

NERVE GROWTH FACTOR

Trattamento con Nerve Growth Factor (NGF) di bambini con glioma delle vie ottiche e lesioni ipossico-ischemiche cerebrali

Prof. Antonio Ruggiero

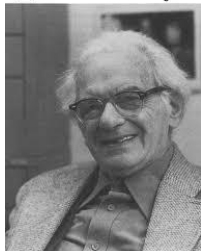
Unità di Oncologia Pediatrica

Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli IRCCS

Università Cattolica Sacro Cuore di Roma

NGF: *una storia affascinante*

Viktor Hamburger



1934 - Viktor Hamburger, embriologo della Washington University (St. Louis) pubblica i risultati di studi su embrioni di pollo con cui dimostra che lo sviluppo del sistema nervoso è influenzato da segnali provenienti dai tessuti circostanti; tali segnali sono in grado di indirizzare la differenziazione dei neuroni, la crescita delle fibre nervose e l'innervazione degli organi.



1946 - presso il proprio laboratorio domestico di Torino la Rita Levi Montalcini e il suo maestro Giuseppe Levi dimostrano che i neuroni di embrioni di pollo erano in grado di dividersi, di iniziare il processo di crescita e migrazione delle fibre e che poi erano morti: avevano stabilito il principio della morte neuronale

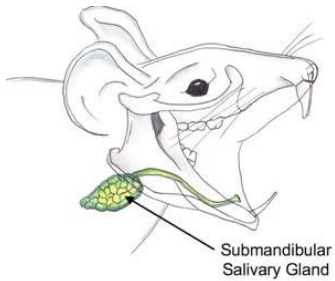
Nel 1947 riceve incarico docente di neurobiologia della Washinton University di Saint Louis

1950 - Rita Levi Montalcini dimostra che alcuni tipi cellulari rilasciano una "sostanza stimolante la crescita nervosa", infrangendo i principi fondanti dell'embriologia del tempo, secondo i quali la differenziazione delle cellule era guidata esclusivamente dal programma genetico

1953 - la Levi Montalcini tornava a St Louis Hamburger le affiancava Stanley Cohen, un giovane biochimico

1956 - La Levi Montalcini e Cohen isolano ed identificano una frazione nucleo-proteica in grado di stimolare la crescita nervosa, che veniva chiamata **Nerve Growth Factor, NGF**.

NGF: *una storia affascinante*



1958 - veniva scoperta una ricca sorgente di NGF nelle ghiandole sottomandibolari del topo

1959 - un esperimento condotto con un antisiero specifico contro l'NGF iniettato in cavie ai primi giorni di vita provava che l'inattivazione dell'NGF endogeno determinava una marcata atrofia dei gangli simpatici. Era la dimostrazione che l'NGF costituisce un fattore fondamentale nel normale sviluppo del sistema nervoso

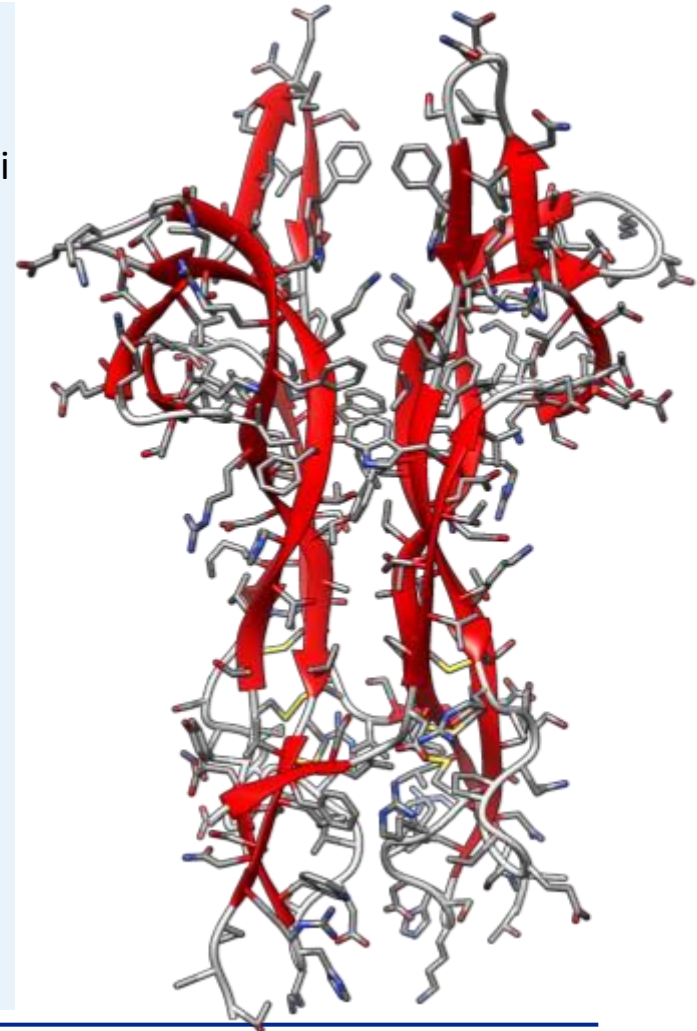
1986 - viene assegnato a Rita Levi Montalcini e Stanley Cohen un riconoscimento prestigioso, il Nobel, "per le loro scoperte sui fattori di crescita".



NGF

- 2 catene polipeptidiche
- I due monomeri del NGF uniti l'uno all'altro da legami deboli formano un dimero di peso molecolare di 26.500.
- È stato dimostrato che il dimero è dotato dell'attività biologica NGF; non è noto se questa sia presente anche nel monomero
- NGF è una proteina endogena altamente conservata tra le diverse specie: elevata omologia tra NGF murino e umano
- Presenza ubiquitaria nel corpo umano

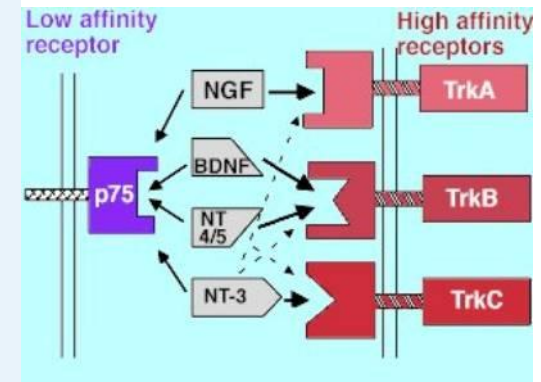
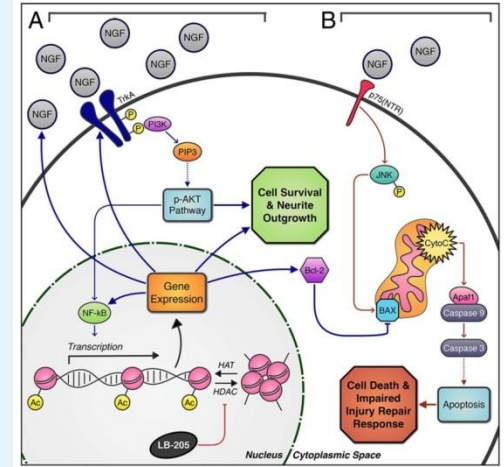
ShooterEM, Annu Rev Neurosci, 2001



ATTIVITA' NGF

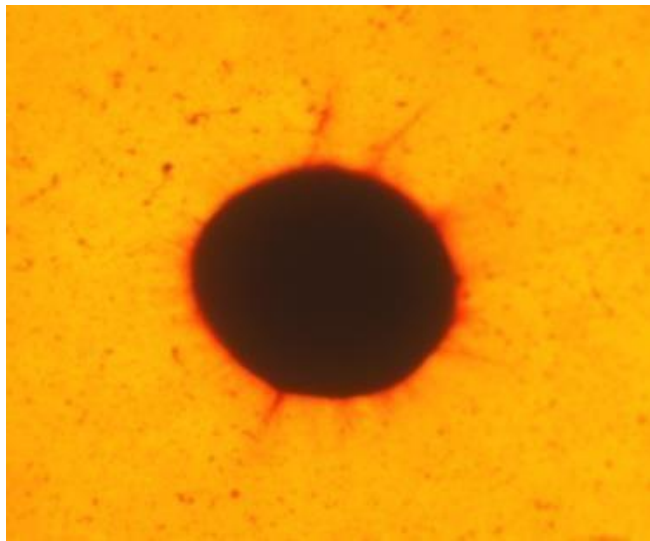
- NGF è presente in: sistema nervoso centrale e periferico, sistema immunitario, sangue, cuore, fegato, ghiandola lacrimale, cornea, umore acqueo, iride, retina, nervo ottico.
- Regolazione della sopravvivenza e del differenziamento dei neuroni durante lo sviluppo embrionale e di alcune funzioni dei neuroni maturi
- 2 famiglie di recettori: una famiglia di recettori aventi attività tirosin-chinasica denominati Trk e un recettore comune denominato p75NTR
- Trasporto retrogrado
- Modulatore attività sinaptica (plasticità neuronale)
- Promuove l'allungamento e il riparo neuronale dopo un danno ischemico, traumatico e tossico
- Migliora il flusso ematico cerebrale nei neonati con danno cerebrale ipossico ischemico (migliori performance cognitive e pattern elettroencefalografici)

Kaplan et al 2000; McAllister 2001; Dekosky et al. 2004; Verge et al. 1992; Chiaretti et al. 2008; Chiaretti et al. 2005; Eriksson et al. 1998

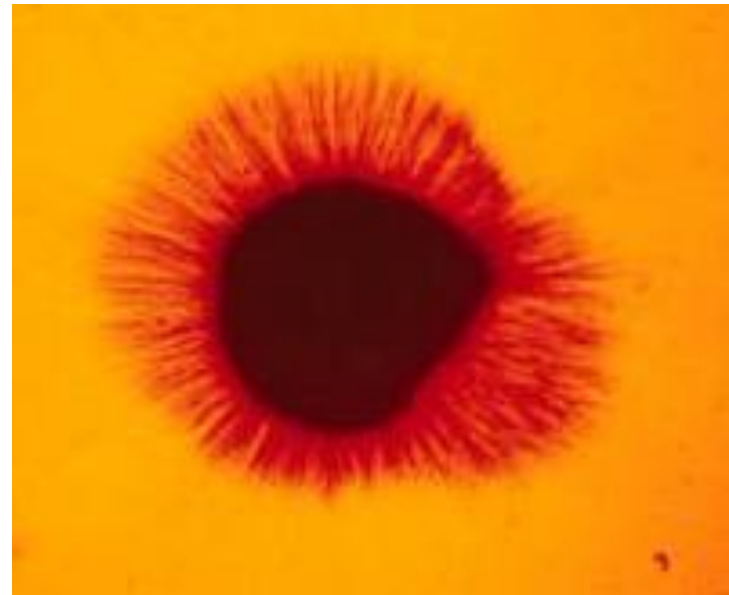


Effetti dell'NGF

Crescita e differenziamento di specifiche popolazioni neuronali



A



B

Un ganglio spinale cresciuto in assenza (A) o presenza (B) di NGF.
In B, è possibile osservare una rilevante proliferazione di processi neuritici.

NGF e sistema visivo

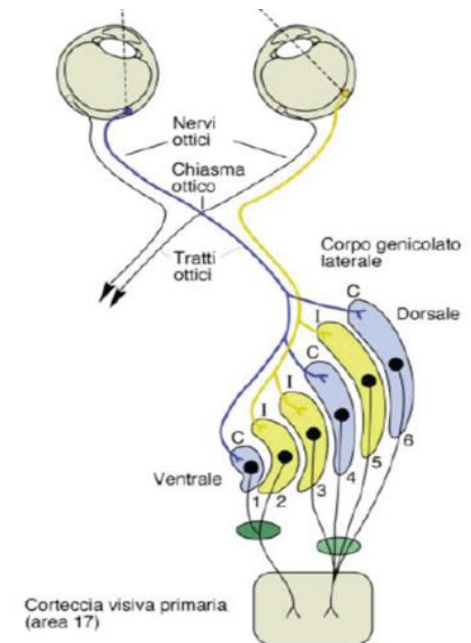
In modelli animali:

Recettori del NGF sulla cornea, congiuntiva, epitelio pigmentato retinico, fotorecettori e cellule ganglionari retiniche (CGR)

L' NGF somministrato per via congiuntivale a ratti adulti ha mostrato la presenza dell'NGF all'interno delle cellule retiniche e dei neuroni del nervo ottico con un concomitante rapido picco di concentrazione ematica.

La somministrazione intraoculare di NGF protegge le CGR dalla degenerazione dopo la sezione sperimentale del nervo ottico o l'ischemia oculare e determina il reclutamento di neuroni colinergici del proencefalo.

(Carmignoto et al. 1989; Hefti 1986; Silipandri et al. 1993; Tuszynski et al. 1996; Williams et al. 1986; Lambiase et al. 2005)



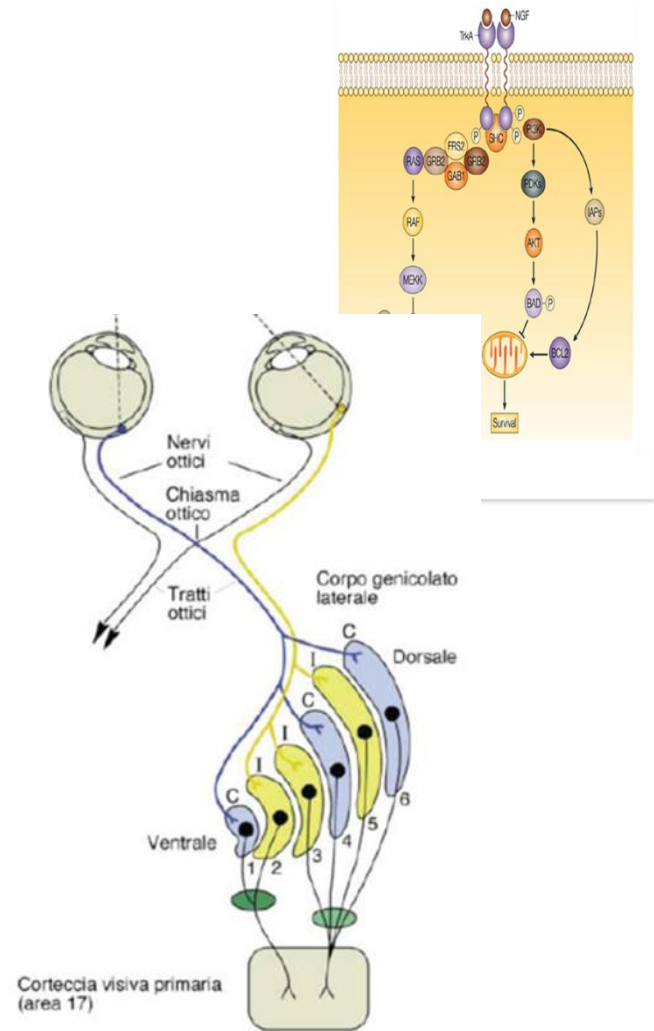
NGF e sistema visivo

In studi clinici:

NGF somministrato per via oculare è sicuro ed efficace nel trattamento di pazienti con **ulcere corneali** dovute al deficit del nervo trigemino

Gli effetti dell'NGF sui neuroni delle vie ottiche sono mediati attraverso l'up-take delle CGR, il trasporto retrogrado lungo il nervo ottico e il rilascio a livello dei neuroni genicolati postsinaptici

(ambiase et al. 2000; Lambiase et al. 1998; Domenici et al. 1994)



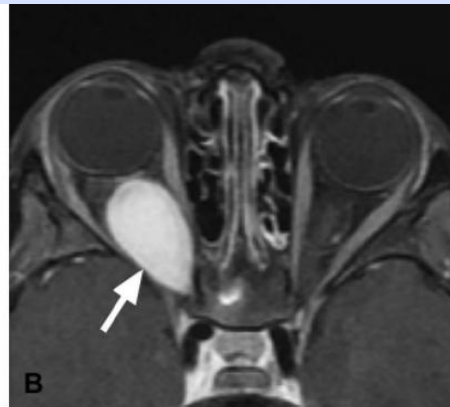
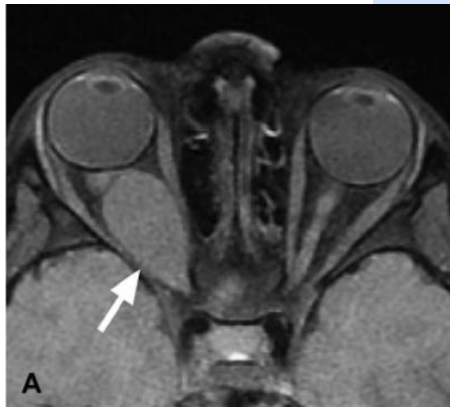
GLIOMI VIE OTTICHE

- 5% dei tumori intracranici pediatrici

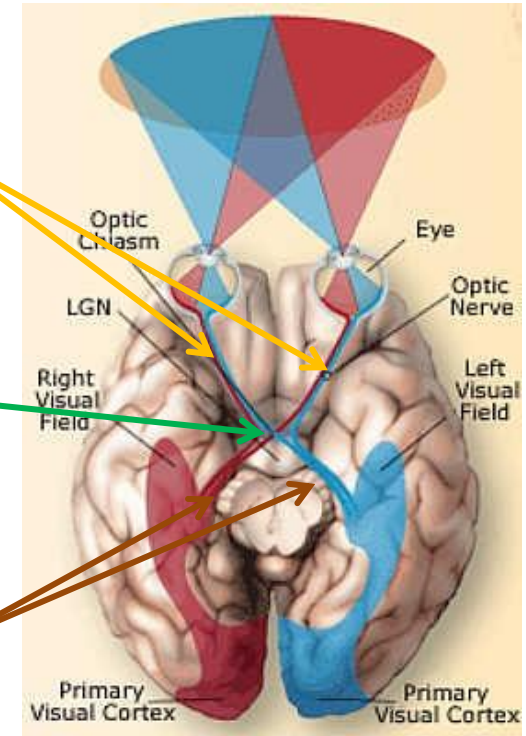
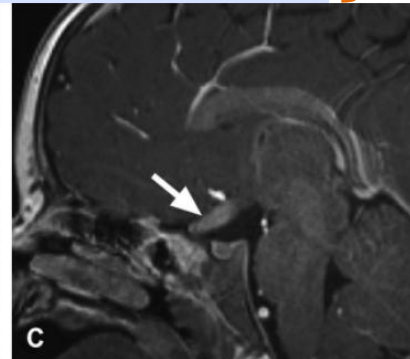
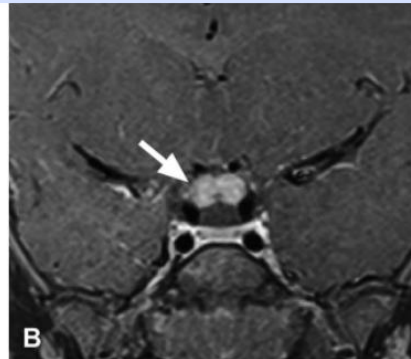
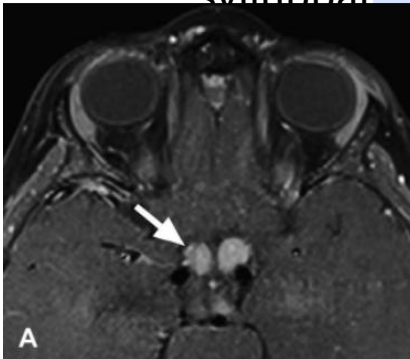
diminuzione dell'acuità visiva,
esoftalmo,
campo visivo

le associate a
come *spasmus*
re e asimmetrico,
capo e torcicollo.)

emianopsia



- 1:3500
- 15-20%
sviluppar



NGF: *una storia affascinante*

Compressione delle vie ottiche

Danno ischemico e tossico a carico dei neuroni del nervo ottico e delle vie ottiche



Riduzione del visus

Trattamento antineoplastico

“segni inequivocabili di progressione di malattia e o di deterioramento delle condizioni cliniche, come lo è la riduzione della funzione visiva anche senza modificazioni volumetriche del tumore”

(GNEKOW et al. 2004; KING et al. 2003; LISTERNICK et al. 1997; MASSIMINO et al. 2002).

GLIOMI

Research Articles

Topical Nerve Growth Factor as a Visual Rescue Strategy in Pediatric Optic Gliomas: A Pilot Study Including

Neurorehabilitation and
Neural Repair
25(6) 512–520
© The Author(s) 2011
Reprints and permission: <http://www.sagepub.com/journalsPermissions.nav>
DOI: 10.1177/1545968310397201
<http://nrr.sagepub.com>

doi:10.1093/brain/awv366

BRAIN 2016; 139; 404–414 | 404

BRAIN
A JOURNAL OF NEUROLOGY

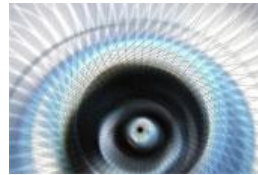
Nerve growth factor improves visual loss in childhood optic gliomas: a randomized, double-blind, phase II clinical trial

Benedetto Falsini,¹ Antonio Chiaretti,² Daniela Rizzo,² Marco Piccardi,¹ Antonio Ruggiero,² Luigi Manni,³ Marzia Soligo,³ Anna Dickmann,¹ Matteo Federici,¹ Annabella Salerni,¹ Laura Timelli,⁴ Gaspare Guglielmi,⁵ Ilaria Lazzareschi,² Massimo Caldarelli,⁶ Lucia Galli-Resta,⁷ Cesare Colosimo⁸ and Riccardo Riccardi²

Preparazione NGF



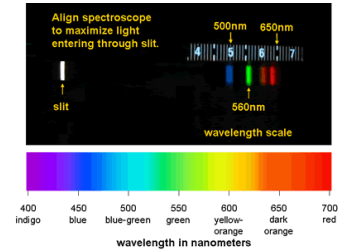
Estrazione delle ghiandole mandibolari di topo adulto



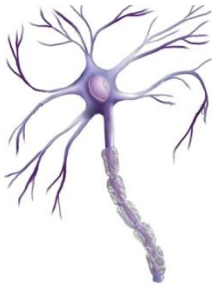
Omogeneizzazione
Centrifuga
Dialisi



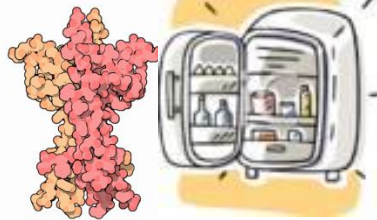
Filtrazione ed
isolamento di NGF



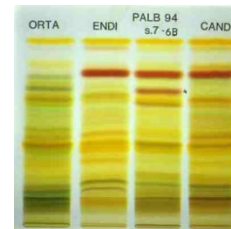
Identificazione
frazioni con NGF



Test attività
biologica in vitro



Liofilizzazione e
conservazione



Determinazione
della purezza

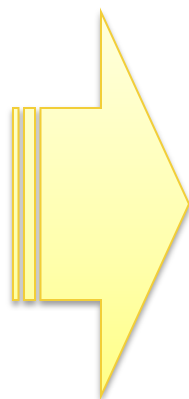


Determinazione
della specificità

Somministrazione NGF



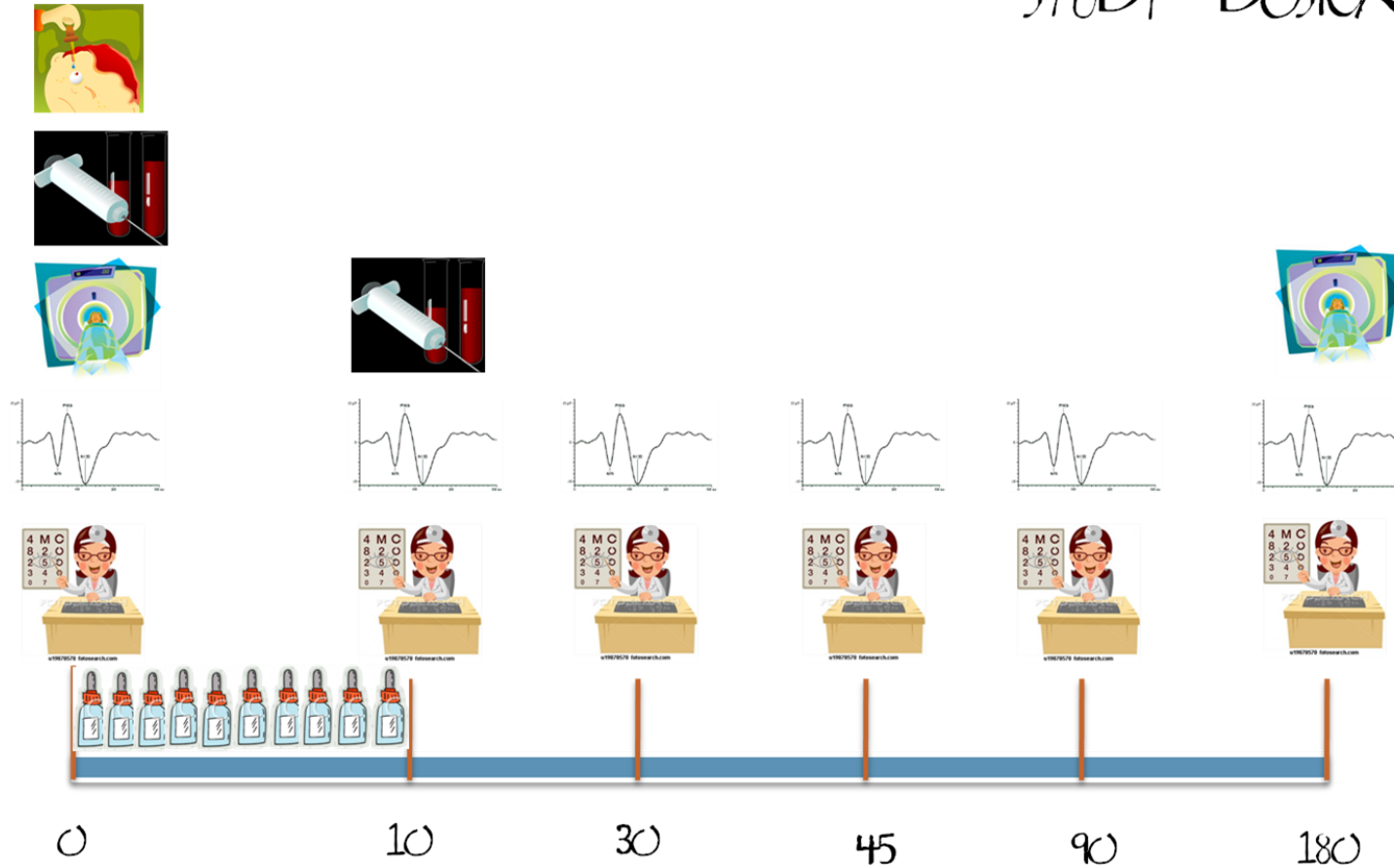
0.5 mg di NGF è stato
sciolto in 2.5 ml di SF allo
0,9%



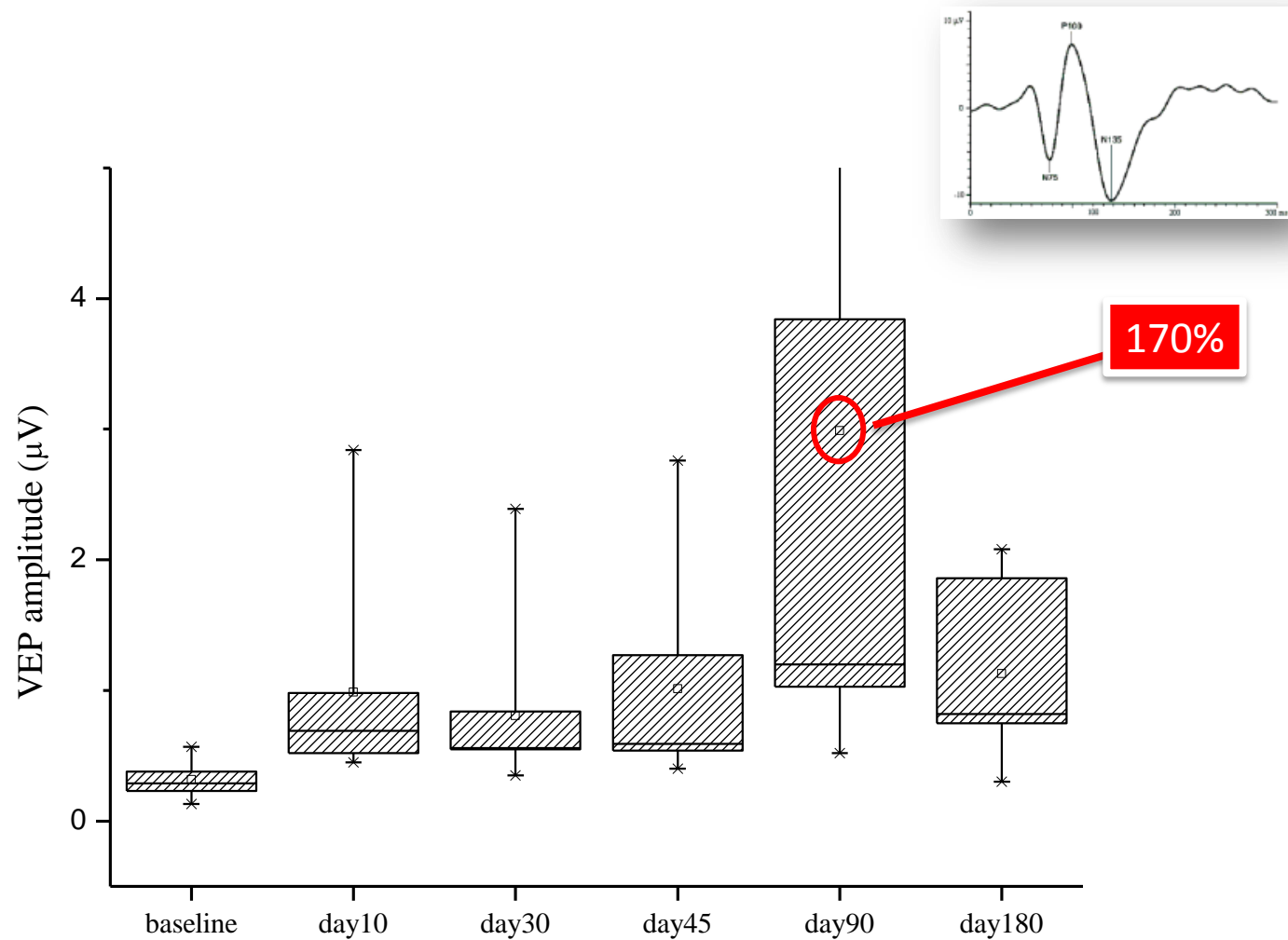
Le gocce della soluzione sono state
somministrate per via congiuntivale tre
volte al giorno per 10 giorni consecutivi

NGF Materiali e Metodi

STUDY DESIGN

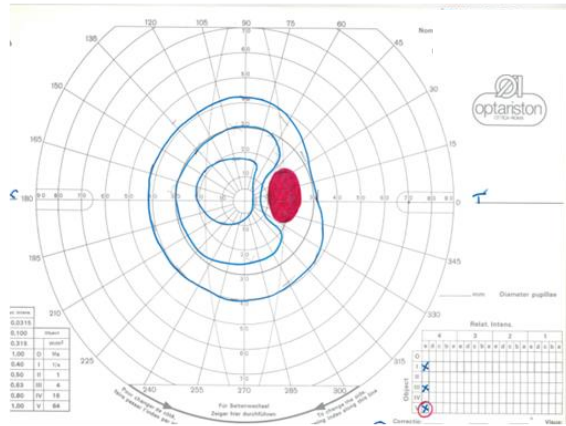


NGF Risultati



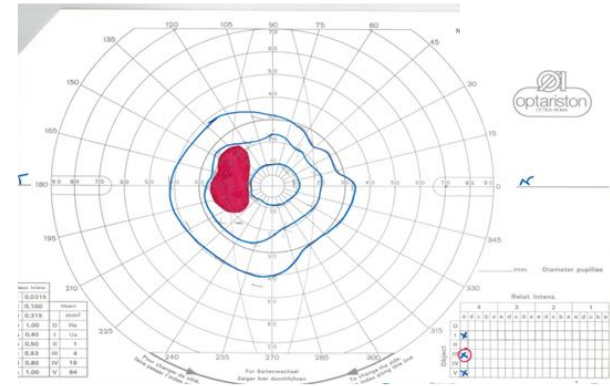
Paziente SC – 8 anni

OD Right Eye

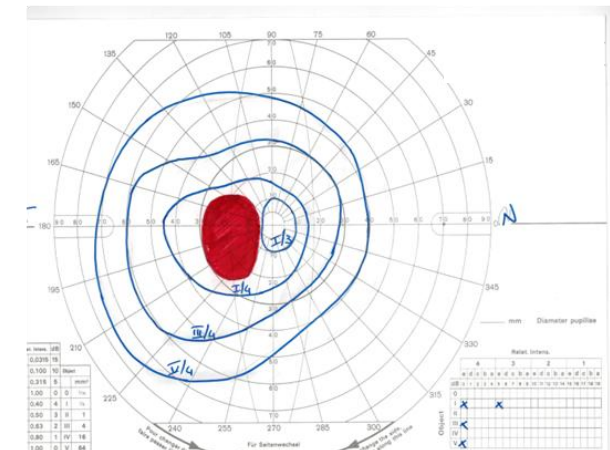
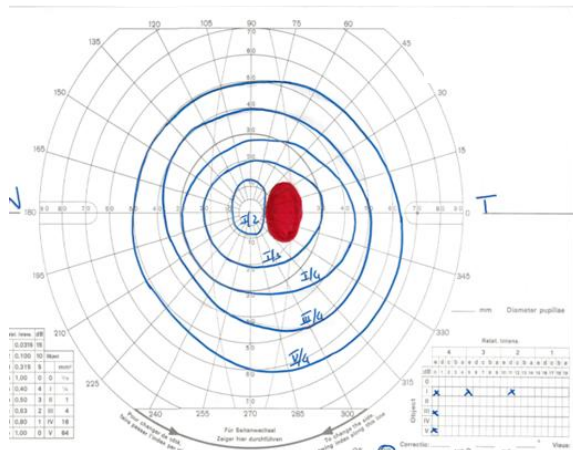


BASELINE

OS Left Eye

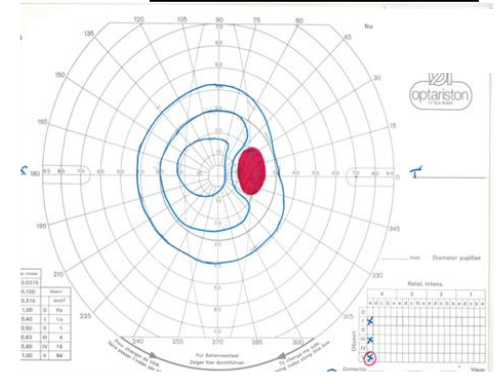


90 days

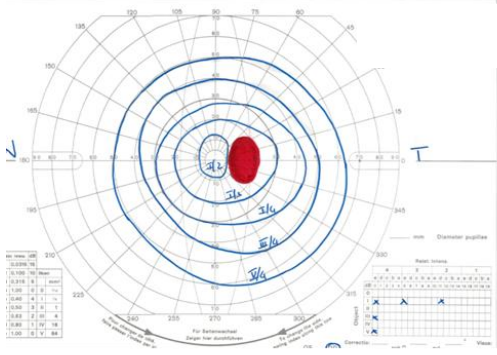


Paziente SC - 8 anni

OD Right Eye



BASELINE



90 days

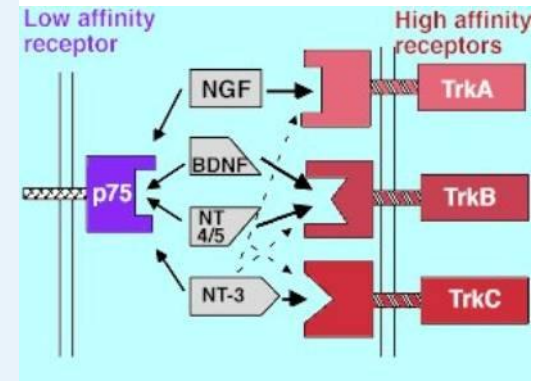
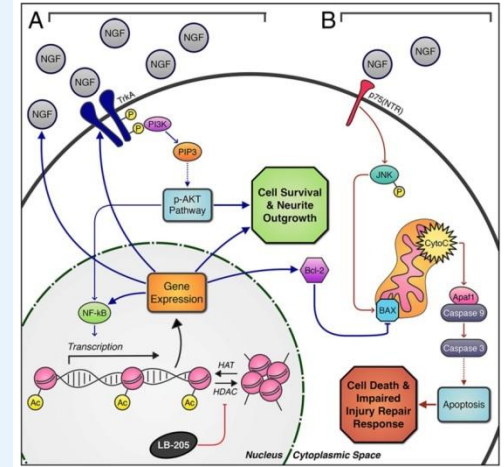


BASED ON THE EVIDENCE OF STATISTICALLY SIGNIFICANT DRUG EFFECT, A CROSS OVER TREATMENT WITH NGF WAS GIVEN, IN OPEN LABEL, TO PATIENTS RECEIVING PLACEBO. The overall NGF response rate in all patients was estimated to be 75% for visual field improvement.

ATTIVITA' NGF

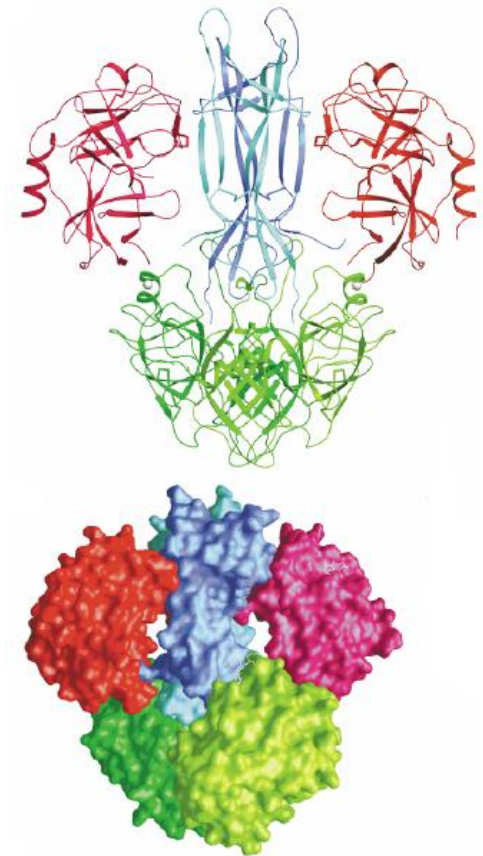
- NGF è presente in: sistema nervoso centrale e periferico, sistema immunitario, sangue, cuore, fegato, ghiandola lacrimale, cornea, umore acqueo, iride, retina, nervo ottico.
- Regolazione della sopravvivenza e del differenziamento dei neuroni durante lo sviluppo embrionale e di alcune funzioni dei neuroni maturi
- 2 famiglie di recettori: una famiglia di recettori aventi attività tirosin-chinasica denominati Trk e un recettore comune denominato p75NTR
- Trasporto retrogrado
- Modulatore attività sinaptica (plasticità neuronale)
- Promuove l'allungamento e il riparo neuronale dopo un danno ischemico, traumatico e tossico
- Migliora il flusso ematico cerebrale nei neonati con danno cerebrale ipossico ischemico (migliori performance cognitive e pattern elettroencefalografici)

Kaplan et al 2000; McAllister 2001; Dekosky et al. 2004; Verge et al. 1992; Chiaretti et al. 2008; Chiaretti et al. 2005; Eriksson et al. 1998



NGF e Neuroprotezione nel Trauma cerebrale

- NGF favorisce la sopravvivenza dei neuroni, soprattutto dei neuroni colinergici, favorendo i processi di riparazione neuronale
- NGF aumenta la sintesi intracerebrale dei recettori nicotinici, migliorando il flusso ematico cerebrale
- NGF promuove il rilascio della Doublecortin (DCX) e del BDNF, coinvolti nei meccanismi di neuroprotezione cerebrale



NGF e Trauma cranico grave

- Il Trauma cranico grave (TBI) rappresenta la più frequente causa di morte e di disabilità tra i bambini e gli adolescenti nei Paesi occidentali
- Nel TBI grave la mortalità si aggira intorno al 15-25%, mentre gli esiti a distanza sono intorno al 25-30 %, in conseguenza del danno neuronale secondario al trauma

*Sharples PM et al. Avoidable factors contributing to death of children with head injury.
Br Med J 2007; 300: 87-91*

NGF e Trauma cranico grave

NGF intranasale

La somministrazione intranasale del NGF rappresenta una via non-invasiva, facile e sicura per ottenere concentrazioni efficaci di tale neurotrofina all' interno del parenchima cerebrale, come già dimostrato in modelli sperimentali di TBI

Frey et al. Delivery of 125I-NGF to the Brain via the Olfactory Route. Drug Delivery 2007; 4: 87-92.
Tian J et al. Intranasal administration of Nerve Growth Factor ameliorates beta-amiloid deposition after traumatic brain injury in rats. Brain Res 2012; 24: 67-71





NGF e Trauma cranico grave

NGF intranasale

- Il pathway olfattorio è una promettente via di somministrazione per il rilascio diretto del NGF all' interno del Sistema Nervoso Centrale, poichè utilizza:
 - ✘ La mucosa olfattoria e l' endotelio olfattorio, con minimo assorbimento sistemico
 - ✘ Le terminazioni del nervo olfattorio che permettono il trasporto retrogrado del complesso NGF-TrkA






NGF e Trauma cranico grave

CASO CLINICO

-  • Bambino di 4 aa con TBI grave e arresto cardio-respiratorio (GCS 4 all' ingresso in TIP)
-  • TAC cranio e RM: DAI + lesione midollo cervicale
-  • Assistenza neurointensiva standard + ipotermia
-  • 28 gg dopo il TBI: tetraplegia e stato comatoso

NGF e Trauma cranico grave

CASO CLINICO

-  • A 6 mesi dal trauma: persistenza dello stato comatoso
-  • Alimentato tramite gastrostomia, ventilato tramite tracheotomia + ventilatore meccanico
-  • no controllo degli sfinteri
-  • spasticità non responsiva alla tossina botulinica
-  • scarsa interazione con l' ambiente

NGF e Trauma cranico grave

Materiale & Metodi



Il bambino è stato trattato con 4 cicli di NGF murino per via intranasale, a distanza di un mese uno dall'altro



Ad ogni ciclo l'NGF è stato somministrato alla dose di 0.1 mg/kg (*2 mg di NGF diluito in 20 mL di SF due volte al giorno per 10 giorni consecutivi*) tramite MAD (Mucosal Atomization Device)



Questa quantità è considerata sufficiente a raggiungere e stimolare la gran parte dei recettori colinergici e serotoninergici per l'NGF



NGF e Trauma cranico grave

Risultati – PET/TC (18F-FDG)

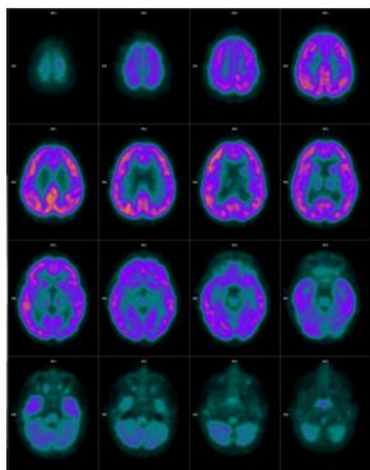


Figure 1A. PET study at time T0

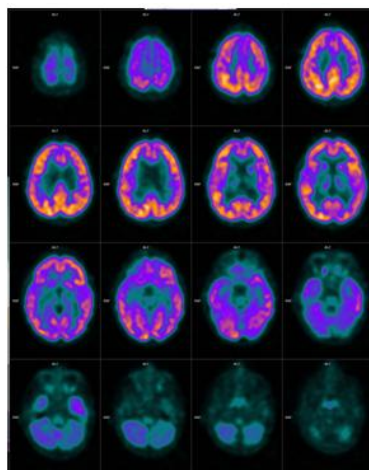


Figure 1B. PET study at time T1

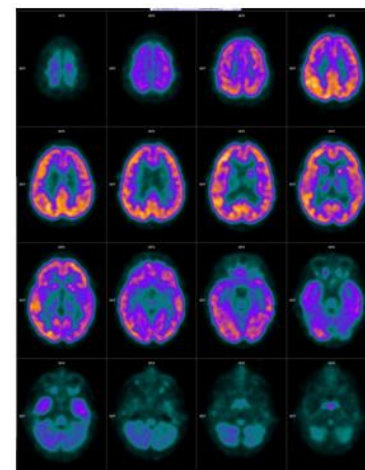


Figure 1C. PET study at time T2

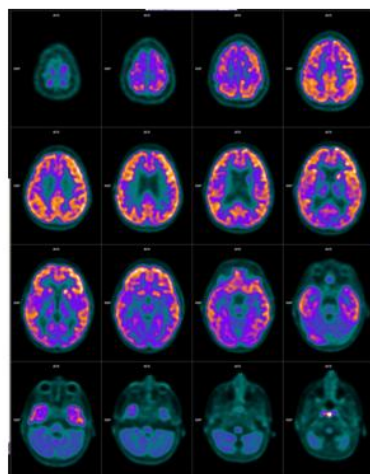


Figure 1D. PET study at time T3

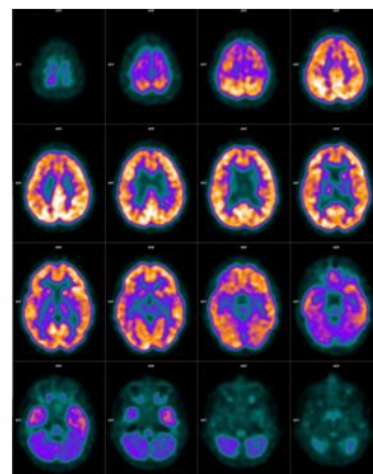
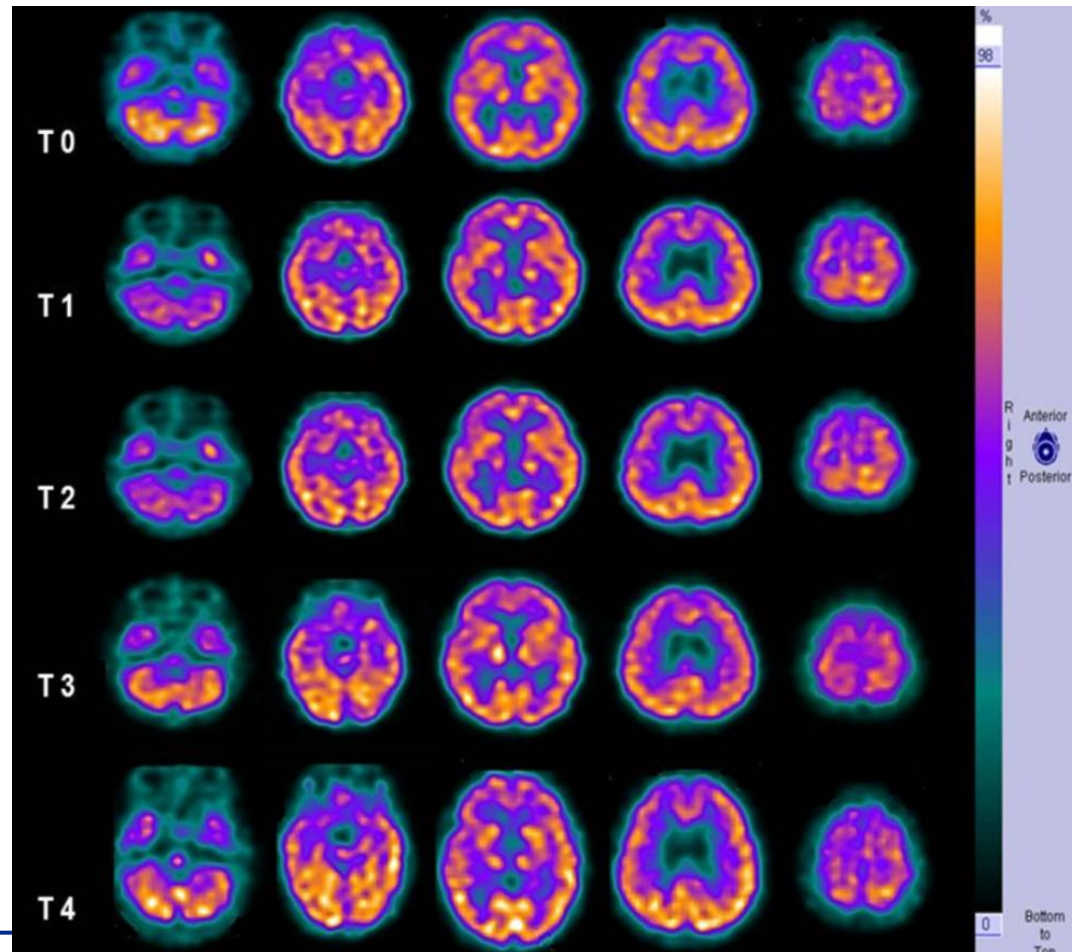


Figure 1E. PET study at time T4

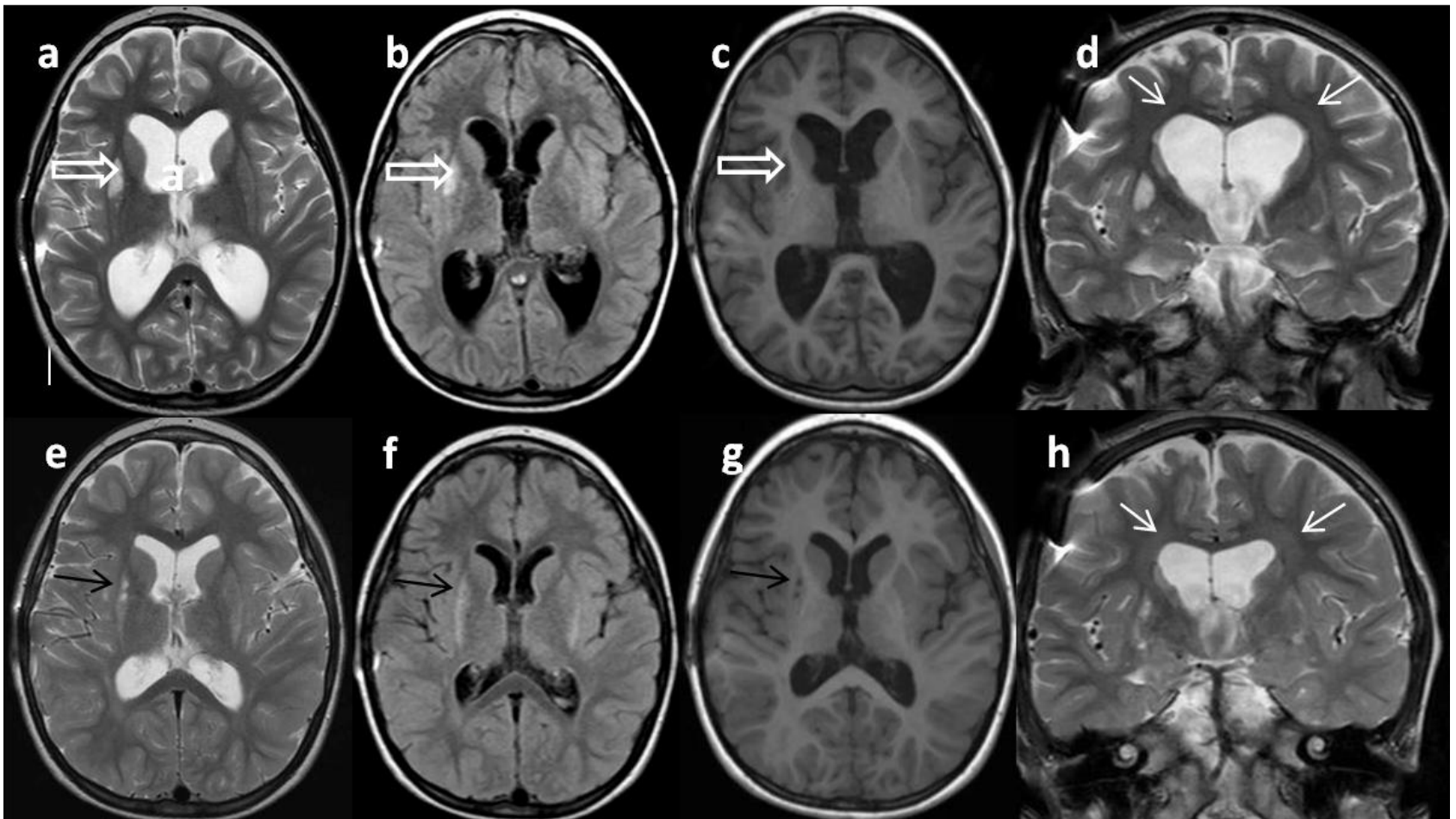
NGF e Trauma cranico grave

Risultati – SPECT/TC



NGF e Trauma cranico grave

Risultati - RM

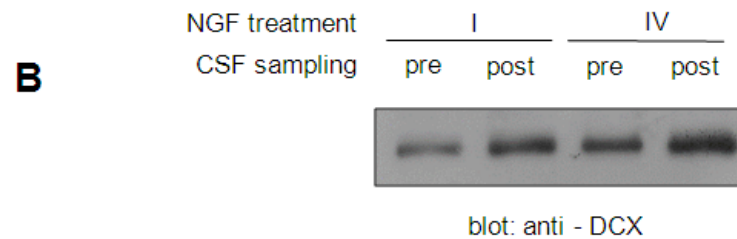


NGF e Trauma cranico grave

Risultati

A

Treatment	Time of CSF sampling	NGF pg/ml
First treatment	Pre-treatment	79.8
	Post-treatment	104.3
Last treatment	Pre-treatment	91.05
	Post-treatment	132.8



NGF e Trauma cranico grave

Risultati clinici

Miglioramento

degli skills comunicativi
della disprassia verbale e motoria
della capacità di mangiare e bere
del tono muscolare

Acquisizione

del riflesso della tosse

PROSPETTIVE FUTURE

- **GLIOMI VIE OTTICHE:** Studio di fase II con collirio -NGF ricombinante in bambini affetti da gliomi delle vie ottiche e deficit visivi
- **LESIONI IPOSSICO-ISCHEMICHE CEREBRALI:** Studio pilota con NGF ricombinante somministrato per via intranasale in bambini con gravi lesioni ipossico-ischemiche cerebrali
- **CENTRO DI NEUROPROTEZIONE PEDIATRICO:**
 - ricerca nel settore della neurodegenerazione, della neuroprotezione e della neurorigenerazione neuronale
 - investigare nuove possibilità terapeutiche e riabilitative per condizioni che, allo stato attuale, non conoscono e non prevedono terapie efficaci.

PROSPETTIVE FUTURE

- Favorire percorsi legislativi e normativi che permettono un piu' facile accesso ai farmaci sperimentali in patologie dell'età pediatrica attraverso il riconoscimento ed istituzione di Centri specialistici pediatrici di eccellenza
 - Bambini esclusi da alcune possibilità cure: nuovi farmaci, nuovi protocolli
 - Scarso interesse aziende farmaceutiche
- Possibilità di Fondi di Ricerca ad hoc, con ripartizione predeterminata per Aree (ad es. pediatrica, cardiovascolare, neurologica,...),, per specifiche patologie invalidanti dell'età pediatrica prive ad oggi di cure efficaci