

L-carnitina, chaperon allosterico farmacologico dell' α -glucosidasi lisosomiale umana

(Carnitine is a pharmacological allosteric chaperone of the human lysosomal α -glucosidase)

Iacono R^{a, b}, Minopoli N^c, Ferrara MC^b, Tarallo A^c, Damiano C^c, Porto C^c,
Strollo S^c, Roig-Zamboni V^d, Peluso G^e, Sulzenbacher G^d,
Cobucci-Ponzano B^b, Parenti G^{c, f}, Moracci M^{a, b}

^aDepartment of Biology, University of Naples "Federico II", Complesso Universitario di Monte S. Angelo, Naples, Italy;

^bInstitute of Biosciences and Bioresources – CNR, Naples, Italy;

^cTelethon Institute of Genetics & Medicine, Pozzuoli, Italy;

^dCentre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Aix-Marseille University, AFMB, Marseille, France;

^eResearch Institute on Terrestrial Ecosystems, UOS Naples-CNR, Naples, Italy;

^fDepartment of Translational Medical Sciences, Federico II University, Naples, Italy

Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2021
Vol. 36, no. 1, 2068–2079

La malattia di Pompe è una malattia ereditaria da accumulo lisosomiale, dovuta al deficit dell'enzima alfa-1,4- glucosidasi acida (GAA), che idrolizza il glicogeno in unità di glucosio, comportando un accumulo intralisosomiale di glicogeno. Attualmente, l'unico trattamento approvato è rappresentato dalla terapia enzimatica sostitutiva con l'enzima ricombinante (rhGAA). Ulteriori approcci come la terapia farmacologica con chaperon, basata sull'effetto stabilizzante indotto da piccole molecole sull'enzima bersaglio, sembrano essere promettenti. Tuttavia, molti chaperon conosciuti sono limitati dai loro potenziali effetti inibitori su alcuni enzimi endogeni. La maggior parte degli chaperon farmacologici proposti o utilizzati per il trattamento delle malattie da accumulo lisosomiale (LSD) sono inibitori competitivi reversibili degli enzimi bersaglio. Rispetto alla ERT, piccole molecole che fungono da chaperon presentano importanti vantaggi in termini di biodistribuzione, disponibilità orale e ridotto impatto sulla qualità della vita dei pazienti. Studi recenti hanno dimostrato che 1-deossinojirimicina, N-butil-deossinojirimicina (rispettivamente DNJ e NB-DNJ) e 1-deossalatonojirimicina (DGJ), possono anche potenziare gli effetti degli enzimi utilizzati per la ERT nelle malattie di Pompe e Fabry. Tuttavia, questi chaperon farmacologici diretti al sito attivo interferiscono con l'attività degli enzimi bersaglio. Un chaperon ideale, quindi, dovrebbe essere in grado di proteggere gli enzimi dalla degradazione senza interferire con la sua attività, essere ampiamente biodisponibile nei tessuti e negli organi, raggiungere livelli terapeutici nei compartimenti cellulari dove la

sua azione è richiesta, mostrare elevata specificità per l'enzima bersaglio con effetti trascurabili sugli altri enzimi e avere un buon profilo di sicurezza. I ricercatori hanno valutato altre molecole già approvate per uso terapeutico nell'uomo e hanno scoperto che la N-acetilcisteina (NAC), un noto farmaco, e i relativi aminoacidi N-acetilserina (NAS) e N-acetilglicina (NAG), strutturalmente non correlati agli inibitori noti dell'alfa glucosidasi acida, si comportano come nuovi chaperon farmacologici allosterici per questo enzima. Queste molecole stabilizzano l'rhGAA a pH non acido, potenziano l'attività residua del GAA mutato e migliorano l'efficacia dell'rhGAA utilizzato per l'ERT nella malattia di Pompe. La struttura tridimensionale ad alta risoluzione di rhGAA nel complesso con NAC ha permesso di identificare due siti di legame per questo chaperon farmacologico in regioni lontane dal sito attivo e di spiegare l'attività di NAC come chaperon. Seguendo lo stesso approccio, gli autori hanno esaminato altri presunti chaperon allosterici, già approvati come farmaci o nutraceutici, riportando nello studio i risultati dello screening. Gli autori hanno scoperto che la L-carnitina (L-CAR), la D-carnitina (D-CAR) e il relativo composto acetil-D-carnitina (AD-CAR) possono stabilizzare rhGAA a pH non lisosomiale e migliorare l'attività dell'enzima GAA nei fibroblasti dai pazienti con malattia di Pompe. Pertanto, queste molecole rappresentano nuovi potenziali chaperon farmacologici con eccellenti prospettive per il trattamento della malattia di Pompe, singolarmente e in combinazione con la terapia enzimatica sostitutiva (ERT). L-CAR è un noto micronutriente e nutraceutico condizionatamente essenziale, non tossico, mentre per D-CAR sono stati documentati effetti collaterali, inclusa la tossicità nei pazienti trattati con dialisi, nei ratti e nei pesci. Per questo, la maggior parte dello studio è stata eseguita su L-CAR. Tali chaperon farmacologici sembrano impedire la perdita di attività dell'enzima GAA a pH 7,0 e aumentare la stabilità termica dell'enzima in modo dose-dipendente, come mostrato in precedenza con NAC. Inoltre, la combinazione di L-CAR e il chaperon diretto al sito attivo DNJ ha mostrato chiaramente un effetto additivo confermando che le due molecole si legano a siti diversi dell'enzima. I ricercatori hanno studiato l'effetto di L-CAR sull'attività dell'enzima GAA nei fibroblasti di tre pazienti con malattia di Pompe a esordio precoce, portatori di diverse mutazioni nel gene corrispondente. Il risultato cruciale che dimostra l'efficacia di L-CAR nel trattamento della malattia

di Pompe è stato individuare la correzione del difetto enzimatico nei fibroblasti in misura maggiore rispetto a quella osservata con NB-DNJ. Quando rhGAA è stato somministrato nei fibroblasti dei pazienti con malattia di Pompe in combinazione con L-CAR, il traffico lisosomiale, la maturazione e l'attività intracellulare degli enzimi sono aumentati fino a 4 volte rispetto al trattamento combinato ERT/NB-DNJ. Pertanto, i risultati ottenuti suggeriscono che tali chaperon farmacologici sembrano stabilizzare l'enzima a pH e temperatura senza inibirne l'attività e agire in sinergia con chaperon farmacologici diretti al sito attivo.

Sorprendentemente, hanno potenziato l'attività residua dell'enzima GAA nei fibroblasti di tre pazienti Pompe con aggiunta di rhGAA. Questo effetto sinergico di L-CAR e rhGAA si tradurrebbe in una migliorata efficacia terapeutica della ERT nella malattia di Pompe. Vale la pena notare che, mentre il potenziamento da parte di chaperon dell'attività degli enzimi endogeni con deficit, nella maggior parte dei casi, ha comportato cambiamenti minori in termini di attività residua, determinando probabilmente un impatto modesto sugli outcome dei pazienti; la sinergia tra ERT e la terapia con chaperon farmacologico basato su L-CAR ha il potenziale per determinare notevoli incrementi di attività specifica, indipendentemente dalle mutazioni che colpiscono i singoli pazienti. L'utilizzo di L-CAR come farmaco per il trattamento della malattia di Pompe risulta quindi particolarmente interessante. L-CAR è coinvolta nel metabolismo degli acidi grassi e sintetizzata principalmente nel fegato e nei reni, a partire dagli aminoacidi essenziali lisina e metionina. Alla concentrazione normalmente somministrata, L-CAR non è tossica ed è già stato approvato il suo utilizzo come nutraceutico.