

## DESCRIZIONE

del brevetto per invenzione dal titolo:

"CONIUGATO DELLA NEUREGULINA 1 PER IL TRATTAMENTO  
DELLE LESIONI DEI NERVI PERIFERICI"

dell'Università Degli Studi Di Torino

di nazionalità italiana

con sede in Via Verdi 8 - 10124 Torino

Inventori: Stefano Geuna, Abraham Shahar, Ofra Ziv-  
Polat, Giovanna Gambarotta, Federica Fregnan

\* \* \*

La presente invenzione è relativa ad un coniugato della neuregulina 1, in particolare per il trattamento delle lesioni dei nervi periferici.

Le lesioni dei nervi periferici, che provocano debolezza, paralisi, perdita sensoriale e percezione di dolore neuropatico, sono causa di morbidità e ridotta qualità della vita. Il 6% della popolazione anziana soffre di neuropatia periferica (Martyn and Hughes 1997) provocata da patologie come il diabete, malattie ereditarie genetiche come la malattia di Charcot-Marie-Tooth, malattie infettive e disturbi infiammatori.

Contrariamente a ciò che capita nel Sistema Nervoso Centrale (SNC), i nervi periferici possiedono una forte capacità rigenerativa intrinseca (Filbin 2003). Nonostante questo, i pazienti non raggiungono mai un recupero

pienamente soddisfacente.

Infatti, gli assoni rigenerano con una velocità di circa 1 mm al giorno, a seconda del sito della lesione; pertanto può verificarsi un ritardo di mesi, se non anni, prima che l'organo bersaglio venga reinnervato, provocando un cambiamento irreversibile a quest'ultimo ed alle cellule di supporto.

Per favorire la rigenerazione dei nervi periferici è quindi opportuno l'impiego dell'ingegneria tissutale e la costruzione di un ambiente rigenerativo ottimizzato.

Uno degli approcci allo studio è quello di fornire al sito bersaglio molecole che siano in grado di promuovere la rigenerazione del nervo. Ad oggi, tuttavia, non esistono in commercio terapie farmacologiche che possano stimolare e velocizzare la rigenerazione assonale, aumentare la specificità nel raggiungere l'organo bersaglio e prevenire l'atrofia muscolare.

In seguito al danno periferico, il meccanismo rigenerativo viene messo in moto da una segnalazione coordinata tra la componente assonale, quella macrofagica e le cellule di Schwann (SC).

La rigenerazione assonale nel sistema nervoso periferico è sottesa da un'intensa attività di differenziazione e proliferazione delle SC (Carroll, Miller et al. 1997). In questo processo, giocano un ruolo

fondamentale diverse isoforme della neuregulina 1 (NRG1); in particolare, l'espressione della NRG1 di tipo I, indotta in seguito a denervazione, è strettamente associata alle cellule SC suggerendo una comunicazione paracrina (Stassart, Fledrich et al.; Ronchi, Gambarotta et al. 2013).

Le neureguline sono una famiglia di fattori di crescita codificata da quattro geni (NRG1-4); tutte queste molecole agiscono attraverso il legame con i recettori tirosin-chinasici appartenenti alla famiglia degli ErbB e contengono il dominio EGF-simile, essenziale per la loro attività (Marchionni, Goodearl et al. 1993; Carraway, Weber et al. 1997; Zhang, Sliwkowski et al. 1997).

Sono state descritte 31 isoforme di NRG1 umana, generate in seguito ad un fenomeno di splicing alternativo e differenti siti di inizio trascrizione (Mei and Xiong 2008). Le isoforme differiscono nel motivo N-terminale e possono essere suddivise in sei tipi (I-VI).

L'importanza documentata della segnalazione endogena della NRG1 nei processi rigenerativi, ha suggerito che la somministrazione della forma ricombinante di tale molecola, in seguito a danno nervoso, possa migliorare il recupero funzionale. Le strategie ad oggi applicate per esplicitare il rilascio di NRG1 si possono identificare in iniezioni subcutanee (Chen, Liu et al. 1998), rilascio attraverso

biomateriali (Whitworth, Dore et al. 1995; Sterne, Brown et al. 1997; Terenghi 1999), trapianto di cellule over-esprimenti NRG1 (Faroni, Mantovani et al. 2011) ed iniezioni di adenovirus codificanti per la NRG1 (Naldini, Blomer et al. 1996).

E' stato osservato tuttavia che lo svantaggio dei sistemi di rilascio sopra descritti consiste nella breve emivita del fattore. Infatti una volta somministrata, la molecola perde in poco tempo la propria efficacia con conseguente limitata azione in seguito a somministrazione.

Lo scopo della presente invenzione è pertanto quello di fornire un sistema di rilascio per la neuregulina che sia stabile nel tempo.

Tale scopo è raggiunto dalla presente invenzione, in quanto relativa ad un coniugato secondo la rivendicazione 1 ad una composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 7 e al loro uso secondo le rivendicazioni 8 e 9.

La presente invenzione verrà ora descritta in modo dettagliato con riferimento alle figure dei disegni annessi, in cui:

- la Figura 1 illustra i risultati del saggio di migrazione che confronta il coniugato dell'invenzione e la neuregulina non coniugata;

- la Figura 2 illustra immagini di microscopia elettronica delle cellule ST14A esprimenti stabilmente

un'isoforma del recettore ErbB4, stimulate con 500 ng/ml del coniugato dell'invenzione e con 500 ng/ml di nanoparticelle di ossido di ferro da sole.

Secondo un primo aspetto della presente invenzione viene fornito un coniugato di una isoforma di neuregulina 1 ricombinante con nanoparticelle di ossido di ferro.

Preferibilmente l'isoforma della NRG1 è l'isoforma beta, più preferibilmente l'isoforma beta 1 (NRG1 tipo I  $\beta$ 1) che include nella sua struttura il dominio EGF-like di tipo  $\beta$  ed un dominio immunoglobulinico nella regione N-terminale (tipo I).

La NRG1 tipo I beta 1 è stata coniugata covalentemente a nanoparticelle di ferro preferibilmente rivestite esternamente di destrano.

Le nanoparticelle di ossido di ferro, che per le loro proprietà fisiche hanno trovato un'ampia applicazione in campo biomedico (Thorek, Chen et al. 2006; Laurent, Forge et al. 2008), possono essere realizzate in magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ).

Esse possono essere suddivise in diverse categorie in base al loro diametro idrodinamico (Corot, Robert et al. 2006) e particelle di ossido di ferro superparamagnetico definite "ultrasmall" (USPIOs) (da 10 a 50 nm) sono utilizzate come agenti di contrasto nella risonanza magnetica (MRI). Altre applicazioni cliniche vedono le

nanoparticelle utilizzate nel campo della cura dei tumori attraverso il targeting magnetico di farmaci attraverso la barriera emato-encefalica (Chertok, Moffat et al. 2008); nella ipertermia magnetica (MFH), procedura in cui nanoparticelle di ossido di ferro vengono iniettate nei tumori, esposte ad una alta frequenza (100 kHz) e quindi in grado di danneggiare il tumore riscaldando il tessuto tumorale (Maier-Hauff, Rothe et al. 2007) (Thiesen and Jordan 2008).

Le sopracitate proprietà fisiche e la biocompatibilità assoluta di queste particelle ha spianato la strada a nuovi studi nel campo della rigenerazione del nervo periferico (Ziv-Polat, Shahar et al. 2014).

Nanoparticelle di ossido di ferro sono state utilizzate in studi in vitro come metodo di veicolazione e rilascio dei fattori di crescita per stimolare la crescita assonale e la differenziazione delle cellule gliali in prospettiva del loro uso nel sito di lesione del nervo (Morano, Wrobel et al. 2014).

Secondo la presente invenzione le nanoparticelle di ferro possono avere un diametro compreso tra 8 e 15 nm, ad esempio a  $9.5 \pm 0.9$  nm.

Secondo un secondo aspetto dell'invenzione viene inoltre fornita una composizione farmaceutica comprendente il coniugato dell'invenzione e un eccipiente

farmaceuticamente accettabile.

Il coniugato dell'invenzione si è dimostrato particolarmente efficace nella rigenerazione del nervo periferico e pertanto per il trattamento di un disturbo selezionato nel gruppo costituito da danni ai nervi periferici dovuti a traumi, incidenti, operazioni chirurgiche e neuropatie periferiche.

Vantaggiosamente, la coniugazione della neuregulina 1 con nanoparticelle di ossido di ferro risulta in un aumento della stabilità della proteina e quindi della sua durata d'azione dopo somministrazione.

Inoltre, la molecola coniugata alle nanoparticelle di ossido di ferro può essere anche dislocata in situ applicando un campo magnetico locale nel punto preciso in cui è necessaria la sua azione. Questo sistema di rilascio, a lunga stabilità, biocompatibile, non tossico, rappresenta pertanto un significativo miglioramento rispetto alle molecole ricombinanti esistenti in commercio.

Ulteriori caratteristiche della presente invenzione risulteranno dalla descrizione che segue di alcuni esempi meramente illustrativi e non limitativi.

Esempio 1

Preparazione del coniugato NRG1-I- $\beta$ 1 con nanoparticelle di Fe

Le nanoparticelle di ossido di ferro rivestite di

destrano di un diametro compreso tra 8-15 nm sono state preparate come descritto in Molday et al (Molday et al, Immunol. Methods 1982; 52(3):353-67). Brevemente, queste nanoparticelle sono state preparate miscelando 10 ml di destrano 50% (p/p) con un ugual volume di una soluzione acquosa contenente 1,51 g di  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e 0,64 g  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . Mescolando, la miscela è stata titolata a pH 10-11 mediante aggiunta goccia a goccia di  $\text{NH}_4\text{OH}$  7,5% (v/v) e scaldata a 60°C, con l'ausilio di un bagnetto termostato, per 15 minuti. Gli aggregati sono poi stati rimossi con tre cicli di centrifugazione in una centrifuga a bassa velocità a 600xg per 5 min. Le nanoparticelle di ossido di ferro rivestite con destrano sono poi state lavate dal destrano non legato con un tampone di sodio bicarbonato 0,1M (pH 8,3) all'interno di colonne magnetiche.

Le nanoparticelle così ottenute presentano sulla loro superficie dei gruppi idrossilici.

La coniugazione con la neuregulina è stata ottenuta mediante l'uso di divinilsulfone (DVS) attraverso la reazione di addizione di Michael. I doppi legami non reagiti sono infine bloccati con la glicina. Le nanoparticelle coniugate con la neuregulina sono poi lavate con PBS all'interno di colonne magnetiche. La concentrazione di neuregulina coniugata alle nanoparticelle è stata determinata tramite kit ELISA (PeproTech Asia,



Israele).

## Esempio 2

### Efficacia e stabilità della NRG1-I- $\beta$ 1 coniugata a nanoparticelle di ossido di Ferro, a confronto con la proteina ricombinante non coniugata

A tal fine si è effettuata la stimolazione della linea cellulare ST14A, esprime in modo stabile un'isoforma di ErbB4, recettore della NRG1, con la NRG1-I- $\beta$ 1, nella forma coniugata a nanoparticelle di Fe e nella forma nativa, fresca e "invecchiata".

## Materiali e Metodi

### Saggio di migrazione tridimensionale

Il saggio di migrazione denominato -Transwell- è stato utilizzato per valutare i movimenti tridimensionali delle cellule. 100.000 cellule ST14A sono state risospese in 200  $\mu$ l di mezzo di Eagle modificato da Dulbecco (DMEM), contenente il 2% di Siero bovino fetale (FBS) e piastrate nella camera superiore di un transwell, contenente una membrana porosa trasparente di polietilentereftalato (dimensione del poro: 8.0  $\mu$ m;  $1 \times 10^5$  pori/cm<sup>2</sup>).

La camera inferiore del transwell è stata riempita di terreno DMEM contenente 2% FBS con o senza 15 ng/ml di NRG1-I- $\beta$ 1 ricombinante nella forma nativa o coniugata a nanoparticelle di ossido di ferro dell'esempio 1. Dopo un tempo di incubazione di 18 ore, le cellule migrate nella

parte inferiore della membrana sono state fissate con 2% glutaraldeide in PBS per 15 minuti, lavate per cinque volte in acqua bi-distillata e colorate con 0.1% cristal violetto e 20% metanolo per 20 minuti. Per ogni transwell sono state acquisite ed analizzate 4 immagini attraverso il programma Image J. Per ogni immagine è stato valutato il numero di cellule migrate, poi espresso come percentuale di numero totale di cellule migrate. Per ogni condizione sperimentale è stato eseguito un triplicato tecnico e ogni esperimento è stato ripetuto tre volte per ottenere un triplicato biologico.

*Protocollo di invecchiamento della NRG1-I- $\beta$ 1 ricombinante nella forma nativa e coniugata a nanoparticelle di ossido di ferro*

Il coniugato dell'esempio 1 è stato pre-incubato in DMEM 2% FBS a 37°C per un tempo di 4 e 6 settimane. DMEM 2%FBS è stato pre-incubato per gli stessi tempi sperimentali e utilizzato come controllo.

Risultati

L'espressione stabile del recettore tirosin-chinasi ErbB4 conferisce un aumento della migrazione nella linea di cellule progenitrici neuronali ST14A in risposta alla stimolazione con NRG1-I- $\beta$ 1. Per questo esperimento è stato scelto un clone stabile che esprime un'isoforma del recettore ErbB4.

L'intento di questo esperimento è stato quello di testare la stabilità della NRG1-I- $\beta$ 1 coniugata a nanoparticelle di ossido di ferro, confrontando il suo effetto con quello della proteina ricombinante nella forma nativa (fresca e invecchiata per un tempo di 4 e 6 settimane) sulla migrazione delle cellule ST14A.

Come mostrato in figura 1, il fattore NRG1-I- $\beta$ 1 ricombinante, nella forma nativa, fresco ha un maggiore effetto nell'indurre la migrazione tridimensionale tuttavia, durante il processo di invecchiamento in vitro (4 e 6 settimane) esso perde la sua bioattività, mentre l'NRG1-I- $\beta$ 1 coniugata (np-Nrg1) mantiene la propria bioattività ed azione nel promuovere la migrazione cellulare rispetto alle condizioni di controllo (cellule migrate in terreno 2% FBS).

Somministrata a colture di precursori neuronali esprimenti il recettore specifico per la neuregulina 1 beta 1, il coniugato dell'invenzione ha dimostrato un'efficacia biologica prolungata, rispetto alla proteina ricombinante non coniugata, nell'indurre la migrazione tridimensionale. La NRG1 coniugata ha dimostrato inoltre di indurre la crescita orientata dei neuriti in espianti di gangli della radice dorsale prelevati da ratto neonato e adulto.

### Esempio 3

Interazione e localizzazione subcellulare della NRG1-

I- $\beta$ 1 coniugata a nanoparticelle di Fe.

L'indagine di microscopia elettronica è stata condotta su cellule ST14A, clone stabile esprime un'isoforma di ErbB4, recettore della NRG1, stimolato con NRG1-I- $\beta$ 1 coniugata a nanoparticelle di ossido di ferro e con nanoparticelle di ossido di ferro da sole.

#### Materiali e Metodi

Le cellule ST14A esprimono stabilmente il recettore ErbB4 sono state stimolate con 500 ng/ml del coniugato dell'esempio 1 e con nanoparticelle di ossido di ferro da sole, per un tempo di 15 minuti e 24 ore. In seguito a stimolazione le cellule sono state raccolte e centrifugate per ottenere un pellet.

Il pellet cellulare è stato fissato in paraformaldeide 1% (Merck, Darmstadt, Germany), glutaraldeide 1,25% (Fluka, St Louis, MO, USA) e 0,5% saccarosio in tampone Sorensen per due ore.

In seguito si è proceduto ad un lavaggio in tampone fosfato 0,1M e saccarosio all'1,5% ed alla post-fissazione in tetrossido di osmio ( $\text{OsO}_4$  al 2% in tampone fosfato 0,1 M, pH 7,3) per circa 60-90 minuti a 4°C. Il materiale è stato quindi disidratato ed incluso in una miscela di resine secondo il metodo descritto da Glauerts (Pease, 1964): Araldite Harter al 50% e Araldite Cy212 al 50%. Si è infine proceduto all'allestimento delle sezioni ultra-fini

(70-90 nm) per l'analisi ultrastrutturale.

Le sezioni ultra-fini sono state raccolte su retini in rame, contrastate con acetato di uranile e citrato di piombo (Pease, 1964) ed infine esaminate e fotografate a 80 KV mediante un microscopio elettronico a trasmissione JEM-1010 (JEOL, Tokyo, Japan).

#### Risultati

La linea neuronale di cellule progenitrici ST14A, esprimenti stabilmente un'isoforma del recettore ErbB4 è stata stimolata con 500 ng/ml di NRG1-I- $\beta$ 1 coniugata a nanoparticelle di ferro o con nanoparticelle da sole, per i tempi sperimentali: 15 minuti e 24 ore. Dopo tale tempo di somministrazione è stato possibile osservare che le nanoparticelle da sole, dopo 15 minuti dalla somministrazione si trovano ancora all'esterno della cellula (fig. 2C e 2D), mentre dopo 24 ore di stimolazione non è possibile riconoscere nessuna nanoparticella (Fig. 2E e 2F).

Cellule ST14A stimulate con 500 ng/ml di NRG1-I- $\beta$ 1 coniugata a nanoparticelle di ossido di ferro, mostrano l'incorporazione delle nanoparticelle e la loro localizzazione a livello delle vescicole citoplasmatiche (fig. 2G, 2H, 2I e 2L) sede di demolizione e trasformazione del Fe.

Questi esperimenti hanno consentito di visualizzare

chiaramente la rapida internalizzazione del coniugato dell'invenzione attraverso fenomeni di endocitosi e successivamente una raccolta delle nanoparticelle nei compartimenti lisosomali/endosomali delle cellule, sede di demolizione e trasformazione del Fe.

## RIVENDICAZIONI

1.- Coniugato di una isoforma di neuregulina 1 ricombinante con nanoparticelle di ossido di ferro.

2.- Coniugato secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che dette nanoparticelle sono rivestite con destrano.

3.- Coniugato secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto che detta isoforma di neuregulina 1 è una isoforma beta della neuregulina 1.

4.- Coniugato secondo la rivendicazione 3 caratterizzato dal fatto che detta isoforma beta di neuregulina 1 è un isoforma beta 1 della neuregulina 1.

5.- Coniugato secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto che detto ossido di ferro è magnetite.

6.- Coniugato secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto che dette nanoparticelle hanno un diametro compreso tra 8 e 15 nm.

7.- Composizione farmaceutica comprendente un coniugato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6 e almeno un eccipiente farmaceuticamente accettabile.

8.- Coniugato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6 o composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 7 per l'uso nella rigenerazione del nervo periferico.

9.- Coniugato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6 o composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 7 per l'uso nel trattamento di un disturbo selezionato nel gruppo costituito da danni ai nervi periferici dovuti a traumi, incidenti, operazioni chirurgiche e neuropatie periferiche.

p.i.: UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO



TITOLO: "CONIUGATO DELLA NEUREGULINA 1 PER IL TRATTAMENTO DELLE LESIONI DEI NERVI PERIFERICI"

RIASSUNTO

La presente invenzione è relativa ad un coniugato di una isoforma di neuregulina 1 ricombinante con nanoparticelle di ossido di ferro e ad una composizione farmaceutica comprendente il coniugato. E' inoltre relativa all'uso di tale coniugato per la rigenerazione del nervo periferico.