



## PROOF OF CONCEPT - DD467

### RISULTATI PROGETTO POC01\_00016

#### Formulazioni di siRNA per la terapia dell'Osteopetrosi Autosomica Dominante di tipo 2 (ADO2)

Periodo 10/7/2019 – 9/1/2022

Il progetto in oggetto si è preposto l'obiettivo di identificare formulazioni complessate con un piccolo RNA interferente (siRNA) per la cura di una patologia genetica dello scheletro denominata Osteopetrosi Autosomica Dominante di tipo 2 (ADO2).

L'ADO2 è una patologia di elevata gravità in termini di sofferenza ed impatto sociale ed economico. Essa è caratterizzata da notevole disabilità, grave sintomatologia e necessità di una continua assistenza fisica e psicologica. Affligge specialmente, ma non solo, lo scheletro ed è incurabile. Pertanto, per la sua cura è necessario identificare farmaci atti a ridurre gli effetti della mutazione genica piuttosto che a trattare i sintomi in modo palliativo. Il 70% dei pazienti affetti da ADO2 è portatore di mutazioni missenso del gene *CLCN7* che codifica la proteina dimerica CIC7, la quale funziona come antiporto 2Cl<sup>-</sup>/1H<sup>+</sup> ed è ampiamente espressa da numerose cellule dell'organismo umano. Noi abbiamo raccolto prove sostanziali che indicano che i siRNA rappresentano mezzi per ridurre l'espressione del trascritto mutato in questa malattia eterozigote, senza modificare l'espressione di altri mRNA, compreso quello del *CLCN7* non mutato.

Il progetto è stato suddiviso in 7 obiettivi realizzativi (OR) che comprendevano l'approvazione degli esperimenti su topi ADO2 (OR 1), la selezione delle formulazioni da utilizzare nello studio (OR 2), il trattamento dei topi ADO2 con le formulazioni migliori complessate con il siRNA *Cln7<sup>G213R</sup>*, da noi selezionato in uno studio precedente, che fossero efficaci e specifiche (OR 3), la tollerabilità e gli effetti collaterali (OR 4), l'analisi del fenotipo osseo (OR 5) e non osseo (OR 6) e la valutazione dei risultati dal punto di vista brevettuale e di mercato (OR 7). I risultati sono stati rendicontati in otto Stati di Avanzamento dei Lavori (SAL). In questa relazione le formulazioni selezionate sono denominate Formulazione A e B. Si mette qui in evidenza che tutti gli OR sono stati raggiunti come di seguito specificato.

### OR 1

#### APPROVAZIONE DEGLI ESPERIMENTI SUGLI ANIMALI

##### Obiettivo raggiunto nel SAL 2.

L'approvazione degli esperimenti sugli animali è stata ottenuta dal Ministero della Salute il 18 febbraio 2020, con prot. N. 112/2020-PR.



---

## OR 2

### SELEZIONE DELLE NANOPARTICELLE POLIMERICHE DA UTILIZZARE NELLO STUDIO

#### Obiettivo raggiunto nel SAL6.

La selezione delle formulazioni oggetto dello studio è stata condotta in vitro utilizzando cellule HEK293, transfettate stabilmente con il plasmide *CLCN7<sup>G215R-EGFP</sup>*, e monociti primari isolati dal midollo osseo di topi ADO2. Gli esperimenti sono stati eseguiti nei SAL4-6 ed i risultati hanno mostrato che entrambe le Formulazioni del *Clcn7<sup>G213R</sup>*-siRNA (A e B) sottoposte a valutazione, erano efficaci nel ridurre l'espressione del gene mutato *Clcn7<sup>G213R</sup>*. Tale efficacia era maggiore per la Formulazione A, per la quale in vitro erano necessarie concentrazioni minori di siRNA (30-60 nM) rispetto alla Formulazione B (60-120 nM).

Studi di tossicità in vitro hanno inoltre dimostrato che, mentre la formulazione A era ben tollerata, la formulazione B induceva evidenti danni cellulari. Tale tossicità era attenuata dalla complessazione con liposomi di fosfolipidi.

A conclusione degli studi in vitro eseguiti nell'OR 2 abbiamo quindi dedotto che in vitro:

- la Formulazione A è in media più efficace della Formulazione B
- la Formulazione A richiede dosi meno elevate della Formulazione B
- la Formulazione B è meno tollerata dalle cellule
- i liposomi di fosfolipidi migliorano la tollerabilità cellulare di entrambe le formulazioni

---

## OR 3

### TRATTAMENTO DEI TOPI ADO2 CON LE FORMULAZIONI DEL siRNA *Clcn7<sup>G213R</sup>* EFFICACI E SPECIFICHE

#### Obiettivo raggiunto nel SAL8.

Sulla base dei risultati ottenuti nel corso dell'OR 3, dal SAL4 al SAL8 abbiamo eseguito i trattamenti in vivo. A tale scopo, abbiamo utilizzato topi maschi (*Mus Musculus*) di ceppo C57BL6/J, geneticamente modificati mediante *knock in* totale del gene *Clcn7<sup>G213R</sup>*, eterozigoti per la mutazione (topi ADO2), di 10 giorni di età. Essi sono stati trattati mediante iniezioni intraperitoneali delle Formulazioni A e B o di formulazioni di controllo ottenute complessando le Formulazioni A e B con siRNA inattivo *scramble* (SCR). Poiché dagli esperimenti a breve termine avevamo dedotto che in vivo funzionavano meglio e/o erano maggiormente tollerate le formulazioni complessate con



liposomi di fosfolipidi, i trattamenti a lungo termine sono stati eseguiti utilizzando *Clcn7<sup>G213R</sup>*-siRNA or SCR-siRNA complessati con le Formulazioni A o B e liposomi.

I topi ADO2 sono stati trattati ad intervalli di 48 ore o con frequenza di tre inoculi a settimana a seconda della durata degli esperimenti. Al loro termine, i topi sono stati sacrificati mediante inalazione di CO<sub>2</sub>, quindi da essi sono stati prelevati ossa, organi viscerali e sangue. Le ossa sono state utilizzate per l'analisi molecolare dell'espressione trascrizionale del gene mutato *Clcn7<sup>G213R</sup>*, l'analisi morfometrica mediante microCT dei parametri strutturali, e l'analisi istomorfometrica dei parametri cellulari in campioni inclusi in polimetilmetacrilato. Gli organi viscerali sono stati utilizzati per l'analisi molecolare dell'espressione trascrizionale del gene *Clcn7<sup>G213R</sup>* e per l'analisi istopatologica. Il sangue è stato utilizzato per l'analisi di marcatori sierici di danno d'organo e dell'espressione trascrizionale del gene *Clcn7<sup>G213R</sup>* nelle cellule mononucleate circolanti (PBMCs).

---

## OR 4

### TOLLERABILITÀ ED EFFETTI COLLATERALI

#### Obiettivo raggiunto nel SAL8.

Quest'analisi è stata condotta in vivo nei SAL6-SAL8. La prima fase è consistita nella verifica di eventuali alterazioni della sopravvivenza, dell'assunzione di cibo, della crescita ponderale e delle capacità motorie dei topi ADO2 trattati con le Formulazioni A e B nei confronti di topi ADO2 di controllo, trattati con formulazioni complessate con SCR-siRNA inattivo, e di topi *wild-type* non trattati, provenienti dal nostro archivio storico.

I risultati hanno mostrato un'ottima tollerabilità della Formulazione A inoculata alla dose di 4 mg/Kg, 3 volte a settimana per 4 settimane. Infatti, la sopravvivenza dei topi era del 100%, la loro crescita ponderale ed il peso al termine del trattamento erano paragonabili fra i due gruppi e con i valori riscontrati nei topi *wild-type* non trattati.

Lo stesso schema di trattamento induceva invece seri effetti collaterali con la Formulazione B, consistenti nella morte improvvisa del 36% dei topi trattati con formulazione non complessata con liposomi e del 25% dei topi trattati con formulazione complessata con liposomi di fosfolipidi. Inoltre, la crescita ponderale ed il peso al termine dell'esperimento dei topi sopravvissuti erano inferiori ai valori normali. Per stabilire se si potessero attenuare tali effetti negativi, abbiamo ridotto la dose somministrata a 2 mg/Kg di siRNA, utilizzando la Formulazione B e mantenendo lo schema di somministrazione inalterato (3 volte a settimana per 4 settimane). Con queste modifiche la tollerabilità è migliorata. Si noti comunque che, nonostante le differenze non fossero significative, il peso dei topi ADO2 trattati con la Formulazione B con o senza liposomi era costantemente inferiore al peso dei topi *wild-type* non trattati, facendoci sospettare un lieve effetto tossico della formulazione B indipendente dalla complessazione con il siRNA.



Successivamente abbiamo eseguito studi istopatologici per verificare se organi vitali dei topi ADO2 trattati subissero alterazioni microscopiche. Il trattamento con 4 mg/Kg di siRNA *Clcn7<sup>G213R</sup>* complessato con la Formulazione A non ha indotto alcuna alterazione dell'aspetto istologico dei fegati, dei reni e delle milze, a conferma della sua buona tollerabilità. Analogamente, non abbiamo riscontrato alcuna alterazione microscopica in organi vitali di topi ADO2 trattati con 2 mg/Kg di siRNA *Clcn7<sup>G213R</sup>* complessato con la Formulazione B.

Le analisi biochimiche eseguite sui sieri dei topi ADO2 trattati con *Clcn7<sup>G213R</sup>*-siRNA complessato con la formulazione A hanno mostrato valori nella norma degli enzimi epatici alanina amino transferasi (ALT) e fosfatasi alcalina (ALP). I marcatori sierici di danno renale, urea ed acido urico, non erano invece misurabili. Le analisi biochimiche eseguite sui sieri dei topi ADO2 trattati con *Clcn7<sup>G213R</sup>*-siRNA complessato con la Formulazione B hanno mostrato una concentrazione dell'ALP anch'essa nella norma. I dati ottenuti analizzando l'ALT hanno invece mostrato valori in media superiori alla norma sia nei topi trattati con il *Clcn7<sup>G213R</sup>*-siRNA che in quelli trattati con il siRNA SCR di controllo. Fra i due trattamenti non vi erano invece differenze significative. Questo risultato ci induce ulteriormente ad ipotizzare che vi sia un lieve effetto tossico intrinseco alla Formulazione B, indipendente dal *Clcn7<sup>G213R</sup>*-siRNA. I marcatori sierici di danno renale, urea ed acido urico, anche in questo caso non erano misurabili.

Gli studi di tollerabilità hanno permesso di identificare le condizioni sperimentali migliori per valutare gli effetti delle Formulazioni A e B complessate con liposomi di fosfolipidi sul fenotipo osseo e non osseo dei topi ADO2.

- Formulazione A: iniezione intraperitoneale di 4 mg/Kg, 3 volte a settimana per 4 settimane
- Formulazione B: iniezione intraperitoneale di 2 mg/Kg, 3 volte a settimana per 4 settimane

Sono state invece escluse dallo studio sul fenotipo dei topi ADO2 le formulazioni A e B non complessate con liposomi.

---

## OR 5

### ANALISI DEL FENOTIPO OSSEO

#### Obiettivo raggiunto nel SAL8.

Per quanto concerne la Formulazione A, mediante *real time* RT-PCR, utilizzando primers specifici che riconoscono esclusivamente il gene mutato, abbiamo dimostrato una tendenza alla riduzione dell'espressione del gene mutato *Clcn7<sup>G213R</sup>* nei femori ed una riduzione significativa nelle cellule mononucleate del sangue periferico.

Nonostante il risultato ottenuto nei femori non sia stato significativo, l'analisi morfologica mediante microCT delle tibie dei topi trattati con *Clcn7<sup>G213R</sup>*-siRNA complessato con la Formulazione A ha mostrato meno osso trabecolare nel versante prossimale delle tibie rispetto al trattamento con siRNA



di controllo SCR. Quest'osservazione è stata confermata mediante analisi morfometrica, la quale ha mostrato un riduzione significativa del volume di osso trabecolare sul volume totale di tessuto (BV/TV) e del numero di trabecole ossee (Tb.N), con un conseguente aumento della separazione delle trabecole (Tb.Sp). Il trattamento non ha modificato lo spessore delle trabecole ossee (Tb.Th), il quale non è però affetto dalla patologia (Alam et al. 2014, [10.1016/j.bone.2013.10.021](https://doi.org/10.1016/j.bone.2013.10.021)).

L'analisi istomorfometrica condotta istochimicamente in sezioni di tibia per evidenziare l'attività dell'enzima osteoclasta-specifico fosfatasi acida tartrato-resistente (TRAcP), ha mostrato una normalizzazione dei parametri osteoclastici. Da notare che l'ADO2 è una forma di osteopetrosi definita "ricca di osteoclasti", nella quale il loro numero è più elevato che nei topi *wild-type* per compensare con l'aumento della quantità la riduzione della loro attività. Pertanto, il risultato del trattamento risulterebbe positivo se il numero degli osteoclasti dei topi ADO2 si riducesse. In conformità con questa peculiarità, i risultati hanno mostrato che il trattamento con la Formulazione A aveva in effetti ridotto sia la superficie che il numero di osteoclasti presenti nelle sezioni istologiche rispetto ai topi di controllo, avvalorando la normalizzazione del fenotipo osteoclastico. Invece, la superficie ossea erosa dagli osteoclasti risultava significativamente aumentata, a dimostrazione del ripristino della loro attività.

L'ADO2 è caratterizzata da una pessima qualità delle ossa che, nei pazienti, si fratturano anche in assenza di traumi. Per valutare se la qualità del tessuto osseo dei topi ADO2 fosse migliorata dal trattamento, abbiamo eseguito analisi di bioindentazione per misurare il primo ciclo di distanza di indentazione (ID) (misura della deformazione plastica iniziale del tessuto al penetrare della sonda di indentazione) e la distanza totale di indentazione (TID) (misura della profondità totale raggiunta dalla sonda dopo indentazioni multiple). Se elevati, tali parametri dimostrano scarsa resistenza del tessuto mineralizzato. Nella valutazione da noi eseguita, abbiamo osservato che l'ID e la TID delle ossa dei topi ADO2 erano significativamente ridotte dal trattamento con la Formulazione A rispetto al trattamento di controllo con la formulazione di controllo contenente SCR-siRNA, dimostrando così una diminuzione della fragilità ossea e quindi un miglioramento della resistenza del tessuto.

Per quanto concerne la Formulazione B, nei topi ADO2 trattati per 4 settimane con 2 mg/Kg di *Cln7<sup>G213R</sup>* abbiamo riscontrato una riduzione significativa dell'mRNA del gene mutato *Cln7<sup>G213R</sup>* nei femori, rispetto ai topi ADO2 trattati con la formulazione di SCR-siRNA di controllo. Al contrario, nei PBMCs non si assisteva ad alcuna riduzione dell'espressione del gene mutato, dimostrando una minore efficacia di questa dose sui precursori circolanti degli osteoclasti.

L'analisi morfometrica mediante microCT ha comunque rivelato un miglioramento del fenotipo osseo come si evince dalla riduzione del volume osseo totale sul volume totale di tessuto (BV/TV), dalla riduzione del numero di trabecole (Tb.N) e dal conseguente aumento della separazione fra le trabecole (Tb.Sp) misurati nella metafisi prossimale delle tibie. Come atteso, lo spessore delle trabecole, il quale, come già detto, non è affetto dalla patologia (Alam et al. 2014, [10.1016/j.bone.2013.10.021](https://doi.org/10.1016/j.bone.2013.10.021)), non si modificava per effetto del trattamento (Tb.Th).

L'analisi istomorfometrica in sezioni istologiche colorate istochimicamente per evidenziare l'enzima osteoclasta-specifico TRAcP ha rilevato che anche il trattamento con la Formulazione B aveva ridotto



sia la superficie che il numero degli osteoclasti presenti nelle sezioni rispetto ai topi di controllo, avvalorando così la normalizzazione del fenotipo osteoclastico. Inoltre, la superficie ossea erosa dagli osteoclasti risultava significativamente aumentata, dimostrando il ripristino della loro funzione di riassorbimento osseo.

Per valutare se la qualità del tessuto osseo dei topi ADO2 fosse migliorata dal trattamento, anche per il *Clcn7<sup>G213R</sup>*-siRNA complessato con la Formulazione B abbiamo eseguito le analisi di bioindentazione per valutare la resistenza del tessuto mineralizzato. In questo caso, abbiamo osservato solo una tendenza non significativa alla riduzione dell'ID e della TID indotta dal trattamento con la Formulazione B rispetto al trattamento di controllo con SCR-siRNA.

---

## OR 6

### ANALISI DEL FENOTIPO NON OSSEO

#### Obiettivo raggiunto nel SAL8.

L'analisi mediante *real time* RT-PCR, utilizzando primers specifici che riconoscono esclusivamente il gene mutato, ha rivelato che la sua espressione era significativamente ridotta nei polmoni, nei fegati, nei reni e nei muscoli dei topi trattati per 4 settimane con 4 mg/Kg di *Clcn7<sup>G213R</sup>*-siRNA complessato con la Formulazione A rispetto al complesso SCR di controllo. Non si osservava invece alcuna riduzione nell'encefalo, probabilmente a causa della presenza della barriera emato-encefalica.

Per quanto concerne l'analisi del fenotipo non osseo nel trattamento per 4 settimane con 2 mg/Kg di Formulazione B, la valutazione dei livelli di espressione del gene mutato *Clcn7<sup>G213R</sup>* negli organi viscerali mediante *real time* RT-PCR ha rivelato che la sua espressione era significativamente ridotta esclusivamente nei polmoni, mentre nei fegati, nei reni, nei muscoli e negli encefali non si osservava alcuna variazione rispetto ai topi ADO2 trattati con il SCR-siRNA di controllo.

Nel loro complesso, questi dati indicano che la riduzione della dose di siRNA *Clcn7<sup>G213R</sup>* complessato con la Formulazione B mostra limiti di efficacia sistemica che, insieme al sospetto di una lieve tossicità osservata nell'analisi della tollerabilità del trattamento, la rendono meno interessante sotto il profilo farmacologico rispetto al complesso con la Formulazione A.

---

## OR 7

### VALUTAZIONE DEI RISULTATI DAL PUNTO DI VISTA BREVETTUALE E DI MERCATO ED ATTIVITA' DI VALORIZZAZIONE PER LO SVILUPPO INDUSTRIALE DELLA MIGLIORE FORMULAZIONE TESTATA IN VIVO

#### Obiettivo raggiunto nel SAL8.



Al termine delle valutazioni eseguite nel SAL8 abbiamo completato l'analisi critica dei risultati ottenuti. Confermiamo che i dati raccolti nel corso dello studio indicano che le formulazioni utilizzate nel progetto sono più efficaci se complessate con liposomi di fosfolipidi. Le nanoparticelle polimeriche della formulazione B hanno però un elevato grado di tossicità, solo leggermente attenuato dalla complessazione con i liposomi.

Per quanto concerne l'efficacia dei due complessi, la Formulazione B consente di ridurre la dose di siRNA a 2 mg/Kg, attenuando così i problemi di tossicità, senza però annullarli del tutto. Tuttavia, a questa dose si riscontrano limiti di efficacia soprattutto sulla resistenza meccanica dell'osso e sull'espressione del gene in cellule mononucleate circolanti ed in organi viscerali, tranne i polmoni. Poiché gli organi viscerali analizzati nello studio sono affetti dalla malattia e beneficiano del trattamento con i nostri siRNA (Maurizi et al. 2019, [10.1038/s41413-019-0055-x](https://doi.org/10.1038/s41413-019-0055-x)), riteniamo tale limite piuttosto importante per l'ulteriore sviluppo della Formulazione B quale veicolo idoneo alla somministrazione del farmaco. L'inefficacia sulle cellule mononucleate circolanti limiterebbe inoltre l'uso di questo strumento poco invasivo quale potenziale *endpoint* di sperimentazione clinica.

La Formulazione A è efficace solo alla dose di siRNA di 4 mg/Kg, ma non mostra effetti tossici ed esercita effetti benefici sui parametri strutturali e cellulari del tessuto osseo, sulle sue proprietà meccaniche, sull'espressione del gene mutato nei monociti circolanti ed in tutti gli organi viscerali analizzati, ad eccezione dell'encefalo, probabilmente a causa della presenza della barriera emato-encefalica. Pertanto, riteniamo che per lo sviluppo industriale sia da valorizzare soprattutto la Formulazione A, eventualmente anche eseguendo modifiche che ne migliorino ulteriormente l'efficacia e ne consentano la somministrazione, per esempio, per via sottocutanea o orale.

Questi risultati incoraggiano alla valorizzazione dello studio per lo sviluppo industriale. Riteniamo quindi che gli obiettivi del progetto siano stati pienamente raggiunti, coerentemente con il piano sperimentale approvato dal Ministero dell'Università e della Ricerca, ente finanziatore del progetto Proof of Concept.