

Petra Doerfler and Barbara Wolff-Winiski

Innovation der Therapie chronischer Wunden durch Patienten-spezifische zellbasierte Assays und Vortests potenzieller Wundtherapeutika

Akribes Biomedical GmbH, Vienna, Austria

Doerfler P, Schoefmann N, Cabral G, Bauer W, Berli MC, Binder B, Borst C, Botter S, French LE, Goerge T, Hafner J, Hartmann D, Høgh A, Hoetzenecker W, Holzer-Geissler JC, Kamolz LP, Kofler K, Luger T, Nischwitz SP, Popovits M, Rappersberger K, Restivo G, Schlager JG, Schmuth M, Stingl G, Stockinger T, Stroelin A, Stuetz A, Umlauf J, Weninger WP, Wolff-Winiski B. (2024)

Development of a Cellular Assay as a Personalized Model for Testing Chronic Wound Therapeutics.

Journal of Investigative Dermatology (JID), 2024.

doi: <https://doi.org/10.1016/j.jid.2024.05.029>

Chronische Wunden wie venöse, arterielle, und diabetische Fußgeschwüre oder Dekubitus stellen weltweit ein großes Gesundheitsproblem dar, von dem allein in den westlichen Ländern 10-20 Millionen Patienten betroffen sind. Aufgrund der alternden Bevölkerung und der zunehmenden Inzidenz von Stoffwechselkrankheiten wird diese Zahl voraussichtlich noch steigen^{1,2}. Chronische, nicht-heilende Wunden haben multifaktorielle Ursachen (z.B. durch zugrunde liegende Pathologien und/oder mikrobielle Infektionen), und die derzeitigen Behandlungsmöglichkeiten sind nicht zufriedenstellend. Trotz dieses hohen medizinischen Bedarfs wurden in den letzten mehr als 20 Jahren keine neuen Arzneimittel in diesem Bereich zugelassen, und die Entwicklung von Arzneimitteln für chronische Hautwunden beim Menschen wird durch die mangelnde Übertragbarkeit von präklinischen Tiermodellen auf Patienten erschwert. Obwohl die Entwicklung von diagnostischen Markern und bildgebenden Verfahren für chronische Wunden Fortschritte gemacht hat, fehlen nach wie vor Systeme für die Entwicklung und/oder Vorabprüfung von medikamentösen Behandlungsmöglichkeiten in personalisierter Art und Weise³.

Es wurde bereits früher festgestellt, dass Wundexsudate (WEs) pathogene Faktoren für die Chronifizierung enthalten⁴⁻⁶. Das Team von Akribes Biomedical in Wien erweiterte diese Beobachtungen durch detaillierte molekulare und funktionelle Charakterisierungen von WEs individueller Wunden und etablierte ein zellbasiertes Testsystem, das Wundexsudate für ein „humanisiertes und personalisiertes Modell für chronische Hautwunden“ verwendet. Werden primäre humane dermale Fibroblasten (HDF) von gesunden Spendern mit steril gefilterten WEs von individuellen Patienten in Kontakt gebracht, werden wichtige funktionelle Merkmale des Wundzustands auf das Kultursystem übertragen (Abbildung 1).

Typischerweise beeinträchtigten WEs aus nicht-heilenden Wunden die Zellproliferation (innerhalb von 72 Stunden), die

Petra Doerfler and Barbara Wolff-Winiski

Innovation of chronic wound therapy through patient-specific cell-based assays and pretesting of potential wound therapeutics

Akribes Biomedical GmbH, Vienna, Austria

Doerfler P, Schoefmann N, Cabral G, Bauer W, Berli MC, Binder B, Borst C, Botter S, French LE, Goerge T, Hafner J, Hartmann D, Høgh A, Hoetzenecker W, Holzer-Geissler JC, Kamolz LP, Kofler K, Luger T, Nischwitz SP, Popovits M, Rappersberger K, Restivo G, Schlager JG, Schmuth M, Stingl G, Stockinger T, Stroelin A, Stuetz A, Umlauf J, Weninger WP, Wolff-Winiski B. (2024)

Development of a Cellular Assay as a Personalized Model for Testing Chronic Wound Therapeutics.

Journal of Investigative Dermatology (JID), 2024.

doi: <https://doi.org/10.1016/j.jid.2024.05.029>

Chronic wounds, such as venous, arterial, pressure or diabetic foot ulcers, are a major health issue worldwide, affecting 10-20 million patients in Western countries alone. Due to the aging population and growing incidence of metabolic diseases, this number is expected to increase^{1,2}. Chronic, non-healing wounds are of multifactorial origin (e.g., caused by underlying pathologies and/or microbial infections), and the current treatment options are not satisfactory. However, despite this great medical need, no new drugs have been approved in this field over the last >20 years, and drug development for chronic human skin wounds is hampered by the lack of translatability from preclinical animal models to patients. Moreover, while the development of diagnostic markers and imaging devices for chronic wounds has progressed, systems to develop and/or pretest drug treatment options in a personalized manner are still lacking³.

Wound exudates (WEs) were previously found to contain pathogenic drivers of chronicity⁴⁻⁶. The team of Akribes Biomedical in Vienna, Austria, expanded these observations by performing detailed molecular and functional characterizations of WEs of individual wounds, and established a cell-based assay system using wound exudates for a “humanized and personalized model of chronic skin wounds”. Exposing primary human dermal fibroblasts (HDF) from healthy donors to sterile-filtered WEs from individual patients was found to transfer important functional characteristics of the wound condition to the culture system (Figure 1).

Typically, WEs from non-healing wounds impaired cell proliferation (within 72 hours), fibroblast-derived matrix formation (within 8 days) and production of extracellular

Bildung einer 3D Fibroblastenmatrix (innerhalb von 8 Tagen) und die Produktion von Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM), und erhöhten die Sekretion entzündlicher Zytokine, während WEs aus heilenden Wunden dies nicht taten.

Die Proliferation erwies sich als der robusteste und aussagekräftigste funktionelle Biomarker, der den Wundstatus *in vivo* widerspiegelt und die Beobachtung des Übergangs von nicht-heilenden zu heilenden Wunden in aufeinanderfolgenden Proben zulässt. Ein miniaturisiertes Assay-Format ermöglichte die Analyse eines weiten Spektrums und einer großen Anzahl von Wunden mit einem minimalen Probenvolumen von nur 7 µl. Durch die Zusammenarbeit mit 14 klinischen Zentren in ganz Europa zur Sammlung von Proben und klinischen Daten konnten mit dieser Assay-Plattform >800 WE-Proben, die >300 nicht-heilende und heilende Wunden unterschiedlicher Ätiologie repräsentieren, ausgewertet werden. Die WE-Proben wurden unter klinischen Routinebedingungen mit Behältern oder Schwämmen aus der Vakuumtherapie (NPWT) oder mit Nylon-beflockten Tupfern entnommen. Es wurde eine ausgezeichnete Korrelation zwischen der klinischen Bewertung der Wundchronizität und der hemmenden Wirkung individueller Exsudate auf die Fibroblastenproliferation beobachtet. Diese Übereinstimmung zwischen der *ex vivo* Klassifizierung und den klinischen Beurteilungen der nicht-heilenden Wunden wurde für alle WE-Sammelmethoden festgestellt. Außerdem spiegelten die *ex vivo*-Tests das Fortschreiten von einer nicht-heilenden zu einer heilenden Wunde beim einzelnen Patienten wider: sie zeigten die Normalisierung der Fibroblastenproliferation, eine Erhöhung der Fibroblasten-abhängigen Matrixbildung und der Kollagen 1- und Kollagen 3 mRNA-Expression, sowie die Verbesserung der Entzündung durch reduzierte Interleukin-1β Sekretion.

matrix (ECM) proteins, and enhanced inflammatory cytokine secretion, while WEs from healing wounds did not.

Proliferation was revealed as the most robust and meaningful functional biomarker, reflecting the *in vivo* wound status and permitting the transition from non-healing to healing wounds in sequential samples to be monitored. A miniaturized assay format allowed the analysis of a vast array of wounds, accommodating large WE numbers, and sample volumes as low as 7µl. Collaborating with 14 clinical institutions across Europe for sample and clinical data collection, >800 WE samples representing >300 non-healing and healing wounds of diverse etiologies could be evaluated in this assay platform. WE samples were collected under clinical routine conditions, using containers or sponges from negative pressure wound therapy (NPWT), or nylon-flocked swabs. An excellent correlation was observed between the clinical assessments of wound chronicity and the inhibitory effects of individual exudates on fibroblast proliferation. This agreement between *ex vivo* classification and clinical assessments of non-healing wounds was found for all WE collection methods. Moreover, the *ex vivo* assay reflected the progression from a non-healing to a healing wound in an individual patient: they demonstrated normalization of fibroblast proliferation, enhancement of fibroblast-derived matrix formation, collagen 1 and -3 mRNA expression as well as reduction of inflammation by reduced IL1-β secretion.

Akribes also investigated the effects of non-healing WEs on the gene expression profiles of fibroblasts to eluci-

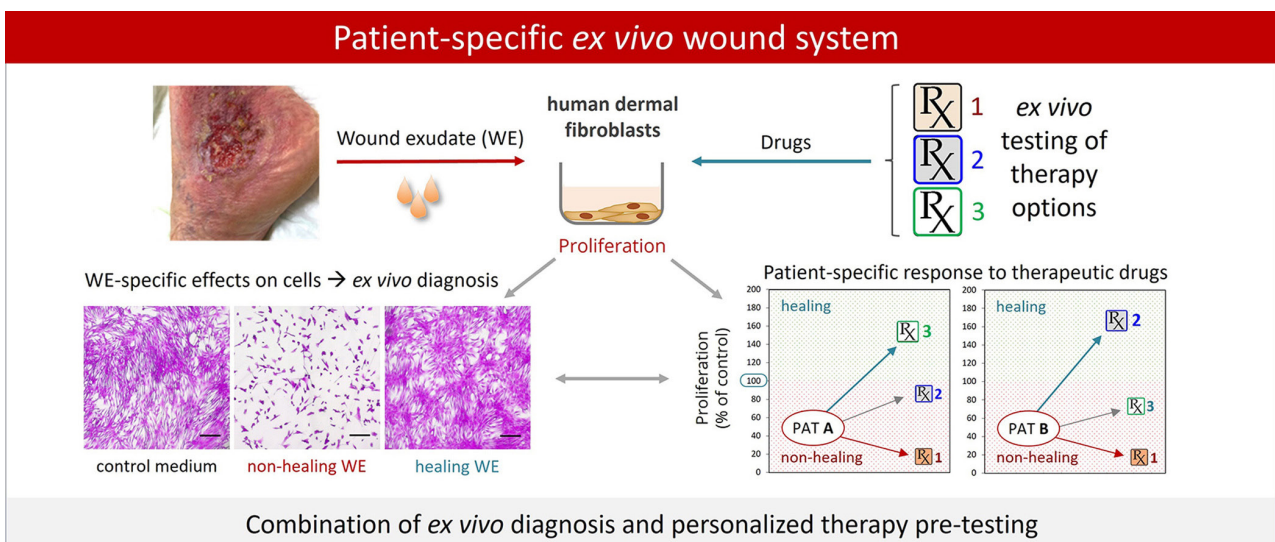


Abbildung 1: Patienten-spezifisches zellbasiertes Wundsystem, das Diagnose und personalisierten Therapie-Vortest kombiniert. Auf der linken Seite ist das Konzept des Fibroblastenproliferations-tests in Gegenwart von Exsudaten aus nicht-heilenden oder heilenden Wunden dargestellt, einschließlich mikroskopischer Bilder einzelner Beispiele nach 72 Stunden in Kultur. Auf der rechten Seite wird das Konzept der Arzneimittelprüfung mit Patienten-spezifischen Ergebnissen skizziert.

Figure 1: Patient-specific cell-based wound system, combining diagnosis and personalized therapy pre-testing. On the left, the concept of the fibroblast proliferation assay in the presence of exudates from non-healing or healing wounds is shown, including microscopic pictures of individual examples after 72 hours in culture. On the right, the concept of drug testing with patient-specific outcomes is outlined.

Akribes untersuchte auch die Auswirkungen von nicht-heilenden WEs auf die Genexpressionsprofile von Fibroblasten, mit dem Ziel, frühe Veränderungen aufzuklären, die der Hemmung der Zellproliferation zugrunde liegen könnten, und um molekulare Angriffspunkte für therapeutische Interventionen zu enthüllen.

Die Transkriptionsanalyse ergab eine Induktion entzündlicher Zytokin- und Chemokin-Signalwege und einer zellulären Stressreaktion auf ungefaltete Proteine, der sogenannten „Unfolded Protein Response“ (UPR) bereits innerhalb von 6 Stunden nach Stimulation mit drei WEs unterschiedlicher Ätiologien. Diese übereinstimmenden Effekte, die durch WEs verschiedener Wundtypen verursacht werden, deuten darauf hin, dass diese Veränderungen zur Pathologie nicht-heilender Wunden beitragen können. Die Relevanz dieser Ergebnisse wurde durch frühere Berichte bestätigt, wonach diese Signalwege auch in Zellen hochreguliert sind, die aus chronischen Wunden oder Biopsien von venösen Ulzera isoliert wurden. Mit anderen Worten: Normale Fibroblasten werden nach Kontakt mit Wundexsudaten zu „chronischen Wund-Fibroblasten“.

Diese *ex vivo* Testsysteme können daher für die Suche nach neuen Wirkstoffen genutzt werden, die Fibroblasten vor schädigenden WE-Effekten bewahren. Akribes testete zwei Therapeutika, die derzeit in der klinischen Behandlung chronischer Wunden eingesetzt werden, nämlich den Wachstumsfaktor Platelet derived Growth Factor (PDGF) und Silbersulfadiazin (SSD). Beide Substanzen zeigten patientenspezifische Reaktionen, ähnlich der klinischen Erfahrung.

Die Verwendung von Testsubstanzen, die einige der wichtigsten Akteure dieser Signalwege angreifen, konnte die Fibroblastenproliferation jedoch nicht retten, wahrscheinlich weil zusätzliche Mechanismen an der Chronizität der Wunde beteiligt sind.

Fibroblastenproliferation als Messparameter hängt nicht von einem einzelnen Molekül ab, sondern fasst die zelluläre Reaktion auf die spezifische Kombination von Komponenten in jedem einzelnen WE zusammen. Dieses System kann daher für die Suche nach neuen Wirkstoffen genutzt werden, die Fibroblasten vor nachteiligen WE-Effekten bewahren – unabhängig von der Wirkungsweise. Zum Nachweis des Konzepts testete Akribes zwei Therapeutika, die derzeit in der klinischen Behandlung chronischer Wunden eingesetzt werden, nämlich den Wachstumsfaktor Platelet derived Growth Factor (PDGF) und Silbersulfadiazin (SSD), die beide zu patientenspezifischen Reaktionen führten, ähnlich der klinischen Erfahrung. PDGF, das in den USA als Becaplermin (Regranex®) zugelassen ist, konnte im Fibroblastentest die Zellen nicht vor den negativen Auswirkungen nicht-heilender WEs bewahren. Positive Ergebnisse bei heilenden Wunden deuten jedoch darauf hin, dass eine PDGF-Behandlung am wirksamsten sein könnte, wenn sich die Wunden bereits auf dem Weg der Heilung befinden. Dies stimmt mit veröffentlichten Beobachtungen überein, wonach PDGF in der klinischen Praxis nur eine begrenzte Verbesserung der Heilungsraten bewirkt⁷. Im Gegensatz dazu verbesserte SSD die Fibroblastenproliferation in Anwesenheit von >50 % der getesteten aggressiven, nicht-

date early changes that may underlie inhibition of cell proliferation and to reveal molecular targets for therapeutic intervention.

Transcriptional analysis results reveal an induction of inflammatory cytokine and chemokine signalling pathways and a cellular stress reaction, the so-called unfolded protein response (UPR) already within 6 hours after stimulation with three WEs of different etiologies. These common effects caused by WEs from different wound types indicated that these changes may contribute to the pathology of non-healing wounds. The relevance of these findings is confirmed by previous reports that these pathways are also upregulated in cells isolated from chronic wounds or biopsies of venous ulcers. Thus, normal fibroblast become “chronic wound fibroblasts” after contact with WE.

These *ex vivo* assays may therefore be exploited to search for new compounds which rescue fibroblasts from adverse WE-effects. Akribes tested two therapeutics currently employed in the clinical management of chronic wounds, platelet derived growth factor (PDGF) and silver sulfadiazine (SSD). Both compounds resulted in patient-specific responses in line with clinical experience.

More specifically, using test substances to interfere with some of the most prominent players of these pathways did not rescue fibroblast proliferation, probably because additional mechanisms are involved in wound chronicity.

Fibroblast proliferation readout does not depend on a single molecule but summarizes the cellular response to the specific combination of components within each individual WE. It may therefore be exploited to search for new compounds which rescue fibroblasts from adverse WE effects regardless of the mode of action. As a proof of concept, Akribes tested two therapeutics currently employed in the clinical management of chronic wounds, platelet derived growth factor (PDGF) and silver sulfadiazine (SSD), both leading to patient-specific responses in line with clinical experience. More specifically, PDGF, registered in the USA as Becaplermin (Regranex®), failed to rescue cells from adverse effects of non-healing WEs in the fibroblast assay. However, positive results with healing WEs suggested that PDGF treatment may be most effective to improve wounds that are already on a healing trajectory. This is consistent with published observations where PDGF provides only limited improvements to healing rates in clinical practice⁷. In contrast, SSD improved fibroblast proliferation in the presence of >50% of the aggressive, non-healing WEs tested, which could not be attributed to its known antimicrobial function but suggested a novel rescue mechanism and supports its clinical use.

heilenden WEs. Dieser Effekt konnte nicht auf die bekannte antimikrobielle Funktion von SSD zurückgeführt werden, sondern deutet auf einen neuartigen Rettungsmechanismus hin, der den klinischen Einsatz unterstützt.

Die Akribes Tests beinhalten Schlüsselkomponenten von chronischen Wunden und reflektieren den Übergang einer nicht-heilenden zu einer heilenden Wunde. Soweit wir wissen, ist diese Studie die erste, in der Wundtherapeutika in einem funktionellen, wundrelevanten Assay und mit einer großen Anzahl klinischer Proben einzelner Patienten getestet wurden. Diese Ergebnisse offerieren die Möglichkeit, WEs von Einzelpersonen vorab zu testen, um die Wahrscheinlichkeit des Ansprechens auf eine Behandlung individuell vorherzusagen (Abbildung 1).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Fibroblastenproliferationstest in Gegenwart von WEs als Patienten-spezifisches zellbasiertes Testsystem für chronische Wunden dient, um a) zwischen heilenden und nicht-heilenden Wunden zu unterscheiden, b) den Heilungsprozess einzelner Patienten zu verfolgen und c) die Auswirkungen von Therapeutika für chronische Wunden *ex vivo* zu bewerten. Er sollte ein nützliches Instrument werden, um die translationale Lücke zwischen präklinischer Entwicklung und klinischen Ergebnissen zu schließen⁸. Bei dem Test handelt es sich um ein für den Menschen relevantes System, von dem zu erwarten ist, dass es eine höhere Vorhersagekraft hat als *in vivo*-Tiermodelle, was im Einklang mit den aktuellen Programmen der FDA und der EMA zur Einführung alternativer Methoden für Tierversuche steht^{9,10}. Darüber hinaus weisen die vorgestellten Ergebnisse auf die Nützlichkeit des Tests für die Suche nach neuen Arzneimittelkandidaten für die Therapie chronischer Wunden hin.

Ein zugehöriger Kommentar in derselben Ausgabe der Zeitschrift erörtert die klinischen Implikationen von zellulären Assays und Wundflüssigkeiten als nächste Stufe der personalisierten Wundversorgung¹¹, mit der Konklusion: *“cellular response to wound fluid as a readout of clinical outcomes provides a new approach for predictive and/or monitoring wound outcomes that can support personalized care as well as clinical trials”*.

Kommentar:

Chronische Wunden sind seit vielen Jahren ein enormes Gesundheitsproblem multifaktorieller Ursache. Trotzdem sind, neben der Ursachenbehebung, in den letzten Jahren keine neuen therapeutischen Optionen beschrieben worden. Dieser Test gibt dem Kliniker eine Möglichkeit in die Hand, Aussagen über die Chronizität der Wunde zu erlangen und vorab mögliche pharmazeutische Interventionen testen zu können. Als Anwendungsbeispiel wurde in dieser Arbeit die Wirkung von Silber-Sulfadiazin auf proliferationsgehemmten Fibroblastenzellkulturen getestet. Überraschenderweise zeigte sich hier eine proliferationssteigernde Wirkung, die von der antimikrobiellen Wirkung entkoppelt ist.

The Akribes assays include key components of chronic wounds and reflect the transition of a non-healing to healing wound. To our knowledge, this study is the first to test wound therapeutics in a functional, wound-relevant assay, using a large number of wound exudates from individual patients. These results offer the possibility of pre-testing WEs of individuals to predict the likelihood of response to treatment for each patient (Figure 1).

In conclusion, the fibroblast proliferation assay in the presence of WEs was shown to serve as a patient-specific cell-based test system for chronic wounds to a) differentiate between healing and non-healing wounds, b) follow the healing process of individual patients, and c) assess the effects of therapeutics for chronic wounds *ex vivo*. It should become a useful tool to help close the translational gap from pre-clinical development to clinical outcomes⁸. The assay is a human-relevant system, expected to offer more predictive power than *in vivo* animal models, which is in line with current FDA and EMA programs to implement alternative methodologies for animal testing^{9,10}. Moreover, the presented results indicate the usefulness of the assay to search for and profile new drug candidates for chronic wound therapy.

An associated Commentary in the same issue of the journal discusses the clinical implications of cellular assays and wound fluids as the next frontier in personalized wound care¹¹, concluding *“cellular response to wound fluid as a readout of clinical outcomes provides a new approach for predictive and/or monitoring wound outcomes that can support personalized care as well as clinical trials.”*

Commentary:

Chronic wounds are a major health problem with multifactorial causes. Despite this fact, new therapeutic options have neither been described in recent years nor has the cause been addressed. This test provides the clinician with a way to obtain information about the chronicity of the wound and to test possible pharmaceutical interventions in advance. As an example of use, the effect of silver sulfadiazine on proliferation-impaired fibroblast cell cultures was tested in this work. Surprisingly, a proliferation-enhancing effect was observed here, which is decoupled from the antimicrobial effect.

<https://doi.org/10.61783/oegdv0410>



Literatur:

1. Gould L, Abadir P, Brem H, Carter M, Conner-Kerr T, Davidson J, et al. Chronic wound repair and healing in older adults: Current status and future research. *Wound Repair Regeneration* 2015;23:1–13.
2. Carter, MJ, DaVanzo J, Haught R, Nusgart M, Cartwright D, Fife CE. Chronic wound prevalence and the associated cost of treatment in Medicare beneficiaries: changes between 2014 and 2019. *J Med Economics* 2023;26:894–901.
3. Weigelt MA, Lev-Tov HA, Tomic-Canic M, Lee WD, Williams R, Strasfeld D, et al. Advanced Wound Diagnostics: Toward Transforming Wound Care into Precision Medicine. *Advances in Wound Care* 2022;11:330–359.
4. Bucalo B, Eaglstein WH, Falanga V. Inhibition of cell proliferation by chronic wound fluid. *Wound Rep Regen* 1993;1:181-186.
5. Phillips TJ, Al-Amoudi HO, Leverkus M, Park HY. Effect of chronic wound fluid on fibroblasts. *J Wound Care* 1998;7:527-532.
6. Thamm OC, Koenen P, Bader, N, Schneider A, Wutzler S, Neugebauer EAM, et al. Acute and chronic wound fluids influence keratinocyte function differently. *Int Wound J*. 2015;12:143-149
7. Papanas N, Maltezos E. Becaplermin gel in the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers. *Clin Interv Aging* 2008;3:233–240.
8. Seyhan AA. Lost in translation: the valley of death across preclinical and clinical divide – identification of problems and overcoming obstacles. *Transl. Med. Commun*. 2019;4:18.
9. European parliament, Council of the European Union, 2010. Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes. www.consilium.europa.eu.
10. U.S. Food and Drug Administration, 2021. Advancing new alternative methodologies at FDA. www.fda.gov.
11. Jozic I, Tomic-Canic M. Flipping the Script: Are Cellular Assays and Wound Fluids the Next Frontier in Personalized Wound Care? *J Invest Dermatol* 2024;S0022202X24020670.