



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102011901991725
Data Deposito	28/10/2011
Data Pubblicazione	28/04/2013

Classifiche IPC

Titolo

INIBITORI DELL'ENZIMA LSD-1 PER L'INDUZIONE DEL DIFFERENZIAMENTO OSTEOPENICO

9443 M Descrizione del brevetto per invenzione industriale avente per titolo:

SB/mc **“INIBITORI DELL’ENZIMA LSD-1 PER L’INDUZIONE DEL
DIFFERENZIAMENTO OSTEOGENICO”**

a nome : **MESOGENICS s.r.l.**

con sede in: Napoli

* * *

Campo dell’invenzione

La presente invenzione è relativa all’uso di inibitori dell’enzima LSD-1 nel differenziamento osteogenico di cellule in grado di differenziarsi in osteoblasti.

Stato della tecnica

LSD-1 (lysine specific demethylase-1) è un gene che codifica una monoaminoossidasi flavina-dipendente, che può demetilare lisine mono- e di-metilate, in particolare lisine 4 e 9 degli istoni 3 (H3K4 e H3K9).

LSD-1, scoperto da Yujiang nel laboratorio di Yang Shi presso la Harvard Medical School, è il primo degli enzimi in grado di demetilare la lisina ad essere stato scoperto.

Attraverso una reazione ossidativa FAD-dipendente, LSD-1 rimuove specificamente la metilazione sull’istone H3 posizione K4 da me2 a me1 o me0.

Quando si forma un complesso con un recettore degli androgeni (e altri recettori ormonali nucleari), LSD-1 è riportato su H3K9me2.

Funzioni di altri componenti del complesso contenente LSD-1, come CoREST e BHC80, sono state ulteriormente studiate.

Più di recente, è stato dimostrato che LSD-1 è anche in grado di

demetilare residui di lisina su proteine non istoniche come p53 Dnmt1 e E2F1.

La modificazione istonica mediante enzimi è un fenomeno biologico chiave per molti processi differenziativi.

LSD-1 è stato identificato come modificatore chiave istonico coinvolto nel mantenimento della pluripotenza, il che è essenziale per mantenere il giusto equilibrio tra H3K4me2/me3 e H3K27me3 importanti nella regolazione della staminalità. Alti livelli di LSD-1 sono necessari per mantenere lo stato indifferenziato di cellule staminali embrionali umane attraverso uno stretto controllo dei livelli di metilazione H3K4 nelle regioni di regolazione dei geni della differenziazione. Così, la “down-regulation” o l’inibizione di LSD-1 durante la differenziazione può costituire un meccanismo essenziale per l’indirizzamento del differenziamento. In definitiva, i cambiamenti nei livelli di espressione o l’inibizione di LSD-1 possono controllare l’equilibrio tra auto-rinnovamento e maturazione.

Sommario dell’invenzione

La presente invenzione riguarda inibitori dell’enzima LSD-1 per l’uso nel differenziamento osteogenico di cellule in grado di differenziarsi in osteoblasti e nel mantenimento della maturazione ossea.

Descrizione dettagliata dell’invenzione

È stato sorprendentemente trovato che l’inibizione dell’enzima LSD-1 (lysine specific demethylase-1) induce il differenziamento osteogenico, in vitro e in vivo, di cellule con potenzialità di differenziarsi in osteoblasti, come, ad esempio, cellule mesenchimali staminali primarie umane ottenute da midollo osseo oppure cellule mesenchimali staminali primarie derivate da topo oppure in linee cellulari derivate da queste ultime, tipo

W20-17.

L'inibizione dell'enzima LSD-1 induce inoltre il mantenimento della maturazione ossea.

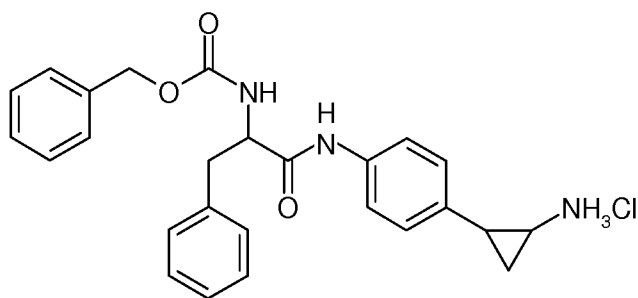
La presente invenzione è relativa all'uso di inibitori dell'enzima LSD-1 nel differenziamento osteogenico di cellule in grado di differenziarsi in osteoblasti.

L'invenzione è inoltre relativa all'uso di inibitori dell'enzima LSD-1 nel mantenimento della maturazione ossea.

Secondo un aspetto preferito dell'invenzione, le cellule in grado di differenziarsi in osteoblasti sono cellule mesenchimali staminali, cellule staminali dell'adulto (adult stem cells, ASC) o cellule con potenziale osteogenico.

Il differenziamento osteoblastico consiste nella trasformazione a seguito di appropriati stimoli biologici, fisici e/o farmacologici di cellule, ad esempio di ASC derivanti da diversi tessuti come: midollo osseo, tessuto adiposo, tessuto connettivo, muscolo, in osteoblasti, ossia in cellule capaci di produrre matrice ossea mineralizzata. L'induzione di questo fenomeno biologico ha diverse applicazioni nel campo delle attività di laboratorio per lo studio dei cambiamenti cellulari connessi con questo processo e nel campo terapeutico per patologie caratterizzate da carenza di tessuto osseo mineralizzato come l'osteoporosi, l'osteomalacia e le fratture ossee discontinue.

Secondo la presente invenzione, composti in grado di inibire l'enzima LSD-1 sono preferibilmente tranilcipromina e il composto MC2580 di formula (I):



(I).

Preferibilmente tranilcipromina e MC2580 sono in grado di indurre il differenziamento osteogenico di cellule staminali dell'adulto in osteoblasti.

Gli inibitori dell'enzima LSD-1 possono essere utilizzati a scopo terapeutico in campo ortopedico e chirurgico.

Secondo un aspetto preferito, gli inibitori dell'enzima LSD-1 possono essere utilizzati in soggetti affetti da patologie ossee dovute, ad esempio, alla riduzione della neosintesi o all'aumento del riassorbimento osseo, quali ad esempio osteoporosi, osteomalacia, fratture ossee discontinue e in soggetti affetti da patologie che possono trarre benefici dall'induzione del differenziamento osteogenico.

Inoltre, gli inibitori di LSD-1 possono essere utilizzati a scopo terapeutico per artrodesi, dispositivi medici in grado di indurre la sintesi ossea per il riparo di frattura o per qualsiasi impiego in campo ortopedico e/o chirurgico.

L'inibizione dell'enzima LSD-1 può essere utilizzato per indurre il differenziamento osteogenico in colture cellulari mediante l'impiego di inibitori dell'enzima LSD-1 nella preparazione di mezzi di coltura, di sostitutivi di siero e/o di additivi di coltura.

Gli inibitori dell'enzima LSD-1 possono essere utilizzati da soli o in combinazione con altri opportuni principi attivi.

Gli esempi di seguito riportati illustrano ulteriormente l'invenzione.

Esempi

Esempio 1 - Inibizione dell'enzima LSD-1 e aumento del differenziamento osteogenico

Cellule W20-17 oppure cellule mesenchimali staminali primarie seminate su piastre da 96 pozzetti oppure piastre da 6 pozzetti oppure qualsiasi altro tipo di supporto di coltura, se cresciute con mezzo induttore dell'osteogenesi (D-MEM supplementato con siero fetale bovino al 10%, L-glutamina 4 mM, acido ascorbico 2-fosfato 0,05 mM, glicerolo 2-fosfato 10 mM e desametasone 10^{-6} M) differenziano in osteoblasti in 14 giorni e producono matrice ossea mineralizzata in 21 giorni. Il differenziamento in osteoblasti viene valutato mediante analisi della comparsa dell'enzima fosfatasi alcalina, la cui attività viene identificata per mezzo di una colorazione istochimica. La presenza di matrice mineralizzata viene invece valutata mediante analisi istochimica con colorazione Alizarin Red che evidenzia i precipitati mineralizzati.

Le cellule W20-17 sono state seminate in piastre da 96 pozzetti ad una concentrazione di 6,000 cellule x cm^2 e cresciute in mezzo osteogenico da solo o supplementato con farmaci in grado di inibire l'attività di LSD-1, tranilcipromina e MC2580 (50 μM).

Il quattordicesimo giorno è stata effettuata una colorazione per valutare l'attività della fosfatasi alcalina, marker espresso dagli osteoblasti durante il differenziamento.

Dopo un lavaggio con PBS le cellule sono fissate con una soluzione al 10% di *neutral formalin buffer* (NFB) e incubate per 45 minuti a temperatura ambiente con una soluzione contenente naftolo AS MX-PO4 0,24 mM, N,N-

dimetilformammide 0,4%, *red violet LB salt* in Tris-HCL 0,2 M a pH 8.3.

Dopo lavaggi con acqua distillata, le cellule positive per l'espressione della fosfatasi alcalina sono state quindi osservate al microscopio.

I risultati ottenuti hanno mostrato che l'inibizione dell'enzima LSD-1 determina un incremento del differenziamento osteogenico, in quanto la somministrazione di entrambi i farmaci inibitori di LSD-1 induce una espressione della fosfatasi alcalina maggiore ed una colorazione più intensa rispetto al solo trattamento con mezzo osteogenico.

Esempio 2 - Inibizione dell'enzima LSD-1 e aumento della mineralizzazione

Si è valutato se l'inibizione di LSD-1 incrementi anche la deposizione di matrice mineralizzata, che contraddistingue l'ultima fase del differenziamento osteogenico.

Cellule W20-17 sono state seminate in piastre a 96 pozzetti e mantenute in coltura con mezzo osteogenico da solo o supplementato con il composto MC2580.

Il ventunesimo giorno è stata valutata la presenza di matrice mineralizzata mediante colorazione istochimica con Alizarin Red. Le cellule sono lavate con PBS e fissate con una soluzione di formaldeide al 10%; e sono state incubate con una soluzione al 2% di Alizarin Red (pH 4.1-4.3) per un'ora.

Dopo alcuni lavaggi con acqua distillata la piastra è stata osservata al microscopio per valutare l'entità della mineralizzazione. Per un'analisi più precisa, dopo l'osservazione al microscopio, sono state effettuate la quantizzazione della colorazione mediante l'estrazione con Guanidina-HCL 4

M del colorante legato ai depositi di calcio e la determinazione dell'assorbanza a 490 nm.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che l'inibizione dell'enzima LSD-1 mediante trattamento farmacologico determina un incremento della deposizione di matrice mineralizzata rispetto al solo trattamento con mezzo osteogenico.

L'effetto dell'inibizione di LSD-1 sul differenziamento osteogenico e sulla mineralizzazione è stato anche valutato mediante colorazione von Kossa che consente di individuare la presenza di sali di calcio.

Al termine del trattamento con mezzo osteogenico o mezzo osteogenico supplementato con il composto MC2580 le cellule W20-17 sono lavate con PBS, fissate con una soluzione di formaldeide al 10% ed incubate con una soluzione di nitrato di argento al 5% per 40 minuti sotto una lampada UV. In seguito ad esposizione a luce ultravioletta il nitrato d'argento viene ridotto e l'argento metallico è fissato al posto del calcio. L'argento in eccesso viene rimosso con una soluzione al 5% di sodio tiosolfato e, dopo lavaggi con acqua distillata, i depositi di calcio o di sali di calcio possono essere osservati al microscopio.

Anche in questo caso i risultati ottenuti mostrano che il trattamento con farmaci inibitori di LSD-1 induce un incremento della mineralizzazione rispetto al solo trattamento con mezzo osteogenico.

Esempio 3 - Profili di espressione di marker osteogenici

Le diverse fasi del differenziamento osteogenico sono caratterizzate dall'espressione di una serie di markers osteogenici che includono i fattori trascrizionali RUNX-2 e Osterix, la glicoproteina Osteopontina e

Osteocalcina.

È stato valutato l'effetto di due composti inibitori di LSD-1, tranilcipromina e MC2580, sul profilo di espressione di tre markers osteogenici (Osteopontina, Osterix e Osteocalcina) in cellule W20-17 in coltura con mezzo osteogenico.

Dopo 21 giorni di trattamento l'RNA totale è stato estratto impiegando il TriReagent e si è quindi proceduto con la retrotrascrizione in cDNA. La retrotrascrizione (RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction) è stata condotta utilizzando 2 µg di RNA totale, primers random 5 µM e la trascrittasi inversa M-MuLV. I livelli di espressione dei geni di interesse sono stati successivamente determinati mediante Real time PCR, impiegando la SYBR Green PCR master mixture ed un apparecchio ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

I livelli di espressione dei geni target sono stati quantizzati utilizzando primers specifici per il gene di interesse e normalizzati in base all'espressione della gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH). I risultati ottenuti mostrano che, rispetto a cellule W20-17 in coltura con solo mezzo osteogenico, il trattamento con composti inibitori di LSD-1 determina un significativo aumento dell'espressione dei geni osteopontina e osterix ed una riduzione dell'espressione del marker tardivo osteocalcina, più marcata in caso di somministrazione del composto MC2580.

Esempio 4 - Inibizione dell'enzima LSD-1 e favorimento del differenziamento osteogenico in assenza di altri stimoli

Per determinare se l'inibizione dell'enzima LSD-1 fosse sufficiente ad indurre il differenziamento in osteoblasti, è stato effettuato il saggio per

valutare l'attività della fosfatasi alcalina su cellule W20-17 in coltura con mezzo normale (D-MEM) o con D-MEM supplementato con tranilcipromina o con MC2580.

I risultati ottenuti mostrano che il trattamento con composti inibitori di LSD-1 induce un incremento significativo dell'attività della fosfatasi alcalina rispetto al controllo negativo (cellule in coltura con solo D-MEM), indicando quindi che l'inibizione di LSD-1 è in grado di indurre il differenziamento osteogenico in assenza di altri stimoli.

Esempio 5 - Inibizione dell'enzima LSD-1 e favorimento della mineralizzazione in assenza di altri stimoli

Per valutare la composizione minima del mezzo in grado di indurre la formazione di matrice mineralizzata, le cellule W20-17 sono state seminate in una piastra a 96 pozzetti e mantenute in coltura per 21 giorni in differenti condizioni di crescita.

Al termine del trattamento le cellule sono state sottoposte alla colorazione Alizarin Red, come precedentemente descritto nell'esempio 2, per valutare la formazione di noduli mineralizzati.

I risultati della colorazione indicano che l'inibizione dell'attività dell'enzima LSD-1, ottenuta mediante la somministrazione sia di tranilcipromina che del composto MC2580, è in grado di favorire la mineralizzazione anche in assenza degli induttori dell'osteogenesi desametasone e acido ascorbico.

La somministrazione di glicerolo 2-fosfato è invece necessaria, in quanto tale fattore funge da donatore di gruppi fosfato indispensabili per la formazione dei noduli mineralizzati.

Esempio 6 - L'attività dell'enzima LSD-1 è inibita durante il differenziamento osteogenico

Per valutare se l'attività dell'enzima LSD-1 fosse inibita durante il differenziamento osteogenico, è stato effettuato un saggio di attività enzimatica *in vitro* su cellule W20-17 al fine di valutare la percentuale di inibizione dell'attività di LSD-1 in differenti condizioni.

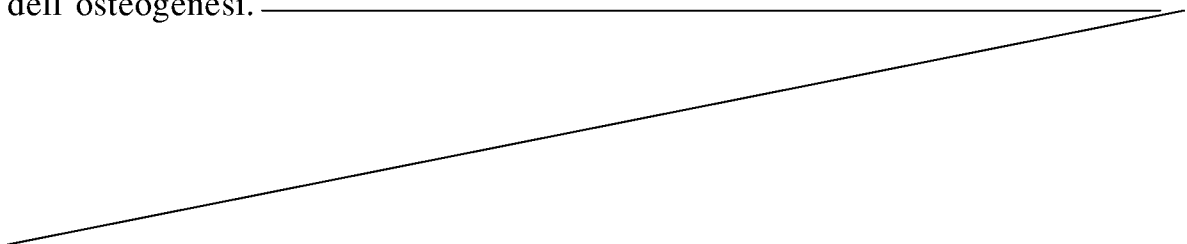
I risultati ottenuti mostrano che l'attività dell'enzima è inibita durante il differenziamento osteogenico (cellule in coltura con mezzo osteogenico) e che la percentuale di inibizione incrementa quando il mezzo di coltura viene supplementato con il composto MC2580.

Esempio 7 - L'enzima LSD-1 ha una bassa espressione nelle fasi iniziali del differenziamento

È stato valutato il profilo di espressione del gene LSD-1 in cellule W20-17 durante il differenziamento osteogenico.

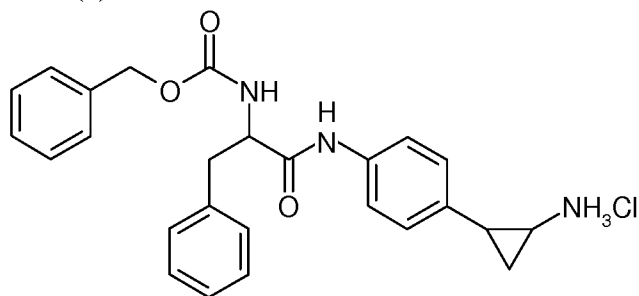
L'RNA totale è stato estratto a 0, 4, 14 e 21 giorni di differenziamento e il livello di espressione di LSD-1 è stato determinato mediante Real time PCR, secondo la procedura precedentemente descritta nell'esempio 3.

I risultati ottenuti mostrano che il gene di interesse è espresso a livelli molto bassi nelle fasi iniziali del differenziamento (t0 e t4), mentre la sua espressione comincia ad aumentare dal quattordicesimo giorno, suggerendo quindi che LSD-1 potrebbe essere down-regolato nelle fasi precoci dell'osteogenesi.



RIVENDICAZIONI

1. Inibitori dell'enzima LSD-1 per l'uso nel differenziamento osteogenico di cellule in grado di differenziarsi in osteoblasti e/o nel mantenimento della maturazione ossea.
2. Inibitori secondo la rivendicazione 1, in cui le cellule sono cellule mesenchimali staminali.
3. Inibitori secondo la rivendicazione 1, in cui le cellule sono cellule staminali dell'adulto.
4. Inibitori secondo la rivendicazione 1, in cui le cellule sono cellule con potenziale osteogenico.
5. Inibitori secondo le rivendicazioni 1-4, in cui l'inibitore è tranilcipromina.
6. Inibitori secondo le rivendicazioni 1-4, in cui l'inibitore è il composto MC2580 di formula (I):



(I).

7. Inibitori secondo le rivendicazioni 1-6, per l'uso in campo ortopedico e/o chirurgico.
8. Inibitori secondo le rivendicazioni 1-7, per l'uso nel trattamento di patologie ossee dovute a riduzione della neosintesi ossea oppure all'aumento del riassorbimento osseo.
9. Inibitori secondo la rivendicazione 8, in cui le patologie ossee sono osteoporosi, osteomalacia, fratture ossee discontinue.

10. Inibitori secondo le rivendicazioni 1-7, per l'impiego in artrodesi e/o dispositivi medici per l'uso nell'induzione della sintesi ossea per il riparo di fratture.

11. Inibitori secondo le rivendicazioni 1-6, per l'uso nella preparazione di mezzi di coltura e/o sostitutivi del siero e/o qualsiasi additivo per la coltura cellulare.

12. Composizione farmaceutica comprendente un inibitore dell'enzima LSD-1 per l'uso nel differenziamento osteogenico di cellule in grado di differenziarsi in osteoblasti e/o nel mantenimento della maturazione ossea.

Milano, 28 ottobre 2011