

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	10202000006517
Data Deposito	27/03/2020
Data Pubblicazione	27/09/2021

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	31	437

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	D	471	04

Titolo

Small molecules che inducono la degradazione della proteina prionica cellulare

Titolo: "Piccole molecole che inducono la degradazione della proteina prionica cellulare"

DESCRIZIONE

La presente invenzione trova applicazione in campo
5 medico e, in particolare, nel trattamento dei disturbi
legati alla proteina prionica cellulare (PrP^C).

Campo tecnico dell'invenzione

L'invecchiamento è legato a molteplici cambiamenti
molecolari, cellulari e funzionali, che influenzano in
10 particolare l'integrità del sistema nervoso.

Un processo fondamentale alterato
dall'invecchiamento è la ripiegatura delle proteine.
Quando le proteine si ripiegano male, acquisiscono
conformazioni alternative, ricche di foglietti- β , in grado
15 di innescare unacascata di eventi molecolari, portando
infine a disfunzioni neuronali e alla morte. Gli aggregati
associati alle malattie, spesso denominati fibrille
amiloidi, possono derivare da proteine prive di sequenza o
omologia strutturale ed essere associati ad una vasta
20 gamma di sindromi e fenotipi clinici; esempi includono
disturbi comuni come il Parkinson e il morbo di Alzheimer,
così come disturbi più rari come la sclerosi laterale
amiotrofica o le malattie da prioni.

Le malattie da prioni, che comprendono la malattia
25 di Creutzfeldt-Jakob (CJD), la sindrome di Gerstmann-

Sträussler-Scheinker (GSS) e l'insonnia familiare fatale (FFI), sono patologie legate al misfolding proteico che può manifestarsi in modo sporadico, ereditario o trasmissibile o acquisito.

5 Le malattie prioniche, note anche come encefalopatie spongiformi trasmissibili, sono associate alla conversione conformazionale della PrP^C, una glicoproteina ancorata alla superficie cellulare tramite glicosil-fosfatidilinositolo endogeno (GPI), in una
10 isoforma erroneamente piegata chiamata "forma di scrapie della PrP" (o PrP^{Sc}) che si accumula che si accumula nel sistema nervoso centrale degli individui colpiti.

 La PrP^{Sc} è una proteina infettiva (prione) priva di qualsiasi informazione codificata tramite acido nucleico
15 in grado di propagarsi come un agente infettivo (prione) legandosi direttamente alla PrP^C e innescando il suo riassetto conformazionale in nuove molecole di PrP^{Sc}, catalizzando la conversione strutturale della sua controparte fisiologica.

20 Nonostante queste caratteristiche peculiari, crescenti evidenze derivanti da studi genetici, biofisici e biochimici indicano che i meccanismi patogeni che operano nelle malattie da prioni possono essere alla radice dei percorsi neurodegenerativi che si verificano
25 in diversi altri disturbi.

Ad esempio, sta diventando evidente che la PrP^C svolge un duplice ruolo nelle malattie da prioni, essendo sia un substrato per la replicazione della PrP^{Sc}, sia un mediatore della sua tossicità [1].

5 Questo concetto è stato inaspettatamente ampliato da dati che coinvolgono gli assemblaggi oligomerici del peptide β amiloide (A β) e della proteina alfa-sinucleina, che si ritiene causino la sinaptotossicità alla base del declino cognitivo del Parkinson e del morbo di Alzheimer,
10 rispettivamente. Infatti, diversi studi hanno fornito la prova che la PrP^C potrebbe mediare la tossicità degli assemblaggi oligomerici di A β e alfa-sinucleina, suggerendo che assemblaggi sbagliati di diverse proteine patogene potrebbero esercitare i loro effetti dannosi
15 bloccando, potenziando o alterando la normale attività della PrP^C. Inoltre, la ricerca in campi ancora più lontani ha evidenziato ruoli sorprendenti per la PrP^C in diversi contesti fisiologici e di malattia al di fuori del cervello, come i disturbi mielinici, le malattie
20 autoimmuni e il cancro (Kuffer, A., et al., La proteina prionica è un ligando agonistico del recettore Adgrg6 accoppiato alla proteina G. *Natura*, 2016; Mabbott, N.A., Immunologia della proteina Prion e Prioni. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2017; Hirsch, T.Z., S. Martin-Lannere, e S.
25 Mouillet-Richard, Funzioni della proteina Prion. *Prog Mol*

Biol Transl Sci, 2017).

È importante notare che molti dati indicano che inibire la funzione della PrP^C nei pazienti può essere la strategia più efficace per contrastare gli eventi
5 neurotossici senza causare gravi effetti collaterali dannosi [4].

Questa ipotesi è stata recentemente rafforzata dall'identificazione di alleli con perdita di funzione in individui sani, a sostegno della sicurezza delle
10 strategie terapeutiche mirate alla PrP^C.

Così, i composti in grado di modulare l'espressione e/o l'attività della PrP^C potrebbero fornire una prospettiva terapeutica completamente nuova per le malattie legate alla proteina prionica cellulare (PrP^C) o
15 agli interattori della PrP^C o a vie di segnale tossici che coinvolgono la PrP^C.

Questi includono disturbi neurodegenerativi, come le malattie prioniche sporadiche, ereditarie o acquisite, il morbo di Alzheimer, il morbo di Parkinson e altre a-
20 sinucleinopatie; disturbi neuroinfiammatori e malattie demielinizzanti, come la sclerosi multipla; il cancro, in particolare il glioblastoma, il cancro gastrico, il cancro al seno, il cancro al colon.

L'evidenza sperimentale supporta la logica
25 dell'impiego di tecnologie computazionali all'avanguardia

per identificare nuove terapie per una varietà di patologie umane.

Tale processo, spesso indicato come scoperta di farmaci assistita dal computer, si basa su informazioni precise riguardanti la struttura tridimensionale delle 5 proteine (la cosiddetta "conformazione nativa") associata alla malattia di interesse e, opzionalmente, su come tale struttura possa essere alterata per generare isoforme mal piegate.

10 L'elucidazione dei meccanismi molecolari alla base dei percorsi di ripiegamento e di misfolding delle proteine associate alla malattia è un prerequisito per la progettazione di terapie efficaci.

Tuttavia, gli approcci sperimentali volti ad 15 affrontare le dinamiche di ripiegamento delle proteine sono seriamente influenzati dal tradeoff tra le risoluzioni temporali e spaziali delle tecniche biofisiche disponibili. Le tecnologie basate sul computer, come le simulazioni di dinamica molecolare 20 (MD), potrebbero in linea di principio superare questi limiti e aiutare a prevedere l'evoluzione nel tempo della conformazione delle proteine. In pratica, tuttavia, le simulazioni classiche MD non sono applicabili per studiare molti processi molecolari fondamentali, come la 25 cascata di eventi alla base del ripiegamento di un tipico

polipeptide biologicamente rilevante più grande di 100 aminoacidi. Il motivo è che i tempi che possono essere simulati da MD, anche sui supercomputer più potenti, sono comunque di ordini di grandezza inferiori a quelli in cui avvengono le principali transizioni strutturali.

Gli inventori hanno impiegato i recenti progressi tecnologici nel campo della biochimica computazionale per progettare un paradigma di scoperta di farmaci completamente nuovo, basato sulla logica della regolazione negativa dell'espressione delle proteine, mirando agli intermedi di ripiegamento. L'approccio applicato alla proteina prionica ha sorprendentemente portato all'identificazione di una tasca all'interno di un intermedio di ripiegamento di detta proteina e alla progettazione di nuove molecole che, legando tale tasca, inibiscono efficacemente l'espressione della proteina prionica.

Riassunto dell'invenzione

Gli inventori hanno sorprendentemente scoperto che, per superare i limiti dei metodi dell'arte nota, si potrebbe applicare un paradigma sperimentale innovativo per la scoperta di farmaci, denominato "inattivazione della proteina farmacologica mediante il folding intermediate targeting" (PPI-FIT), in grado di identificare piccoli ligandi organici per intermedi di

5 folding di una proteina più cineticamente e termodinamicamente rilevanti al fine di stabilizzare tale conformazione, promuovere la sua degradazione da parte del macchinario di controllo della qualità cellulare e quindi inibire la formazione della proteina matura.

10 Gli inventori hanno identificato molecole caratterizzate da diverse impalcature (strutture) chimiche, che sono in grado di interagire con un intermedio di ripiegamento della proteina prionica cellulare (PrP^C). Questi composti hanno la notevole capacità di sopprimere l'espressione della PrP^C nelle cellule aumentandone la degradazione post-traslazionale.

15 Di conseguenza, le impalcature (strutture chimiche) scoperte sono utili per il trattamento di malattie o disturbi legati alla proteina prionica cellulare (PrP^C).

20 Questi includono disturbi neurodegenerativi, come le malattie prioniche sporadiche, ereditarie o acquisite, il morbo di Alzheimer, il morbo di Parkinson e altre α -sinucleinopatie; disturbi neuroinfiammatori e malattie demielinizzanti, come la sclerosi multipla; il cancro, in particolare il glioblastoma, il cancro gastrico, il cancro al seno, il cancro al colon.

Oggetto dell'invenzione

25 Un primo oggetto dell'invenzione è rappresentato dai composti all'interno delle formule generali della

rivendicazione 1, e dalle rivendicazioni dipendenti, in grado di indurre la degradazione della proteina prionica cellulare e che sono identificati utilizzando la metodologia PPI-FIT.

5 Composti specifici all'interno della presente invenzione rappresentano particolari forme di realizzazione.

 In un secondo oggetto, la presente invenzione descrive le composizioni farmaceutiche che comprendono i
10 composti dell'invenzione.

 In un terzo oggetto, l'invenzione descrive i composti all'interno della formula generale dell'invenzione, i composti specifici così come le composizioni farmaceutiche che li compongono, per l'uso
15 come medicinale.

 In particolare, i composti dell'invenzione sono divulgati per l'uso nel trattamento di malattie o disturbi legati alla proteina prionica cellulare (PrP^C) o di interattori della PrP^C o di vie di segnale tossiche
20 che coinvolgono la PrP^C, compresi i disturbi neurodegenerativi, come le malattie prioniche sporadiche, ereditarie o acquisite, il morbo di Alzheimer, il morbo di Parkinson e altre α -sinucleinopatie; disturbi neuroinfiammatori e malattie demielinizzanti, come la
25 sclerosi multipla; il cancro, in particolare il

glioblastoma, il cancro gastrico, il cancro al seno, il cancro al colon.

In un ulteriore oggetto, viene divulgato un metodo per il trattamento di malattie e/o disturbi legati alla proteina prionica cellulare (PrP^C) o di interattori della PrP^C o di vie di segnale tossiche che coinvolgono la PrP^C che comprendono la somministrazione di un composto dell'invenzione o di una composizione farmaceutica che comprende un composto dell'invenzione a un paziente che ne ha bisogno.

Un composto dell'invenzione può essere eventualmente somministrato in combinazione con altre molecole terapeutiche.

Breve descrizione delle figure

Figura 1: strutture 3D del dominio globulare, C-terminale del dominio nativo PrP^C (a sinistra) e del suo intermedio di ripiegamento FI-PrP (a destra). In FI-PrP è stata identificata un'unica tasca di legame (a destra). Tale tasca non è accessibile nella PrP^C nativa (sinistra).

Figura 2: Rappresentazione della struttura di PrP. A. rappresentazione schematica della struttura di PrP umana. La proteina è organizzata come segue: un peptide di segnale (residui 1-22), precede cinque ripetizioni di ottapeptidi contenenti istidina (residui 51-89), che

possono legare ioni divalenti. La regione centrale comprende un dominio idrofobico altamente conservato (residui 111-134). Il C-terminale, dominio globulare (risolto da NMR, PDB 1QLX, mostrato nel pannello B) 5 comprende due brevi β -filii anti-parallelo (residui 127-129; e 166-168) e tre α -eliche (H1, H2 e H3, residui 143-152, 171-191 e 199-221, rispettivamente). Un peptide C-terminale (residui 232-253) viene rimosso per consentire 10 l'attacco di una frazione di glicosilfosfatidilinositolo (GPI), che fissa la proteina al foglietto esterno della membrana plasmatica. Il dominio globulare contiene anche due catene oligosaccaridiche legate tramite N (a Asn-181 e Asn-197) e un legame disolfuro tra i residui 179 e 214.

Figura 3: tasca di legame unica identificata 15 nell'intermedio di ripiegamento PrP, evidenziata in grigio. Il riquadro mostra i residui specifici che definiscono il sito.

Figura 4: Schema sintetico di SM875. Reagenti e condizioni: (a) soluzione acquosa di NaHCO_3 ; (b) riflusso 20 di etanolo, 2 h; (c) 1:1 metanolo/aqueo 2M NaOH, riflusso 1h; (d) 180°C , 10 min; 61%; (e) riflusso di etanolo 2,5 h, purificazione HPLC, 25%. La numerazione arbitraria dell'intermedio sintetico [1-(4-bromofenil)-1H-pirazol-5-ammina] viene utilizzata per l'assegnazione di 1H-NMR: 25 [δH 7.58(d, J 8.7 Hz, H-3'and H-5'), 7.47(d, J 8.7 Hz, H-

2' and H-6'), 7.41(s, H-3), 5.62 (s, H-4)].

Figura 5: Caratterizzazione strutturale di SM875.

A. Spettro $^1\text{H-NMR}$ di SM875 (pannello superiore, 400 MHz) in CDCl_3 con CHCl_3 residuo a 7,25 ppm. Spettro $^{13}\text{C-NMR}$ (pannello inferiore, 100 MHz) di SM875 in CDCl_3 . **B.** Analisi ESI-MS per infusione diretta di una soluzione di metanolo dello spettro SM875 in modalità ionica negativa con m/z 412.1/414.1 corrispondente al segnale $[\text{M-H}]$ (pannello superiore); frammentazione che mostra m/z 397.1/399.1 (pannello inferiore); **C.** Spettro IR del prodotto finale SM875. Bande rilevanti (cm^{-1}): 1681s, 1543s, 1515s, 1490s, 1274s, 991m, 828m, 728 vs; **D.** (i) Il pannello superiore mostra l'analisi LC-ESI-MS di SM875 separata da una colonna RP18 in acetonitrile/acqua 70:30 e rilevata a 254 nm (flusso 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$). Il pannello inferiore mostra il cromatogramma a ioni estraibili corrispondente a (ii) m/z 414/416 $[\text{M+H}]^+$ ione per $\text{C}_{19}\text{H}_{1779}\text{BrN}_{303}$ / $\text{C}_{19}\text{H}_{1781}\text{BrN}_{303}$.

Figura 6: **A.** Struttura chimica di SM875. **B-C.**

Trattamento dose-risposta di SM875 in cellule HEK293 (ATCC, CRL-1573) stabilmente trasfettate con PrP^{C} murina o NEGR-1, come rilevato da Western blot utilizzando con specifici anticorpi anti- PrP^{C} (B) o anti-NEGR-1 (C). **D.** Trattamento dose-risposta di SM875 nella linea di cellule tumorali della mammella umana ZR-75 che esprimono la PrP^{C}

umana in modo endogeno, come rilevato dal trattamento dei blot con un anticorpo specifico anti-PrP^C.

Figura 7: Effetto SM785 sull'elaborazione post-traslazionale di PrP^C. cellule HEK293 murine che esprimono stabilmente PrP^C sono state esposte a diverse concentrazioni di SM875 (mostrato) o veicolo (DMSO, volume equivalente) per 24 ore, lisate, trattate con l'enzima PNGase-F per rimuovere residui di zucchero, e analizzati tramite Western blotting.

Figura 8: Effetto di SM875 sulla localizzazione cellulare di PrP^C. Analisi di immunofluorescenza di cellule HEK293 che esprimono in modo stabile la PrP^C marchiata ("taggata" con) EGFP incubata con SM875 (**B e C**) o controllo del veicolo (DMSO) (**A**).

Figura 9: **A.** Struttura chimica del derivato SM875 SM898. **B.** Saggio di vitalità cellulare in cellule HEK293 che esprimono PrP^C, tramite il saggio MTT. **C.** Effetti di SM875 e SM898 sull'espressione della PrP^C, tramite il saggio *Western blotting*.

Figura 10: Analisi degli effetti del composto derivato da PPI-FIT SM930 sull'espressione di PrP^C. **A.** Struttura chimica di SM930; **B.** Saggio di vitalità cellulare in HEK293 (pannello sinistro) o cellule ZR-75 (pannello destro), tramite il saggio MTT, dimostrando che SM930 induce morte cellulare alla più alta concentrazione

testata (30 μM); **C.** Immagini rappresentative da Western blotting e grafici di quantificazione che mostrano che SM930 sopprime significativamente l'espressione PrP^C del mouse alla più alta concentrazione (30 μM), ma non la proteina di controllo NEGR-1, quando testato in cellule HEK293 trasformate stabilmente; **D.** Immagini rappresentative da Western blotting e grafici di quantificazione che mostrano che SM930 sopprime significativamente l'espressione PrP^C umana (a partire dalla concentrazione di 3 μM), ma non la proteina di controllo Thy-1, quando testato in cellule tumorali del seno umano ZR-75 non trasformate. Le differenze statistiche sono state stimate da Anova a senso unico, test Dunnet post-hoc. valori p sono: * <0.05 , ** <0.01 , *** <0.001 .

Figura 11: Analisi degli effetti del composto derivato da PPI-FIT SM940 sull'espressione di PrP^C. **A.** Struttura chimica di SM940; **B.** Saggio di vitalità cellulare in cellule HEK293 o ZR-75, tramite il saggio MTT, dimostra che che SM940 non induce la morte cellulare rilevabile alle concentrazioni testate (indicato); **C.** Immagini rappresentative da Western blotting e grafici di quantificazione che mostrano che SM940 sopprime significativamente l'espressione PrP^C murina a partire da 3 μM , ma non la proteina di controllo NEGR-1, quando

testato in cellule HEK293 stabilmente trasformate; **D.** Immagini rappresentative da Western blotting e grafici di quantificazione che mostrano che SM940 sopprime significativamente l'espressione PrP^C umana (a partire
5 dalla concentrazione di 3 μ M), ma non la proteina di controllo Thy-1, quando testata in cellule tumorali del seno umano ZR-75 non trasformate. Le differenze statistiche sono state stimate da Anova a senso unico, test Dunnet post-hoc. valori p sono: * <0.05 , ** <0.01 .

10 **Figura 12:** Analisi degli effetti del composto derivato da PPI-FIT SM950 sull'espressione PrP^C. **A** Struttura chimica di SM950; **B.** Saggio di vitalità cellulare in cellule HEK293 o ZR-75, tramite saggio MTT, dimostra che SM950 induce morte cellulare ad alcune delle
15 concentrazioni testate (indicato); **C.** Immagini rappresentative da Western blotting e grafici di quantificazione che mostrano che SM950 sopprime significativamente l'espressione PrP^C del mouse a partire da 10 μ M, ma non la proteina di controllo NEGR-1, quando
20 testato in cellule HEK293 stabilmente trasformate; **D.** Immagini rappresentative da Western blotting e grafici di quantificazione che mostrano che SM950 sopprime significativamente l'espressione PrP^C umana (a partire dalla concentrazione di 1 μ M), ma non la proteina di
25 controllo Thy-1, quando testata in cellule tumorali del

seno umano ZR-75 non trasformate. Le differenze statistiche sono state stimate da Anova a senso unico, test Dunnet post-hoc. p valori sono: * <0.05 , ** <0.01 , *** <0.001 .

5 **Figura 13:** Analisi PCR in tempo reale dei livelli di mRNA della PrP^C dopo il trattamento con il composto. SM875 non diminuisce i livelli di mRNA di PrP^C in: **A**, cellule HEK293 stabilmente trasfettate; **B**, cellule umane non trasformate di cancro al seno ZR-75; o **C**, fibroblasti di topo L929. Allo stesso modo, i composti SM940 (**D**) e 10 SM950 (**E**) non sopprimono i livelli di mRNA di PrP^C murina nelle cellule HEK293. Questi risultati dimostrano che i diversi composti non diminuiscono la quantità di mRNA di PrP^C, dimostrando così che agiscono a livello post-15 traslazionale. È interessante notare che un aumento significativo di mRNA di PrP^C è stato occasionalmente rilevato per alcune cellule/concentrazioni, indicando eventualmente una risposta compensatoria delle cellule alla diminuzione indotta della PrP^C a livello proteico. 20 Le differenze statistiche sono state stimate da Anova a senso unico, Dunnet post-hoc test. p valori di p sono: * <0.05 .

Figura 14: I composti derivati da PPI-FIT SM875 e SM940 inducono l'aggregazione di PrP^C ricombinante in 25 modo dipendente dalla temperatura. **A.** Schema

dell'esperimento. Al fine di osservare un effetto diretto delle molecole identificate sulla PrP^C in vitro, è stato progettato un paradigma sperimentale in cui la PrP^C nella sua forma matura ripiegata viene riscaldata a diverse temperature con la speranza di fornire energia sufficiente a consentire la sua transizione conformazionale al previsto intermedio di ripiegatura (FI-PrP). Se l'intermedio di ripiegatura appare come conseguenza dell'innalzamento della temperatura, allora gli inventori hanno previsto che i composti dell'invenzione, per esempio SM875 o SM940, dovrebbero essere in grado di legarlo, causandone la stabilizzazione e quindi probabilmente inducendone l'aggregazione, poiché l'FI-PrP espone residui idrofobici di solvente che sono invece sepolti all'interno del nucleo proteico della PrP^C nella forma ripiegata (matura). L'aggregazione della proteina ricombinante PrP è stata valutata con un test di insolubilità in detergente. **B.** Immagini rappresentative da Western blotting che mostrano gli effetti dipendenti dalla temperatura sull'aggregazione di PrP esercitati dai composti SM875 e SM940. L'aumento di temperatura è stato il seguente: corsie 1,5, T = 25°C; corsie 2,6, T = 37°C; corsie 3,7, T = 45°C; corsie 4,8, T = 55°C. **C.** Grafici di distribuzione che illustrano i risultati. I composti SM875 e SM940 hanno causato l'aumento della quantità di

PrP ricombinante insolubile in funzione della temperatura. Al contrario, non sono stati rilevati effetti nei controlli non trattati, o quando la proteina è stata incubata con la molecola SM935. Questi risultati
5 indicano che il composto SM875 e SM940 si legano ad un intermedio di ripiegamento di PrPC (cioè FI-PrP). Le differenze statistiche sono state stimate da Anova unidirezionale, Dunnet post-hoc test. p valori sono: * <0.05 , ** <0.01 .

10 **Figura 15:** SM875 induce l'attivazione dell'autofagia in modo dipendente dalla PrP^C e i suoi effetti sono inibiti dall'inibitore dell'autofagia Bafilomicina A1. **A.** In primo luogo, le cellule HEK293 stabilmente trasformate con PrP^C murina o non trasformate
15 sono state trattate con SM875 a diverse concentrazioni e poi i livelli del marcatore autofagico LC3II sono stati valutati da Western blotting. Immagini rappresentative (sopra) e la quantificazione corrispondente (grafico a barre qui sotto) mostrano che SM875 induce un grande
20 aumento di LC3II in cellule esprimenti PrP^C- (HEK293 WT-PrP) e un aumento molto minore in cellule non trasformate. Tuttavia, si deve notare che le cellule non trasformate esprimono endogenamente livelli di PrP^C bassi ma ancora rilevabili, che possono eventualmente spiegare
25 il piccolo aumento di LC3III rilevato in queste cellule.

I dati sono stati normalizzati sull'effetto del trealosio (TRE), un induttore autofagico noto, che come previsto ha aumentato i livelli di LC3-II sia nelle cellule che esprimono la PrP^C che in quelle non trasfettate. **B.**

5 Successivamente, le cellule tumorali della mammella ZR-75 che esprimono la PrP^C umana in modo endogeno sono state trattate con concentrazioni crescenti di SM875, in presenza o meno di Bafilomicina A1 (BAF), un noto inibitore della degradazione lisosomiale. Le immagini

10 rappresentative (sopra) e la corrispondente quantificazione (grafico a barre sotto) mostrano che il BAF impedisce quasi completamente la diminuzione dei livelli di PrP^C indotta da SM875. Collettivamente, questi dati indicano che SM875 promuove la degradazione post-

15 traslazionale della PrP^C attraverso la via autofagica dipendente dal lisosoma. Le differenze statistiche sono state stimate da Anova a senso unico, Dunnet post-hoc test. p valori di p sono: * <0.05 , ** <0.01 , *** <0.001 .

Figura 16: SM875 inibisce la replicazione dei prioni nei fibroblasti di topo. **A.** Lo schema illustra il layout sperimentale, utilizzando come esempio l'effetto del Fe (III) -TMPyP, un composto anti-prione descritto precedentemente (Massignan et al. SciRep 2016). **B.** Le cellule sono state incubate con concentrazioni crescenti

25 di SM875 (indicato) o con TMPyP (10 μ M) e il livello di

PrP resistente alla PK è stato quantificato tramite Western blotting. I risultati hanno mostrato che, analogamente al controllo positivo TmPyP, SM875 inibisce i livelli di prioni in modo dose-dipendente. Le
5 differenze statistiche sono state stimate da Anova a senso unico, test Dunnet post-hoc. p valori di p: * <0.05 , ** <0.01 , *** <0.001 .

Descrizione dettagliata dell'invenzione

Definizioni

10 Ai sensi della presente invenzione, una malattia o patologia è una condizione risultante da una risposta fisiopatologica a fattori esterni o interni.

 Un disturbo è un'alterazione delle funzioni normali o regolari del corpo o di una parte del corpo a causa di
15 una malattia.

 Sindrome è un termine che si riferisce a una malattia o a un disturbo che ha più di una caratteristica o sintomo identificativo.

 Nell'ambito della presente invenzione, i termini
20 malattia, disturbo, patologia sono utilizzati in modo intercambiabile e vanno intesi nel significato più ampio di malattia.

 Come usato nella presente invenzione, il termine
"trattamento" si riferisce all'uso di un composto per
25 scopi terapeutici, che includono la diminuzione o la

prevenzione dei sintomi della malattia, la progressione più lenta di tali sintomi, l'abrogazione dei sintomi, così come l'abrogazione totale o parziale della causa della malattia.

5 All'interno della presente invenzione, una malattia neurodegenerativa è una malattia risultante da processi neurodegenerativi, ad esempio la progressiva perdita di struttura o funzione dei neuroni, compresa la morte neuronale.

10 Le malattie neurodegenerative includono, ma non sono limitate a, il morbo di Parkinson, il morbo di Alzheimer, la malattia di prione, la sclerosi laterale amiotrofica.

I disturbi neuroinfiammatori sono condizioni in cui
15 le risposte immunitarie danneggiano i componenti del sistema nervoso.

Una malattia demielinizzante è una malattia del sistema nervoso in cui la guaina mielinica dei neuroni è danneggiata.

20 Come definito nel presente documento e nella WO 2020/021493, la fase di modellazione di una sequenza nel tempo di un percorso di ripiegatura delle proteine viene effettuata mediante simulazioni al computer basate sugli approcci di Meccanica Molecolare (MM) o Meccanica
25 Quantistica-Meccanica Molecolare (QM-MM). Tali

simulazioni al computer sono basate sulla dinamica molecolare Ratchet-and-pawl, e/o su un approccio di calcolo funzionale Bias, e/o per mezzo di un approccio di calcolo Self-Consistent Path Sampling.

5 Maggiori dettagli sugli algoritmi esemplari che possono essere efficacemente utilizzati per effettuare la suddetta fase di modellazione dell'evoluzione temporale di un percorso di piegatura delle proteine si possono trovare nei lavori scientifici "S. Orioli, S. a Beccara, 10 e P. Faccioli, J. Chem. Phys. 147, 064108 (2017)"; "C. Camilloni, R. A. Broglia, e G. Tiana, J. Chem. Fis. 134, 045105 (2011)"; "S. a Beccara, L. Fant, e P. Faccioli, Phys. Rev. Lett. 114, 098103 (2015)".

Nel contesto della presente invenzione, il 15 "percorso di ripiegatura" descrive il passaggio da una proteina dispiegata alla sua piega nativa nel corso del tempo, cioè come una catena di aminoacidi raggiunge il suo stato termodinamicamente stabile. Nel contesto delle "vie di ripiegamento delle proteine" e delle "vie di 20 ripiegamento", menzionate nella presente descrizione, si intende all'interno della sintesi proteica endogena, e non correlate a processi di denaturazione o di rinaturazione o a conformeri o "conformazioni di breve durata".

25 La "drogabilità" è la capacità di una proteina, o

di qualsiasi "conformero" di una proteina, di consentire il legame di un farmaco (ad esempio, una piccola molecola, qualsiasi altro composto organico, un peptide o un anticorpo), causando così potenziali benefici terapeutici per i pazienti. Un "conformero" è ogni conformazione alternativa dello stesso polipeptide. Esso riflette l'isomerismo conformazionale dei polipeptidi e il carattere statistico degli stati termodinamici delle macromolecole.

10 Nella presente descrizione, coerentemente con una terminologia comunemente usata nel campo della ricerca farmaceutica, il termine "tasca" indica una regione spaziale della struttura proteica terziaria adatta a legare una piccola molecola.

15 In particolare, il concetto di sacche drogabili si riferisce ad uno specifico sito di legame di un bersaglio proteico legato alla malattia in grado di legare molecole simili ai farmaci ottenendo così una modulazione della funzione biologica della proteina.

20 Quando il sito di legame non è noto da una struttura 3D (ad esempio, complesso ligando-proteico) o da altri dati sperimentali (ad esempio, mutazioni della resistenza ai farmaci), si possono utilizzare metodi di calcolo per suggerire le posizioni probabili.

25 Di conseguenza, diverse proprietà e/o parametri e/o

descrittori di tasche globali (e rispettivi valori esemplari) possono essere utilizzati per caratterizzare i siti/tasche di rilegatura.

Ad esempio, un'adeguata tasca drogabile può essere
5 caratterizzata da una deviazione radice-media-quadrata (RMSD) più grande di una soglia di deviazione radice-media-quadrata dalla tasca presente allo stato nativo.

In un esempio non limitativo, detta soglia di deviazione radice-media-quadrato è pari a 2 Ångström (Å)
10 o superiore a 2 Ångström (Å).

Secondo la presente invenzione, la tasca è definita in termini di parametri di tasca che sono strumentali per prevedere la sua drogabilità attraverso il confronto di tali parametri di tasca con le rispettive soglie.

15 Tali parametri di tasca comprendono i parametri dimensionali, e/o i parametri di forma, e/o i parametri di posizione, e/o il rapporto tra carattere idrofobico e idrofilo.

In particolare, i parametri dimensionali della
20 tasca possono comprendere il volume della tasca e/o la profondità della tasca e/o dell'involucro e l'esposizione della tasca. L'esposizione e le proprietà dell'involucro forniscono una misura diversa di quanto il sito sia aperto al solvente.

25 In un esempio di implementazione, la soglia di

volume tascabile è di almeno 300 Å³.

In un esempio di implementazione, la soglia di esposizione della tasca è inferiore a 0,5 e la soglia della custodia della tasca è almeno 0,7.

5 In un esempio di implementazione, la soglia di profondità della tasca è di almeno 10Å.

I parametri di punteggio per l'identificazione dei "hot spots" della proteina comprendono "SiteScore", e/o "Dscore", e/o "DrugScore" e/o il bilancio tascabile.

10 Questi parametri sono noti nel campo della modellazione e della caratterizzazione delle proteine e degli intermedi proteici, e si basano su un mix di valori, relativi a diverse proprietà, adatti a valutare la "drogabilità" di una proteina allo stato nativo o di
15 un intermedio proteico di ripiegamento.

Infatti, tali parametri di punteggio derivano da pacchetti di software di valutazione noti.

Ad esempio, SiteMap (Halgren TA (2009) "Identificazione e caratterizzazione di siti vincolanti e
20 valutazione della drogabilità", J. Chem. Inf. Modello 49: 377-389) prevede un punteggio del sito (SiteScore) e un punteggio di drogabilità (DScore) attraverso una combinazione lineare di soli tre singoli descrittori: la
dimensione della tasca di rilegatura, il suo recinto, e
25 una penalità per la sua idrofilia.

Un altro esempio è DoGSiteScorer (A. Volkamer, D. Kuhn, T. Grombacher, F. Rippmann, M. Rarey, "Combining global and local measures for structure-based druggability predictions" J. Chem. Inf. Modello. 5 2012,52,360-37), che genera anche un punteggio di drogabilità (DrugScore) che va da zero a uno.

La selezione si basa sul confronto dei parametri di punteggio con le rispettive soglie.

All'interno della presente invenzione, i parametri di punteggio sono stati definiti come segue:

la soglia SiteScore tascabile è di 0,8.

la soglia del DScore tascabile è di 0,9.

la soglia tascabile di DrugScore è di 0,5.

la soglia di equilibrio tascabile è di 1,0.

15 Mentre i criteri per l'identificazione e la selezione dell'intermedio di ripiegamento e della tasca di legame con il composto come sopra elencati, si basano su un confronto di parametri e/o valori relativi alle proprietà scelte con le rispettive soglie, la persona
20 esperta nell'arte può capire che i valori esemplari e le rispettive soglie possono essere soggetti a modifiche a seconda del tipo di proteina o di altri requisiti, senza che ciò influisca sulla definizione di tasca di legame con il composto.

25 L'inattivazione delle proteine farmacologiche

tramite il Folded Intermediate Targeting (metodologia PPI-FIT)

Il metodo per identificare gli intermedi di ripiegamento della proteina bersaglio adatti ad essere testati come bersagli per le procedure di scoperta del farmaco divulgate in WO 2020/021493 è applicato nella presente invenzione alla progettazione e selezione di composti contro l'intermedio di ripiegamento più cineticamente e termodinamicamente rilevante della proteina prionica, al fine di stabilizzare tale intermedio e inibire la sua transizione alla forma nativa. In un ambiente cellulare, detto intermedio stabilizzato di ripiegamento è riconosciuto dalla macchina di controllo di qualità della cellula come un polipeptide impropriamente piegato e inviato alla degradazione.

Così, gli inventori hanno selezionato composti terapeuticamente rilevanti in grado di diminuire l'espressione della proteina prionica con benefici terapeutici nelle malattie prioniche, ed eventualmente altri disturbi, per esempio i disturbi neurodegenerativi, legati all'attività di trasmissione della tossicità proprio a di questa proteina.

Come primo passo, gli inventori hanno ricostruito l'intera sequenza di eventi alla base del percorso di

ripiegamento della proteina prionica con un livello di risoluzione atomistica.

Questo è stato fatto per mezzo di simulazioni molecolari atomiche basate sull'approccio Bias Functional (BF), come dettagliato in Metodi.

Secondo questo approccio, una prima serie di conformazioni proteiche completamente denaturate si ottiene per mezzo di simulazioni di dinamica molecolare (MD) eseguite a grande temperatura, partendo dalla struttura nativa del cristallo proteico.

Successivamente, da ciascuna delle configurazioni iniziali dispiegate vengono generati molti percorsi di piegatura indipendenti per mezzo di uno specifico algoritmo chiamato rMD (ratchet-and-pawl molecular dynamics), che contiene una forza di polarizzazione per promuovere il tasso di transizione di piegatura.

Infine, la traiettoria meno orientata (LBT) nell'insieme delle traiettorie di piegatura rMD generate a partire dalla stessa condizione dispiegata è stata selezionata calcolando il punteggio funzionale definito Eq.(4) in Metodi.

Per identificare gli intermedi di ripiegatura, tutte le configurazioni visitate dalle traiettorie rMD sono tracciate nel piano definito dalla deviazione quadratica radice-metallo-principale istantanea

(RMSD) alla struttura nativa e alla frazione di contatti nativi.

L'intermedio di ripiegamento è identificato con una regione ad alta densità nell'istogramma di frequenza su questo piano, separata dall'alta densità associata allo stato nativo della proteina.

Le configurazioni nell'intermedio di piegatura vengono poi raggruppate strutturalmente utilizzando algoritmi di clustering standard.

Infine, i target proteici sono stati identificati tra i conformeri dei suddetti cluster, selezionati tra i LBT e che soddisfano i criteri PPI-FIT.

Poi, gli inventori hanno impiegato tecniche di modellazione in-silico e di screening virtuale dei farmaci per identificare ligandi specifici per l'intermedio di ripiegatura PrP^c qui identificato. Potenziali siti di legame unici nella struttura dell'intermedio di ripiegatura e non presenti nella conformazione nativa sono stati identificati sulla superficie dell'intermedio di PrP, tenendo conto delle proprietà tipiche delle tasche di legame ai composti, come il volume, la profondità, l'involucro/esposizione e l'idrofobicità, come mostrato nella tabella 1.

Descriptor	Threshold	FI-PrP pocket
SiteScore	≥ 0.8	0.94
DScore	≥ 0.9	0.94
exposure	≤ 0.5	0.47
enclosure	≥ 0.7	0.75
balance	≥ 1	1.58
volume	$\geq 300 \text{ \AA}^3$	313.54
depth	$\geq 10 \text{ \AA}$	13.59
SimpleScore	≥ 0.5	0.52
DrugScore	≥ 0.5	0.53

Tabella 1

Tra l'elica spostata 1 e l'elica 3, definita da 14, residui non continui (152, 153, 156, 157, 158, 187, 196, 197, 198, 202, 203, 205, 206, 209 con riferimento alla sequenza PDB 1QLX), è stata selezionata una tasca di droga accessibile ai solventi. La conformazione di questa tasca è stata oggetto di una campagna di screening virtuale eseguita utilizzando il software BioSolveIT e impiegando la collezione Asinex Gold & Platinum di piccole molecole ($\sim 3,2 \times 10^5$ composti disponibili in commercio). I risultati positivi sono stati filtrati da diversi strumenti di chemioinformatica per prevedere l'interferenza del Pan-assay (ad esempio la selezione di composti di interferenza del Pan-assay (PAINS) che

reagiscono in modo non specifico con numerosi bersagli biologici piuttosto che influenzare specificamente un bersaglio desiderato), e proprietà come la farmacodinamica, la fisico-chimica e le proprietà ADME (adsorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione).
5 I composti sono stati raggruppati in base alla loro impalcatura chimica ed è stata generata una graduatoria dei candidati colpiti.

A seguito della validazione biologica, come descritto negli esempi qui riportati, sono stati selezionati quattro impalcature (classi) chimiche di molecole terapeutiche e diversi composti attivi.
10

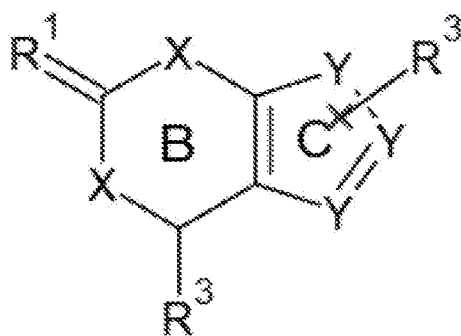
Di conseguenza, un primo oggetto dell'invenzione è rappresentato da impalcature (classi) chimiche in grado di indurre la degradazione della proteina prionica cellulare, identificate mediante la metodologia di inattivazione farmacologica di proteine tramite il folded intermediate targeting (PPI-FIT).
15

Secondo la metodologia dettagliata di cui sopra, le impalcature dell'invenzione hanno sorprendentemente dimostrato di legare in silico una specifica tasca corrispondente ad un sito di legame nell'intermedio di ripiegatura della proteina PrP, che è assente nella sua conformazione nativa.
20

Secondo una prima forma realizzativa preferita, i
25

composti identificati secondo la presente invenzione sono caratterizzati dal seguente impalcatura di Formula I generale (impalcatura I):

5



10 in cui:

l'anello B può essere parzialmente saturo, per esempio un anello di di-idropiridinone quando R¹ è O e/o quando uno o entrambi X è N, o insaturo, per esempio un anello di piridinone quando R¹ è O;

15 R¹ può essere O o S;

ogni atomo di carbonio sull'anello B può essere indipendentemente un atomo C o N;

X può essere selezionato indipendentemente da -C- o -O- o -N(R⁴)-, dove R⁴ può essere -H, or -C₁₋₄ lineare o ciclico alchilico;

20 l'anello C è un anello aromatico a 5- o 6- elementi in cui ogni atomo di carbonio può essere -C- o -N, ad esempio Y può essere indipendentemente -C(R³) o -N(R³)-;

R³ è selezionato tra -H, C₁₋₄ gruppo alchilico lineare o ciclico, alchossilico o arilossilico, anello A

o anello Z A;

preferibilmente, l'anello C ha uno o due eteroatomi;

Z può essere $-\text{CH}_2-$ o $-\text{O}-$ o $-\text{N}(\text{H})-$ o $-\text{S}(\text{O}_2)-$ o

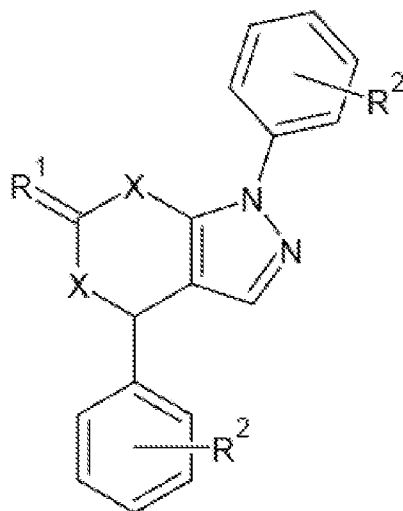
5 $-\text{S}(\text{O})-$;

l'anello A può essere un anello aromatico o eteroaromatico a 5- o 6- membri, preferibilmente un anello fenilico; l'anello A può essere sostituito in qualsiasi posizione con uno o più gruppi R^2 selezionati
 10 indipendentemente da: $-\text{H}$, $-\text{F}$, $-\text{Cl}$, $-\text{Br}$, $-\text{I}$, $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$,
 $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{CHF}_2$, $-\text{CF}_3$, $-\text{OH}$, $-\text{OCH}_3$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$,
 $-\text{OCF}_3$, $-\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CN}$, $-\text{NO}_2$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$.

Ai fini della presente invenzione, una formula

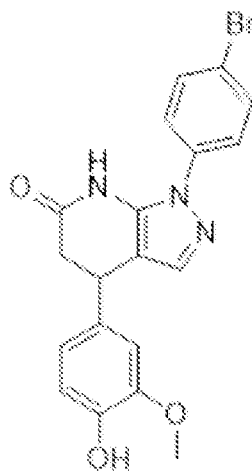
generale preferita I è l'impalcatura della formula

15 I.1:



in cui si applicano le definizioni di cui sopra.

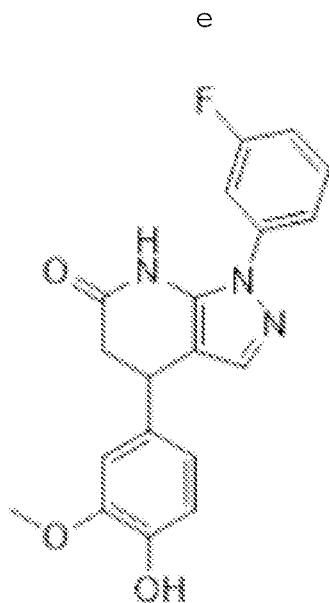
Secondo forme realizzative preferite della presente invenzione, sono composti esemplari secondo la formula 5 generale I:



SM 875

CAS n. 919023-94-2

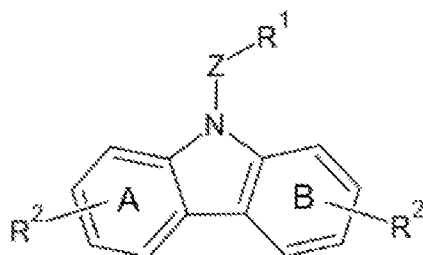
1-(4-bromofenil)-4-(4-idrossi-3-metossifenil)-5,
diidro-4H-pirazolo[3,4-b]piridina-6-one

**SM 898**

CAS n. 919024-19-4

5 1-(3-fluorofenil)-4-(4-idrossi-3-metossifenil)-
 5,7-diidro-4H-pirazolo[3,4-b]piridina-6-one

Secondo una seconda forma realizzativa
 esemplificativa, i composti identificati secondo la
 10 presente invenzione sono caratterizzati dalla seguente
 impalcatura di formula generale II (impalcatura II):



in cui:

ogni atomo di carbonio su ogni anello può essere indipendentemente un -C- o -N- atomo;

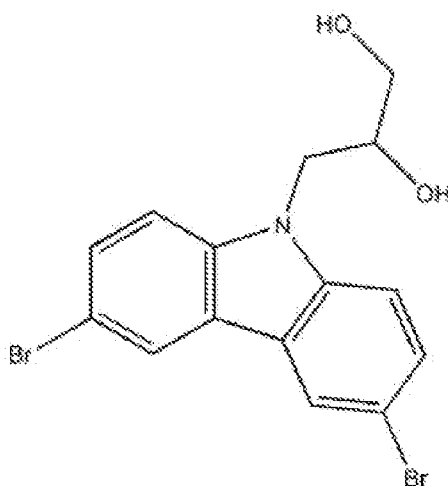
Z può essere -H, -CH₂-, -S(O₂)-, -S(O)-,

5 R¹ può essere assente (quando Z è -H) o può essere un gruppo selezionato indipendentemente da: H, C₁₋₄ lineare, ramificato, alchilico ciclico o alcossilico o arilossilico opzionalmente sostituito con uno o più di uno: -H, -F, -Cl, -Br, -I, -CH₃, -CH₂CH₃, -CH(CH₃)₂, -
 10 C(CH₃)₃, -CHF₂, -CF₃, -OH, OCH₃, -OCH₂CH₃, -OCF₃, -OCH(CH₃)₂, -CN, -NO₂, -NH₂, -S, un anello tetraidrofurano o un anello tetraidropiranicico in cui ogni atomo di carbonio dell'anello può essere sostituito indipendentemente con -
 H o -OH, un anello aromatico o eteroaromatico a 5 o 6
 15 membri sostituito in qualsiasi posizione con uno o più gruppi R² selezionati indipendentemente: -H, -F, -Cl, -
 Br, -I, -CH₃, -CH₂CH₃, -CH(CH₃)₂, -C(CH₃)₃, -CHF₂, -CF₃,
 -OH, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -OCF₃, -OCH(CH₃)₂, -CN, -NO₂, -NH₂, -
 SH;

20 l'anello A e l'anello B sono ciascuno indipendentemente un anello aromatico o eteroaromatico a 5 o 6 membri, preferibilmente un anello fenilico; l'anello A e l'anello B possono essere sostituiti indipendentemente in qualsiasi posizione con uno o più
 25 gruppi R² selezionati indipendentemente tra: -H, -F, -Cl,

-Br, -I, -CH₃, -CH₂CH₃, -CH(CH₃)₂, -C(CH₃)₃, -CHF₂, -CF₃, -
OH, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -OCF₃, -OCH(CH₃)₂, -CN, -NO₂, -NH₂, -
SH.

Secondo le forme realizzative preferite della
5 presente invenzione, un composto esemplare secondo la
formula generale II è:

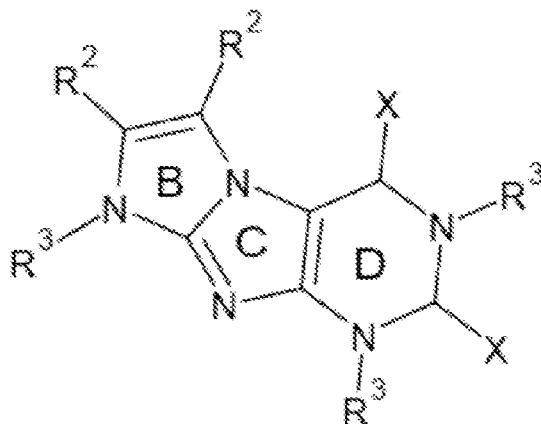


SM 930

CAS n. 173157-92-1

3-(3,6-dibromocarbazol-9-il)propano-1,2-diolo

10 Secondo una terza forma realizzativa
esemplificativa, i composti identificati secondo la
presente invenzione sono caratterizzati dalla seguente
impalcatura di formula generale III (impalcatura III):



in cui:

ogni atomo di carbonio su ogni anello aromatico può essere indipendentemente un atomo C o N;

5 l'anello B e l'anello C sono anelli di imidazolo fusi,

l'anello D è un anello di pirimidina, opzionalmente l'anello D può essere un anello di citosina o di uracile;

10 R^2 sono ciascuno indipendentemente -H, -OH, -CH₂OH, -CH₃, -CH₂CH₃, alogeno selezionato nel gruppo che comprende: - F, -Cl, -Br, -I, -CF₃, -OCH₃;

X può essere indipendente: =O, - NH₂, =S;

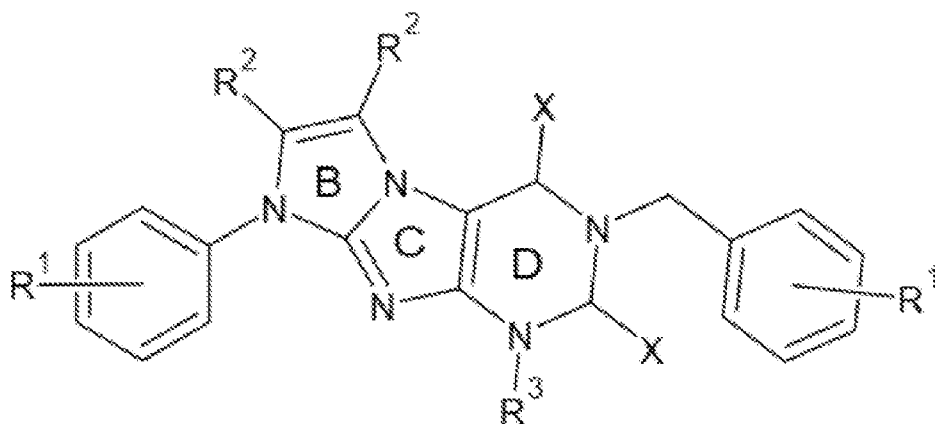
15 R^3 è selezionato indipendentemente da -H, C₁₋₄ lineare, ramificato o ciclico alchilico, anello A o Z-ring A;

Z può essere -CH₂ o -S(O₂)- o -S(O)-,

l'anello A può essere un anello aromatico o eteroaromatico a 5 o 6 membri, preferibilmente un anello

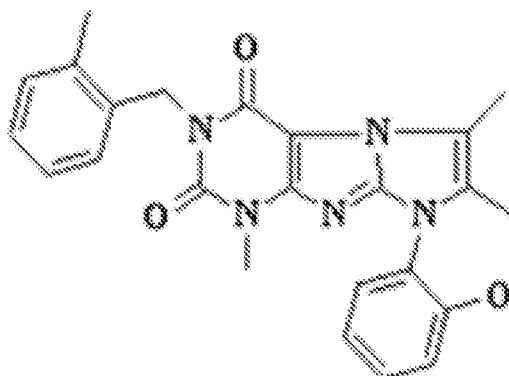
fenilico; l'anello A può essere sostituito in qualsiasi
 posizione con uno o più gruppi R^1 selezionati
 indipendentemente da: -H, -F, -Cl, -Br, -I, -CH₃, -CH₂CH₃,
 -CH(CH₃)₂, -C(CH₃)₃, -CHF₂, -CF₃, -OH, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -
 5 OCF₃, -OCH(CH₃)₂, -CN, -NO₂, -NH₂, -SH.

Ai fini della presente invenzione, una formula
 generale preferita III è l'impalcatura della formula
 III.1:



10 in cui si applicano le definizioni di cui sopra.

Secondo una forma realizzativa preferita, un
 composto esemplare secondo la formula generale III è:

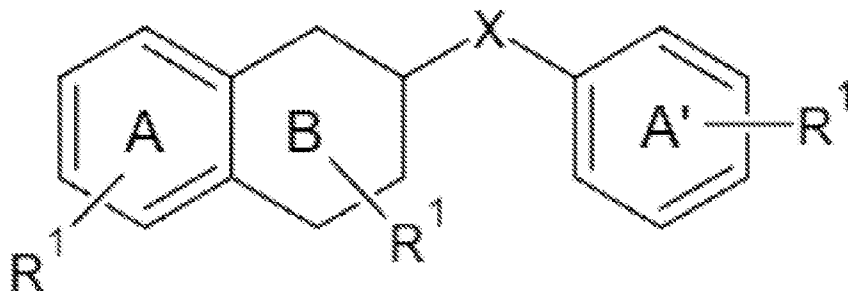


SM 940

CAS n. 919012-03-6

6-(2-idrossifenil)-4,7,8-trimetil-2-[(2-
metilfenil)metil]purino[7,8-a]imidazolo-1,3-dione

5 Secondo una quarta forma realizzativa
esemplificativa, i composti identificati secondo la
presente invenzione sono caratterizzati da un'impalcatura
di formula generale IV (impalcatura IV):



in cui:

10 ogni atomo di carbonio su ogni anello può essere
indipendentemente un atomo C o N;

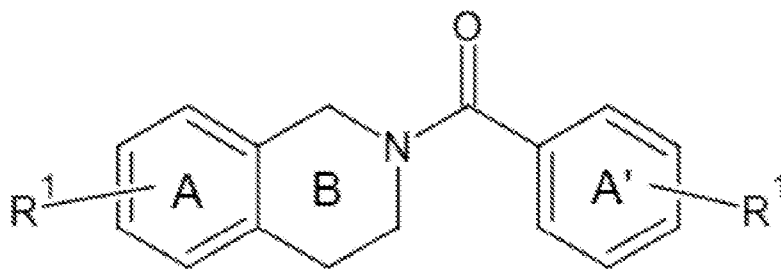
l'anello A e A' sono ognuno indipendentemente un
anello aromatico o eteroaromatico a 5 o 6 membri,
preferibilmente un anello fenilico;

gli anelli A, A' e B possono essere sostituiti in qualsiasi posizione con uno o più gruppi R¹ selezionati indipendentemente da: -H, -F, -Cl, -Br, -I, -CH₃, -CH₂CH₃, -CH(CH₃)₂, -C(CH₃)₃, -CHF₂, -CF₃, -OH, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -OCF₃, -OCH(CH₃)₂, -CN, -NO₂, -NH₂, -SH;

l'anello B è un anello aromatico o non aromatico in cui ogni atomo può essere indipendentemente uno o più atomi di C o N o O o S o S(O₂) e preferibilmente è un anello di piperidina;

X è -CH₂, -O-, -S-, -N(H), -C(O)-, -C(S)-, -C(H)=C(H)-, -S(O₂), -S(O).

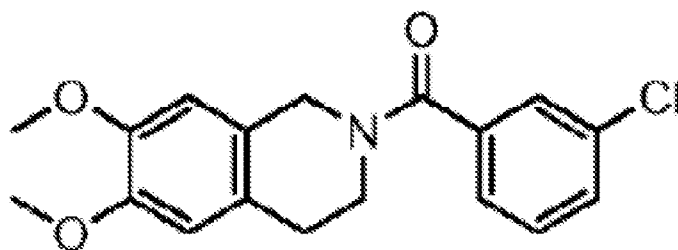
Ai fini della presente invenzione, una formula generale IV preferita è la seguente formula generale IV.1:



15

in cui si applicano le definizioni di cui sopra.

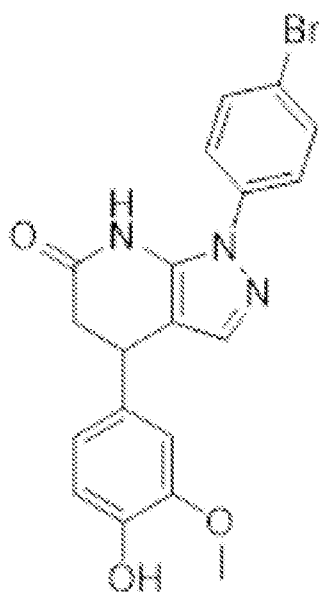
Secondo forme realizzative preferite della presente invenzione, un composto esemplare secondo la formula generale I è:

**SM 950**

CAS n.332939-23-8

(3-clorofenil)-(6,7-dimetossi-3,4-diidro-1H-
5 isochinolin-2-il)metanone

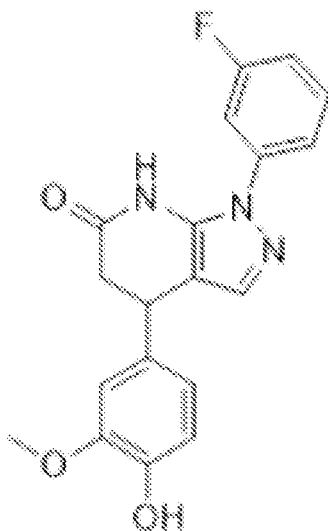
Come da specifiche forme realizzative della presente
invenzione, i composti preferiti identificati con
l'inattivazione delle Proteine Farmacologiche con la
metodologia del Folded Intermediate Targeting (PPI-FIT)
10 secondo quanto sopra esposto hanno una delle seguenti
formule:



SM 875

CAS n. 919023-94-2

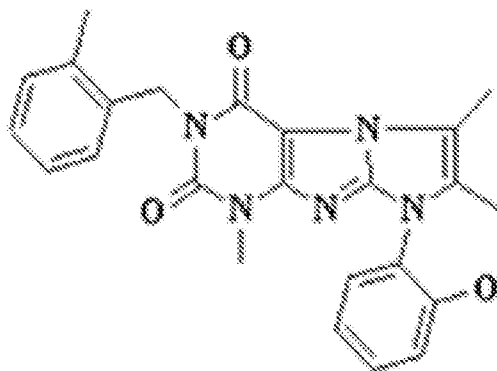
1-(4-bromofenil)-4-(4-idrossi-3-metossifenil)-5,7-diidro-4H-pirazolo[3,4-b]piridina-6-one



SM 898

CAS n. 919024-19-4

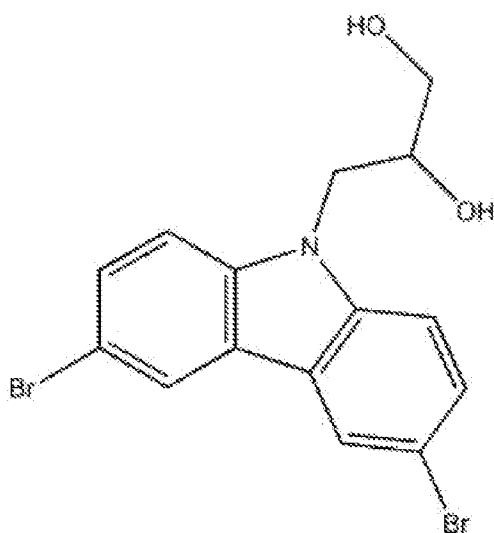
1-(3-fluorofenil)-4-(4-idrossi-3-metossifenil)-
5,7-diidro-4H-pirazolo[3,4-b]piridina-6-one



SM 940

CAS n. 919012-03-6

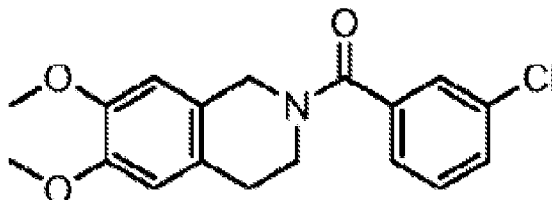
5 6-(2-idrossifenil)-4,7,8-trimetil-2-[(2-
metilfenil)metil]purino[7,8-a]imidazolo-1,3-dione



SM 930

CAS n. 173157-92-1

10 3-(3,6-dibromocarbazol-9-il)propano-1,2-diolo

**SM 950**

CAS n.332939-23-8

5 (3-clorofenil)-(6,7-dimetossi-3,4-diidro-1H- isochinolin-
2-il)metanone

In particolare, i composti preferiti
dell'invenzione sono SM875, SM898 e SM940.

I composti divulgati nella presente invenzione sono
10 tutti disponibili in commercio e/o possono essere
preparati secondo metodi noti nell'arte.

In un secondo oggetto, la presente invenzione
descrive le composizioni farmaceutiche che compongono i
composti dell'invenzione.

15 In un terzo oggetto, l'invenzione descrive i
composti della formula generale (I, II, III e IV) e i
composti specifici sopra riportati, nonché le
composizioni farmaceutiche che li compongono, per l'uso
come medicinale.

20 In particolare, i composti dell'invenzione sono
descritti per l'uso come medicamento nel trattamento di

malattie o disturbi legati alla proteina prionica
cellulare (PrPC) o interagenti della PrPC o di vie di
segnale tossiche che coinvolgono la PrPC, compresi i
disturbi neurodegenerativi, come le malattie prioniche
5 sporadiche, ereditarie o acquisite, il morbo di
Alzheimer, il morbo di Parkinson e altre α -
sinucleinopatie; disturbi neuroinfiammatori e malattie
demielinizzanti, come la sclerosi multipla; il cancro, in
particolare il glioblastoma, il cancro gastrico, il
10 cancro al seno, il cancro al colon.

In una forma realizzativa preferita, i composti
della formula generale (I, II, III e IV) e i composti
specifici sopra riportati sono divulgati per l'uso come
medicinale nel trattamento delle malattie da prioni,
15 morbo di Alzheimer, morbo di Parkinson, sclerosi
multipla, glioblastoma, cancro gastrico, cancro al seno,
cancro al colon.

In particolare, le malattie da prioni comprendono la
malattia di Creutzfeldt-Jakob (CJD), la sindrome di
20 Gerstmann-Stràussler-Scheinker (GSS) e l'insonnia
familiare mortale (FFI).

Secondo un'ulteriore forma realizzativa
dell'invenzione, i composti dell'invenzione sono
descritti per l'uso nel trattamento di una malattia, dove
25 il termine "trattamento" si riferisce a scopi

terapeutici, che includono la diminuzione o la prevenzione dei sintomi della malattia, la progressione più lenta di tali sintomi, l'abrogazione dei sintomi, così come l'abrogazione totale o parziale della causa
5 della malattia.

In un'altra forma realizzativa, le impalcature scoperte vengono divulgate per il trattamento dei disturbi demielinizzanti, tra cui, ma non solo, la sclerosi multipla.

10 Secondo un'ulteriore forma realizzativa, i composti dell'invenzione sono descritti per l'uso nel trattamento delle malattie sopra menzionate insieme ad altri trattamenti farmacologici o non farmacologici.

In particolare, si può dimostrare una sinergia
15 farmacologica tra i composti dell'invenzione e:

- piccole molecole
- anticorpi,
- terapia genica o approcci terapeutici di
modificazione genica,

20 contro la PrP^C o gli interattori della PrP^C o vie di segnale tossici che coinvolgono la PrP^C.

Pertanto, i composti dell'invenzione sono descritti per uso medico in combinazione con piccole molecole, anticorpi, terapia genica o approcci terapeutici di
25 modificazione genica, contro malattie o disturbi legati

alla proteina prionica cellulare (PrP^C) o interattori della PrP^C o vie di segnale tossici che coinvolgono la PrP^C.

In particolare, tali malattie o disturbi legati alla proteina prionica cellulare (PrP^C) o interattori della PrP^C o vie di segnale tossiche che coinvolgono la PrP^C comprendono disturbi neurodegenerativi, come le malattie prioniche sporadiche, ereditarie o acquisite, il morbo di Alzheimer, il morbo di Parkinson e altre α -sinucleinopatie; disturbi neuroinfiammatori e malattie demielinizzanti, come la sclerosi multipla; il cancro, in particolare il glioblastoma, il cancro gastrico, il cancro al seno, il cancro al colon.

In un ulteriore oggetto, viene descritto un metodo per il trattamento di disturbi legati alla proteina prionica cellulare (PrP^C) o di interattori della PrP^C o di vie di segnale tossiche che coinvolgono la PrP^C che comprendono la somministrazione di un composto dell'invenzione o di una composizione farmaceutica che comprende un composto dell'invenzione, ad un paziente che ne ha bisogno.

Secondo un'ulteriore forma realizzativa dell'invenzione, viene divulgato un metodo che comprende la somministrazione di un composto dell'invenzione per il trattamento di una malattia, in cui il termine

"trattamento" si riferisce a scopi terapeutici, che includono la diminuzione o la prevenzione dei sintomi della malattia, la progressione più lenta di tali sintomi, l'abrogazione dei sintomi, così come
5 l'abrogazione totale o parziale della causa della malattia.

In particolare, nell'ambito del metodo dell'invenzione, tale somministrazione può essere iniziata prima dell'insorgenza della malattia (in
10 particolare nel caso di disturbi genetici per i quali sono state valutate le mutazioni che causano la malattia), subito dopo la diagnosi del disturbo, o una volta che altri trattamenti farmaceutici si sono dimostrati inefficaci.

15 In un'altra forma realizzativa, le impalcature scoperte vengono divulgate in un metodo per il trattamento dei disturbi demielinizzanti, tra cui, ma non solo, la sclerosi multipla.

Nell'ambito del metodo descritto, i composti
20 dell'invenzione possono essere somministrati insieme ad altri trattamenti farmacologici o non farmacologici.

In particolare, si può dimostrare una sinergia farmacologica tra i composti dell'invenzione e:

- piccole molecole
- 25 - anticorpi,

- terapia genica o approcci terapeutici di
modificazione genica,
contro la PrP^C o gli interattori della PrP^C o vie di
segnale tossiche che coinvolgono la PrP^C.

5 Pertanto, i composti dell'invenzione sono descritti
in un metodo di trattamento in combinazione con piccole
molecole, anticorpi, terapia genica o approcci
terapeutici di modificazione genica, contro malattie o
disturbi legati alla proteina prionica cellulare (PrP^C) o
10 interattori della PrP^C o vie di segnale tossiche che
coinvolgono la PrP^C.

In particolare, tali malattie o disturbi legati alla
proteina prionica cellulare (PrP^C) o interattori della
PrP^C o vie di segnale tossiche che coinvolgono la PrP^C
15 comprendono disturbi neurodegenerativi, come le malattie
prioniche sporadiche, ereditarie o acquisite, il morbo di
Alzheimer, il morbo di Parkinson e altre α -
sinucleinopatie; disturbi neuroinfiammatori e malattie
demyelinizzanti, come la sclerosi multipla; il cancro, in
20 particolare il glioblastoma, il cancro gastrico, il
cancro al seno, il cancro al colon.

La presente invenzione sar  ulteriormente
illustrata con riferimento alla seguente sezione
sperimentale.

25 *Metodi*

Metodi funzionali di polarizzazione per simulazioni di percorsi pieghevoli.

Caratteristiche generali e software. Il metodo BF è una procedura in tre fasi che permette la simulazione di percorsi di ripiegatura delle proteine a livello di risoluzione atomistica e consiste in: (i) generazione della condizione denaturata per dispiegamento termico, (ii) produzione di traiettorie di piegatura a partire dagli stati di dispiegamento e (iii) punteggio delle traiettorie di piegatura basato su un principio di variabilità. Il software per eseguire queste simulazioni si basa sul motore MD di Gromacs 4.6.5 patchato con il plugin per l'analisi variabile collettiva Plumed 2.0.2.

Generazione di condizioni denaturate. Le conformazioni dispiegate sono generate dallo svolgimento termico a partire dalla struttura nativa. Questo si ottiene eseguendo traiettorie indipendenti di 3-5 ns di dinamica molecolare ad alta temperatura (800K) nell'insieme NVT.

Per ogni traiettoria viene estratta una singola conformazione denaturata.

Generazione di percorsi di piegatura. Per ogni conformazione denaturata, viene generato un insieme di traiettorie di piegatura utilizzando l'algoritmo rMD. In questo schema, l'avanzamento di piegatura è descritto in funzione di una coordinata di reazione, definita come

$z(X)$:

$$z(X) \equiv \sum_{|i-j|>35}^N [C_{ij}(X) - C_{ij}(X)^{Native}]^2 \quad \text{Equazione 1}$$

5 Dove $C_{ij}(X)$ è la mappa di contatto della configurazione istantanea del sistema e $C_{ij}(X)^{Native}$ è la mappa di contatto nello stato nativo di riferimento. Lo stato nativo di riferimento è ottenuto riducendo al minimo l'energia della struttura sperimentale recuperata dalla
 10 banca dati delle proteine. Le voci $C_{ij}(X)$ di $z(X)$ si interpolano senza problemi tra 0 e 1 secondo la seguente funzione:

$$C_{ij}(X) = \begin{cases} \frac{1 - (r_{ij}/r_0)^6}{1 - (r_{ij}/r_0)^{10}} & \text{if } r_{ij} \leq r_c \\ 6/10 & \text{if } r_{ij} = r_0 \\ 0 & \text{if } r_{ij} > r_c \end{cases} \quad \text{Equazione 2}$$

Dove r_{ij} è la distanza euclidea tra l' i esimo e il j th
 15 atom, r_0 è una tipica distanza che sfida i contatti residui (impostata a 7,5 Å) e r_c è una distanza di taglio (impostata a 12,3 Å) oltre la quale il contatto è impostato a 0. In rMD, la proteina si evolve secondo il plain-MD finché la reazione procede spontaneamente verso
 20 lo stato nativo (cioè abbassando il valore della coordinata $z(x)$). D'altra parte, quando la catena cerca di fare marcia indietro lungo $z(X)$, viene introdotta una forza di polarizzazione esterna che reindirizza la

dinamica verso lo stato nativo. La forza di polarizzazione che agisce su un dato atomo, F_i^{rMD} , è definita come:

$$5 \quad \mathbf{F}_i^{rMD} = \begin{cases} -k_r \nabla_i z(X) \cdot \{z(X) - z_m(t)\} & \text{if } z(X) > z_m \\ 0 & \text{if } z(X) \leq z_m \end{cases} \quad \text{Equazione 3}$$

dove $z_m(t)$ indica il più piccolo valore della coordinata di reazione $z(X)$ fino al tempo t e k_r è una costante di accoppiamento.

10 *Scelta della traiettoria meno inclinata.* Per ogni serie di traiettorie a partire dalla stessa condizione iniziale, viene selezionata la traiettoria di ripiegamento con la più alta probabilità di realizzarsi in assenza di forza di polarizzazione esterna. Questo
 15 schema viene applicato definendo prima una soglia di ripiegamento: si considera che una traiettoria abbia raggiunto lo stato di ripiegamento se la sua deviazione media al quadrato delle posizioni atomiche (RMSD) rispetto alla struttura nativa è $\leq 4 \text{ \AA}$. Successivamente,
 20 le traiettorie che raggiungono con successo lo stato nativo sono segnate dalla loro T funzionale di polarizzazione calcolata, definita come:

$$T = \sum_{i=1}^N \frac{1}{m_i y_i} \int_0^t d\tau |\mathbf{F}_i^{rMD}(X, \tau)|^2 \quad \text{Equazione 4}$$

25

Dove t è il tempo di piegamento della traiettoria, m_i e γ_i sono la massa e il coefficiente di attrito dell' i -esimo atomo e $F_{i,MD}$ è la forza che agisce su di esso. La traiettoria di piegamento che riduce al minimo il bias funzionale per ogni set è indicata come traiettoria Least Biased (LB).

Analisi computazionale della Proteina Prionica Cellulare.

Struttura e topologia del dominio C-terminale della proteina prionica cellulare (PrP). La struttura nativa del dominio C-terminale della PrP umana è stata recuperata da PDB 1QLX, la struttura va dal residuo 125 a 228 e contiene il dominio globoso strutturato della PrP. La topologia delle proteine è stata generata in Gromacs 4.6.5 utilizzando il campo di forza Amber99SB-ILDN in acqua TIP3P.

Simulazioni di piegatura di PrP. La struttura nativa del dominio C-terminale di PrP umano (PDB 1QLX) è stata posizionata in una scatola dodecaedrica con una distanza minima di 40 Å dalle pareti. La scatola è stata riempita con molecole d'acqua spc216 e neutralizzata con 3 ioni Na⁺. Il sistema è stato ridotto al minimo l'energia utilizzando l'algoritmo di discesa più ripida. L'equilibrio NVT è stato poi eseguito per 500 ps a 800 K utilizzando il termostato a scala V con vincoli di posizione sugli atomi pesanti. I vincoli sono stati poi

rimossi e sono stati eseguiti 9 ns indipendenti 3 ns di
semplice MD nell'insieme NVT a 800 K, ottenendo 9
conformazioni denaturate. Ogni condizione iniziale è
stata riposizionata in una scatola dodecaedrica con 15 Å
5 di distanza minima dalle pareti, l'energia è stata
minimizzata utilizzando l'algoritmo di discesa più ripida
e poi equilibrata prima nell'insieme NVT (utilizzando il
termostato Nosé-Hoover a 350 K, $\tau_T = 1$ ps) e poi
nell'insieme NPT (utilizzando il termostato Nosé-Hoover a
10 350 K, $\tau_T = 1$ ps, e il barostato Parrinello-Rahman a 1
bar, $\tau_P = 2$ ps). Per ogni condizione iniziale sono state
generate 20 traiettorie utilizzando l'algoritmo rMD
nell'insieme NPT (350 K, 1 bar). Ogni traiettoria
consiste in passi da $1,5 \cdot 10^6$ rMD generati con un
15 integratore di rMD con passo di 2 fs. I frame sono stati
salvati ogni $5 \cdot 10^2$ passi. La costante di cricchetto k_r è
stata impostata a $5 \cdot 10^{-4}$ kJ/mol. Le interazioni non
legate sono state trattate come segue: Il taglio Van-der-
Waals e Coulomb era impostato a 16 Å, mentre il Particle
20 Mesh Ewald era impiegato per l'elettrostatica a lungo
raggio. Per ogni serie di traiettorie, lo schema
funzionale di bias è stato applicato con un ulteriore
filtraggio sul contenuto della struttura secondaria per
la definizione della piegatura. In particolare, le
25 traiettorie che raggiungono una conformazione finale con

meno dell'85% del contenuto medio della struttura secondaria rispetto alla struttura NMR non sono state considerate in classifica.

Analisi delle traiettorie. RMSD è stato calcolato utilizzando Gromacs, mentre la frazione di contatti nativi (Q) è stata calcolata utilizzando VMD 1.9.2. Un'approssimazione più bassa del paesaggio energetico $G(Q, \text{RMSD})$ è stata generata tracciando il logaritmo negativo della distribuzione di probabilità 2D delle variabili collettive Q e RMSD, ottenuta dalle traiettorie di 180 rMD (115x115 bins). Sono state campionate le conformazioni proteiche appartenenti alle traiettorie LB e che si estendono sui pozzi energetici di interesse ($G < 3,7$ kBT). Le conformazioni appartenenti allo stato intermedio sono state raggruppate utilizzando un clustering k-mean in R-Studio utilizzando le seguenti metriche per definire una distanza tra due strutture:

$$D(X_A, X_B) = \sqrt{\sum_{|i-j|}^N [C_{ij}(X_A) - C_{ij}(X_B)]^2} \text{ Equazione 5}$$

20

Dove $D(X_A, X_B)$ è la metrica della distanza tra due conformazioni proteiche, $C_{ij}(X_A)$ e $C_{ij}(X_B)$ sono le voci della mappa di contatto delle conformazioni A e B rispettivamente (definite nell'equazione 2). Il numero appropriato di cluster ($k = 3$) è stato selezionato con il

25

metodo del gomito. La configurazione rappresentativa di ciascun cluster è stata selezionata calcolando la mappa di contatto media delle conformazioni del cluster e quindi estraendo la struttura minimizzando la distanza $D(XA, XB)$ tra se stessa e la mappa di contatto media. I dati sono stati rappresentati usando la libreria Matplotlib in python, il diagramma di energia 2D [Q, RMSD] è stato lisciato con un kernel gaussiano. Le immagini delle conformazioni delle proteine sono state prodotte utilizzando UCSF Chimera.

Analisi di scoperta del farmaco assistita dal computer.

Approccio consenso per l'identificazione del sito di legame per il ligando drogabile. Un approccio di consenso basato sulla SiteMap (Schrödinger Release 2017-4: SiteMap, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017; Halgren, T., J. Chem. Inf. Model., 2009, 49, 377-389) e DoGSiteScorer (A. Volkamer, J. Chem. Inf. Modello. 2012, 52 (2), pagg. 360-372) l'analisi è stata applicata per trovare e valutare le tasche di legame per il farmaco. I parametri di base sono stati utilizzati per entrambi gli strumenti. Considerando il carattere innovativo del target qui riportato (cioè una struttura intermedia di ripiegamento), sono state quindi selezionate soglie meno stringenti nella ricerca di tasche di legame per il farmaco da esplorare in screening virtuale: volume ≥ 300

Å³; profondità ≥ 10 Å; equilibrio $\geq 1,0$; esposizione $\leq 0,5$; involucro $\geq 0,70$; SiteScore $\geq 0,8$; DScore $\geq 0,90$; DrugScore $\geq 0,5$; SimpleScore $\geq 0,5$ (Supp. Tabella 2 e 3).

5 *Identificazione di una tasca di legame per il farmaco nel PrP Folding Intermediate.* L'intermedio di ripiegatura è stato preparato con la procedura guidata per la preparazione delle proteine di Schroedinger. Durante la preparazione, le reti di legame dell'idrogeno sono state
10 ottimizzate attraverso un campionamento esaustivo di gruppi ossidrilici e tiolici. I residui terminali N e C sono stati ricoperti rispettivamente con i gruppi ACE e NMA. Poi, gli atomi di idrogeno e le catene laterali delle proteine sono stati minimizzati in termini di
15 energia utilizzando il campo di forza OPLS3. La struttura ottenuta è stata (i) solvatata da molecole di acqua TIP3P in una scatola di simulazione cubica di 12,5 Å distante dalla proteina in ogni direzione, (ii) neutralizzata con l'aggiunta di tre ioni Na⁺, e (iii) equilibrata per 100
20 ps di simulazione MD (insieme NPT) a 300 K utilizzando il termostato Langevin. In tale simulazione, le posizioni relative degli atomi di Ca sono state mantenute fisse (costante di forza 1 Kcal/mol), al fine di campionare esclusivamente la disposizione delle catene laterali. Le
25 simulazioni MD sono state eseguite utilizzando il campo

di forza OPLS3 nel software Desmond 5.0 (Schrödinger Release 2017-4: Desmond Molecular Dynamics System, D. E. Shaw Research, New York, NY, 2017) e sono state eseguite per 50ns. L'intervallo di registrazione è stato impostato a 50ps, consentendo la raccolta di 1001 fotogrammi. La 5 traiettoria è stata raggruppata utilizzando lo strumento "Desmond trajectory clustering" in Maestro (Maestro-Desmond Interoperability Tools, Schrödinger, New York, NY, 2017) basato sul RMSD dei residui 152, 153, 156, 156, 10 157, 157, 158, 187, 196, 197, 198, 202, 202, 203, 205, 206 e 209 (cioè i residui che compongono il sito interessato). È stato effettuato un clustering gerarchico per ottenere 10 cluster del sito esplorato. Il centroide di ciascun cluster è stato quindi selezionato come 15 struttura rappresentativa e sottoposto a una previsione del sito *in silico* ligando vincolante e a una valutazione della drogabilità utilizzando i metodi di consenso di cui sopra che prevedono l'analisi DogSiteScorer e SiteMap.

Preparazione della biblioteca chimica virtuale. La Asinex 20 Gold & Platinum Library è stata scaricata dalla pagina web Asinex ($\sim 3,2 \times 10^5$ composti disponibili in commercio, www.asinex.com). Un primo ciclo di preparazione del ligando è stato eseguito in LigPrep (Schrödinger Release 2017-4: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017).

25 In questa fase sono state create le diverse forme

tautomeriche per i centri chirali non definiti. Al contrario, per la chiralità specificata, è stato mantenuto solo l'enantiomero specificato. Successivamente, i composti sono stati importati all'interno di SeeSAR (vedi versione 5.6 di SeeSAR, BioSolveIT GmbH, Sankt Augustin, Germania, 2016). Si è così ottenuta una libreria finale di $\sim 4,3 \times 10^5$ clienti docking.

Identificazione di In Silico Hits attraverso lo screening virtuale. Il workflow di screening virtuale è stato sviluppato utilizzando la piattaforma analitica KNIME (Berthold, Michael R. AcM SIGKDD esplorazioni Newsletter 11, n. 1 (2009): 26-31) e i nodi di BioSolveIT KNIME. In particolare, il flusso di lavoro è stato organizzato come segue: (i) il nodo "Preparare il recettore con LeadIT" è stato utilizzato per la preparazione delle proteine e la definizione dei parametri di aggancio in LeadIT (LeadIT versione 2.2.0; BioSolveIT GmbH, Sankt Augustin, Germania, 2017, www.biosolveit.de/LeadIT). Il sito di binding è stato definito sulla base dei residui che compongono la sacca di drogaggio identificata (Supp Table 3). Gli stati di protonazione dei residui, così come le forme tautomeriche, sono stati valutati automaticamente in LeadIT utilizzando il metodo ProToss, che genera le posizioni di idrogeno più probabili sulla base di una

rete ottimale di legame dell'idrogeno utilizzando una
funzione di punteggio empirico; (ii) il nodo "Compute
LeadIT Docking" è stato selezionato per eseguire le
simulazioni di docking dei client di docking $\sim 4.3 \times 10^5$
5 utilizzando l'algoritmo FlexX (Rarey M, et al. J Mol
Biol. 1996 Aug 23;261(3):470-89). Sono state prodotte
dieci pose per ogni ligando; (iii) il nodo "Assess
Affinity with HYDE in SeeSAR" ha generato energia libera
di legame raffinata (cioè ΔG) e l'affinità HYDE stimata
10 (KiHYDE) per ogni posa del ligando utilizzando la
funzione di ripristino HYDE (N. Schneider, et al. J.
Comput. Aiatati. Mol. Des., 27 (2013), pp. 15-29); (iv)
per ogni ligando è stata estratta la posa con il KiHYDE
più basso. Solo i composti con un range di KiHYDE
15 previsto inferiore a 5uM sono stati mantenuti per le fasi
successive; (v) le pose rescored sono state filtrate
sulla base di filtri fisico-chimici e ADME utilizzando i
modelli Optibrium integrati in SeeSAR (Optibrium 2018,
www.optibrium.com/stardrop). In particolare sono stati
20 utilizzati i seguenti filtri: $2 \leq \text{LogP} \leq 5$, dove LogP è
il coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua calcolato;
 $1,7 \leq \text{LogD} \leq 5$, dove LogD è il coefficiente di
distribuzione ottanolo/acqua calcolato;
TPSA ≤ 90 ; LogS ≥ 1 , dove TPSA è la superficie polare
25 topologica; LogS_{7,4} ≥ 1 , dove LogS_{7,4} è la solubilità

acquosa intrinseca a pH 7.4 (un $\text{LogS} \geq 1$ corrisponde ad una solubilità acquosa intrinseca superiore a 10 μM); HIA = +, dove HIA è la classificazione per l'assorbimento intestinale umano (prevede una classificazione di '+' per i composti che sono $\geq 30\%$ assorbiti e '-' per i composti che sono $< 30\%$ assorbiti); $300 \leq \text{MW} \leq 500$, dove MW è il peso molecolare; numero di legami rotabili ≤ 3 ; categoria PgP = - , dove la categoria PgP è la classificazione del trasporto di P-glicoproteine (il composto deve appartenere alla categoria "-" per evitare l'efflusso attivo); numero di donatori di legami a idrogeno ≤ 3 ; numero di stereocentri ≤ 1 . Inoltre, sono state scaricate molecole che potenzialmente agiscono come composti di interferenza pan-assay. Questo approccio ha prodotto una lista di 275 risultati virtuali, che sono stati sottoposti per la prima volta ad una selezione basata sulla diversità. Per ogni composto, un'impronta digitale binaria è stata derivata per mezzo dell'utility canvasFPgen fornita da Schrödinger (Tipo di impronta digitale: MolPrint2D; precisione:XP) (Schrödinger Release 2017-4: Canvas, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017). Utilizzando l'impronta digitale creata, i 10 composti più diversi (cioè ASN 03578729, ASN 15755504, ASN 16356773, ASN 17325626, ASN 19380113, BAS 00312802, BAS 00340795, BAS 00382671, BAS 01058340, BAS 01849776) sono stati

estrapolati applicando l'utility canvasLibOpt Schrödinger (Schrödinger Release 2017-4: Canvas, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017). Inoltre, l'ispezione visiva ha guidato la selezione dei leganti promettenti in base alla
5 modalità di rilegatura prevista e alle interazioni stabilite con la tasca di rilegatura identificata. In totale, sono state selezionate 30 molecole, 8 dalla diversa selezione e 22 dopo l'ispezione visiva (Figura 6 e Tabella 4). Infatti, anche se in origine sono stati
10 scelti 10 diversi composti, il BAS 00340795 non era in stock e l'ASN 03578729 è stato successivamente sostituito dal suo vicino analogo ASN 05397475, selezionato dalla visualizzazione 3D e dotato di una migliore affinità prevista.

15

Sintesi chimica di SM875.

Reagenti e *strumentazione*. I reagenti (Sigma Aldrich) e i solventi (Merck) sono stati utilizzati senza purificazione. Le rese di reazione non sono state
20 ottimizzate e calcolate dopo la purificazione cromatografica. La cromatografia a strato sottile (TLC) è stata effettuata su Merck Kieselgel 60 PF254 con visualizzazione con luce UV. Reazioni assistite da microonde sono state effettuate utilizzando un reattore
25 monomodale CEM Discover in un contenitore sigillato.

Cromatografia preparatoria a strato sottile (PLC) su lastre da 20 x 20 cm Merck Kieselgel 60 F254 0,5 mm. La purificazione HPLC è stata effettuata da un apparecchio Merck Hitachi L-6200, dotato di un rivelatore a serie di diodi Jasco UVIDEC 100V e di una colonna LiChrospher a fase inversa RP18, in condizioni isocratiche con eluente acetonitrile/acqua 1:1, flusso 5 mL·min⁻¹, rivelazione a 254 nm. Lo spettro IR del prodotto finale è stato registrato utilizzando uno spettrometro Bruker FT-IR Tensor 27 dotato di dispositivo ATR (Attenuated Transmitter Reflection) a 1 cm⁻¹ risoluzione nella regione di assorbimento $\Delta\nu$ 4000 ÷ 1000 cm⁻¹. Un sottile strato solido è stato ottenuto dall'evaporazione della soluzione di cloroformio nel campione. Lo strumento è stato spurgato con un flusso di azoto secco costante. L'elaborazione degli spettri è stata effettuata utilizzando la confezione del software Opus. Gli spettri NMR sono stati registrati su uno spettrometro Bruker-Avance 400 utilizzando una sonda 5 mm BBI ¹H a 400 MHz e ¹³C a 100 MHz in CDCl₃ rispetto ai segnali residui di solvente δ_H 7,25 e δ_C 77,00 ppm, J valori in Hz. Le assegnazioni strutturali sono confermate dall'esperimento di correlazione multipla eteronucleare (HMBC). Gli spettri ESI-MS sono stati prelevati con uno spettrometro di massa Bruker Esquire-LC dotato di una sorgente ionica

elettrospray, iniettando i campioni nella sorgente da una soluzione di metanolo condizioni MS: temperatura della sorgente. 300°C, gas di nebulizzazione N₂, 4 L·min⁻¹, tensione del cono 32 V, range di scansione m/z 100-900.

5 Esperimenti di frammentazione sono stati effettuati utilizzando l'elio per attivare collisionalmente gli ioni primari selezionati. Lo spettro LC-ESI-MS è stato acquisito utilizzando una colonna C-18 Kinetex 5µm, eluizione con acetonitrile/acqua 70:30, flusso 1 mL·min⁻¹
10 utilizzando la sorgente ESI come rivelatore in modalità ionica positiva. La misura ad alta risoluzione ESI-MS per il prodotto finale, compresi gli esperimenti di frammentazione tandem MS₂, sono stati ottenuti per infusione diretta utilizzando uno spettrometro di massa
15 Orbitrap Fusion Tribrid.

Colture cellulari e trattamenti.

Le linee cellulari utilizzate nella presente invenzione sono state coltivate nel Minimal Essential Medium di Dulbecco (DMEM, Gibco, #11960-044), siero bovino fetale fetale inattivato a calore al 10% (Δ56-FBS),
20 penicillina/Streptomicina (Pen/Strep, Corning #20-002-C1), aminoacidi non essenziali (NEAA, Gibco, #11140-035) e L-Glutamina (Gibco, #25030-024), se non diversamente specificato. Le cellule HEK293 e N2a sono state ottenute
25 da ATCC (ATCC CRL-1573 e CCL-131, rispettivamente).

Abbiamo usato un subclone (A23) di HEK293 che esprime stabilmente un mouse wild-type PrP o un costrutto EGFP-PrP, entrambi già descritti e caratterizzati in precedenza (Stincardini et al. 2017). I fibroblasti di topo L929 e le cellule inducibili RK13 sono stati gentilmente forniti da Ina Vorberg (DZEN, Bonn, Germania) (Vorberg et al. 2004) e Didier Villette (INRA, Tolosa, Francia) (Arellano-Anaya et al. 2017), rispettivamente. Le linee cellulari tumorali umane (H358, ZR-75, A549, H460, MCF7, H1299, SKBR3 e T47D), tutte appartenenti alla collezione di linee cellulari tumorali umane del NCI, sono state gentilmente fornite a Valentina Bonetto (Istituto Mario Negri, Milano, Italia). Le cellule sono state passate in matracci T25 o in scatole di Petri da 100 mm in supporti contenenti 200 µg/ml di igromicina o 500 µg/ml di G418 e divise ogni 3-4 giorni. Ogni linea cellulare impiegata in questo studio non è stata passata più di 20 volte dal magazzino originale. I composti utilizzati negli esperimenti sono stati risospesi a 30 o 50 mM in DMSO, e diluiti per fare una soluzione stock 1000X, che è stata poi utilizzata per diluizioni seriali. Un'aliquota di 1 µl di ogni punto di diluizione del composto è stata poi aggiunta alle cellule placcate in 1 mL di media senza antibiotici di selezione. Per gli esperimenti di impulso, le cellule RK13 inducibili sono

state seminate su piastre a 24 pozzetti ad una confluenza del 50%. Dopo 24 h cellule sono state trattate con doxiciclina (0,01 mg/ml) o veicolo (DMSO), in presenza o meno di Brefeldina 1A (10 μ M) o SM875 (10 μ M). Alla fine di ogni punto di tempo (2, 4, 8 e 24 ore) le cellule sono state lavate con PBS e poi lisate in tampone di lisi. Per gli esperimenti di inseguimento, le cellule RK13 sono state seminate su piastre a 24 pozzetti ad una confluenza del 30%. Dopo 24 h cellule sono state trattate con Doxiciclina (0,01 mg/ml) per 24 h. Il terreno contenente doxiciclina è stato poi rimosso e le cellule mantenute in terreno fresco per 4 h prima di aggiungere SM875 (10 μ M). Dopo 5, 19 e 24 ore di incubazione i pozzetti delle cellule sono stati lavati con PBS e lisati.

15 **Plasmidi.**

Le strategie di clonazione utilizzate per generare la codifica dei cDNA per il WT o la PrP con marchio EGFP sono state descritte in precedenza (Ivanova et al. 2001). Il costrutto EGFP-PrP contiene una versione monomerizzata di EGFP inserita dopo il codone 34 del mouse PrP. L'identità di tutti i costrutti è stata confermata dal sequenziamento dell'intera regione di codifica. Tutti i costrutti sono stati clonati nel pcDNA3.1(+)/hygro expression plasmid (Invitrogen). Lo Strep-FLAG pcDNA3.1(+)/G418 NEGR-1 è stato gentilmente fornito da

Giovanni Piccoli (Università di Trento, Italia) (Pischedda et al. 2014). Tutti i plasmidi sono stati trasfettati con Lipofectamina 2000 (Life Technologies), seguendo le istruzioni del produttore.

5 **Western Blotting & Anticorpi.**

I campioni sono stati lisati in tampone di lisi (Tris 10mM, pH 7,4, 0,5% NP-40, 0,5% TX-100, 150mM NaCl più completo EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, #11697498001), diluito 2:1 in 4X Laemmli campione
10 tampone (Bio-Rad) contenente 100 mM di ditiotreitolo (CAS No. 3483-12-3, SigmaAldrich), bollito 8 min a 95 °C e caricato su SDS-PAGE, utilizzando gel pre-fuso di acrilammide al 12% (Bio-Rad) e poi trasferito su membrane di fluoruro di polivinilidene (PVDF) (Thermo Fisher
15 Scientific). Le membrane sono state bloccate per 20 minuti nel 5% (p/v) di latte secco non grasso in soluzione salina tamponata con Tris contenente lo 0,01% di Tween-20 (TBS-T). Le macchie sono state sondate con anticorpo anti-PrP D18 (gentilmente fornito da D. Burton,
20 The Scripps Research Institute, La Jolla, CA) o 6D11 (1:5.000) in BSA 3% in TBS-T durante la notte a 4°C, lavate 3 volte con TBS-T 10 min ciascuna, poi sondate con una diluizione di 1:8.000 di capra coniugata con rafano antiumano (Jackson ImmunoResearch) o IgG anti-topo (Santa
25 Cruz) per 1 h a RT. Dopo 2 lavaggi con TBS-T e uno con

acqua Milli-Q, i segnali sono stati rivelati utilizzando l'ECL Prime Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare), e visualizzati con un sistema di imaging ChemiDoc XRS Touch (Bio-Rad).

5 **Dot Blotting.**

I campioni sono stati trasferiti su membrana in PVDF in un sistema a 96 pozzetti. Un apparato di 96 pozzetti (Schleicher & Schuell) è stato dotato di una membrana di polivinilidene difluoruro 0.45- μ m-pore-size (PVDF) (Immobilon-P; Millipore), e ogni punto è stato risciacquato con 500 μ l di TBS. Sotto vuoto, lisati cellulari sono stati aggiunti all'apparecchio risciacquato con 500 μ l di TBS. La membrana è stata poi bloccata con 5% latte-0,05% Tween 20 (Sigma) in TBS (TBST-latte) per 30 min e sondato con l'anticorpo anti-PrP 6D11 (1:4.000) seguito da capra anti-topo IgG (Pierce). I segnali sono stati rivelati utilizzando chemiluminescenza migliorata (Luminata, Bio-Rad) e visualizzati da un sistema di imaging ChemiDoc XRS Touch (Bio-Rad).

PCR in tempo reale.

In seguito ai trattamenti, le cellule sono state raccolte da 24 piastre di pozzetti e l'RNA è stato estratto utilizzando TRIzol (Invitrogen) o RNeasy Plus mini kit (Quiagen). Un'aliquota di 800 ng per ogni campione è

stata trascritta al contrario utilizzando il kit di trascrizione inversa di cDNA ad alta capacità (Applied Biosystems) secondo le istruzioni del produttore. La RT-PCR quantitativa è stata eseguita in un termociclatore CFX96 Touch (Bio-Rad) utilizzando PowerUp SYBR Green Master mix (Invitrogen) con un programma di 40 cicli di amplificazione. Il set PrP del mouse 1 e il set 2 sono stati usati rispettivamente per amplificare la PrP endogena e transgenica (tabella sottostante). La quantificazione relativa è stata normalizzata per la HPRT del topo o umana (ipoxantina-guanina fosforibosiltransferasi).

Primer	Sequenza forward 5' -	Sequenza reverse 5' -3'
Mouse HPRT (endogeno)	TCAGACCGCTTTTTGCCGCGA	ATCGCTAATCACGACGCTGGGA
Mouse PrP (endogeno)	GGACATCACCAAGACGAGGG	CGCCATGATGACTGATCCGA
Mouse PrP (esogeno)	GCTGGCCCTCTTTGTGACTA	GTTCCACCCTCCAGGCTTTG
HPRT umano (endogeno)	CAGCCCTGGCGTCGTGATTA	TCACATCTCGAGCAAGACGTT
PrP umano (endogeno)	CCGAGGCAGAGCAGTCATTA	CCAGGTCACTCCATGTGGC

Immunofluorescenza e imaging ad alto contenuto.

L'immunocitochimica è stata eseguita su cellule RK13 inducibili trattate per 2, 4, 8 o 24 ore con doxiciciclina 0,01 (1x) o 0,1 (10x) mg/mL, in presenza o
5 meno di SM875 (10 μ M). Le cellule sono state seminate su micropiastre CellCarrier-384 Ultra (Perkin Elmer) ad una concentrazione di 6.000 cellule/pozzetto, coltivate per circa 24 ore, per ottenere uno strato semiconfluente (60%) e poi trattate con il composto. Le cellule sono
10 state fissate per 12 minuti a RT aggiungendo paraformaldeide senza metanolo (PFA, Thermo Fisher Scientific) ad una concentrazione finale del 4%. I pozzi sono stati poi lavati tre volte con PBS, e la permeabilizzazione è stata effettuata incubando le
15 cellule per 1 min con PBS contenente una concentrazione finale di 0,1% Triton X100. I pozzi sono stati lavati tre volte con PBS e le cellule sono state incubate con soluzione bloccante (FBS 2% in PBS) per 1h a RT. L'anticorpo primario anti-PrP (D18) è stato diluito nella
20 soluzione bloccante e aggiunto ai pozzetti ad una concentrazione finale di 1:400. Dopo tre lavaggi con PBS, l'anticorpo secondario (anti-IgG umane IgG di capra coniugate con Alexa 488 diluito 1:500 in soluzione bloccante) è stato incubato per 1 h a RT. Hoechst 33342
25 (Thermo Fisher Scientific) diluito in PBS 0,5 mM è stato

poi aggiunto dopo due ulteriori lavaggi. Per esperimenti di imaging ad alto contenuto, le cellule che esprimono EGFP-PrP sono state placcate su micropiastre CellCarrier-384 Ultra (Perkin Elmer) ad una concentrazione di 12.000 cellule/pozzetto e sono cresciute per circa 24 ore, per ottenere uno strato semiconfluente (60%). SM875 è stato somministrato ad una concentrazione finale di 0,1, 0,3, 1, 3 o 10 μ M, in due pozzetti replicati. Il veicolo (DMSO, volume equivalente) è stato utilizzato come controllo negativo. Le cellule sono state trattate per 24 ore e poi fissate per 12 minuti a RT aggiungendo paraformaldeide senza metanolo (Thermo Fisher Scientific) ad una concentrazione finale del 4%. Le piastre sono state poi lavate due volte con PBS e contate con Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific). La localizzazione cellulare di EGFP-PrP e PrP inducibile è stata monitorata utilizzando un sistema di imaging ad alto contenuto di Operetta (Perkin Elmer). L'imaging è stato eseguito in modalità ad ampio campo utilizzando un obiettivo 20X High NA (0,75). Cinque campi sono stati acquisiti in ogni pozzetto su due canali (380-445 Excitation-Emission per Hoechst e 475-525 per EGFP e Alexa 488). L'analisi delle immagini è stata effettuata utilizzando il software Harmony versione 4.1 (Perkin Elmer).

25 **Vitalità cellulare.**

Le cellule sono state seminate su piastre a 24 pozzetti a circa ~60% di confluenza. Composti a diverse concentrazioni o controllo del veicolo (DMSO, volume equivalente) sono stati aggiunti dopo 24 ore, il mezzo è stato sostituito il secondo giorno, e poi rimosso dopo un totale di 48 trattamenti. Le cellule sono state incubate con 1 mg/ml di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT, Sigma Aldrich) in PBS per 15 minuti a 37°C. Dopo aver accuratamente rimosso MTT, le cellule sono state risospese in 500 µL DMSO, e valori di vitalità cellulare ottenuti da uno spettrofotometro a piastra (BioTek Instruments, VT, USA), misurando l'assorbanza a 570 nm.

Produzione di PrP ricombinante. RecHuPrPrP23-231 è stato espresso dal competente vettore di espressione del batterio E. coli Rosetta (DE3) che ospita il vettore di espressione pOPIN E contenente il gene di tipo wild type I109 bank vole Prnp (Erana et al. 2019). I batteri provenienti da un glicerolato mantenuto a -80°C sono stati coltivati in una beuta da 250 ml contenente 50 ml di brodo LB per una notte. La coltura è stata poi trasferita in due beute da 2 L contenenti ciascuna 500 ml di terreno minimo integrato con 3 g/L di glucosio, 1 g/L NH₄Cl, 1M MgSO₄, 0,1 M CaCl₂, 10 mg/mL di tiamina e 10 mg/mL di biotina. Quando la coltura ha raggiunto un OD₆₀₀

di ~0,9-1,2 AU, è stato aggiunto Isopropyl β -D-1-tiogalattopiranoside (IPTG) per indurre l'espressione di PrP durante la notte alla stessa temperatura e condizioni di agitazione. I batteri sono stati poi pellettati, 5 lisati, corpi di inclusione raccolti per centrifugazione, e solubilizzati in 20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 6M Gnd/HCl, pH = 8. Anche se la proteina non contiene un His-tag, la purificazione della proteina è stata eseguita con una colonna di affinità istidina (HisTrap FF grezzo 5 10 ml, GE Healthcare Amersham) sfruttando l'istidina naturale presente nella regione di ripetizione octapeptide di PrP. Dopo l'eluizione con tampone contenente 20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 500 mM imidazolo e 2 M guanidina HCl, pH = 8, la qualità e la purezza dei 15 lotti di proteine è stata valutata da BlueSafe (NZYTech, Lisbona) colorazione dopo elettroforesi in gel SDS-PAGE. La proteina è stata rinaturata alla conformazione PrP^C mediante dialisi contro 20 mM di tampone NaAcetato, pH = 5. Il materiale aggregato è stato rimosso per 20 centrifugazione. La corretta piegatura è stata confermata dalla concentrazione di CD e proteine, mediante misurazione dell'assorbanza a 280 nm. La proteina è stata concentrata utilizzando dispositivi di centrifugazione Amicon e la soluzione concentrata conservata a -80°C fino 25 al momento dell'utilizzo.

Ridistribuzione dinamica della massa.

Il lettore di piastre multimodali EnSight (Perkin Elmer) è stato utilizzato per effettuare analisi DMR. L'immobilizzazione della lunghezza totale (residui 23230) o del topo N-terminalmente troncato (111-230) ricombinante PrP (15 µL/pozzetto di una soluzione di 2,5 µM di PrP in 10 mM di tampone di acetato di sodio, pH 5) su micropiastre senza etichetta (micropiastre ad alta sensibilità EnSpire-LFB, Perkin Elmer) è stata ottenuta mediante chimica di accoppiamento amminico. L'interazione tra Fe³⁺-TMPyP, SM875 e SM940 diluito a diverse concentrazioni (0,03-100 µM, otto diluizioni seriali 1:3) in tampone di saggio (10 mM PO₄, pH 7,5, 2,4 mM KCl, 138 mM NaCl, 0,05% Tween-20) e PrP, è stata monitorata dopo un'incubazione di 30 minuti a RT. Tutti i passaggi sono stati eseguiti utilizzando una stazione di lavoro Zephyr Compact Liquid Handling Workstation (Perkin Elmer). I dati sono stati ottenuti normalizzando ogni segnale sulla superficie intra-bene vuoto, e poi per sottrazione dei pozzi di controllo. Per acquisire ed elaborare i dati è stato impiegato il software Kaleido (Perkin Elmer).

Saggio di insolubilità del detergente in funzione della temperatura.

Una soluzione madre 800 µM di PrP ricombinante di topo appena purificato (residui 111-231) è stata diluita 1:10

in Acetato di Sodio (10 mM NaAc, pH 7) per ottenere aliquote di 80 μ M. Per evitare la precipitazione di PrP ricombinante, le aliquote sono state congelate in flash freeze in azoto liquido, conservate a -80°C , e poi tenute
5 in ghiaccio durante il loro utilizzo. Per effettuare il saggio, la PrP ricombinante è stata diluita ad una concentrazione finale di 0,5 μ M in tampone di precipitazione (10 mM NaAc, 2% TX100, pH 7), divisa in 8 aliquote identiche, ed incubata per 1 h a diverse
10 temperature (25, 37, 45, e 55°C), in presenza o meno di ogni molecola, o di controllo del veicolo (DMSO, volume equivalente). Ogni campione è stato poi accuratamente caricato su un doppio strato di saccarosio (60% e 80%) preparato in tampone di precipitazione e depositato sul
15 fondo delle provette di ultracentrifuga. I campioni sono stati poi sottoposti a ultracentrifugazione a 100.000 x g per 1 ora a 4°C . I pellet proteici ottenuti sono stati diluiti in 2X LMSB e poi analizzati con Western blotting.

Rilevamento di prioni nelle cellule.

20 I fibroblasti L929 sono stati coltivati in coltura e sono passati 5-7 volte dopo l'infezione con il ceppo prionico RML (derivato dai corrispondenti topi infetti da prioni, per gentile concessione del Dr. Roberto Chiesa, Istituto Mario Negri, Milano). Al fine di testare gli effetti
25 anti-prione dei composti, le cellule sono state seminate

in piastre a 24 pozzetti (giorno 1) a circa il 60% di
confluenza, con diverse concentrazioni di ogni molecola,
o di controllo del veicolo (DMSO, volume equivalente). Il
mezzo contenente composti freschi o veicolo è stato
5 sostituito il giorno 2, e le cellule sono state divise
(1:2) il giorno 3, evitando l'uso di tripsina pipettando
direttamente sulla superficie del pozzo. Le cellule sono
state raccolte il giorno 4 in PBS e centrifugate a 3.500
rpm x 3 min. I pellet risultanti sono stati poi
10 immagazzinati rapidamente a -80°C. Per valutare i carichi
di prioni, i pellet delle cellule sono stati risospesi in
20 pL di tampone di lisi (Tris 10mM, pH 7,4, 0,5% NP-40,
0,5% TX-100, 150mM NaCl) e incubati per 10 minuti a 37°C
con 2.000 unità/mL di DNase I (New England BioLabs). La
15 metà del campione risultante è stata incubata con 10
µg/mL di PK (Sigma Aldrich) per 1h a 37°C, mentre l'altra
metà è stata incubata nelle stesse condizioni in assenza
di PK. Entrambi i campioni trattati con PK e non trattati
sono stati poi mescolati 1:2 con 4X Laemmli campione
20 tampone (Bio-Rad) contenente DTT, bollito per 8 minuti a
95°C ed eseguito da SDS-PAGE.

Analisi statistiche di dati biologici.

Tutti i dati sono stati raccolti e analizzati alla cieca
da due diversi operatori. Le analisi statistiche,
25 effettuate con il software Prism versione 7.0 (GraphPad),

comprendevano tutti i punti di dati ottenuti, ad eccezione degli esperimenti in cui i controlli negativi e/o positivi non hanno dato il risultato atteso. Non è stato utilizzato alcun test per i valori anomali. È stato applicato il test di normalità Kolmogorov-Smirnov (quando possibile, $n \geq 5$). I risultati sono stati espressi come la media \pm errori standard, se non specificato. In alcuni casi, gli esperimenti dose-risposta sono stati dotati di un modello di regressione non lineare logistico a 4 parametri (4PL) e l'adattamento è stato stimato calcolando l' R^2 . Tutti i dati sono stati analizzati con il test ANOVA unidirezionale, inclusa una valutazione della normalità dei dati, e corretti con il test Dunnet post-hoc. I valori di probabilità (p) $< 0,05$ sono stati considerati significativi (* $<0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$).

Esempio 1

Identificazione di un intermedio di ripiegatura PrP

La metodologia PPI-FIT è stata utilizzata per identificare un intermedio drogabile lungo il percorso di piegatura della PrPC (denominato FI-PrP, Figura 1, a destra). Per caratterizzare il percorso di piegatura della proteina e identificare gli intermedi cineticamente rilevanti gli inventori si sono affidati ad una tecnica di campionamento del percorso migliorata (Bias Functional approach) utilizzando il campo di forza AMBER ff99SB-ILDN

in solvente esplicito.

La proteina prionica è costituita da un segmento N-terminale flessibile (residui 24-120 della sequenza umana con riferimento alla sequenza PDB 1QLX), e un dominio C-terminale strutturato (residui 121-230) composto da tre α -eliche e due brevi β -filati che affiancano l'elica 1. Il segmento N-terminale è nativamente non strutturato e preclude il suo utilizzo per approcci *in-silico*. Quindi, come struttura di riferimento è stato utilizzato il dominio globulare della PrP umana (residui 121-230, come mostrato in Figura 2). Abbiamo generato 9 conformazioni di PrP dispiegate per dispiegamento termico e abbiamo usato rMD per produrre 20 traiettorie di piegatura per ogni conformazione. Lo schema BF è stato poi impiegato per definire il percorso di piegatura statisticamente più significativo per ogni serie di traiettorie, portando a 9 percorsi di piegatura meno distorti. Le conformazioni che risiedono all'interno dei pozzi di energia osservati nella distribuzione bidimensionale sono state campionate da ogni traiettoria meno polarizzata. Le analisi hanno rivelato l'esistenza di uno stato semi-nativo, intermedio di ripiegamento PrP esplorato da tutti i percorsi meno distorti. La successiva analisi di clustering dell'insieme di conformatori che popolano lo stato intermedio ha permesso la definizione di una struttura a

tutti gli atomi per l'intermedio di piegamento PrP (come mostrato in figura 3, a sinistra). Rispetto alla conformazione nativa di PrP, questa struttura è caratterizzata da un'elica spostata-1 che manca i
5 contatti di aggancio con l'elica 3, lasciando esposti al solvente diversi residui idrofobici nativamente sepolti all'interno del nucleo proteico (ad esempio Y157, M206, V209; Figura 3, a destra).

Identificazione virtuale dei ligandi ad alta affinità per
10 l'intermedio di piegatura PrP.

Sono state impiegate tecniche di modellazione *in silico* e di screening virtuale dei farmaci per identificare piccoli ligandi specifici per l'intermedio di piegatura PrP selezionato. In primo luogo, gli inventori hanno
15 cercato potenziali siti di legame unici nella struttura dell'intermedio e non presenti nella conformazione nativa. Il software SiteMap e DoGSiteScorer sono stati utilizzati per esplorare la superficie dell'intermedio PrP, tenendo conto delle proprietà tipiche delle tasche
20 di legante, come il volume, la profondità, l'involucro/esposizione e l'idrofobicità (come mostrato nella Tabella 1). Queste analisi hanno identificato una sacca drogabile accessibile ai solventi tra l'elica spostata 1 e l'elica 3, definita da 14, residui non
25 continui (152, 153, 156, 156, 157, 157, 158, 187, 196,

197, 198, 202, 203, 205, 206, 209). La conformazione di questa tasca, affinata eseguendo MD con reticolo posizionale degli atomi della spina dorsale, come mostrato in figura 3), è stata oggetto di una campagna di screening virtuale eseguita utilizzando il software BioSolveIT e impiegando la collezione Asinex Gold & Platinum di piccole molecole ($\sim 3,2 \times 10^5$ composti disponibili in commercio). I risultati positivi sono stati filtrati da diversi strumenti chemioinformatici per prevedere, l'interferenza del pan-assay (cioè composti chimici che potrebbero dare risultati falsi positivi in diversi schermi ad alto rendimento), la farmacodinamica, le proprietà fisico-chimiche e ADME (adsorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione). I composti sono stati anche raggruppati in base alla loro impalcatura chimica. Queste analisi hanno generato una graduatoria dei candidati, da cui sono state ulteriormente selezionate 31 molecole per la validazione biologica.

20 Selezione *in vitro* dei risultati positivi

La biogenesi della PrP segue un percorso di traffico tipico dei polipeptidi di ancorati tramite glicosilfosfatidilinositolo (GPI). La proteina viene sintetizzata direttamente nel lume del reticolo endoplasmatico (ER), dove si piega e riceve

l'elaborazione post-traslazionale della struttura primaria (rimozione del peptide di segnale e ancoraggio del gruppo GPI) così come l'aggiunta di due catene di glicosilazione legate a N (a Asn-181 e Asn-197). In linea di principio, un composto che si lega ad un intermedio di 5 piegatura PrP può produrre un conformero a lunga durata e immaturo che potrebbe essere riconosciuto dal macchinario di controllo di qualità ER (ERQC), portando alla sua degradazione da parte del percorso di clearance associato all'ER e/o dall'autofagia dipendente dal lisosoma. 10 Seguendo questo principio, i 31 ligandi putativi sono stati testati direttamente in cellule per la loro capacità di abbassare l'espressione di PrP a livello post-traslazionale. Ogni composto è stato somministrato 15 per 24 ore a diverse concentrazioni (1-310-30 μ M) a cellule di HEK293 che esprimono stabilmente la PrP del topo. L'espressione e/o alterazioni post-traslazionale di PrP sono stati rilevati da Western blotting. Composti che mostrano una capacità di abbassare la quantità o alterare 20 l'elaborazione post-traslazionale di PrP (\geq 30%) ad almeno una concentrazione sono stati testati contro una proteina di controllo, NEGR-1. Questa molecola ancorata GPI segue la stessa via di espressione della PrP, rappresentando così un controllo ideale per valutare la 25 specificità del composto.

Inoltre, anche la citotossicità di ogni molecola è stata valutata nella stessa gamma di concentrazioni, utilizzando il test MTT.

L'attività di screening effettuata ha portato alla
5 selezione di quattro composti, chiamati SM875, SM930, SM940 e SM950.

Esempio 2

Sintesi chimica di SM875.

Il prodotto target SM875 è stato ottenuto secondo la
10 strategia sintetica riportata in figura 4. La sequenza prevede la preparazione del precursore 1-(4-bromofenil)-1H-pirazol-5-ammina [1], che è stato utilizzato in una successiva reazione a tre componenti con 4-idrossi-3-metossibenzaldeide e acido Meldrum (2,2-dimetil-1,3-diossano-4,6-dione) secondo un metodo modificato da Zeng
15 et al. [2]. Il 1-(4-bromofenil)-1H-pirazol-5-ammina è stato sintetizzato a partire da 4-(bromofenil)idrazina che è stato ottenuto dal cloridrato commerciale mediante trattamento con una soluzione acquosa satura di NaHCO₃
20 (50 mL), seguita da estrazione di diclorometano (50 mL x3), trattamento con Na₂SO₄ anidro ed evaporazione. Ad una soluzione mescolata magneticamente di 4-(bromofenil)idrazina (100 mg, 0,53 mmol, in 5 mL di etanolo 5), (E)-etil 2-ciano-3-etossiacrilato (89,6 mg, 0,53 mmol) è stato aggiunto e refluxo per 2 h. La
25

miscela di reazione è stata concentrata in vacuo, il residuo è stato sospeso in soluzione 1:1 metanolo / 2M NaOH aq. soluzione (5 mL) e reflussato per 1 h. Dopo il raffreddamento, la miscela è stata neutralizzata con 1M HCl aq. soluzione (5 mL) e concentrato in vacuo utilizzando un bagno d'acqua a 40 ° C. Il residuo è stato riscaldato a 180°C per 10 minuti, sospeso in etanolo dopo il raffreddamento e conservato per una notte a 4°C. Il supernatante è stato recuperato e concentrato per dare un residuo che è stato mescolato in presenza di una soluzione di NaHCO₃ (10 mL). L'estrazione con acetato di etile (10 mL x3), seguita dal trattamento con Na₂SO₄ anidro delle fasi organiche combinate e la concentrazione in vacuo ha dato il prodotto (79 mg, 61%), che è stato utilizzato nella seguente reazione a tre componenti. La sintesi di successo di 1-(4-bromofenil)-1H-pirazol-5-ammina è stata verificata da 1H-NMR [δ H 7,58(d, J 8,7 Hz, H-3'e H-5'), 7,47(d, J 8,7 Hz, H-2'e H-6'), 7,41(s, H-3), 5,62 (s, H4)] e ESIMS (m/z 239,8 [M+H]⁺). Nell'ultimo stadio di reazione, 1-(4-bromo-fenil)-1H-pirazol-5-ammina (79 mg, 0,33 mmol), 4-idrossi-3-metossibenzaldeide (41 mg, 0,27 mmol) e 2,2-dimetil-1,3-diossano-4,6-dione (46 mg, 0.32 mmol) in etanolo (5 mL) sono stati reimmessi sotto agitazione per 2,5 h, o in alternativa sostituendo il riscaldamento convenzionale con l'irradiazione a

microonde a 110°C per 1 h. La miscela di reazione è stata poi raffreddata a temperatura ambiente ed essiccata in vacuo. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia a strato sottile preparatoria a base di silice (PLC) eluizione con n-esano/etil acetato (1:1). La banda raccolta al fattore di ritenzione 0,4 è stata prima utilizzata per la caratterizzazione strutturale e poi iniettata in HPLC preparatorio (colonna RP-18, acetonitrile / acqua 1:1, rilevamento UV a 254 nm, flusso 5 mL·min⁻¹, tempo di ritenzione 4,5 min) per dare il prodotto di destinazione (per l'uso su colture cellulari) come polvere bianca dopo l'evaporazione dell'eluente: 34 mg, 25% con reflusso in etanolo; un rendimento di ~25% si ottiene anche con l'irradiazione a microonde.

15 Caratterizzazione strutturale di SM875.

NMR, spettri ESI-MS insieme a LC-MS (UV, EIC e MS) sono riportati in figura 5, A-D. I valori di spettrometria di massa ad alta risoluzione riportati corrispondono alla media di 100 misure: HRESI(+)MS: m/z 414.04426 ± 0.00126 [M+H]⁺ (calcolato per C₁₉H₁₇₇₉BrN₃₀₃, 414.04478); HRESI(+)MS/MS (414): m/z 399.02055 ± 0.00190 [M+H]⁺ (calcolato per C₁₈H₁₄₇₉BrN₃₀₃, 399.02131); m/z 372,03349 ± 0,00195 (calcolato per C₁₇H₁₅₇₉BrN₃₀₂, 372,03422); m/z 289,99184 ± 0,00175 (calcolato per C₁₂H₉₇₉BrN₃₀, 372,03422).

Caratterizzazione dell'attività terapeutica di SM875

Il composto SM875 (mostrato in Figura 6A) induce una diminuzione dose-dipendente dell'espressione di PrP^C, accompagnata da uno spostamento progressivo del segnale
5 dall'atteso ~35 kDa di PrP^C nativo a lunghezza piena, diglicosilato, a bande di peso molecolare più basse (>28 kDa), probabilmente corrispondenti a forme di PrP scisse. Questi effetti erano già evidenti a concentrazioni fino a 3 pM (Figura 6B, corsie 7-10). È importante notare che
10 SM875 non ha prodotto alcun effetto su NEGR-1, una proteina non rilevante GPI-anchored sintetizzata nel ER come la PrPC (Figura 6B). Le cellule HEK293 (ATCC, CRL-1573) sono state stabilmente trasfettate con il mouse PrP^C o NEGR-1 ed esposte a diverse concentrazioni di
15 SM875 (mostrato) o veicolo (DMSO, volume equivalente) per 24 ore, lisate e analizzate tramite *Western blotting*. I segnali sono stati rilevati utilizzando uno specifico anticorpo primario anti-PrPC o anti-NEGR-1, e anticorpi secondari rilevanti accoppiati con HRP, rivelati
20 utilizzando un sistema di imaging ChemiDoc Touch (BioRad, CA, USA) Effetti simili sono stati ottenuti in cellule ZR-75, una linea di cellule di cancro al seno umano che esprimono la PrP^C in modo endogeno (Figura 6D). È importante notare che la diminuzione dell'espressione
25 di PrP^C non è stata accompagnata da una diminuzione del

suo mRNA, come saggiato da RT-PCR (Figura 13), dimostrando che il composto agisce a livello post-traslazionale.

Successivamente si è verificato se SM875 poteva
5 modificare l'elaborazione post-traslazionale della PrP^C.
La proteina è nota per essere fisiologicamente sottoposta ad una scissione primaria post-traslazionale chiamato alfa-cleavage, che divide i domini N e C-terminale di PrP^C, producendo una metà membrana-c-terminale C (residui
10 ~111-231) e un frammento solubile chiamato N1 (residui ~23-110). L'esatta posizione della scissione, così come l'identità precisa degli enzimi responsabili sono ancora oggetto di dibattito. Al fine di testare l'effetto di SM875 sulla scissione alfa, le cellule HEK293 che
15 esprimono stabilmente la PrP^C sono state incubate con diverse concentrazioni di composto (1-10 pM) per 24 ore. I lisati delle cellule sono stati poi trattati con l'enzima PNGase-F per rimuovere i mutati di zucchero, e analizzati da *Western blotting* (Figura 7). Al trattamento
20 con SM875, è stato osservato un aumento dose-dipendente di C1 PrP, accompagnato da una diminuzione proporzionale della PrP^C a lunghezza intera, indicando che il composto aumenta l'alfa-cleavage. Collettivamente, questi dati indicano che SM875 induce una specifica diminuzione dose-dipendente della PrP^C nativa a lunghezza intera,
25

favorendo la sua degradazione.

SM875 riduce la quantità di PrP^C a piena lunghezza sulla superficie della cella

Sulla base degli effetti osservati di SM875
5 sull'espressione della PrP^C, si è ipotizzato che il
composto potrebbe anche diminuire la quantità totale
della proteina sulla superficie cellulare. Al fine di
testare direttamente questa ipotesi, Le cellule HEK293
stabilmente trasfettate con un modulo PrP^C marcato con
10 una molecola EGFP monomerizzata al suo estremo N-
terminale (EGFP-PrP^C) sono state seminate su un vetrino
da camera a 8 pozzetti e incubate con SM875 (Figura 8, B
e C) o controllo del veicolo (DMSO) (Figura 8 A). I
vetrini coprioggetto sono stati montati con un supporto
15 in gel (Sigma Aldrich), e visualizzati con una stazione
di imaging Cell-R (Olympus) accoppiata ad un microscopio
invertito (IX 81, Olympus). I segnali fluorescenti
derivanti dall'EGFP sono stati acquisiti con una
telecamera ad alta risoluzione (ORCA) dotata di un filtro
20 di eccitazione a 488 nm, e un filtro di emissione con una
gamma di 510 ± 40 nm. In condizioni di controllo, l'EGFP-
PrP^C si localizza quasi interamente sulla membrana al
plasma, dando luogo ad una tipica colorazione "a nido
d'ape" della superficie cellulare. Composti che alterano
25 il traffico di PrP^C, come il derivato della fenotiazina

clorpromazina, hanno dimostrato in precedenza di alterare tale modello di localizzazione [12]. È importante notare che l'incubazione con SM875 per 24 ore ha indotto una drastica riduzione di EGFP-PrP^C sulla superficie cellulare, alle stesse concentrazioni (3-10 pM) alle quali la molecola ha prodotto effetti sull'espressione e sull'elaborazione della PrP^C (Figura 8). È interessante notare che in poche cellule trattate con SM875 è stata osservata la comparsa di strutture simili a punti, indicando il possibile l'accumulo di EGFP-PrP^C in specifici compartimenti intracellulari, compatibili con un modello in cui la proteina viene rimossa dalla ER e inviata alla degradazione intracellulare.

Generazione e caratterizzazione di SM898, un derivato di SM875

In diversi esperimenti è stata notata una evidente citotossicità di SM875 a concentrazioni vicine a quelle in cui il composto esercitava il massimo effetto biologico. Nel tentativo di ridurre la citotossicità di SM875, è stato progettato un derivato fluorurato (chiamato SM898, Figura 9A). SM898 ha mostrato una citotossicità fortemente ridotta (~3 volte), come saggiato in cellule HEK293 esposte a ciascun composto per 48 ore, e successivamente analizzato con il saggio MTT (Figura 9B; la dose letale mediana stimata, LD50, è stata

di 4,6 μM per SM875, e 37,9 μM per SM898). È importante notare che non sono state osservate differenze apprezzabili tra SM875 e SM898 nella loro capacità di ridurre l'espressione PrP^C (Figura 9C). Collettivamente, questi risultati indicano che SM898 è meno tossico del suo composto genitore, pur mantenendo la sua attività biologica.

Esempio 3

Caratterizzazione dell'attività terapeutica di SM930, SM940 e SM950

Tre composti aggiuntivi, denominati SM930, SM940 e SM950 (mostrati nelle Figure 10, 11 e 12 rispettivamente) hanno indotto una riduzione specifica dei livelli di PrP^C nelle cellule, come saggiato dall'analisi Western Blotting, seguendo lo stesso protocollo sperimentale descritto sopra per SM875. Queste molecole sono state analizzate anche per la tossicità intrinseca dal saggio MTT. SM930 ha soppresso l'espressione della PrP^C, ma non il NEGR-1, alla massima concentrazione testata (30 μM) quando testato in cellule HEK293 stabilmente trasformate. La molecola ha anche indotto la morte cellulare alla massima concentrazione testata (30 μM). SM940 ha soppresso l'espressione PrP^C, ma non il NEGR-1, quando testato in cellule HEK293 stabilmente trasformate, a partire da una concentrazione di 3 μM . Il test di vitalità cellulare

nelle cellule HEK293 e Zr-75, come testato da MTT, ha mostrato che SM940 non ha indotto una morte cellulare significativa anche alla più alta concentrazione testata (30 μ M). Infine, SM950 ha soppresso l'espressione PrP^C,
5 ma non il NEGR-1, quando testato in cellule HEK293 stabilmente trasformate, a partire da una concentrazione di 10 μ M. Il test di vitalità cellulare nelle cellule HEK293 e Zr-75, come saggiato da MTT, ha mostrato che questo composto induceva una morte cellulare
10 significativa già ad una concentrazione di 3 μ M nelle cellule HEK293, anche se la molecola era molto meno tossica quando testata nelle cellule Zr-75 (dove ha mostrato una modesta tossicità solo a 30 μ M). Al contrario, nessuno dei composti ha diminuito
15 l'espressione della proteina di controllo NEGR-1 a qualsiasi concentrazione.

Esempio 4

Attività di SM875, SM940 e SM950 nella diminuzione dei livelli di mRNA PrP^C

20 Al fine di escludere la possibilità che SM875, SM940 e SM950 abbiano agito diminuendo i livelli di mRNA di PrP^C, gli inventori hanno effettuato l'analisi PCR in tempo reale della trascrizione di PrP^C in diverse linee cellulari al trattamento composto (Figura 13). I
25 risultati hanno mostrato che nessuna di queste molecole

sopprime l'espressione di PrP^C diminuendo i livelli del suo mRNA.

Esempio 5

I composti SM875 e SM940 inducono l'aggregazione di PrP^C

5 ricombinante in modo dipendente dalla temperatura

I composti SM940 e SM875 sono stati identificati sulla base della logica PPI-FIT di puntare su un intermedio di ripiegamento di PrP^C. Al fine di osservare un effetto diretto di queste molecole sulla PrP^C *in vitro*, è stato
10 progettato un paradigma sperimentale in cui la PrP^C nella conformazione nativa viene riscaldata a diverse temperature con la speranza di fornire energia sufficiente a consentire la sua transizione conformazionale all'intermedio di piegatura previsto
15 (Figura 14). Se l'intermedio di piegatura appare come conseguenza dell'innalzamento della temperatura, allora gli inventori hanno previsto che i composti dell'invenzione, per esempio SM875 o SM940, dovrebbero essere in grado di legarlo, causandone la stabilizzazione
20 e quindi probabilmente inducendone l'aggregazione, poiché il FI-PrP espone ai residui idrofobici di solvente che invece sono sepolti all'interno del nucleo proteico nella conformazione nativa della PrP^C.

L'aggregazione di PrP ricombinante è stata valutata con
25 un test di insolubilità al detergente. I composti SM875 e

SM940 hanno aumentato la quantità di PrP ricombinante insolubile nel detergente e in modo dipendente dalla temperatura; al contrario, non sono stati rilevati effetti nei controlli non trattati, o quando la proteina è stata incubata con la molecola SM935 (che è stata trovata negativa dopo lo screening cellulare e qui utilizzata come controllo negativo), come mostrato da Western blot. Questi risultati indicano che i composti SM875 e SM940 si legano ad un intermedio di ripiegamento di PrP^C (cioè FI-PrP). Le differenze statistiche sono state stimate da Anova a senso unico, Dunnet post-hoc test. p valori di p sono: * $<0,05$, ** $<0,01$.

Esempio 6

SM875 induce la degradazione della PrP^C nel comparto lisosomiale

Gli inventori hanno cercato di testare la possibilità che la molecola SM875 e i suoi derivati potessero indurre la degradazione della PrP^C tramite autofagia dipendente dal lisosoma. In primo luogo, hanno osservato che SM875 induce l'attivazione dell'autofagia nelle cellule in modo dipendente dalla PrP^C, come dimostrato rilevando il Marcatore autofagico LC3-II (Figura 15 A).

Successivamente, hanno trovato che l'inibitore dell'autofagia Bafilomicina A1 inibisce la diminuzione della PrP^C indotta da SM875 nelle cellule (Figura 11 B).

Collettivamente, questi risultati suggeriscono che SM875 promuove la degradazione della PrP^C per via autofagica dipendente dal lisosoma.

Esempio 7

5 SM875 inibisce la replicazione dei prioni nei fibroblasti dei topi

In seguito all'osservazione che SM875 sopprime l'espressione della PrP^C, il substrato per la replicazione dei prioni, gli inventori hanno cercato di
10 testare la capacità di questa molecola di abbassare la quantità di molecole PrP resistenti alla proteinasi-K (PK) nei fibroblasti di topo persistentemente infettati dal ceppo prionico dei Rocky Mountain Laboratories (RML).
Come mostrato in figura 16, hanno scoperto che il
15 composto SM875 inibisce la replicazione dei prioni in modo dose-dipendente, diminuendo i carichi di prioni in modo simile al composto TPM, un potente composto anti-prione precedentemente segnalato (Massignan et al. SciRep 2016).

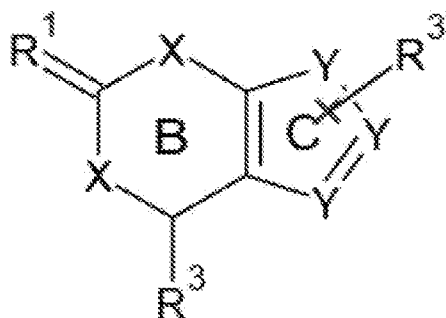
20

* * *

RIVENDICAZIONI

1. Un composto con formula generale (I):

5



10 in cui:

l'anello B può essere parzialmente saturo, ad esempio un anello di di-idropiridinone quando R¹ è O e/o quando una o entrambe le X è N, oppure insaturo, ad esempio un anello di piridinone quando R¹ è O;

15 R¹ può essere O o S;

ogni atomo di carbonio sull'anello B può essere indipendentemente un atomo C o N;

X può essere selezionato indipendentemente tra -C- o -O- o

-N(R⁴)-, dove R⁴ può essere -H, o -C₁₋₄ lineare o ciclico

20 alchilico;

l'anello C è un anello aromatico a 5 o 6 elementi in cui ogni atomo di carbonio può essere -C- o -N-, ad esempio Y può essere indipendentemente -C(R³) o -N(R³)-;

R³ è selezionato tra -H, C₁₋₄ gruppo alchilico lineare o

25 ciclico, alchossile o arilossile, anello A o anello Z A;

preferibilmente, l'anello C ha uno o due eteroatomi;

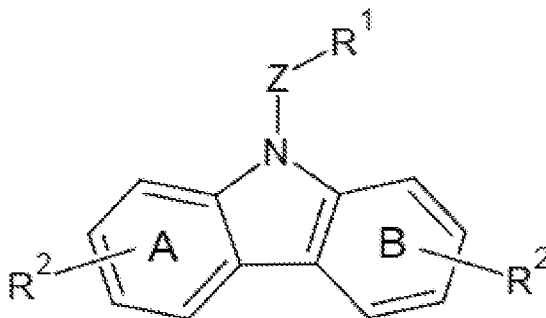
Z può essere -CH₂- o -O- o -N(H)- o -S(O₂)- o -S(O)-;

l'anello A può essere un anello aromatico o eteroaromatico a 5 o 6 membri, preferibilmente un anello fenilico; l'anello A

5 può essere sostituito in qualsiasi posizione con uno o più gruppi R₂ selezionati indipendentemente tra: -H, -F, -Cl, -Br, -I, -CH₃, -CH₂CH₃, -CH(CH₃)₂, -C(CH₃)₃, -CHF₂, -CF₃, -OH, -OCH₃,

-OCH₂CH₃, -OCF₃, -OCH(CH₃)₂, -CN, -NO₂, -NH₂, -SH;

10 o formula generale (II):



15 in cui:

ogni atomo di carbonio su ogni anello può essere indipendentemente un atomo -C- o -N-;

Z può essere -H, -CH₂-, -S(O₂)-, -S(O)-,

20 R₁ può essere assente (quando Z è -H) o può essere un gruppo selezionato indipendentemente tra: H, C₁₋₄ lineare, ramificato, alchilico ciclico o alchossilico o arilossilico opzionalmente sostituito con uno o più di uno: -H, -F, -Cl, -Br, -I, -CH₃, -CH₂CH₃, -CH(CH₃)₂, -C(CH₃)₃, -CHF₂, -CF₃,
25 -OH, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -OCF₃, -OCH(CH₃)₂, -CN, -NO₂, -NH₂, -S,

un anello tetraidrofurano o un anello tetraidropiranicico in cui ogni atomo di carbonio dell'anello può essere sostituito indipendentemente con -H o -OH, un anello aromatico o eteroaromatico a 5 o 6 membri sostituito in qualsiasi

5 posizione con uno o più gruppi R² selezionati indipendentemente tra: -H, -F, -Cl, -Br, -I, -CH₃, -CH₃, -CH₂CH₃,

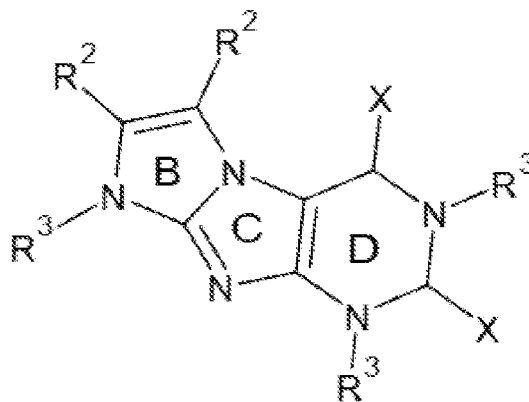
-CH(CH₃)₂, -C(CH₃)₃, -CHF₂, -CF₃, -OH, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -OCF₃, -OCH(CH₃)₂, -CN, -NO₂, -NH₂, -SH;

10 l'anello A e l'anello B sono ciascuno indipendentemente un anello aromatico o eteroaromatico a 5 o 6 membri, preferibilmente un anello fenilico; l'anello A e l'anello B possono essere sostituiti indipendentemente in qualsiasi

15 posizione con uno o più gruppi R² selezionati indipendentemente tra: -H, -F, -Cl, -Br, -I, -CH₃, -CH₂CH₃, -CH(CH₃)₂, -C(CH₃)₃, -CHF₂, -CF₃, -OH, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -OCF₃, -OCH(CH₃)₂, -CN, -NO₂, -NH₂, -SH;

o formula generale (III):

20



25

in cui:

ogni atomo di carbonio su ogni anello aromatico può essere indipendentemente un atomo C o N;

l'anello B e l'anello C sono anelli di imidazolo fusi,

5 L'anello D è un anello di pirimidina, opzionalmente l'anello D può essere un anello di citosina o di uracile;

R₂ sono ciascuno indipendentemente -H, -OH, -CH₂OH, -CH₃, -CH₂CH₃, -CH₂CH₃, alogeno selezionato nel gruppo che lo compone: -F, -Cl, -Br, -I, -CF₃, -OCH₃;

10 X può essere indipendentemente =O, -NH₂, =S;

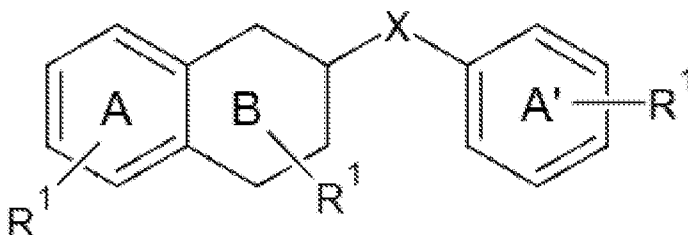
R₃ è selezionato indipendentemente da -H, C₁₋₄ lineare, ramificato o ciclico alchilico, anello A o Z-ring A;

Z può essere -CH₂ o -S(O₂)- o -S(O)-,

L'anello A può essere un anello aromatico o eteroaromatico a
15 5 o 6 membri, preferibilmente un anello fenilico; l'anello A può essere sostituito in qualsiasi posizione con uno o più gruppi R₁ selezionati indipendentemente da: -H, -F, -Cl, -Br, -I, -CH₃, -CH₂CH₃, -CH(CH₃)₂, -C(CH₃)₃, -CHF₂, -CF₃, -OH, -OCH₃,

20 -OCH₂CH₃, -OCF₃, -OCH(CH₃)₂, -CN, -NO₂, -NH₂, -SH;

o formula generale (IV):



25

in cui:

ogni atomo di carbonio su ogni anello può essere indipendentemente un atomo C o N;

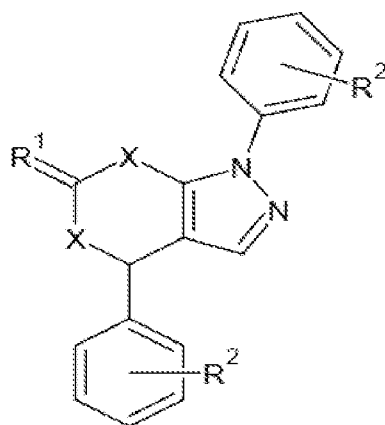
l'anello A e A' sono ciascuno indipendentemente un anello aromatico o eteroaromatico a 5 o 6 membri, preferibilmente un anello fenilico;

l'anello A, A' e B possono essere sostituiti in qualsiasi posizione con uno o più gruppi R1 selezionati indipendentemente tra: -H, -F, -Cl, -Br, -I, -CH3, -CH2CH3, -CH(CH3)2, -C(CH3)3, -CHF2, -CF3, -OH, -OCH3, -OCH2CH3, -OCF3, -OCH(CH3)2, -CN, -NO2, -NH2, -SH;

l'anello B è un anello aromatico o non aromatico in cui ogni atomo può essere indipendentemente uno o più atomi di C o N o O o S o S(O2) e preferibilmente è un anello di piperidina;

X è -CH2-, -O-, -S-, -N(H)-, -C(O)-, -C(S)-, -C(H)=C(H)-, -S(O2)-, -S(O)-.

2. Il composto secondo la rivendicazione 1, con formula (I.1):



in cui ogni atomo di carbonio sull'anello B può essere
indipendentemente un atomo C o N,

X può essere selezionato indipendentemente tra -C- o -O- o
N(R4)-, R4 può essere -H, o -C1-4 lineare o ciclico
5 alchilico,

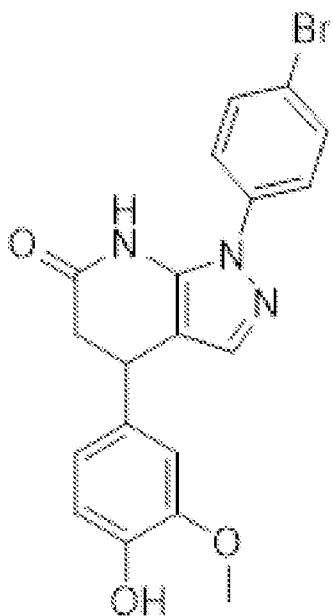
R1 può essere O o S,

R2 può essere selezionato indipendentemente tra: -H, -F, -Cl,
-Br, -I, -CH3, -CH2CH3, -CH(CH3)2, -C(CH3)3, -CHF2, -CF3,
-OH,

10 -OCH3, -OCH2CH3, -OCF3, -OCH(CH3)2, -CN, -NO2, -NH2, -SH.

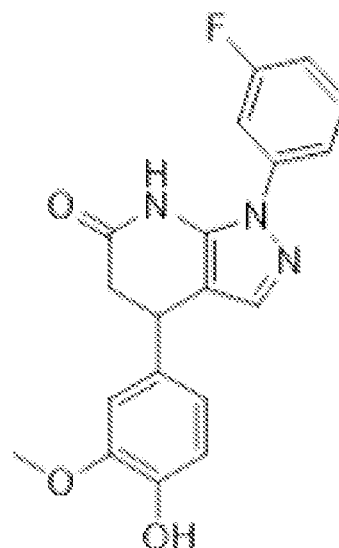
3. Il composto secondo la rivendicazione 1 o 2 con formula:

15



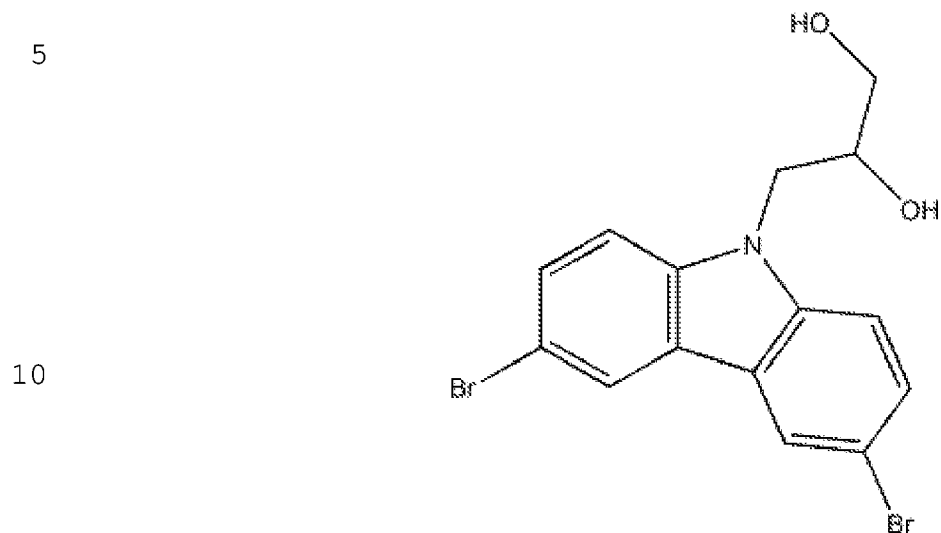
oppure

20

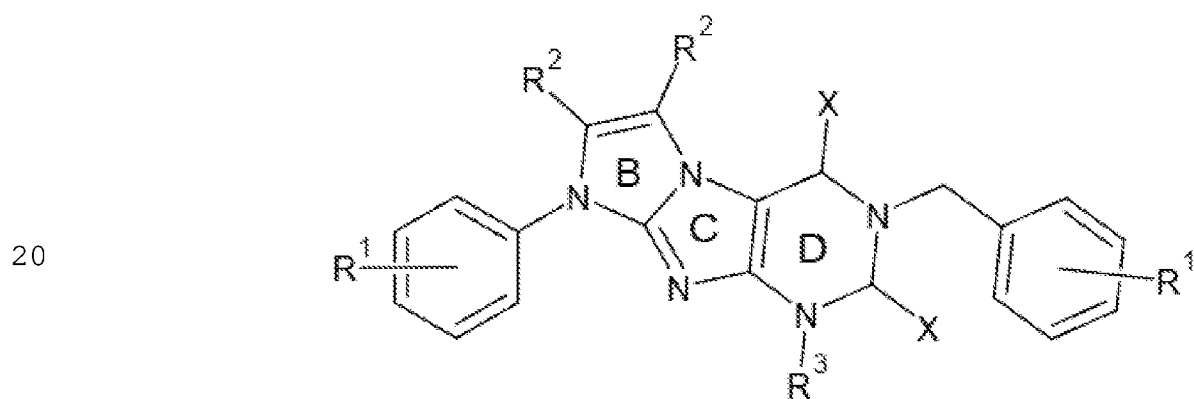


25

4. Il composto secondo la rivendicazione 1 avente formula:



5. Il composto secondo la rivendicazione 1 con formula
15 (III.1)



in cui ogni atomo di carbonio su ogni anello aromatico può
25 essere indipendentemente un atomo C o N,

L'anello B e l'anello C sono anelli di imidazolo fusi,
 L'anello D è un anello di pirimidina, opzionalmente l'anello
 D può essere un anello di citosina o di uracile;
 X può essere indipendentemente =O, -NH₂, =S;

5 R1 può essere selezionato indipendentemente tra: -H, -F, -Cl,
 -Br,

-I, -CH₃, -CH₂CH₃, -CH(CH₃)₂, -C(CH₃)₃, -CHF₂, -CF₃, -OH,
 -OCH₃, -OCH₂CH₃, -OCF₃, -OCH(CH₃)₂, -CN, -NO₂, -NH₂, -SH;

R2 può essere ciascuno indipendentemente -H, -OH, -CH₂OH,

10 -CH₂OH, -CH₃,

-CH₂CH₃, alogeno selezionato nel gruppo che comprende: -F,
 -Cl, -Br, -I, -CF₃, -OCH₃,

R3 è selezionato indipendentemente da -H, C1-4 lineare,
 ramificato o ciclico alchilico, anello A o Z-ring A,

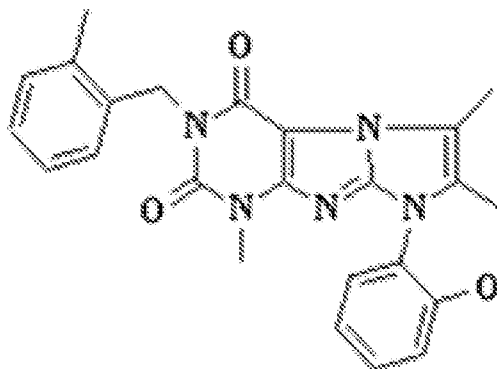
15 Z può essere -CH₂ o -S(O₂)- o -S(O)-,

L'anello A può essere un anello aromatico o eteroaromatico a
 5 o 6 componenti, preferibilmente un anello fenilico;
 l'anello A può essere sostituito in qualsiasi posizione con
 uno o più gruppi R1.

20

6. Il composto secondo la rivendicazione 1 o 5 avente
 formula:

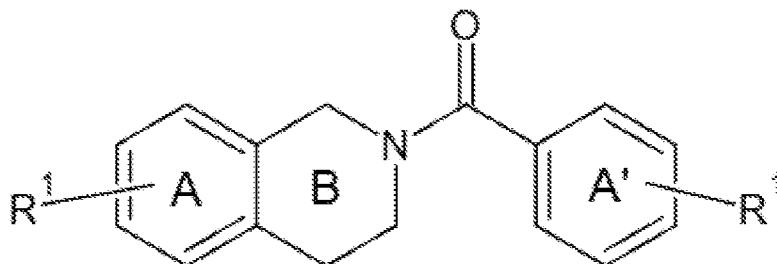
25



5

7. Il composto secondo la rivendicazione 1 avente formula (IV.1):

10



15 l'anello A e A' possono essere ognuno indipendentemente un anello aromatico o eteroaromatico a 5 o 6 membri, preferibilmente un anello fenilico,

L'anello B può essere un anello aromatico o non aromatico in cui ogni atomo può essere indipendentemente uno o più atomi
20 di C o N o O o S o S(O₂) e preferibilmente è un anello di piperidina,

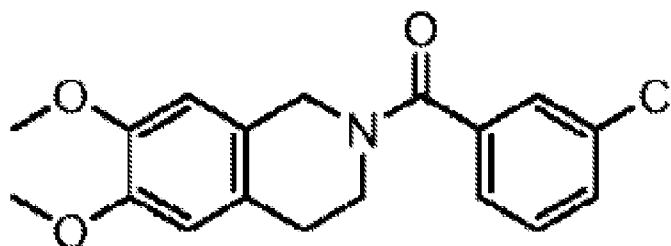
Gli anelli A, A' e B possono essere sostituiti in qualsiasi posizione con uno o più gruppi R₁,

R₁ può essere selezionato indipendentemente da: -H, -F, -Cl,
25 -Br, -I, -CH₃, -CH₂CH₃, -CH(CH₃)₂, -C(CH₃)₃, -CHF₂, -CF₃, -OH,

-OCH₃, -OCH₂CH₃, -OCF₃, -OCH(CH₃)₂, -CN, -NO₂, -NH₂, -SH.

8. Il composto secondo la rivendicazione 1 o 7 con formula:

5



9. Un composto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti da 1 a 8 per l'uso come medicinale.

10 10. Un composto secondo la precedente rivendicazione per l'uso come medicinale nel trattamento di disturbi neurodegenerativi, disturbi neuroinfiammatori e malattie demielinizzanti, cancro.

15 11. Un composto secondo la rivendicazione precedente, in cui tali disturbi neurodegenerativi sono selezionati nel gruppo che comprende le malattie prioniche sporadiche, ereditarie o acquisite, il morbo di Alzheimer, il morbo di Parkinson e altre α -sinucleinopatie; tali disturbi neuroinfiammatori e malattie demielinizzanti che comprendono
20 la sclerosi multipla; tale cancro è selezionato nel gruppo che comprende il glioblastoma, il cancro gastrico, il cancro al seno, il cancro al colon.

25 12. Un composto secondo la rivendicazione precedente, in cui la malattia prionica comprende: Malattia di Creutzfeldt-Jakob (CJD), sindrome di Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS)

e insonnia familiare mortale (FFI).

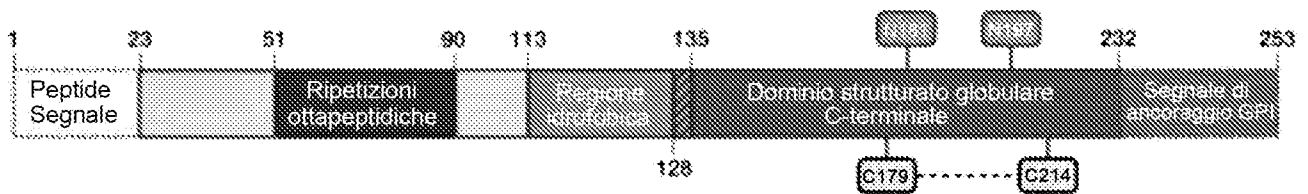
13. Un composto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti 9-12, per l'uso come medicinale in combinazione con composti chimici, anticorpi, terapia genica o approcci terapeutici di modificazione genica, contro 5 malattie o disturbi legati alla proteina prionica cellulare (PrPC) o interattori di PrPC o vie di segnale tossiche che coinvolgono PrPC.

14. Il composto secondo la precedente rivendicazione, in cui tali malattie o disturbi legati alla proteina prionica 10 cellulare (PrPC) o agli interattori della PrPC o alle vie di segnale tossiche che coinvolgono la PrPC comprendono disturbi neurodegenerativi, come malattie prioniche sporadiche, ereditarie o acquisite, morbo di Alzheimer, morbo di 15 Parkinson e altre α -sinucleinopatie; disturbi neuroinfiammatori e malattie demielinizzanti, come la sclerosi multipla; cancro, in particolare glioblastoma, cancro gastrico, cancro al seno, cancro al colon.



FIG. 1

A.



B.

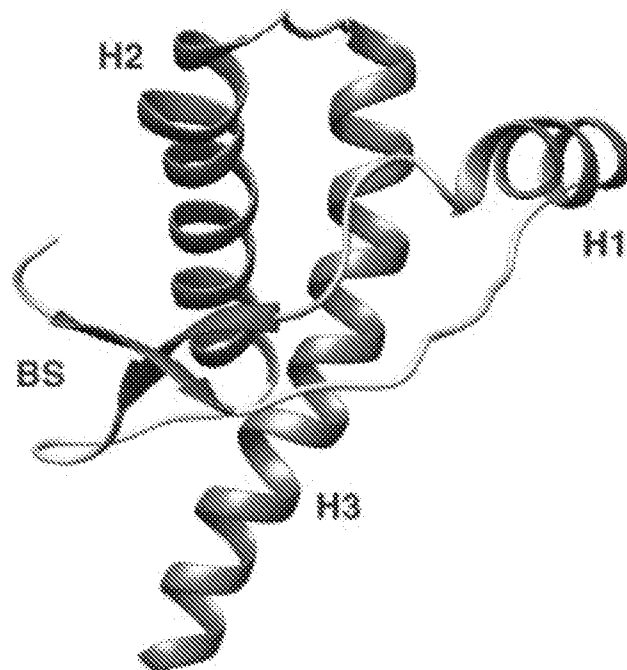


FIG. 2

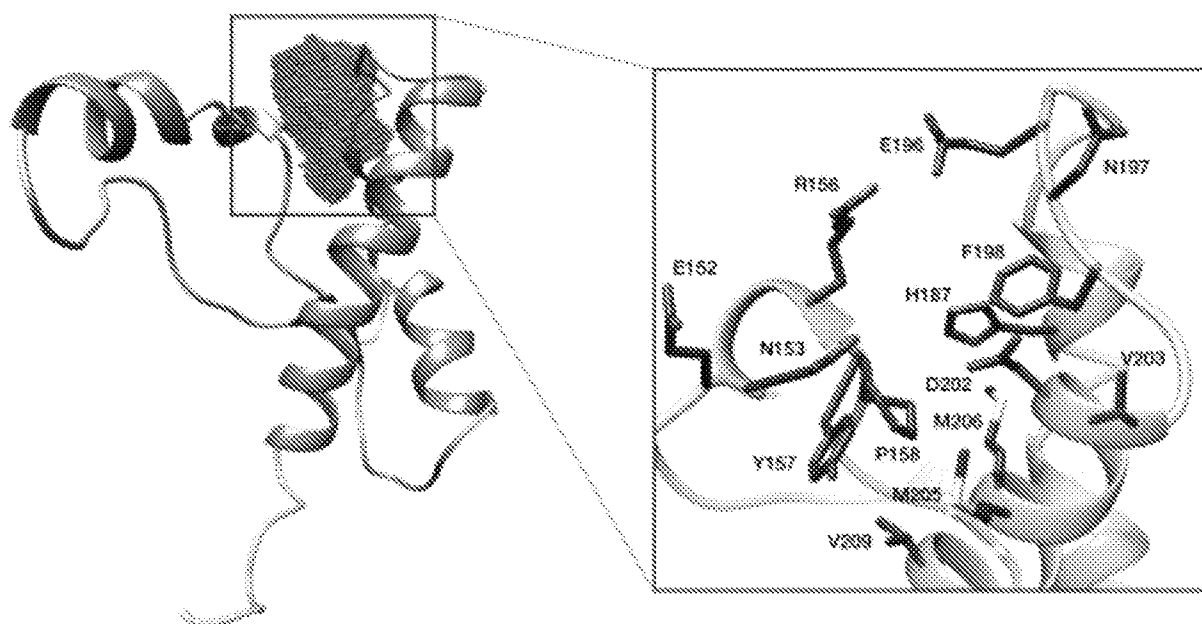


FIG. 3

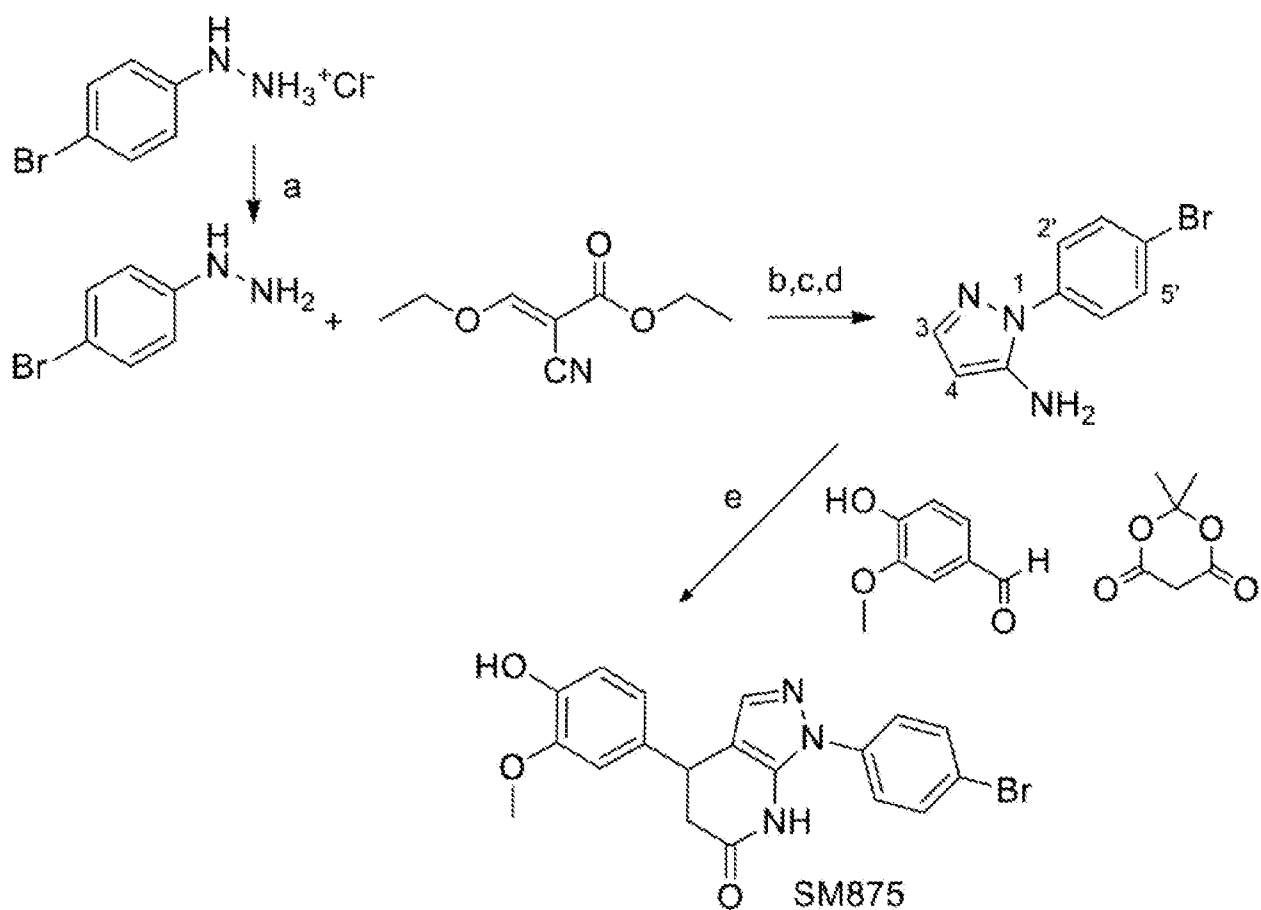


FIG. 4

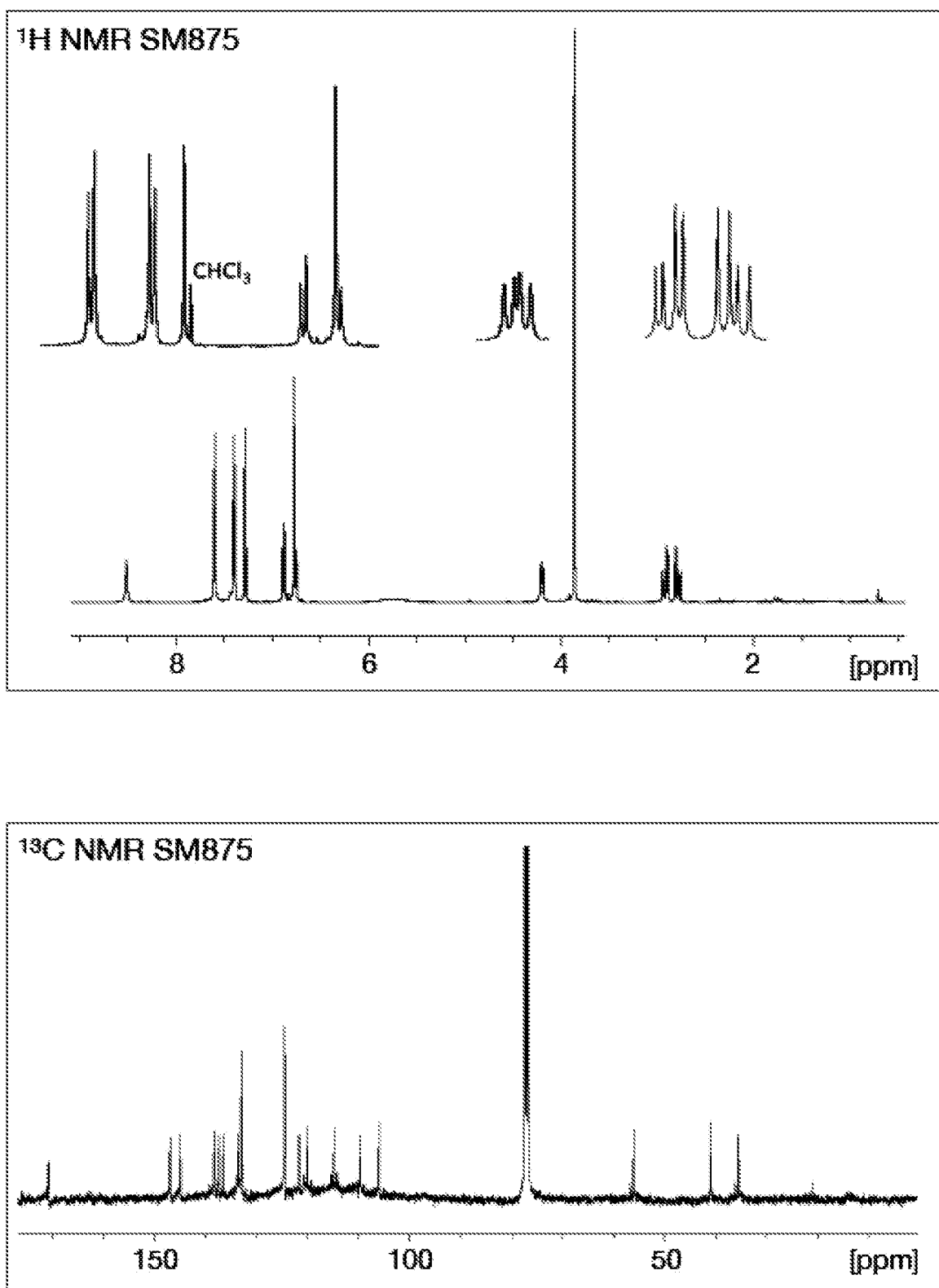


FIG. 5A

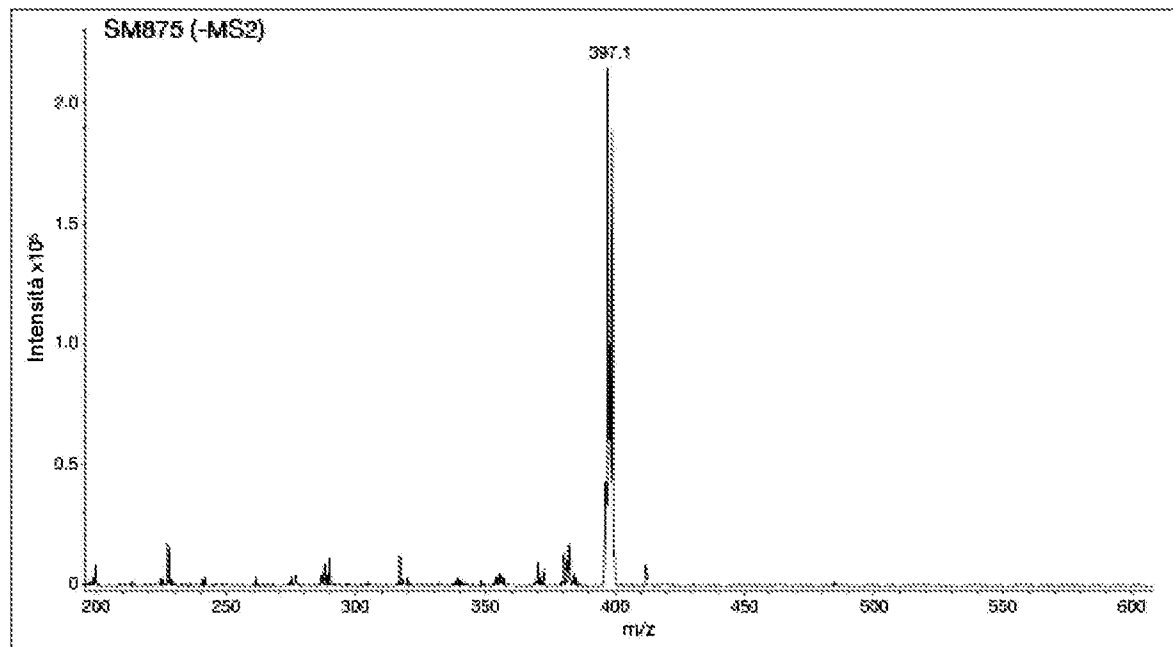
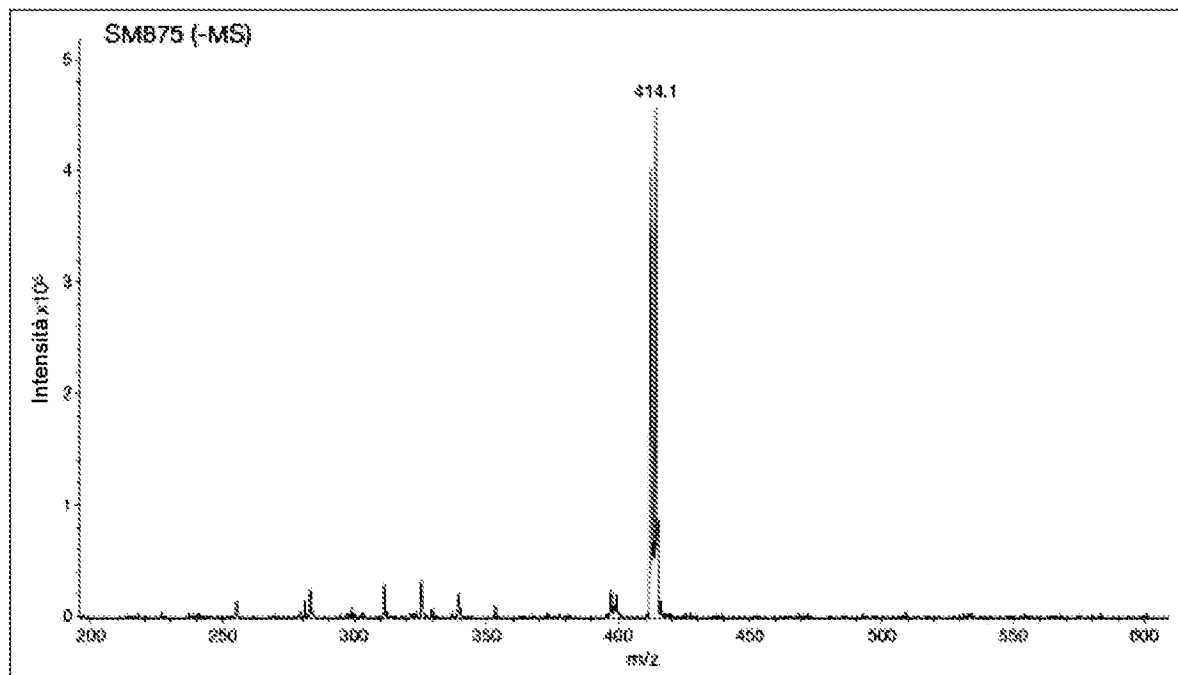


FIG. 5B

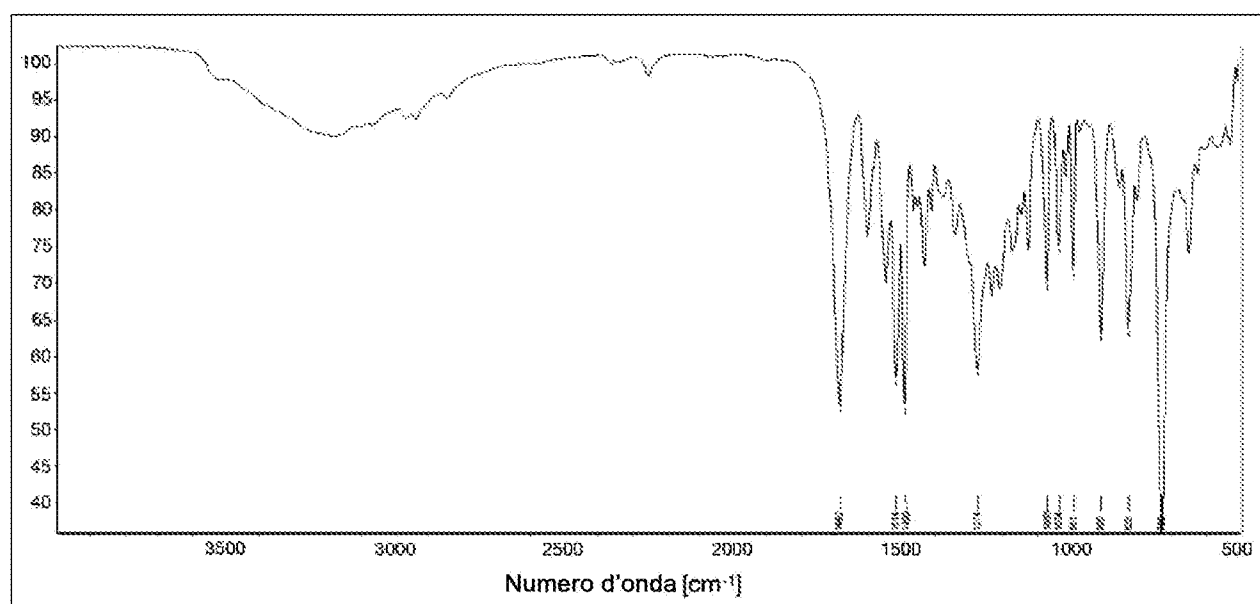
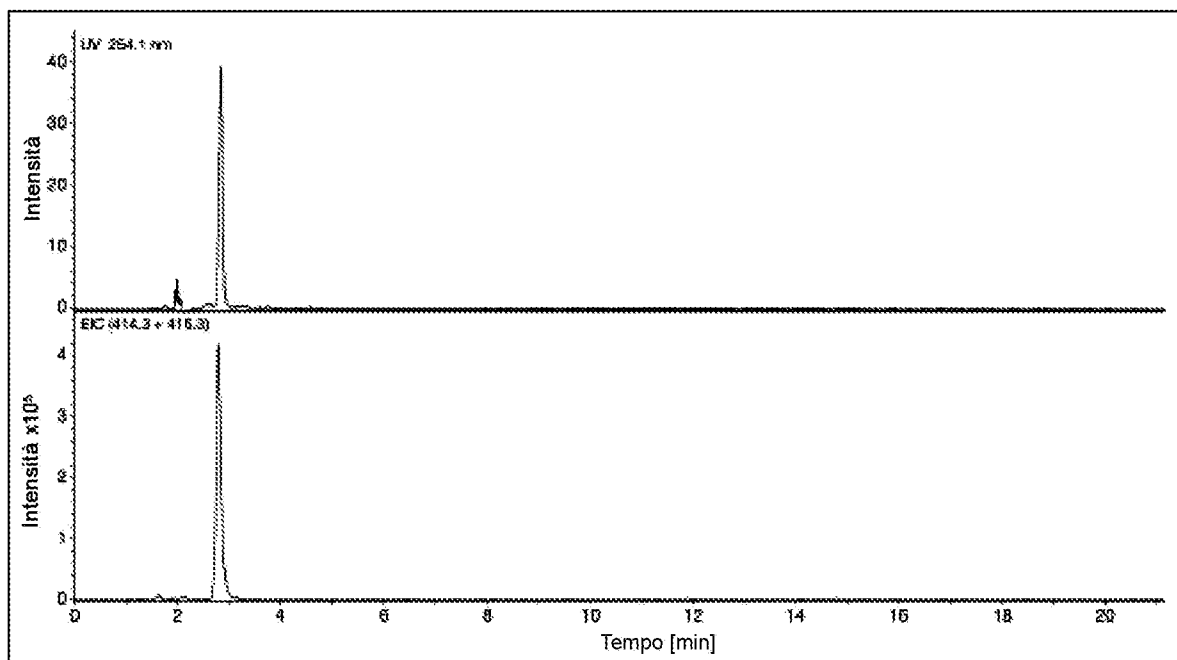


FIG. 5C

(i)



(ii)

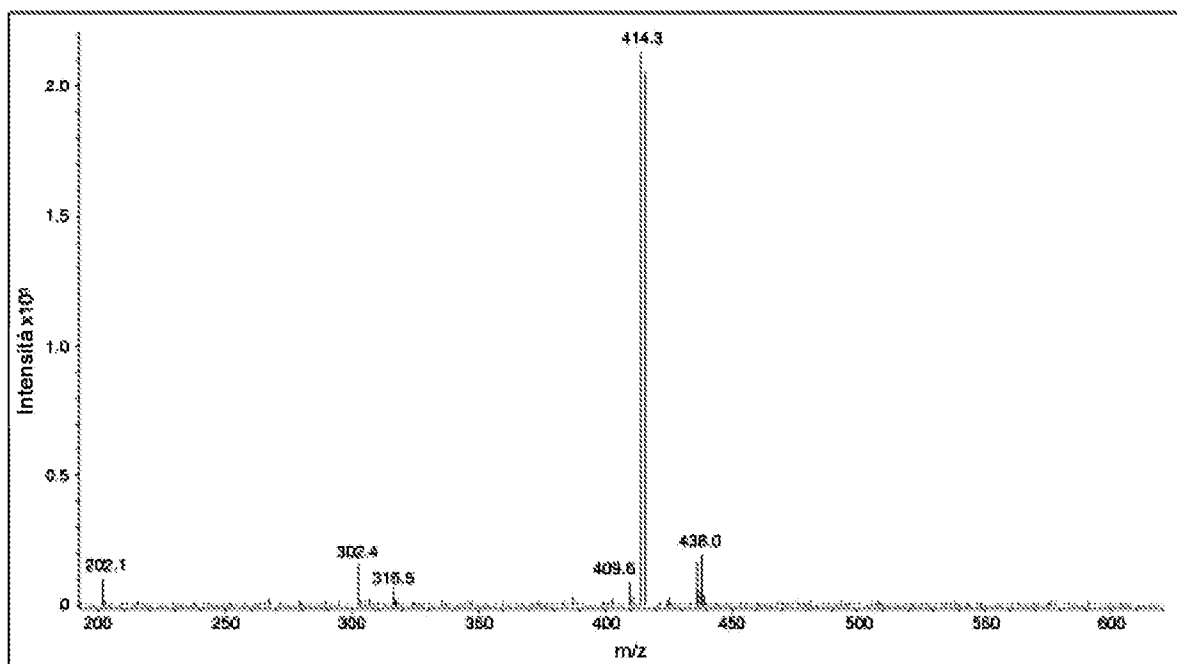


FIG. 5D

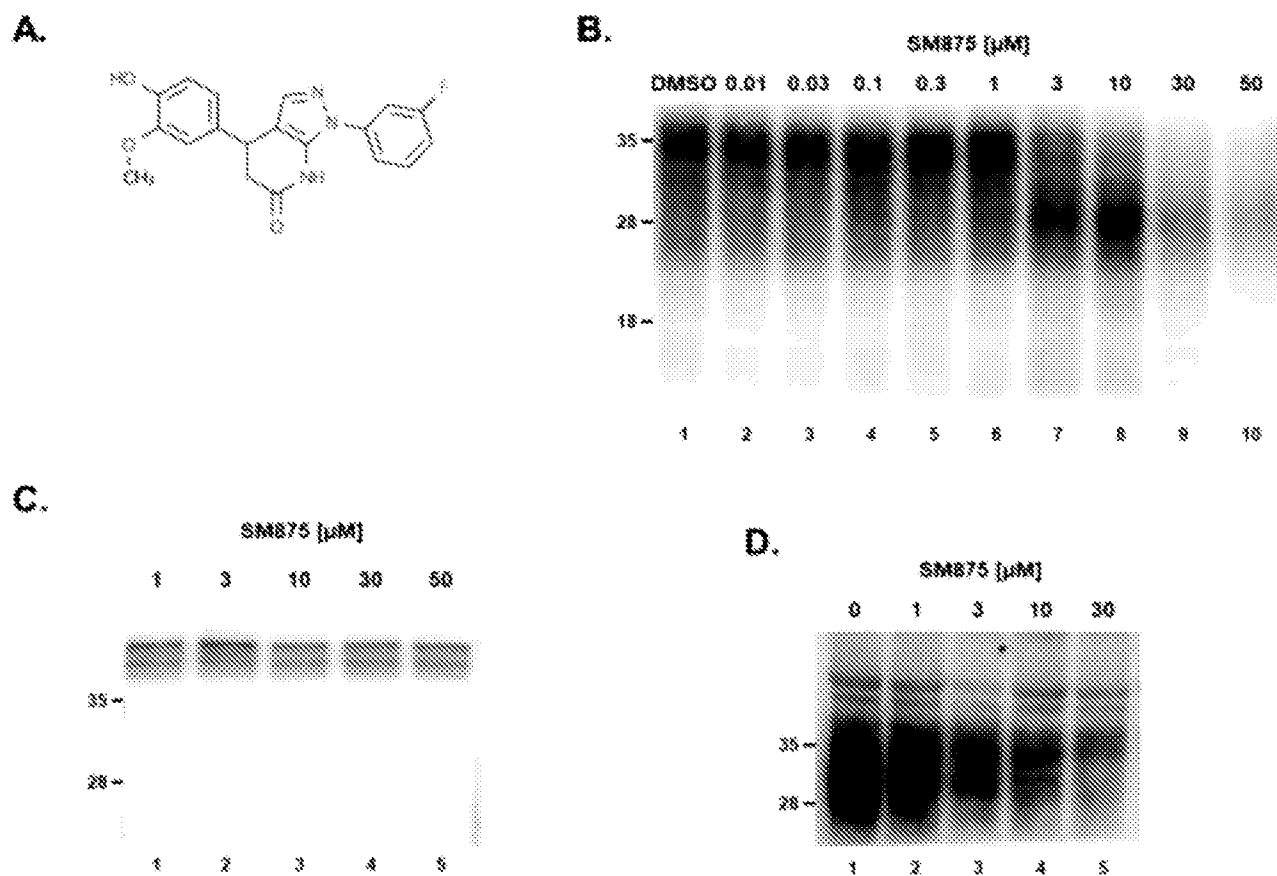


FIG. 6

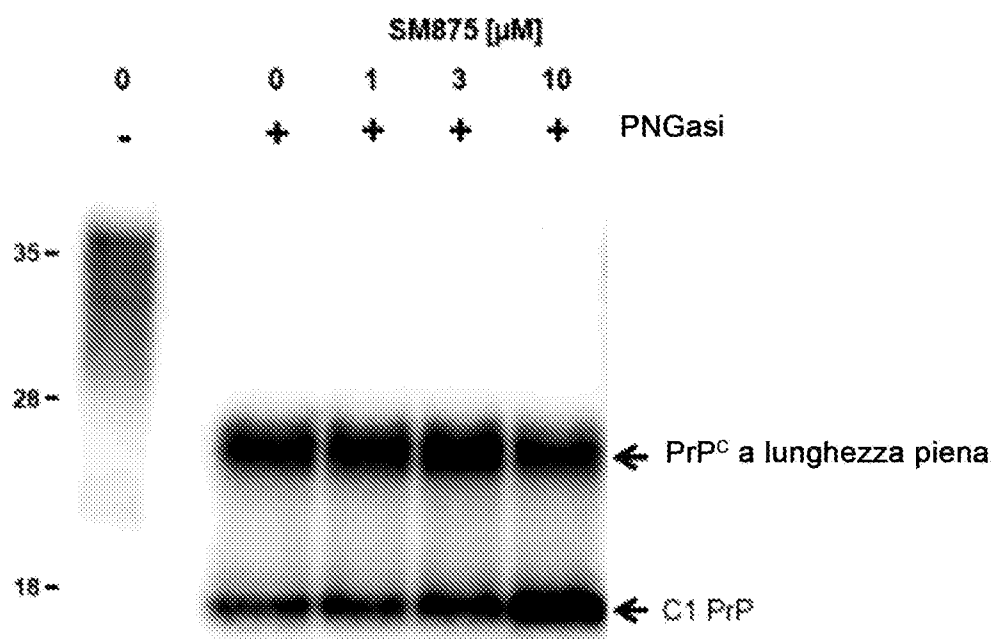


FIG. 7

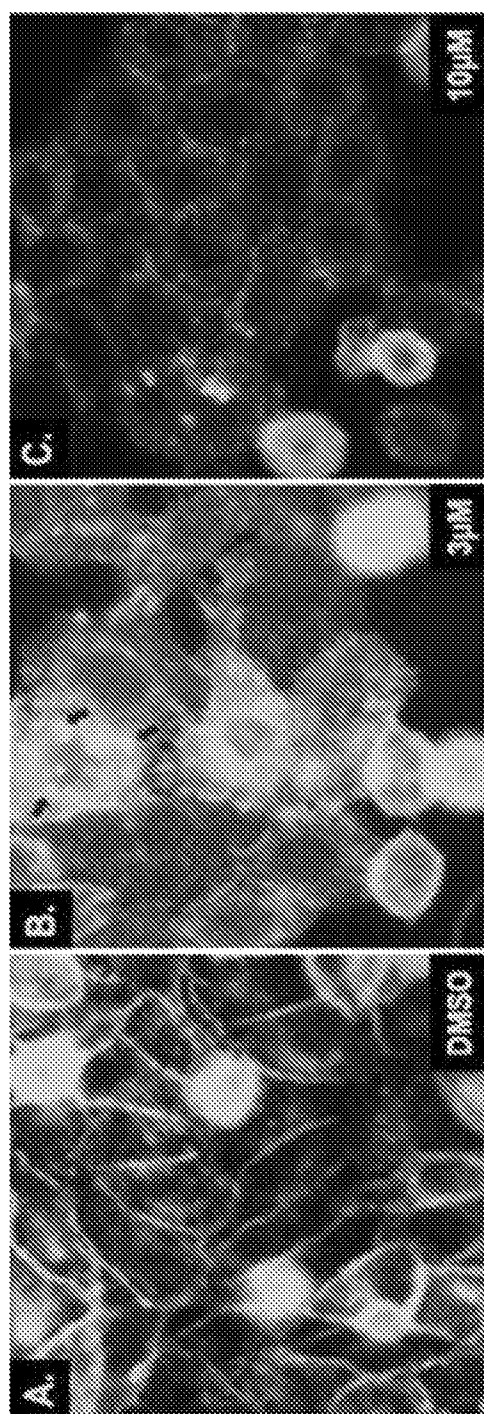


FIG. 8

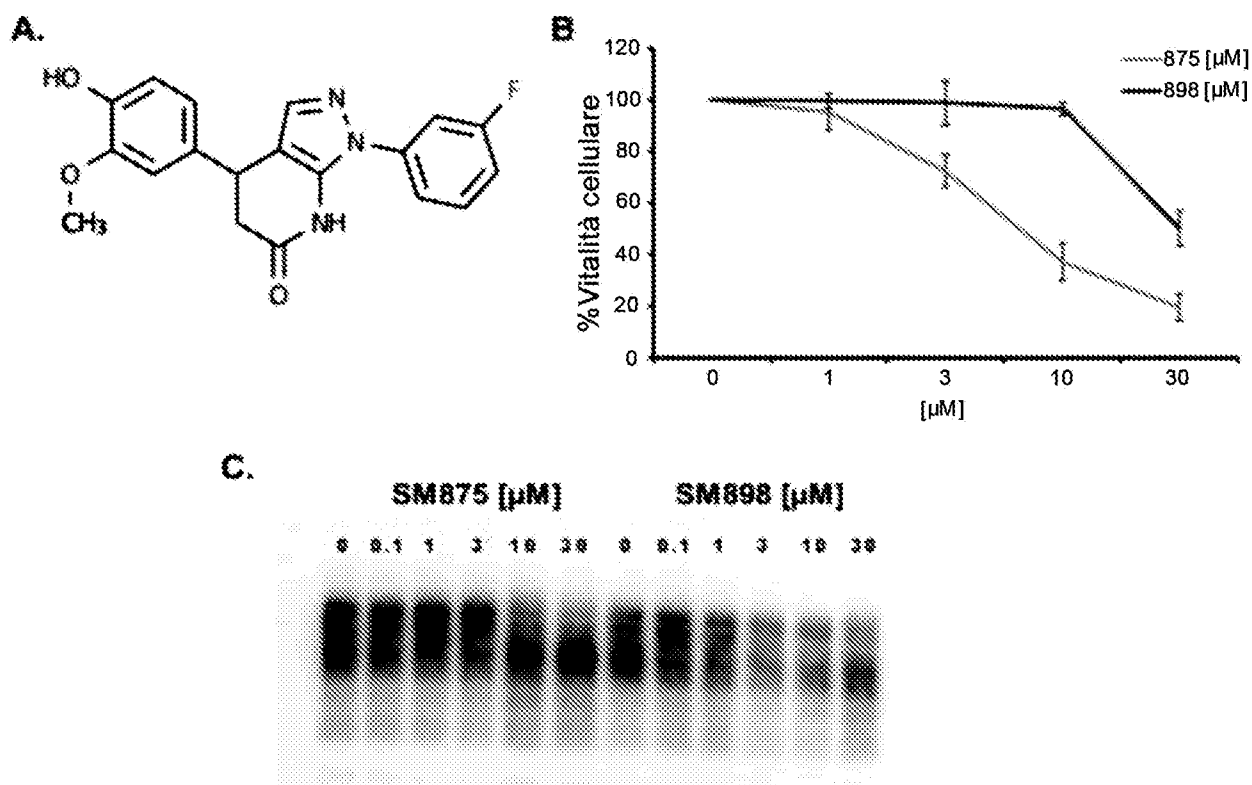
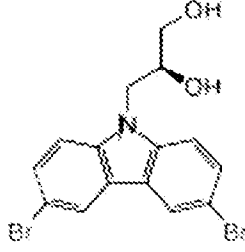
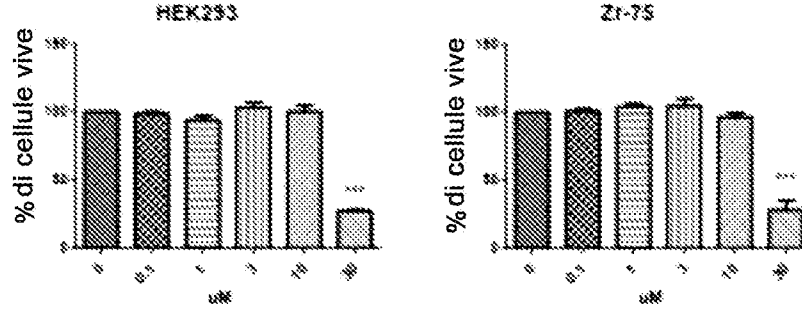


FIG. 9

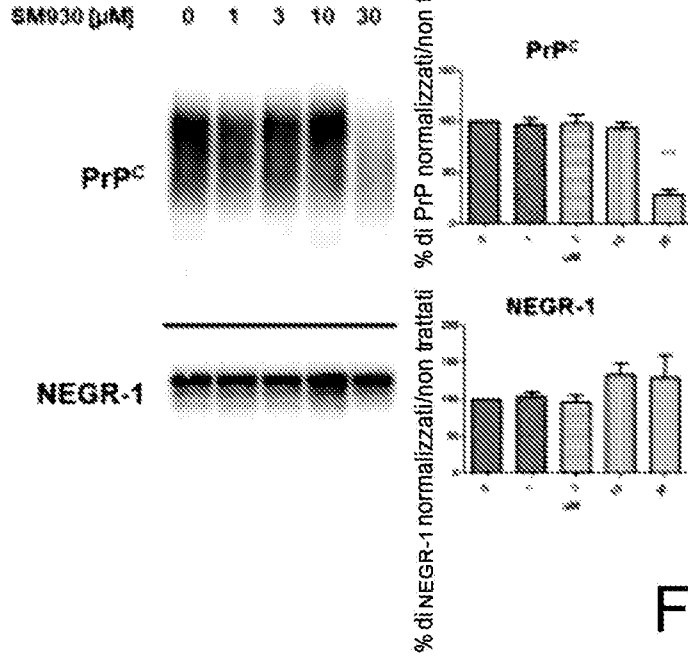
A. SM930



B. Viabilità cellulare



C. HEK293



D. Zr-75

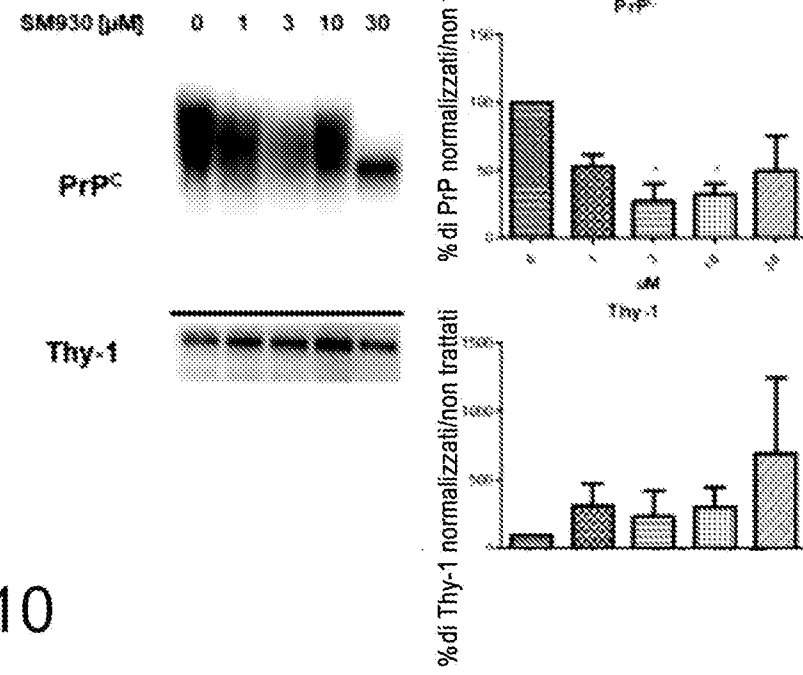
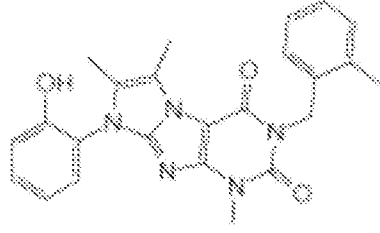
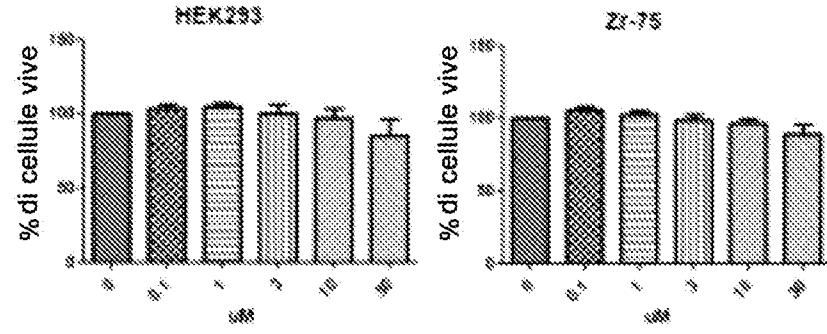


FIG. 10

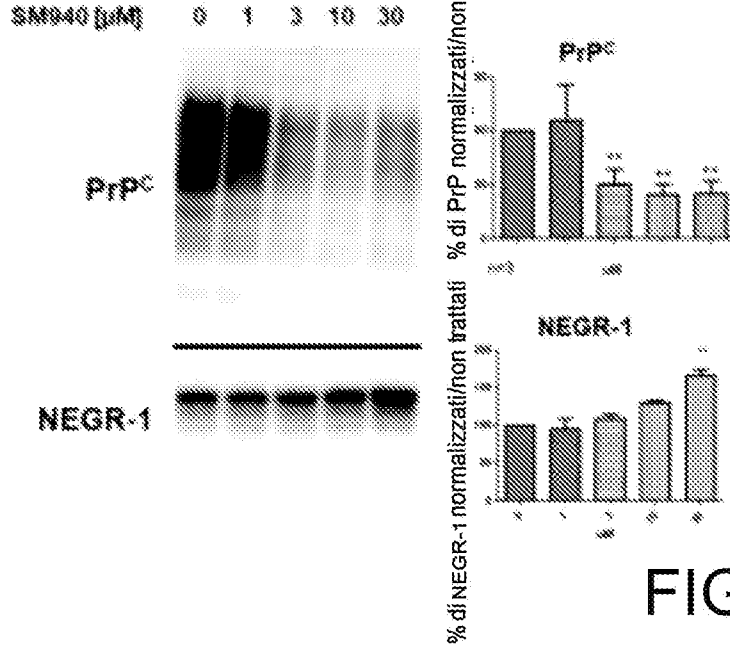
A. SM940



B. Viabilità cellulare



C. HEK293



D. Zr-75

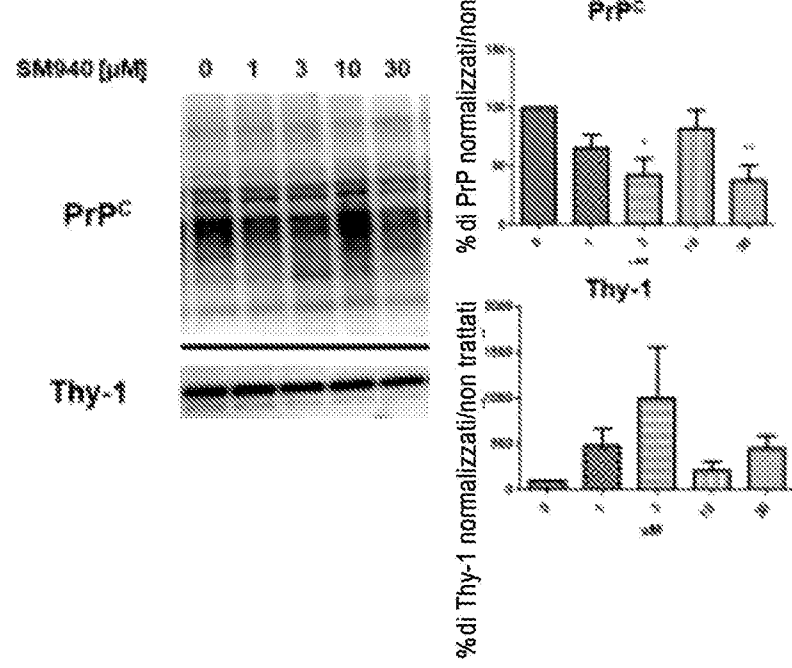
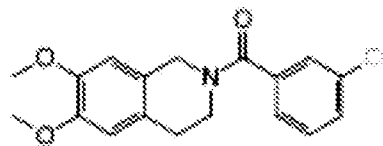
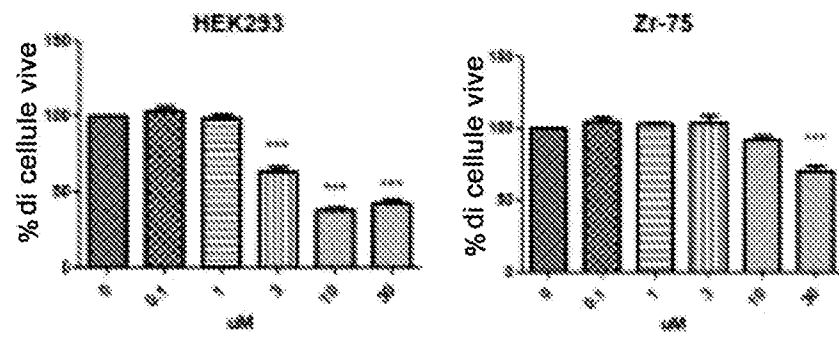


FIG. 11

A. SM950



B. Viabilità cellulare



C. HEK293

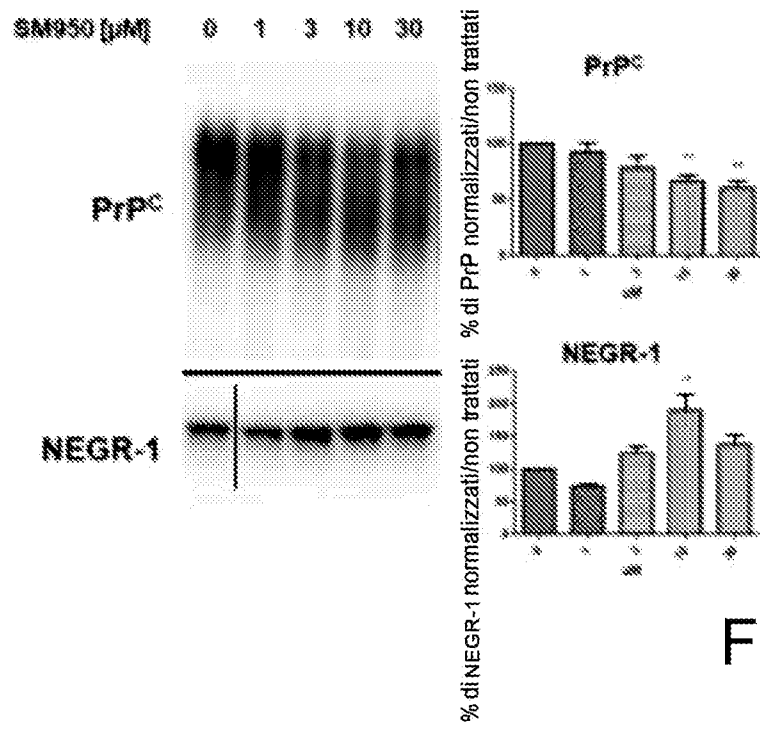
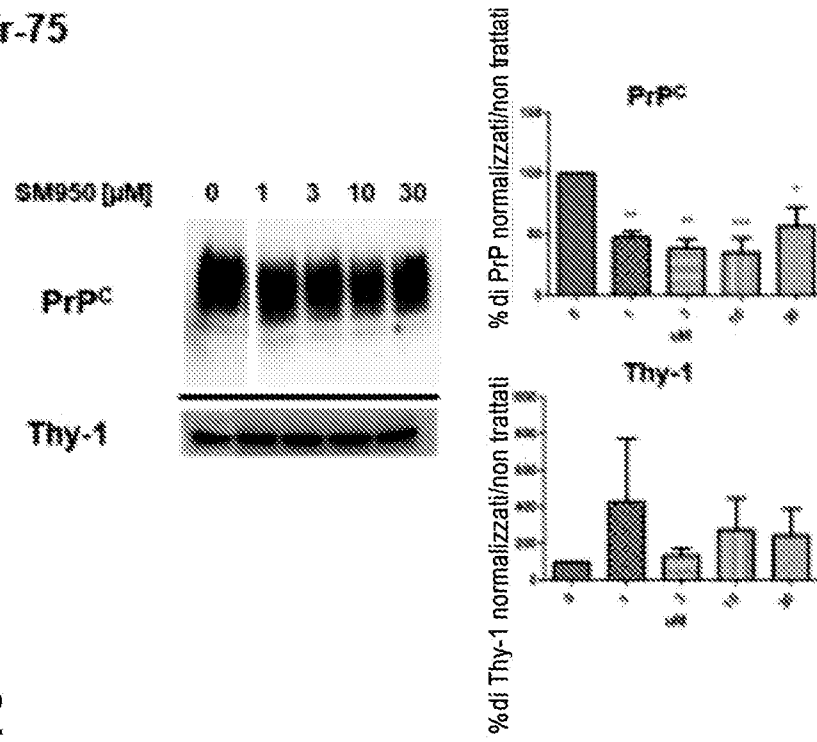


FIG. 12

D. Zr-75



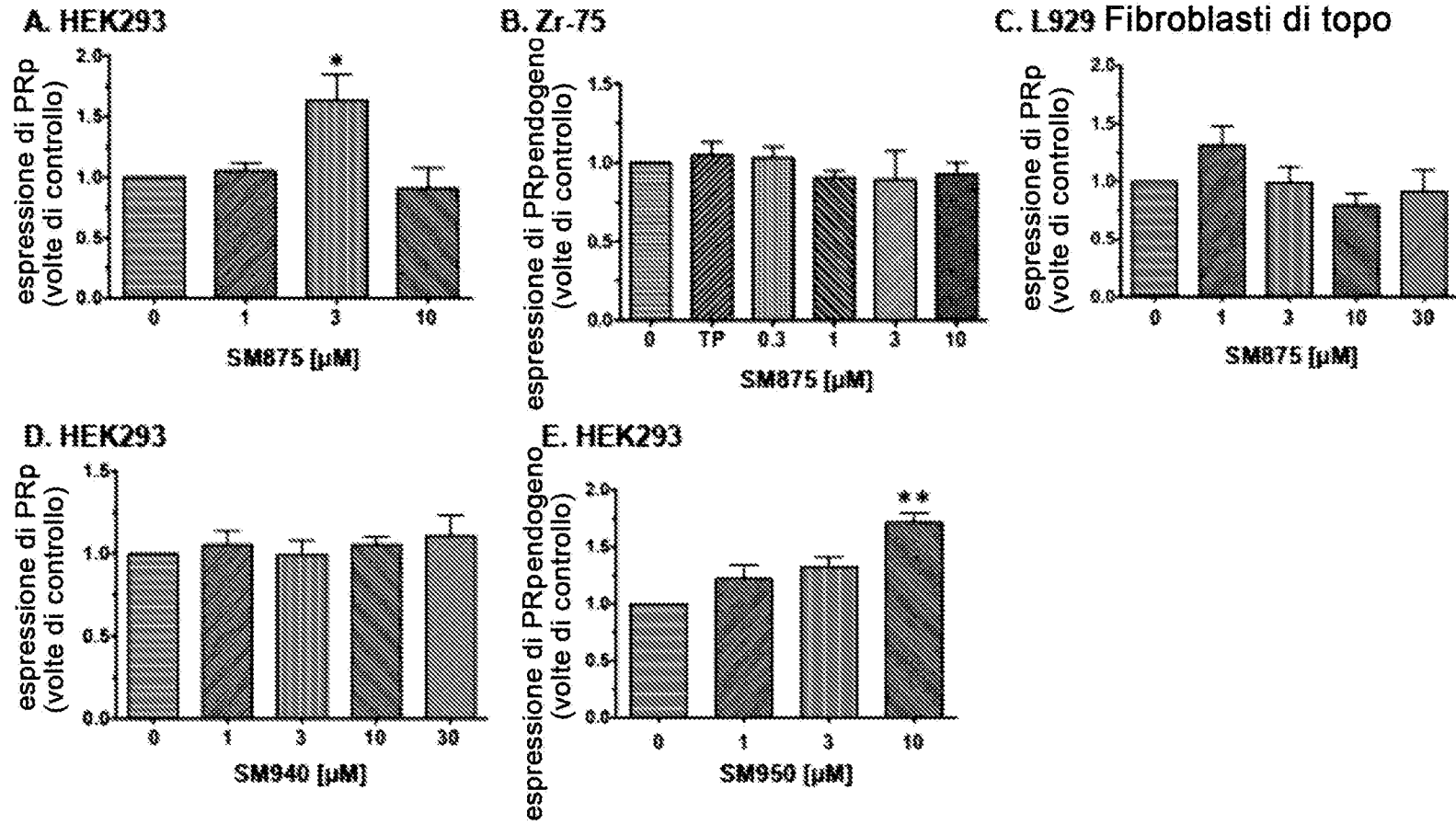


FIG. 13

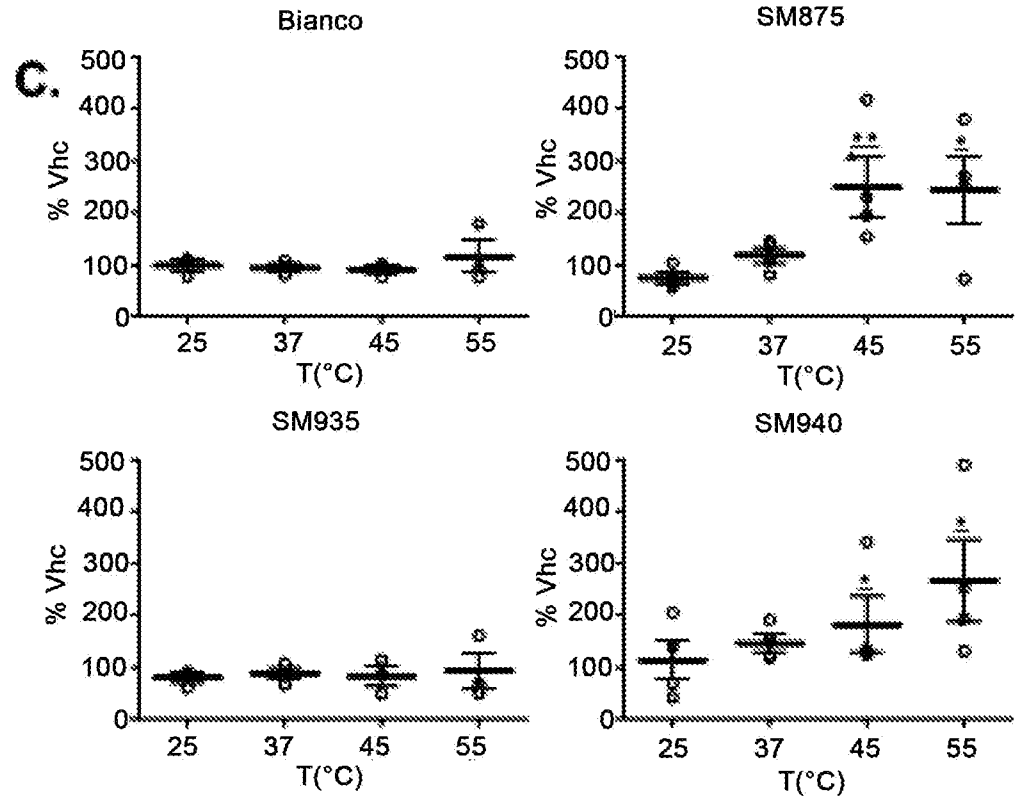
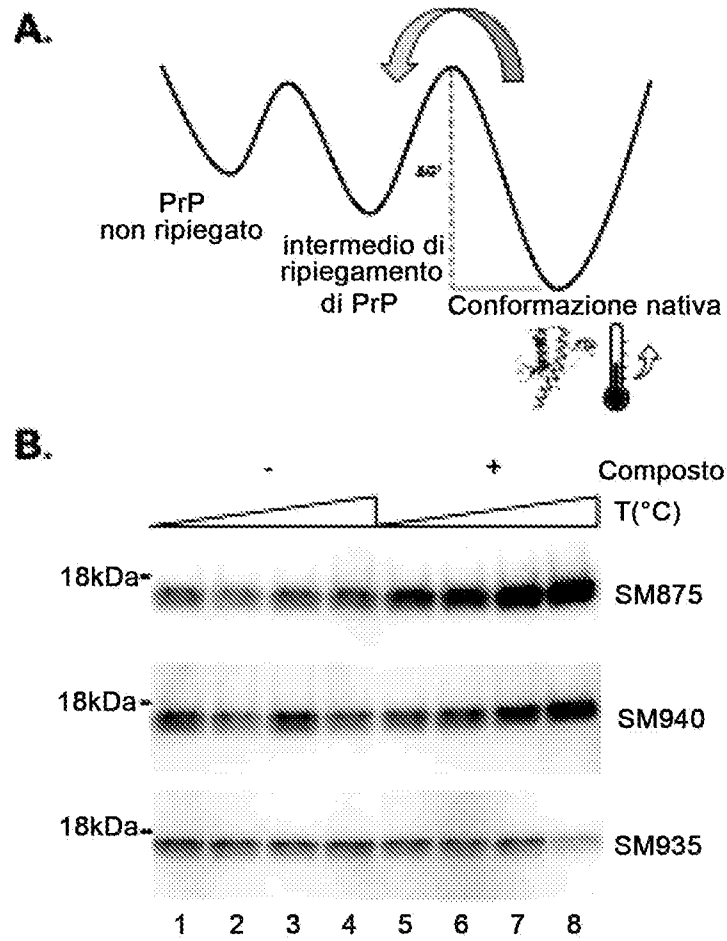


FIG. 14

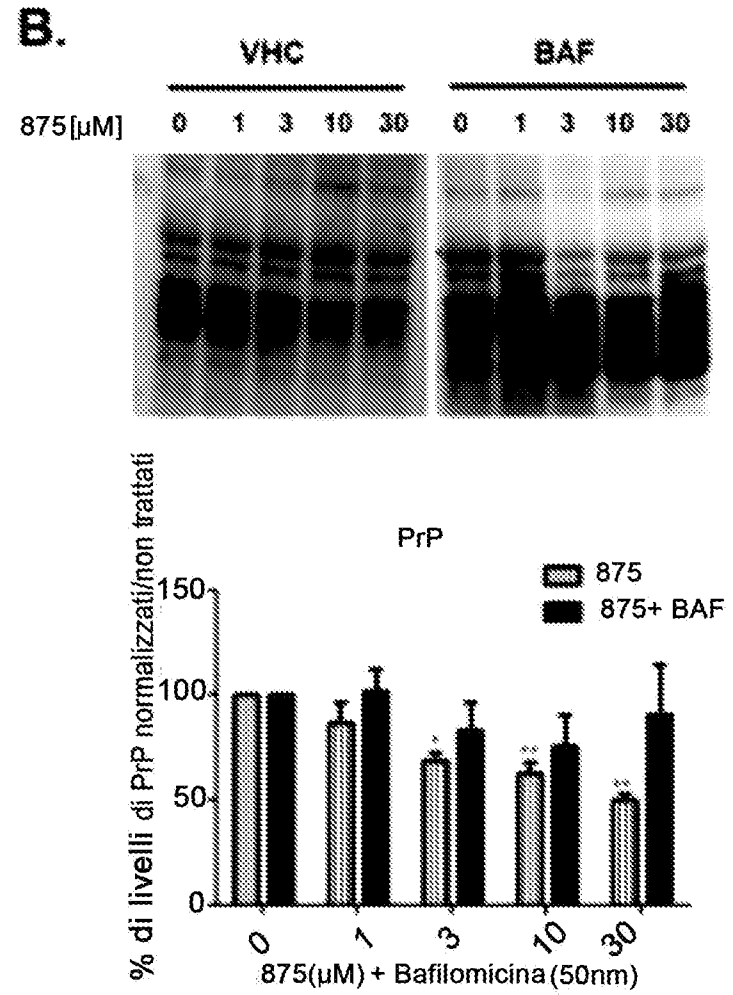
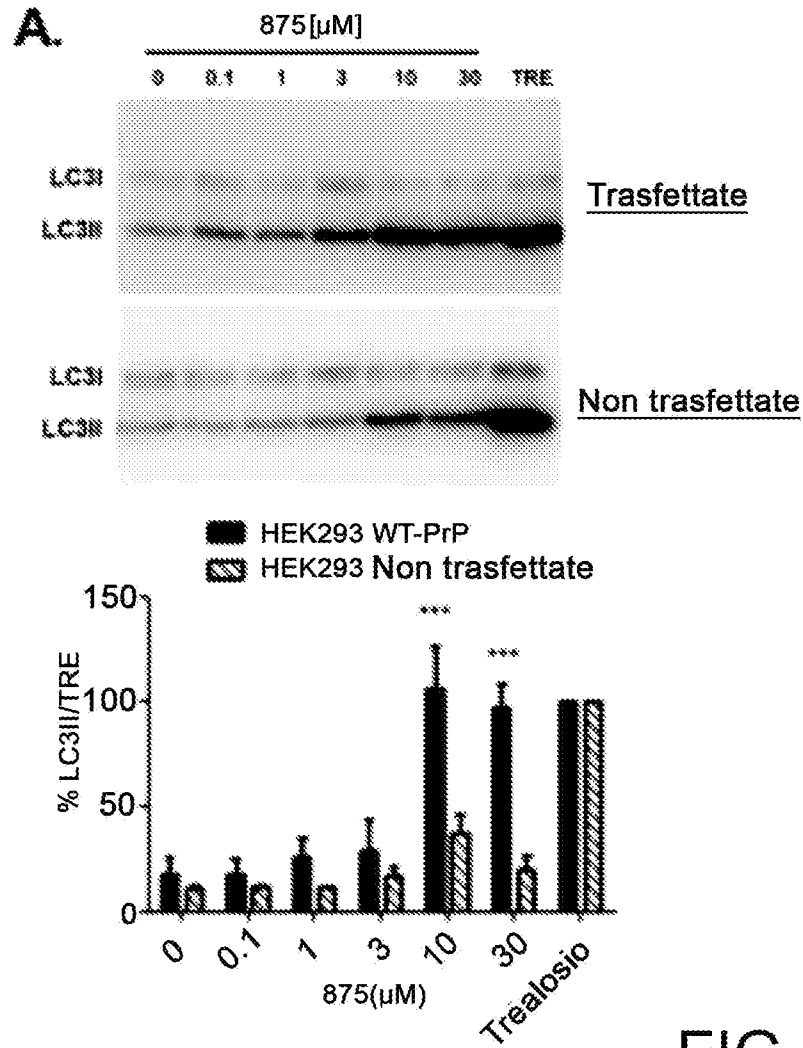


FIG. 15

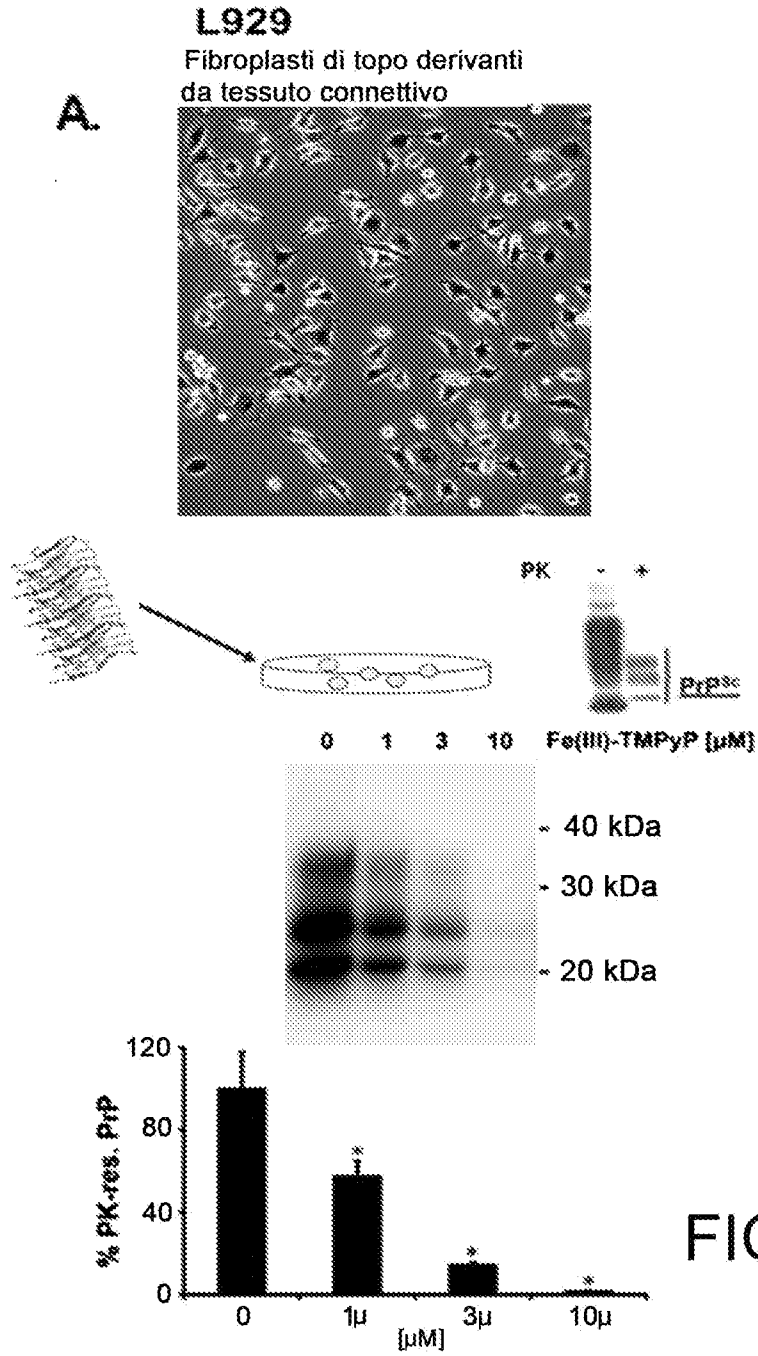


FIG. 16

