



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101997900592375
Data Deposito	24/04/1997
Data Pubblicazione	24/10/1998

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	N		
Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

USO DEL NERVE GROWTH FACTOR NELLA CONSERVAZIONE DI CORNEE IN COLTURA
NELLA PRODUZIONE DI TESSUTI CORNEALI E CONGIUNTIVALI IN VITRO E NELLA
TERAPIA DI PATOLOGIE CORNEALI E CONGIUNTIVALI

RM 97 A 000238

DESCRIZIONE

a corredo di una domanda di brevetto per invenzione avente per titolo:

"Uso del nerve growth factor nella conservazione di cornee in coltura, nella produzione di tessuti corneali e congiuntivali in vitro e nella terapia di patologie corneali e congiuntivali"

a nome: Alessandro LAMBIASE

Inventore: Lo stesso Richiedente

La presente invenzione concerne l'uso del nerve growth factor nella conservazione di cornee in coltura, nella produzione di tessuti corneali e congiuntivali in vitro e nella terapia di patologie corneali e congiuntivali. Più in particolare, l'invenzione riguarda l'impiego della neurotrofina denominata nerve growth factor (NGF), nota per la sua capacità di influenzare lo sviluppo, la rigenerazione e il mantenimento delle funzioni biologiche dei neuroni, per il trattamento dei tessuti corneo-congiuntivali, sia per il corretto mantenimento della loro funzionalità in vitro che per la terapia di patologie della superficie oculare.

Come è noto, il trapianto di cornea rappresenta l'unica possibilità terapeutica nei confronti di patologie corneali distrofiche, infiammatorie o degenerative, qualora queste abbiano compromesso irreversibilmente la trasparenza o la normale struttura corneale. Una volta isolate da cadavere, le cornee vengono "conservate" fino al momento del trapianto, applicando metodi di conservazione che utilizzano liquidi derivati da mezzi per colture cellulari. Secondo uno dei metodi più usati, denominato "short/intermediate term storage", la cornea viene man-

Ing. Barzanò & Barzanò
Roma s.p.a.

tenuta a 4°C in terreni del tipo del McCarey-Kaufman (MK), o in diversi liquidi commerciali (tra cui l'Optisol-GS[®]) per un periodo massimo di 7 giorni. Una conservazione per tempi più lunghi è possibile con un altro metodo ugualmente diffuso, denominato "organ culture", che si basa su tecniche simili alle colture cellulari e consente di conservare le cornee espianate, a temperature comprese tra 30 e 36°C, per più di un mese.

Nessuno di questi metodi consente di migliorare le caratteristiche biologiche dei tessuti corneali durante la conservazione, il massimo obiettivo conseguibile essendo quello di mantenere invariata la qualità dei tessuti durante la conservazione. Ciò contribuisce a rendere più critica la già problematica situazione nel settore del trapianto di cornea, dove più della metà delle cornee vengono scartate subito dopo l'espianto perché l'esame al microscopio le rivela non idonee per il trapianto.

Un'altra importante problematica è rappresentata dalla necessità di avere a disposizione singole popolazioni cellulari della cornea, quali cellule endoteliali, cellule epiteliali e cheratociti, per poterle utilizzare a scopo di trapianto. In determinate situazioni che comportano distruzione della superficie oculare per ustioni fisiche o chimiche, o in conseguenza di patologie autoimmuni sinechianti (quali il pemfigoide cicatriziale, la sindrome di Stevens-Johnson, ecc.) o post-infettive, risulta infatti di estrema importanza poter disporre di cellule epiteliali corneali (comprendenti le stem cells) da poter trapiantare per sostituire la superficie oculare danneggiata, come pure poter disporre di tessuto epiteliale congiuntivale per sostituire la superficie sinechiata e retratta.

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

Passando ad esaminare le situazioni patologiche che possono interessare l'unità morfo-funzionale corneale (intesa come epitelio, stroma/cheratociti ed endotelio) e/o congiuntivale, si nota che vi è un'ampia gamma di affezioni che colpiscono questo distretto che risultano a tutt'oggi di difficile approccio terapeutico o del tutto prive di un valido trattamento. Si tratta, in particolare, di patologie corneali e/o congiuntivali congenite o acquisite quali: cheratiti e/o congiuntiviti neurotrofiche e neuroparalitiche, post-traumatiche, post-infettive, post-chirurgiche, conseguenti a trattamenti laser, da ustioni chimiche o fisiche o da metalli, cheratiti autoimmuni, distrofiche, degenerative, post-infiammatorie. Queste patologie si manifestano con alterazioni dell'epitelio corneale (spontaneamente nelle forme neuroparalitiche primarie o su base fisica, infettiva, immunitaria o tossica nelle forme secondarie) che esitano in un'ulcera che nella maggior parte dei casi tende alla perforazione, che può essere un'evenienza spontanea o seguire a microtraumi o a sovrainfezioni. Il quadro clinico di questa patologia è caratterizzato dalla lenta e difficoltosa guarigione, dalle infezioni sovrapposte e dal fallimento frequente di ogni terapia. Spesso l'esito finale è l'opacamento della cornea o la perforazione spontanea.

Per il trattamento di tali patologie si ricorre al bendaggio e all'utilizzo di sostanze lubrificanti e di antibiotici per prevenire le complicanze. Il ricoprimento congiuntivale si rende necessario quando la perforazione corneale è imminente o già sopravvenuta, ed ha l'unico scopo di preservare l'integrità anatomica del bulbo oculare, mentre la funzione visiva viene sacrificata. Il trapianto della cornea, sia lamellare

Ing. Bassano & Bonardo
Roma s.p.a.

che perforante, è assolutamente controindicato per la frequente comparsa di recidive anche sul lembo trapiantato, e per il rischio di sovrainfezioni. Sulla base di studi in vitro è stata anche proposta la terapia medica locale con preparazioni a base di fibronectina, plasmina, inibitori delle collagenasi, EGF (epidermal growth factor), autosiero. Nessuno di questi trattamenti si è rivelato risolutivo, in grado di bloccare o ridurre il danno della cornea o di modificare l'esito finale della patologia.

In particolare, nelle sequele delle ustioni corneali discreti risultati sono stati ottenuti con il trapianto di congiuntiva limbare prelevato dall'occhio controlaterale. Quando la patologia è bilaterale, si può ricorrere alla donazione di congiuntiva da parenti prossimi, o quando ciò non sia possibile, dal prelievo da cadavere. La metodica non è comunque risolutiva in tutti i casi. Nel caso di trapianto autologo, si possono verificare delle recidive della patologia a distanza di anni, mentre nel caso di trapianti omologhi il rigetto è frequente ed è assolutamente necessaria la terapia immunosoppressiva, con tutte le conseguenze secondarie agli effetti collaterali.

Un altro tipo di patologie corneo-congiuntivali per le quali la terapia dà spesso risultati insoddisfacenti è costituito dalle infezioni erpetiche, per le quali dopo la risoluzione di un primo evento patologico si manifestano frequentemente recidive, per le quali la prevenzione e il trattamento si presentano spesso di scarso successo.

Anche le patologie che colpiscono l'endotelio corneale, come ad esempio lo scompenso primario e secondario e le endoteliti, carat-

Ing. Barrano & Barardo
Roma s.p.a.

terizzate da una perdita del numero e/o della funzione delle cellule endoteliali, costituiscono un gruppo di malattie attualmente prive di un qualsiasi trattamento efficace.

La presente invenzione si propone pertanto lo scopo di fornire una soluzione ai problemi sopra riportati, tutti connessi con la fisiopatologia dei tessuti dell'unità morfologica e funzionale corneo-congiuntivale, mediante l'utilizzazione di un agente terapeutico che consenta di mantenere e ripristinare l'integrità e la corretta attività biologica di tali tessuti.

Il nerve growth factor (NGF) è una molecola capostipite di una complessa famiglia di neurotrofine, ben conosciuta per la sua azione trofica, tropica e differenziativa sui neuroni colinergici del sistema nervoso centrale e sul sistema simpatico periferico. È prodotta in molti tessuti di mammiferi, uomo compreso, e viene rilasciata nel torrente circolatorio in quantità più elevate durante la crescita e la differenziazione del sistema nervoso. Studi biologici, biochimici e molecolari condotti su sistemi cellulari in vitro hanno messo in evidenza una elevatissima omologia tra il NGF murino e quello umano. Inoltre, nell'uomo come in altre specie animali il NGF è normalmente presente sia nel liquor cerebrospinale che nel torrente ematico a concentrazioni dell'ordine di 10-50 pg/ml, che aumentano in alcune patologie infiammatorie (malattie autoimmuni, allergiche, ecc.) e diminuiscono in altre (diabete).

Il NGF è stato scoperto nel 1966 dalla Prof. Rita Levi-Montalcini, nell'istituto di Zoologia della Washington University di St. Louis

Ing. Barxano G. Barxano
Roma s.p.a.

(Levi-Montalcini R., Harvey Lect., 60:217, 1966) ed ha rappresentato un passo importante nello studio dei meccanismi di crescita e di differenziazione della cellula nervosa, essendo in grado di influenzare lo sviluppo e il mantenimento delle funzioni biologiche e la rigenerazione dei neuroni. Per la scoperta di questa molecola, per averne caratterizzato il ruolo biologico sia nel sistema nervoso periferico che in quello centrale, nel 1986 fu assegnato alla Prof. R. Levi-Montalcini il premio Nobel per la Medicina e Fisiologia.

Numerosi studi sperimentali in vitro ed in vivo hanno dimostrato l'importanza fisiopatologica del NGF nel prevenire il danno neuronale di natura chirurgica, chimica, meccanica ed ischemica, rendendolo il candidato ideale per l'impiego nella terapia di numerose patologie del sistema nervoso centrale e periferico (Hefti F., J. Neurobiol., 25:1418, 1994; J. Fricker, Lancet, 349:480, 1997). Infatti, già da qualche anno sono state effettuate prove cliniche su pazienti affetti dal morbo di Parkinson e dal morbo di Alzheimer, mediante somministrazione intracerebrale di NGF murino (si veda, ad es., Olson L et al., J. Neural Trans.: Parkinson's Disease and Dementia Section, 4: 79, 1992). I risultati di tali studi hanno confermato le osservazioni fatte su modelli animali ed hanno messo in evidenza l'assenza di possibili effetti collaterali in seguito alla somministrazione di NGF murino. Questa caratteristica è stata confermata più recentemente per il NGF umano ricombinante (Petty B.G. et al., Annals of Neurology, 36:244-246, 1994).

Dato che fino dalla sua scoperta gli studi sulla caratterizzazione degli effetti biologici, biochimici, molecolari, preclinici e clinici del

Ing. Barxano & Zanardo
Roma s.p.a.

NGF sono stati condotti quasi esclusivamente con il NGF isolato dalle ghiandole sottomandibolari di roditori adulti, la più ampia quantità di dati acquisiti riguarda attualmente il NGF murino. Le proprietà biochimiche di quest'ultimo sono state descritte, in particolare, in un lavoro che risale al 1968 (Levi-Montalcini R. e Angeletti P.U., *Physiological Reviews*, 48:534, 1968).

Il NGF contenuto nelle ghiandole salivari di topo è un complesso molecolare di 140 kdalton, con coefficiente di sedimentazione pari a 7S, costituito da tre subunità, α , β e γ , la seconda delle quali rappresenta la forma attiva vera e propria. Quest'ultima, detta β NGF, a coefficiente di sedimentazione pari a 2,5S, viene normalmente estratta e purificata seguendo tre metodologie non molto diverse tra di loro (Bocchini V., Angeletti P.U., *Biochemistry*, 64: 787-793, 1969; Varon S. et al., *Methods in Neurochemistry*, 203-229, 1972; Mobley W.C. et al., *Molecular Brain Research*, 387: 53-62, 1986).

Il β NGF ottenuto con tali metodiche è a sua volta un dimero di circa 13.000 dalton, costituito da due catene identiche di 118 amminoacidi. Ogni singola catena è stabilizzata da tre ponti disolfuro, mentre delle forze di legame non covalente garantiscono la formazione della struttura dimerica. Tale molecola, essendo molto stabile, risulta solubile pressoché in qualsiasi solvente sia acquoso che oleoso, conservando inalterate le proprie caratteristiche biochimiche e l'attività biologica. Ulteriori dettagli sulla struttura e sulle proprietà fisiche e biochimiche della molecola sono riportati in Greene, L.A. e Shooter, E.M., *Ann. Rev. Neurosci.* 3:353, 1980.

Ing. Barzani G. Barzani
Roma 24.01.81

Di recente, la struttura del β NGF è stata ulteriormente chiarita mediante un'analisi cristallografica. Questa ha rilevato la presenza di tre coppie antiparallele di filamenti, con struttura secondaria di tipo β , in grado di formare una superficie piana lungo la quale si associano le due catene per dare il dimero attivo. Su tali catene del β NGF si è evidenziata la presenza di quattro regioni "loop" in cui sono localizzati molti amminoacidi variabili ai quali, probabilmente, è legata la specificità di riconoscimento da parte del recettore.

L'effetto biologico del NGF è mediato da due recettori presenti sulla superficie delle relative cellule bersaglio. Esistono numerosi anticorpi che inibiscono selettivamente l'effetto biologico del NGF, la cui esistenza ha permesso e permette una accurata caratterizzazione e modulazione della sua azione, sia in sistemi cellulari che in vivo.

In tempi più recenti è stato possibile sintetizzare con tecniche di ingegneria genetica il NGF umano (Iwane, M. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 171:116, 1990), e sono anche divenute reperibili commercialmente piccole quantità di NGF umano. Tuttavia, da esperienze dirette si è riscontrato che l'attività biologica del NGF umano è molto bassa rispetto all'attività del NGF murino. Inoltre, è da tenere presente che la quasi totalità dei dati sull'uomo attualmente disponibili, sia in vitro che in vivo, sono stati condotti utilizzando il NGF murino, e che non sono mai stati riscontrati effetti indesiderati ricollegabili all'origine murina della molecola.

Studi condotti a partire dagli anni '90 su modelli animali hanno suggerito un possibile coinvolgimento del NGF in patologie oculari.

Ing. Barzani G. Barzani
Roma s.p.a.

Tuttavia, tali sperimentazioni riguardano quasi esclusivamente l'impiego del NGF in affezioni retiniche, ossia sul tessuto nervoso, mentre nulla è presente in letteratura su un effetto di questa neurotrofina sulla superficie oculare (cornea e congiuntiva), né risultano lavori scientifici che propongano l'impiego del NGF per il trattamento di patologie oculari corneo-congiuntivali. In particolare, alcuni studi sono stati condotti nell'animale per verificare l'efficacia della somministrazione locale del NGF nel trattamento di patologie retiniche, ad esempio nel trattamento dell'ischemia acuta retinica (Siliprandi R. et al., *Inv. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 34:3232, 1993), nella transezione del nervo ottico (Carmignoto G. et al., *J. Neurosci.*, 9:1263, 1989) e nel trattamento della retinite pigmentosa (Lambiase A. e Aloe L., *Grafe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 234: S96-S100, 1996). I risultati hanno dimostrato che la somministrazione locale di NGF è in grado di prevenire od almeno ritardare la morte delle cellule gangliari retiniche e dei fotorecettori durante le suddette patologie. Nessuno di questi studi ha evidenziato effetti collaterali sull'animale.

Per quanto riguarda invece le patologie dei tessuti corneali, che rappresentano l'oggetto di interesse della presente invenzione, numerosi Autori hanno preso in considerazione per queste indicazioni un possibile impiego dell'epidermal growth factor (EGF), partendo dal presupposto che alterazioni dell'epitelio corneale rappresentino la chiave patogenetica per lo sviluppo di altre affezioni corneali quali ulcere e cheratiti.

L'EGF è un polipeptide di 53 aminoacidi scoperto e caratteriz-

Ing. Barzani & Zanardo
Roma s.p.a.

zato nei primi anni '60 (Cohen S., J. Biol. Chem., 237:1555-1562; 1962), che ha un peso molecolare di circa 6000 dalton ed è prodotto dalla ghiandola salivare di topo adulto, ma è presente in piccole quantità in molti tessuti umani. Esercita una ben caratterizzata azione trofica, proliferativa e differenziativa sulle cellule epiteliali ottenute da vari tessuti animali e umani, e la sua efficacia in vitro su colture di cellule epiteliali corneali, nonché la sua capacità di indurre proliferazione e differenziazione di queste cellule, sono descritte in alcuni lavori sperimentali.

Tuttavia, gli studi clinici su patologie corneali che sono stati effettuati sulla base di tali dati sperimentali hanno dato risultati contraddittori, dimostrando, in generale, una sostanziale inefficacia dell'EGF in questo tipo di patologie umane (Kandrakis A.S. et al., Am. J. Ophthalmol., 98:411, 1984), forse da imputare ad una diversa espressione del recettore per l'EGF in vitro ed in vivo, o più probabilmente al fatto che le alterazioni epiteliali nelle patologie corneali costituirebbero solo un epifenomeno della patologia corneale stessa.

Il documento EP-A-0 312 208 (Ethicon) descrive formulazioni in gel per l'uso nel trattamento di lesioni e patologie epiteliali in genere, ivi comprese le lesioni e patologie superficiali oftalmiche, le quali contengono un principio attivo che sembra poter essere scelto indifferentemente tra varie molecole nella cui denominazione compare l'espressione "fattore di crescita". Infatti, benché la descrizione sia esclusivamente dedicata all'EGF come principio attivo preferito, e solo di questo siano presentati dati di attività (in vitro) ed esempi di formu-

Ing. Barzani G. Barzani
Roma 4 p.m.

lazione, vengono altresì nominati vari altri fattori di crescita, come il FGF (fibroblast growth factor), il PDGF (platelet-derived growth factor), il TGF- α (transforming growth factor) o lo stesso NGF, presentandoli apparentemente come un insieme di molecole con le stesse caratteristiche ed azioni biologiche dell'EGF. In realtà, allo stato attuale delle conoscenze, l'esperto riconosce che tali fattori di crescita hanno dei target specifici diversi e spesso effetti contrapposti, e non li considera certo come biologicamente equivalenti tra loro. Inoltre, per quanto riguarda in modo specifico il campo oftalmico, il documento citato descrive i fattori di crescita in questione come attivi esclusivamente sull'epitelio corneale, riducendone l'impiego proposto a quello di fattori riepitelizzanti, utili, in pratica, solo nelle patologie traumatiche.

Al contrario, nell'ambito degli studi che hanno portato alla presente invenzione si è partiti dal concetto di cornea come unità morfofunzionale in cui i singoli strati (epitelio, stroma ed endotelio) svolgono tutti una funzione di uguale importanza nella preservazione dell'integrità del tessuto e nei meccanismi riparativi. In questa ottica svolge un ruolo fondamentale il supporto trofico garantito dall'innervazione sensoriale corneale, la cui lesione causa un danno di tutta l'unità morfofunzionale.

Visto che nella tecnica anteriore non esisteva nessuna evidenza di un effetto del NGF (uno dei tanti neuromediatrici rilasciati dalle terminazioni sensoriali in altri distretti dell'organismo) sulla superficie oculare, ci si è inizialmente posti la domanda se tale neurotrofina potesse svolgere un ruolo trofico-riparativo sul tessuto corneale di deri-

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

vazione embrionale neuroectodermica, dato che numerosi targets di questa neurotrofina presentano un'analoga derivazione embriogenetica. Si sono pertanto analizzate cornea e congiuntiva per individuare la presenza di NGF e del recettore ad alta affinità per il NGF (TrkA, tirosinchinasi A), utilizzando un anticorpo monoclonale (TrkA-antibody; Santa Cruz, USA) con tecniche di immunoistochimica. Infatti, la presenza del recettore specifico costituisce un presupposto fondamentale per l'attività della molecola in studio.

Si è così trovato che tutte le cellule corneali (cellule epiteliali, endoteliali e cheratociti) esprimono il TrkA e che, nel contempo, l'innervazione somatosensoriale corneale è in grado di rilasciare NGF. Questa scoperta consente di ipotizzare, da un lato, che il NGF, probabilmente rilasciato dalle terminazioni nervose, svolgerebbe un ruolo fisiopatologico in tutti i meccanismi riparativi corneali (sia superficiali che profondi), e dall'altro che numerose patologie corneali superficiali associate a compromissione primaria (quali cheratiti neurotrofiche o distrofiche e recidive di infezioni erpetiche) o secondaria (quali ustioni chimiche o fisiche, lesioni post-infettive, autoimmuni, post-chirurgiche o conseguenti a trattamento con laser) dell'innervazione riconoscerebbero come momento eziologico fondamentale il mancato rilascio del NGF.

La stessa scoperta consente anche di ipotizzare che il NGF risulterebbe essenziale nella conservazione dell'intero tessuto corneale in coltura, ossia in tutte quelle condizioni in cui la cornea in toto, intesa come unità morfo-funzionale comprendente epitelio, stroma ed endote-

Ing. Barzani S. Barzani
Roma s.p.a.

lio, od alcune sue cellule, sono private del supporto trofico garantito dal rilascio del NGF dalle terminazioni nervose corneali.

Inoltre, dato che gli effetti che sono stati osservati dopo somministrazione di NGF esogeno avvengono a concentrazioni pressoché fisiologiche (dell'ordine di alcuni microgrammi) è ipotizzabile che un possibile meccanismo fisiopatogenetico nelle affezioni corneali considerate consista in una riduzione dei livelli locali del NGF sotto la soglia in grado di garantire l'integrità corneale e/o congiuntivale.

Forma pertanto oggetto specifico della presente invenzione, secondo un suo primo aspetto, l'uso del nerve growth factor (NGF) per la conservazione di cornee in coltura e per la conservazione e produzione in vitro di tessuti corneali o congiuntivali e di singole popolazioni cellulari della cornea o della congiuntiva.

Preferibilmente, il NGF viene aggiunto ad un terreno di coltura di tipo adatto per la conservazione delle cornee, o per la coltura in vitro di cellule o tessuti corneali o congiuntivali, in concentrazioni comprese tra 100 pg/ml e 200 ng/ml, eventualmente assieme ad altri nutrienti e ad altri agenti biologicamente attivi. Il NGF da impiegare a tale scopo può essere di origine murina o anche umano, eventualmente ricombinante, e può essere utilizzato sotto forma di liofilizzato, disciolto in soluzione, in un terreno di coltura o in qualsiasi altro solvente disponibile, fino ad ottenere una concentrazione finale compresa nel campo sopra indicato.

Adatte metodiche di estrazione e purificazione del NGF sono riportate nella letteratura precedentemente citata. Per gli scopi speri-

*Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.*

mentali della presente invenzione, si è adottata la tecnica di Bocchini e Angeletti, qui sinteticamente riportata. Vengono prelevate sterilmente le ghiandole sottomascellari di topi maschi adulti, e i tessuti vengono omogeneizzati, centrifugati e dializzati; quindi la sospensione viene fatta passare attraverso successive colonne di cellulosa, su cui rimane adsorbito il NGF. Il NGF viene quindi eluito dalla colonna mediante un tampone contenente cloruro di sodio 0,4 M. I campioni così ottenuti vengono letti allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 280 nm per identificare le frazioni contenenti il NGF. Queste ultime vengono dializzate ed il NGF così ottenuto viene liofilizzato sterilmente e conservato in frigorifero a -20 °C.

In una valutazione degli effetti di una aggiunta di NGF a vari terreni di coltura per cornee espiantate (sia a 4 °C che a 30-36 °C), si è ottenuto un miglioramento di tutte le caratteristiche biologiche del tessuto corneale, per quantità di NGF comprese tra 100 pg/ml e 200 ng/ml. La risposta ottimale si è avuta per una concentrazione di 100 ng/ml. In particolare, dopo 7 giorni di coltura si sono ottenuti un aumento della densità delle cellule endoteliali (incremento compreso tra il 10 e il 25%), una riduzione della mortalità cellulare endoteliale (assenza di cellule endoteliali trypan blue positive), una migliore morfologia endoteliale (qualitativamente un trofismo di 3/3 contro un trofismo di 2/3 dei controlli in cui non era stato aggiunto il NGF), una maggiore vitalità dei cheratociti e un aspetto notevolmente migliore dell'epitelio. Inoltre, alcune cornee che prima di essere messe in coltura erano considerate non idonee al trapianto risultavano invece idonee dopo 7 giorni di col-

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

tura in presenza di NGF.

Un'analoga verifica sperimentale sugli effetti del NGF come additivo al terreno di coltura di cellule corneali (epiteliali, endoteliali e cheratociti) ha mostrato che l'aggiunta di una quantità di NGF murino compresa tra 100 pg/ml e 200 ng/ml (con una risposta ottimale alla concentrazione di 100 ng/ml) è in grado di indurre proliferazione e differenziazione delle varie popolazioni cellulari, ed inoltre di favorirne l'attecchimento su vari tessuti di supporto (quali lamelle di stroma corneale, membrana amniotica, ecc.). Tale aggiunta favorisce inoltre l'interazione tra i diversi tipi cellulari in co-culture cellulari, per cui l'invenzione può essere utilizzata anche per la coltura di linee cellulari corneali miste al fine di ottenere una cornea artificiale utile per trapianto.

Anche le colture di cellule epiteliali congiuntivali hanno dimostrato, in presenza di NGF murino alle stesse concentrazioni sopra specificate, un aumento della proliferazione e differenziazione, e anche un aumento del numero delle cellule caliciformi, rendendo vantaggioso un trapianto di tessuto epiteliale congiuntivale così ottenuto per sostituire la congiuntiva di pazienti affetti da cherato-congiuntivite sicca, sia primaria che secondaria ad altre patologie.

Secondo un altro aspetto dell'invenzione, viene pertanto fornito un terreno di coltura per la conservazione di cornee o per la conservazione e produzione in vitro di tessuti corneali o congiuntivali o di singole popolazioni cellulari della cornea o della congiuntiva, caratterizzato dal fatto di contenere una quantità efficace di NGF, preferibilmente compresa tra 100 pg/ml e 200 ng/ml di NGF, e in maniera ottimale pari

Ing. Barzani G. Riccardo
Roma s.p.a.

a 100 ng/ml.

Come risulta dalla descrizione che precede, l'invenzione ha ulteriormente ad oggetto l'uso del nerve growth factor per la produzione di un farmaco per la terapia e/o la profilassi di patologie corneali e/o congiuntivali.

In modo specifico, l'invenzione è indicata per la produzione di farmaci utili per la terapia e/o la profilassi di patologie corneali e/o congiuntivali congenite o acquisite scelte nel gruppo consistente in: cheratiti e/o congiuntiviti neuroparalitiche o neurotrofiche, cheratiti e/o congiuntiviti erpetiche, cheratiti e/o congiuntiviti post-traumatiche, da ustioni chimiche o fisiche o da metalli, post-infettive, post-chirurgiche, conseguenti a trattamento laser, cheratiti e/o congiuntiviti autoimmuni, distrofiche, degenerative, post-infiammatorie.

Un prodotto medicinale secondo l'invenzione adatto per somministrazione topica contiene preferibilmente, da solo o in associazione con uno o più altri principi attivi, da 10 a 500 µg/ml di NGF, una concentrazione ottimale essendo pari a 250 µg/ml circa. Tale prodotto può essere sotto forma di collirio, gel, unguento, crema, polvere o può anche essere aggiunto ad un bendaggio locale o con lente a contatto terapeutica.

Secondo un'altra forma di realizzazione dell'invenzione, il prodotto farmaceutico per la cui realizzazione viene proposto l'uso del NGF è un farmaco indicato per la terapia e/o la profilassi di patologie oftalmiche endoteliali primitive e secondarie, per il quale le formulazioni preferite contengono (anche in questo caso eventualmente in associa-

Ing. Barzani G. Barzani
Roma s.p.a.

zione con altri principi attivi) da 1 a 250 µg/ml di NGF, e per il quale la somministrazione avviene per introduzione in camera anteriore.

Studi in vivo su animali per il trattamento di patologie dell'endotelio corneale sono stati effettuati con somministrazione in camera anteriore di soluzioni acquose contenenti NGF a concentrazioni comprese tra 1 e 250 µg/ml. In particolare, in conigli in cui era stato indotto un danno endoteliale per mezzo di una criosonda si è ottenuto, a distanza di 15 giorni, un completo ripristino della densità endoteliale. La somministrazione di NGF in patologie a carico dell'endotelio, sia di natura distrofica che acquisita, sia con perdita del numero delle cellule endoteliali che della loro funzionalità, risulta in grado di ripristinare una corretta funzione endoteliale.

In una serie di studi sull'uomo per la verifica dell'efficacia del NGF nel trattamento topico di affezioni corneo-congiuntivali, è stato selezionato un certo numero di patologie in base ad un interessamento primario o secondario del plesso nervoso corneale somato-sensoriale. In tali studi è stato impiegato NGF murino (2,5S), ottenuto con la tecnica di purificazione precedentemente riportata, ad una concentrazione di circa 250 mg/ml diluito in soluzione salina bilanciata, per somministrazione topica.

Nella tabella riportata più avanti sono riassunti i risultati ottenuti da uno studio su 5 pazienti affetti da ulcera corneale torpida in cheratite neurodistrofica (2 occhi) o in seguito a cheratoplastica (2 occhi) o ad ustione da alcali (2 occhi). Il protocollo terapeutico consisteva nella instillazione di una-due gocce della preparazione con una frequenza

Ing. Barzani & Zanardo
Roma s.p.a.

giornaliera così suddivisa: ogni 2 ore per i primi 2 giorni, 6 volte al giorno fino al 2° giorno dopo riepitelizzazione completa della cornea e 2 volte al giorno per i successivi 15 giorni.

La terapia topica con NGF veniva iniziata dopo 15 giorni di trattamento con autosiero in assenza di segni di miglioramento del quadro clinico. Tutti i pazienti trattati hanno mostrato chiari segni di guarigione entro 2 settimane dall'inizio del trattamento con NGF, e nessuno di essi ha mostrato la comparsa di effetti collaterali locali o sistemici durante il trattamento o nel periodo successivo. La terapia, una volta sospesa, dovrebbe essere reinstaurata qualora e non appena si verificassero i primi segni o sintomi di una recidiva della patologia epiteliale.

Qui di seguito sono riportati singolarmente i 5 casi in questione, i cui dati fondamentali sono poi riassunti nella successiva tabella.

1° caso - Una bambina di 9 anni affetta da anoftalmo congenito presentava un'ulcera corneale da oltre 20 giorni che, trattata con somministrazione topica di antibiotici e cortisonici, non mostrava nessuna tendenza alla guarigione. L'ulcera presentava un diametro di circa 7 mm ed una profondità di oltre i 2/3 dello stroma corneale. L'esame clinico mostrava un'anestesia corneale sulla base della quale è stata diagnosticata una cheratite neurotrofica. Dopo 15 giorni di trattamento con autosiero, di fronte ad un progressivo peggioramento del quadro clinico, si è iniziato il trattamento topico con NGF.

Dopo 4 giorni l'ulcera corneale si era ridotta approssimativamente a 3,5 mm di diametro, e dopo 12 giorni la cornea era completa-

Ing. Barzani G. Riccardo
Roma s.p.a.

mente riparata ed il trattamento con NGF veniva sospeso. La paziente presentava un leucoma centrale con alcuni neovasi e, sia pur ridotta, era presente una sensibilità corneale, completamente inesistente prima del trattamento. Dopo 8 mesi di follow up la paziente presentava un acuità visiva di 5/10 con una sensibilità corneale ancora presente.

2° Caso - Una donna di 26 anni, affetta da sindattilia e deficit dell'VIII paio di nervi cranici, presentava da circa 2 mesi un'ulcera corneale che si era progressivamente approfondita fino a raggiungere un'estensione di 7 mm ed una profondità fino alla membrana di Descemet. L'esame clinico mostrava una completa anestesia corneale.

Dopo 2 settimane di terapia con NGF erano presenti segni evidenti di guarigione con una riduzione della profondità dell'ulcera. Dopo 6 settimane di terapia la cornea era completamente riepitelizzata, residuando un leucoma centrale con alcuni neovasi, e inoltre era ripristinata una sensibilità corneale, sia pur ridotta.

3° Caso - Un uomo di 25 anni, enucleato dell'occhio sinistro in seguito all'insorgenza di un'ulcera corneale dopo un intervento di cheratoplastica perforante, presentava da circa 1 mese sull'occhio destro un'ulcera corneale su un trapianto corneale. L'ulcera corneale presentava circa 5 mm di diametro ed una profondità di circa $\frac{1}{2}$ stroma corneale; era inoltre presente anestesia corneale.

Dopo 2 settimane di trattamento con NGF era evidente un processo riparativo corneale con riduzione dell'estensione e della profondità dell'ulcera. Dopo 4 settimane di trattamento con NGF l'ulcera era completamente guarita e persisteva un leucoma centrale con alcuni

Ing. Barrano & Ranardo
Roma s.p.a.

neovasi; permaneva una spiccata ipoestesia corneale.

4° Caso - Un uomo di 56 anni presentava un'ulcera corneale bilaterale in seguito ad un'ustione da alcali. L'occhio destro, dopo essere stato sottoposto ad un intervento di cheratoplastica perforante, era stato enucleato dopo l'insorgenza di un'ulcera. L'occhio sinistro, dopo essere stato sottoposto ad un intervento di cheratoplastica lamellare, aveva sviluppato un'ulcera torpida di circa 7 mm che non mostrava segni di guarigione.

Dopo 2 settimane di terapia con NGF era evidente l'inizio di un processo riparativo, che si è completato dopo 5 settimane.

5° Caso - Un uomo di 56 anni presentava un'ulcera corneale bilaterale dovuta ad un'ustione da acido cloridrico. A destra era presente un'ulcera di circa 4 mm di diametro, mentre a sinistra l'ulcera era più larga (più di 8 mm di diametro) e più profonda. Il paziente presentava marcata ipoestesia corneale.

Dopo 2 settimane di trattamento con NGF l'occhio destro era completamente guarito, con un residuo leucoma centrale, mentre a sinistra l'ulcera era ridotta sia in estensione che in profondità, anche se era presente un panno neovascolare. Dopo 3 settimane di trattamento entrambe le cornee erano completamente riepitelizzate, residuava un leucoma centrale ed era presente sensibilità corneale, sia pur ridotta. Dopo un follow up di 2 mesi entrambe le cornee sono rimaste riepitelizzate, e a destra è presente un'acuità visiva di 3/10, mentre a sinistra l'acuità è di 1/10; inoltre, permane una sensibilità corneale in entrambi gli occhi.

Ing. Barranò & Ranardo
Roma s.p.a.

TABELLA 1: Trattamento in vivo con Nerve Growth Factor

Paziente No.	Patologia	Età (anni), sesso	Insorgenza	Sensibilità iniziale	Terapia pregressa	Trattamento con NGF	Esito	Sensibilità finale	Visus	Follow up
1	ulcera neurotrofica	9, F	20 giorni	anestesia	antibiotici, cortisonici, autosiero	12 giorni	guarigione	normale/ ipoestesia	migliorato	8 mesi
2	ulcera neurotrofica	26, F	2 mesi	anestesia	antibiotici, cortisonici, autosiero	6 settimane	guarigione	normale/ ipoestesia	migliorato	4 mesi
3	ulcera neurotrofica in PK ^{a)}	25, M	1 mese	anestesia	antibiotici, cortisonici, autosiero	4 settimane	guarigione	anestesia	migliorato	2 mesi
4	ulcera post-ustione da alcali in LK ^{b)}	56, M	2 mesi	anestesia	antibiotici, cortisonici, autosiero	5 settimane	guarigione	normale/ ipoestesia	migliorato	4 mesi
5 (OD)	ustione da alcali	56, M	1 mese	anestesia/ ipoestesia	antibiotici, cortisonici, autosiero	2 settimane	guarigione	normale/ ipoestesia	migliorato	3 mesi
5 (OS)	ustione da alcali	56, M	1 mese	anestesia/ ipoestesia	antibiotici, cortisonici, autosiero	3 settimane	guarigione	normale/ ipoestesia	migliorato	3 mesi

a) PK: trapianto di cornea perforante (penetrating keratoplasty)

b) LK: trapianto di cornea lamellare (lamellar keratoplasty)

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

I dati che precedono dimostrano chiaramente l'efficacia dell'uso del NGF non solo per la conservazione e per la produzione in vitro di tessuto corneale e/o congiuntivale in toto o in parte, o dei singoli tipi cellulari che lo compongono, ma anche per la cura e la prevenzione di patologie umane o animali che colpiscono l'unità morfo-funzionale corneale o la congiuntiva, e che non hanno finora trovato una terapia efficace.

La presente invenzione è stata descritta con riferimento ad alcune sue forme di realizzazione specifiche, ma è da intendersi che variazioni o modifiche potranno essere ad essa apportate dagli esperti nel ramo senza per questo uscire dal relativo ambito di protezione.

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Marina Banchetti
(N° d'iscr. 463)

Marina Banchetti

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.



RIVENDICAZIONI

RM 97 A 0002381

1. Uso del nerve growth factor (NGF) per la conservazione di cornee in coltura e per la conservazione e produzione in vitro di tessuti corneali o congiuntivali e di singole popolazioni cellulari della cornea o della congiuntiva.

2. Uso secondo la rivendicazione 1, in cui il NGF viene aggiunto ad un mezzo di coltura per la conservazione delle cornee o ad un mezzo di coltura per la conservazione e la produzione di tessuti o di cellule corneali o congiuntivali in concentrazioni comprese tra 100 pg/ml e 200 ng/ml.

3. Uso secondo la rivendicazione 2, in cui detta concentrazione è pari a 100 ng/ml.

4. Uso secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti, in cui detto mezzo di coltura contiene altri agenti biologicamente attivi.

5. Terreno di coltura per la conservazione di cornee o per la conservazione e produzione in vitro di tessuti corneali o congiuntivali o di singole popolazioni cellulari della cornea o della congiuntiva, caratterizzato dal fatto di contenere una quantità efficace di NGF.

6. Terreno di coltura secondo la rivendicazione 5, contenente tra 100 pg/ml e 200 ng/ml di NGF.

7. Terreno di coltura secondo la rivendicazione 6 contenente 100 ng/ml di NGF.

8. Uso del nerve growth factor (NGF) per la produzione di un farmaco per la terapia e/o la profilassi di patologie corneali e/o con-

Ing. Barzanò & Zanardo
Roma s.p.a.

giuntivali.

9. Uso secondo la rivendicazione 8 in cui detto farmaco è indicato per la terapia e/o la profilassi di patologie corneali e/o congiuntivali congenite o acquisite scelte nel gruppo consistente in: cheratiti e/o congiuntiviti neuromuscolari o neurotrofiche, cheratiti e/o congiuntiviti erpetiche, cheratiti e/o congiuntiviti post-traumatiche, da ustioni chimiche o fisiche o da metalli, post-infettive, post-chirurgiche, conseguenti a trattamento laser, cheratiti e/o congiuntiviti autoimmuni, distrofiche, degenerative, post-infiammatorie.

10. Uso secondo le rivendicazioni 8 o 9, in cui detto farmaco è per somministrazione topica, e contiene da 10 a 500 µg/ml di NGF.

11. Uso secondo la rivendicazione 10, in cui detto farmaco contiene 250 µg/ml di NGF.

12. Uso secondo la rivendicazione 8 in cui detto farmaco è indicato per la terapia e/o la profilassi di patologie oftalmiche endoteliali primitive e secondarie.

13. Uso secondo la rivendicazione 12, in cui detto farmaco è per somministrazione in camera anteriore e contiene da 1 a 250 µg/ml di NGF.

14. Uso secondo ognuna delle rivendicazioni 8-13, in cui l'NGF è in associazione, in detto farmaco, con uno o più altri principi attivi.

15. Uso e terreno di coltura secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti in cui detto NGF è di origine murina o umana, o è NGF umano ricombinante.

Ing. Barzani G. Barzani
Roma s.p.a.

16. Uso del nerve growth factor nella conservazione di cornee
in coltura, nella produzione di tessuti e cellule corneali e congiuntivali
in vitro e nella terapia di patologie corneali e/o congiuntivali e relativo
terreno di coltura, secondo le rivendicazioni 1-15, sostanzialmente co-
me sopra descritto.

ROMA, 24 APR. 1997

p.p. Alessandro LAMBIASE

ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

UN MANDATO
per se e per gli altri
Marina Banchetti
(N° d'iscr. 463)

Marina Banchetti

MB

*Ing. Barzano' & Zanardo
Roma s.p.a.*

[Signature]

