

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102022000007808
Data Deposito	20/04/2022
Data Pubblicazione	20/10/2023

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	31	445

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	P	25	28

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	P	31	12

Titolo

COMPOSIZIONI TERAPEUTICHE PER MALATTIE CAUSATE DA ACCUMULO DI EPARAN SOLFATO

11980M Descrizione del brevetto per invenzione industriale dal titolo:

FM/mc **“COMPOSIZIONI TERAPEUTICHE PER MALATTIE CAUSATE DA
ACCUMULO DI EPARAN SOLFATO”**

a nome: **1) PAVONE LUIGI MICHELE (35%)**

2) GUARAGNA ANNALISA (35%)

3) DE PASQUALE VALERIA (10%)

4) ESPOSITO ANNA (10%)

5) D'AGOSTINO MASSIMO (10%)

residenti in: 1. Viale Colli Aminei 36, 80131, Napoli;

2. Via San Giacomo dei Capri 82, 80131, Napoli;

3. Viale Colli Aminei 36, 80131, Napoli;

4. Via P. Castaldi L. Sequino 15, 80126, Napoli;

5. Via D. Tifatina 19, 81055, Santa Maria Capua Vetere (Caserta)

* * *

La presente invenzione ha per oggetto specifici imminozuccheri della serie sterica L e loro sali farmaceuticamente accettabili per uso nel trattamento e nella prevenzione di malattie causate da accumulo di eparan solfato, in particolare mucopolisaccaridosi, morbo di Alzheimer, neoplasie, infezioni virali.

SFONDO DELL'INVENZIONE

Le Mucopolisaccaridosi (MPS) sono malattie metaboliche ereditarie causate dall'assenza o dal difetto di enzimi lisosomiali necessari per il catabolismo dei glicosamminoglicani (GAG) eparan solfato (HS), dermatan solfato (DS), cheratan solfato (KS), condroitin solfato (CS) e acido ialuronico (HA) [Neufeld, E.F. and Muenzer, E.F. The mucopolysaccharidoses, in: Scriver, C.R. et al (Eds), The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases, McGraw-Hill, 2001, pp. 3421–3452]. La mancanza di questi

enzimi lisosomiali causa accumulo di GAG non degradati in diversi compartimenti cellulari e molteplici disfunzioni di organi e apparati, con manifestazioni cliniche distinte a seconda del tipo di enzima mancante e di GAG accumulato. Le MPS si classificano, pertanto, in undici diverse malattie (MPS I, II, IIIA, IIIB, IIIC, IIID, IVA, IVB, VI, VII e IX) a seconda dell'enzima lisosomiale deficitario ed in sette sottotipi se si considerano i prodotti di accumulo: MPS I-eparan e dermatan solfato; MPS II-eparan e dermatan solfato; per MPS III-eparan solfato; per MPS IV-cheratan solfato e condroitin 6-solfato; MPS VI-dermatan solfato; MPS VII-eparan solfato, dermatan solfato e condroitin 6-solfato; MPS IX-acido ialuronico. Il deposito dei GAG sulla membrana cellulare e all'interno dei lisosomi, insieme ad altri meccanismi patogenetici, porta a diverse conseguenze cliniche, con un'ampia variabilità fenotipica [Mehta, A. and Winchester, B. *Lysosomal Storage Disorders: A Practical Guide*, First Edition 2012]. I sintomi clinici tipici della malattia comprendono disturbi neurologici, disfunzioni cardiovascolari, difetti scheletrici, articolari, delle vie aeree, dell'udito e della vista, e morte nella seconda o terza decade di vita [Oussoren E. et al. (2011). *Biochim. Biophys. Acta* 1812, 1542; Schiattarella G.G. et al. (2015). *PLoS One* 10, e0131662; Costa, R. et al. (2017). *Hum. Mol. Genet.* 26, 1643; Bellettato, C.M. and Scarpa, M. J. (2010). *Inherit. Metab. Dis.* 33, 347].

Per i pazienti colpiti da MPS è fondamentale una diagnosi tempestiva e attualmente esistono poche opzioni terapeutiche con efficacia variabile e limitata [Hollak CEM, Wijburg FA. (2014) *J Inherit metab dis.* 37, 587]. Le attuali opzioni di trattamento per le MPS includono la terapia enzimatica sostitutiva (ERT), la terapia di riduzione del substrato, la terapia farmacologica con chaperoni molecolari, la terapia genica e il trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSCT) [Fecarotta, S. et al. (2018). *Ital. J. Pediatr.* 44, 124; Poswar, F. et al. (2017). *Expert Opin. Investig. Drugs* 26, 1331]. La maggior parte di queste strategie terapeutiche sono descritte in US2013302308, WO2012177778,

US8623910, US2012190642, US2011008810, EP2081023, KR100762945, KR20040084881, US8105788, US2009092996, WO02055064, RU2196988, RU2083205, JP2008102114, JP4965999, JP2003265196. Tali strategie terapeutiche presentano numerose limitazioni. In particolare, la terapia di sostituzione enzimatica, che è la più diffusa, non riesce a correggere tutti i difetti associati a tali patologie soprattutto con riferimento ai difetti del sistema nervoso centrale a causa dell'impossibilità degli enzimi ricombinanti di superare la barriera ematoencefalica. Il trattamento con cellule staminali risulta anch'esso inefficace, ma soprattutto di estrema pericolosità a causa del destino incerto cui tali cellule staminali possono andare incontro dopo la somministrazione nel paziente, ivi inclusa la possibilità che tali cellule acquisiscano un fenotipo tumorale. La terapia genica è tutt'oggi una metodica non utilizzata in clinica a causa dell'alta immunogenicità dei vettori utilizzati e dei pericoli dell'integrazione del genoma virale, seppur inattivo, nel genoma dei pazienti trattati. A causa delle limitazioni di tali strategie, la ricerca continua a concentrarsi sullo studio della fisiopatologia delle MPS e sull'identificazione di nuove strategie terapeutiche per le MPS.

Dal quadro di riferimento descritto si evince che le MPS non trovano ad oggi terapie del tutto adeguate a ridurre o eliminare i gravi sintomi dei pazienti affetti da tali malattie.

Nelle malattie MPS è stato testato l'uso potenziale di inibitori della biosintesi dei GAG [Fecarotta, S. et al. (2018). *Ital. J. Pediatr.* 44, 124; Poswar, F. et al. (2017). *Expert Opin. Investig. Drugs* 26, 1331]. Questo approccio comunemente indicato come "terapia di riduzione del substrato" (SRT) impiega piccole molecole che sono in grado di attraversare la barriera emato-encefalica, avendo così il potenziale di trattare il fenotipo neurologico della malattia. La prima molecola identificata come un potenziale farmaco per la SRT nei pazienti MPS con manifestazioni neurologiche è stata la genisteina, un isoflavone derivato dalla soia con somiglianza strutturale al 17 β -estradiolo, che inibisce la

sintesi dei GAG influenzando la via di segnalazione molecolare dipendente dal fattore di crescita epidermico (EGF) [Jakóbkiewicz-Banecka, J. et al. (2009). *J. Biomed. Sci.* 16, 26]. Tuttavia, la genisteina si è rivelata inefficace in trial clinici su pazienti affetti da MPS III. L'identificazione di nuove molecole che interferiscano con la sintesi dei GAG può fornire un utile strumento per migliorare il fenotipo neurologico nei pazienti affetti da MPS. D'altra parte, la manipolazione della sintesi dei GAG in diverse malattie è stata eseguita utilizzando xilosidi sintetici che riducono i GAG legati ai proteoglicani, soprattutto HS, modulando così le funzioni biologiche degli HSPG (HS proteoglicani) [Chua, J.S. and Kuberan, B. (2017). *Acc. Chem. Res.* 50, 2693].

A causa della capacità degli HSPG di regolare molteplici funzioni cellulari tra cui la proliferazione cellulare, la differenziazione, l'adesione, la migrazione, la sopravvivenza e la segnalazione, queste molecole complesse sono emerse come potenziali bersagli terapeutici per il trattamento di diverse malattie, tra cui il cancro, l'infiammazione, le infezioni, la chiusura delle ferite, le malattie polmonari, il morbo di Alzheimer e altre malattie [Varki, A. et al., *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2009].

Negli ultimi decenni, gli HSPG sono stati un intrigante oggetto di studio per le loro complesse caratteristiche strutturali, il loro meccanismo biosintetico finemente regolato e la vasta gamma di funzioni che svolgono negli organismi viventi dallo sviluppo all'età adulta. Da questi studi, sono emersi ruoli chiave degli HSPG nell'inizio e nella progressione dei tumori, tanto che attualmente vengono esplorati come potenziali biomarcatori e bersagli terapeutici per i tumori. La natura multiforme della struttura/attività degli HSPG si traduce nella loro capacità di agire come inibitori o promotori della crescita e dell'invasione tumorale a seconda del tipo di tumore. La deregolazione delle caratteristiche strutturali e funzionali degli HSPG con conseguente malignità può essere dovuta sia ad alterati livelli

di espressione sia a cambiamenti nella loro struttura e funzione come risultato dell'alterata attività dei loro enzimi biosintetici o modificatori. Infatti, nel microambiente tumorale, gli HSPG subiscono alterazioni strutturali attraverso l'allontanamento dell'ectodominio dei proteoglicani dalla superficie cellulare o la frammentazione e/o desolfatazione delle catene di HS, influenzando la funzione degli HSPG con un impatto significativo sulle interazioni molecolari tra le cellule tumorali e il loro microambiente, e il comportamento delle cellule tumorali stesse.

Tra le loro funzioni, gli HSPG aiutano molti virus a invadere le cellule ospiti in varie fasi del loro ciclo vitale. I virus utilizzano gli HSPG per l'attacco alla cellula ospite, l'internalizzazione, il traffico intracellulare, l'uscita e la diffusione. Recentemente, è stato stabilito il coinvolgimento degli HSPG nella patogenesi dell'infezione da SARS-CoV-2 [De Pasquale, V. et al. (2021). *Int J Mol Sci.* 22, 6574].

Il legame comune tra tutte le diverse cause della neuropatologia nel cervello del morbo di Alzheimer è l'accumulo precoce degli HSPG e glicosaminoglicani HS. Tutti questi eventi implicano ulteriormente HSPG /HS GAG come attori chiave nella patogenesi della neuropatologia nella malattia di Alzheimer.

Negli ultimi anni, gli imminozuccheri hanno mostrato un notevole potenziale farmacologico nella gestione dei disordini da accumulo lisosomiale (LSD) come risultato della loro capacità di interagire con gli enzimi coinvolti nei processi di elaborazione dei carboidrati [Nash, R.J. et al. (2011). *Future Med. Chem.* 3, 1513; Platt, F.M. et al. (2018). *Nat. Rev. Dis. Prim.* 4, 27; Compain, P.; Martin, O. (2007). "Iminosugars: From Synthesis to Therapeutic Applications" (John Wiley & Sons, Ltd); Butters, T.D. et al. (2003), *Curr. Top. Med. Chem.* 3, 561]. In particolare, questi glicomimetici hanno trovato applicazione nel trattamento delle LSD sia inibendo l'accumulo di substrati nei lisosomi (terapia di riduzione del substrato, SRT) [Platt, F.M. and Jeyakumar, M. (2008). *Acta Paediatr.* 97,

88; Coutinho, M.F. et al. (2016), *Int. J. Mol. Sci.* *17*, 1065], sia per la loro capacità di legare in modo reversibile e a concentrazioni sub-inibitorie le glicosidasi lisosomiali migliorando la funzione degli enzimi mutanti (chaperoni molecolari) [Sánchez-Fernández, E.M., et al. (2016) *Chem. Commun.* *52*, 5497; Cox, T.M. et al., (2008) “Medicinal use of Iminosugars” in “Iminosugars: From Synthesis to Therapeutic Applications” (John Wiley & Sons, Ltd), pp. 295–326].

Due imminozuccheri hanno raggiunto il mercato per la terapia delle LSD, il Miglustat, noto anche come NBDNJ, autorizzato per il trattamento della malattia di Gaucher di tipo I [Cox, T.M. et al. (2000). *The Lancet* *355*, 1481] e della malattia di Niemann-Pick di tipo C (come terapia SRT) [Pineda, M. et al. (2018). *Orphanet J. Rare Dis.* *13*, 140] e il Migalastat, noto anche come DGJ, l'unico chaperone farmacologico attualmente approvato e utilizzato per la terapia della malattia di Fabry [Benjamin, E.R. et al. (2009). *J. Inherit. Metab. Dis.* *32*, 424; Markham, A. (2016) *Drugs* *76*, 1147]. Oltre a questi imminozuccheri, una varietà di altri derivati è stata valutata per il loro uso come candidati farmaci in diverse LSD, compresa la malattia di Pompe e la MPS [Parenti, G. et al. (2021). *EMBO Mol. Med.* *13*, e12836; Díaz, J.C.L. et al. (2020), *Int. J. Mol. Sci.* *21*, 1].

In questo contesto è stata osservata un'attività promettente per alcuni imminozuccheri come chaperoni farmacologici per il trattamento della MPS II, III e IV [Zhu, S. et al. (2021). *Chem. - A Eur. J.* *27*, 11291; Fantur, K. et al. (2010). *Mol. Genet. Metab.* *100*, 262; Thonhofer, M. et al. (2016). *Carbohydr. Res.* *429*, 71; Takai, T. et al. (2013). *Mol. Ther.* *21*, 526].

Inoltre, un'interessante applicazione degli imminozuccheri nelle MPS riguarda l'ipotesi che l'immagazzinamento secondario dei gangliosidi possa rappresentare un bersaglio terapeutico nei pazienti con coinvolgimento neurologico. Su queste basi,

l'imminozucchero NBDNJ (Miglustat) è stato valutato come agente di riduzione del substrato per la MPS di tipo III grazie alla sua capacità di interferire con il metabolismo dei glicosfingolipidi [Fecarotta, S. et al. (2018). *Ital. J. Pediatr.* *44*, 124].

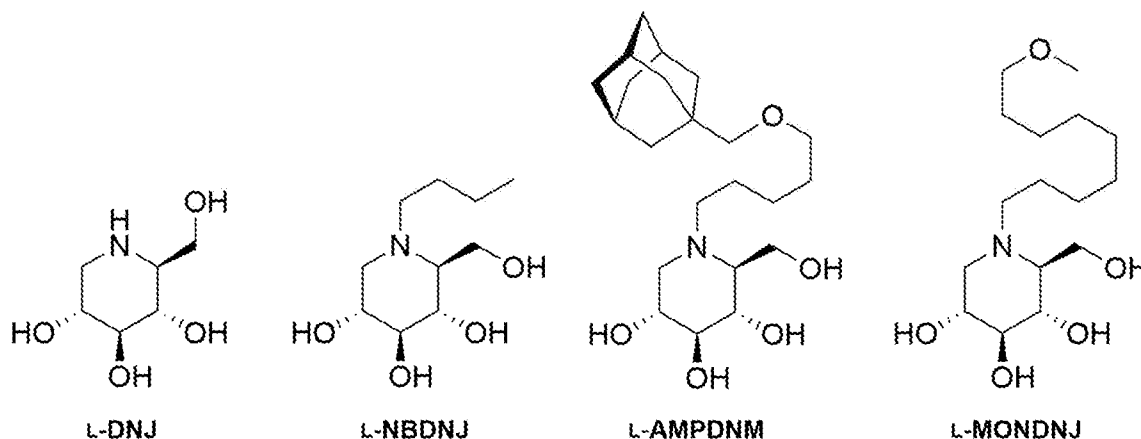
Tuttavia, nonostante i promettenti risultati ottenuti negli studi preclinici [Kaidonis, X. et al. (2016). *Mol Gen. Metab.* *118*, 110], non sono stati osservati effetti benefici nei pazienti affetti da MPS III trattati con NBDNJ (Miglustat) [Guffon, N. et al. (2011). *J. Pediatr.* *159*, 838]. Questi dati suggeriscono chiaramente che gli imminozuccheri rappresentano candidati interessanti per i trattamenti delle MPS.

Nell'ambito di studi volti ad esplorare il ruolo della chiralità sull'attività farmacologica degli imminozuccheri e di altri composti bioattivi [Esposito, A. et al. (2020). *Chem. – A Eur. J.* *26*, 2597; Esposito, A. et al. (2020) *Mar. Drugs* *18*, 572; Esposito, A. et al., (2019) *RSC Adv.* *9*, 21519] è stato recentemente evidenziato un potenziale molto promettente degli L-imminozuccheri nel trattamento delle malattie rare. In particolare, L-NBDNJ, (l'enantiomero di NBDNJ) ha mostrato un interessante potenziale come candidato per la terapia combinata della malattia di Pompe, senza funzionare come inibitore della maggior parte delle glicosidasi, diversamente dal suo D-enantiomero [D'Alonzo, D. et al. (2017). *J. Med Chem.* *60*, 9462].

Risultati ancora più interessanti sono stati ottenuti quando gli L-imminozuccheri sono stati considerati per l'applicazione nella Fibrosi Cistica (FC) [Esposito, A. et al. (2020). *Int. J. Mol. Sci.* *21*, 3353]. Infatti, L-NBDNJ e i suoi congeneri hanno mostrato proprietà antinfiammatorie e antibatteriche *in vitro* e *in vivo*, evidenziando il potenziale di questi composti come candidati terapeutici per il trattamento della malattia polmonare da FC [De Fenza, M. et al. (2019). *Eur. J. Med. Chem.* *175*, 63; De Gregorio, E. et al. (2020). *Antibiotics* *9*, 362].

DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

Si è ora trovato che gli L-imminozuccheri aventi le formule di struttura riportate di seguito, contraddistinti dalle sigle L-DNJ, L-NBDNJ, L-AMPDNM e L-MONDNJ e i loro sali farmaceuticamente accettabili presentano una marcata attività di inibizione dell'accumulo di eparan solfato e sono pertanto utili per il trattamento delle mucopolisaccaridosi di tipo I, II, III o VII e loro sottotipi, in particolare la sindrome di Sanfilippo e i suoi sottotipi A, B, C e D, nonché per il trattamento di altre condizioni legate all'accumulo di eparan solfato quali il morbo di Alzheimer, le neoplasie e le infezioni virali.



La sintesi del composto L-NBDNJ (N-butil-L-deossinojirimicina, l'enantiomero non naturale di Miglustat) è descritta da D'Alonzo D. et al. (2017). *J. Med. Chem.* *60*, 9462; L-NBDNJ è suggerito come possibile farmaco per la terapia combinata della malattia di Pompe.

La sintesi degli L-imminozuccheri L-DNJ (enantiomero non naturale di deossinojirimicina o Duvoglustat) e L-AMPDNM (N-adamantanometossipentil L-DNJ) è descritta da D'Alonzo D. et al. (2017). *J. Med. Chem.* *60*, 9462 e De Fenza M. et al. (2019). *Eur. J. Med. Chem.* *175*, 63.

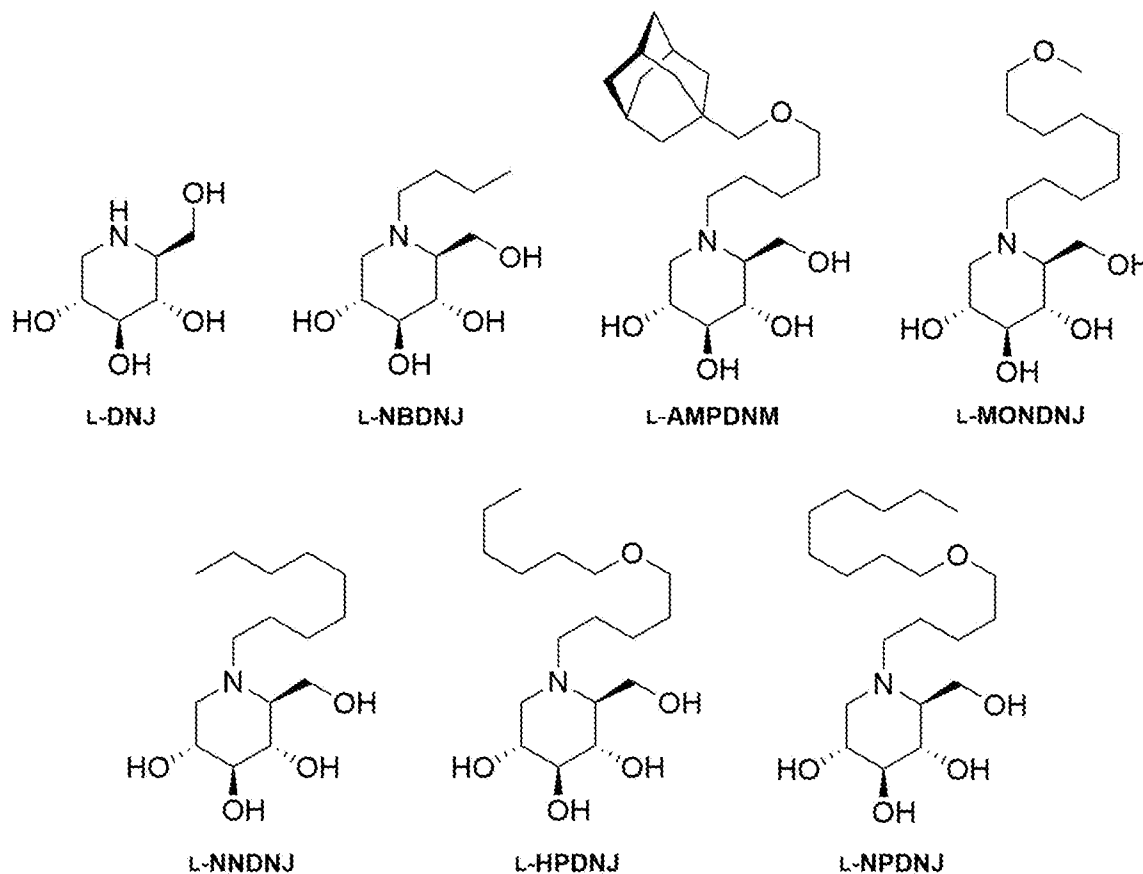
Il composto L-MONDNJ (N-metossinonil L-DNJ) è nuovo e costituisce un ulteriore oggetto dell'invenzione.

Per i previsti impieghi terapeutici, gli imminozuccheri L-DNJ, L-NBDNJ, L-AMPDNM e L-MONDNJ o i loro sali farmaceuticamente accettabili saranno formulati in composizioni farmaceutiche adatte alla somministrazione orale o parenterale, ad esempio capsule, compresse, soluzioni e simili, contenenti opportuni eccipienti.

Il dosaggio sarà determinato dagli specialisti in base alle condizioni, peso, sesso ed età del paziente oltre che ovviamente delle caratteristiche farmacocinetiche e tossicologiche dei composti. In linea di massima, il dosaggio potrà essere simile a quello dei farmaci già in uso (Miglustat e Migalastat), ad esempio da 10 a 1000 mg al giorno, in una o più somministrazioni.

L'attività farmacologica riscontrata per i composti L-DNJ, L-NBDNJ, L-AMPDNM e L-MONDNJ o per i loro sali farmaceuticamente accettabili è da ritenersi sorprendente in considerazione del fatto che altri imminozuccheri strutturalmente simili (composti L-NNDNJ, L-HPDNJ e L-NPDNJ le cui formule sono riportate di seguito), valutati nelle stesse condizioni, sono risultati per nulla attivi.

Di seguito le formule di struttura dei composti secondo l'invenzione e dei composti di confronto.



L'invenzione è descritta in maggior dettaglio nella seguente parte sperimentale.

ESEMPIO 1: Sintesi di L-MONDNJ (N-metossinonil L-DNJ) e del corrispondente cloridrato.

Fase a: Sintesi di 1,9-diiodiononano. Lo iodio (2,6 g, 10,2 mmol) è stato aggiunto a una sospensione in agitazione di trifetilfosfina polimerica (PS-TPP; 100–200 mesh, ~ 3 mmol/g di trifetilfosfina) (3,4 g, 10,5 mmol) in diclorometano anidro (25 mL) in atmosfera di argon. Dopo 10 minuti, alla sospensione è stato aggiunto 1,9-nonandiolo (0,41 g, 2,56 mmol) e la reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 1 ora. Successivamente la sospensione è stata filtrata per rimuovere l'ossido di trifetilfosfina ancorato al polimero, lavando con diclorometano. Il filtrato è stato lavato con Na₂S₂O₃ saturo, con una soluzione saturo di NaCl ed estratta con diclorometano. La fase organica è stata anidrificata (Na₂SO₄) ed evaporata sotto pressione ridotta, fornendo il desiderato 1,9-diiodiononano (olio, 0,9 g, resa 95%). ¹H NMR (400 MHz,

CDCl₃): δ 1.21-1.47 (m, 10H), 1.76-1.88 (m, 4H), 3.19 (t, J = 7,0 Hz, 4H). In questa reazione la sostituzione della trifenilfosfina polimerica con la trifenilfosfina porta a risultati analoghi in termini di tempo e resa di reazione; tuttavia, questa procedura richiede uno step di purificazione mediante precipitazione dell'ossido di trifenilfosfina o attraverso cromatografia.

Fase b: Sintesi di 1-iodo-9-metossinonano. NaH (dispersione al 60% in olio minerale, 0,10 g, 2,55 mmol) è stato aggiunto sotto agitazione magnetica a una soluzione di metanolo (0,12 mL, 2,95 mmol) in THF anidro (3,5 mL) a 0 °C e sotto atmosfera di argon. La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione alla stessa temperatura per 1 ora; quindi, è stata aggiunta una soluzione di 1,9-diiodononano (0,75 g, 1,95 mmol) in THF (3,5 mL). La soluzione è stata portata a temperatura ambiente e agitata per 48 ore alla stessa temperatura. Successivamente, è stato aggiunto diclorometano e la soluzione lavata con NH₄Cl acquoso prima ed una soluzione satura di NaCl poi. La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ ed il solvente evaporato sotto pressione ridotta. La cromatografia del residuo grezzo su gel di silice (esano:EtOAc = 95:5) ha fornito 1-iodo-9-metossinonano puro (olio, 0,42 g, resa 75%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.21-1.47 (m, 8H), 1.51-1.63 (m, 4H), 1.76-1.88 (m, 2H), 3.19 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 3.30 (s, 3H), 3.36 (t, J = 6.6 Hz, 2H).

Fase c: Sintesi di L-MONDNJ (N-metossinonil L-DNJ). Ad una soluzione di L-DNJ (0,20 g, 1,22 mmol) in DMF anidro (4 mL) sotto agitazione magnetica, è stato aggiunto K₂CO₃ (0,5 g, 3,6 mmol) a temperatura ambiente sotto atmosfera di argon. Una soluzione di 1-iodo-9-metossinonano (0,42 g, 1,46 mmol) in DMF (4,0 mL) è stata aggiunta goccia a goccia e la miscela di reazione è stata riscaldata a 80°C e agitata per 16 ore. Il solvente è stato quindi rimosso sotto pressione ridotta e cromatografato su gel di silice (acetone:MeOH = 8:2) per fornire L-MONDNJ puro.

Fase d: Preparazione di L-MONDNJ·HCl (N-metossinonil L-DNJ·HCl).

Il cloridrato L-MONDNJ·HCl è stato ottenuto mediante aggiunta di HCl 1M (1,22 mmol) seguita da evaporazione sotto pressione ridotta (0,30 g, resa 75%). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 1.28-1.49 (m, 10H), 1.52-1.63 (m, 2H), 1.67-1.88 (m, 2H), 2.95-3.11 (m, 2H), 3.13-3.27 (m, 1H), 3.31 (s, 3H), 3.40 (t, J = 6.5 Hz, 4H), 3.47 (dd, J = 4.9, 11.8 Hz, 1H), 3.61 (t, J = 11.8 Hz, 1H), 3.65-3.77 (m, 1H), 3.91 (d, J = 11.6 Hz, 1H), 4.14 (d, J = 11.6 Hz, 1H).

ESEMPIO 2: Il trattamento con L-deossimminozuccheri (L-DNJ, L-NBDNJ, L-AMPDNM e L-MONDNJ) sotto forma di cloridrato innesca la riduzione dei difetti lisosomiali nelle cellule modello della malattia di Sanfilippo B (MPS IIIB).

Per studiare gli effetti di nuovi trattamenti sulle disfunzioni lisosomiali in un modello neuronale della malattia di Sanfilippo B (MPS IIIB), abbiamo recentemente generato cloni stabili della linea cellulare di neuroblastoma umano SK-NBE silenziati per il gene NAGLU causativo della MPS IIIB [De Pasquale V, et al. (2021). *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 1868, 119113.]. Imitando le caratteristiche della malattia di Sanfilippo B, il silenziamento di NAGLU causa accumulo di eparan solfato e accumulo di lisosomi nel citoplasma dei cloni stabili SK-NBE rispetto al clone di controllo (WT).

Pertanto, il clone silenziato per NAGLU (cl5) e il clone controllo (WT) sono stati selezionati per testare l'effetto di L-deossimminozuccheri (L-DNJ, L-NBDNJ, L-NNDNJ, L-HPDNJ, L-NPDNJ, L-AMPDNM e L-MONDNJ) nella forma di cloridrato sul fenotipo lisosomiale del nostro modello cellulare di Sanfilippo B (MPS IIIB).

Il clone 5 è stato coltivato in presenza di 20 μM di ogni L-deossimminozuccherio in condizioni di crescita normali e dopo 48 ore è stato valutato l'accumulo lisosomiale con tecnica di immunofluorescenza per la proteina specifica dei lisosomi Lamp1. Il clone 5 non trattato mostra strutture lisosomiali positive Lamp1 allargate all'interno del citoplasma rispetto al clone controllo WT (**Tabella 1**). Il trattamento con i composti L-DNJ,

L-NBDNJ, L-AMPDNM e L-MONDNJ causa una drastica riduzione dell'ingrossamento e dell'accumulo lisosomiale nel clone 5 (cl5) sistema modello della Sanfilippo B (MPS IIIB) (**Tabella 1**). Inoltre, la distribuzione dei lisosomi all'interno delle cellule non è più concentrata nella regione perinucleare, come precedentemente descritto in diverse malattie lisosomiali, ma fisiologicamente distribuita in tutto il citoplasma. È interessante notare che gli L-deossiminiozuccheri L-NNDNJ, L-HPDNJ e L-NPDNJ non hanno mostrato alcuna attività sul fenotipo lisosomiale del clone 5 (cl5) modello della Sanfilippo B (**Tabella 1**).

Tabella 1

	Cellule positive per Lamp1 (%)		Intensità relativa di fluorescenza di Lamp1	
	WT	cl5	WT	cl5
mock	3,5	88	1,00	2,01
L-DNJ·HCl	2,8	25	1,00	0,95
L-NBDNJ·HCl	2,6	20	1,07	0,97
L-AMPDNM·HCl	2,5	18	1,08	0,99
L-MONDNJ·HCl	2,4	21	1,05	1,00
L-NNDNJ·HCl	4,1	85	1,04	2,70
L-HPDNJ·HCl	4,8	87	1,00	2,10
L-NPDNJ·HCl	3,7	84	1,10	2,65

La distribuzione fisiologica dei lisosomi all'interno del citoplasma nelle cellule trattate con L-DNJ, L-NBDNJ, L-AMPDNM e L-MONDNJ è stata più evidente confrontando questi risultati con l'immunofluorescenza per la proteina Lamp1 nel clone normale di controllo WT.

Il trattamento con uno qualsiasi dei sette L-imminozuccheri non ha causato alcun cambiamento nelle dimensioni e nella distribuzione lisosomiale delle cellule modello non malate WT.

Nel complesso, questi risultati mostrano per la prima volta che il trattamento con gli L-imminozuccheri specificamente selezionati (L-DNJ, L-NBDNJ, L-AMPDNM e L-MONDNJ) è in grado di curare i difetti lisosomiali in un modello cellulare della malattia di Sanfilippo B (MPS IIIB).

ESEMPIO 3: Il trattamento con L-deossimminozuccheri (L-DNJ, L-NBDNJ, L-AMPDNM e L-MONDNJ) sotto forma di cloridrato innesca la riduzione dell'accumulo di HS nelle cellule modello della malattia di Sanfilippo B (MPS IIIB).

Il clone 5 è stato coltivato in presenza di 20 µM di ciascun L-imminozucchero in condizioni di crescita normali e dopo 48 ore è stato valutato l'accumulo di eparan solfato (HS) mediante colorazione con immunofluorescenza per l'HS. Il clone 5 non trattato ha mostrato un accumulo di HS sulla membrana cellulare rispetto al clone controllo WT (**Tabella 2**). In presenza dei composti L-DNJ, L-NBDNJ, L-AMPDNM e L-MONDNJ è stata invece osservata una drastica riduzione della colorazione dell'HS nel clone 5 (cl5) sistema modello della malattia di Sanfilippo B (MPS IIIB) (**Tabella 2**). Anche in questo caso, gli L-imminozuccheri L-NNDNJ, L-HPDNJ e L-NPDNJ non hanno mostrato alcuna attività sulla riduzione d'accumulo di HS nel modello di Sanfilippo B testato (**Tabella 2**).

Questi risultati sono in accordo con i risultati ottenuti con la colorazione dei lisosomi mediante Lamp1.

Tabella 2

	Cellule positive per HS (%)		Intensità relativa di fluorescenza di HS	
	WT	cl5	WT	cl5
mock	3,2	94,9	1,0	3,5
L-DNJ·HCl	2,6	5,1	0,94	1,20
L-NBDNJ·HCl	2,5	7,4	0,96	1,13
L-AMPDNM·HCl	2,3	5,1	0,94	1,19
L-MONDNJ·HCl	2,1	4,9	0,97	1,15
L-NNDNJ·HCl	4,1	97,5	0,94	3,71
L-HPDNJ·HCl	2,4	95,1	0,95	3,60
L-NPDNJ·HCl	4,4	97,5	0,93	3,65

Inoltre, il trattamento con uno qualsiasi dei sette L-imminozuccheri non ha causato alcun cambiamento nelle quantità di HS nelle cellule modello non malate WT.

Nel complesso, questi risultati mostrano per la prima volta che il trattamento con gli L-imminozuccheri L-DNJ, L-NBDNJ, L-AMPDNM e L-MONDNJ specificamente

selezionati è in grado di ridurre l'accumulo di HS in un modello cellulare della malattia di Sanfilippo B (MPS IIIB) generato nel nostro laboratorio.

ESEMPIO 4: Il trattamento con L-deossimminozuccheri (L-DNJ, L-NBDNJ, L-AMPDNM e L-MONDNJ) sotto forma di cloridrato innesca la riduzione dei difetti lisosomiali e dell'accumulo di HS in fibroblasti di pazienti affetti da Sanfilippo A e B (MPS IIIA e IIIB).

Per verificare se gli imminozuccheri selezionati avessero esercitato gli stessi effetti anche sui fibroblasti di pazienti affetti dalla malattia di Sanfilippo, sono stati utilizzati fibroblasti dermali adulti umani HDFa come controllo (acquistati dalla Sigma-Aldrich), e fibroblasti di pazienti affetti dalla Sanfilippo A e B (MPS IIIA e IIIB) come modello della malattia.

Le linee cellulari umane, fibroblasti, di pazienti affetti da MPS (malattia di Sanfilippo) utilizzate negli esempi sono state ottenute dall'Istituto G. Gaslini di Genova, "Cell Line and DNA Biobank from Patients Affected by Genetic Diseases" - Telethon Genetic Biobank Network - Telethon research service. Tali cellule sono classificate con codici identificativi e per tipo di malattia senza consentire l'identificazione del paziente. Le cellule sono state prelevate dai pazienti, presso l'Istituto Gaslini, con consenso informato al prelievo esteso alla conservazione e ad un suo eventuale uso, a scopo di diagnosi e/o di ricerca secondo la normativa vigente come previsto dalle linee guida seguite dalle biobanche Telethon (Vedi allegato 1 pag. 6 e allegato 2 pag. 5). In particolare, a pagina 5 dell'allegato 2 è riportato quanto segue: "The Network operates abiding by the Italian Privacy and Data Protection Laws in force, including: Italian Data Protection Authority (Garante), Personal Data Protection Code, Legislative Decree no. 196, 30th June 2003, published in Official Gazette No. 174 of Italian Republic, 29th July 2003; Italian Data Protection Authority (Garante), General Authorisation for the processing of

genetic data, 24th June 2011, published in Official Gazette No. 159 of Italian Republic, 11th July 2011".

Le cellule sono state coltivate in presenza degli L-imminozuccheri selezionati al dosaggio di 20 μ M e dopo 48 ore sono state trattate per l'immunofluorescenza per HS e Lamp1. Il trattamento con gli L-imminozuccheri non ha avuto alcun effetto sulle HDFa di controllo (**Tabella 3**). D'altra parte, gli stessi L-imminozuccheri L-DNJ, L-NBDNJ, L-AMPDNM e L-MONDNJ hanno causato una forte riduzione dell'accumulo di HS e dei lisosomi nei fibroblasti di pazienti affetti da Sanfilippo A e B (MPS IIIA e MPS IIIB) (**Tabella 3**).

Tabella 3

	Intensità relativa di fluorescenza rispetto a HDFa					
	HDFa		MPS-IIIA		MPS-IIIB	
	Lamp1	HS	Lamp1	HS	Lamp1	HS
mock	1,0	1,0	3,0	5,3	3,0	6,0
L-DNJ·HCl	1,0	1,0	1,8	1,0	1,0	1,0
L-NBDNJ·HCl	1,0	1,0	1,9	1,7	1,0	1,5
L-AMPDNM·HCl	1,0	1,0	2,2	1,5	1,0	1,0
L-MONDNJ·HCl	1,0	1,0	2,2	1,8	1,3	1,7
L-NNDNJ·HCl	1,0	1,0	3,0	4,9	3,1	5,8
L-HPDNJ·HCl	1,0	1,0	3,1	5,4	3,0	5,7
L-NPDNJ·HCl	1,0	1,0	2,8	5,2	3,3	5,9

Nel complesso, questi risultati mostrano per la prima volta che il trattamento con gli L-imminozuccheri specificamente selezionati L-DNJ, L-NBDNJ, L-AMPDNM e L-MONDNJ è in grado di prevenire l'accumulo di HS e di lisosomi nei fibroblasti di pazienti affetti dalla malattia di Sanfilippo A e B.

ESEMPIO 5: Il trattamento con D-deossimminozuccheri (D-DNJ o DNJ, D-NBDNJ o NBDNJ) sotto forma di cloridrato non ha effetto sui difetti lisosomiali e sull'accumulo di HS in fibroblasti di pazienti affetti da Sanfilippo A e B (MPS IIIA e IIIB).

Per dimostrare che gli imminozuccheri oggi disponibili per la cura delle malattie lisosomiali (D-DNJ o Duvoglustat, D-NBDNJ o Miglustat) non hanno la stessa efficacia dei composti oggetto di questa invenzione, dimostrando così l'innovazione della scoperta, sono stati utilizzati fibroblasti dermali adulti umani HDFa come controllo (acquistati dalla SIGMA), e fibroblasti di pazienti affetti dalla Sanfilippo A e B (MPS IIIA e IIIB) come modello della malattia.

Le cellule sono state coltivate in presenza degli L-imminozuccheri D-DNJ e D-NBDNJ al dosaggio di 20 μ M e dopo 48 ore sono state trattate per l'immunofluorescenza per HS e Lamp1. Il trattamento con gli imminozuccheri della serie sterica D, commerciali, non ha avuto alcun effetto sulle HDFa e sui fibroblasti di pazienti affetti da Sanfilippo A e B (MPS IIIA e MPS IIIB) sia sui livelli di accumulo di HS sia dei lisosomi (**Tabella 4**).

Tabella 4

	Cellule positive per Lamp1 (%)			Cellule positive per HS (%)		
	HDFa	MPS-III A	MPS-IIIB	HDFa	MPS-III A	MPS-IIIB
Mock	5,5	94,8	95,0	4,5	97,5	96,8
D-DNJ·HCl	5,0	95,0	92,5	2,4	97,3	94,9
D-NBDNJ·HCl	5,0	94,7	93,8	4,8	99,7	95,2

Nel complesso, questi risultati mostrano l'innovatività della nostra scoperta per il trattamento con gli L-imminozuccheri specificamente selezionati L-DNJ, L-NBDNJ, L-AMPDNM e L-MONDNJ nella prevenzione dell'accumulo di HS e dei lisosomi in una cellula modello della Mucopolisaccaridosi come i fibroblasti di pazienti affetti da Sanfilippo A e B.

ESEMPIO 6: Il trattamento con L-deossimminozuccheri (L-DNJ, L-NBDNJ, L-AMPDNM e L-MONDNJ) sotto forma di cloridrati innesca la riduzione delle quantità di HS nella linea di cellule epiteliali tumorali Hela e la riduzione della loro crescita cellulare.

Per testare se il trattamento con gli L-deossimminozuccheri selezionati (L-DNJ, L-NBDNJ, L-AMPDNM e L-MONDNJ) interferisse con la sintesi dell'HS abbiamo selezionato una linea cellulare non mutata per NAGLU e altamente decorata dall'eparan solfato sulla membrana cellulare. A questo scopo, le cellule epiteliali tumorali HeLa (acquistate dall'ATCC) sono state coltivate per 48 ore in presenza degli L-imminozuccheri selezionati e la quantità di HS è stata valutata tramite immunocolorazione per HS. Il trattamento con gli stessi L-imminozuccheri L-DNJ, L-NBDNJ, L-AMPDNM e L-MONDNJ ha causato una forte riduzione dell'accumulo di HS sulla membrana cellulare delle HeLa (**Tabella 5**).

Tabella 5

	Intensità relativa di fluorescenza per HS
mock	1,00
L-DNJ·HCl	0,24
L-NBDNJ·HCl	0,26
L-AMPDNM·HCl	0,12
L-MONDNJ·HCl	0,11
L-NNDNJ·HCl	0,88
L-HPDNJ·HCl	0,95
L-NPDNJ·HCl	1,19

Inoltre, il trattamento con gli L-deossimminozuccheri L-DNJ, L-NBDNJ, L-AMPDNM e L-MONDNJ ha causato la diminuzione del numero di cellule HeLa dopo 48 ore come mostrato dal saggio di proliferazione cellulare riportato in **Tabella 6**.

Tabella 6

Numero di cellule	
mock	$5,2 \cdot 10^5$
L-DNJ·HCl	$2,9 \cdot 10^5$
L-NBDNJ·HCl	$3,6 \cdot 10^5$
L-AMPDNM·HCl	$3,7 \cdot 10^5$
L-MONDNJ·HCl	$3,1 \cdot 10^5$
L-NNDNJ·HCl	$4,2 \cdot 10^5$
L-HPDNJ·HCl	$4,3 \cdot 10^5$
L-NPDNJ·HCl	$4,7 \cdot 10^5$
D-DNJ·HCl	$4,4 \cdot 10^5$
D-NBDNJ·HCl	$4,2 \cdot 10^5$

Questo risultato dimostra che il trattamento con gli L-imminozuccheri L-DNJ, L-NBDNJ, L-AMPDNM e L-MONDNJ causa una riduzione dell'HS nelle cellule tumorali HeLa a cui segue una inibizione della crescita cellulare tumorale, poiché l'HS è fondamentale per sostenere la proliferazione delle cellule epiteliali tumorali.

Questi dati dimostrano che gli imminozuccheri agiscono interferendo con la sintesi di HS con un meccanismo completamente nuovo rispetto al meccanismo di azione degli altri imminozuccheri in commercio. Inoltre, questi risultati mostrano che l'invenzione può essere applicata non solo per le mucopolisaccaridosi dove vi è un accumulo di HS, ma anche per le malattie tumorali dove l'HS è fondamentale per sostenere la crescita delle cellule tumorali ed i loro meccanismi metastatici.

ESEMPIO 7: Il trattamento con L-deossimminozuccheri (L-DNJ, L-NBDNJ, L-AMPDNM e L-MONDNJ) sotto forma di cloridrati innesca la riduzione delle quantità di fibra beta amiloide nelle cellule modello della malattia di Sanfilippo B (MPS IIIB).

Al fine di dimostrare l'applicazione dell'uso terapeutico degli imminozuccheri selezionati L-DNJ, L-NBDNJ, L-AMPDNM e L-MONDNJ per le malattie neurodegenerative abbiamo utilizzato il modello neuronale della malattia di Sanfilippo B

(clone 5, c15) che abbiamo recentemente generato nel nostro laboratorio (esempio 2). Il clone (c15) stabilmente silenziato per NAGLU, gene causativo della MPS IIIB, imita le caratteristiche delle malattie neurodegenerative in quanto accumula fibre beta-amiloidi nel citoplasma.

Il clone della malattia (c15) e il clone controllo (WT) sono stati coltivate in presenza degli L-imminozuccheri selezionati L-DNJ, L-NBDNJ, L-AMPDNM e L-MONDNJ al dosaggio di 20 μ M e dopo 48 ore sono stati processati per immunofluorescenza contro il peptide beta-amiloide 1-42. I dati riportati in **Tabella 7** mostrano che in seguito al trattamento con gli specifici L-deossimminozuccheri L-DNJ, L-NBDNJ, L-AMPDNM e L-MONDNJ vi è una riduzione totale dell'accumulo di fibre amiloide rispetto alle cellule non trattate ripristinando una morfologia simile alle cellule di controllo.

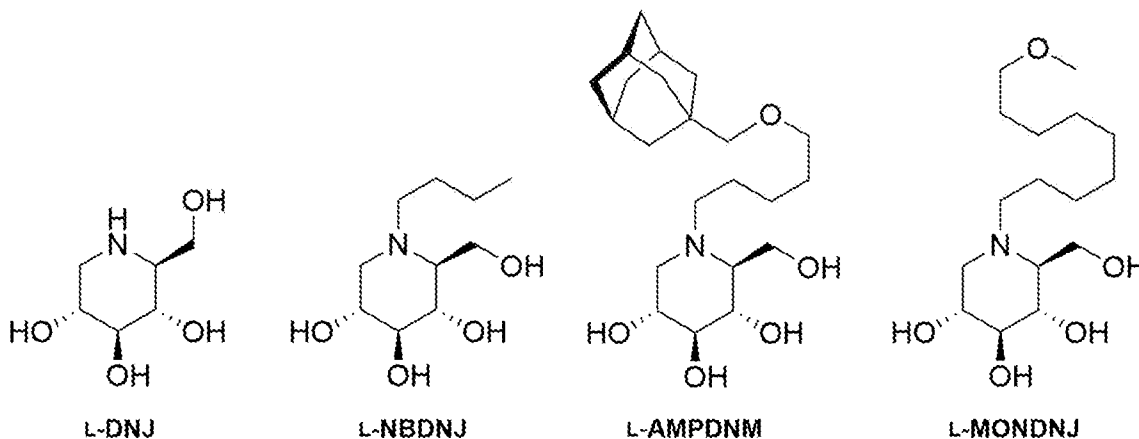
Tabella 7

	Intensità relativa di fluorescenza amiloide
mock	1,00
L-DNJ·HCl	0,01
L-NBDNJ·HCl	0,01
L-AMPDNM·HCl	0,02
L-MONDNJ·HCl	0,01

Questi risultati mostrano per la prima volta che gli imminozuccheri selezionati L-DNJ, L-NBDNJ, L-AMPDNM e L-MONDNJ oggetto delle rivendicazioni sono efficaci per la riduzione dell'accumulo di placche amiloide e per la cura dei processi neurodegenerativi come l'Alzheimer.

RIVENDICAZIONI

1. Imminozuccheri di formula



o loro sali farmaceuticamente accettabili per uso nel trattamento e nella prevenzione di malattie causate da accumulo di eparan solfato.

2. Imminozuccheri per uso secondo la rivendicazione 1 in cui la malattia da accumulo di eparan solfato è la mucopolisaccaridosi di tipo I, II, III o VII.

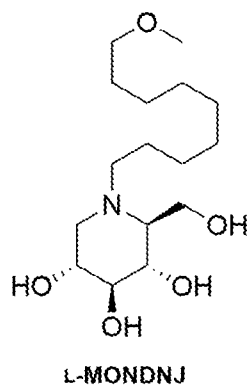
3. Imminozuccheri per uso secondo la rivendicazione 2 in cui la malattia è la sindrome di Sanfilippo e i suoi sottotipi (A, B, C, D).

4. Imminozuccheri per uso secondo la rivendicazione 1 in cui le malattie da accumulo di eparan solfato comprendono morbo di Alzheimer, neoplasie, infezioni virali.

5. Imminozuccheri per uso secondo la rivendicazione 4 in cui la malattia è morbo di Alzheimer.

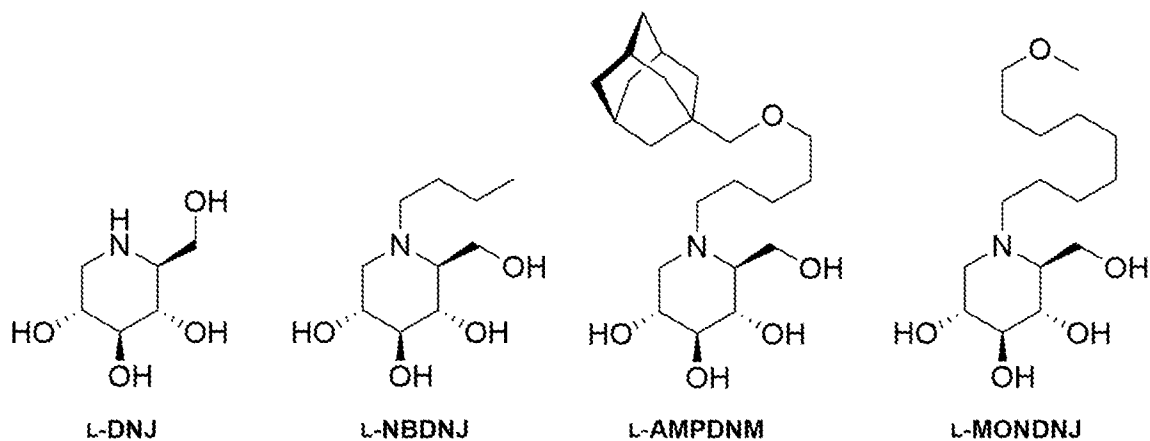
6. Imminozuccheri per uso secondo la rivendicazione 4 in cui la malattia è una neoplasia.

7. Composto di formula:



e suoi sali farmaceuticamente accettabili.

8. Composizioni farmaceutiche comprendenti gli imminozuccheri di formula



o loro sali farmaceuticamente accettabili, in miscela con opportuni eccipienti.

Milano, 20 aprile 2022