modelo de rata con vasoconstricción pulmonar inducida por hipoxia aguda



Efectos de seralutinib y treprostinil sobre (A) el cambio en PAPm desde el valor basal en normoxia y (B) SAPm. Los datos se representan como media (n=5). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías con la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. \*p<0.05, \*\*\*p<0.001 y \*\*\*\*p<0.0001 versus vehículo. <sup>2</sup>Los animales fueron retirados del respirador y expuestos a normoxia durante la administración intratraqueal. mPAP, PAPm: presión arterial pulmonar media, mSAP, SAPm: presión arterial sistémica media.

## CONCLUSIONES

- Los estudios previos de imagen por tomografía computarizada, biomarcadores y estudios preclínicos demostraron un efecto de remodelación inversa con seralutinib
- Nuestros hallazgos actuales confirman que el mecanismo de acción principal de seralutinib es la remodelación inversa, más que la vasodilatación
  - Seralutinib inhibió el flujo de Ca<sup>2+</sup> inducido por PDGF-BB, el cual se sabe que contribuye a la proliferación, y no mostró efectos vasodilatadores significativos
  - Ni seralutinib ni la señalización de PDGF-BB moduló la tensión en los anillos de PA
  - Seralutinib no revirtió la vasoconstricción inducida por hipoxia aguda
- Seralutinib es un agente antiproliferativo y antifibrótico que se diferencia de las terapias vasodilatadoras tradicionales

