



Ministero delle Imprese e del Made in Italy
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102022000016407
Data Deposito	02/08/2022
Data Pubblicazione	02/02/2024

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	31	417

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	31	216

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	38	05

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	45	06

Titolo

INIBITORI DELLA GAMMA-SECRETASI PER L'USO NEL TRATTAMENTO
DELL'EPIDERMOLISI BOLLOSA

INIBITORI DELLA GAMMA-SECRETASI PER L'USO NEL
TRATTAMENTO DELL'EPIDERMOLISI BOLLOSA

La presente invenzione riguarda inibitori della gamma-secretasi per l'uso nel trattamento dell'epidermolisi bollosa. In particolare, la presente invenzione riguarda inibitori della gamma-secretasi per l'uso nel trattamento dell'epidermolisi bollosa e/o di fibrosi associata all'epidermolisi bollosa, in particolare, per uso nel trattamento dell'epidermolisi bollosa distrofica recessiva e della fibrosi associata alla epidermolisi bollosa distrofica recessiva.

È noto che l'epidermolisi bollosa (EB, Epidermolysis Bullosa) è un gruppo di disturbi di fragilità cutanea determinati da difetti ereditari nei componenti proteici di adesione della zona della membrana basale cutanea [1,2].

Il sottotipo distrofico recessivo di EB (RDEB, Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa) è causato da mutazioni con perdita di funzione nel gene *COL7A1*, codificante per il collagene VII (COL7), che garantisce l'integrità cutanea in risposta al traumatismo e allo stress tangenziale. Le caratteristiche distintive dei pazienti con RDEB sono vesciche ed erosioni mucocutanee incessanti, ferite croniche e infiammazione e fibrosi autoalimentate. Quest'ultima si traduce in sequele cliniche altamente invalidanti comprendenti deformità a guanto, contratture articolari e stenosi esofagee, e predispone all'insorgenza precoce di carcinomi cutanei a cellule squamose aggressivi, che rappresentano la

prima causa di morte nei pazienti con RDEB [3].

Attualmente non vi è alcuna cura per la RDEB e il trattamento della malattia si basa su misure sintomatiche, tra cui cura delle ferite, supporto nutrizionale e chirurgia, da parte di un team multidisciplinare [1,4,5].

L'Agenzia europea per i medicinali (EMA, European Medicines Agency) ha appena raccomandato il rilascio di un'autorizzazione all'immissione in commercio per Filsuvez (Amryt Pharmaceuticals DAC), un gel contenente un estratto di corteccia di betulla, per il trattamento topico di ferite a spessore parziale associate a EB distrofica e giunzionale (<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/summaries-opinion/filsuvez>). Filsuvez è il primo prodotto medicinale approvato per il trattamento delle ferite da EB. Tuttavia, la sua efficacia sulla chiusura della ferita appare limitata e, infatti, i risultati del corrispondente studio di fase III (NCT03068780) non sono ancora stati resi pubblici.

Negli ultimi anni, gli approcci di terapia a base di geni, cellule e proteine per la sostituzione di COL7 per RDEB si sono dimostrati promettenti negli studi preclinici e alcuni di essi sono entrati o addirittura hanno completato studi clinici di fase I/II [6-9]. In particolare, sono state esplorate strategie di terapia genica ex-vivo che utilizzano vettori retrovirali o lentivirali integranti per il loro potenziale di portare un beneficio clinico duraturo ai pazienti con RDEB, a condizione che siano bersagliate le cellule staminali

epidermiche [10]. Difatti, in un paziente affetto da una forma diversa di EB, l'EB giunzionale, l'innesto di circa l'80% della superficie cutanea con fogli epiteliali autologhi geneticamente corretti con un vettore retrovirale che esprime il cDNA di LAMB3 sotto il controllo del promotore LTR virale ha rigenerato un'epidermide completamente funzionale, che è rimasta geneticamente corretta al follow-up di 5 anni [11,12]. Tuttavia, un approccio simile di innesto di fogli epiteliali autologhi trasdotti retroviralmente da *COL7A1* in ferite da RDEB ha determinato un'espressione di COL7 variabilmente aumentata e la guarigione delle ferite, che sono diminuite nel tempo [13].

Nel complesso, gli approcci di terapia genica classica trattano ancora questioni tecnologiche relative all'efficienza di trasfezione/trasduzione di cellule staminali e anche alla sicurezza dei vettori [6].

Le strategie di terapia cellulare per RDEB hanno mostrato anch'esse un'efficacia e una tollerabilità limitate, come nel caso di iniezioni locali di fibroblasti allogenici, e/o complicanze gravi correlate, come si è visto per il trapianto di midollo osseo in questi pazienti fragili [6].

La terapia proteica sistemica con COL7 ricombinante umano è stata a lungo sostenuta, ma solo di recente è entrata in studi clinici di fase I/II (NCT03752905 e NCT05143190). Pertanto, ad oggi le terapie curative si sono rivelate più impegnative di quanto inizialmente previsto e il bisogno medico insoddisfatto nella RDEB rimane molto elevato.

Di conseguenza, gli sforzi crescenti sono attualmente concentrati sullo sviluppo di terapie modificanti la malattia in grado di ridurre o ritardare specifiche manifestazioni e complicazioni della malattia [6].

La fibrosi associata a RDEB è il risultato di una complessa interazione tra una vasta gamma di determinanti molecolari, tra cui citochine e fattori di crescita, in primo luogo il fattore di crescita trasformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$, Transforming Growth Factor- $\beta 1$) [14,15], componenti della matrice extracellulare [16-19] e fattori epigenetici [20,21]. La fenocconversione di un gruppo eterogeneo di cellule precursori, che consiste principalmente di fibroblasti locali residenti, in un tipo cellulare altamente specializzato chiamato miofibroblasto, è un evento regolare e un meccanismo patogenetico chiave alla base di ogni condizione fibrotica, indipendentemente dal tessuto/dagli organi interessati [22,23]. I miofibroblasti sono cellule dotate di una potente capacità di secernere componenti della matrice extracellulare (ECM, Extracellular Matrix), sintetizzare fibre da stress e proteine contrattili e, a loro volta, trasmettere forze meccaniche alla ECM [22,23]. A causa delle loro caratteristiche, i miofibroblasti svolgono un ruolo fondamentale nel contesto della guarigione delle ferite e del rimodellamento dei tessuti. Tuttavia, nei pazienti affetti da RDEB e altre malattie fibrotiche cutanee, i miofibroblasti sono iper-attivati e risiedono cronicamente nel derma, innescando e sostenendo la

fibrosi in modo auto-catalizzato [24,25].

È noto che la cascata di segnalazione di Notch è una via evolutivamente conservata coinvolta in una varietà di processi biologici in condizioni di salute e di malattia, inclusa la fibrosi cutanea [26,27]. In generale, l'attivazione di Notch richiede un'interazione fisica (trans-attivazione) tra uno dei quattro recettori Notch esposti da una cellula "di invio del segnale" e uno dei cinque ligandi Notch che ornano una cellula "di ricezione del segnale" vicina [26]. L'unione tra recettore e ligando di Notch innesca due clivaggi proteolitici successivi, indicati come S2 e S3, guidati rispettivamente dalle metalloproteasi della famiglia ADAM (ad esempio, ADAM10 e ADAM17) e dal complesso gamma (γ)-secretasi. Il rimodellamento di recettore Notch determina il rilascio citoplasmatico del dominio intracellulare di Notch biologicamente attivo (N-ICD) che trasloca nel nucleo e, in cooperazione con i fattori di trascrizione ubiquitari come CBF-1/soppressore di hairless/Lag1 (CSL) e il co-attivatore MAML1, regola la trascrizione genica [26].

Alcune evidenze indicano che la segnalazione di Notch viene attivata in disturbi fibrotici di diversi tessuti e organi, inclusa la pelle [27,28]. Tuttavia, il suo ruolo nella fibrosi da RDEB è quasi inesplorato. Uno studio precedente degli inventori ha mostrato che i livelli proteici del ligando di Notch Jagged-1 (JAG1) e della forma intracellulare di NOTCH1 (N1-ICD) sono sovraregolati nei fibroblasti di RDEB (RDEB-FB) rispetto ai fibroblasti cutanei primari da soggetti sani (NH-FB),

e sono correlati positivamente all'abbondanza del microRNA pro-fibrotico (miR), miR-145-5p [21].

Alla luce di quanto sopra, è quindi evidente la necessità di fornire nuovi trattamenti per l'epidermolisi bollosa, in particolare, l'epidermolisi bollosa distrofica recessiva, e la fibrosi associata, in grado di superare gli svantaggi dei trattamenti noti.

Secondo la presente invenzione, è stato ora sorprendentemente scoperto che due inibitori della gamma-secretasi (GSI, Gamma-Secretase Inhibitor), vale a dire DAPT e PF-03084014 (nirogacestat), sono in grado di contrastare il comportamento fibrotico dei fibroblasti dell'epidermolisi bollosa distrofica recessiva.

Gli inibitori del complesso della γ -secretasi (GSI) rappresentano una famiglia ampia ed eterogenea di molecole originariamente sviluppate per contrastare la produzione di proteina precursore amiloide-beta (APP, Amyloid-beta Precursor Protein), i componenti primari della placca amiloide, nel cervello di pazienti affetti dal morbo di Alzheimer [29]. Tuttavia, dato che la via di Notch rappresenta uno dei substrati di γ -secretasi meglio caratterizzati e le mutazioni attivanti Notch sono associate a diverse neoplasie ematologiche maligne e tumori solidi, i GSI sono stati progressivamente testati come agenti antitumorali, da soli o in combinazione con uno o più farmaci chemioterapici convenzionali [30].

In particolare, PF-03084014, noto anche come nirogacestat, è una tetralina imidazolo inibitore della

γ -secretasi originariamente sviluppato da Pfizer Inc. per ridurre la produzione di amiloide- β (A β) in pazienti affetti dal morbo di Alzheimer [31,32], e successivamente testato come agente chemioterapico autonomo o in combinazione con farmaci anti-cancro convenzionali nel contesto di diversi modelli clinici e preclinici di neoplasie ematologiche e tumori solidi caratterizzati da una via di segnalazione di Notch disregolata, come i tumori desmoidi [33]. In particolare, PF-03084014 è recentemente entrato in studi clinici di fase II/III sponsorizzati da SpringWorks Therapeutics Inc. (<https://springworkstx.com/pipeline/nirogacestat/>) per il trattamento dei tumori desmoidi progressivi negli adulti (fase III, NCT03785964) e dei tumori desmoidi non resecabili nei pazienti pediatrici (fase II, NCT04195399) [34,35].

Come affermato sopra, secondo la presente invenzione due inibitori della gamma-secretasi (GSI), vale a dire, DAPT e PF-03084014 (nirogacestat), hanno mostrato risultati promettenti nel contrastare il comportamento fibrotico dei fibroblasti dell'epidermolisi bollosa distrofica recessiva.

In particolare, secondo i risultati sperimentali riportati nell'Esempio 1, sono state mostrate le proprietà fibrogeniche della cascata di segnalazione di Notch in fibrosi associata a RDEB. In particolare, è stato confermato che l'asse JAG1/NOTCH1 è sovra-espressa/sovra-attivata in fibroblasti di RDEB primari (RDEB-FB) rispetto a cellule di controllo [21]. Inoltre,

secondo i risultati sperimentali riportati di seguito, è stato dimostrato per la prima volta mediante saggi *in vitro* (ossia, analisi funzionali in RDEB-FB JAG1-silenziati) che l'asse JAG1/NOTCH1 ha un coinvolgimento funzionale in diversi processi fibrotici, inclusa la capacità cellulare di contrarre reticoli di collagene di tipo I e l'espressione di tipici marcatori di miofibroblasti.

Inoltre, come affermato sopra, secondo la presente invenzione è stato trovato che l'inibizione della via di Notch da parte di due diversi inibitori della gamma-secretasi (GSI), vale a dire, DAPT e PF-03084014 (nirogacestat), ha attenuato una varietà di comportamenti fibrotici che caratterizzano RDEB-FB. In particolare, come riportato nei risultati sperimentali mostrati di seguito nell'esempio 1, gli RDEB-FB trattati con DAPT e PF-03084014 hanno mostrato:

(i) una riduzione significativa della loro capacità contrattile e del tasso di migrazione;

(ii) una ridotta deposizione di collagene nella matrice extracellulare; e

(iii) una sottoregolazione dei livelli di espressione di diverse proteine contrattili/fibrotiche, tra cui α -SMA, CNN1, TAGLN e JAG1.

Inoltre, secondo i dati sperimentali mostrati di seguito, RDEB-FB trattati sia con DAPT sia con PF-03084014 hanno mostrato una capacità aumentata di degradare uno strato di collagene di tipo I, suggerendo che GSI può migliorare l'equilibrio tra sintesi di collagene di tipo I e degradazione in cellule dotate di

tratti fibrotici. Nella maggior parte dei saggi funzionali e delle analisi di espressione, la capacità di DAPT e PF-03084014 di contrastare i suddetti processi e marcatori fibrogenici è stata mantenuta in RDEB-FB trattati con TGF- β 1, il che ha evidenziato la loro attività anti-fibrotica anche in un contesto impegnativo. Infine, RDEB-FB trattati con PF-03084014 hanno mostrato una riduzione significativa di TGF- β 1 secreto nel terreno di coltura e una riduzione del tasso di proliferazione.

Pertanto, sulla base dei risultati sperimentali sopra menzionati dell'Esempio 1, secondo la presente invenzione, inibitori del complesso della γ -secretasi, in particolare PF-03084014 e DAPT, possono essere vantaggiosamente usati per il trattamento dell'epidermolisi bollosa, in particolare per l'epidermolisi bollosa distrofica recessiva e la sua fibrosi associata.

Secondo i risultati sperimentali riportati di seguito nell'Esempio 1, PF-03084014 ha mostrato una maggiore attività anti-fibrotica rispetto a DAPT. Ciò si è dimostrato vero sia in tutti i saggi funzionali eseguiti sia nell'analisi dei livelli di espressione di diversi marcatori pro-fibrotici.

Pertanto, secondo la presente invenzione, PF-03084014 potrebbe essere vantaggiosamente usato come farmaco innovativo per contrastare la fibrosi associata a RDEB, sulla base dei risultati promettenti mostrati di seguito nell'Esempio 1 insieme al know-how esistente derivato da studi preclinici e clinici (già completati

o attualmente in corso) volti a valutare l'intervallo di dose e le finestre terapeutiche, gli effetti avversi, i bersagli molecolari e l'efficacia antitumorale di PF-03084014 in una varietà di modelli di cancro.

Pertanto, è oggetto specifico della presente invenzione un inibitore della gamma-secretasi per l'uso nel trattamento dell'epidermolisi bollosa e/o di una fibrosi associata all'epidermolisi bollosa.

Con "inibitore della gamma-secretasi" (o "inibitore della γ -secretasi" o "GSI") si intende una molecola in grado di inibire l'attività proteolitica del complesso della gamma-secretasi, che è un complesso di proteasi multi-subunità che scinde una varietà di proteine transmembrana a singolo passaggio, inclusi i recettori Notch, in residui specifici all'interno dei loro domini transmembrana.

In particolare, un inibitore della gamma-secretasi secondo l'invenzione può essere un TSA, vale a dire un analogo dello stato di transizione, o un non-TSA, in base al meccanismo d'azione.

Secondo la presente invenzione, detto inibitore della gamma-secretasi inibisce il complesso multiproteico della gamma-secretasi attraverso un meccanismo diretto, più in particolare, attraverso la formazione di legami chimici tra detto inibitore e specifici residui amminoacidici delle proteine componenti del complesso multiproteico della gamma-secretasi, ad esempio, la presenilina 1.

Il legame inibente dell'inibitore della gamma-secretasi alle proteine componenti del complesso della

gamma-secretasi può causare diversi effetti, inclusi, in via non limitativa, un cambiamento conformazionale di specifici siti funzionali delle proteine appartenenti al complesso della gamma-secretasi, un'interferenza con il reclutamento dei substrati biologici efficaci o una maggiore affinità di legame dell'inibitore con il complesso proteolitico delle gamma-secretasi rispetto all'affinità che la/le proteina/e del complesso avrebbe/avrebbero con i loro substrati biologici.

Secondo la presente invenzione, l'epidermolisi bollosa può essere scelta dal gruppo che consiste in epidermolisi bollosa distrofica recessiva, epidermolisi bollosa distrofica dominante (DDEB, Dominant Dystrophic Epidermolysis Bullosa) e epidermolisi bollosa giunzionale (JEB, Junctional Epidermolysis Bullosa), preferibilmente epidermolisi bollosa distrofica recessiva.

Secondo la presente invenzione, la fibrosi può essere fibrosi associata a epidermolisi bollosa distrofica recessiva.

Secondo la presente invenzione, detto inibitore della gamma-secretasi può essere scelto dal gruppo consistente in Nirogacestat (denominato anche PF-03084014, avente formula chimica [(S)-2-((S)-5,7-difluoro-1,2,3,4-tetraidronaftalen-3-ilammino)-N-(1-(2-metil-1-(neopentilammino)propan-2-il)-1H-imidazol-4-il)pentanammid]), DAPT (denominato anche GSI-IX, avente formula chimica (N-[N-(3,5-difluorofenacetil)-L-alanil]-S-fenilglicina t-butil estere), RO492909, Semagacestat (denominato anche LY-450139), BMS-90602

(denominato anche AL101), Avagestat (denominato anche BMS-70816), MK-0752, preferibilmente Nirogacestat.

La presente invenzione riguarda anche una composizione farmaceutica comprendente un inibitore della gamma-secretasi, insieme a uno o più eccipienti e/o adiuvanti farmaceuticamente accettabili, per l'uso nel trattamento dell'epidermolisi bollosa e/o di una fibrosi associata all'epidermolisi bollosa.

Secondo la presente invenzione, l'epidermolisi bollosa, per la quale viene usata la composizione farmaceutica dell'invenzione, può essere scelta dal gruppo consistente in epidermolisi bollosa distrofica recessiva, epidermolisi bollosa distrofica dominante (DDEB) e epidermolisi bollosa giunzionale (JEB), preferibilmente epidermolisi bollosa distrofica recessiva.

Secondo la presente invenzione, la fibrosi, per la quale viene usata la composizione farmaceutica dell'invenzione, può essere fibrosi associata a epidermolisi bollosa distrofica recessiva.

Secondo la presente invenzione, l'inibitore della gamma-secretasi di detta composizione farmaceutica può essere scelto dal gruppo consistente in Nirogacestat (denominato anche PF-03084014, avente formula chimica [(S)-2-((S)-5,7-difluoro-1,2,3,4-tetraidronaftalen-3-ilammino)-N-(1-(2-metil-1-(neopentilammino)propan-2-il)-1H-imidazol-4-il)pentanamide]), DAPT (denominato anche GSI-IX, avente formula chimica (N-[N-(3,5-difluorofenacetil)-L-alanil]-S-fenilglicina t-butil estere), R0492909, Semagacestat (denominato anche LY-

450139), BMS-90602 (denominato anche AL101), Avagestat (denominato anche BMS-70816), MK-0752, preferibilmente Nirogacestat.

Secondo la presente invenzione, detta composizione farmaceutica può comprendere uno o più inibitori della gamma-secretasi, ad esempio, può comprendere Nirogacestat insieme a DAPT.

Secondo la presente invenzione, detta composizione farmaceutica può inoltre comprendere un prodotto scelto dal gruppo consistente in farmaci antinfiammatori, losartan, esapeptide angiotensina (Ang)-(1-7) e prodotti farmaceutici a base di Ang-(1-7), come la formulazione orale di TXA127.

La presente invenzione riguarda anche una combinazione di un inibitore della gamma-secretasi con un prodotto scelto dal gruppo consistente in farmaci antinfiammatori, losartan, esapeptide angiotensina (Ang)-(1-7), prodotti farmaceutici a base di Ang-(1-7), come la formulazione orale di TXA127, formulazioni topiche di idrogel contenenti timosina beta-4, come RGN-137, Filsuvez (denominato anche AP101/Oleogel-S10) e gel topici contenenti decorina, per l'uso separato o sequenziale nel trattamento dell'epidermolisi bollosa e/o di una fibrosi associata all'epidermolisi bollosa.

"Uso separato" è inteso nel senso della somministrazione, nello stesso momento, dei composti della combinazione secondo l'invenzione in forme farmaceutiche distinte.

"Uso sequenziale" è inteso nel senso della somministrazione successiva dei composti della

combinazione secondo l'invenzione, ciascuno in una forma farmaceutica distinta.

Secondo la presente invenzione, l'epidermolisi bollosa, per la quale viene usata detta combinazione, può essere scelta dal gruppo consistente in epidermolisi bollosa distrofica recessiva, epidermolisi bollosa distrofica dominante (DDEB) ed epidermolisi bollosa giunzionale (JEB), preferibilmente epidermolisi bollosa distrofica recessiva.

Secondo la presente invenzione, la fibrosi, per la quale viene usata detta combinazione, può essere fibrosi associata a epidermolisi bollosa distrofica recessiva.

Secondo la presente invenzione, l'inibitore della gamma-secretasi di detta combinazione può essere scelto dal gruppo consistente in Nirogacestat (denominato anche PF-03084014, avente formula chimica [(S)-2-((S)-5,7-difluoro-1,2,3,4-tetraidronaftalen-3-ilammino)-N-(1-(2-metil-1-(neopentilammino)propan-2-il)-1H-imidazol-4-il)pentanammid)], DAPT (denominato anche GSI-IX, avente formula chimica (N-[N-(3,5-difluorofenacetil)-L-alanil]-S-fenilglicina t-butil estere), RO492909, Semagacestat (denominato anche LY-450139), BMS-90602 (denominato anche AL101), Avagestat (denominato anche BMS-70816), MK-0752, preferibilmente Nirogacestat.

Sulla base dello studio clinico di fase III per il trattamento dei tumori desmoidi progressivi negli adulti (fase III, NCT03785964), è plausibile che PF-03084014 (Nirogacestat) possa essere somministrato in pazienti con epidermolisi bollosa distrofica recessiva, secondo la presente invenzione, a 150 mg per bocca (ad esempio,

compresse orali), due volte al giorno, in modo continuo, in cicli di 28 giorni.

La presente invenzione verrà ora descritta a titolo illustrativo, ma non limitativo, secondo forme di realizzazione preferite della stessa, con particolare riferimento all'esempio e ai disegni allegati, in cui:

- **la Figura 1** mostra che **fibroblasti primari da soggetti sani trattati con l'inibitore della gamma-secretasi PF-03084014 presentano una riduzione della proliferazione cellulare dipendente dal tempo e dalla dose.** Saggio con 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio bromuro (MTT) che mostra l'impatto del trattamento con DAPT e PF-03084014 sulla vitalità e sul tasso di proliferazione di tre ceppi di fibroblasti primari da controlli sani (NH-FB). I valori di assorbanza (Abs) sono stati convertiti in percentuale usando la formula seguente: $Abs_{DAPT \text{ o } PF-03084014} \times 100 / Abs_{POZZETTI DI RIFERIMENTO}$. I dati sono presentati come $media \pm$ deviazione standard (SD, Standard Deviation) di almeno otto repliche tecniche per condizione. Le cellule trattate con il veicolo DMSO (pannello A) e le cellule analizzate 24 h dopo la semina (T0) (pannello B) sono state considerate come pozzetti di riferimento. NH-FB sono stati fatti crescere in terreno DMEM contenente il 10% di siero fetale bovino (FBS, Fetal Bovine Serum). **(Pannello A)** Gli NH-FB trattati per 48 h con 20 e 40 μ M di DAPT hanno mostrato una riduzione lieve, ma statisticamente significativa, del tasso di proliferazione. Al contrario, gli effetti di 20 e 40 μ M di PF-03084014 sono stati osservati dopo 24 ore di

trattamento e sono diventati più evidenti dopo 48 h di trattamento, anche a basse dosi (5 e 10 μM). (**Pannello B**) Gli NH-FB trattati con PF-03084014 a 40 μM hanno mostrato una riduzione della vitalità cellulare rispetto a cellule prima del trattamento con GSI (T0) (linea tratteggiata). D'altro canto, è stato dimostrato che 5-20 μM di PF-03084014 hanno influenzato la proliferazione dei fibroblasti in modo dipendente dal tempo e dalla dose, in assenza di citotossicità palese. In base ai risultati, si è scelto di usare GSI a 20 μM (freccie nere) in quanto era la concentrazione farmaceutica minima che induceva una riduzione della proliferazione cellulare dopo 24 h di trattamento. ** valore $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

- **La Figura 2 mostra i livelli proteici di Jagged 1 (JAG1) in fibroblasti primari da pazienti con RDEB trasfettati con due diversi RNA interferenti corti (si-JAG1-1 e si-JAG1-2) che bersagliano l'mRNA di JAG1.** Analisi di immunoblotting che mostra i livelli proteici di JAG1 in fibroblasti primari di RDEB (RDEB-FB) trasfettati con due RNA interferenti corti (siRNA) che bersagliano l'mRNA di JAG1 (ossia, siJAG1-1 e siJAG1-2). A 24 ore dal silenziamento di JAG1, gli RDEB-FB sono stati trattati con TGF- β 1 a 2 ng/mL per altre 24 ore.

- **La Figura 3 mostra che Jagged 1 e il prodotto clivato del recettore NOTCH1 sono sovra-espressi in fibroblasti cutanei primari da pazienti con RDEB e l'induzione di Jagged 1 è guidata dal fattore di crescita trasformante β 1. (A)** Analisi di immunoblotting (IB) che mostra i livelli proteici del ligando di Notch canonico

Jagged 1 (JAG1), del prodotto clivato del recettore NOTCH1 (dominio intracellulare NOTCH1, N1-ICD) e del marcatore fibrotico alfa-actina del tessuto muscolare liscio (α -SMA) in fibroblasti primari da pazienti con RDEB (RDEB-FB) (n=5) rispetto a fibroblasti da soggetti sani (NH-FB) (n=3). N1-ICD rappresenta l'ultimo prodotto di clivaggio biologicamente attivo del processamento del recettore Notch. Gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) è stata usata come controllo di carico. Le linee tratteggiate separano esperimenti di IB distinti. **(B)** Analisi PCR in tempo reale di trascrizioni di JAG1 e NOTCH1 in RDEB-FB (n=7) e NH-FB (n=5). Si noti l'aumento dei livelli di espressione dell'mRNA di JAG1 nella maggior parte dei ceppi di RDEB-FB analizzati (RDEB-FB1-7). GAPDH è stata usata come gene housekeeping (costitutivo). **(C)** Analisi IB che mostra i livelli proteici dei marcatori di fibrosi JAG1, α -SMA e transgelina (TAGLN) in RDEB-FB (n=3) trattati con la citochina pro-fibrotica prototipica fattore di crescita trasformante β 1 (TGF- β 1) a 2 ng/mL per 24 e 48 ore. La sovraregolazione di α -SMA e TAGLN in risposta al trattamento con TGF- β 1 è servita come controllo positivo per dimostrare l'efficacia della stimolazione con TGF- β 1.

- **La Figura 4** mostra l'effetto dell'inibitore della gamma-secretasi PF-03084014 sulla capacità contrattile di fibroblasti primari da pazienti con RDEB, in assenza di TGF- β 1 come booster di contrazione. **(Pannello superiore)** Immagini rappresentative che mostrano un saggio di contrazione di reticolo di collagene (CLC,

Collagen Lattice Contraction) su fibroblasti primari da pazienti con RDEB (RDEB-FB) trattati con l'inibitore della gamma-secretasi PF-03084014, in assenza di fattore di crescita trasformante- β 1 (TGF- β 1) come induttore di contrazione. Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato. **(Pannello inferiore)** Istogramma che mostra la percentuale di contrazione rispetto alle aree di gel iniziali, ossia, reticoli di collagene misurati prima della stimolazione con PF-03084014 (tempo 0, T0). I valori più bassi indicano una maggiore capacità di contrarre la matrice di collagene.

- **La Figura 5** mostra che **l'inibizione farmacologica e mediata da siRNA della via di Notch compromette la capacità contrattile di fibroblasti primari da pazienti con RDEB. (A-B)** Saggio di contrazione di reticolo di collagene (CLC) di fibroblasti primari da pazienti con RDEB (RDEB-FB) trattati per 48 ore con gli inibitori della gamma-secretasi (GSI) DAPT e PF-03084014 in presenza di TGF- β 1 come booster di contrazione. Cellule trattate con il veicolo dimetil solfossido (DMSO) sono state usate come controllo. **(C)** Istogrammi che mostrano la percentuale di contrazione rispetto alle aree di gel iniziali, ossia, reticoli di collagene misurati al distacco di gel di collagene dai pozzetti, e prima del trattamento con GSI e TGF- β 1 (tempo 0, T0). I valori più bassi indicano una maggiore capacità cellulare di contrarre la matrice di collagene e, pertanto, una maggiore attivazione di processi pro-fibrotici. **(D)** Saggio CLC su due ceppi di RDEB-FB trasfettati transitoriamente con un RNA interferente corto (siRNA)

che bersaglia Jagged 1 (si-JAG1) e una molecola di controllo scramble non bersagliante (Scramble), con e senza stimolazione con TGF- β 1. Le cellule non trasfettate sono etichettate come "controllo". Si noti che la capacità degli RDEB-FB JAG1-silenziati di contrarre la matrice di collagene di tipo I circostante era particolarmente ridotta in presenza di TGF- β 1 come booster di contrazione.

- **La Figura 6** mostra che **l'inibitore della gamma-secretasi DAPT riduce la capacità contrattile di fibroblasti primari da pazienti con RDEB. (Pannello di sinistra)** Saggio di contrazione di reticolo del collagene (CLC) su fibroblasti primari da pazienti con RDEB (RDEB-FB) (n=3) trattati con l'inibitore della gamma-secretasi DAPT, in presenza del fattore di crescita trasformante β 1 (TGF- β 1) come induttore di contrazione. Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato. **(Pannello di destra)** Istogramma che mostra la percentuale di contrazione rispetto alle aree di gel iniziali, ossia, reticoli di collagene misurati prima della stimolazione con DAPT e TGF- β 1 (tempo 0, T0). I valori più bassi indicano una maggiore capacità di contrarre la matrice di collagene.

- **La Figura 7** mostra che **l'inibizione farmacologica della via di Notch riduce la capacità migratoria e il tasso di proliferazione di fibroblasti primari da pazienti con RDEB. (A)** Saggio di migrazione cellulare di fibroblasti primari da pazienti con RDEB (RDEB-FB) trattati con PF-03084014, DAPT o il veicolo DMSO per 24 ore. L'istogramma mostra la percentuale di area priva di

cellule rispetto al riferimento (controlli premigrazione). I dati sono presentati come media \pm deviazione standard (SD) di almeno tre replicati ($n = 3$). Le aree prive di cellule più piccole indicano una maggiore capacità cellulare di migrare. **(B)** Saggio di proliferazione con 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio bromuro (MTT) di RDEB-FB trattati o meno con PF-03084014 e DAPT. L'istogramma rappresenta la percentuale di proliferazione rispetto al riferimento, ossia, cellule saggate prima dei trattamenti farmacologici (tempo 0, T0). I dati rappresentano la media \pm SD di almeno sei repliche ($n = 3$). ** valore $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

- **La Figura 8** mostra che **l'inibizione farmacologica della via di Notch riduce la secrezione di TGF- β 1 e la deposizione di collagene nella matrice extracellulare da parte di fibroblasti primari da pazienti con RDEB e aumenta la capacità cellulare di degradare uno strato di fibrille di collagene di tipo I.** **(A)** La quantità di TGF- β 1 secreta da fibroblasti primari da pazienti con RDEB (RDEB-FB) in presenza di PF-03084014 è stata valutata mediante saggio ELISA. L'istogramma mostra la quantità di TGF- β 1 (pg/mL) in terreni condizionati di due ceppi di RDEB-FB trattati o meno con 20 μ M di PF-03084014 per 24 e 48 ore. Cellule trattate con il veicolo dimetil solfossido (DMSO) sono state usate come controllo. I dati rappresentano la media \pm deviazione standard (SD) di due replicati biologici per ciascuna condizione sperimentale. **(B)** Istogramma che mostra la quantità di collageni solubili in pepsina (μ g/mL) depositati nella

matrice extracellulare (ECM) da RDEB-FB trattati per 96 ore con PF-03084014 (5 μ M) e DAPT (20 μ M), in presenza o in assenza di TGF- β 1 come innesco di sintesi di collagene. Cellule trattate con DMSO sono state usate come controlli. La quantità di collagene è stata misurata impiegando il saggio Sircol basato su colorazione con rosso Sirius (Biocolor, Carrickfergus, Irlanda del Nord - Regno Unito). I dati rappresentano la media \pm SD di due repliche. **(C, pannello di sinistra)** Immagini rappresentative che mostrano l'attività collagenolitica di due ceppi di RDEB-FB (RDEB-FB5 e RDEB-FB6) seminati su un film di collagene di tipo I ricostituito, e trattati per 96 ore con i GSI PF-03084014 (5 μ M) e DAPT (20 μ M), in presenza di TGF- β 1 (+). La degradazione del collagene viene rilevata come aree bianche su uno sfondo grigio scuro. **(C, pannello di destra)** Istogramma che mostra la percentuale di degradazione di collagene in cellule trattate con GSI rispetto a controlli non stimolati. Gli esperimenti sono stati eseguiti in duplicato. * valore P <0,05, ** valore P <0,01, *** P <0,001.

- **La Figura 9** mostra che **l'inibizione farmacologica e mediata da siRNA della via di Notch sottoregola marcatori miofibroblastici.** **(A)** Analisi di immunoblotting (IB) che mostra i livelli proteici dei marcatori fibrotici alfa-actina del tessuto muscolare liscio (α -SMA), transgelina (TAGLN), calponina (CNN1) in fibroblasti primari da pazienti con RDEB (RDEB-FB) (n=3) trattati per 24 ore con l'inibitore della gamma-secretasi PF-03084014 (PF) (20 μ M), con o senza

stimolazione con TGF- β 1. Cellule trattate con DMSO sono state usate come controlli. **(B)** Analisi IB che mostra i livelli proteici dei marcatori fibrotici α -SMA, TAGLN, CNN1 e del recettore NOTCH1 non processato (NOTCH FL, Notch a lunghezza intera) in RDEB-FB JAG1-silenziati (n=3), trattati o meno con TGF- β 1. Gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) è stata usata come controllo di carico in analisi di immunoblotting. **(C)** Analisi PCR in tempo reale che mostra i livelli di espressione di una selezione di marcatori contrattili/fibrotici, inclusi α -SMA, CNN1, TAGLN e JAG1, in RDEB-FB trattati con PF-03084014 (PF) sia in condizioni di coltura basale, sia in presenza di TGF- β 1. HES1 (fattore di trascrizione bHLH della famiglia hes 1) è un bersaglio di trascrizione di Notch. Periostina (POSTN) e Pri-miR-143/145 rappresentano due geni pro-fibrotici convalidati in fibroblasti primari di RDEB [21,36]. Ipoxantina fosforibosiltransferasi 1 (HPRT1) è stata usata come gene housekeeping.

- **La Figura 10** mostra i livelli proteici di una selezione di marcatori miofibroblastici in fibroblasti primari da pazienti con RDEB trattati con l'inibitore della gamma-secretasi DAPT. Analisi di immunoblotting (IB) che mostra i livelli proteici dei marcatori fibrotici alfa-actina del tessuto muscolare liscio (α -SMA), transgelina (TAGLN), calponina (CNN1) in fibroblasti primari da pazienti con RDEB (RDEB-FB) (n=3) trattati per 24 ore con l'inibitore della gamma-secretasi DAPT, in presenza o in assenza di TGF- β 1 come induttore di proteine pro-fibrotiche. Cellule trattate

con DMSO sono state usate come controlli.

ESEMPIO 1: *Studio delle proprietà fibrogeniche della cascata di segnalazione di Notch nella fibrosi associata a RDEB e dell'inibizione della via di Notch da parte di inibitori della gamma-secretasi (GSI) secondo la presente invenzione.*

Materiali e metodi

Culture cellulari

Fibroblasti dermici primari da pazienti con RDEB (RDEB-FB) e soggetti sani (NH-FB) sono stati ottenuti da biopsie effettuate per, rispettivamente, scopi diagnostici o chirurgia plastica. Il consenso informato è stato ottenuto prima della biopsia cutanea da pazienti/soggetti sani o loro tutori legali, secondo la legislazione italiana vigente. Questo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, IRCCS, Roma, Italia (2470_OPBG_2021) e IDI-IRCCS, Roma, Italia (ID n. 660/1, 2021).

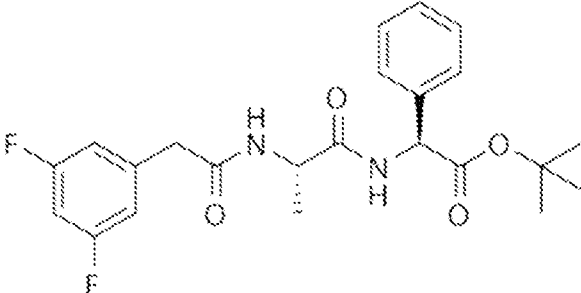
I fibroblasti (passaggi 4-8) sono stati coltivati in terreno di Eagle modificato da Dulbecco (DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium) integrato con siero fetale bovino al 10% (FBS), 50 U/mL di penicillina G, 50 µg/mL di streptomicina e L-glutammina 4 mM. Per esperimenti selezionati, RDEB-FB e NH-FB sono stati privati del siero per tutta la notte in un terreno privo di siero contenente lo 0,1% di albumina sierica bovina (BSA, Bovine Serum Albumin). TGF-β1 è stato usato a 2 ng/mL (100-21C; PeproTech, Londra, Regno Unito).

Inibizione farmacologica e mediata da RNA interferente corto della segnalazione di Notch

Inibitori della gamma-secretasi. NH-FB e RDEB-FB sono stati trattati con due diversi inibitori della gamma-secretasi (GSI): DAPT (N-[N-(3,5-difluorofenacetil)-L-alanil]-S-fenilglicina t-butil estere) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Stati Uniti) e PF-03084014 [(S)-2-((S)-5,7-difluoro-1,2,3,4-tetraidronaftalen-3-ilammino)-N-(1-(2-metil-1-(neopentilammino)propan-2-il)-1H-imidazol-4-il)pentanammid] (Selleck Chemicals LLC, Houston, TX, Stati Uniti).

Le caratteristiche chimiche degli inibitori della gamma-secretasi DAPT e PF-03084014 (nirogacestat) sono riportate nella Tabella 1, in particolare, struttura chimica, nomenclatura IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), CAS (Chemical Abstract Service, USA) n. di registro (n. Cas.), formula molecolare e peso molecolare degli inibitori della gamma-secretasi DAPT (a) e PF-03084014 (b).

Tabella 1

a) DAPT (GSI-IX)

<i>Nomenclatura IUPAC:</i> terz-butil (2s)-2-[[[(2s)-2-[[[2(3,5difluorofenil)acetil]ammino]propanoil]ammino]-2-fenilacetato
<i>N. Cas.:</i> 208255-80-5

<i>Formula molecolare:</i> C ₂₃ H ₂₆ F ₂ N ₂ O ₄
<i>Peso molecolare:</i> 432,46
b) PF03084014 (Nirogacestat)
<i>Nomenclatura IUPAC:</i> (2S)-2-[[[(2S)-6,8-difluoro-1,2,3,4-tetraidronaftalen-2-il]ammino]-N-[1-[1-(2,2-dimetilpropilammino)-2-metilpropan-2-il]imidazol-4-il]pentanammide
<i>N. Cas.:</i> 1290543-63-3
<i>Formula molecolare:</i> C ₂₇ H ₄₁ F ₂ N ₅ O
<i>Peso molecolare:</i> 489,6

I GSI interrompono la maturazione del recettore Notch e, a loro volta, svolgono un ruolo come inibitori indiretti della cascata di segnalazione di Notch. Dopo la loro ricostituzione a 10 mM in dimetil solfossido (DMSO), aliquote di GSI sono state conservate a -20 °C fino all'uso, evitando cicli di congelamento-scongelo. Il trattamento con GSI è stato eseguito in DMEM contenente FBS al 10%, se non diversamente specificato. Secondo i rapporti precedenti, gli RDEB-FB sono stati privati del siero per tutta la notte in DMEM contenente BSA prima di essere trattati con GSI [28]. Cellule trattate con il veicolo DMSO sono state usate come

controlli. I GSI sono stati usati a concentrazioni diverse che variano da 5 a 20 μ M a seconda del saggio. Le concentrazioni di GSI sono state selezionate in base a un test preliminare di vitalità MTT eseguito su tre ceppi di NH-FB (figura 1).

Trasfezione di RNA interferenti corti che bersagliano Jagged 1. Due sequenze di RNA interferenti corti (siRNA) candidati complementari a diverse regioni dell'mRNA di JAG1 umano, si-JAG1-1 e si-JAG1-2, sono state scelte per essere valutate funzionalmente nel contesto di esperimenti di trasfezione. Le sequenze siJAG1-1 e siJAG1-2 sono indicate di seguito: 5'-GAAUGUGAGGCCAAACCUU[dT][dT]-3' (SEQ ID NO:1) (si-JAG1-1, cod. SASI_Hs01_00100441) and 5'-CCUGUAACAUAAGCCCGAAA[dT][dT]-3' (SEQ ID NO:2) (si-JAG1-2, cod. SASI_Hs01_00100442). Entrambi i siRNA sono stati acquistati da Merck (Merck, Darmstadt, Germania). Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) è stato usato per trasfettare i siRNA, seguendo il protocollo del produttore. Dopo 48 ore, l'efficienza di silenziamento dei due siRNA candidati è stata valutata mediante immunoblotting (IB) (figura 2). L'analisi IB ha dimostrato che entrambe le molecole sono state in grado di ridurre i livelli di espressione di JAG1 in assenza di stimolazione con TGF- β 1 (2 ng/mL per 24 ore) (figura 2) rispetto a cellule trasfettate con una molecola scramble di controllo (Scramble). Al contrario, in presenza di TGF- β 1, cellule trasfettate con si-JAG1-2 hanno mostrato una riduzione maggiore dei livelli proteici di JAG1 rispetto a cellule trasfettate con si-

JAG1-1 (figura 2). Di conseguenza, si-JAG1-2, in tutto il testo indicato come si-JAG1, è stato selezionato per tutti gli esperimenti di silenziamento a valle. Il controllo negativo universale di siRNA MISSION® n. 1 (Merck) è stato usato come controllo negativo per trasfezioni di siRNA.

Saggio di contrazione di reticolo di collagene

RDEB-FB (5×10^5 cellule) sono stati miscelati in un tampone di collagene e seminati in piastre da 12 pozzetti come descritto in precedenza [21]. Dopo la gelificazione, i reticoli di collagene popolati da fibroblasti sono stati staccati dai pozzetti e lasciati galleggiare. Gli RDEB-FB sono stati trattati con $20 \mu\text{M}$ di DAPT e PF-03804014 in DMEM contenente lo 0,1% di BSA, in presenza o in assenza di TGF- β 1 a 2 ng/mL , come booster di contrazione. Gli RDEB-FB JAG1-silenziati sono stati incorporati nei reticoli di collagene 24 ore dopo trasfezione di siRNA. In entrambi i casi, sono state acquisite immagini con il sistema ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) al distacco dei reticoli di collagene dai pozzetti (tempo 0, T0) e dopo 48 ore. Le aree di gel sono state misurate mediante il software ImageJ e le foto a T0 sono state usate come riferimenti.

Saggio di proliferazione

Il tasso di proliferazione è stato valutato mediante saggio con 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio bromuro (MTT), seguendo il protocollo del produttore. In breve, tre diversi ceppi di RDEB-FB sono stati seminati alla densità di 4×10^3 cellule in piastre da 96 pozzetti. Il giorno successivo,

gli RDEB-FB che crescono in DMEM contenente il 10% di FBS sono stati trattati con 20 μ M di DAPT o PF-03084014 per 24 ore o 48 ore. Cellule trattate con il veicolo DMSO sono state usate come controlli. Nei punti temporali selezionati, il terreno è stato sostituito con soluzione di MTT e le piastre sono state incubate in un incubatore a secco a 37 °C per 3 ore. Successivamente, le cellule sono state lisate in DMSO per dissolvere cristalli di formazano e i valori di assorbanza sono stati registrati a 560 nm con un lettore di micropiastre Infinite F50 (Tecan, Mannedorf, Svizzera). I valori registrati 24 ore dopo la semina cellulare, prima della stimolazione con GSI (T0), sono stati usati come riferimento.

La riduzione della proliferazione cellulare è un effetto consolidato dei GSI su una varietà di tipi cellulari [37]. Per questi motivi, le concentrazioni appropriate di GSI da usare nel presente studio sono state selezionate sulla base di analisi MTT preliminari su tre ceppi di NH-FB trattati per 24 e 48 ore con PF-03084014 e DAPT a concentrazione crescente (1, 5, 10, 20 e 40 μ M) (figura 1 - pannello A), come descritto sopra.

Saggio di migrazione cellulare

Il tasso di migrazione è stato valutato usando un kit di saggio di migrazione cellulare Oris™ (Platypus Technologies, Madison, WI, USA) seguendo le istruzioni del produttore. In breve, cellule sono state seminate ad alta densità (5×10^4 per pozzetto) su piastre da 96 pozzetti contenenti tappi di silicone di grado medico che limitano la semina cellulare a una regione anulare esterna del pozzetto, e privati del siero per tutta la

notte. Il giorno dopo, i tappi di silicio sono stati rimossi e le cellule sono state trasfettate. L'analisi della migrazione cellulare nella zona di rilevamento è stata eseguita dopo colorazione di Giemsa (Sigma-Aldrich). La zona di rilevamento è stata fotografata con un microscopio Leica DMi8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germania) a 0 ore (controlli premigrazione) e 24 ore dopo la rimozione dei tappi. ImageJ è stato usato per calcolare la percentuale di area priva di cellule. Il saggio di migrazione cellulare di RDEB-FB e NH-FB coltivati in condizioni basali è stato eseguito seguendo lo stesso protocollo. Non è stato eseguito alcun trattamento con mitomicina C per bloccare la proliferazione cellulare in quanto (i) le cellule private del siero e sovraconfluenti usate nel saggio subiscono un'inibizione della proliferazione a contatto e (ii) la migrazione è stata valutata in un breve punto temporale (24 ore).

Saggio ELISA

Il kit Quantikine ELISA per TGF- β 1 umano (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) è stato usato per misurare la quantità di TGF- β 1 (pg/mL) in terreni condizionati privi di siero di due ceppi di RDEB-FB, trattati o meno con 20 μ M di PF-03084014 per 24 e 48 ore. Cellule trattate con DMSO sono state usate come controlli. Il kit Quantikine ELISA per TGF- β 1 è stato eseguito secondo le istruzioni del produttore. Campioni sono stati saggiati in duplicato per ciascuna condizione sperimentale. Al fine di rilevare sia il precursore latente, sia la forma attiva senza peptide associato a

latenza, surnatanti cellulari sono stati sottoposti ad attivazione acida prima di essere analizzati [38,39]. I valori di assorbanza sono stati registrati a 455 nm con un lettore di micropiastre Infinite F50 (Tecan, Männedorf, Svizzera) e analizzati impiegando la versione GraphPad Prism 8.2 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Analisi di deposizione di collagene

La quantità di collageni depositati nella matrice extracellulare (ECM) è stata misurata usando il saggio Sircol basato su colorazione con rosso Sirius (Biocolor, Carrickfergus, Irlanda del Nord - Regno Unito). In breve, due ceppi di RDEB-FB sono stati seminati in piastre da 12 pozzetti (55.000 cellule/pozzetto) e fatti crescere per due giorni fino a raggiungere una confluenza di circa l'80-90%. Quindi, le cellule sono state trattate per 96 ore con PF-03084014 (5 μ M), DAPT (20 μ M) o la corrispondente quantità di veicolo DMSO in terreni privi di siero. La stimolazione con GSI è stata eseguita in presenza o in assenza di TGF- β 1 (2 ng/mL) come induttore di sintesi di collagene. Al fine di migliorare ulteriormente la deposizione di collagene, le colture di RDEB-FB sono state integrate giornalmente con 50 μ g/mL di acido L-ascorbico (Merck) [40] e 100 μ g/mL di destrano solfato 500 kDa (Merck) [41]. Collageni ECM sono stati solubilizzati raschiando i pozzetti di coltura con una soluzione di acido acetico 0,5 M contenente pepsina a 0,1 mg/ml (Pepsin E.C. 3.4.23.1, codice prodotto: P7012, Merck) e incubati per tutta la notte a 4 °C in agitazione. Il giorno successivo, lisati ECM sono stati

neutralizzati con 100 μ L di reagente neutralizzante acido (Biocolor), e concentrati mediante incubazione per tutta la notte in una miscela di acqua e ghiaccio, in presenza di 200 μ L di Reagente di Isolamento & Concentrazione (Biocolor). I valori di assorbanza del campione sono stati misurati mediante il lettore di micropiastre BioTek Synergy H1 (Agilent, Santa Clara, CA, USA) a 560 nm e analizzati attraverso il software GEN5™ v. 3.04 (Agilent).

Saggio di degradazione di collagene

La capacità di RDEB-FB di degradare un sottile film di collagene di tipo I (COL1) è stata valutata come descritto in precedenza [42]. In breve, COL1 da pelli di vitello (Symatase, Chaponost, Francia) è stato diluito a una concentrazione di 375 μ g/ml in acido cloridrico 13 mM. La soluzione di COL1 diluita è stata rapidamente miscelata su ghiaccio con un quarto di volume di un tampone fosfato neutralizzante (20 ml di NaH_2PO_4 0,2 M a pH 7,5, 20 ml di NaOH 0,1 M, 4,15 ml di NaCl 5 M) e delicatamente distribuita in piastre da 24 pozzetti. La gelificazione di COL1 è stata ottenuta mantenendo le piastre rivestite di COL1 a 37 °C per 2 ore. I gel di COL1 sono stati disidratati per tutta la notte in una cappa a flusso laminare, lavati con acqua sterile e PBS contenente penicillina/streptomina. In seguito, una gocciolina di terreno completo contenente 12,500 RDEB-FB è stata versata delicatamente al centro del pozzetto, e le cellule sono state lasciate aderire in una camera umidificata per 3 ore. Le cellule sono state mantenute in terreno Optimem I (Thermo Fisher Scientific) per 5

giorni, il terreno contenente integratori è stato sostituito dopo 2 giorni. Al termine del periodo di incubazione, gli RDEB-FB sono stati staccati mediante tripsina/EDTA e contati per essere sicuri di valutare l'attività collagenolitica dello stesso numero di cellule per condizione. Il film di COL1 residuo è stato colorato per 15 min con una soluzione di colorazione al blu di Coomassie brillante R-250 (Thermo Fisher Scientific), l'eccesso di colorante è stato rimosso con una soluzione di decolorazione (30% di etanolo, 7,5% di CH₃COOH). Le immagini sono state acquisite usando un obiettivo 10x.

Estrazione di RNA e analisi PCR in tempo reale

Il tutto è stato estratto da TRIzol (Thermo Fisher Scientific) mediante colture di fibroblasti monostrato, seguendo le istruzioni del produttore. RNA è stato trascritto inversamente e amplificato usando il kit Power SYBR Green RNA-to-Ct 1-Step (Thermo Fisher Scientific) sul sistema per PCR in tempo reale QuantStudio™ 7 Pro (Thermo Fisher Scientific). Le coppie di primer usate in questo studio sono elencate nella Tabella 2: ACTA2, alfa-actina 2, tessuto muscolare liscio; CNN1, calponina; COL1A1, collagene di tipo I a catena alfa 1; GAPDH, gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi; HES1, fattore di trascrizione bHLH della famiglia hes 1; JAG1, ligando di Notch canonico jagged 1; NOTCH1, recettore Notch 1; POSTN, periostina; TAGLN, transgelina.

Tabella 2

Nome dei primer (cDNA)	Sequenza senso (5'-3')	Sequenza antisenso (5'-3')
ACTA2	GCGTGGCTATTCCTTCGTT A (SEQ ID NO:3)	GACTCCATCCCGATGAAGGAT (SEQ ID NO:4)
CNN1	GGCCCAGAAGTATGACCAC C (SEQ ID NO:5)	GATGAATTCGCAAAGAATGATG CC (SEQ ID NO:6)
COL1A1	GGCCAAGACGAAGACATC CC (SEQ ID NO:7)	CGTCATCGCACAACACCTTG (SEQ ID NO:8)
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGT C (SEQ ID NO:9)	GAAGATGGTGATGGGATTTC (SEQ ID NO:10)
HES1	AGAAAGATAGCTCGCGGC ATT (SEQ ID NO:11)	TACTTCCCCAGCACACTTGG (SEQ ID NO:12)

JAG1	GTCTCAACGGGGAACTTG T (SEQ ID NO:13)	GCGTGCTCAGCAATTCACA (SEQ ID NO:14)
NOTCH1	GACAGCCTCAACGGGTACA A (SEQ ID NO:15)	CACACGTAGCCACTGGTCAT (SEQ ID NO:16)
POSTN	TGGAAGAGACGGTCACTTC ACA (SEQ ID NO:17)	GTGGTACTTCATAAGAGCTTCGG (SEQ ID NO:18)
Pri-miR-143/145	AACTCCAGCTGGTCCTTAG (SEQ ID NO:19)	TCTTGAACCCTCATCCTGT (SEQ ID NO:20)
TAGLN	AACCACCGGGGTGAGAGG (SEQ ID NO:21)	GGGGAAAGCTCCTTGGAAGT (SEQ ID NO:22)
HPRT1	TGACACTGGCAAAACAATGC A (SEQ ID NO:23)	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT (SEQ ID NO:24)

I livelli di espressione di mRNA relativi sono stati misurati mediante il metodo $2^{-\Delta\Delta CT}$ [43]. Ipoxantina fosforibosiltransferasi 1 (HPRT1) è stata usata come gene housekeeping per normalizzare i livelli di espressione di mRNA.

Immunoblotting

Lisati di cellule intere sono stati ottenuti in tampone di saggio di radioimmunoprecipitazione (RIPA, Radioimmunoprecipitation Assay) (Sigma-Aldrich) integrato con inibitori di fosfatasi e proteasi (Merck).

Diverse quantità di lisati proteici sono state fatte correre in condizioni di riduzione usando gel precolato con gradiente del 4-12% (Thermo Fisher Scientific) o gel di poliacrilammide colati a mano (4-8%), a seconda della proteina da saggiare. Membrane di nitrocellulosa Amersham™ Protran® Premium (dimensione dei pori 0,2 µm) (Merck) sono state sottoposte a immunoblotting con anticorpi primari indicati nella Tabella 3 e incubate con anticorpi secondari legati alla perossidasi del rafano.

Gli anticorpi primari usati in questo studio sono elencati nella Tabella 3: α -SMA, alfa-actina del tessuto muscolare liscio; CNN1, calponina; JAG1, ligando di Notch canonico jagged 1; NOTCH1, recettore Notch 1; TAGLN, transgelina. TBS-T sta per soluzione salina tamponata con Tris con il 20% di Tween 20.

Tabella 3

Anticorpo primario	Clone	Azienda	Diluizione
α -SMA	1A4	Merck	1:1000 (TBS-T, 5% latte)
CNN1	836701	R&D Systems (Bio-Techne)	1 µg/mL (TBS-T, 5% latte)
GAPDH	14C10	Cell Signalling Technology	1:1000 (TBS-T, 5% latte)
JAG1	28H8	Cell Signalling Technology	1:500 (TBS-T, 1% latte)
NOTCH1	BTAN20	Developmental Studies Hybridoma Bank	1:500 (TBS-T, 1% latte)
TAGLN	859112	R&D Systems (Bio-Techne)	1:1000 (TBS-T, 5% latte)

Il rilevamento è stato eseguito usando Cytiva ECL™

Prime Western Blotting System (Merck) o SuperSignal West Femto (Thermo Fisher Scientific), a seconda della proteina da saggiare. L'anticorpo contro Notch1 (tutte le forme; clone bTAN20) è stato ottenuto dalla Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB) presso l'Università dell'Iowa (DSHB, Iowa City, IA, USA). GAPDH (clone 14C10) e Jagged1 (clone 28H8) sono stati ottenuti da Cell Signaling (Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA, USA). Gli anticorpi contro TAGLN (clone n. 859112) e CNN1 (clone n. 836701) provenivano da R&D Systems (R&D Systems, Inc. Minneapolis, MN, USA). L'anticorpo contro α -SMA (clone 1A4) è stato acquistato da Sigma-Aldrich. Tutti gli anticorpi sono stati usati secondo le istruzioni del produttore. Gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) è stata usata come controllo di carico.

Risultati

JAG1 e NOTCH1 intracellulare sono sovra-espressi in fibroblasti cutanei primari da pazienti con RDEB, e l'espressione di JAG1 è potenziata da TGF- β 1

I livelli di espressione di JAG1 e la forma clivata di NOTCH1 sono stati analizzati mediante immunoblotting (IB) e PCR in tempo reale in RDEB-FB e NH-FB. L'analisi IB ha rivelato un aumento significativo dei livelli proteici di JAG1 e N1-ICD in RDEB-FB rispetto al pool di NH-FB (figura 3A). Questi risultati erano in linea con le risultanze precedenti (si veda la figura 7 in rif. [21]). La PCR in tempo reale ha confermato un aumento significativo della quantità di mRNA di JAG1, sebbene meno marcato di quello osservato a livello proteico,

indicando meccanismi regolatori post-traduzione che potenziano la traduzione di mRNA di JAG1 (figura 3B). D'altra parte, i livelli di mRNA di NOTCH1 erano comparabili tra RDEB-FB e NH-FB (figura 3B). In linea con il ruolo fibrogenico dell'asse JAG1/NOTCH1, gli RDEB-FB trattati con TGF- β 1 hanno mostrato un'ulteriore sovraregolazione dei livelli proteici di JAG1, che era massima a 24 ore (figura 3C).

L'inibizione farmacologica e basata su RNA interferente corto della cascata di segnalazione di Notch compromette la capacità contrattile di fibroblasti di RDEB primari

La capacità contrattile è una caratteristica tipica dei miofibroblasti e la sua valutazione attraverso il saggio di contrazione di reticolo di collagene (CLC) popolato da fibroblasti rappresenta un approccio convalidato per esplorare i processi fibrotici *in vitro*. Per valutare l'impatto dell'inibizione di Notch sulla capacità contrattile di RDEB-FB, è stato eseguito il saggio CLC su fibroblasti di pazienti trattati con due GSI disponibili in commercio, DAPT e PF-03084014 (nirogacestat) (si veda la Tabella 1), in presenza o in assenza di TGF- β 1 come booster di contrazione. In condizioni di coltura basale, ossia, crescita cellulare in assenza di stimolazione con TGF- β 1, gli effetti di PF-03084014 sulla contrattilità cellulare sono stati modesti ma coerenti in tutti i ceppi di RDEB-FB analizzati (figura 4). In particolare, PF-03084014 ha mostrato un'evidente inibizione delle proprietà contrattili in RDEB-FB1, che condivide capacità

contrattili notevoli con RDEB-FB2, ma sembra essere più sensibile alla stimolazione con PF-03084014 rispetto al suo ceppo cellulare affine (figura 4). D'altra parte, gli RDEB-FB trattati con DAPT non hanno mostrato variazioni significative della capacità di contrarre la matrice di collagene di tipo I circostante in assenza di stimolazione con TGF- β 1 (dati non mostrati). Viceversa, in presenza di TGF- β 1, gli RDEB-FB trattati con PF-03084014 hanno mostrato una marcata riduzione della contrattilità (figura 5), mentre erano significativi anche gli effetti DAPT-dipendenti, sebbene meno evidenti (figura 5B e figura 6). La diversa attitudine dei due GSI a ridurre la contrattilità di RDEB-FB e, a loro volta, a inibire i processi fibrotici *in vitro*, è stata dimostrata in modo inequivocabile quando gli stessi ceppi di RDEB-FB (ossia, RDEB-FB3 e RDEB-FB4) sono stati sottoposti simultaneamente al trattamento con PF-03084014 o DAPT per 48 ore, in presenza di TGF- β 1 come induttore di contrazione (figura 5B). Infine, per corroborare il coinvolgimento di Notch nella contrattilità di RDEB-FB, il saggio CLC è stato ripetuto su RDEB-FB trasfettati con un RNA interferente corto (siRNA) che bersagliava JAG1 (si-JAG1). I risultati hanno mostrato che la capacità cellulare di contrarre la matrice di collagene di tipo I circostante era ridotta in RDEB-FB JAG1-silenziati rispetto a cellule trasfettate con un siRNA di controllo scramble non bersagliante (Scramble), con e senza stimolazione con TGF- β 1 (figura 5D). Presi insieme, questi risultati supportano il ruolo della cascata di segnalazione di

Notch come regolatore positivo della capacità contrattile dei fibroblasti attivati, che è un tratto distintivo della fibrosi. Inoltre, è stato dimostrato l'effetto superiore di PF-03084014 nel contrastare la contrattilità di RDEB-FB rispetto a DAPT.

PF-03084014 contrasta il potenziale migratorio e il tasso di proliferazione di fibroblasti di RDEB primari

Come parte del processo di riparazione tissutale, i fibroblasti attivati inizialmente migrano verso i siti di lesione e iniziano a proliferare e produrre componenti ECM, principalmente collagene di tipo I e III. Una volta ristabilita l'integrità tissutale, i miofibroblasti possono tornare al loro "stato a bassa attività" tramite de-differenziazione in fibroblasti e in altre cellule precursori o, in alternativa, subire senescenza o morte cellulare programmata. Tuttavia, in modelli di malattia *in vitro* e *in vivo* di fibrosi, i miofibroblasti persistono nel sito della lesione a causa di meccanismi di self-clearance compromessi o della loro eccessiva attivazione/proliferazione [24,25]. In questo studio sono stati valutati gli effetti di PF-03084014 e DAPT sulla capacità migratoria e sul tasso di proliferazione di RDEB-FB. Per quanto riguarda la migrazione cellulare, l'inibizione della via di Notch da parte di entrambi i GSI ha portato a una significativa riduzione della capacità di RDEB-FB di migrare nell'area priva di cellule rispetto a cellule non trattate (figura 7A). Parallelamente, gli effetti dei GSI sulla capacità di proliferazione di RDEB-FB sono stati valutati mediante saggio MTT su tre diversi ceppi di RDEB-FB trattati con

PF-03084014 o DAPT per 24 e 48 ore. Gli RDEB-FB trattati con DAPT non hanno mostrato variazioni nella proliferazione cellulare (figura 7B). Al contrario, il trattamento con PF-03084014 per 48 ore ha determinato una riduzione statisticamente significativa del tasso di proliferazione di RDEB-FB rispetto a cellule non trattate (figura 7B), evidenziando i maggiori effetti di PF-03084014 rispetto a DAPT, anche nel contesto della crescita cellulare.

Gli RDEB-FB trattati con PF-03084014 mostrano una riduzione della secrezione di TGF- β 1 e della deposizione di collagene

Per valutare se l'inibizione della via Notch può attenuare due segni distintivi della fibrosi tissutale, ossia, la deposizione di collagene e il rilascio di TGF- β 1 da parte dei fibroblasti attivati, la quantità di collagene ECM e la concentrazione di TGF- β 1 in surnatanti attivati da acido sono state quantificate in RDEB-FB trattati con PF-03084014 e DAPT. Per quanto riguarda la secrezione di TGF- β 1, la quantità di citochina rilasciata da RDEB-FB in terreni di coltura è stata ridotta fino al 73% in presenza del GSI PF-03084014 rispetto alle cellule di controllo trattate con DMSO (DMSO a 24 ore = $85,3 \pm 5,0$ pg/mL, PF-03084014 a 24 ore = $22,8 \pm 2,5$ pg/mL; DMSO a 48 ore = $119 \pm 8,5$ pg/mL, PF-03084014 a 48 ore = $40,4 \pm 3$ pg/mL) (figura 8A). Inoltre, gli RDEB-FB trattati con PF-03084014 hanno mostrato una riduzione del 50% dei collagene solubili in pepsina depositati nell'ECM rispetto a cellule non trattate, sia in assenza sia in presenza di TGF- β 1 come induttore della

deposizione di collagene (figura 8B). I risultati hanno rivelato anche una riduzione mediata da DAPT della deposizione di collagene in ciascuna condizione sperimentale, sebbene la differenza fosse moderata rispetto al trattamento con PF-03084014 (figura 8B). Infine, l'impatto dei GSI sulla capacità di RDEB-FB di rimodellare uno strato di fibrille di collagene di tipo I è stato studiato mediante un saggio di degradazione *in vitro* [42,44]. In presenza di TGF- β 1, gli RDEB-FB trattati con PF-03084014 hanno mostrato un numero e una dimensione maggiori di aree di degradazione di collagene rispetto a controlli non trattati (figura 8C). Sebbene meno marcati, risultati simili sono stati ottenuti negli RDEB-FB trattati con DAPT (figura 8C).

L'inibizione farmacologica e mediata da RNA interferente corto della via di segnalazione di Notch sottoregola i marcatori miofibroblastici

Per valutare gli effetti dell'inibizione di Notch sull'attivazione dei fibroblasti, i livelli di espressione di una selezione di marcatori prototipici pro-fibrotici e della contrattilità sono stati studiati mediante analisi di immunoblotting (IB) e PCR in tempo reale in RDEB-FB trattati con GSI o trasfettati con un RNA interferente corto che bersaglia JAG1 (si-JAG1), in condizioni di coltura basale e in presenza di TGF- β 1. Nonostante le variazioni inter-individuali nei livelli di espressione genica, che sono previste quando si tratta di cellule primarie da pazienti con diverse manifestazioni fenotipiche e gravità, l'analisi IB ha rivelato che gli RDEB-FB trattati con PF-03084014 hanno

mostrato la sottoregolazione dei marcatori contrattili e fibrotici prototipici, incluso JAG1 (figura 9A), sia in assenza sia in presenza di TGF- β 1 (figura 9A). Modelli simili di modulazione sono stati osservati negli RDEB-FB trattati con DAPT, sebbene meno marcati (figura 10). Di conseguenza, i fibroblasti JAG1-silenziati hanno mostrato una riduzione significativa dei livelli proteici di α -SMA, CNN1, TAGLN, JAG1 e del recettore NOTCH1 non processato (ossia, NOTCH a lunghezza intera, NOTCH FL) rispetto a controlli di trasfezione, ossia, cellule trasfettate con una molecola scramble (Scramble) (figura 9B). Gli effetti del silenziamento di JAG1 sull'abbondanza di marcatori pro-fibrotici erano più evidenti negli RDEB-FB stimolati con TGF- β 1 (figura 9B), probabilmente a causa dell'induzione mediata da TGF- β 1 di vie pro-fibrotiche, tra cui Notch. Sebbene con variabilità inter-individuale, anche l'analisi PCR in tempo reale ha confermato la sottoregolazione di una selezione di marcatori contrattili/fibrotici, tra cui α -SMA, CNN1, TAGLN e JAG1, in RDEB-FB trattati con PF-03084014 sia in condizioni di coltura basale (figura 9C) sia in presenza di TGF- β 1 (figura 9C). In aggiunta, è stata osservata una sottoregolazione dipendente dal contesto dei livelli di mRNA di HES1 (fattore di trascrizione bHLH della famiglia hes 1), un bersaglio trascrizionale di Notch, e di periostina (POST) e Pri-miR-143/145, che rappresentano due geni pro-fibrotici convalidati [21,36] (figura 9C).

Riferimenti

1. Bardhan, A.; Bruckner-Tuderman, L.; Chapple,

I.L.C.; Fine, J.D.; Harper, N.; Has, C.; Magin, T.M.; Marinkovich, M.P.; Marshall, J.F.; McGrath, J.A.; et al. Epidermolysis bullosa. *Nat Rev Dis Primers* **2020**, *6*, 78, doi:10.1038/s41572-020-0210-0.

2.Has, C.; Bauer, J.W.; Bodemer, C.; Bolling, M.C.; Bruckner-Tuderman, L.; Diem, A.; Fine, J.D.; Heagerty, A.; Hovnanian, A.; Marinkovich, M.P.; et al. Consensus reclassification of inherited epidermolysis bullosa and other disorders with skin fragility. *Br J Dermatol* **2020**, *183*, 614-627, doi:10.1111/bjd.18921.

3.Condorelli, A.G.; Dellambra, E.; Logli, E.; Zambruno, G.; Castiglia, D. Epidermolysis Bullosa-Associated Squamous Cell Carcinoma: From Pathogenesis to Therapeutic Perspectives. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20225707.

4.El Hachem, M.; Zambruno, G.; Bourdon-Lanoy, E.; Ciasulli, A.; Buisson, C.; Hadj-Rabia, S.; Diociaiuti, A.; Gouveia, C.F.; Hernandez-Martin, A.; de Lucas Laguna, R.; et al. Multicentre consensus recommendations for skin care in inherited epidermolysis bullosa. *Orphanet J Rare Dis* **2014**, *9*, 76, doi:10.1186/1750-1172-9-76.

5.Has, C.; El Hachem, M.; Buckova, H.; Fischer, P.; Friedova, M.; Greco, C.; Nevorankova, P.; Salavastru, C.; Mellerio, J.E.; Zambruno, G.; et al. Practical management of epidermolysis bullosa: consensus clinical position statement from the European Reference Network for Rare Skin Diseases. *J Eur Acad Dermatol Venereol* **2021**, *35*, 2349-2360, doi:10.1111/jdv.17629.

6.Bruckner-Tuderman, L. Skin Fragility:

Perspectives on Evidence-based Therapies. *Acta Derm Venereol* **2020**, *100*, adv00053, doi:10.2340/00015555-3398.

7.Kiritsi, D.; Dieter, K.; Niebergall-Roth, E.; Fluhr, S.; Daniele, C.; Esterlechner, J.; Sadeghi, S.; Ballikaya, S.; Erdinger, L.; Schauer, F.; et al. Clinical trial of ABCB5+ mesenchymal stem cells for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *JCI Insight* **2021**, *6*, doi:10.1172/jci.insight.151922.

8.Hou, P.C.; Wang, H.T.; Abhee, S.; Tu, W.T.; McGrath, J.A.; Hsu, C.K. Investigational Treatments for Epidermolysis Bullosa. *Am J Clin Dermatol* **2021**, *22*, 801-817, doi:10.1007/s40257-021-00626-3.

9.Gurevich, I.; Agarwal, P.; Zhang, P.; Dolorito, J.A.; Oliver, S.; Liu, H.; Reitze, N.; Sarma, N.; Bagci, I.S.; Sridhar, K.; et al. In vivo topical gene therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa: a phase 1 and 2 trial. *Nat Med* **2022**, *28*, 780-788, doi:10.1038/s41591-022-01737-y.

10.Subramaniam, K.S.; Antoniou, M.N.; McGrath, J.A.; Lwin, S.M. The potential of gene therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Br J Dermatol* **2022**, *186*, 609-619, doi:10.1111/bjd.20910.

11.Hirsch, T.; Rothoefl, T.; Teig, N.; Bauer, J.W.; Pellegrini, G.; De Rosa, L.; Scaglione, D.; Reichelt, J.; Klausegger, A.; Kneisz, D.; et al. Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells. *Nature* **2017**, *551*, 327-332, doi:10.1038/nature24487.

12.Kueckelhaus, M.; Rothoefl, T.; De Rosa, L.; Yeni, B.; Ohmann, T.; Maier, C.; Eitner, L.; Metze, D.; Losi, L.; Secone Seconetti, A.; et al. Transgenic

Epidermal Cultures for Junctional Epidermolysis Bullosa - 5-Year Outcomes. *N Engl J Med* **2021**, *385*, 2264-2270, doi:10.1056/NEJMoa2108544.

13.Eichstadt, S.; Barriga, M.; Ponakala, A.; Teng, C.; Nguyen, N.T.; Siprashvili, Z.; Nazaroff, J.; Gorell, E.S.; Chiou, A.S.; Taylor, L.; et al. Phase 1/2a clinical trial of gene-corrected autologous cell therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *JCI Insight* **2019**, *4*, doi:10.1172/jci.insight.130554.

14.Lodyga, M.; Hinz, B. TGF-beta1 - A truly transforming growth factor in fibrosis and immunity. *Semin Cell Dev Biol* **2020**, *101*, 123-139, doi:10.1016/j.semcdb.2019.12.010.

15.Akasaka, E.; Kleiser, S.; Sengle, G.; Bruckner-Tuderman, L.; Nystrom, A. Diversity of Mechanisms Underlying Latent TGF-beta Activation in Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *J Invest Dermatol* **2021**, *141*, 1450-1460 e1459, doi:10.1016/j.jid.2020.10.024.

16.Titeux, M.; Pendaries, V.; Tonasso, L.; Decha, A.; Bodemer, C.; Hovnanian, A. A frequent functional SNP in the MMP1 promoter is associated with higher disease severity in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Hum Mutat* **2008**, *29*, 267-276, doi:10.1002/humu.20647.

17.Odorisio, T.; Di Salvio, M.; Orecchia, A.; Di Zenzo, G.; Piccinni, E.; Cianfarani, F.; Travaglione, A.; Uva, P.; Bellei, B.; Conti, A.; et al. Monozygotic twins discordant for recessive dystrophic epidermolysis bullosa phenotype highlight the role of TGF-beta signalling in modifying disease severity. *Hum Mol Genet*

2014, 23, 3907–3922, doi:10.1093/hmg/ddul02.

18.Cianfarani, F.; De Domenico, E.; Nystrom, A.; Mastroeni, S.; Abeni, D.; Baldini, E.; Ulisse, S.; Uva, P.; Bruckner-Tuderman, L.; Zambruno, G.; et al. Decorin counteracts disease progression in mice with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Matrix Biol* **2019**, 81, 3–16, doi:10.1016/j.matbio.2018.12.001.

19.Atanasova, V.S.; Russell, R.J.; Webster, T.G.; Cao, Q.; Agarwal, P.; Lim, Y.Z.; Krishnan, S.; Fuentes, I.; Guttman-Gruber, C.; McGrath, J.A.; et al. Thrombospondin-1 Is a Major Activator of TGF-beta Signaling in Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa Fibroblasts. *J Invest Dermatol* **2019**, 139, 1497–1505 e1495, doi:10.1016/j.jid.2019.01.011.

20.Vanden Oever, M.; Muldoon, D.; Mathews, W.; McElmurry, R.; Tolar, J. miR-29 Regulates Type VII Collagen in Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *J Invest Dermatol* **2016**, 136, 2013–2021, doi:10.1016/j.jid.2016.05.115.

21.Condorelli, A.G.; Logli, E.; Cianfarani, F.; Teson, M.; Diociaiuti, A.; El Hachem, M.; Zambruno, G.; Castiglia, D.; Odorisio, T. MicroRNA-145-5p regulates fibrotic features of recessive dystrophic epidermolysis bullosa skin fibroblasts. *Br J Dermatol* **2019**, 181, 1017–1027, doi:10.1111/bjd.17840.

22.Hinz, B.; McCulloch, C.A.; Coelho, N.M. Mechanical regulation of myofibroblast phenoconversion and collagen contraction. *Exp Cell Res* **2019**, 379, 119–128, doi:10.1016/j.yexcr.2019.03.027.

23.Pakshir, P.; Noskovicova, N.; Lodyga, M.; Son,

D.O.; Schuster, R.; Goodwin, A.; Karvonen, H.; Hinz, B. The myofibroblast at a glance. *J Cell Sci* **2020**, *133*, doi:10.1242/jcs.227900.

24.Kato, K.; Logsdon, N.J.; Shin, Y.J.; Palumbo, S.; Knox, A.; Irish, J.D.; Rounseville, S.P.; Rummel, S.R.; Mohamed, M.; Ahmad, K.; et al. Impaired Myofibroblast Dedifferentiation Contributes to Nonresolving Fibrosis in Aging. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2020**, *62*, 633–644, doi:10.1165/rcmb.2019-00920C.

25.Fortier, S.M.; Penke, L.R.; King, D.; Pham, T.X.; Ligresti, G.; Peters-Golden, M. Myofibroblast dedifferentiation proceeds via distinct transcriptomic and phenotypic transitions. *JCI Insight* **2021**, *6*, doi:10.1172/jci.insight.144799.

26.Siebel, C.; Lendahl, U. Notch Signaling in Development, Tissue Homeostasis, and Disease. *Physiol Rev* **2017**, *97*, 1235–1294, doi:10.1152/physrev.00005.2017.

27.Condorelli, A.G.; El Hachem, M.; Zambruno, G.; Nystrom, A.; Candi, E.; Castiglia, D. Notch-ing up knowledge on molecular mechanisms of skin fibrosis: focus on the multifaceted Notch signalling pathway. *J Biomed Sci* **2021**, *28*, 36, doi:10.1186/s12929-021-00732-8.

28.Dees, C.; Tomcik, M.; Zerr, P.; Akhmetshina, A.; Horn, A.; Palumbo, K.; Beyer, C.; Zwerina, J.; Distler, O.; Schett, G.; et al. Notch signalling regulates fibroblast activation and collagen release in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* **2011**, *70*, 1304–1310, doi:10.1136/ard.2010.134742.

29.Wen, J.; Liu, D.; Zhao, L. Small molecules

targeting gamma-secretase and their potential biological applications. *Eur J Med Chem* **2022**, *232*, 114169, doi:10.1016/j.ejmech.2022.114169.

30. Moore, G.; Annett, S.; McClements, L.; Robson, T. Top Notch Targeting Strategies in Cancer: A Detailed Overview of Recent Insights and Current Perspectives. *Cells* **2020**, *9*, doi:10.3390/cells9061503.

31. Lanz, T.A.; Wood, K.M.; Richter, K.E.; Nolan, C.E.; Becker, S.L.; Pozdnyakov, N.; Martin, B.A.; Du, P.; Oborski, C.E.; Wood, D.E.; et al. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the gamma-secretase inhibitor PF-3084014. *J Pharmacol Exp Ther* **2010**, *334*, 269–277, doi:10.1124/jpet.110.167379.

32. Brodney, M.A.; Auperin, D.D.; Becker, S.L.; Bronk, B.S.; Brown, T.M.; Coffman, K.J.; Finley, J.E.; Hicks, C.D.; Karmilowicz, M.J.; Lanz, T.A.; et al. Design, synthesis, and in vivo characterization of a novel series of tetralin amino imidazoles as gamma-secretase inhibitors: discovery of PF-3084014. *Bioorg Med Chem Lett* **2011**, *21*, 2637–2640, doi:10.1016/j.bmcl.2010.12.118.

33. Skubitz, K.M. Biology and Treatment of Aggressive Fibromatosis or Desmoid Tumor. *Mayo Clin Proc* **2017**, *92*, 947–964, doi:10.1016/j.mayocp.2017.02.012.

34. Kummar, S.; O'Sullivan Coyne, G.; Do, K.T.; Turkbey, B.; Meltzer, P.S.; Polley, E.; Choyke, P.L.; Meehan, R.; Vilimas, R.; Horneffer, Y.; et al. Clinical Activity of the gamma-Secretase Inhibitor PF-03084014 in Adults With Desmoid Tumors (Aggressive Fibromatosis). *J Clin Oncol* **2017**, *35*, 1561–1569,

doi:10.1200/JCO.2016.71.1994.

35. Takahashi, T.; Prensner, J.R.; Robson, C.D.; Janeway, K.A.; Weigel, B.J. Safety and efficacy of gamma-secretase inhibitor nirogacestat (PF-03084014) in desmoid tumor: Report of four pediatric/young adult cases. *Pediatr Blood Cancer* **2020**, *67*, e28636, doi:10.1002/pbc.28636.

36. Chacon-Solano, E.; Leon, C.; Diaz, F.; Garcia-Garcia, F.; Garcia, M.; Escamez, M.J.; Guerrero-Aspizua, S.; Conti, C.J.; Mencia, A.; Martinez-Santamaria, L.; et al. Fibroblast activation and abnormal extracellular matrix remodelling as common hallmarks in three cancer-prone genodermatoses. *Br J Dermatol* **2019**, *181*, 512-522, doi:10.1111/bjd.17698.

37. Rasul, S.; Balasubramanian, R.; Filipovic, A.; Slade, M.J.; Yague, E.; Coombes, R.C. Inhibition of gamma-secretase induces G2/M arrest and triggers apoptosis in breast cancer cells. *Br J Cancer* **2009**, *100*, 1879-1888, doi:10.1038/sj.bjc.6605034.

38. Lyons, R.M.; Keski-Oja, J.; Moses, H.L. Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium. *J Cell Biol* **1988**, *106*, 1659-1665, doi:10.1083/jcb.106.5.1659.

39. Annes, J.P.; Munger, J.S.; Rifkin, D.B. Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci* **2003**, *116*, 217-224, doi:10.1242/jcs.00229.

40. Murad, S.; Tajima, S.; Johnson, G.R.; Sivarajah, S.; Pinnell, S.R. Collagen synthesis in cultured human skin fibroblasts: effect of ascorbic acid and its analogs. *J Invest Dermatol* **1983**, *81*, 158-162,

doi:10.1111/1523-1747.ep12543573.

41.Lareu, R.R.; Subramhanya, K.H.; Peng, Y.; Benny, P.; Chen, C.; Wang, Z.; Rajagopalan, R.; Raghunath, M. Collagen matrix deposition is dramatically enhanced in vitro when crowded with charged macromolecules: the biological relevance of the excluded volume effect. *FEBS Lett* **2007**, *581*, 2709-2714, doi:10.1016/j.febslet.2007.05.020.

42.Havemose-Poulsen, A.; Holmstrup, P.; Stoltze, K.; Birkedal-Hansen, H. Dissolution of type I collagen fibrils by gingival fibroblasts isolated from patients of various periodontitis categories. *J Periodontal Res* **1998**, *33*, 280-291, doi:10.1111/j.1600-0765.1998.tb02201.x.

43.Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **2001**, *25*, 402-408, doi:10.1006/meth.2001.1262.

44.Zigrino, P.; Brinckmann, J.; Niehoff, A.; Lu, Y.; Giebeler, N.; Eckes, B.; Kadler, K.E.; Mauch, C. Fibroblast-Derived MMP-14 Regulates Collagen Homeostasis in Adult Skin. *J Invest Dermatol* **2016**, *136*, 1575-1583, doi:10.1016/j.jid.2016.03.036.

Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

RIVENDICAZIONI

1) Inibitore della gamma-secretasi per l'uso nel trattamento dell'epidermolisi bollosa e/o di una fibrosi associata all'epidermolisi bollosa.

2) Inibitore della gamma-secretasi per l'uso secondo la rivendicazione 1, in cui l'epidermolisi bollosa è scelta dal gruppo consistente in epidermolisi bollosa distrofica recessiva, epidermolisi bollosa distrofica dominante ed epidermolisi bollosa giunzionale, preferibilmente epidermolisi bollosa distrofica recessiva.

3) Inibitore della gamma-secretasi per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-2, in cui la fibrosi è fibrosi associata a epidermolisi bollosa distrofica recessiva.

4) Inibitore della gamma-secretasi per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-3, in cui detto inibitore della gamma-secretasi è scelto dal gruppo consistente in Nirogacestat, DAPT, RO492909, Semagacestat, BMS-90602, Avagacestat, MK-0752, preferibilmente Nirogacestat.

5) Composizione farmaceutica comprendente un inibitore della gamma-secretasi, insieme a uno o più eccipienti e/o coadiuvanti, per l'uso nel trattamento dell'epidermolisi bollosa e/o di una fibrosi associata all'epidermolisi bollosa.

6) Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 5, per l'uso secondo la rivendicazione 5, in cui l'epidermolisi bollosa è scelta dal gruppo consistente in epidermolisi bollosa distrofica

recessiva, epidermolisi bollosa distrofica dominante ed epidermolisi bollosa giunzionale, preferibilmente epidermolisi bollosa distrofica recessiva.

7) Composizione farmaceutica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 5-6, per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 5-6, in cui la fibrosi è fibrosi associata a epidermolisi bollosa distrofica recessiva.

8) Composizione farmaceutica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 5-7, per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 5-7, in cui detto inibitore della gamma-secretasi è scelto dal gruppo costituito da Nirogacestat, DAPT, RO492909, Semagacestat, BMS-90602, Avagacestat, MK-0752, preferibilmente Nirogacestat.

9) Composizione farmaceutica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 5-8, per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 5-8, in cui detta composizione farmaceutica comprende inoltre un prodotto scelto dal gruppo consistente in farmaci antinfiammatori, losartan, l'esapeptide angiotensina (Ang)-(1-7) e prodotti farmaceutici a base di Ang-(1-7), come la formulazione orale di TXA127.

10) Combinazione di un inibitore della gamma-secretasi con un prodotto scelto dal gruppo consistente in farmaci antinfiammatori, losartan, esapeptide angiotensina (Ang)-(1-7), prodotti farmaceutici a base di Ang-(1-7), come la formulazione orale di TXA127, formulazioni topiche di idrogel contenenti timosina beta-4, come RGN-137, Filsuvez e gel topici contenenti

decorina, per l'uso separato o sequenziale nel trattamento dell'epidermolisi bollosa e/o di una fibrosi associata all'epidermolisi bollosa.

11) Combinazione secondo la rivendicazione 10, per l'uso secondo la rivendicazione 10, in cui l'epidermolisi bollosa è scelta dal gruppo consistente in epidermolisi bollosa distrofica recessiva, epidermolisi bollosa distrofica dominante (DDEB) ed epidermolisi bollosa giunzionale (JEB), preferibilmente epidermolisi bollosa distrofica recessiva.

12) Combinazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 10-11, per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 10-11, in cui la fibrosi è fibrosi associata a epidermolisi bollosa distrofica recessiva.

13) Combinazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 10-12, per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 10-12, in cui detto inibitore della gamma-secretasi è scelto dal gruppo consistente in Nirogacestat, DAPT, RO492909, Semagacestat, BMS-90602, Avagacestat, MK-0752, preferibilmente Nirogacestat.

Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

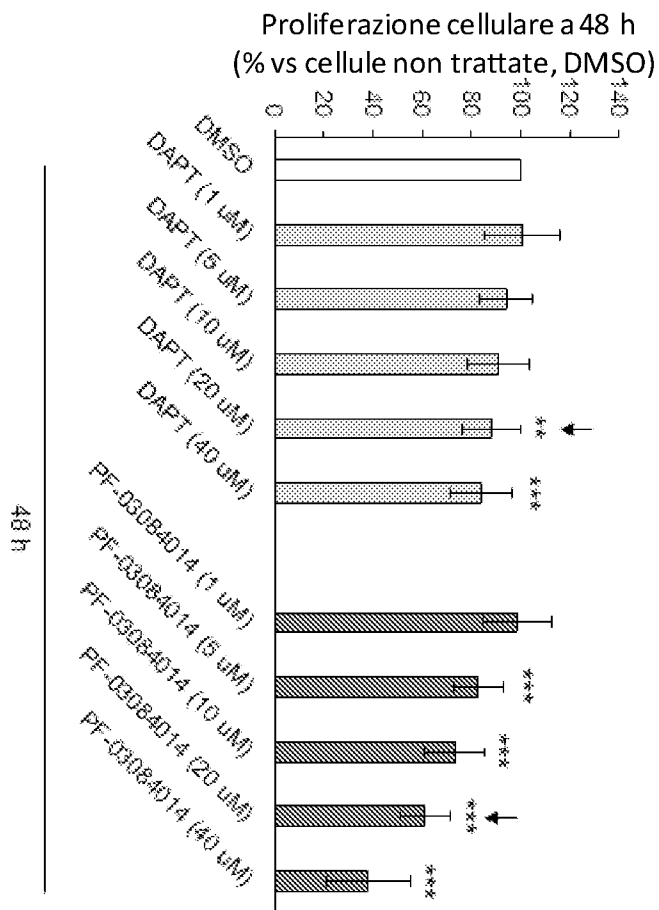
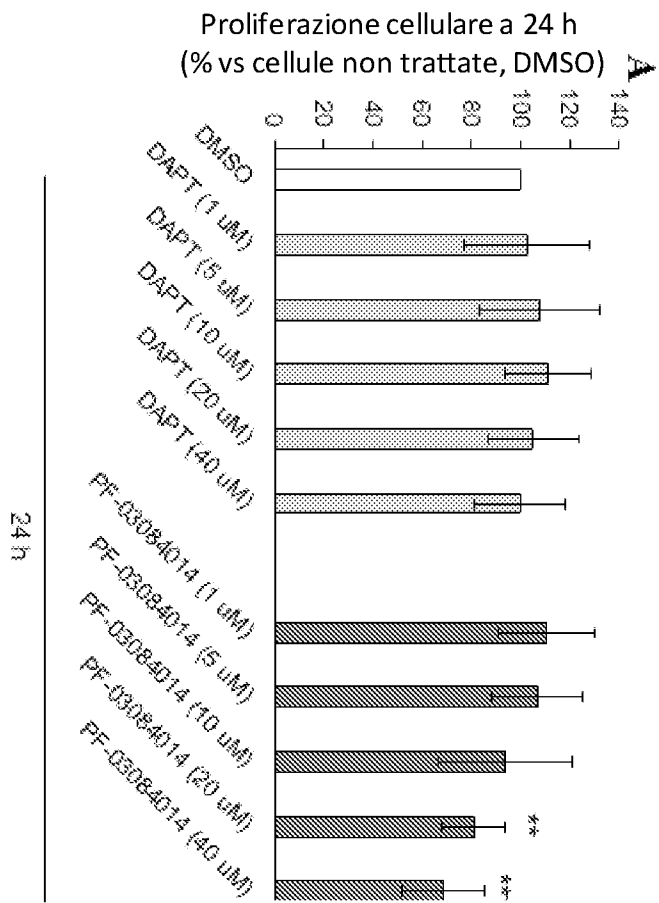


Fig. 1

B

Proliferazione cellulare
(% vs T0, 24 h dopo semina cellulare)

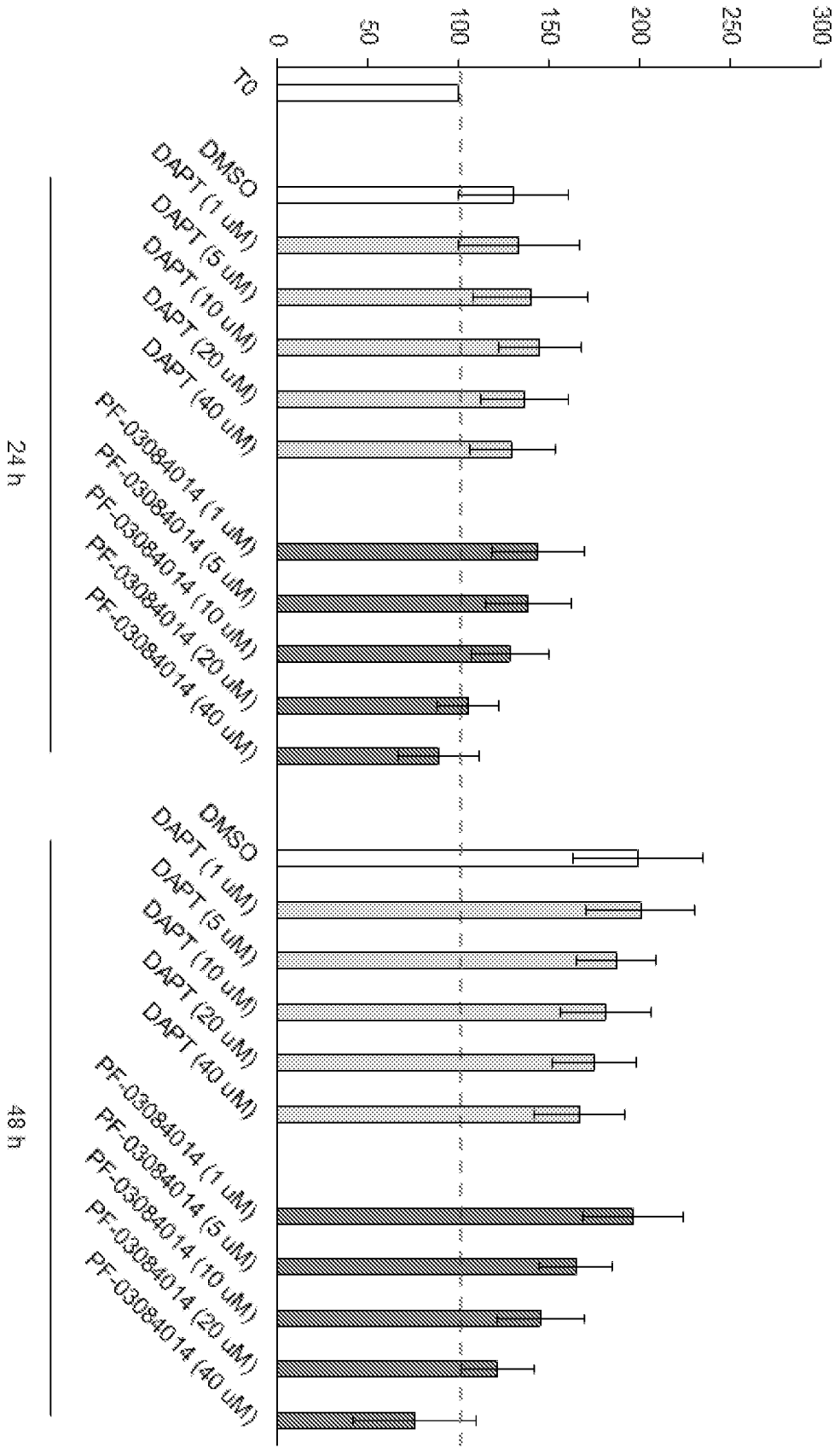


Fig. 1

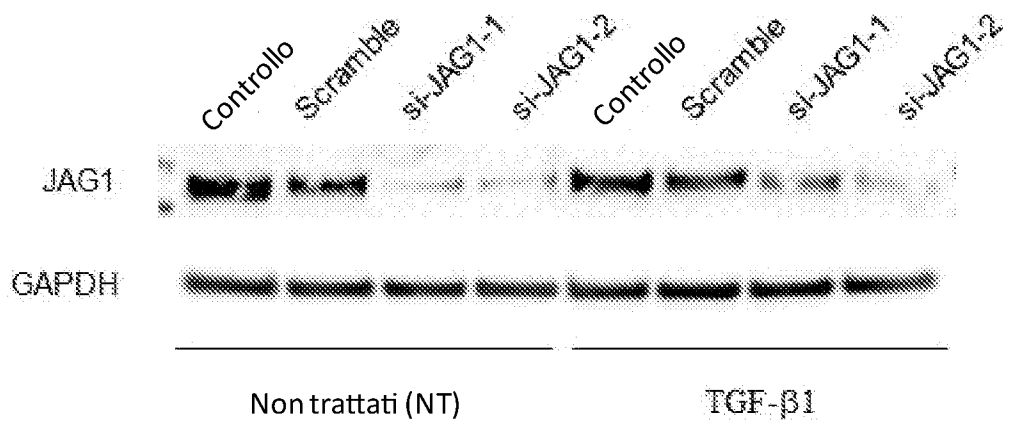


Fig.2

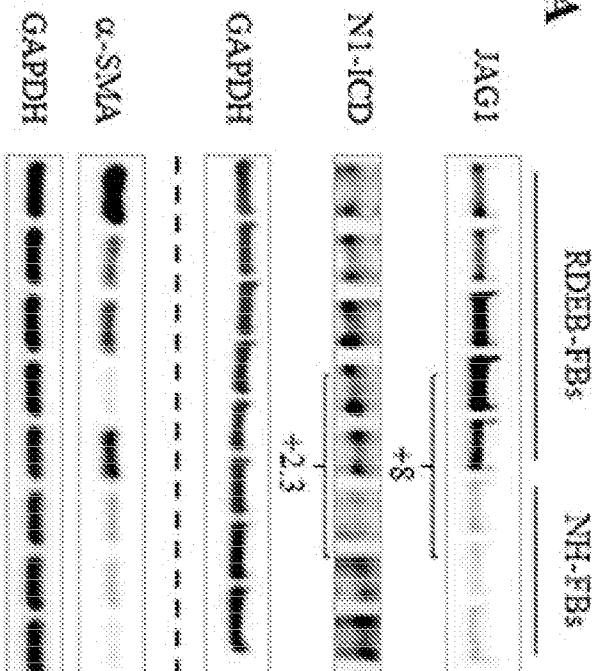
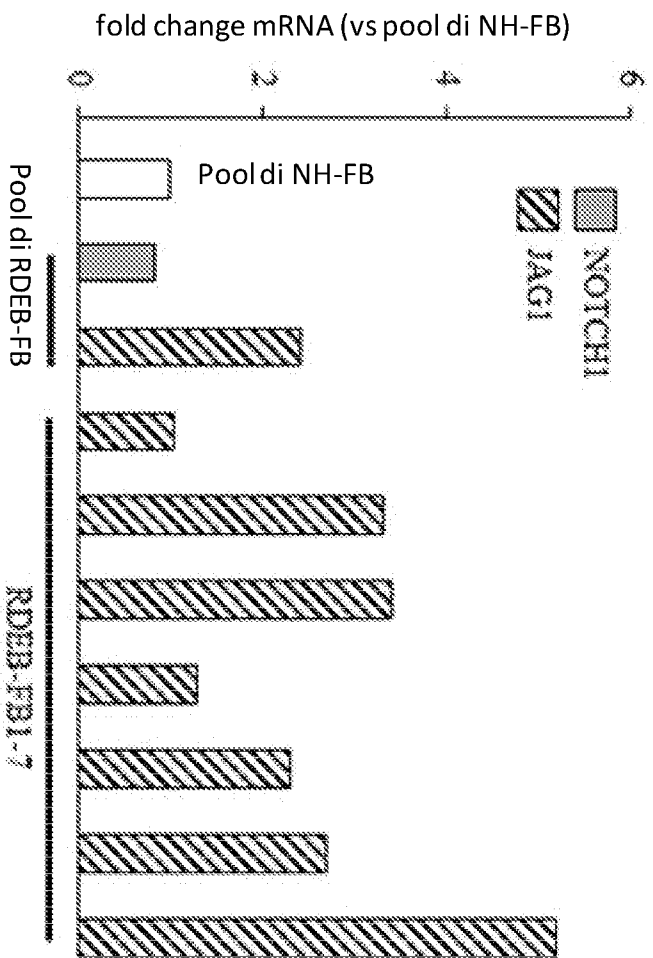
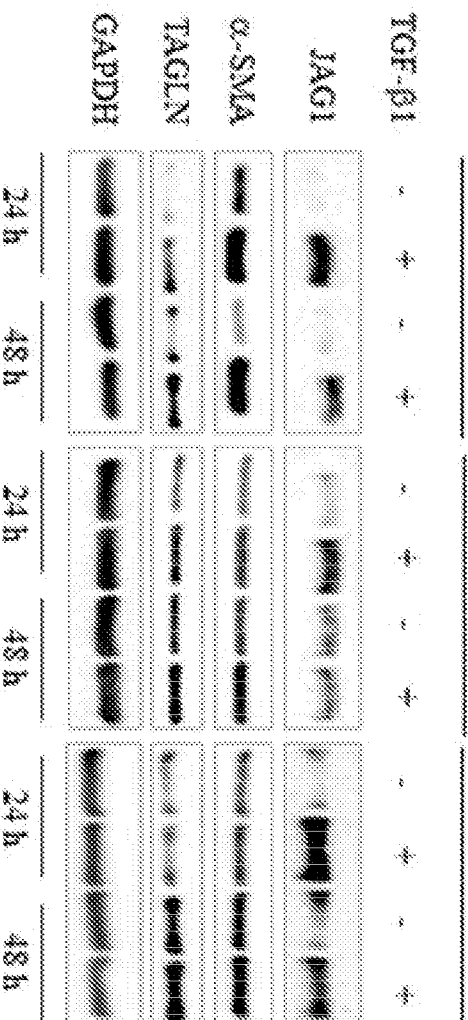
A**B****C**

Fig. 3

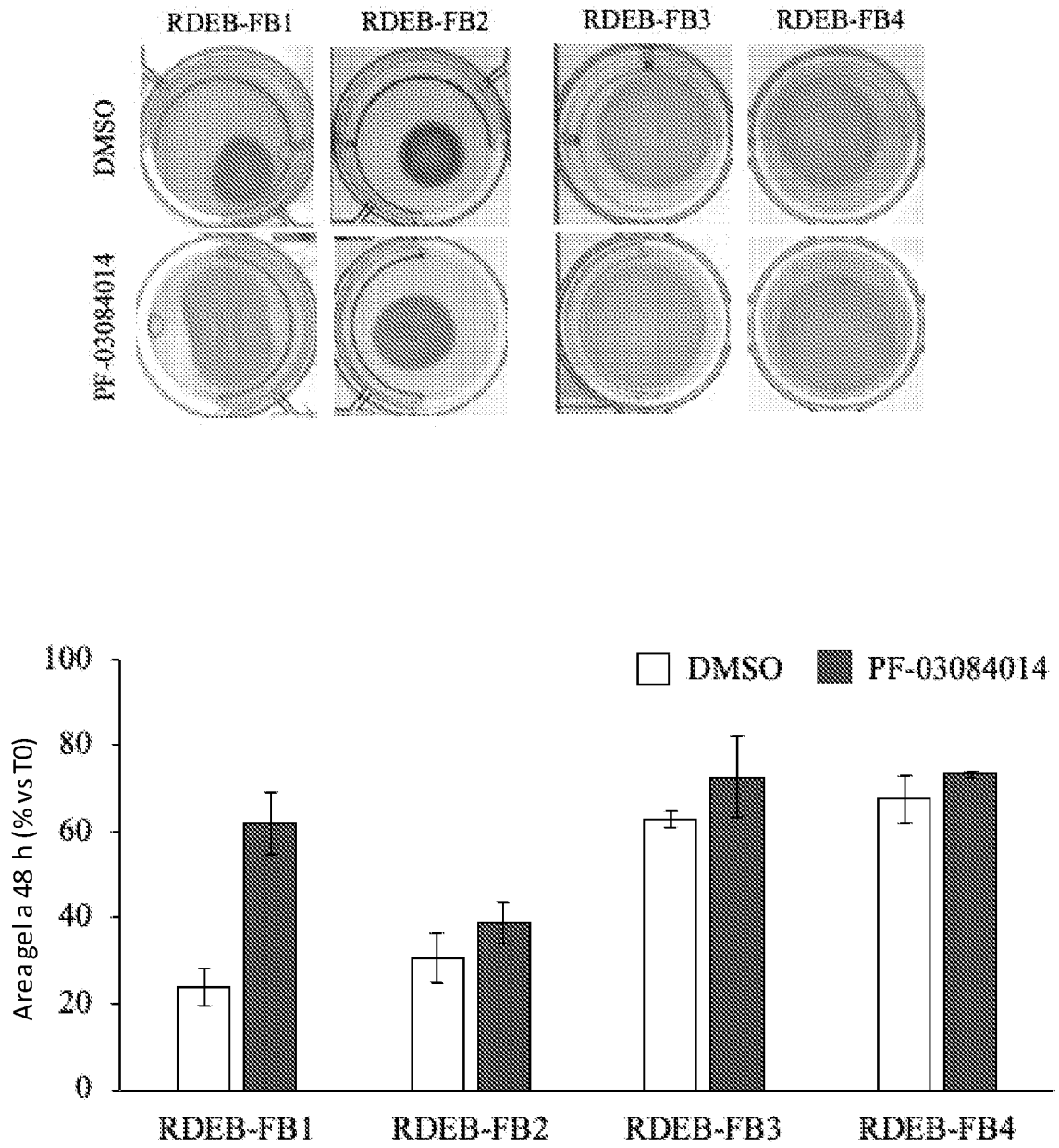


Fig.4

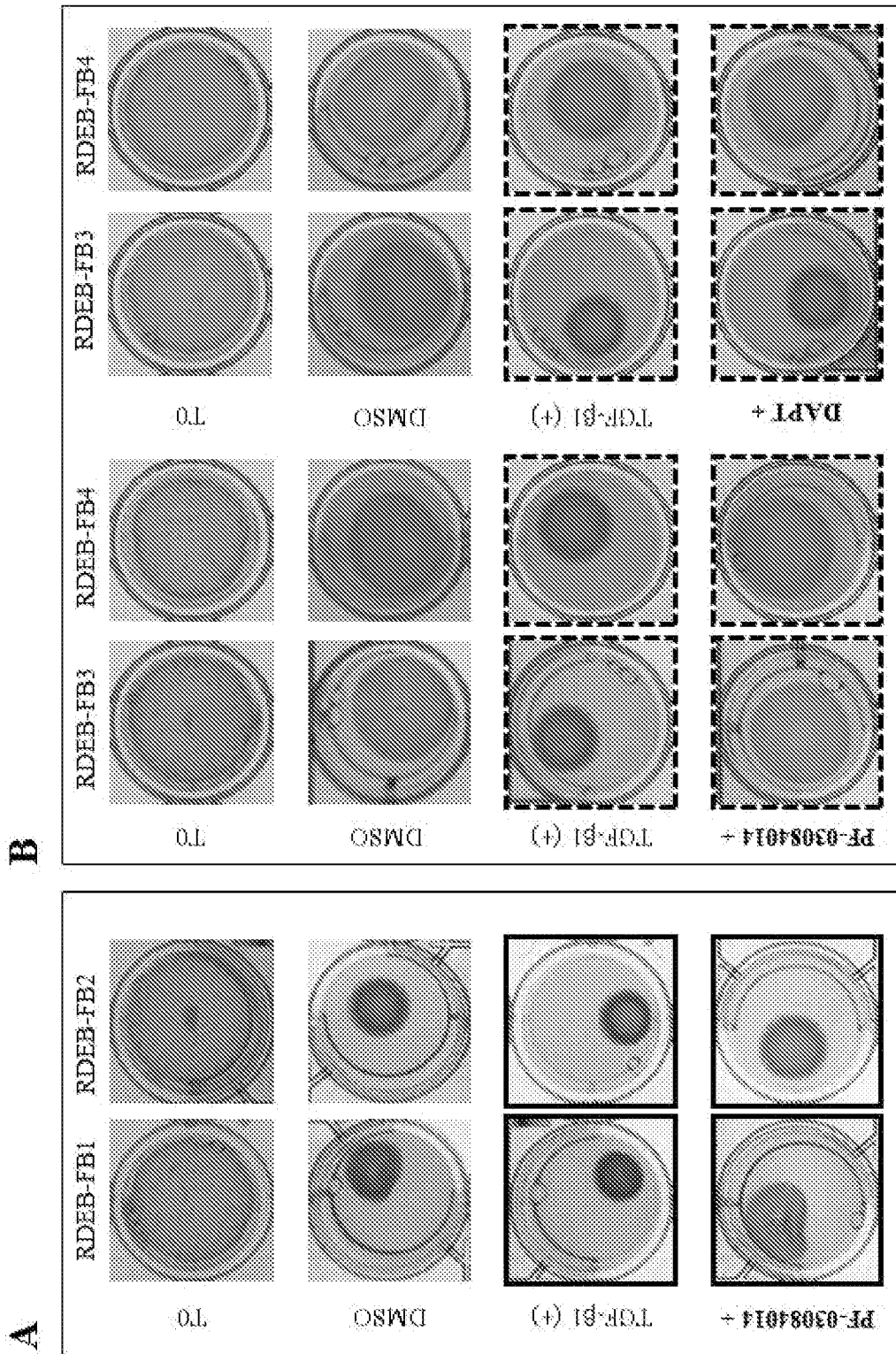


Fig.5

C

7/15

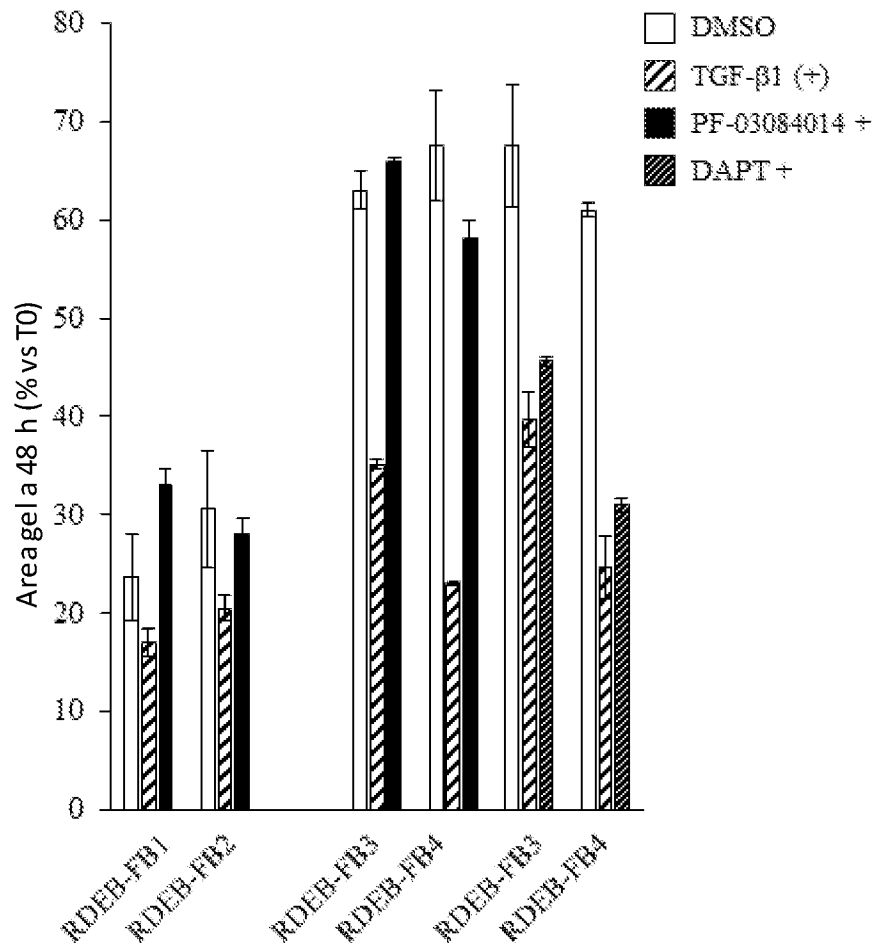
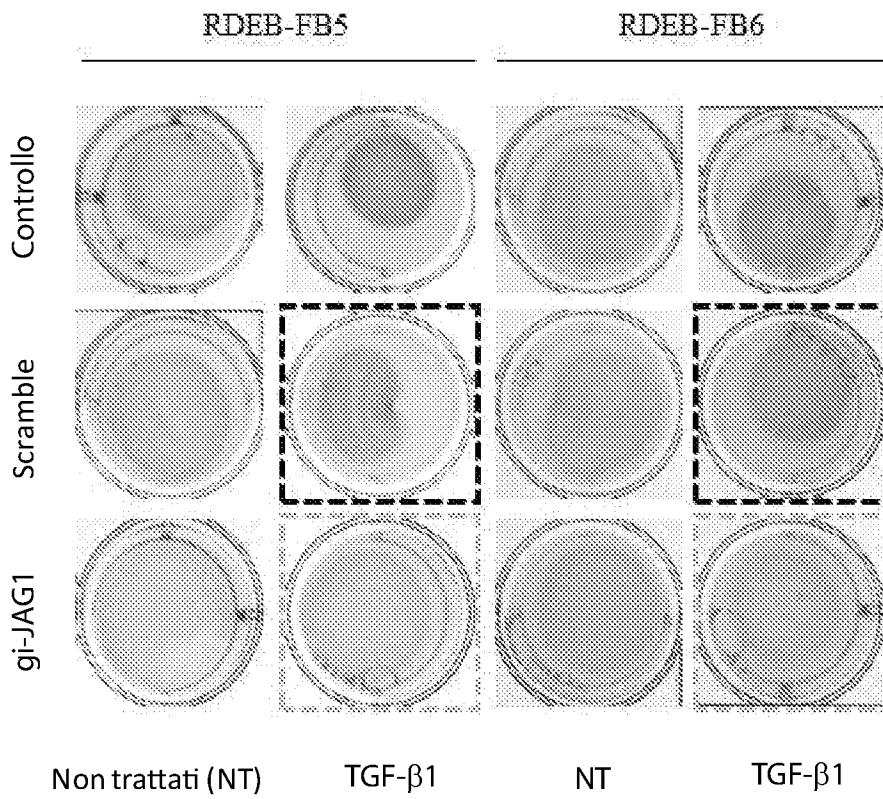
**D**

Fig.5

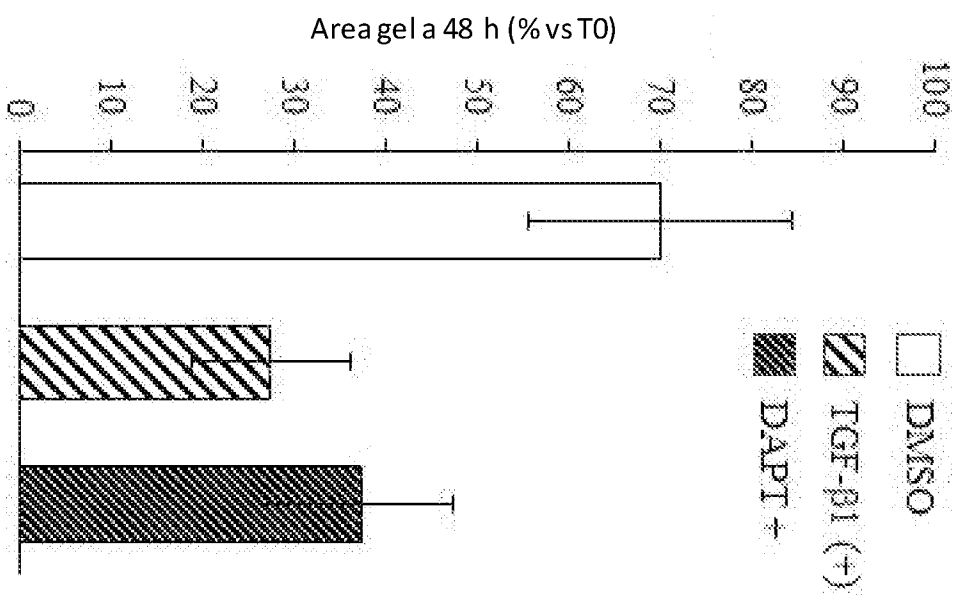
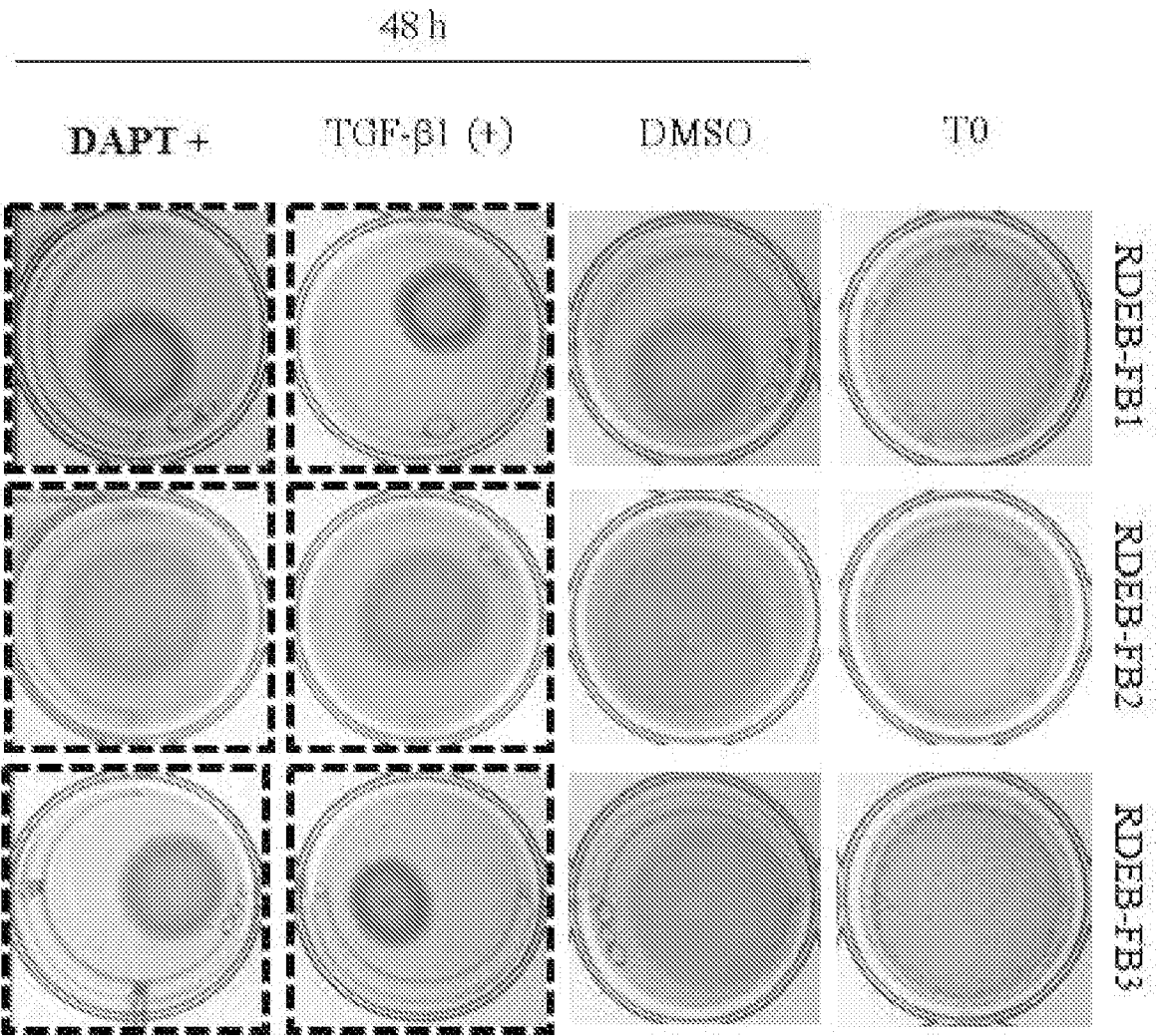


Fig.6

A

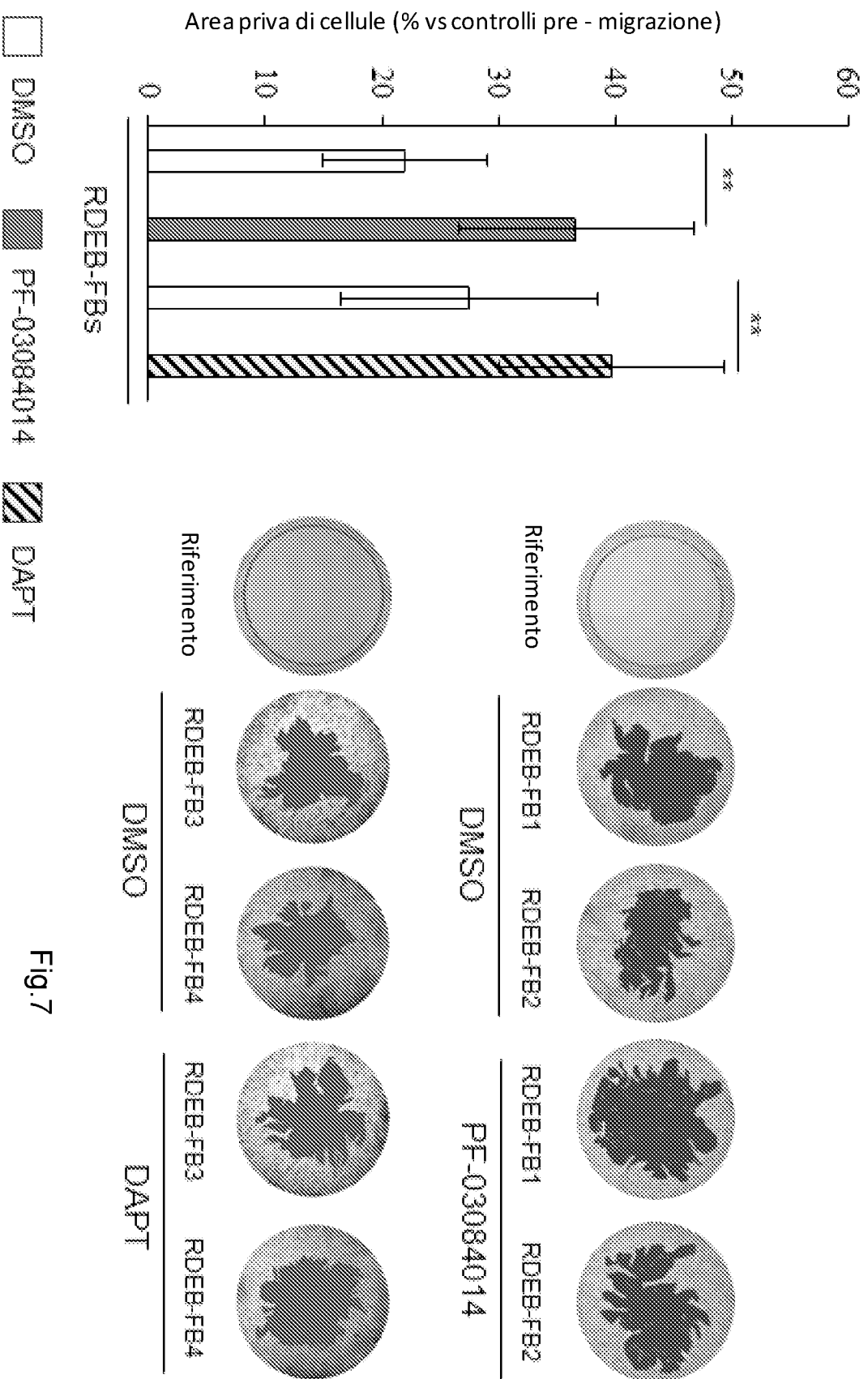


Fig. 7

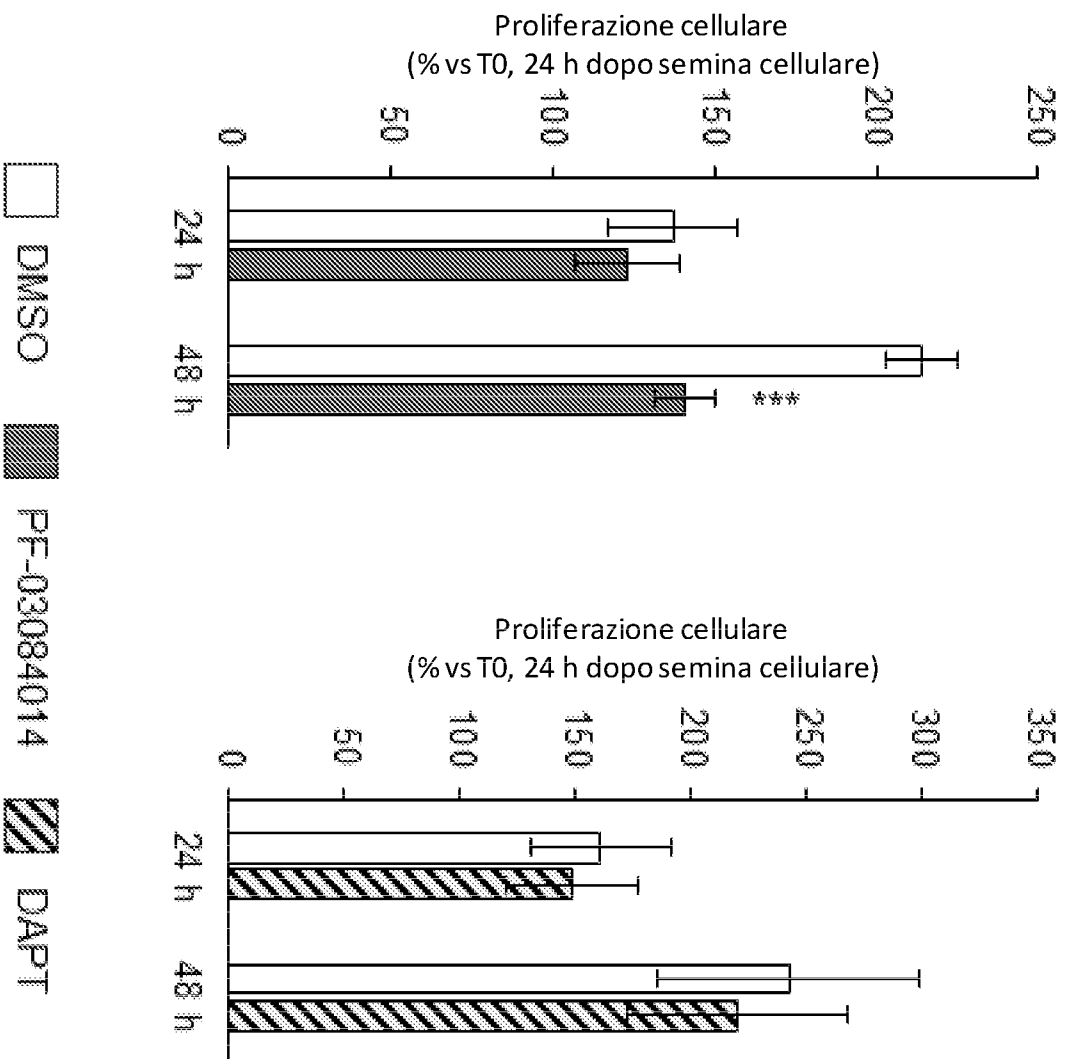
B

Fig.7

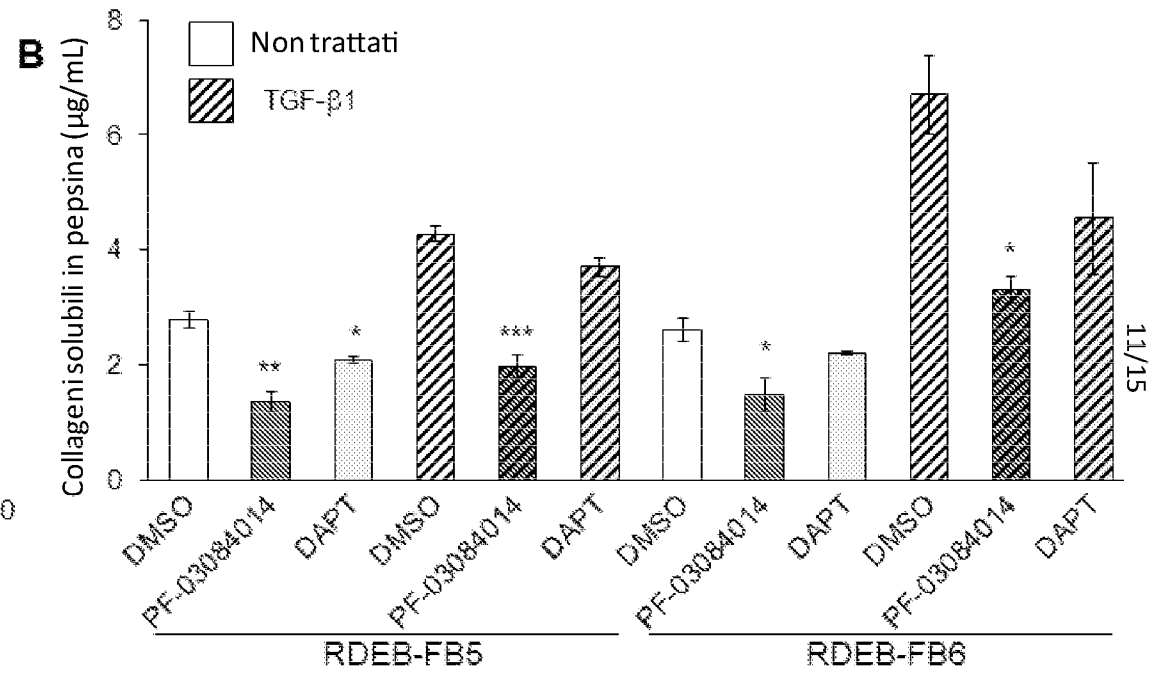
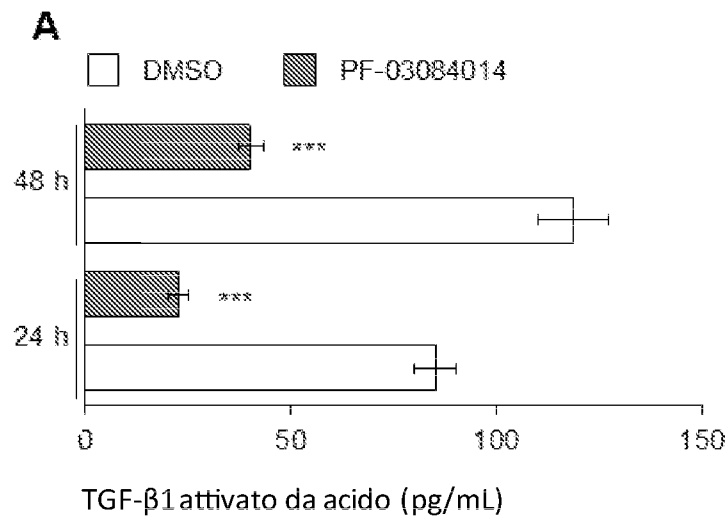


Fig.8

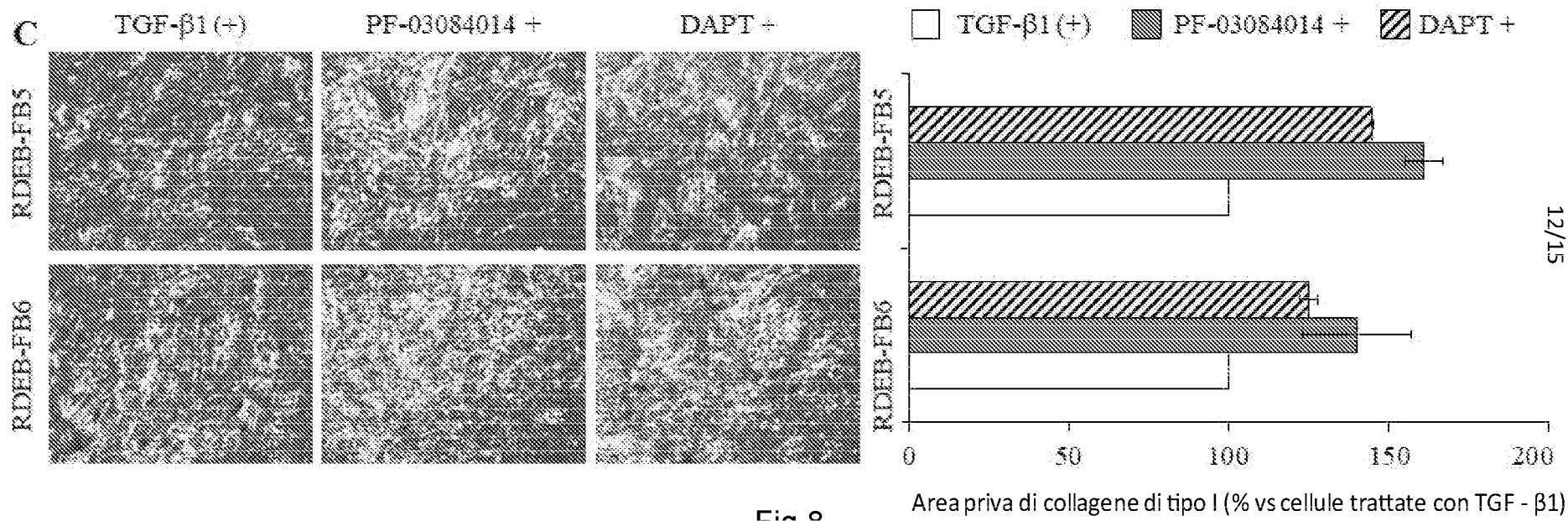


Fig.8

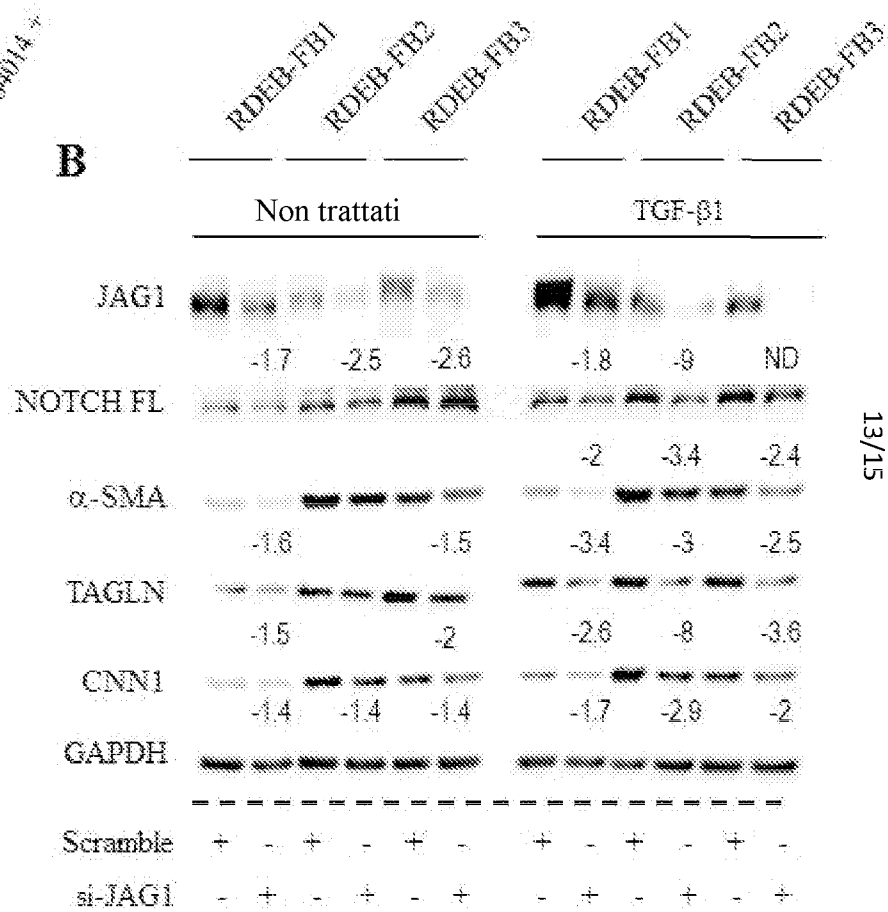
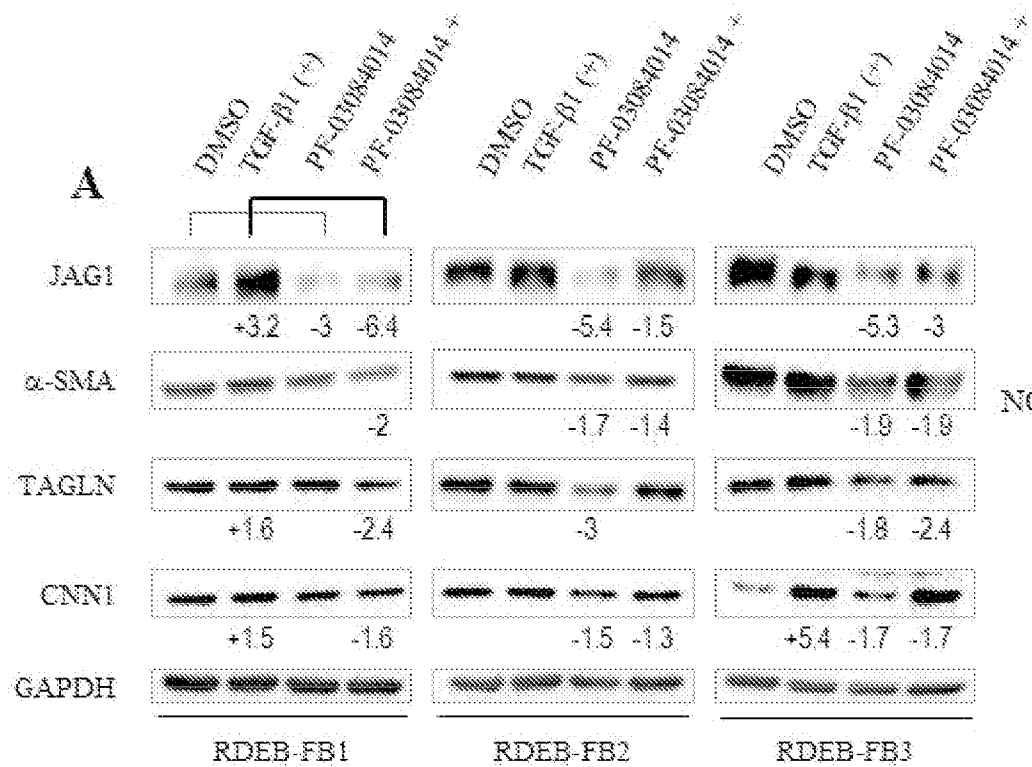


Fig.9

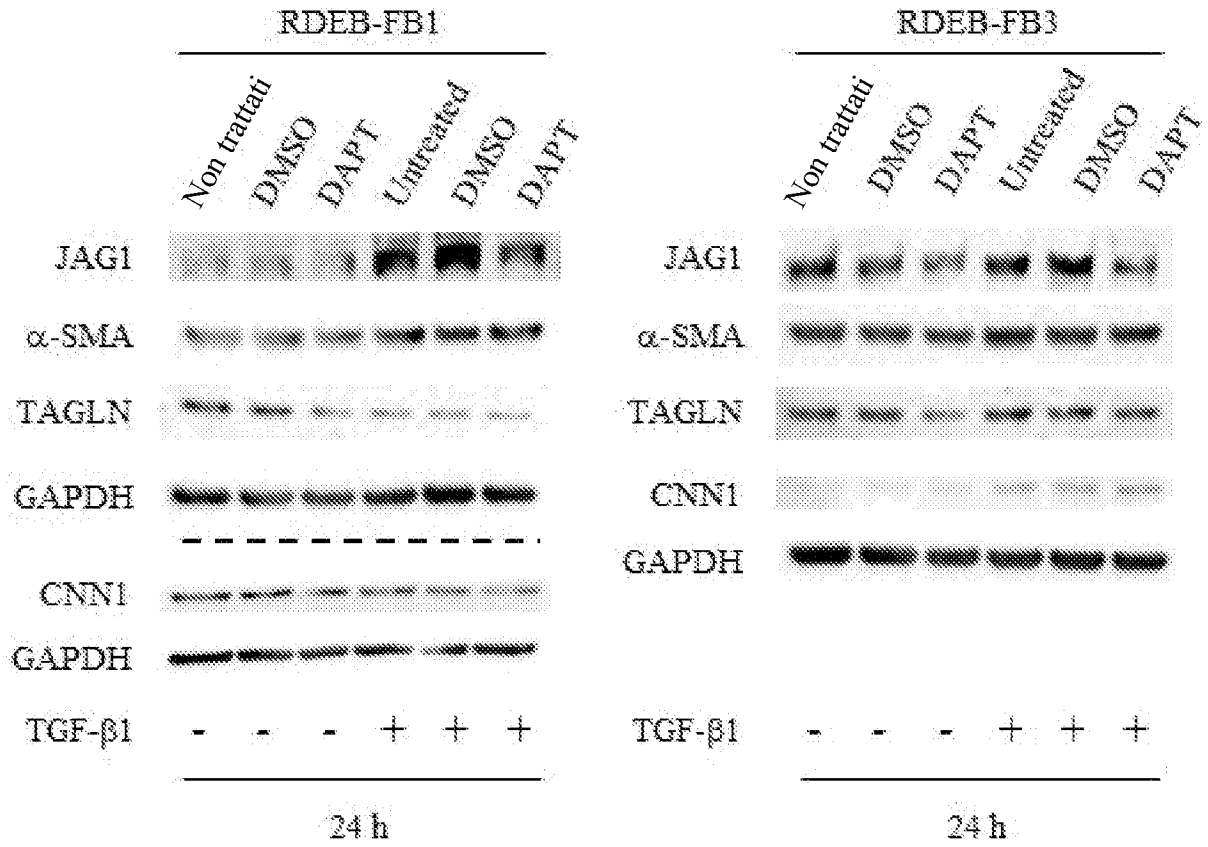


Fig.10