

Związek niskocząsteczkowy do zastosowania w leczeniu
ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3

Przedmiotem wynalazku jest związek niskocząsteczkowy do zastosowania w leczeniu ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3. Wynalazek dotyczy dziedziny terapeutycznego leczenia ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3, wywołanej przez obecność zmutowanego białka ataksyny 3.

Choroby neurodegeneracyjne, takie jak choroby poliglutaminowe, choroba Alzheimerera i choroba Parkinsona często mają wspólne objawy kliniczne i molekularne. Wiele z nich ma genetyczną etiologię, w tym mutacje genów, które powodują nieprawidłowe funkcje białek. Funkcje te prowadzą do agregacji i akumulacji białek w neuronach, degeneracji neuronów, wadliwej neurotransmisji i ekscytotoksyczności, deficytów energii, nieprawidłowej sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, zmian transkrypcyjnych i zmian zapalnych (MCLOUGHLIN, H.S. i in. Pathogenesis of SCA3 and implications for other polyglutamine diseases. *Neurobiology of Disease*, luty 2020, tom 134, s. 104635). Ataksja rdzeniowo-mózdkowa 3 (SCA3), zwana także chorobą Machado-Josepha (MJD), jest dziedziczną chorobą neurodegeneracyjną, spowodowaną mutacją w genie ATXN3. Mutacja w genie sprawia, że powstaje nieprawidłowe białko, które ma tendencję do tworzenia złogów wewnątrz mózgu. Pacjenci z ataksją rdzeniowo-mózdkową typu 3 cierpią na upośledzenie funkcji motoryczne i umysłowe, takie jak ataksja chodu, spastyczność, zaburzenia ruchu gałek ocznych i demencja (RIESS, O. i in. SCA3: Neurological features, pathogenesis and animal models. *Cerebellum*, 26 marca 2008, tom 7, s. 125–137). Zmiany patologiczne obejmują dysfunkcję i utratę neuronów w jądrach głębokich mózdku, jądrach mostu, a także jądrach nerwów przedśionkowych i czaszkowych, odcinku rdzeniowo-mózdkowym (kolumna Clarke'a) i rogach przednich (RÜB, U. i in. Clinical features, neurogenetics and neuropathology of the polyglutamine spinocerebellar ataxias type 1, 2, 3, 6 and 7. *Prog. Neurobiol.*, maj 2013, tom 104, s. 38–66).

Ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 3 jest postępującą chorobą neurodegeneracyjną, dla której nie istnieje żadna skuteczna terapia przyczynowa, u podstaw której leży mechanizm choroby. Większość dostępnych terapii jest związana z łagodzeniem pojedynczych objawów choroby. Obecnie testowane leki obejmują modulatory neuroprzekaźników, inhibitory transportu jonów, czynniki wzrostu, inhibitory deacetylazy histonowej i wzmacniacze autofagii, oraz testy z użyciem komórek macierzystych pochodzących z adipocytów i krwi pępowinowej. W testach klinicznych znajdowały się takie substancje jak acetyl-DL-leucine (różne ataksje), Ceftriaxone (różne ataksje), Trans-resveratrol, Trehalosa, kwas walproinowy, Tandospirone, BHV-4157,

Cabaletta i inne (CHEN, Y.-S. i in. Identifying Therapeutic Targets for Spinocerebellar Ataxia Type 3/Machado–Joseph Disease through Integration of Pathological Biomarkers and Therapeutic Strategies. *Int. J. Mol. Sci.*, 26 kwietnia 2020, tom 21, zesz. 9, s. 3063.)

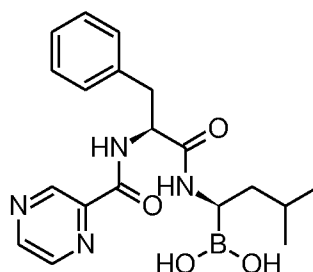
Jedną ze strategii zmniejszania agregacji zmutowanej ataksyny-3 jest ukierunkowana podwyższona ekspresja szlaku ubikwityna-proteasom (UPS). Proteosom został zidentyfikowany w inkluzjach jądrowych ataksyny 3 i wykazano, że hamuje agregację zmutowanej ataksyny 3 (CHAI, Y. i in. Evidence for Proteasome Involvement in Polyglutamine Disease: Localization to Nuclear Inclusions in SCA3/MJD and Suppression of Polyglutamine Aggregation in vitro. *Human Molecular Genetics*, 1 kwietnia 1999, tom 8, zesz. 4, s. 673–682.).

10 Jako potencjalne induktory usuwania zmutowanego białka ataksyny-3 przez UPS zaproponowano leki takie jak inhibitor kinazy rho (H1152), katapol, pueraryna i daidzeina (te ostatnie są aktywnymi składnikami ziół leczniczych, odpowiednio, *Rehmannia glutinosa* i *Pueraria lobata*) (CHEN, I.-C. i in. Targeting Ubiquitin Proteasome Pathway with Traditional Chinese Medicine for Treatment of Spinocerebellar Ataxia Type 3. *Am. J. Chin. Med.*, 4

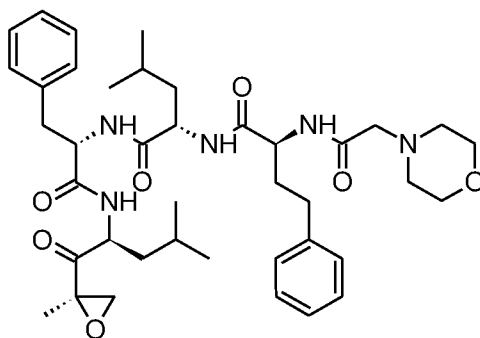
15 stycznia 2019, tom 47, zesz. 1, s. 63–95; WANG, Z. Experimental and Clinical Strategies for Treating Spinocerebellar Ataxia Type 3. *Neuroscience*, 10 lutego 2018, tom 371, s. 138–154). Dotychczas inhibitory proteasomu były wykorzystywane w leczeniu chorób nowotworowych. W publikacji nr EP2619184B1 ujawniono zastosowanie bortezomibu w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych.

20 Celem wynalazku jest zapewnienie skutecznego i przyczynowego leku w terapii ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3, który zmniejsza poziom zmutowanej ataksyny 3 w komórkach.

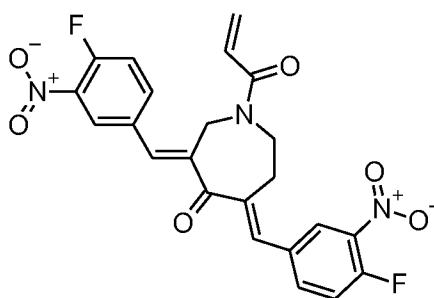
Przedmiotem wynalazku jest związek niskocząsteczkowy do zastosowania w leczeniu ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 3, przy czym związek ten jest wybrany spośród bortezomibu, karfilzomibu, VLX1570 lub oprozomibu o następujących wzorach chemicznych:



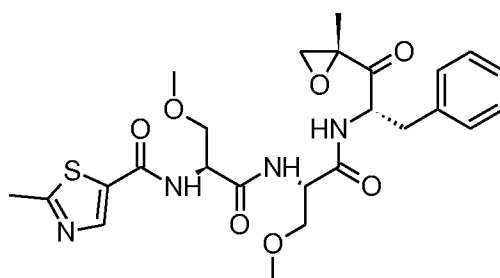
bortezomib



karfilzomib



VLX1570



oprozomib

Działanie związków niskocząsteczkowych według niniejszego wynalazku polega na inhibicji proteasomu. W efekcie, poziom patogennego, zmutowanego białka ataksyny 3 w komórkach pacjentów z ataksją rdzeniowo-mózdkową typu 3 ulega znacznemu obniżeniu.

Wynalazek został uwidoczniony w przykładzie wykonania i na figurach rysunku.

- 5 W trakcie przeprowadzonych badań określono efektywności działania bortezomibu, carfilzomibu, VLX1570 oraz oprozomibu na obniżenie poziomu zmutowanego białka ataksyny 3 w kulturze komórkowej fibroblastów wyprowadzonych od pacjentów z ataksją rdzeniowo-mózdkową typu 3. Badania prowadzono w odniesieniu do referencyjnego inhibitora proteasomu Mg132.
- 10 Fig. 1A i 1B przedstawiają schematy zastosowanych sposobów podawania związków niskocząsteczkowych, które odzwierciedlają możliwy schemat podania u pacjentów z ataksją rdzeniowo-mózdkową typu 3. Pierwszy sposób (fig. 1A) polegał na ciągłej ekspozycji

komórek na związki niskocząsteczkowe. Badane związki podano w danym stężeniu do medium hodowlanego o obniżonej ilości FBS (2%). Po upływie 48 godzin wymieniono medium na świeże zawierające związki niskocząsteczkowe w danym stężeniu po upływie 48 godzin. Po kolejnych 24 godzinach komórki były lizowane. Sposób ten stanowił odpowiednik stałego dostarczania terapeutyków u pacjentów, przy czym potencjalne podawanie pacjentom nie jest limitowane poniżej ani powyżej 72h. Drugi sposób (fig. 1B) polegał na podawaniu związków niskocząsteczkowych naprzemiennie z medium nie zawierającym związków niskocząsteczkowych. Komórki były eksponowane na działanie substancji terapeutycznych przez 24 godziny, a następnie były hodowane przez 2 dni w medium bez związków niskocząsteczkowych. Po 10 dniach komórki były lizowane. Sposób ten symulował podawanie leku w odstępach czasowych, przy czym podawane czasy traktowania i przerwy w traktowaniu pacjentów nie są ograniczone powyżej ani poniżej do wymienionych ilości godzin. Fig. 2A, 2B i 2C przedstawiają wyniki przeprowadzonych badań eksperymentalnych. Na fig. 2A, 2B i 2C podane skróty mają następujące znaczenia: GAPDH - Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego, białko kontrolne używane w celu normalizacji poziomu ekspresji białek; wtATXN3 - prawidłowe białko ataksyny 3 zawierające 18 powtórzeń CAG; mutATXN3 - zmutowane białko ataksyny 3 zawierające 69 powtórzeń CAG; Mg132 - nazwa referencyjnego inhibitora proteasomu, przy czym zastosowanie leku nie ogranicza się do pacjentów z wymienioną liczbą powtórzeń CAG ani ciągu PolyQ. Terapia może być stosowana u pacjentów z mniejszą lub większą liczbą powtórzeń CAG w gene ATXN-3 i lub z większą bądź mniejszą liczbą glutamin w ciągu poliglutaminowym w białku ataksyny-3.

Fibroblasty od pacjentów chorych na ataksję rdzeniowo-mózdkową typu 3 (GM06153, 18/69 CAG) (Coriell Cell Repositories) hodowano w EMEM (Lonza) uzupełnionym 10% FBS (płodowa surowica bydlęca; EurX), antybiotykami (Sigma-Aldrich). Traktowanie komórek fibroblastów przeprowadzono przy użyciu związków niskocząsteczkowym. Komórki wysiano na 60 mm szalkach na 24 godziny przed transfekcją. Po 24 godzinach komórki fibroblastów osiągały ok. ~60% konfluencję. Mieszaniny do leczenia przygotowano w EMEM uzupełnionym 2% FBS ze związkami niskocząsteczkowymi w DMSO. Komórki były traktowane w dwóch reżimach; pierwsze podejście: Fibroblasty rosły przez 24 godziny po pasażu (~60% konfluencja). Następnie medium hodowlane zmieniono na EMEM uzupełnioną 2% FBS z inhibitorami proteasomów w DMSO, pożywkę zmieniono 48 godzin po pierwszej dawce inhibitorów proteasomów na świeżą pożywkę zawierającą inhibitory proteasomów w tym samym stężeniu na kolejne 24 godziny, po czym komórki zebrano do analizy Western blot. W drugim podejściu komórki były hodowane 10 dni. Komórki umieszczono na 60 mm płytce

24 godziny po pasażu (komórki miały konfluencję ~30%), a następnie inkubowano je 24 godziny z inhibitorami proteasomów, po czym pożywkę zmieniono na normalną pożywkę hodowlaną (EMEM (Lonza) uzupełnioną 10% FBS (płodowa surowica bydlęca; EurX), antybiotykami (Sigma-Aldrich)) przez 48 godzin. Schemat powtarzano do 10 dni i komórki
5 zebrano do Western blot.

Komórki poddano lizie w buforze zawierającym 60 mM TRIS, 2% SDS, 10% sacharozę i 2 mM PMSF. Stężenie białka oszacowano przy użyciu zestawu do oznaczania białka BCA (Pierce), a 20 µg całkowitego białka rozcieńczono w buforze do próbek zawierającym 2-merkaptoetanol i gotowano w 95°C przez 5 min. Białka rozdzielono metodą elektroforezy w
10 żelu SDS-PAGE (5% żel zagęszczający/12% żel rozdzielający), przeniesiono na nitrocelulozę i wybarwiono roztworem Ponceau S. Bloty zablokowano 5% odtłuszczonym mlekiem w PBS/0,05% Tween 20, a następnie inkubowano przez noc w 4°C z następującymi przeciwciałami pierwszorzędowymi: anti-ataksyna-3 1:2000; ProteinTech, anti-GAPDH 1:10 000 (Merck Milipore). Bloty sondowano odpowiednim drugorzędowym przeciwciałem
15 antykróliczym skoniugowanym z HRP 1:2000 (Jackson ImmunoResearch). Reakcja immunologiczna została wykryta przy użyciu substratu ECL (ThermoFisher Scientific).

Lizaty komórek traktowanych 72 godziny były analizowane z użyciem techniki western blot w celu określenia ilości zmutowanego białka ataksyny 3 po traktowaniu związkami niskocząsteczkowymi. Analizy wykazały, że bortezomib, carfilzomib i VLX1570 w stężeniu
20 10 nM obniża w sposób istotny statystycznie poziom zmutowanego białka w komórkach fibroblastów (fig. 2A).

Lizaty komórkowe traktowane 10 dni był również analizowane z użyciem techniki western blot w celu określenia ilości zmutowanego białka ataksyny 3 po traktowaniu związkami niskocząsteczkowymi. Analiza ponownie wykazała, że bortezomib, carfilzomib i VLX1570 w
25 stężeniu 10 nM obniża w sposób istotny statystycznie poziom zmutowanego białka w komórkach fibroblastów (fig. 2B).

Lizaty komórek traktowanych 72 godziny były analizowane z użyciem techniki western blot w celu określenia ilości zmutowanego białka ataksyny 3 po traktowaniu związkami niskocząsteczkowymi. Analizy wykazały, że oprozomib w stężeniu 25 nM w sposób
30 statystycznie istotny obniża poziom zmutowanej ataksyny 3 (fig. 2C).

Badane związki znacząco obniżyły ilości zmutowanego białka ataksyny 3 w komórkach pacjentów z ataksją rdzeniowo-mózdkową typu 3. Terapia związkami niskocząsteczkowymi według wynalazku jest bardzo korzystnym rozwiązaniem dla pacjenta ze względu na niższe koszty leczenia i łatwiejszą drogę podania (np. doustnie lub iniekcja).