

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"



DIPARTIMENTO DI FARMACIA

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZA DEL FARMACO

XXV CICLO

**SINTESI DI NUOVI MODULATORI DELLA VIA  
DEL SEGNALE MEDIATA DALLA  
SFINGOSINA 1-FOSFATO**

Coordinatore:

Prof.ssa *Maria Valeria D'Auria*

Tutor:

Prof.ssa *Elisa Perissutti*

Candidata:

Dott.ssa *Giuseppina Maria Incisivo*

# INDICE

	Pagina
<b>1. INTRODUZIONE</b>	1
1.1. <i>Pathways</i> metabolici della S1P	2
1.1.1. Sfingolipidi	2
1.1.2. Produzione e degradazione della S1P	3
1.1.3. Trasporto di S1P	7
1.2. Recettori e funzioni fisiologiche di S1P	10
1.2.1. Recettori S1P	10
1.2.2. Funzioni fisiologiche di S1P	11
1.3. S1P come regolatore della circolazione linfocitaria	16
1.4. S1P nella coagulazione e nell'infiammazione	20
1.4.1. S1P nelle piastrine	20
1.4.2. S1P nell'integrità della barriera endoteliale	21
1.4.3. S1P nell'angiogenesi	24
1.4.4. S1P nella coagulazione	25
1.4.5. S1P nelle mast cellule	29
1.4.6. S1P nel signaling del TNF- $\alpha$	29
1.4.7. S1P nell'aterosclerosi	33
<b>2. IMPOSTAZIONE DELLA RICERCA</b>	36
<b>3. PARTE SPERIMENTALE</b>	55
3.1. Sintesi	56
3.1.1. Sommario delle operazioni	56
3.1.2. Procedimenti sperimentali delle sintesi	67
3.1.3. Caratterizzazione dei derivati 1-37	77
3.1.4. Purificazione dei derivati peptidici I-XX	78
3.2. Sperimentazione farmacologica	80
3.2.1. Preparazione del tessuto	80
3.2.2. Protocollo sperimentale sul tessuto aortico di topo	80
3.2.3. Saggio di proliferazione su fibroblasti murini	81
3.3. Analisi computazionale (derivati peptidici I-XX)	82

<b>4. RISULTATI E DISCUSSIONI</b>	83
4.1. Derivati eterociclici 1-37	84
4.2. Derivati peptidici I-XX	91
4.2.1. Studi computazionali	98
<b>5. CONCLUSIONI</b>	102
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	105

## **1. INTRODUZIONE**

Nel 1997, il gruppo di ricerca diretto dal Professore Yatomi è stato il primo a mostrare che il lisofosfolipide sfingosina 1-fosfato (S1P) è un componente del plasma umano, a concentrazioni di circa 200 nM [1]. Inizialmente essa era considerata un semplice intermedio del metabolismo degli sfingolipidi, ma oggi si ritiene che la S1P sia un potente mediatore di molti processi cellulari vitali. È un lipide pleiotropico coinvolto nella regolazione della proliferazione e migrazione cellulare, nel riarrangiamento del citoscheletro, nell'adesione leucocitaria e nell'angiogenesi, a livello di differenti linee cellulari, tra cui quelle del sistema cardiovascolare, del sistema immunitario innato e adattativo e del sistema nervoso centrale.

## **1.1 PATHWAYS METABOLICI DELLA S1P**

### **1.1.1 Sfingolipidi**

Gli sfingolipidi sono una classe di molecole caratterizzata dalla presenza nella loro struttura di un aminoalcol insaturo, la sfingosina (Sph) o un suo derivato. Il prefisso “sfingo” deriva da sfinge, enigmatica creatura mitologica, ed è stato ad essi attribuito da Thudichum, nel 1884, in quanto all'epoca erano del tutto sconosciute le loro funzioni biologiche. La sintesi *de novo* degli sfingolipidi comincia sul lato citosolico del reticolo endoplasmatico, dove la serina palmitoiltransferasi catalizza la condensazione tra una molecola di serina ed una di palmitato (figura 1). La 3-cheto-diidrosfingosina formatasi viene sequenzialmente convertita in diidrosfingosina, diidroceramide e ceramide per azione, rispettivamente, della 3-cheto-diidrosfingosina riduttasi, diidroceramide sintasi e diidroceramide desaturasi. La ceramide può essere considerata il perno centrale del metabolismo sfingoide perché, una volta sintetizzata, viene trasportata

dall'ER al Golgi e, in seguito ad una serie di metabolizzazioni, da essa si formano sia sfingolipidi complessi come la sfingomieline ed i glicosfingolipidi, sia molecole di segnale come la ceramide 1-P, la Sph e la S1P. Sebbene gli sfingolipidi siano stati per lungo tempo considerati come semplici elementi costituenti le membrane cellulari, recenti studi hanno rivelato il loro ruolo come mediatori inter ed intracellulari. La sfingomieline non è solo il maggiore costituente della guaina mielinica, ma svolge anche un'importante funzione nella formazione delle membrane plasmatiche. Analogamente la ceramide è implicata nella ritenzione di umidità nell'epidermide ed in molte risposte cellulari allo stress, tra cui la regolazione dell'apoptosi [2] e la senescenza delle cellule [3]. Tra tutti gli sfingolipidi, la S1P è la più potente molecola di segnale intercellulare. Strutturalmente è classificata come un lisofosfolipide, come ad esempio l'acido lisofosfatidico ed il fattore attivante le piastrine, con un *headgroup* polare ed una coda acilica idrofobica. Questo carattere anfipatico le consente di lasciare la membrana cellulare e di agire come mediatore intercellulare, attraverso il legame a recettori accoppiati a specifiche proteine G (GPCRs), i cui *pathways* sono implicati in varie funzioni fisiologiche.

### **1.1.2 Produzione e degradazione della S1P**

Il sangue e la linfa contengono livelli submicromolari di S1P, mentre i fluidi interstiziali dei tessuti ne contengono di meno e da ciò scaturisce un forte gradiente di concentrazione [4], che consente di regolare la circolazione delle cellule immunitarie, ossia dei linfociti, dei progenitori delle cellule ematopoietiche e delle cellule dendritiche. Dal momento che l'emivita plasmatica della S1P quando è legata all'albumina è <15 minuti, è probabile che essa venga

continuamente prodotta per mantenerne un'alta concentrazione nel plasma e nella linfa. In passato si riteneva che le piastrine fossero la principale fonte plasmatica di S1P [1], da momento che ne contengono un'alta riserva. Tuttavia questo ruolo loro attribuito è stato contestato in virtù dell'osservazione che il plasma di topi NF-E2-deficiente e quello di topi con trombocitopenia anticorpo-indotta presentano un normale profilo di concentrazione di S1P, pur mancando di piastrine in circolo. Recenti studi hanno dimostrato che anche gli eritrociti contribuiscono al mantenimento del gradiente plasmatico di S1P [5], così come le cellule endoteliali, sotto lo stimolo dello sforzo di taglio del fluido, mentre le piastrine, probabilmente, sono implicate nella genesi di una locale grande quantità di questo sfingolipide durante gli episodi trombotici.

Il principale *pathway* di produzione della S1P deriva, comunque, dall'idrolisi della sfingomieline, che viene sequenzialmente convertita in ceramide, sfingosina e S1P, per azione della sfingomielinasi, della ceramidasi e della sfingosina chinasi, rispettivamente (figura 1). Sono stati identificati due tipi di sfingosina chinasi, la SphK1 e la SphK2 [6] e, sebbene esse presentino sottili differenze nella specificità del substrato e nella localizzazione subcellulare, catalizzano la stessa reazione, ossia la fosforilazione della Sph per produrre la S1P, ed hanno funzioni ridondanti, dal momento che né topi *knockout* per l'isoforma 1, né quelli *knockout* per l'isoforma 2, presi singolarmente, presentano visibili anomalie nel loro sviluppo, mentre topi *double knockouts* mostrano una completa perdita dell'attività delle sfingosina chinasi, che determina letalità a livello embrionale, a causa di un improprio sviluppo neuronale e vascolare [7]. E' importante sottolineare che l'attività enzimatica della SphK1 e 2 è regolata da stimoli extracellulari e la prima evidenza che ha fatto luce su questo aspetto è stata la

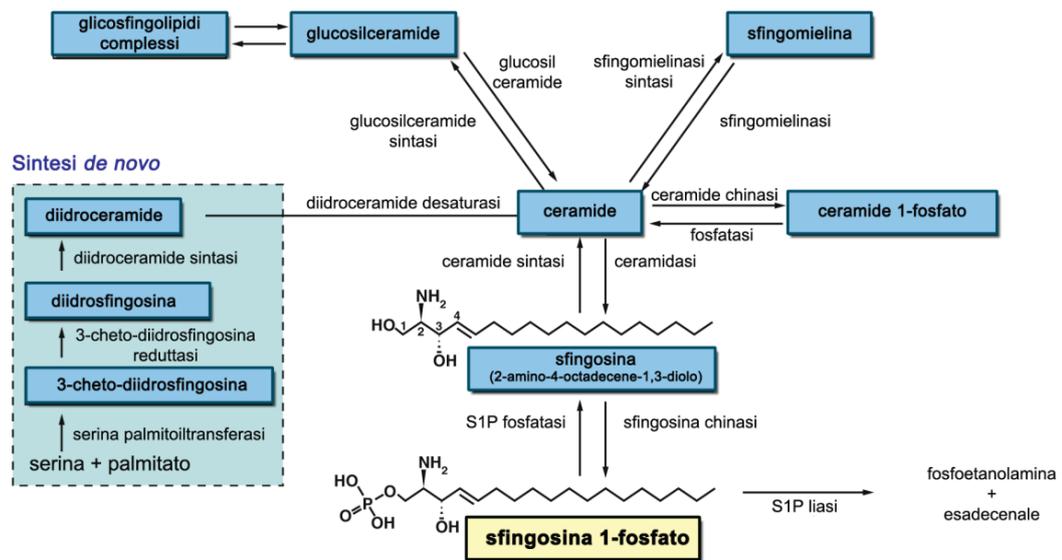
traslocazione della SphK1 dal citoplasma alla membrana plasmatica, in risposta al trattamento con l'estere del forbolo (composto organico diterpenoide, di origine vegetale). Questa traslocazione è regolata dalla fosforilazione della chinasi ERK e determina un'incrementata produzione di S1P.

Molti fattori di crescita, per esercitare i loro effetti proliferativi, determinano la traslocazione e l'attivazione della SphK1; tra questi possiamo annoverare il fattore di crescita derivante dalle piastrine (PDGF), il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), il fattore di crescita nervoso (NGF), il fattore di crescita epidermico (EGF), l'insulina ed il fattore di crescita insulino-simile-1 (IGF-1). L'SphK1 è anche attivata dalla stimolazione di TNF- $\alpha$  con un meccanismo dipendente dal fattore 2 associato al recettore TNF (TRAF2) [8] e studi *knockdown* hanno rivelato che l'SphK1 media gli effetti di TNF- $\alpha$  sull'induzione di COX-2, sulle molecole di adesione, sulla produzione di prostaglandine e sull'attivazione dell'ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS). Sembra che molti stimoli extracellulari, inclusi i fattori di crescita ed i mediatori pro-infiammatori, convergano sulla SphK1 come *target* intracellulare e quindi esercitino i loro effetti attraverso la successiva produzione di S1P. Tuttavia è importante notare che c'è una significativa attività basale di SphK nelle cellule, la quale è correlata alle normali funzioni metaboliche dell'enzima nel *turnover* degli sfingolipidi. Inoltre molti fattori di crescita e citochine esplicano ugualmente le loro funzioni in condizione *knockout* dell'isoenzima SphK, suggerendo che l'attivazione di questo *pathway* potrebbe essere necessaria in condizioni patofisiologiche.

La S1P viene defosforilata a Sph sia dalla famiglia delle fosfatasi lipidiche, LPP1-3, a livello della superficie cellulare, sia da fosfatasi S1P specifiche, SPP1 e SPP2, a livello del reticolo endoplasmatico. Le LPPs hanno un'ampia specificità di

substrato, in quanto defosforilano la S1P, la ceramide 1-P e l'acido lisofosfatidico e si pensa che questo sia il primo meccanismo attraverso il quale il *signaling* della S1P venga attenuato [9]. La sovraespressione di specifiche LPPs riduce gli eventi S1P-dipendenti nelle cellule HEK293. D'altro canto, invece, le SPPs sono fosfatasi S1P specifiche e sono localizzate principalmente a livello del reticolo endoplasmatico, per cui sono implicate nella regolazione dei livelli citoplasmatici di S1P.

Un *pathway* alternativo che regola i livelli di S1P è la degradazione irreversibile di questo sfingolipide in fosfoetanolamina ed esadecenale ad opera della S1P liasi (SPL) e ciò rappresenta lo *step* finale della degradazione degli sfingolipidi. L'SPL è esclusivamente localizzata a livello del reticolo endoplasmatico ed ha un'ampia distribuzione tissutale, con la più alta espressione nel timo e nell'intestino, seguiti dalla milza, dal fegato e dai testicoli. In contrapposizione l'attività SPL non può essere rilevata nelle piastrine e negli eritrociti in cui la S1P è attivamente prodotta. L'espressione SPL negli organi linfoidi sembra essere essenziale per un'adeguata circolazione linfocitaria, dal momento che l'inibizione di quest'enzima ad opera del colorante alimentare 2-acetil-4-tetraidrossibutilindazolo (THI) induce linfopenia a causa della distruzione del gradiente di S1P tra sangue o linfa ed organi linfoidi [10].



**Figura 1.** Sintesi degli sfingolipidi.

### 1.1.3 Trasporto di S1P

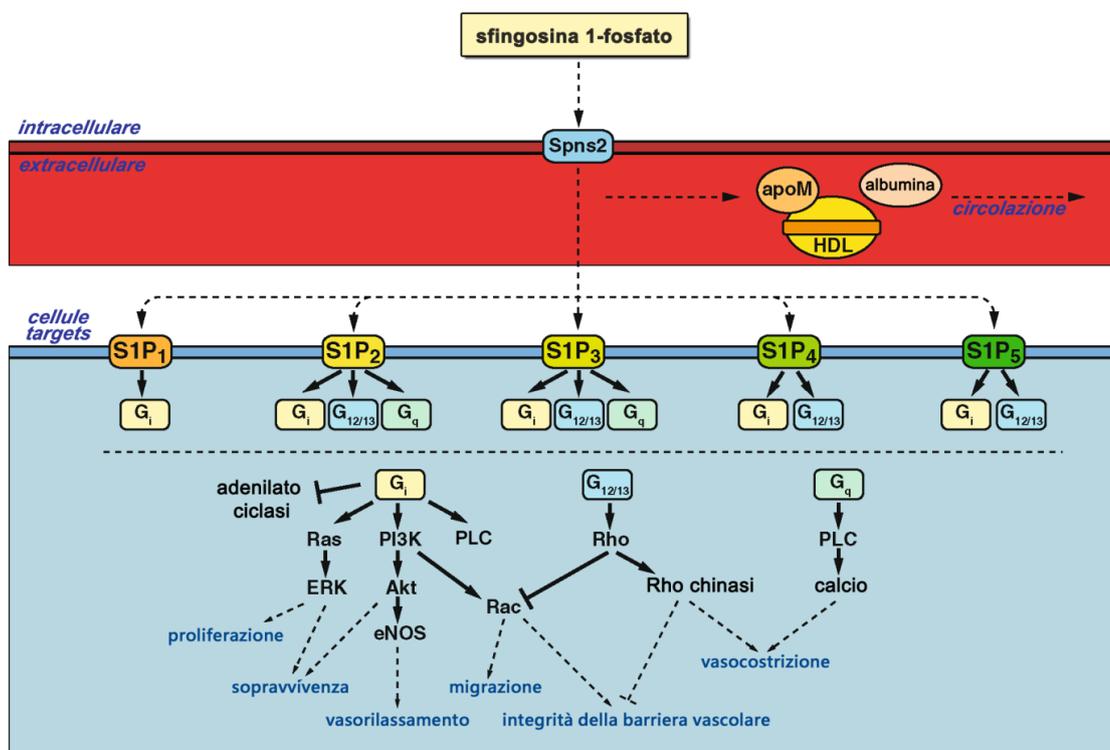
Le cellule endoteliali secernono i diversi enzimi coinvolti nella produzione di S1P, quali la sfingomielinasi, la ceramidasi e la SphK1, per cui la sintesi di questo sfingolipide potrebbe avvenire anche nello spazio extracellulare. Nonostante ciò si ritiene che la maggior parte di S1P sia prodotta a livello intracellulare e poi estrusa dopo la produzione (figura 2). Diversi membri della famiglia dei trasportatori ABC (*ATP-binding cassette*) sono impegnati nella regolazione del trasporto di S1P. Essi includono l'ABCC1 nelle mastcellule, l'ABCA1 e l'ABCA7 nelle piastrine, l'ABCA1 negli astrociti, l'ABCC1 nei fibroblasti e l'ABCC1 e ABCG2 nelle cellule cancerose del seno.

Tuttavia nessuno dei topi deficienti di ABCA1, ABCA7 o ABCC1 mostra significativi cambiamenti nei livelli plasmatici di S1P rispetto alla normale controparte *wild type* [11]. Ciò indica che questi trasportatori non sono necessari per il mantenimento del gradiente plasmatico di S1P o che regolano un trasporto

ridondante di questo sfingolipide; per cui la necessità di questa classe di molecole nell'estruzione di S1P non risulta, al giorno d'oggi, ancora chiara. Recentemente è stato riportato che *Spinster 2* (Spns 2) è un trasportatore critico di S1P necessario per lo sviluppo cardiaco [12]. Esso è dotato di 12 domini transmembranari e presenta similarità strutturali con il trasportatore del glicerolo-3-fosfato. Spns 2 mutanti nei pesci zebra (danio rerio o zebrato) determinano comparsa di due cuori (*cardia bifida*), similmente al fenotipo che si manifesta in seguito alla mutazione dei recettori S1P<sub>2</sub> [12]; inoltre, quando nelle cellule CHO (linea di cellule coltivate in vitro e ricavate dall'ovaio di criceto cinese, noto anche come *hamster*) viene indotta l'espressione di SphK1, soltanto Spns 2 ma non ABCA1, ABCB1, ABCC1 o ABCG2, risulta in grado di determinare la secrezione S1P. Dal momento che sia i dati biochimici che genetici concordano nel definire l'Spns 2 come il trasportatore di S1P, è probabile che questo sia proprio il ruolo fisiologico di tale proteina, ma la sua reale funzione nei mammiferi deve essere ancora elucidata.

A causa del suo carattere anfipatico, la maggior parte di S1P nel plasma è legata a proteine *carriers* (figura 2): più della metà alle HDL, il 36% circa all'albumina e l'8% alle LDL [13]. Non è chiaro quale molecola sulle HDL sia specificamente il *carrier* dello sfingolipide in esame, sebbene questo ruolo recentemente sia stato attribuito all'apolipoproteina M (apoM) [14]. L'apoM è una proteina plasmatica associata alle lipoproteine, di 25 kDa e sintetizzata principalmente nel fegato. L'estremità NH<sub>2</sub>-terminale idrofobica e conservata, ancora l'apoM nello strato fosfolipidico delle particelle lipoproteiche. La risoluzione della struttura cristallina di apoM umana ricombinante ha mostrato che essa è una tipica lipocalina (proteina extracellulare che, grazie alla propria struttura, lega i lipofili per ridurre

il contatto con il solvente) ripiegata, caratterizzata da 8 filamenti disposti in forma circolare per delineare una tasca di legame interna anfifilica a cui si aggancia la S1P. Sebbene l'apoM sia soltanto il 5% di tutte le HDL plasmatiche, la S1P è associata specificamente alle HDL che contengono apoM. Infatti è stato dimostrato che HDL contenenti apoM, a differenza di quelle prive, inducono il *signaling* dei recettori S1P nelle cellule HUVEC (cellule endoteliali della vena ombelicale umana). Inoltre la carenza di S1P nella frazione delle HDL di topi *Apom<sup>-/-</sup>* diminuisce la funzione basale della barriera endoteliale nel tessuto polmonare [14]. Questi risultati rafforzano il concetto dell'utilità di apoM come *carrier* specifico di S1P sulle HDL in grado di mediare azioni vasoprotettive a livello endoteliale.



**Figura 2.** Trasporto di S1P ed attivazione degli S1PRs.

## 1.2 RECETTORI E FUNZIONI FISILOGICHE DI S1P

### 1.2.1 Recettori S1P

Le diverse funzioni fisiologiche della S1P sono mediate da specifici GPCRs ad alta affinità, chiamati S1P<sub>1-5</sub>, il primo dei quali è stato scoperto nel 1998 [15]. Inizialmente erano chiamati EDG-1, EDG-5, EDG-3, EDG-6 e EDG-8, rispettivamente [16]; sono stati poi rinominati per riflettere l'attivazione da parte di due distinti lipidi, l'S1P e l'acido lisofosfatidico. Tutti questi recettori sono attivati da concentrazioni nanomolari di S1P ed i loro diversi ma sovrapponibili profili di espressione, unitamente ai *pathways* intracellulari di ciascuno, consentono alla S1P di esercitare differenti funzioni. I recettori S1P<sub>1-3</sub> sono ampiamente espressi e ne sono particolarmente ricchi il sistema cardiovascolare ed il sistema immunitario. Gli S1P<sub>4-5</sub>, invece, hanno un tasso di espressione relativamente più basso rispetto ai primi tre; il primo è presente negli organi linfoidi [17] e nelle cellule muscolari lisce delle vie aeree [18], mentre il secondo si trova in tratti di materia bianca del SNC [19]. L'S1P<sub>1</sub> è accoppiato esclusivamente ad una G<sub>i/o</sub>, gli S1P<sub>2-3</sub> ad una G<sub>i/o</sub>, G<sub>q</sub> e G<sub>12/13</sub>, e gli S1P<sub>4-5</sub> ad una G<sub>i/o</sub> e G<sub>12/13</sub> (figura 2). Generalmente, il *signaling* mediato dalla G<sub>i/o</sub> determina l'attivazione del *pathway* Ras/ERK, a cui è associata la proliferazione, del *pathway* PI3K/Akt, che previene l'apoptosi e del *pathway* PI3K/Rac, che promuove il riarrangiamento del citoscheletro e la migrazione cellulare; la G<sub>i/o</sub> media ancora l'attivazione della fosfolipasi C (PLC), a cui è associato un aumento della concentrazione di calcio intracellulare, e l'inibizione dell'adenilato ciclasi, che riduce la produzione di AMPc. Invece il *signaling* mediato da G<sub>q</sub> attiva il *pathway* di PLC, mentre quello di G<sub>12/13</sub> promuove l'attivazione di Rho per inibire

Rac e la migrazione cellulare. Il bilanciamento di questi *pathways* a valle determina i differenti effetti della S1P, che dipendono dal profilo di espressione di ciascun sottotipo recettoriale in un dato tipo di cellula. Ad esempio l'S1P<sub>1</sub> e l'S1P<sub>2</sub> mediano azioni contrapposte sulla migrazione cellulare: il primo la promuove attraverso l'attivazione di Rac [20], il secondo la sopprime attraverso l'inibizione Rho-mediata della stessa chinasi [21]. Quando nelle cellule HUVEC, che esprimono in maniera predominante l'S1P<sub>1</sub>, viene indotta la sovraespressione dell'S1P<sub>2</sub>, la migrazione cellulare verso la S1P risulta marcatamente attenuata.

Molte delle funzioni biologiche della S1P sono mediate dai suoi recettori, tuttavia questo intermedio sfingoide esercita anche delle azioni intracellulari: lega specificamente le deacetilasi istoniche HDAC1 e HDAC2 [22] ed inibisce la loro attività enzimatica, ossia la rimozione dei gruppi acetilici dagli istoni che determina il blocco del processo di trascrizione; ciò ha consentito di attribuire allo sfingolipide una funzione, a livello nucleare, nella regolazione epigenetica dell'espressione genica. Successivi studi [23] hanno dimostrato che l'S1P lega l'ubiquitina ligasi E3 ed è necessaria per la sua attività su TRAF2, un mediatore essenziale del *pathway* di NF- $\kappa$ B innescato dal TNF- $\alpha$ , la più importante molecola di segnale del fenomeno infiammatorio.

### **1.2.2 Funzioni fisiologiche di S1P**

La delezione genica di S1P<sub>1</sub> determina grave emorragia e letalità embrionale tra il dodicesimo ed il quattordicesimo giorno di gestazione. Ad essa non è associata nessuna anomalia nella vasculogenesi e nell'angiogenesi, ma la maturazione vascolare risulta incompleta per una difettosa copertura da parte delle cellule

muscolari lisce/periciti dell'aorta dorsale [24]. Inoltre la delezione endoteliale-specifica di S1P<sub>1</sub> determina lo stesso fenotipo della delezione globale e ciò dimostra chiaramente che l'S1P<sub>1</sub> ha un ruolo critico nella stabilizzazione vascolare, in quanto recluta cellule murali; esso, nel particolare, regola l'adesione cellulare N-caderina mediata tra le cellule endoteliali e murali.

L'S1P è importante anche per garantire l'integrità vascolare negli adulti, dal momento che topi mutanti, progettati per mancare selettivamente della S1P plasmatica in seguito ad un'inducibile doppia delezione di SphK1/SphK2, mostrano alterazioni a livello del sistema vascolare e una bassa possibilità di sopravvivenza in seguito ad anafilassi. La delezione S1P<sub>1</sub> causa anche compromissioni nella neurogenesi: embrioni al dodicesimo giorno di gestazione presentano perdite cellulari nel proencefalo, incremento di cellule apoptotiche nel neuroepitelio del telencefalo e del diencefalo e diminuite cellule mitotiche nel telencefalo.

Topi *double knockouts* SphK1/SphK2 mostrano fenotipi molto simili. L'SphK1 è altamente espressa nel cervello, soprattutto a livello del telencefalo, mentre l'SphK2 è concentrata principalmente nelle gemme degli arti (che compaiono alla IV settimana di vita embrionale), negli occhi e negli archi branchiali. I profili di espressione sovrapponibili con quelli di S1P<sub>1</sub> stabiliscono l'importante ruolo dell'asse SphK/S1P/S1P<sub>1</sub> nello sviluppo neuronale e vascolare. Come nel caso della delezione di S1P<sub>1</sub>, embrioni SphKs *knockouts* hanno livelli non rilevabili di S1P e muoiono alla dodicesima settimana di vita perché presentano un'incompleta maturazione vascolare.

La singola delezione o di S1P<sub>2</sub> o di S1P<sub>3</sub> non causa letalità embrionale, ma la loro delezione simultanea determina la morte del 50% degli embrioni in seguito ad

emorragia [25]. Topi che mancano di tutti e tre i sottotipi recettoriali S1P<sub>1-3</sub> mostrano eventi emorragici più gravi, con morte degli embrioni tra il decimo e l'undicesimo giorno di vita, quindi ancora prima rispetto alla singola delezione dell'S1P<sub>1</sub>. Questi risultati evidenziano il ruolo critico dell'S1P<sub>1</sub> nella maturazione vascolare e quello ridondante e/o compensatorio di S1P<sub>2-3</sub>.

Per quanto riguarda i recettori S1P<sub>2</sub>, topi deficienti di questo sottotipo nascono senza apparenti difetti anatomici o fisiologici, ma sviluppano spontanee, sporadiche e occasionali convulsioni letali tra 3 e 7 settimane di vita. A livello cellulare si osserva, infatti, un ampio incremento dell'eccitabilità dei neuroni piramidali della neocorteccia [26] e ciò suggerisce l'importanza dell'S1P<sub>2</sub> nello sviluppo e/o nella mediazione dell'eccitabilità nervosa.

Questo recettore è essenziale anche per un corretto funzionamento del sistema uditivo e vestibolare, dal momento che i topi che ne sono privi manifestano sordità a causa della degenerazione delle cellule ciliate nella *stria vascularis* (tessuto altamente vascolare nella parete laterale della coclea) e nel dotto cocleare [27]. Diversi studi in cui sono stati utilizzati topi S1P<sub>2</sub>-deficienti hanno fatto chiarezza sui ruoli critici di tale recettore nell'angiogenesi e nell'aterogenesi: il processo infiammatorio S1P<sub>2</sub>-mediato è un evento importante nell'angiogenesi patologica innescata dall'ipossia a livello della retina [28], mentre, per quanto riguarda l'aterosclerosi, questo recettore la promuove in quanto determina ritenzione dei macrofagi e secrezione di citochine infiammatorie a livello delle placche aterosclerotiche [29].

L'S1P<sub>3</sub> è altamente espresso nel cuore, nel polmone, nella milza, nel rene, nell'intestino e nel diaframma, ma topi S1P<sub>3</sub>-deficienti non presentano nessun fenotipo visibile. Tuttavia è stato dimostrato un chiaro coinvolgimento di questo

recettore in diverse funzioni cardiovascolari, tra cui la regolazione della frequenza cardiaca e della pressione sanguigna [30], la regolazione della perfusione miocardica e, di conseguenza, la protezione dei cardiomiociti nel danno ischemia/riperfusion, il vasorilassamento e la fibrosi cardiaca. L'S1P<sub>3</sub> regola anche l'organizzazione delle cellule endoteliali nella zona marginale della milza e la differenziazione dei progenitori delle cellule endoteliali. Inoltre il *crosstalk* PAR1-S1P<sub>3</sub> [31] a livello delle cellule dendritiche accoppia in maniera critica gli eventi coagulativi con quelli infiammatori in caso di sepsi. L'S1P<sub>3</sub> media gli effetti chemiotattici dell'S1P nei confronti dei macrofagi [32] ed ha un ruolo causale nell'aterosclerosi, promuovendo il reclutamento di monociti/macrofagi ed alterando il comportamento delle cellule muscolari lisce.

L'S1P<sub>4</sub> è espresso principalmente nei tessuti linfoidei e gli studi farmacologici hanno suggerito che esso media gli effetti immunosoppressivi dell'S1P, inibendo la proliferazione delle cellule T e la secrezione di citochine. Recentemente studi condotti su topi S1P<sub>4</sub>-*knockdown*, hanno mostrato che esso induce la differenziazione terminale dei megacariociti e lo sviluppo di pro piastrine (prolungamenti citoplasmatici dei megacariociti maturi da cui poi si formano le piastrine) [33].

L'S1P<sub>5</sub> è espresso principalmente negli oligodendrociti cerebrali; quelli immaturi, derivanti da topi S1P<sub>5</sub>-deficienti, pur non presentando difetti nella mielinizzazione, non rispondono al processo S1P-indotto di retrazione delle connessioni neuronali. L'S1P<sub>5</sub> è espresso anche a livello delle cellule *natural killer* e regola la loro circolazione attraverso un meccanismo FTY720-resistente [34].

Nel complesso l'SIP esercita i suoi effetti mediante specifici recettori localizzati in diversi organi, ma soprattutto a livello del sistema cardiovascolare, immunitario e nervoso centrale. Questi recettori consentono allo sfingolipide di avere effetti pleiotropici in quanto presentano una distribuzione tissutale ed un *signaling* intracellulare parzialmente sovrapponibili e lavorano talvolta cooperando e talvolta competendo l'uno con l'altro.

### 1.3 S1P COME REGOLATORE DELLA CIRCOLAZIONE LINFOCITARIA

Il *signaling* S1P-S1P<sub>1</sub> ha un ruolo critico nella regolazione dell'uscita dei linfociti dal timo e dagli organi linfoidi secondari. Questo *signaling* e quello mediato dagli altri S1PRs rappresentano il *target* dell'FTY720, un nuovo e potente immunomodulatore recentemente approvato dall'*US Food and Drug Administration* [35,36] come primo farmaco somministrabile per via orale nel trattamento della sclerosi multipla recidivante-remittente (SM-RR). Si tratta di un immunosoppressore a bassa citotossicità, sintetizzato utilizzando come *lead compound* [37] la miriocina, che è uno dei principi attivi della *Isaclaria sinclarii*, erba tradizionale della medicina orientale. Diversamente dagli inibitori della calcineurina, come la ciclosporina, l'FTY720 non ha effetto sulla proliferazione ed attivazione dei linfociti, ma induce una notevole riduzione di quelli in circolo (linfopenia), specialmente dei linfociti T maturi. La similarità strutturale tra il farmaco in questione e la Sph fa sì che esso, una volta somministrato, venga fosforilato a FTY720-P da parte della SphK2 [38], potente agonista di tutti i recettori S1P, fatta eccezione per l'S1P<sub>2</sub>, a concentrazioni nanomolari [39].

In seguito a stimolazione agonista, l'S1P<sub>1</sub> viene fosforilato sulla sua estremità C-terminale e, quindi, desensitizzato; successivamente è internalizzato, attraverso un meccanismo  $\beta$ -arrestina-mediato, in vescicole ricoperte da clatrina. Nel caso della stimolazione da parte dell'agonista endogeno S1P, molti dei recettori internalizzati ritornano a livello della membrana plasmatica. L'FTY720-P, invece, induce una prolungata internalizzazione dei recettori, seguita dalla poliubiquitinazione WWWP2 (ubiquitina E3 ligasi)-dipendente e dalla loro degradazione, a cui consegue una notevole riduzione del livello di espressione.

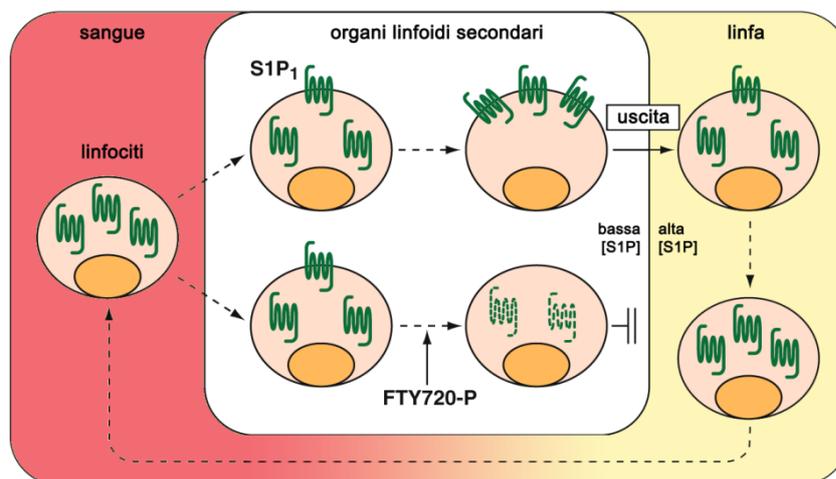
I linfociti derivati da topi S1P<sub>1</sub> mutanti-*knocking*, in cui i siti di fosforilazione C-terminale del recettore sono mutati, vanno incontro, in seguito alla stimolazione agonista, ad una ritardata internalizzazione degli S1P<sub>1</sub> e ad una difettosa desensitizzazione. Questi topi transgenici, dopo la somministrazione dell'FTY720, presentano una linfopenia notevolmente ritardata, e ciò supporta l'ipotesi che questa molecola eserciti i suoi effetti modulando la residenza e l'attività a livello della superficie cellulare dell'S1P<sub>1</sub> e degli altri S1PRs. L'analisi istologica ha rivelato che i seni midollari dei linfonodi di topi trattati con FTY720 sono ricchi di linfociti che, presentando una conta di S1P<sub>1</sub> notevolmente ridotta, non riescono ad accedere ai vasi efferenti. Questi linfociti, come dimostrato pure da studi condotti su topi S1P<sub>1</sub> *knockout*, vanno incontro ad un normale processo di maturazione, ma quasi nessuna cellula matura viene poi trovata nel sangue o nella linfa. Quando linfociti S1P<sub>1</sub>-deficienti vengono trasferiti per via intravenosa in topi *wild type*, essi entrano ma non possono più uscire dagli organi linfoidi secondari [40]. Inoltre la risposta chemiotattica S1P<sub>1</sub>-dipendente è fortemente *up*-regolata nello sviluppo di tali cellule prima che esse escano dal timo, mentre è *down*-regolata durante la loro attivazione periferica [40]. Il ruolo di S1P<sub>1</sub>, quindi, è quello di regolare l'uscita dei linfociti dal timo e dagli organi linfoidi, in risposta al gradiente S1P tra gli organi e la circolazione.

Come già precedentemente detto, la concentrazione S1P viene mantenuta alta nel sangue e nella linfa e bassa nei tessuti. La S1P nel plasma è ritrovata generalmente a basse concentrazioni micromolari, mentre la sua concentrazione nella linfa è approssimativamente 1/6 di quella plasmatica. In virtù di ciò, dopo l'incubazione con 1 nM di S1P per 20 minuti *ex vivo*, l'S1P<sub>1</sub> sui timociti viene internalizzato quasi completamente e non risulta più rilevabile sulla superficie

delle cellule T circolanti; al contrario la sua presenza può essere riscontrata in quelle nella milza e nei linfonodi. Questi risultati sottolineano la sensibilità dei linfociti al gradiente S1P tra sangue e fluidi interstiziali.

L'inibizione della S1P liasi nelle cellule ematopoietiche o mediante il colorante alimentare THI, o mediante il trattamento con la deossipiridossina, antagonista della vitamina B6, o mediante *knockdown* mediato da un piccolo RNA tornante (hairpin RNA= shRNA, sequenza di RNA che può essere utilizzato per mettere a tacere l'espressione di geni bersaglio tramite RNA *interference*) determina un incremento della concentrazione S1P negli organi linfoidi e di conseguenza linfopenia. Lo stesso effetto si manifesta in seguito a delezione di entrambe le chinasi, in quanto si ha distruzione del gradiente S1P [5].

Il modello che rappresenta in che modo l'egresso dei linfociti sia mediato dal *signaling* S1P è rappresentato nella figura 3.



**Figura 3.** Regolazione della circolazione linfocitaria da parte di S1P.

I linfociti in circolo hanno i loro recettori S1P<sub>1</sub> per la maggior parte internalizzati a causa dell'alta concentrazione di S1P; al momento dell'ingresso negli organi linfoidi secondari, dove la concentrazione dello sfingolipide è bassa, essi

recuperano gradualmente l'espressione superficiale di S1P<sub>1</sub> e guadagnano nuovamente la possibilità di uscire dagli organi linfoidi verso l'S1P nel sangue o nella linfa.

L'FTY720 induce la degradazione dell'S1P<sub>1</sub> e in questo modo inibisce l'uscita dei linfociti dagli organi linfoidi.

Il *signaling* S1P è implicato nella regolazione non solo del traffico linfocitario, ma anche delle cellule dendritiche, delle *natural killer* e delle cellule staminali ematopoietiche.

## 1.4 S1P NELLA COAGULAZIONE E NELL'INFIAMMAZIONE

Il gradiente vascolare della S1P preserva l'integrità dei vasi e regola la circolazione delle cellule immunitarie. Non è corretto definire la S1P un mediatore pro-infiammatorio, in quanto essa, a differenza di eicosanoidi e citochine, che vengono prodotti in grande quantità in seguito a stimolazione, agisce sull'endotelio e sulle cellule in circolo in condizioni omeostatiche. Alterazioni della concentrazione plasmatica di questo mediatore sfingoide, in seguito ad un'eccessiva produzione locale o ectopica, fanno sì che ne aumentino i livelli nei tessuti e che essa eserciti sia azioni pro- che anti-infiammatorie in diversi tipi cellulari, quali le cellule endoteliali, le cellule muscolari lisce, i fibroblasti, i monociti/macrofagi, le mast cellule, i linfociti e così via. Gli effetti della S1P, in un dato tipo di cellula, sono dipendenti dalla sua concentrazione locale e dal profilo di espressione dei sottotipi recettoriali su cui essa agisce.

### 1.4.1 S1P nelle piastrine

Le piastrine sono dotate di un'attività costitutiva della SphK e mancano della S1P liasi per cui contengono alte concentrazioni di S1P e le rilasciano, durante il processo coagulativo, in seguito a stimolazione da parte della trombina, del collagene e dell'estere del forbolo.

Un aumento della produzione locale di S1P in seguito all'attivazione delle piastrine potrebbe essere importante nei processi di guarigione da ferite e nel mantenimento dell'integrità della barriera vascolare. Concentrazioni molto alte di S1P ( $>10 \mu\text{M}$ ) determinano l'incremento di calcio intracellulare, il cambiamento di forma, l'aggregazione, e quindi l'attivazione piastrinica, mentre *range* fisiologici non mediano gli stessi effetti. Sebbene l'S1P non sia il principale

fattore attivante le piastrine, il suo *signaling* sembra avere un ruolo importante nella loro produzione. L'S1P<sub>4</sub>, infatti, è *up*-regolato durante lo sviluppo di megacariociti umani dalle cellule progenitrici ematopoietiche e quelli che si sviluppano da midollo osseo murino deficiente di questo sottotipo recettoriale, mostrano atipica e ridotta formazione dei precursori delle piastrine in vitro. Il recupero del numero delle piastrine dopo trombocitopenia sperimentale è significativamente ritardato nei topi che mancano dell'S1P<sub>4</sub>. Queste osservazioni indicano che tale recettore regola la differenziazione terminale nello sviluppo dei megacariociti e delle pro piastrine.

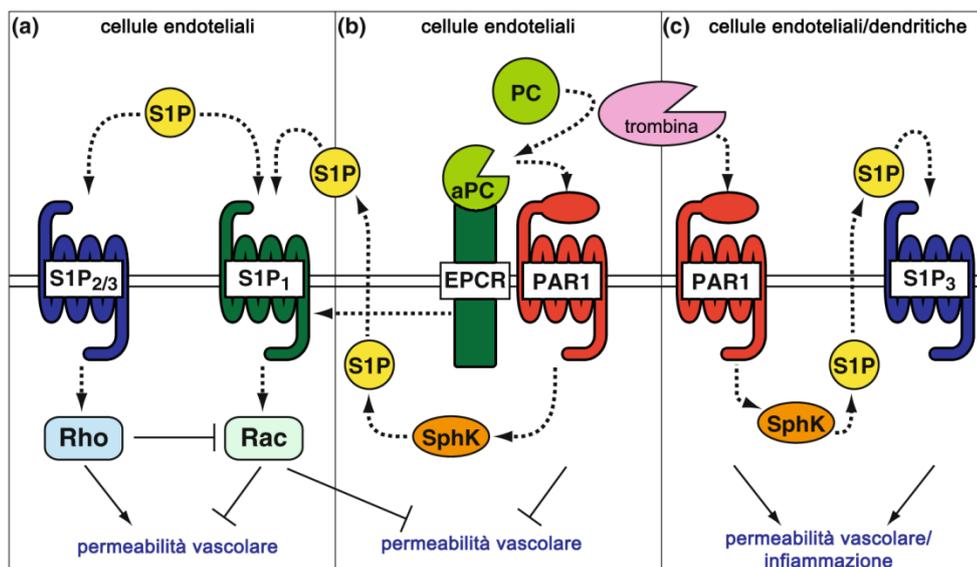
#### **1.4.2 S1P nell'integrità della barriera endoteliale**

Alterazioni della barriera endoteliale determinano un marcato incremento della permeabilità vascolare; tale evento ricorre in caso di infiammazione, metastasi tumorale, angiogenesi e aterosclerosi. Il *signaling* S1P ha un ruolo critico nel mantenere l'integrità della barriera vascolare, infatti topi transgenici che mancano selettivamente della S1P plasmatica in seguito ad un'inducibile doppia delezione SphK1/SphK2, presentano un sistema vascolare non integro e vanno incontro a morte per anafilassi a causa del fattore che attiva le piastrine o a causa dell'istamina. Le alterazioni del sistema vascolare si estendono anche alle venule, che presentano lacune a livello dello strato delle cellule endoteliali; quest'evento può essere invertito dalla trasfusione di eritrociti *wild type*, che ristabiliscono i livelli plasmatici di S1P, o da un acuto trattamento con un agonista S1P<sub>1</sub>. La S1P plasmatica, quindi, attraverso i recettori S1P<sub>1</sub>, rende integra la vascolatura basale in condizioni omeostatiche e previene la possibilità di andare incontro a morte in risposta ai mediatori che ne inducono un'alterazione. Al fine di mantenere

quest'integrità sono necessari il riarrangiamento del citoscheletro e la formazione di giunzioni di adesione tra le cellule endoteliali. La S1P induce la riorganizzazione dell'actina del citoscheletro e la localizzazione di VE-caderina e di  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -catenina a livello dei siti di contatto cellula-cellula nelle HUVEC. Inoltre, dopo la stimolazione S1P, a livello di questi siti di contatto si accumulano anche Rac e Tiam1, un fattore di scambio del nucleotide guanina; l'assemblaggio delle giunzioni endoteliali viene attenuato dal dominante negativo di Rac, dall'inibizione di Rho, mediata dall'endotossina C3, e dalla soppressione dell'espressione S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub>. Garcia *et al.* [41] hanno mostrato che, nelle cellule endoteliali bovine, la S1P induce preferenzialmente l'espressione di Rac e la successiva attivazione della chinasi p-21 associata, in un modo sensibile alla tossina della pertosse, e determina, quindi, la formazione di anelli corticali di actomiosina; la trombina, invece, induce la dissoluzione del citoscheletro corticale, la formazione delle fibre da stress e l'aumento dei divari a livello intercellulare. La S1P determina rapidi e sostenuti incrementi dose-dipendente della resistenza elettrica del monostrato cellulare (TER), sia a livello dell'arteria polmonare umana che bovina, che a livello delle cellule del microcircolo polmonare, e annulla gli effetti deleteri della trombina sulla barriera endoteliale. L'incremento TER S1P-indotto è mediato principalmente dall'S1P<sub>1</sub> e parzialmente dall'S1P<sub>3</sub>, attraverso l'attivazione di Rac ed il riarrangiamento dei filamenti di actina. Il ruolo dell'S1P<sub>3</sub> nell'integrità della barriera endoteliale è complesso e forse è contesto-dipendente. Recenti studi hanno dimostrato che il silenziamento di questo recettore attenua l'incremento della permeabilità vascolare in seguito a stimoli che inducono edema. La stimolazione agonista sull'S1P<sub>3</sub> determina l'attivazione di Rho attraverso l'accoppiamento ad una G<sub>12/13</sub>.

Sebbene la simultanea attivazione di Rac e Rho sia richiesta per garantire l'integrità della barriera endoteliale, la predominanza di Rho determina l'attivazione di fibre da stress e la distruzione delle giunzioni di adesione.

In modo analogo l'attivazione S1P<sub>2</sub> promuove la formazione di fibre da stress-Rho dipendente e la distruzione delle giunzioni di adesione, incrementando la permeabilità vascolare [42]. Quindi le azioni concertate di S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> e S1P<sub>3</sub> regolano la permeabilità vascolare: l'S1P<sub>1</sub> la riduce perché è implicato principalmente nella funzione barriera-protettiva dell'endotelio, mentre gli S1P<sub>2/3</sub> la incrementano perché promuovono l'assottigliamento di tale barriera, sebbene in maniera contesto-dipendente (figura 4a).



**Figura 4.** Crosstalk tra la via del segnale della S1P e quella mediata dal PAR1 nella regolazione della permeabilità vascolare.

Questo concetto è supportato da diversi esperimenti condotti *in vivo*. La somministrazione di S1P o di agonisti S1P<sub>1</sub> selettivi hanno un effetto protettivo in caso di danno polmonare o vascolare LPS (lipopolisaccaride)-indotto, mentre la

somministrazione di antagonisti S1P<sub>1</sub> determina la perdita dell'integrità capillare e danni a livello del microcircolo polmonare e cutaneo. L'efficacia della somministrazione S1P nella permeabilità vascolare LPS-indotta è dipendente dalla concentrazione dello sfingolipide, in quanto una bassa dose ha un effetto protettivo, mentre un'alta dose ha un effetto distruttivo [43], probabilmente a causa dell'attivazione dei recettori S1P<sub>2</sub> e S1P<sub>3</sub>. Infatti i topi S1p<sub>2</sub><sup>-/-</sup> così come quelli con una ridotta espressione di S1P<sub>3</sub> sono protetti dalla distruzione della barriera endoteliale LPS-indotta rispetto al controllo. Affinchè, dopo uno stress che induce edema, l'S1P<sub>1</sub> eserciti una funzione protettiva per la barriera endoteliale, è importante che venga prodotta S1P ad opera di SphK1. E' stato infatti visto che l'attività della SphK1 e la concentrazione di S1P vengono significativamente incrementate nel polmone dopo la somministrazione di un peptide che mima la trombina e che topi Sphk1<sup>-/-</sup> mostrano un marcato incremento della formazione di edemi polmonari in risposta a LPS o a trombina rispetto ai topi *wild type*. A livello delle cellule endoteliali dell'arteria polmonare umana, infatti, l'S1P prodotta da SphK1 attiva l'S1P<sub>1</sub> in modo autocrino/paracrino e ristabilisce l'integrità della barriera endoteliale dopo stimolazione con trombina. Anche i progenitori delle cellule endoteliali derivanti dal midollo osseo sono un'ulteriore fonte di S1P nel processo di ripristino dell'integrità endoteliale dopo somministrazione di LPS.

### **1.4.3 S1P nell'angiogenesi**

In aggiunta al suo ruolo nel garantire l'integrità della barriera vascolare, l'S1P è un potente fattore pro-angiogenico che stimola la migrazione, la proliferazione e la morfogenesi delle cellule endoteliali. L'S1P<sub>1</sub> e l'S1P<sub>3</sub> promuovono la

chemiotassi delle cellule endoteliali verso l'S1P, attraverso un meccanismo che coinvolge i *pathways* di Rho e di PI3K/AKT/Rac, mentre l'S1P<sub>2</sub> media l'inibizione della migrazione in modo Rho e PTEN-dipendente. L'S1P stimola anche la proliferazione e la morfogenesi delle cellule endoteliali all'interno della rete capillare e potenzia l'angiogenesi indotta *in vivo* dal fattore di crescita dei fibroblasti (FGF)-2 e dal VEGF. Quindi la produzione locale di S1P da parte delle piastrine attivate, o durante gli eventi coagulativi nel sito del trauma o nel processo di guarigione delle ferite, induce, insieme ad altri fattori di crescita angiogenici, quali FGF, VEGF e PDGF [44], angiogenesi e conseguente migrazione, proliferazione e morfogenesi delle cellule endoteliali. Studi *in vivo* hanno dimostrato il ruolo del *signaling* S1P nell'angiogenesi patologica. In un modello animale di impianto tumorale subcutaneo, il silenziamento del recettore S1P<sub>1</sub> mediato da RNA *interference* inibisce l'angiogenesi e la crescita tumorale, mentre l'S1P<sub>2</sub> espresso a livello delle cellule endoteliali e delle cellule derivanti dal midollo osseo, regola negativamente questi due eventi. Utilizzando un modello di angiogenesi patologica ipossia-scatenata a livello della retina murina, si è visto che l'S1P<sub>2</sub> sulle cellule dell'endotelio corneale è essenziale per l'infiammazione COX-2-indotta e per la neovascolarizzazione nella camera vitrea. In topi S1P<sub>2</sub> deficienti, questa anormale angiogenesi viene significativamente inibita, il che è correlato con una ridotta espressione COX-2 ed un'aumentata espressione eNOS.

#### **1.4.4 S1P nella coagulazione**

Il *signaling* S1P è attivamente legato al processo coagulativo ed ha un effetto sinergico sull'espressione trombina-indotta del fattore tissutale nelle cellule

HUVEC. Infatti l'S1P, di per sé, non induce l'espressione del fattore tissutale, ma potenzia l'effetto della trombina, attraverso l'attivazione dei fattori trascrizionali NF- $\kappa$ B e Egr-1 (*Early growth factor response protein 1*) in modo dipendente dalle chinasi ERK1/ERK2. Inoltre la co-stimolazione trombina-S1P aumenta rapidamente l'espressione dei recettori S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub> e, in particolare, lo sfingolipide, nelle cellule endoteliali umane dell'aorta, attiva l'esocitosi dei corpi di *Weibel-Palade* [45] (granuli presenti all'interno delle cellule endoteliali) che contengono diversi fattori trombotici, tra cui la P-selectina, il fattore di *von Willebrand* e l'attivatore tissutale del plasminogeno. E' interessante sottolineare che la S1P ha due effetti contrapposti nella regolazione dell'esocitosi a livello delle cellule endoteliali: la induce attraverso l'attivazione della fosfolipasi C- $\gamma$  e l'aumento di calcio intracellulare ma, allo stesso tempo, la sopprime attraverso la produzione di NO determinata dall'attivazione dei *pathways* PI3K/Akt/eNOS. Questi effetti contrapposti sembrano essere mediati dalla differente attivazione S1P<sub>1</sub>-S1P<sub>3</sub>. Quindi l'S1P modula il processo coagulativo a seconda della presenza di altri fattori coagulanti o a seconda del sottotipo recettoriale attivato. Inoltre è stata riportata l'esistenza di un *crosstalk* tra il *signaling* dello sfingolipide oggetto di questo lavoro di tesi e quello mediato dal recettore PAR1 (*Protease activated receptor 1*). Il PAR1 è un GPCR che viene attivato dalla trombina ed è presente a livello delle cellule endoteliali [46]. Esso subisce un taglio proteolitico o dalla trombina o dal complesso contenente il fattore tissutale, innesca la coagulazione e media i loro effetti distruttivi a livello della barriera endoteliale, determinando incremento della permeabilità vascolare [46]. D'altro canto, però, il PAR1 può subire tale taglio anche da parte della proteina C attivata (aPC), una serin proteasi anticoagulante che viene prodotta a partire dallo zimogeno proteina C ad opera del

complesso trombina/trombomodulina. Il recettore endoteliale della proteina C (EPCR) lega questa proteina ed il complesso EPCR/aPC attiva il PAR1, inducendo *pathways* diversi da quelli innescati dalla trombina nelle cellule endoteliali ed inibendo potentemente l'incremento della permeabilità vascolare. Gli effetti protettivi di aPC sulla barriera endoteliale sembrano essere parzialmente dipendenti da una *cross* attivazione di S1P<sub>1</sub>. Silenziando l'S1P<sub>1</sub> o l'espressione SphK1 attraverso l'utilizzo di *small interfering* RNA (siRNA) viene meno l'effetto protettivo di aPC contro la trombina, mentre il silenziamento dell'S1P<sub>3</sub> non produce lo stesso effetto. L'aPC fosforila un residuo di treonina dell'S1P<sub>1</sub> in maniera EPCR- e PI3K-dipendente; questo residuo sembra essere la Thr<sup>236</sup>, dal momento che la fosforilazione, Akt-mediata, di questo residuo è indispensabile per l'attivazione di Rac e per l'assemblaggio dell'actina corticale in seguito a stimolazione S1P nelle cellule HUVEC. In contrapposizione, la *trans* attivazione di S1P<sub>3</sub>, RhoA-mediata, è responsabile della distruzione della barriera endoteliale trombina-indotta. Questi studi *in vitro* hanno suggerito che l'S1P<sub>1</sub> protegge la barriera endoteliale o attraverso l'aPC o attraverso la produzione di S1P da parte della SphK1 o attraverso la *trans* attivazione diretta di S1P<sub>1</sub> mediata da EPCR (figura 4b), mentre l'accoppiamento del PAR1 con l'S1P<sub>3</sub> distrugge la barriera endoteliale (figura 4c).

Gli studi *in vitro* sono stati confermati da un recente studio condotto *in vivo* utilizzando una combinazione di modelli genetici murini (Par1<sup>-/-</sup>, S1p3<sup>-/-</sup>, Sphk1<sup>-/-</sup>, EPCR<sup>low</sup>-bassa espressione EPCR- e TM<sup>pro</sup> -carenza dell'attivazione della proteina C trombomodulina-dipendente) e di diversi modulatori farmacologici in un modello di sepsi LPS-indotto. Quindi le proteasi attivanti (trombina vs aPC/EPCR) e l'accoppiamento ai sottotipi recettoriali S1P (S1P<sub>1</sub> vs S1P<sub>3</sub>)

determinano la specificità del *signaling* PAR1 a livello delle cellule endoteliali nella regolazione della permeabilità vascolare. Inoltre, oltre al *crosstalk* a livello delle cellule endoteliali, l'accoppiamento PAR1-S1P<sub>3</sub> nelle cellule dendritiche amplifica le risposte infiammatorie. Uno studio condotto da Niessen *et al.* [47] ha rivelato che i livelli di citochine infiammatorie rilasciate dalle cellule dendritiche e dalle cellule T sono notevolmente ridotti nei topi Par1<sup>-/-</sup> a 18h dalla somministrazione di un'alta dose di LPS, sebbene le iniziali risposte infiammatorie di topi Par1<sup>-/-</sup> e topi *wild type* siano indistinguibili. Il trasferimento di cellule dendritiche immature derivanti da un midollo osseo *wild type* in topi Par1<sup>-/-</sup> ripristina i livelli di tutti i parametri infiammatori. Da ciò si deduce che queste cellule orchestrano le risposte infiammatorie in una fase avanzata del processo di sepsi. Allo stesso tempo, la somministrazione di agonisti non selettivi dei recettori S1P può contrastare l'esacerbazione del processo infiammatorio in topi Par1<sup>-/-</sup>, ma lo stesso effetto non si ottiene con un agonista selettivo del recettore S1P<sub>1</sub>. Inoltre topi S1p<sub>3</sub><sup>-/-</sup> o Sphk1<sup>-/-</sup>, così come quelli Par1<sup>-/-</sup>, presentano similmente una minore gravità degli stadi infiammatori avanzati e risultano essere notevolmente protetti dall'LPS o dalle infezioni batteriche. Il trasferimento di cellule dendritiche *wild type*, ma non Par1<sup>-/-</sup>, in topi S1p<sub>3</sub><sup>-/-</sup> determina un recupero della gravità degli stadi infiammatori tardivi, supportando il concetto che l'espressione di entrambi i recettori, PAR1 e S1P<sub>3</sub>, nelle cellule dendritiche, abbia un ruolo critico in questa fase degli eventi infiammatori. Meccanicisticamente, la perdita del *signaling* PAR1-S1P<sub>3</sub> sequestra le cellule dendritiche a livello dei linfonodi, in quanto viene ridotta la mobilità di tali cellule, ed attenua il rilascio di interleuchina 1-β. Quindi il *signaling* PAR1-S1P<sub>3</sub> nelle cellule dendritiche associa gli eventi coagulativi agli eventi infiammatori (figura 4c).

#### 1.4.5 S1P nelle mast cellule

I mastociti sono cellule residenti a livello del tessuto connettivo ed hanno ruoli importanti sia nell'immunità innata che adattativa, soprattutto nell'allergia e nell'anafilassi.

L'SphK2 è l'enzima maggiormente responsabile della produzione di S1P da parte delle mast cellule e tale produzione dipende dall'attivazione di Fyn [48], una tirosin chinasi associata covalentemente, sul lato citoplasmatico, a recettori che non possiedono attività tirosin chinasi intrinseca. Le mast cellule derivate da topi *Sphk2<sup>-/-</sup>* producono minori quantità di S1P in seguito a stimolazione di FcεRI e ciò determina una riduzione del grado di degranulazione e della produzione di varie citochine ed eicosanoidi, mediatori chiave delle risposte allergiche. L'S1P intracellulare, prodotta durante l'attivazione delle mast cellule [49], lega in modo autocrino o paracrino l'S1P<sub>1</sub> o l'S1P<sub>2</sub>. La delezione genica dell'S1P<sub>2</sub> o il *knockdown* dell'S1P<sub>1</sub> o dell'S1P<sub>2</sub> mediante nucleotide antisense/siRNA hanno indicato che l'S1P<sub>1</sub> è coinvolto nella migrazione verso l'antigene, mentre l'S1P<sub>2</sub> è indispensabile per la degranulazione. L'S1P<sub>2</sub>, in modo particolare, media le risposte anafilattiche IgE-innescate nei ratti, tra cui l'aumento dell'istamina in circolo e l'edema polmonare ad essa associata. Quindi gli S1P<sub>1/2</sub> e/o le SphK1/2 possono essere potenziali *targets* per sopprimere l'entità delle risposte allergiche e per attenuare l'anafilassi.

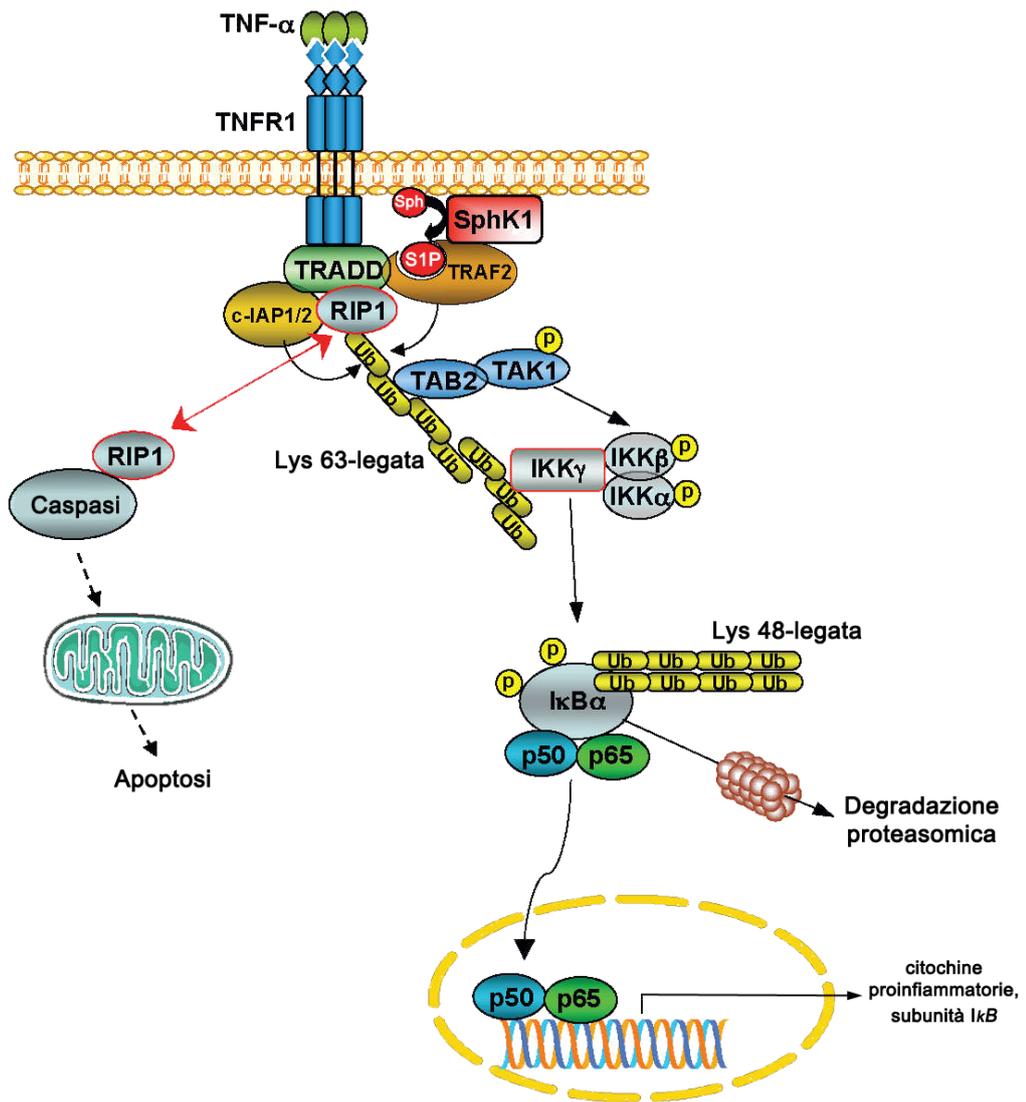
#### 1.4.6 S1P nel *signaling* del TNF-α

La SphK1 e l'S1P sono coinvolte nel *signaling* del TNF-α, una citochina pleiotropica di fondamentale importanza nell'infiammazione sistemica e in un ampio *range* di patologie autoimmuni, tra cui l'artrite reumatoide, i disordini

infiammatori intestinali e l'asma. Il TNF- $\alpha$  induce la fosforilazione ERK1/2-mediata di SphK1 e la sua successiva traslocazione a livello della membrana plasmatica per produrre S1P nelle cellule 293T (cellule embrionali umane di rene). Si pensa che TRAF2, intermedio essenziale nel *signaling* TNF- $\alpha$ , legghi direttamente la SphK1, che è a sua volta necessaria per l'attivazione, TRAF2-mediata, di NF- $\kappa$ B [8]. Nei fibroblasti L929 e nelle cellule di carcinoma polmonare A549, l'*up-regulation* TNF- $\alpha$ -indotta dell'espressione di COX-2 e la successiva produzione di prostaglandina E<sub>2</sub> (un potente eicosanoide pro-infiammatorio) dipendono dall'attivazione della SphK1 e quindi dalla produzione di S1P. Dal momento che anche la stimolazione da parte della S1P induce l'espressione di COX-2, gli effetti del TNF- $\alpha$  potrebbero essere mediati dai recettori S1P in modo autocrino. La S1P attiva anche la fosfolipasi A<sub>2</sub> citosolica nelle cellule A549 attraverso un incremento del calcio intracellulare mediato dal recettore S1P<sub>3</sub> e rilascia acido arachidonico, substrato della COX-2. Allo stesso modo, nei macrofagi, la SphK1 è necessaria per l'incremento di calcio intracellulare, per la degranolazione, per la produzione di citochine (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8), per la chemiotassi e per la produzione della prostaglandina E<sub>2</sub> determinata dal TNF- $\alpha$ . Queste scoperte *in vitro* sono supportate da recenti studi *in vivo* che hanno utilizzato topi Sphk1<sup>-/-</sup> o SphK1 *knockdown* mediante siRNA in modelli di colite indotta da destrano solfato di sodio, o nell'artrite collagene- o TNF- $\alpha$ -indotta, e nella sepsi determinata da LPS. Quindi l'asse SphK1-S1P regola, unitamente al TNF- $\alpha$ , sia le risposte pro-infiammatorie locali che sistemiche, specialmente nelle cellule epiteliali e nei macrofagi.

D'altro canto, nelle cellule endoteliali l'S1P previene, sia *in vitro* che *in vivo* [50], l'adesione TNF- $\alpha$ -mediata dei monociti. Il TNF- $\alpha$  induce l'attivazione di SphK1 e

la produzione di S1P che, a sua volta, attiva l'S1P<sub>1</sub> e l'S1P<sub>3</sub> in modo autocrino ed incrementa la produzione di NO mediante eNOS. L'NO così prodotto attenua l'espressione delle molecole di adesione e la stessa adesione leucocitaria. La differenza tra le azioni pro- e anti-infiammatorie dell'asse SphK1-S1P può essere spiegata dalle differenze tra i tipi cellulari, dai profili di espressione dei sottotipi recettoriali S1P e dagli effetti della S1P, che sono recettori dipendenti e indipendenti. La S1P prodotta dalla SphK1 in seguito alla stimolazione da parte del TNF- $\alpha$  nelle cellule HEK293 lega specificamente TRAF2 a livello della porzione N-terminale del dominio RING e stimola l'attività dell'ubiquitina E3 ligasi che catalizza la poliubiquitinazione di RIP1 (*Receptor Interacting Protein 1*)-lisina-63-legata. L'ubiquitinazione di RIP1 può attivare il complesso IKK. L'NF- $\kappa$ B, infatti, si trova nel citosol legato ad una proteina inibitoria, l'I $\kappa$ B; l'IKK fosforila l'I $\kappa$ B portando alla sua ubiquitinazione e degradazione nel proteasoma. In questo modo l'NF- $\kappa$ B viene reso disponibile e viene traslocato nel nucleo, dove si lega a specifiche sequenze di DNA, denominate *response elements* (RE). Il complesso DNA/NF- $\kappa$ B richiama altre proteine come coattivatori e l'RNA polimerasi trascrive il DNA in mRNA, che è poi trasportato nel citosol e tradotto in proteina; in questo modo vengono prodotte sia le citochine pro-infiammatorie che la subunità inibitrice I $\kappa$ B (figura 5).



**Figura 5.** Ruolo di SphK1 e di S1P nelle azioni di TRAF2, nella regolazione dell'attivazione di NF-κB e delle azioni antiapoptotiche di TNF-α.

Queste risposte sono mediate dall'S1P intracellulare e sono indipendenti dai recettori S1P sulla superficie. Sebbene ciò sia molto interessante, deve essere ancora stabilita la rilevanza del *signaling* intracellulare di S1P in condizioni omeostatiche in quanto, fisiologicamente, la S1P endogena non attiva il *pathway* NF-kB e forse è richiesta una maggiore produzione locale per innescare questi segnali intracellulari.

#### **1.4.7 S1P nell'aterosclerosi**

L'aterosclerosi è una condizione infiammatoria cronica che coinvolge complesse interazioni tra lipidi, cellule vascolari endoteliali, cellule immunitarie e cellule muscolari lisce. Il rischio di sviluppare questa patologia ed i disordini cardiovascolari ad essa associati è strettamente correlato ai livelli plasmatici delle LDL ossidate e inversamente correlato a quelli delle HDL. Le HDL rimuovono l'eccesso di colesterolo dalle arterie e dalle cellule non epatiche per trasportarlo al fegato, dove esso viene escreto con la bile. In aggiunta al trasporto inverso del colesterolo, questa lipoproteina esercita un ampio spettro di azioni, tra cui l'inibizione dell'ossidazione delle LDL, dell'aggregazione piastrinica e molteplici effetti benefici sull'endotelio, come la stimolazione della proliferazione, la sopravvivenza cellulare, la migrazione, la sintesi dell'NO e l'inibizione dell'espressione delle molecole di adesione. Recenti studi hanno rivelato che questi effetti anti-aterogenici esercitati dalle HDL sulle cellule endoteliali sono in parte dovuti alla S1P, che è legata all'apoM della lipoproteina [14]. Nel particolare essa, attraverso i recettori S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub>, media la sopravvivenza, la migrazione e la produzione di NO così come l'inibizione TNF- $\alpha$ -indotta dell'espressione delle molecole di adesione. Inoltre l'S1P<sub>1</sub> potenzia la barriera

endoteliale attraverso l'attivazione Akt, mentre l'S1P<sub>3</sub> determina vasodilatazione mediante la produzione di NO. Dal momento che topi S1P<sub>1</sub>-deficienti muoiono come embrioni, non è stato studiato il coinvolgimento di tali recettori nel modello murino di aterosclerosi utilizzando topi apoE-deficienti (apolipoproteina E) o deficienti del recettore delle LDL (LDLR) alimentati con una dieta ricca di colesterolo. Recentemente, invece, è stato dimostrato il ruolo dell'S1P<sub>2</sub> e dell'S1P<sub>3</sub> in questi modelli patologici. Topi Apoe<sup>-/-</sup>S1p<sub>2</sub><sup>-/-</sup> mostrano uno sviluppo marcatamente minore delle placche aterosclerotiche rispetto a topi Apoe<sup>-/-</sup>, con ridotto accumulo di macrofagi, lipidi, collagene e con ridotta espressione di citochine pro-infiammatorie e di molecole di adesione. Trapianti di midollo osseo hanno dimostrato che le funzioni del recettore S1P<sub>2</sub> a livello ematopoietico sono critiche, in quanto questo recettore regola le funzioni dei macrofagi e promuove l'infiammazione vascolare e l'aterosclerosi. Sebbene topi Apoe<sup>-/-</sup>S1p<sub>3</sub><sup>-/-</sup> non mostrino significative differenze nelle dimensioni delle lesioni aterosclerotiche dopo 24 o 45 settimane di dieta regolare, il contenuto nelle lesioni dei monociti/macrofagi è marcatamente ridotto, mentre il contenuto di cellule muscolari lisce è maggiore rispetto a quello nei topi Apoe<sup>-/-</sup>. Trapianti di midollo osseo hanno rivelato che l'S1P<sub>3</sub>, sia nelle cellule ematopoietiche che non, contribuisce all'accumulo dei monociti/macrofagi all'interno delle lesioni aterosclerotiche. Topi mancanti di tale sottotipo recettoriale presentano minori macrofagi peritoneali in caso di peritonite tioglicolato-indotta ed esprimono livelli più bassi di TNF- $\alpha$  e della proteina-1 chemiotattica dei monociti. Questi risultati suggeriscono che l'S1P<sub>3</sub> ha un ruolo causale nell'aterosclerosi in quanto altera il reclutamento infiammatorio di monociti/macrofagi ed il comportamento delle cellule muscolari lisce.

La somministrazione dell'analogo della S1P, l'FTY720, attenua drammaticamente lo sviluppo di aterosclerosi sia nei topi Apoe<sup>-/-</sup> che in quelli Ldlr<sup>-/-</sup>. Esso riduce la conta linfocitaria nel sangue ed interferisce significativamente con la loro funzione, così come viene evidenziato dalla ridotta proliferazione degli splenociti (grandi cellule macrofagiche mononucleate caratteristiche della milza) e dai livelli di interferon- $\gamma$  nel plasma. Anche le concentrazioni plasmatiche delle citochine pro-infiammatorie, quali il TNF- $\alpha$  e l'IL-6, risultano ridotte. Inoltre l'FTY720 modula l'attivazione dei macrofagi, favorendo quella dei macrofagi anti-infiammatori di tipo M2 [51]. Nei segmenti aortici isolati e nelle cellule muscolari lisce in coltura, l'FTY720 inibisce fortemente il rilascio trombina-indotto della proteina-1 chemiotattica nei confronti dei monociti attraverso il recettore S1P<sub>3</sub>. Complessivamente, quindi, l'FTY720 inibisce l'aterosclerosi, sopprimendo le funzioni dei linfociti e modulando quelle dei macrofagi e delle cellule muscolari lisce.

## **2. IMPOSTAZIONE DELLA RICERCA**

In considerazione delle numerose potenzialità terapeutiche derivanti dall'impiego di composti in grado di modulare la via del segnale mediata dalla S1P, numerosi gruppi di ricerca sono da tempo impegnati nella scoperta di molecole in grado o di interagire direttamente con i recettori della S1P o di modulare la via del segnale attraverso l'inibizione degli enzimi SphK1 e SphK2, responsabili della fosforilazione della sfingosina.

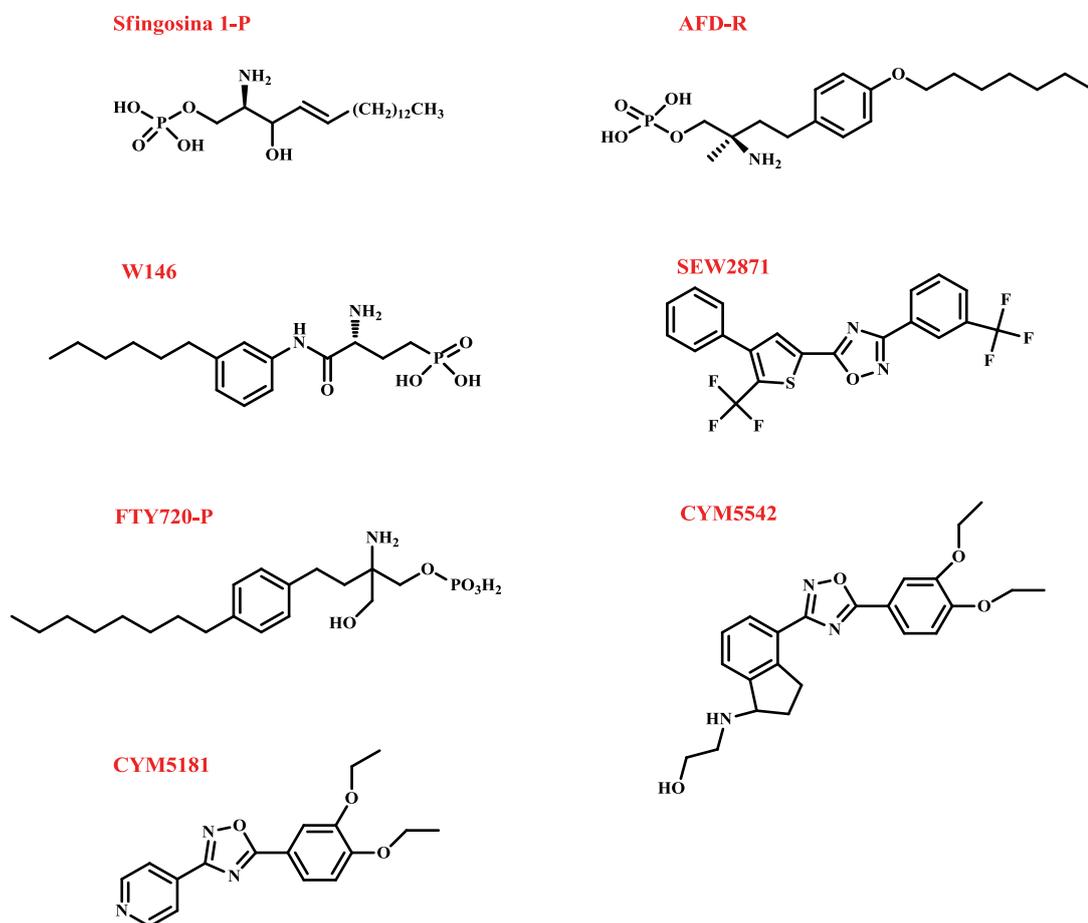
Gli studi di mutagenesi e di *modeling*, condotti da Parril e Tigyi [52], hanno permesso di venire a conoscenza delle interazioni di legame dei recettori S1P. Dopo aver ricavato la sequenza del recettore S1P<sub>1</sub> sulla base della struttura a bassa risoluzione della rodopsina, disponibile a quel tempo, essi hanno ipotizzato e mostrato che gli S1PRs stabiliscono diverse interazioni idrofobiche; inoltre, per ligandi quali la stessa S1P, si generano una serie di critici legami ionici tra l'*headgroup* zwitterionico e residui chiave (E121, R120 ed R292) sul lato extracellulare del recettore, specialmente al punto di emergenza del III dominio transmembranario.

Gli studi per la scoperta di agonisti ed antagonisti (figura 6) sono andati di pari passo fornendo, in tal modo, una panoramica ad alta risoluzione dei recettori S1P e della loro biochimica. Per quanto riguarda gli agonisti, è possibile classificarli in due gruppi [53], a seconda delle interazioni che stabiliscono con i recettori:

1. ligandi di classe I, che possono essere sia composti simil-lipidici, in grado di mimare la S1P e le interazioni ioniche del suo *headgroup*, come esemplificato dall'FTY720-P, sia piccole molecole non lipidiche, che possiedono gruppi polari in grado di interagire con gli stessi residui aminoacidici che ospitano il gruppo ammino fosfato della S1P, con cui

condividono la lunghezza di legame ed il volume occupato, come esemplificato dal derivato SEW2871;

2. ligandi di classe II che, pur mancando dei gruppi responsabili delle interazioni polari, sono in grado di legare e di attivare anche i recettori non responsivi a tale mediatore endogeno, caratterizzati dalla mutazione dei residui chiave di glutammato e arginina con l'alanina (es. CYM-5442 ed i suoi derivati).



**Figura 6.** Agonisti ed antagonisti dei recettori S1P.

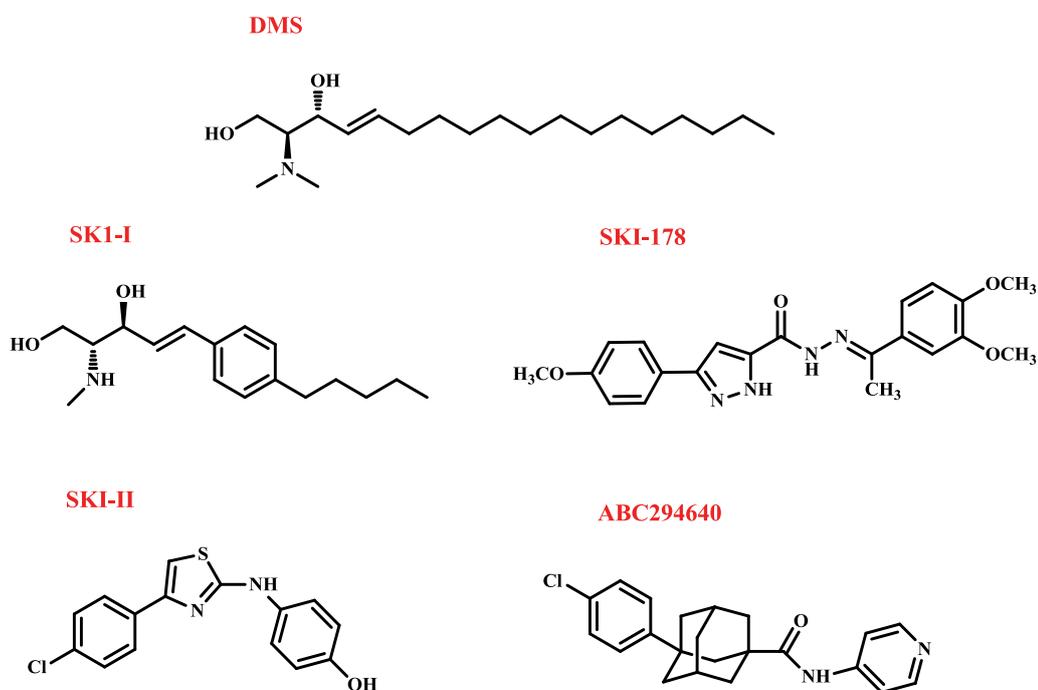
L'esistenza di piccole molecole agoniste di classe II permette di ipotizzare la presenza di una tasca idrofobica all'interno del recettore che è vicina ma che non coincide con il sito di legame dell'agonista endogeno. Ulteriori evidenze che supportano tale ipotesi derivano dagli studi sulle relazioni struttura-attività condotti per la ricerca di molecole ad attività antagonista [54].

In particolare, durante lo sviluppo del composto già precedentemente menzionato, l'FTY720, si è notato che lo spostamento della catena laterale nella posizione *meta* dell'anello aromatico (es. W146) era in grado di convertire l'effetto agonista in antagonista, con un'eccellente attività sul recettore S1P<sub>1</sub> e un modesto antagonismo verso l'S1P<sub>3</sub>. Inoltre, una catena alchilica di sei atomi di carbonio risultava ottimale per l'antagonismo, mentre l'estensione fino a dieci atomi di carbonio ripristinava l'attività agonista; ciò suggerisce che il volume occupato dalla porzione idrofobica del ligando gioca un ruolo chiave nell'attivazione del segnale agonista. Difatti il legame al sito ortosterico, in assenza di adeguate interazioni idrofobiche, determina un efficace blocco del recettore e, probabilmente, produce insufficiente energia per muovere le eliche del dominio transmembranario le une rispetto alle altre.

Parallelamente allo studio di agonisti e antagonisti dei recettori S1P, si è cercato anche di individuare molecole che fossero in grado di inibire le due isoforme enzimatiche di sfingosina chinasi.

Sebbene in letteratura siano stati descritti inibitori di entrambi gli enzimi, non è stata completata una dettagliata caratterizzazione della loro farmacologia, in modo particolare della loro selettività nei confronti della SphK1 o 2 [55]. Il primo inibitore noto è l'analogo della sfingosina, l'N,N-dimetil-D-eritro-sfingosina (DMS) (figura 7), che blocca l'attività di entrambe le chinasi competendo con il

loro substrato naturale. La DMS riduce la crescita tumorale ed induce l'apoptosi delle cellule cancerogene. Tuttavia questa molecola agisce anche sulla protein chinasi C e su altre chinasi ed è quindi considerata un inibitore non specifico delle sfingochinasi. Pochi composti sono stati descritti come selettivi per l'isoforma 1 ed includono l'SK1-I, che riduce la velocità di crescita delle cellule tumorali in caso di glioblastoma (GBM) e di leucemia mieloide acuta (AML) e l'SKI-178, che inibisce la proliferazione di varie linee cellulari tumorali. Questi composti non risultano, però, commercialmente disponibili o mancano di un'opportuna caratterizzazione *in vivo*. L'SKI-II è stato a lungo considerato un inibitore della SphK1, perché riduce la produzione di S1P in un modello di adenocarcinoma mammario murino in cui tale isoforma risulta essere sovraespressa; questo composto, tuttavia, è attivo nei confronti di entrambe le chinasi. L'ABC294640 è, invece, un inibitore selettivo della SphK2; ha un'attività antitumorale sia *in vitro* che *in vivo* ed è attualmente in fase I di sperimentazione clinica (figura 7).



**Figura 7.** Strutture di alcuni inibitori delle SphKs riportati in letteratura.

La progettazione razionale di inibitori delle sfingochinasi è stata, finora, ostacolata dalla mancanza della struttura cristallina di entrambe le proteine. Tuttavia il confronto delle sequenze di SphKs con quelle riportate nel *database* PDB (*Protein Data Bank*), attraverso l'algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), ha permesso di evidenziare similarità nel dominio catalitico della diacilglicerol chinasi (DAGK) e delle SphKs [55]. L'allineamento della DAGK con la SphK1 e la SphK2 ha mostrato che le percentuali di similarità sono del 46 e del 51% nel caso dell'isoforma 1 e 2, rispettivamente.

Dalla struttura cristallina risolta a raggi X della DAGK a 2,8 Angstrom sono stati costruiti i modelli di omologia della SphK1 e 2 umane. L'obiettivo primario degli studi di *modeling* e di simulazione di Peng *et al.* non è stato quello di predire la struttura degli enzimi nella loro interezza, quanto piuttosto quello di comprendere la topologia e la chimica dei siti attivi delle sfingochinasi. In entrambe le SphKs sono stati ritrovati cinque domini conservati che non sono presenti nelle diacilglicerol chinasi; inoltre, l'isoforma 2 contiene un ulteriore dominio (figura 8A) collocato in prossimità del sito di legame del substrato lipidico, che risulta in un largo *loop*; ad esso potrebbe essere associata una restrizione dell'accesso al sito lipidico della SphK2 e la riduzione dell'efficienza catalitica di questa isoforma rispetto alla prima. Nonostante ciò la struttura complessiva e la lipofilia dei domini enzimatici delle due chinasi sembrano essere molto simili (figura 8B).

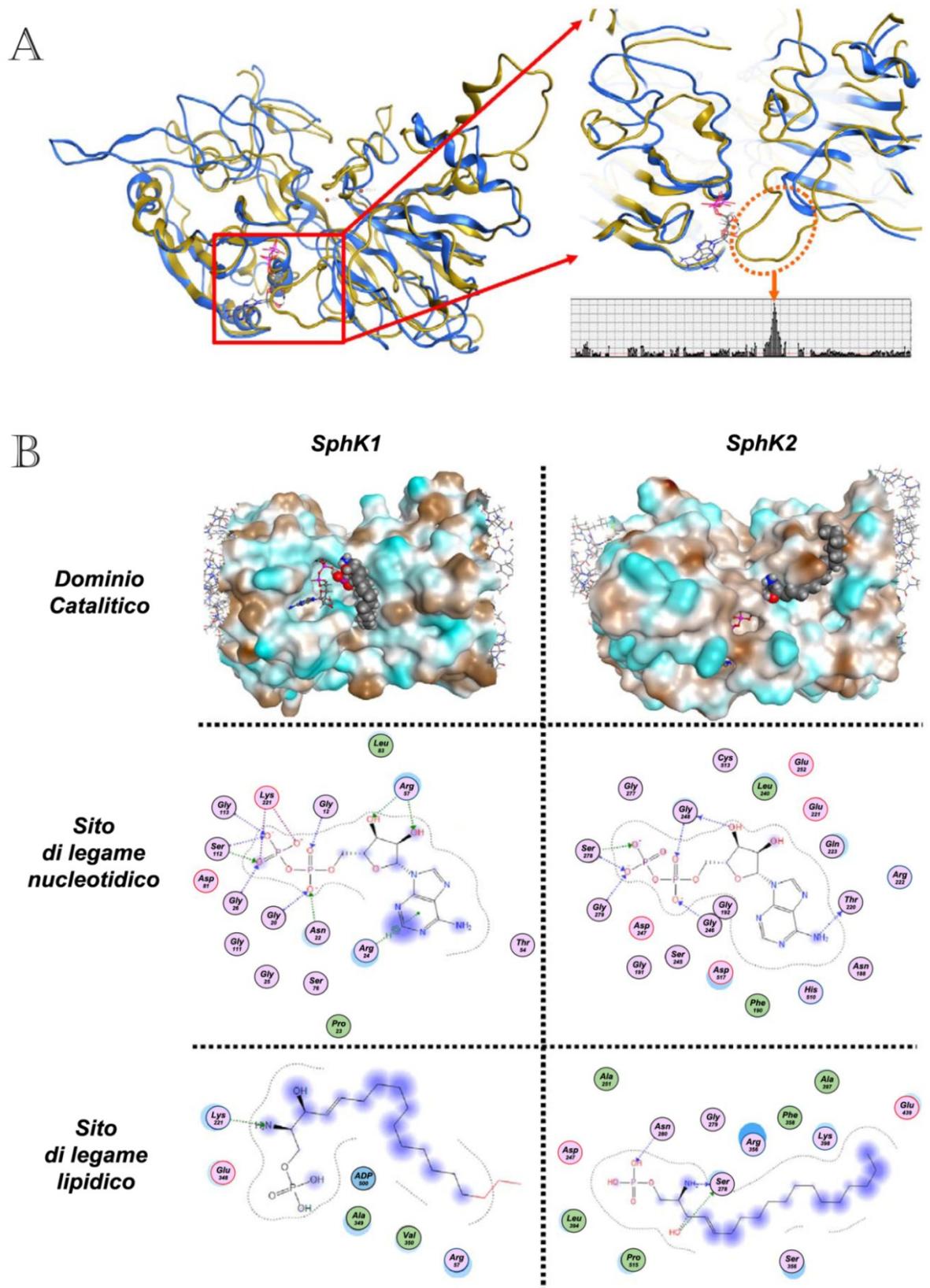
Il meccanismo catalitico dei due isoenzimi è stato evidenziato in seguito al posizionamento della S1P nell'SphK1 e 2 contenenti l'ADP legato (figura 8B). L'*headgroup* fosfato della S1P si trova in stretta vicinanza al beta fosfato dell'ADP e, per entrambe le sfingochinasi, le interazioni che si stabiliscono nella tasca di legame nucleotidica sono simili a quelle delle altre chinasi: diverse glicine

donano protoni agli ossigeni carichi dell' $\alpha$  e  $\beta$  fosfato dell'ADP. Il  $\beta$  fosfato interagisce anche con un residuo di serina mentre una treonina forma legami con l'amina primaria della base nucleotidica in entrambi i modelli.

In contrapposizione al sito di legame nucleotidico, le interazioni che stabilisce la Sph sono molto diverse tra i modelli di sfingosina chinasi 1 e 2:

- nella SphK1, la Lys<sup>221</sup> dona un protone in catena laterale all'azoto aminico della S1P ed un ossigeno del  $\beta$  fosfato dell'ADP forma un legame idrogeno con l'*headgroup* del mediatore sfingoide;
- nella SphK2, gli atomi in catena laterale dell'Asn<sup>280</sup> interagiscono con l'*headgroup* fosfato, mentre la Ser<sup>278</sup> forma legami sia con il gruppo aminico che ossidrilico della S1P.

Questo modello di SphK2 suggerisce che riarrangiamenti conformazionali facilitano il legame del substrato ed il rilascio del prodotto. Inaspettatamente, nel modello di SphK2, l'interazione dell'alchene della S1P non sembra essere basato su un'interazione idrofobica, perché il lipide si trova in una regione relativamente neutra, tangenziale alla tasca idrofila di legame del nucleotide. Dal *modeling* computazionale è stato quindi ricavato che il sito di legame nucleotidico è altamente conservato nelle due sfingochinasi, mentre differente risulta essere la tasca di legame lipidica.



**Figura 8.** Confronto strutturale tra la SphK1 e la SphK2. **A)** Il motivo a nastro della SphK1 è colorato in blu, quello della SphK2 in giallo. **B)** Dominio di legame nucleotidico e lipidico della SphK1 (a sinistra) e della SphK2 (a destra).

Un'attenta analisi dei composti riportati in letteratura [56] ha suggerito che le caratteristiche strutturali necessarie al fine di ottenere molecole in grado di inibire, selettivamente o meno, le due isoforme enzimatiche sono:

- la presenza di una coda lipofila che si posiziona nella tasca idrofoba della chinasi, dove fisiologicamente viene "ospitata" la catena alchilica della sfingosina;
- un *headgroup*, che può essere rappresentato da un'ammina I, II o III oppure da un'amidina, la cui funzione è quella di chelare il gruppo  $\gamma$  fosfato dell'ATP, in modo da stabilizzare il complesso [SphK · ATP · Inibitore];
- un *linker*, dato da una catena alchilica, da un alchene, da un'ammide o da un anello adamantanico, che connette il terminale lipofilo e l'*headgroup*.

Le code lipofiliche più corte, a 8 o a 10 atomi di carbonio, determinano un'uguale inibizione di entrambe le isoforme di sfingosina chinasi, mentre quelle a 12 atomi di carbonio migliorano il profilo di potenza e di selettività verso l'isoforma 1, nonostante aumenti il costo entropico associato alla costrizione che deve subire la coda con un gran numero di legami rotabili per agganciarsi all'enzima in una singola conformazione di legame. Queste differenze possono essere spiegate dal fatto che la tasca di legame del substrato della SphK1, come precedentemente descritto, è più larga di quella della SphK2, per cui molecole che presentano un terminale lipofilo più lungo, vanno incontro ad un alterato posizionamento nell'isoforma 2.

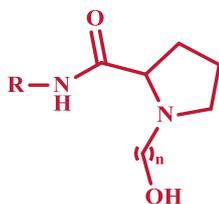
L'individuazione di inibitori più potenti e selettivi nei confronti delle sfingochinasi fornirebbe, quindi, non solo uno strumento molto utile per lo studio dei *pathways* metabolici dei lipidi ma anche un potenziale approccio per il

trattamento di quelle malattie tumorali e/o immunitarie che vedono l'importante coinvolgimento della S1P.

Sulla base delle considerazioni suddette, durante il mio lavoro di dottorato, mi sono occupata della sintesi di una libreria di potenziali inibitori delle sfingosina chinasi, i composti **1-37**.

I derivati **1-7**, a nucleo idrossietil-pirrolidin-carbossamidico, e **8-14**, a nucleo idrossipropil-pirrolidin-carbossamidico (tabella 1), sono stati sintetizzati per valutare l'effetto impartito dalla rigidità dell'anello pirrolidinico e, al contempo, dalla libertà rotazionale del gruppo ossidrilico mimante l'*headgroup* della sfingosina, sull'attività inibitoria.

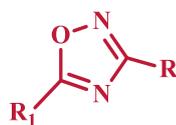
**Tabella 1.** Strutture dei composti a nucleo idrossialchil-pirrolidin-carbossamidico



Composto	n	R	Composto	n	R
1	2		8	3	
2	2		9	3	
3	2		10	3	
4	2		11	3	
5	2	$\text{H}_3\text{C}(\text{H}_2\text{C})_5$ -	12	3	$\text{H}_3\text{C}(\text{H}_2\text{C})_5$ -
6	2	$\text{H}_3\text{C}(\text{H}_2\text{C})_6$ -	13	3	$\text{H}_3\text{C}(\text{H}_2\text{C})_6$ -
7	2	$\text{H}_3\text{C}(\text{H}_2\text{C})_7$ -	14	3	$\text{H}_3\text{C}(\text{H}_2\text{C})_7$ -

I derivati **15-17**, a nucleo 1,2,4-(3-fenil)ossadiazolico (tabella 2), sono stati sintetizzati allo scopo di verificare se, nei composti **15** e **16**, questo sistema eterociclico a cinque termini potesse fungere da *linker* tra il terminale lipofilo e l'*headgroup* e se, nel caso del composto **17**, la sostituzione della porzione idrossialchil-pirrolidinica con un sistema bifenilico, avente la stessa rigidità ma maggiore lipofilia, fosse deleteria ai fini dell'attività.

**Tabella 2.** Strutture dei composti a nucleo 1,2,4-(3-fenil)ossadiazolico



Composto	R	R <sub>1</sub>
15		
16		
17		

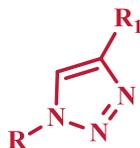
Contestualmente, in virtù dell'osservazione che la struttura octilfenilica ben si adattava alla progettazione di potenziali inibitori, sono stati progettati altri derivati in cui tale unità strutturale è stata condensata o con l'idrossiprolina o, attraverso una cicloadizione 1,3-dipolare, con un nucleo 1,2,3-triazolico, ottenendo rispettivamente i derivati **18-19** (tabella 3) e **20-21, 24-37** (tabella 4). Allo stesso tempo, la presenza di un residuo Cl-fenilico in alcuni inibitori della SphK2 riportati in letteratura (vedi SK1-II e ABC294640, figura 7), ha motivato la progettazione e la sintesi dei composti **22** e **23** (tabella 4), in cui questo terminale lipofilo è stato legato, tramite un *linker* amidico o direttamente, ad uno *scaffold* 1,2,3(4-idrossimetil)-triazolico, per valutarne selettività ed attività.

**Tabella 3.** Strutture dei composti a nucleo idrossipirrolidin-carbossamidico



Composto	R	R <sub>1</sub>
<b>18</b>		H
<b>19</b>		-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH

**Tabella 4.** Strutture dei composti a nucleo 1,2,3-triazolico



Composto	R	R <sub>1</sub>
<b>20</b>		-CH <sub>2</sub> OH
<b>21</b>		-CH <sub>2</sub> OH
<b>22</b>		-CH <sub>2</sub> OH
<b>23</b>		-CH <sub>2</sub> OH
<b>24</b>		-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH

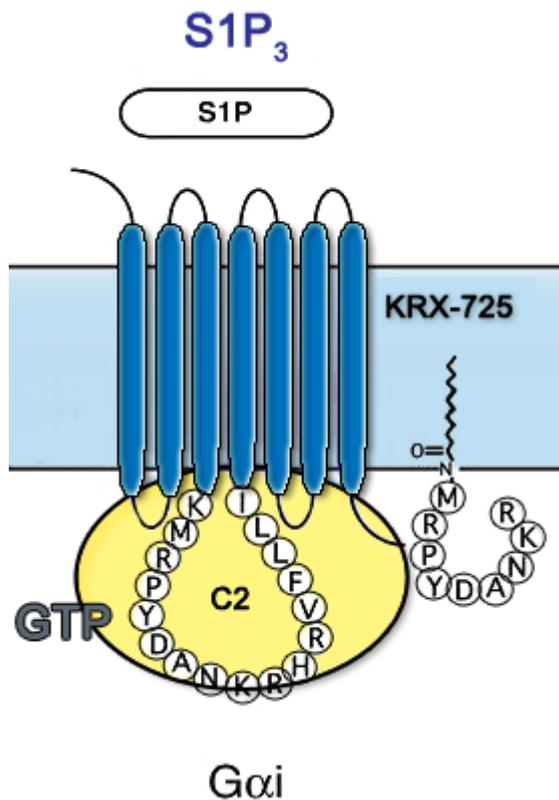
Composto	R	R <sub>1</sub>
25		$-(\text{CH}_2)_3\text{OH}$
26		
27		
28		
29		
30		
31		$-(\text{CH}_2)_2\text{OH}$
32		$-(\text{CH}_2)_3\text{OH}$
33		
34		
35		
36		
37		

Al fine di modulare il *signaling* della S1P, parallelamente al filone dell'inibizione delle sfingosina chinasi, il mio lavoro di dottorato si è rivolto anche alla progettazione e sintesi di una serie di peptidi miristoilati in grado di agire sui recettori S1P.

La progettazione di questi derivati di natura peptidica è nata da un'opportuna analisi del peptide **KRX-725 (I)** riportato in letteratura, la cui sequenza amminoacidica risulta essere la seguente:

**Miristoil-GMRPYDANKR-NH<sub>2</sub>**

Tale peptide corrisponde al tratto C terminale del II *loop* intracellulare (i2) del recettore S1P<sub>3</sub>; il *loop* i2 è altamente conservato nei *G protein-coupled receptors* (GPCRs), ed è coinvolto nella mediazione delle interazioni cellulari. E' stato dimostrato come tale peptide sia in grado di mimare gli effetti della S1P legandosi selettivamente al recettore S1P<sub>3</sub>. Il *binding mode* del peptide differisce da quello dei ligandi classici, che si legano dal lato extracellulare del recettore e lo attivano senza attraversare la membrana cellulare, ed è analogo a quello delle pepducine, che sono in grado di interagire con il recettore a livello intracellulare [57] perchè caratterizzate dalla presenza di una coda lipofila, rappresentata da un residuo di un acido carbossilico a lunga catena (acido palmitico o miristico), che rende possibile l'attraversamento del *bilayer* fosfolipidico e l'ancoraggio alla membrana. All'aggancio segue l'interazione del peptide KRX-725 con il *loop* i2 del recettore. Ne deriva l'attivazione del complesso MEK-ERK (*Mitogen activated protein kinase e extracellular signal regulated kinase*) G<sub>i</sub>-dipendente [58] che determina l'internalizzazione e desensitizzazione del recettore S1P<sub>3</sub> (figura 9).



**Figura 9.** Attivazione dell'S1P<sub>3</sub> da parte di S1P e di KRX-725.

Utilizzando anelli di aorta come modello *ex-vivo* di angiogenesi, è stato valutato l'effetto pro-angiogenico di KRX-725 confrontato a quello della S1P. KRX-725 induce un'intensa ed estesa genesi di vasi che contengono un'elaborata organizzazione dell'endotelio e degli strati muscolari lisci, inclusa la formazione del lumen. La struttura di questi vasi si presenta più simile al normale albero vascolare rispetto ai vasi generati dalla S1P, che sembrano più anormali in quanto risultano meno strutturati e con una minore organizzazione delle cellule muscolari lisce. Quando KRX-725 o la S1P si trovano in presenza di fattori pro-angiogenici, quali il fattore di crescita dei fibroblasti (bFGF), il fattore delle cellule staminali (SCF), o il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), gli effetti sono sinergici, portando ad un maggiore incremento della genesi vascolare.

La specificità di KRX-725 è stata dimostrata dal fatto che esso determina l'internalizzazione peptide-indotta dell'S1P<sub>3</sub> ma non dell'S1P<sub>1</sub>[59].

Crescente è l'interesse verso l'S1P<sub>3</sub> come potenziale *target* terapeutico, dal momento che esso è il recettore maggiormente espresso nelle cellule di tumore alla mammella (BCCs), dove promuove la migrazione cellulare e media gli effetti proliferativi dell'estrogeno.

A tal proposito, uno studio recente ha fornito un supporto a questa ipotesi, in quanto l'espressione di S1P<sub>3</sub> nei tumori al seno si è dimostrata strettamente correlata alla diminuita sensibilità delle pazienti trattate al tamoxifene e alla ridotta possibilità di sopravvivenza [59]. L'importanza dell'antagonismo su questo sottotipo recettoriale è stata confermata dallo sviluppo di un anticorpo monoclonale, 7H9, che si è mostrato in grado di bloccare la trasduzione del segnale dell'S1P<sub>3</sub> [60]. Sebbene questo rappresenti un importante *tool* farmacologico per lo studio delle condizioni patologiche che vedono il coinvolgimento del sottotipo S1P<sub>3</sub>, è auspicabile sintetizzare composti di natura peptidica o peptidomimetica, data la loro maggiore maneggevolezza ed il migliore profilo di tollerabilità.

In virtù di ciò, durante il mio lavoro di dottorato mi sono interessata inizialmente della sintesi di analoghi della peptidina **KRX-725** in cui ciascun residuo è stato sostituito con L-Ala (Ala-scan), allo scopo di verificare l'importanza di ogni amminoacido della sequenza nativa ai fini dell'attività farmacologica (tabella 5).

**Tabella 5.** Sequenza di KRX-725 (**I**) e dei peptidi ottenibili mediante suo Alascan (**II-X**)

<b>Composto</b>	<b>Peptide</b>
<b>I</b>	Myristoyl-Gly-Met-Arg-Pro-Tyr-Asp-Ala-Asn-Lys-Arg-NH <sub>2</sub>
<b>II</b>	Myristoyl- <b>Ala</b> -Met-Arg-Pro-Tyr-Asp-Ala-Asn-Lys-Arg-NH <sub>2</sub>
<b>III</b>	Myristoyl-Gly- <b>Ala</b> -Arg-Pro-Tyr-Asp-Ala-Asn-Lys-Arg-NH <sub>2</sub>
<b>IV</b>	Myristoyl-Gly-Met- <b>Ala</b> -Pro-Tyr-Asp-Ala-Asn-Lys-Arg-NH <sub>2</sub>
<b>V</b>	Myristoyl-Gly-Met-Arg- <b>Ala</b> -Tyr-Asp-Ala-Asn-Lys-Arg-NH <sub>2</sub>
<b>VI</b>	Myristoyl-Gly-Met-Arg-Pro- <b>Ala</b> -Asp-Ala-Asn-Lys-Arg-NH <sub>2</sub>
<b>VII</b>	Myristoyl-Gly-Met-Arg-Pro-Tyr- <b>Ala</b> -Ala-Asn-Lys-Arg-NH <sub>2</sub>
<b>VIII</b>	Myristoyl-Gly-Met-Arg-Pro-Tyr-Asp- <b>Ala</b> -Ala-Lys-Arg-NH <sub>2</sub>
<b>IX</b>	Myristoyl-Gly-Met-Arg-Pro-Tyr-Asp-Ala-Asn- <b>Ala</b> -Arg-NH <sub>2</sub>
<b>X</b>	Myristoyl-Gly-Met-Arg-Pro-Tyr-Asp-Ala-Asn-Lys- <b>Ala</b> -NH <sub>2</sub>

L'obiettivo della seconda fase del progetto è stato l'individuazione della minima sequenza in grado di conservare l'azione *full agonist* verso i recettori S1P<sub>3</sub>, per pervenire ad un'ipotesi ragionevole circa la relativa importanza delle varie funzioni chimiche coinvolte nell'interazione farmacodinamica e procedere alla progettazione di un eventuale antagonista. A tal fine sono stati sintetizzati peptidi deleti dall'estremità N-terminale e C-terminale di KRX-725, le cui sequenze sono riportate nella seguente tabella 6.

**Tabella 6.** Sequenza di KRX-725 (**I**) e dei peptidi di delezione (**XI-XX**).

<b>Composto</b>	<b>Peptide</b>
<b>I</b>	Myristoyl-Gly-Met-Arg-Pro-Tyr-Asp-Ala-Asn-Lys-Arg-NH <sub>2</sub>
<b>XI</b>	Myristoyl-Gly-----Arg-Pro-Tyr-Asp-Ala-Asn-Lys-Arg-NH <sub>2</sub>
<b>XII</b>	Myristoyl-Gly-----Pro-Tyr-Asp-Ala-Asn-Lys-Arg-NH <sub>2</sub>
<b>XIII</b>	Myristoyl-Gly-----Tyr-Asp-Ala-Asn-Lys-Arg-NH <sub>2</sub>
<b>XIV</b>	Myristoyl-Gly-----Asp-Ala-Asn-Lys-Arg-NH <sub>2</sub>
<b>XV</b>	Myristoyl-Gly-Met-Arg-Pro-Tyr-Asp-Ala-Asn-Lys-----NH <sub>2</sub>
<b>XVI</b>	Myristoyl-Gly-----Arg-Pro-Tyr-Asp-Ala-Asn-----NH <sub>2</sub>
<b>XVII</b>	Myristoyl-Gly-----Arg-Pro-Tyr-Asp-Ala-----NH <sub>2</sub>
<b>XVIII</b>	Myristoyl-Gly-----Arg-Pro-Tyr-Asp-----NH <sub>2</sub>
<b>XIX</b>	Myristoyl-Gly-----Arg-Pro-Tyr-----NH <sub>2</sub>
<b>XX</b>	Myristoyl-Gly-----Pro-Tyr-Asp-Ala-Asn-----NH <sub>2</sub>

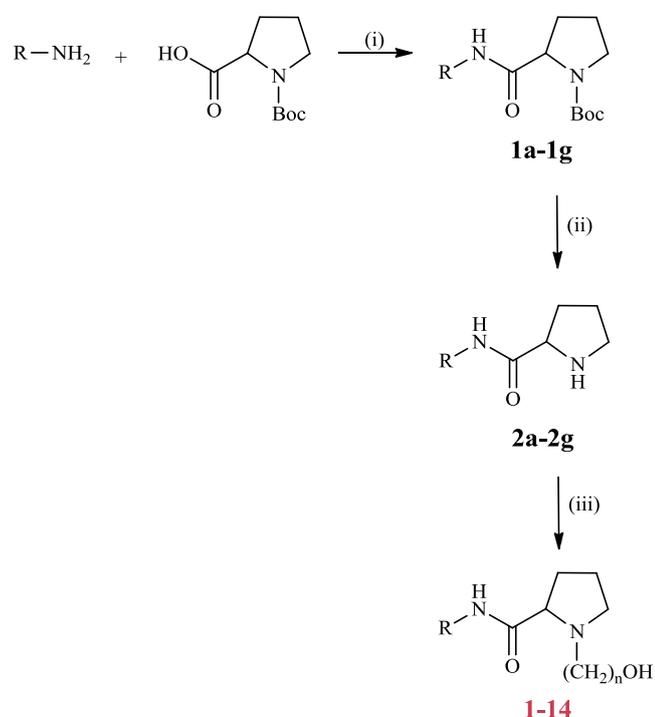
### **3. PARTE SPERIMENTALE**

### 3.1 SINTESI

#### 3.1.1 SOMMARIO DELLE OPERAZIONI

##### 3.1.1.1 DERIVATI A NUCLEO IDROSSIALCHIL-PIRROLIDIN-CARBOSSAMIDICO

La strategia sintetica per la preparazione dei derivati idrossialchil-pirrolidin-carbossamidici (**1-14**) è riassunta graficamente nello **schema 1**.



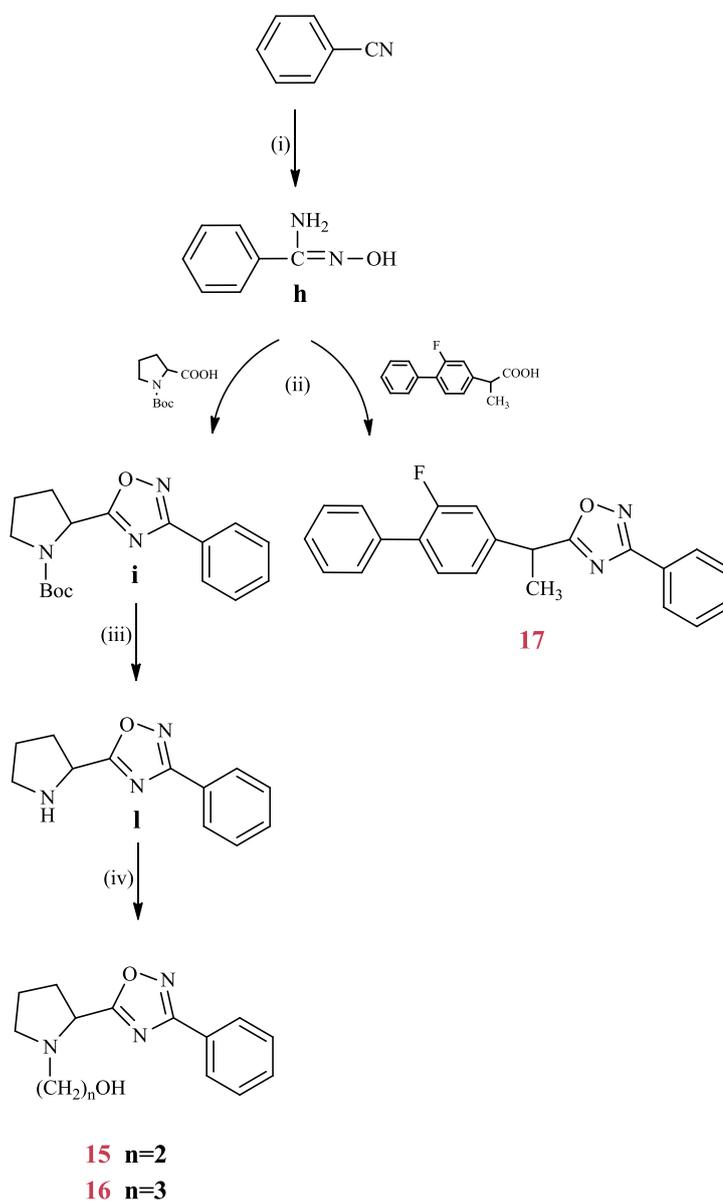
**Schema 1** - Reagenti e condizioni: (i) TBTU/HOBt, DMF, 12h; (ii) TFA al 40% in DCM, 2h; (iii)  $Br(CH_2)_nOH$ , NaI,  $K_2CO_3$ , DMF, 12h.

Il primo stadio ha previsto la condensazione della Boc-Pro-OH, la cui funzione carbossilica è stata previamente attivata via TBTU/HOBt, con le ammine aromatiche desiderate: la *p*-cloro-anilina, l' $\alpha$ -naftilammina, la 2-amminobifenile, la 4-amminobifenile, la 4-esil-anilina, la 4-eptil-anilina, la 4-octil-anilina.

La reazione è stata condotta in DMF, a temperatura ambiente, sotto agitazione elettromagnetica per 12h ed ha fornito gli intermedi **1a-1g**. Per la successiva deprotezione dal gruppo Boc è stata utilizzata una miscela di TFA al 40% in DCM. I prodotti **2a-2g** così ottenuti sono stati trattati con il 2-bromoetano e con il 3-bromo-1-propanolo, in presenza di NaI e K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, in DMF, per fornire rispettivamente i prodotti finali **1-7** e **8-14** (Tabella 1).

### 3.1.1.2 DERIVATI A NUCLEO 1,2,4-(3-FENIL)OSSADIAZOLICO

I derivati 1,2,4-(3-fenil)ossadiazolici (**15-17**), invece, sono stati sintetizzati secondo la procedura illustrata nello **schema 2**.

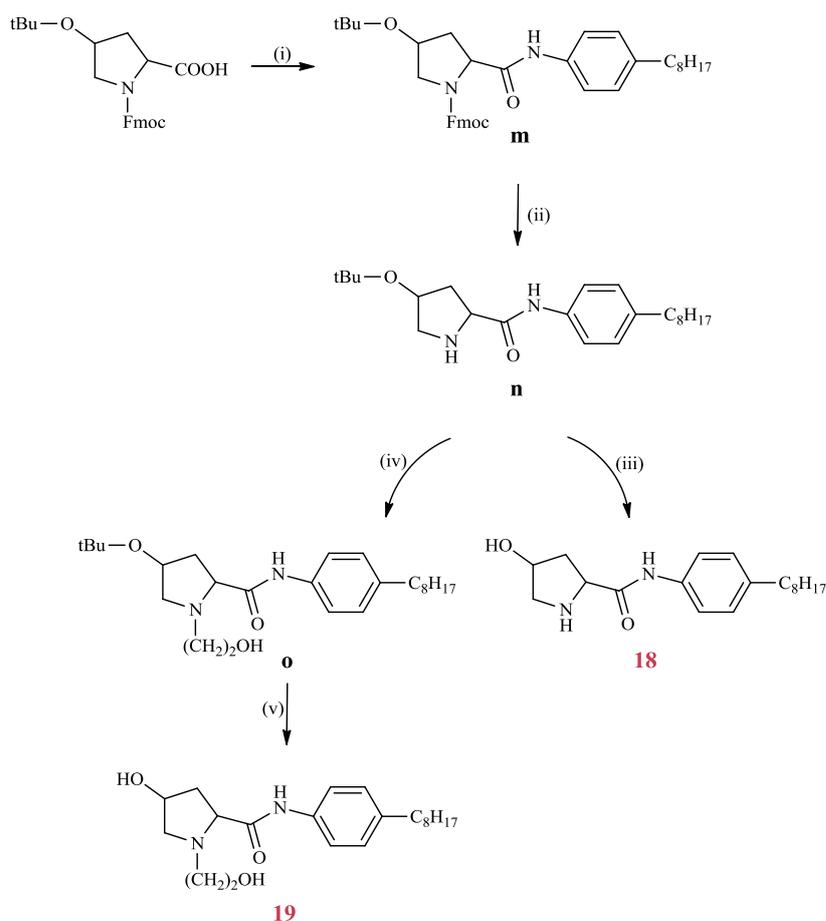


**Schema 2**- Reagenti e condizioni: (i)  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ ,  $\text{NaHCO}_3$ , EtOH,  $\text{H}_2\text{O}$ , 3h,  $90^\circ$ ; (ii) HOBt,  $\text{WSCD}\cdot\text{HCl}$ , DMF, 12h,  $150^\circ$ ; (iii) TFA al 40% in DCM, 2h; (iv)  $\text{Br}(\text{CH}_2)_n\text{OH}$ , NaI,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , DMF, a riflusso per 24h.

Ad una soluzione di benzonitrile in EtOH, precedentemente riscaldata a 90°, viene aggiunta tramite imbuto gocciolatore idrossilamina cloridrato disciolta in acqua. Terminato questo passaggio, la miscela viene addizionata di bicarbonato e lasciata sotto agitazione e.m. per 3h, fornendo l'intermedio **h**. Tale intermedio viene condensato con l'acido 2-(3-fluoro-4-fenil-fenil)propanoico, la cui funzione carbossilica è stata precedentemente attivata via WSCD•HC/HOBt in DMF a temperatura ambiente, sotto agitazione e.m. per 20'. La miscela di reazione dopo circa 30' è stata riscaldata fino alla temperatura di ebollizione del solvente, fornendo il composto finale **17**. Lo stesso intermedio **h** è condensato con la Boc-Pro-OH in modo analogo a quanto descritto per il prodotto **17**, per fornire l'intermedio **i**. Quest'ultimo viene deprotetto dal gruppo Boc, mediante TFA al 50% in DCM, ed alchilato con il 2-bromoetanolo o con il 3-bromo-1-propanolo, in presenza di NaI e K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in DMF, a caldo, fornendo rispettivamente i prodotti desiderati **15** e **16**.

### 3.1.1.3 DERIVATI A NUCLEO IDROSSIPIRROLIDIN-CARBOSSAMIDICO

Per la sintesi dei composti idrossipirrolidin-carbossamidici (**18-19**) è stata eseguita la procedura riportata graficamente nello **schema 3**.



**Schema 3**- Reagenti e condizioni: (i) octilanilina, TBTU, HOBt, DIPEA, DMF, 6h; (ii) DIEA al 33% in THF, 2h; (iii) TFA al 50% in DCM, 3h; (iv) BrCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, NaI, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF, a riflusso per 24h; (v) TFA al 50% in DCM, 3h.

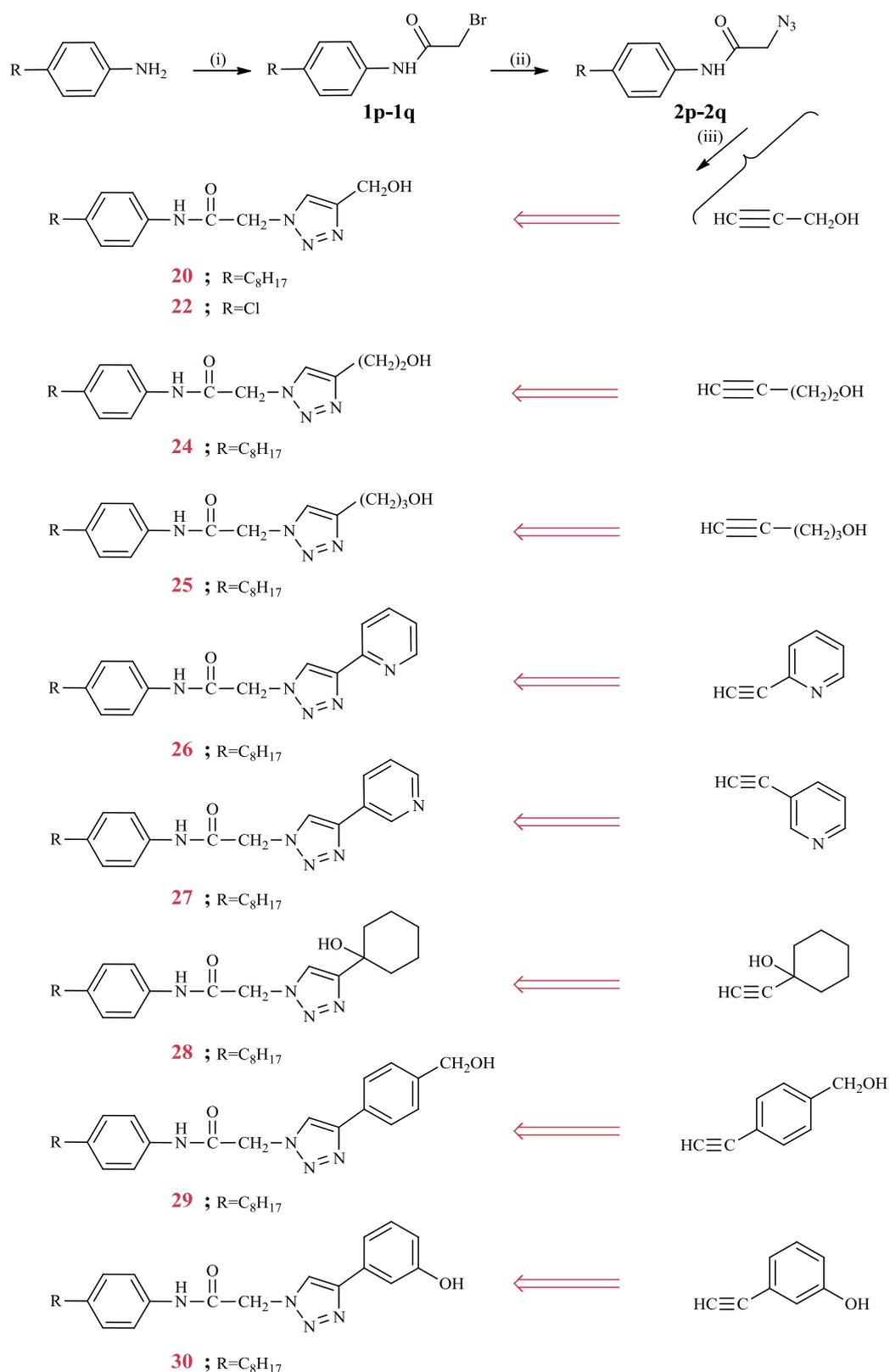
Il primo passaggio ha previsto la condensazione dell'acido-1-(((9H-fluoren-9-il)metossi)carbonil)-4-*tert*-butossipirrolidina-2-carbossilico, la cui funzione acida è stata previamente attivata via TBTU/HOBt, con la 4-octilanilina. La reazione, condotta in DMF, a temperatura ambiente e sotto agitazione e.m. per circa 6 ore, ha fornito l'intermedio **m**. La successiva deprotezione dal gruppo Fmoc, mediante trattamento con una soluzione di DIEA al 33% in THF per 2 ore, ha consentito di ottenere l'intermedio **n**.

La rimozione del gruppo *tert*-butil etere, condotta con una soluzione di TFA al 50% in DCM per 3 ore, ha portato al prodotto finale **18**. Lo stesso intermedio è stato condensato con il 2-bromoetano, in presenza di NaI e K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in DMF, a caldo; il prodotto **o** ottenuto viene trattato con TFA al 50% in DCM fornendo il composto finale **19**.

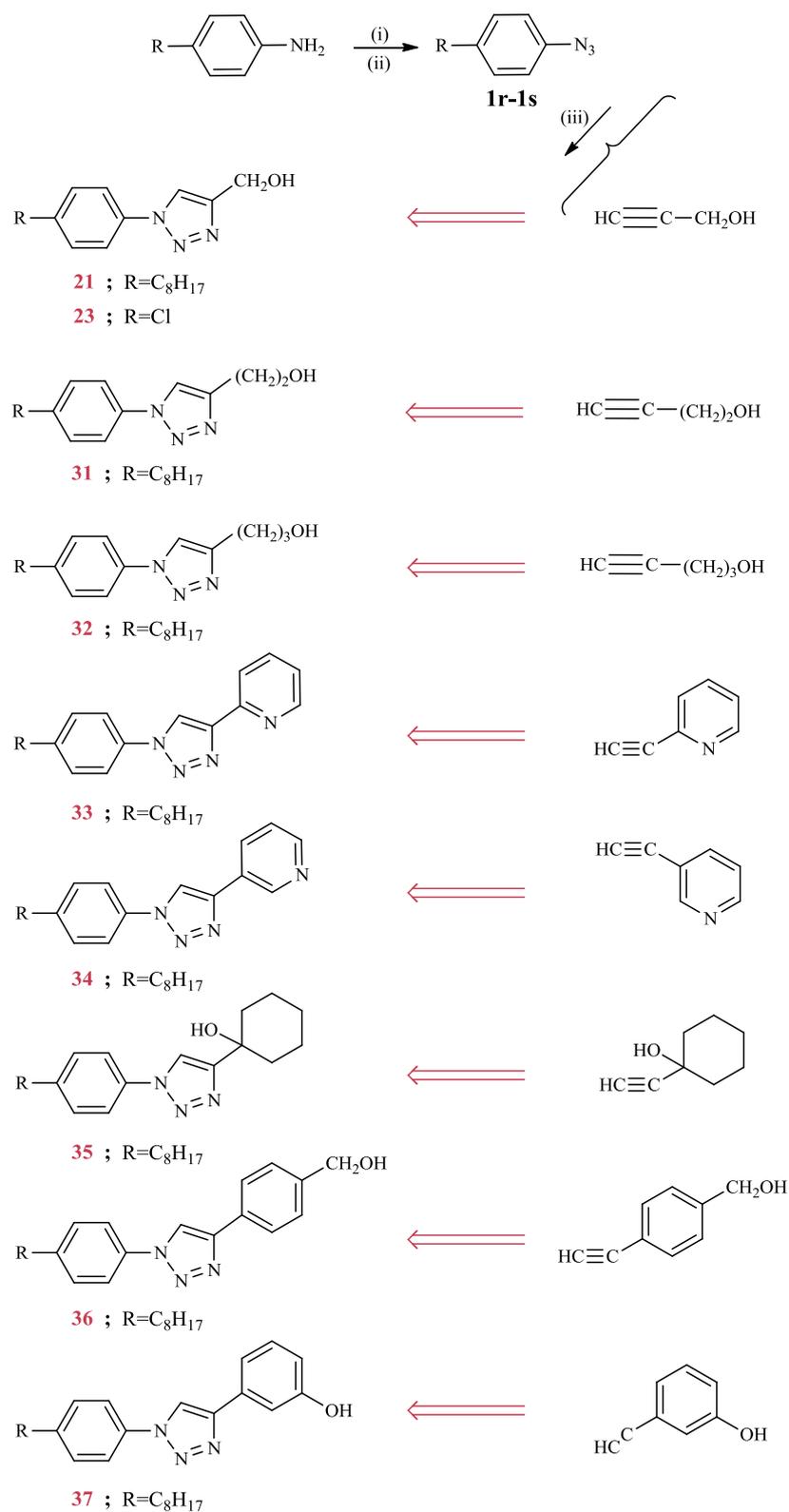
#### 3.1.1.4 DERIVATI A NUCLEO 1,2,3-TRIAZOLICO

La sintesi dei composti a nucleo 1,2,3-triazolico è stata eseguita secondo la procedura illustrata negli **schemi 4** e **5**. Per la sintesi dei derivati a nucleo 1,2,3-triazolico separato dal terminale octilfenilico o clorofenilico tramite un *linker* amidico (**schema 4**), ad una soluzione dell'opportuna ammina aromatica in toluene viene aggiunto, a temperatura ambiente, tramite imbuto gocciolatore, il bromoacetil bomuro. Terminata l'aggiunta, si lascia andare a ricadere per 4h, al fine di ottenere i derivati bromoacetamidici **1p-1q**. Questi intermedi vengono poi trattati con  $\text{NaN}_3$  in EtOH; la miscela di reazione viene riscaldata fino alla temperatura di ebollizione del solvente per 2h e 30', fornendo i derivati azidici **2p-2q**. Le azidi, una volta disciolte in una miscela  $\text{H}_2\text{O}:\text{tBuOH}$  1:1 (v/v), in presenza di  $\text{CuSO}_4$  e sodio L-ascorbato, vengono fatte reagire con gli alchini selezionati (2-propin-1-ol, 3-butin-1-ol, 4-pentin-1-ol, 2-etinilpiridina, 3-etinilpiridina, 1-etinilcicloesano, 4-etinilbenzil alcol, 3-etinilfenolo) a temperatura ambiente, sotto agitazione e.m. per 48h e portano, attraverso una cicloaddizione 1,3-dipolare, ai prodotti finali **20, 22, 24-30**.

La sintesi dei derivati a nucleo 1,2,3-triazolico direttamente legato al terminale octilfenilico o clorofenilico (**schema 2**) ha previsto il trattamento dell'opportuna ammina aromatica con  $\text{NaNO}_2$  in  $\text{H}_2\text{O}$  ed HCl concentrato, ad una temperatura di  $-2^\circ\text{C}$ , sotto agitazione e.m. per 30', al fine di ottenere il sale di diazonio. Tale intermedio non viene isolato, ma fatto reagire con  $\text{NaN}_3$  in  $\text{H}_2\text{O}$  e ghiaccio, poi solo  $\text{H}_2\text{O}$  per 12h, fornendo gli intermedi azidici **1r-1s**. Le azidi **1r-1s** vengono trattate con gli alchini terminali selezionati per la sintesi dei derivati della prima serie, nelle condizioni sopra descritte, portando a composti finali **21, 23, 31-37**.



**Schema 4-** Reagenti e condizioni: (i) 2-bromoacetil bromuro, toluene, 4h, 110°; (ii) NaN<sub>3</sub>, EtOH, a refluxo per 2h e 30'; (iii) CuSO<sub>4</sub>, Sodio L-ascorbato, H<sub>2</sub>O:tBuOH 1:1 (v/v), 48h.



**Schema 5-** Reagenti e condizioni: (i) NaNO<sub>2</sub>, HCl conc, -2°C, 30'; (ii) NaN<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, ghiaccio, 12h; (iii) CuSO<sub>4</sub>, Sodio L-ascorbato, H<sub>2</sub>O:tBuOH 1:1 (v/v), 48h.

### 3.1.1.5 DERIVATI PEPTIDICI

I peptidi I-XX sono stati sintetizzati attraverso la sintesi in fase solida via Fmoc, in un reattore manuale in vetro e mediante passaggi consecutivi. Per ciascun peptide sono stati utilizzati 0.5 g di resina Rink amide MBHA (grado di sostituzione 0.8 mmol/g), precedentemente rigonfiati in DMF per 1h. Ciascun Fmoc-aminoacido è stato aggiunto in un eccesso di 3 equivalenti, via TBTU/HOBt/DIPEA, fatta eccezione per il primo aminoacido, che è stato aggiunto in un eccesso di 5 equivalenti via DIPCDI/HOBt. Il gruppo N<sup>α</sup>-Fmoc è stato rimosso mediante trattamento del peptide legato alla resina con una soluzione al 25% di piperidina in DMF (45 minuti). Il peptide è stato quindi lavato più volte con DMF (3x50 mL) prima di iniziare il successivo *step* di *coupling* ed il procedimento è stato condotto fino alla completezza della sintesi. L'ultimo aminoacido, Miristoil-Gly-OH, precedentemente sintetizzato mediante reazione tra l'acido miristico e l'H-Gly-OMe via DCC/HOBt in DMF e successiva saponificazione con NaOH 1N, è stato aggiunto come residuo N-terminale, in un eccesso di 5 equivalenti, via TBTU/HOBt/DIPEA, utilizzando una miscela DCM/NMP (50/50 v/v) come solvente di reazione. Le sequenze aminoacidiche sono state così assemblate alternando cicli di deprotezione e cicli di accoppiamento. Il *Kaiser test* è stato effettuato dopo ogni accoppiamento, per determinarne la completezza, e dopo ogni deprotezione, per verificare la totale rimozione del gruppo protettore N<sup>α</sup>-Fmoc. Il *capping* dei gruppi amminici è stato effettuato usando una soluzione al 20% di anidride acetica in DMF dopo ogni ciclo di accoppiamento. Tutti gli *step* sintetici sono stati eseguiti utilizzando una corrente di azoto per agitare la miscela di reazione e per evitare l'ossidazione del residuo di Met, qualora presente nelle sequenze aminoacidiche assemblate. Dopo

aver completato la sintesi, il peptide legato alla resina è stato lavato con DMF (3x30 mL), poi con DCM (4x30 mL) e seccato sotto vuoto. Il distacco di ciascun peptide dalla resina e la deprotezione delle catene laterali degli aminoacidi sono avvenuti mediante trattamento con una miscela di TFA/DCM/TIS/anisolo (90/5/3/2 v/v) per 2h a temperatura ambiente, in atmosfera di azoto. La resina è stata rimossa dalla soluzione mediante filtrazione e il peptide grezzo è stato recuperato attraverso precipitazione in etere etilico a freddo ottenendo un precipitato bianco.

### 3.1.2 PROCEDIMENTI SPERIMENTALI DELLE SINTESI

#### 3.1.2.1 DERIVATI A NUCLEO IDROSSIALCHIL-PIRROLIDIN-CARBOSSAMIDICO

##### 3.1.2.1.1 Sintesi di *tert*-butil 2-(4-clorofenilcarbamoil)pirrolidin-1-carbossilato (1a)

In un pallone a due colli da 100 mL è stata posta la Boc-Pro-OH (1 mmol), sciolta in DMF anidra (15 mL); sono stati aggiunti il TBTU (1.1 mmol), l'HOBt (1.1 mmol), la DIPEA (1.1 mmol) e la *p*-cloro-anilina (1 mmol). La miscela di reazione è stata agitata per 12h a temperatura ambiente. Dopo aver allontanato la DMF sotto vuoto, il residuo è stato ripreso con acetato di etile ed estratto con acido citrico al 10%, NaHCO<sub>3</sub> al 5% e soluzione satura di NaCl. La fase organica è stata anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrata e portata a secco. Il residuo è stato purificato su colonna di gel di silice impiegando come eluente una miscela DCM/MeOH (9.5/0.5 v/v). La cristallizzazione con etere etilico ha fornito il prodotto desiderato **1a** con una resa del 55%.

Usando la procedura descritta per la preparazione di **1a**, gli intermedi **1b-1g** sono stati ottenuti a partire da  $\alpha$ -naftilammina (**1b**), 2-amminobifenile (**1c**), 4-amminobifenile (**1d**), 4-esil-anilina (**1e**), 4-eptil-anilina (**1f**) e 4-octil-anilina (**1g**) con rese variabili dal 42 al 62%.

##### 3.1.2.1.2 Sintesi di N-(4-clorofenil)pirrolidin-2-carbossammide (2a)

Il prodotto **1a** è stato disciolto in 10 mL di TFA al 40% in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e la miscela è stata tenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 2 ore. Dopo evaporazione

del solvente, il prodotto desiderato **2a** è stato ottenuto come solido bianco mediante precipitazione con etere dietilico (resa 85%).

Usando la procedura descritta per la preparazione di **2a**, gli intermedi **2b-2g** sono stati ottenuti a partire dai composti **1b-1g** con rese variabili dal 72 all'81%.

### **3.1.2.1.3 Sintesi di N-(4-clorofenil)-1-(2-idrossietil)pirrolidin-2-carbossammide (1) e di N-(4-clorofenil)-1-(3-idrossipropil)pirrolidin-2-carbossammide (8)**

In un pallone a due colli, munito di trappola al  $\text{CaCl}_2$ , è stato posto il 2-bromoetanolo (1 mmol), per il composto **1**, e il 3-bromo-1-propanolo (1 mmol), per il composto **8**, disciolto in 15 mL di DMF, in presenza di NaI (1.5 mmol); la miscela di reazione è stata lasciata a ricadere, sotto agitazione elettromagnetica per 30 minuti.

Successivamente è stata aggiunta una miscela costituita dall'intermedio **2a** (1 mmol) e  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1.5 mmol) in 10 mL di DMF, goccia a goccia tramite imbuto gocciolatore; la reazione è stata tenuta sotto agitazione per 12h. Trascorso questo tempo è stato allontanato il  $\text{K}_2\text{CO}_3$  mediante filtrazione ed il solvente è stato evaporato sotto vuoto. Il residuo ottenuto è stato disciolto in etile acetato e la soluzione è stata estratta con acqua satura di NaCl. La fase organica è stata poi anidrificata con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrata ed evaporata sotto vuoto, per ottenere un residuo oleoso.

Tale residuo è stato purificato mediante cromatografia su colonna di gel di silice impiegando una miscela eluente di DCM/MeOH (9.5/0.5 v/v) ottenendo i prodotti finali puri **1** e **8**, come olio, con resa rispettivamente del 35% e del 38%.

Usando la procedura descritta per la preparazione di **1** e **8**, i prodotti finali **2-7** e **9-14** sono stati ottenuti a partire dagli intermedi **2b-2g** con rese variabili dal 32 al 51% per la serie idrossietilica e dal 41 al 50% per la serie idrossipropilica.

### 3.1.2.2 DERIVATI A NUCLEO 1,2,4-(3-FENIL)OSSADIAZOLICO

#### 3.1.2.2.1 Sintesi di N'-idrossibenzimidamide (**h**)

In un pallone a due colli da 100 mL è stato posto il benzonitrile (1 mmol) in etanolo (30 mL). La miscela di reazione è stata lasciata a ricadere, sotto agitazione elettromagnetica, per 10 minuti. Successivamente è stata aggiunta una soluzione di idrossilamina cloridrato (6 mmol) in 10 mL di H<sub>2</sub>O, goccia a goccia tramite imbuto gocciolatore. Terminata l'aggiunta, è stato addizionato l'NaHCO<sub>3</sub> (4 mmol); la miscela di reazione è stata agitata per 3h a 90°C. Dopo evaporazione del solvente, il residuo è stato ripreso con CHCl<sub>3</sub>, estratto con H<sub>2</sub>O e con una soluzione satura di NaCl. La fase organica è stata anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrata e portata a secco. La cristallizzazione con etere etilico ha fornito il prodotto desiderato **h** con una resa del 51%.

#### 3.1.2.2.2 Sintesi di *tert*-butil 2-(3-fenil-1,2,4-ossadiazol-5-il)pirrolidin-1-carbossilato (**i**)

In un pallone a due colli da 100 mL viene posta la Boc-Pro-OH (1 mmol) in 10 mL di DMF, sotto agitazione elettromagnetica, a temperatura ambiente; alla soluzione ottenuta vengono aggiunti HOBt (1,1 mmol) e WSCD·HCl (1,1 mmol). La miscela di reazione viene agitata per 20 minuti a temperatura ambiente. Trascorso questo tempo, viene aggiunto il reattivo **h** (1,1 mmol) e si lascia andare la reazione sotto agitazione per 30 minuti. Si riscalda, quindi, fino alla temperatura di ebollizione del solvente, per 12h. Dopo aver allontanato la DMF sotto vuoto, il residuo è stato ripreso con acetato di etile ed estratto con H<sub>2</sub>O satura di NaCl. La fase organica è stata anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrata e portata a secco. Il prodotto desiderato **i** viene ottenuto con una resa del 65%.

### **3.1.2.2.3 Sintesi di 5-(1-(2-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)etil)-3-fenil-1,2,4-ossadiazolo (17)**

Il derivato **17** viene ottenuto seguendo la procedura illustrata per l'intermedio **i**. Il prodotto grezzo è stato purificato su colonna di gel di silice, impiegando come eluente dapprima una miscela etere dietilico/esano (6/4 v/v) e poi una miscela etere dietilico/esano (7/3 v/v). La cristallizzazione con etere etilico ha fornito il prodotto desiderato **17**, con una resa del 65%.

### **3.1.2.2.4 Sintesi di 3-fenil-5-(pirrolidin-2-il)-1,2,4-ossadiazolo (I)**

Usando la procedura descritta per la preparazione di **2a** (schema 1), l'intermedio **I** è stato ottenuto con una resa del 50%.

### **3.1.2.2.5 Sintesi di 2-[2-(3-fenil-1,2,4-ossadiazol-5-il)pirrolidin-1-il]etanolo (15) e di 3-[2-(3-fenil-1,2,4-ossadiazol-5-il)pirrolidin-1-il]propan-1-olo (16)**

I derivati **15** e **16** sono ottenuti come olio, secondo la procedura precedentemente illustrata per la sintesi dei composti **1** e **8** (schema 1), con resa rispettivamente del 33% e del 51%.

### **3.1.2.3 DERIVATI A NUCLEO IDROSSIPIRROLIDIN-CARBOSSAMIDICO**

#### **3.1.2.3.1 Sintesi di (9H-fluoren-9-il)metil 4-*tert*-butossi-2-(4-octilfenilcarbamoil)pirrolidin-1-carbossilato (m)**

L'intermedio **m** preposto alla sintesi dei composti **18** e **19** è stato ottenuto seguendo la procedura descritta per la preparazione dell'intermedio **1a** (schema 1), con una resa del 70%.

#### **3.1.2.3.2 Sintesi di 4-*tert*-butossi-N-(4-octilfenil)pirrolidin-2-carbossamide (n)**

Il prodotto **m** è stato disciolto in 6 mL di DIEA al 33% in THF, e la miscela è stata tenuta sotto agitazione elettromagnetica, a temperatura ambiente per 2h. Dopo evaporazione del solvente, il residuo è stato purificato su colonna di gel di silice, impiegando come eluente una miscela etere dietilico/etanolo (9,5:0,5 v/v). Viene ottenuto il composto desiderato **n**, con una resa del 65%.

#### **3.1.2.3.3 Sintesi di 4-idrossi-N-(4-octilfenil)pirrolidin-2-carbossamide (18)**

Il prodotto **n** è stato disciolto in 7 mL di TFA al 50% in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, e la miscela è stata tenuta sotto agitazione elettromagnetica, a temperatura ambiente, per 3h. Dopo evaporazione del solvente, si aggiunge H<sub>2</sub>O e si liofilizza. Il liofilizzato viene poi purificato su colonna di gel di silice, utilizzando come mix eluente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH (9:1 v/v), ottenendo il prodotto finale puro, con una resa del 65%.

#### **3.1.2.3.4 Sintesi di 4-*tert*-butossi-1-(2-idrossietil)-N-(4-octilfenil)pirrolidin-2-carbossamide (o)**

L'intermedio **o** viene ottenuto come olio, secondo la procedura precedentemente descritta per la sintesi dei composti **1** e **8** (schema 1), con resa del 72%.

#### **3.1.2.3.5 Sintesi di 4-idrossi-1-(2-idrossietil)-N-(4-octilfenil)pirrolidin-2-carbossamide (19)**

Usando la procedura descritta per la preparazione di **18**, è stato ottenuto il prodotto finale **19** a partire dall'intermedio **o**, con resa del 61%.

### 3.1.2.4 DERIVATI A NUCLEO 1,2,3-TRIAZOLICO

#### 3.1.2.4.1 Sintesi di 2-bromo-N-(4-octilfenil)acetamide (**1p**)

In un pallone a due colli da 100 mL è stata posta la 4-octil-anilina (1 mmol), sciolta in toluene (4 mL), sotto agitazione elettromagnetica. Ad essa è stato aggiunto il 2-bromoacetil bromuro (1,3 mmol), solubilizzato in 3 mL di toluene, goccia a goccia, tramite imbuto gocciolatore. Terminata l'aggiunta la miscela è stata riscaldata a 110°C e la reazione è stata lasciata andare per 4h. Trascorso questo tempo, il contenuto del pallone è stato ripreso con acetato di etile e sulla soluzione sono stati effettuati tre lavaggi con H<sub>2</sub>O satura di NaCl. La fase organica, anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, è stata filtrata e portata a secco. La cristallizzazione con etere etilico ha fornito il prodotto desiderato **1p**, con una resa dell'83%.

Usando la procedura descritta per la preparazione di **1p**, l'intermedio **1q** è stato ottenuto a partire da 4-cloro-anilina, con una resa del 97%.

#### 3.1.2.4.2 Sintesi di 2-azido-N-(4-octilfenil)acetamide (**2p**)

L'intermedio **1p** (1 mmol) viene trattato con sodio azide (1,25 mmol) in EtOH (7 mL). La miscela di reazione viene lasciata andare sotto agitazione elettromagnetica, a ricadere per 2h e 30'. Trascorso questo tempo, viene lasciata raffreddare e ad essa viene aggiunto etere (10 mL). Si è osservata la precipitazione di NaBr, che viene allontanato dalla miscela mediante filtrazione su *gooch*. Il filtrato viene portato a secco ed il residuo cristallizzato con esano, fornendo il prodotto desiderato **2p** con una resa dell'86%.

L'intermedio **2p** viene ottenuto a partire dall'**1q** secondo una procedura analoga a quella descritta per la sintesi del **2p**, con una resa del 98%.

### 3.1.2.4.3 Sintesi di 2-(4-idrossimetil-1H-1,2,3-triazol-1-il)-N-(4-octilfenil) acetamide (**20**)

In un pallone a due colli da 100 mL viene posto il reattivo **2p** (1 mmol) in presenza di solfato rameico (0,01 mmol) e sodio L-ascorbato (0,05 mmol), sciolto in 6 mL di una soluzione di H<sub>2</sub>O:tBuOH (1/1 v/v). La miscela viene tenuta a temperatura ambiente e sotto agitazione elettromagnetica. Ad essa viene poi aggiunto il 2-propin-1-ol (1 mmol) e la reazione viene lasciata andare per 48h. Si aggiungono 15 mL di H<sub>2</sub>O distillata e si lascia riposare il pallone in ghiaccio, per favorire la precipitazione del prodotto, che viene filtrato su *gooch* ed asciugato in stufa. Si ottiene in questo modo il prodotto desiderato **20**, con una resa del 75%. Il prodotto **22** viene sintetizzato a partire dall'intermedio **2q**, in maniera analoga a quanto descritto per il composto **20** (con resa del 77%). Anche i derivati **24-30** vengono ottenuti seguendo la stessa procedura, utilizzando gli opportuni alchini terminali:

- 3-butin-1-ol, per il **24** (resa dell'80%),
- 4-pentin-1-ol, per il **25** (resa dell'82%),
- 2-etinilpiridina, per il **26** (resa del 78%),
- 3-etinilpiridina, per il **27** (resa dell'85%),
- 1-etinilcicloesano, per il **28** (resa dell'83%),
- 4-etinilbenzil alcol, per il **29** (resa del 78%),
- 3-etinilfenolo, per il **30** (resa dell'83%).

#### 3.1.2.4.4 Sintesi di 1-azido-4-octilbenzene (**1r**)

In un pallone a due colli da 100 mL viene sospesa la 4-octil-anilina (1 mmol) in 1 mL di H<sub>2</sub>O e 0,370 mL di HCl concentrato. La miscela di reazione viene tenuta sotto agitazione elettromagnetica e raffreddata a -2°C. Alla sospensione viene poi aggiunta una soluzione di nitrito di sodio ( 1,04 mmol) in 1 mL di H<sub>2</sub>O, goccia a goccia tramite imbuto gocciolatore. La soluzione risultante viene agitata per 30' a -2°C. Il sale di diazonio così formatosi non viene isolato, ma la miscela di reazione viene versata in una seconda miscela di sodio azide ( 1,12 mmol) in 0,2 mL di H<sub>2</sub>O e 1,4 g di ghiaccio. E' stata osservata la formazione di un'intensa schiuma, dovuta alla liberazione di N<sub>2</sub>; per favorirne l'allontanamento, la miscela viene sottoposta ad agitazione elettromagnetica per 12h. Sulla soluzione vengono poi effettuati tre lavaggi con DCM; la fase organica viene anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e filtrata. L'evaporazione del solvente ha consentito di ottenere l'intermedio desiderato **1r**, con una resa del 68%.

Usando la procedura descritta per la preparazione di **1r**, l'intermedio **1s** è stato ottenuto a partire da 4-cloro-anilina, con una resa del 62%.

#### 3.1.2.4.5 Sintesi di (1-(4-octilfenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metanol (**21**)

Il derivato **21** viene ottenuto secondo la procedura precedentemente descitta per la sintesi del composto **20** (schema 4), con una resa dell'85%. Anche i derivati **23** e **31-37** sono stati ottenuti in maniera analoga, a partire rispettivamente dall'intermedio **1s** e **1r**, utilizzando gli alchini:

- 2-propin-1-ol, per il **23** (resa dell'80%),

- 3-butin-1-ol, per il **31** (resa del 90%),
- 4-pentin-1-ol, per il **32** (resa del 77%),
- 2-etinilpiridina, per il **33** (resa dell'83%),
- 3-etinilpiridina, per il **34** (resa dell'85%),
- 1-etinilcicloesano, per il **35** (resa del 78%),
- 4-etinilbenzilalcol, per il **36** (resa dell'87%),
- 3-etinilfenolo, per il **37** (resa del 78%).

### **3.1.3 CARATTERIZZAZIONE DEI DERIVATI 1-37**

Sia gli intermedi che i prodotti finali sono stati caratterizzati mediante spettroscopia  $^1\text{H-NMR}$  e  $^{13}\text{C-NMR}$ . Gli spettri NMR sono stati registrati su un apparecchio Varian Mercury Plus 400 MHz e utilizzando come solvente  $\text{CDCl}_3$  e, ove necessario, DMSO. I dati ottenuti sono tutti consistenti con le strutture proposte. Per i prodotti finali, inoltre, è stata effettuata l'analisi ESI-MS, mediante uno spettrometro di massa API2000, ESI-triplo quadrupolo.

### 3.1.4 PURIFICAZIONE DEI DERIVATI PEPTIDICI I-XX

La purificazione di tutti i peptidi sintetizzati è stata condotta mediante RP-HPLC preparativo su una colonna Vydac C18 (15-20  $\mu\text{m}$ , 22  $\times$  250 mm) ed impiegando come eluenti: A, 0.1% TFA in acqua e B, 0.1% TFA in acetonitrile. L'analisi è stata condotta mediante un gradiente lineare dal 30 al 60% di B in 50 minuti, flusso 30 mL/min. L'omogeneità dei prodotti è stata accertata con HPLC analitico a fase inversa utilizzando una colonna Macherey-Nagel Nucleosil 100-5 C18 (5  $\mu\text{m}$ , 4  $\times$  125 mm), con un gradiente lineare da 30% al 60% di B in 20 min, rivelatore UV a 220 nm, velocità di flusso 1 mL/min. I prodotti così purificati sono stati, quindi, liofilizzati e caratterizzati mediante spettrometria di massa. I risultati della caratterizzazione chimico-fisica dei peptidi **I-XX** sono riassunti nelle tabelle 7-8.

**Tabella 7.** Sequenze, analisi MS e HPLC di **I** e dei peptidi ottenibili mediante Ala-scan.

COMPOSTO	SEQUENZA	PM		$t_R$ (min)
		calc	sper	
<b>I</b>	Mir-GMRPYDANKR-NH <sub>2</sub>	1416.7	1416.9	13.15
<b>II</b>	Mir-AMRPYDANKR-NH <sub>2</sub>	1430.8	1431.3	14.96
<b>III</b>	Mir-GARPYDANKR-NH <sub>2</sub>	1356.6	1356.8	12.59
<b>IV</b>	Mir-GMAPYDANKR-NH <sub>2</sub>	1331.6	1332.1	15.86
<b>V</b>	Mir-GMRAYDANKR-NH <sub>2</sub>	1390.7	1391.1	13.90
<b>VI</b>	Mir-GMRPADANKR-NH <sub>2</sub>	1324.6	1324.8	12.98
<b>VII</b>	Mir-GMRPYAANKR-NH <sub>2</sub>	1372.7	1373.0	13.58
<b>VIII</b>	Mir-GMRPYDAAKR-NH <sub>2</sub>	1373.7	1373.9	13.90
<b>IX</b>	Mir-GMRPYDANAR-NH <sub>2</sub>	1359.6	1359.8	15.21
<b>X</b>	Mir-GMRPYDANKA-NH <sub>2</sub>	1331.6	1332.1	14.89

**Tabella 8.** Sequenze, analisi MS e HPLC di **I** e dei peptidi ottenibili mediante delezione N- e C-terminale.

COMPOSTO	SEQUENZA	PM		t <sub>R</sub> (min)
		calc	sper	
<b>I</b>	Mir-GMRPYDANKR-NH <sub>2</sub>			
<b>XI</b>	Mir-G--RPYDANKR-NH <sub>2</sub>	1285.4	1285.3	15.25
<b>XII</b>	Mir-G---PYDANKR-NH <sub>2</sub>	1129.2	1129.6	17.25
<b>XIII</b>	Mir-G-----YDANKR-NH <sub>2</sub>	1032.0	1032.2	16.55
<b>XIV</b>	Mir-G-----DANKR-NH <sub>2</sub>	868.9	869.3	15.11
<b>XV</b>	Mir-GMRPYDANK---NH <sub>2</sub>	1260.5	1260.5	24.77
<b>XVI</b>	Mir-G—RPYDAN-----NH <sub>2</sub>	1001.2	1002.0	18.47
<b>XVII</b>	Mir-G—RPYDA-----NH <sub>2</sub>	887.1	887.6	18.80
<b>XVIII</b>	Mir-G—RPYD-----NH <sub>2</sub>	816.0	816.4	19.37
<b>XIX</b>	Mir-G—RPY-----NH <sub>2</sub>	700.9	701.2	20.91
<b>XX</b>	Mir-G----PYDAN-----NH <sub>2</sub>	844.9	845.3	20.74

## **3.2 SPERIMENTAZIONE FARMACOLOGICA**

I composti oggetto del mio lavoro di tesi sono saggiati in vitro su preparati vascolari di aorta di topo (composti **1-37** e peptidi **I-XX**) e su fibroblasti murini (peptidi **I** e **XVI**) dal gruppo di ricerca diretto dal Prof. G. Cirino del Dipartimento di Farmacia dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II".

### **3.2.1 PREPARAZIONE DEL TESSUTO**

Topi maschi Swiss (Harlan 25-30 g) di 8-10 settimane sono stati sacrificati con CO<sub>2</sub>. Dopo apertura della gabbia toracica si è proceduto all'espianco dell'aorta a partire dall'arco aortico. Il vaso è stato poi rapidamente pulito dai tessuti connettivo ed adiposo circostanti e sezionato in anelli di 1-1.5 mm di lunghezza. Gli anelli così ottenuti sono stati montati in bagnetti per organi isolati, connessi ad un trasduttore di forza isometrico, in una soluzione di Krebs ossigenata (O<sub>2</sub> 95% - CO<sub>2</sub> 5%) e termostata a 37°C. La composizione della soluzione di Krebs è la seguente (in mM): NaCl 118.2, KCl 4.7, MgCl<sub>2</sub> 1.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, CaCl<sub>2</sub> 2.5, NaHCO<sub>3</sub> 25.0 e glucosio 10.0.

Gli anelli sono stati inizialmente portati ad una tensione di 1.5 g e lasciati stabilizzare per circa un'ora, durante la quale la tensione è riportata sempre al valore di 1.5 g. Periodicamente si è provveduto a cambiare la soluzione in cui gli anelli erano immersi.

### **3.2.2 PROTOCOLLO SPERIMENTALE SUL TESSUTO AORTICO DI TOPO**

All'inizio di ogni esperimento si è proceduto alla standardizzazione: gli anelli sono stati stimolati con fenilefrina (PE) 3 µM, concentrazione definita di

“risveglio”. Tale stimolo è stato ripetuto alla concentrazione di 1  $\mu\text{M}$  finché non sono state ottenute contrazioni di analoga intensità. Per verificare l'integrità dell'endotelio, è stata effettuata una curva concentrazione-effetto di acetilcolina (ACh 10 nM - 30  $\mu\text{M}$ ) su anelli precontratti con PE 1  $\mu\text{M}$ . Gli anelli di aorta il cui rilassamento era inferiore all'80% sono stati scartati.

### 3.2.3 SAGGIO DI PROLIFERAZIONE SU FIBROBLASTI MURINI

Per valutare la proliferazione dei fibroblasti in vitro, è stato utilizzato il saggio colorimetrico con il bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), basato sulla capacità delle cellule vive di ridurre l'MTT, di colore giallo, a formazano, di colore blu. Esperimenti preliminari hanno consentito di valutare l'esistenza di una relazione lineare tra il numero dei fibroblasti e l'assorbanza (570 nm), per cui tale saggio risulta affidabile per la valutazione della proliferazione cellulare. In ciascun gruppo di studio le cellule sono state suddivise in piastre a 96 pozzetti caricate con  $5 \times 10^6$  cellule per pozzetto nel terreno di coltura RPMI contenente streptomicina/penicillina (1%), piruvato di sodio (0,1%), HEPES (0,1%) e siero fetale di vitello (10%). Ai campioni in coltura è stato aggiunto il composto **I** (1 $\mu\text{M}$ ) sia in presenza che in assenza del composto **XVI**, in un volume finale di 150 $\mu\text{l}$  per 24 h in un incubatore (37°C, 5%  $\text{CO}_2$  + 95% aria). Nelle ultime 4 h di incubazione, sono stati aggiunti a ciascun pozzetto 25  $\mu\text{l}$  di MTT. Questo *step* è stato seguito dall'aggiunta di *lysis buffer* (100  $\mu\text{l}$  per pozzetto) per 2 h, per permettere la completa solubilizzazione del formazano (le piastre sono state conservate al buio). È stata poi misurata l'assorbanza dei campioni utilizzando uno spettrofotometro impostato ad una lunghezza d'onda di 570 nm.

### 3.3 ANALISI COMPUTAZIONALE (DERIVATI PEPTIDICI I-XX)

L'analisi computazionale è stata condotta dal gruppo del prof. Benfenati, presso l'Istituto di Ricerca Mario Negri di Milano.

Sono stati disegnati N-acetil peptidi, corrispondenti ai composti I-XX, utilizzando il programma Marvin Sketch v5.10 ed in seguito sono stati ricercati i conformeri a più bassa energia all'interno del campo di forza MMFF94.

La visualizzazione e l'allineamento dei conformeri sono stati eseguiti con UCSF Chimera v1.7; il *docking* molecolare è stato fatto con Autodock v4.2, utilizzando il seguente protocollo:

- Algoritmo genetico (GA)
- Numero di corse GA: 50
- Dimensione della popolazione: 150
- Numero massimo di valutazioni: *medium* (2500000)
- Altri parametri settati con i loro valori di *default*

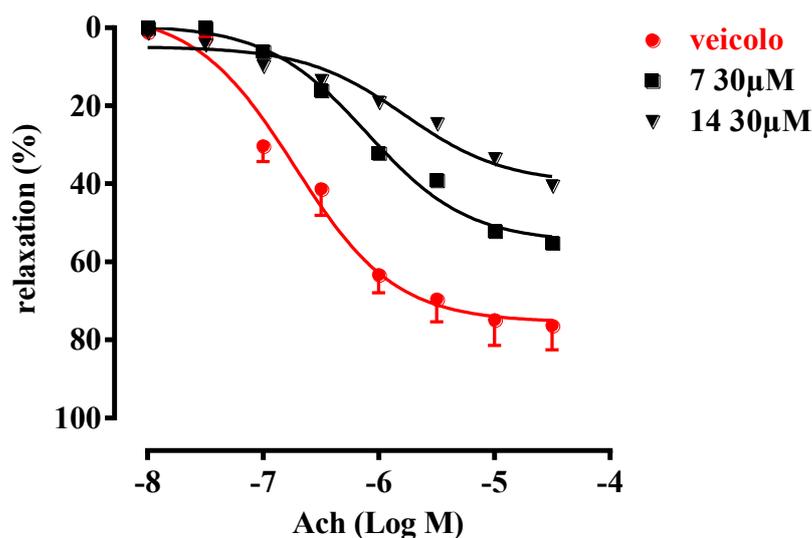
Per indirizzare i ligandi nell'ipotetico sito di legame, è stato utilizzato il programma Autogrid 4, selezionando i parametri che seguono:

- Numero di punti sull'asse x: 48
- Numero di punti sull'asse y: 50
- Numero di punti sull'asse z: 38
- Spaziatura: 0.375 (*default*)
- Centro della griglia tridimensionale (x, y, z): 8.075, 32.02, 24.586

## **4. RISULTATI E DISCUSSIONI**

#### 4.1 DERIVATI ETEROCICLICI 1-37

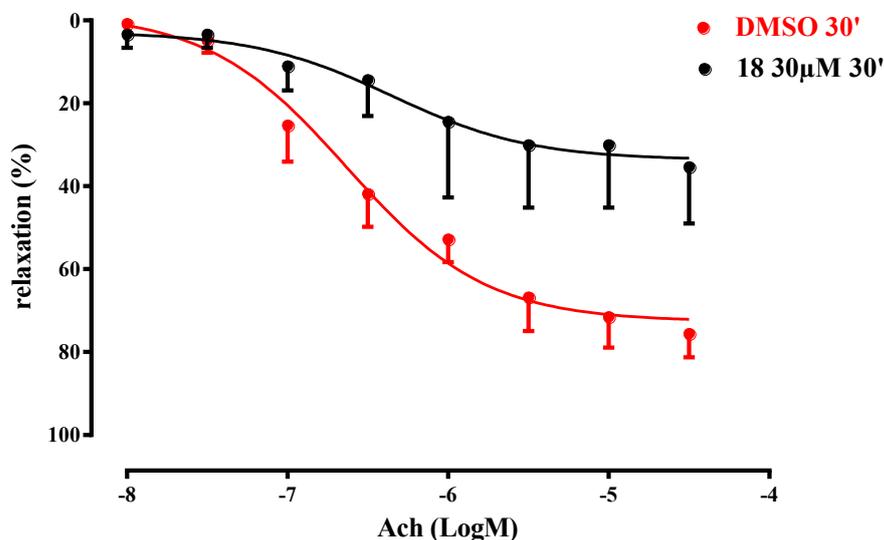
L'effetto inibitorio dei composti sintetizzati nei confronti delle SphKs è stato determinato valutando la loro capacità di interferire sul rilassamento degli anelli di aorta indotto dall'acetilcolina. Il tessuto, opportunamente preparato, è stato incubato con i composti da saggiare, contratto con PE 1  $\mu\text{M}$  e, raggiunto il *plateau*, è stata effettuata una curva cumulativa concentrazione-risposta ( $10^{-8}$ - $10^{-5}$  M) con acetilcolina. I risultati ottenuti vengono mostrati in forma grafica nella figure 10-15 dove, sull'asse delle ascisse, è riportata la concentrazione di Ach espressa sotto forma di Log M e, sull'asse delle ordinate, la percentuale di rilassamento indotto. Per i derivati a nucleo idrossialchil-pirrolidin-carbossamidico (1-14, tabella 1), solo il composto 7, 1-(2-idrossietil)-N-(4-octilfenil)pirrolidin-2-carbossamide, ed il composto 14, 1-(3-idrossipropil)-N-(4-octilfenil)pirrolidin-2-carbossamide, hanno mostrato attività inibitoria nei confronti delle due isoforme enzimatiche di sfingosina chinasi (figura 10).



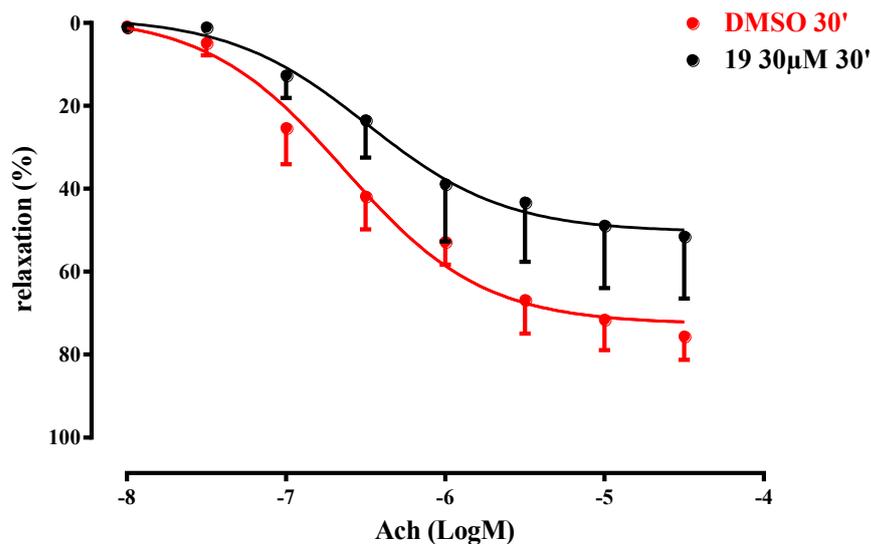
**Figura 10.** Effetto dei composti 7 e 14 sul rilassamento degli anelli di aorta Ach-indotto.

Per quanto riguarda i derivati a nucleo 1,2,4-(3-fenil)ossadiazolico (**15-17**, tabella 2), l'anello ossadiazolico, requisito chimico presente in alcune delle molecole riportate in letteratura come inibitori delle sfingochinasi, unito agli elementi strutturali selezionati, non ha prodotto l'attività desiderata in quanto i composti sintetizzati sono risultati inattivi (dati non mostrati).

In merito ai derivati a nucleo idrossipirrolidin-carbossamidico (**18-19**, tabella 3), il composto **18**, 4-idrossi-N-(4-octilfenil)pirrolidin-2-carbossamide, ha mostrato attività inibitoria nei confronti delle SphKs (figura 11). Invece il composto **19**, che si differenzia dal **18** in quanto presenta una catena idrossietilica sull'azoto secondario dello *scaffold* idrossipirrolidinico, conserva l'attività inibitoria ma mostra una minore potenza rispetto all'omologo (figura 12).

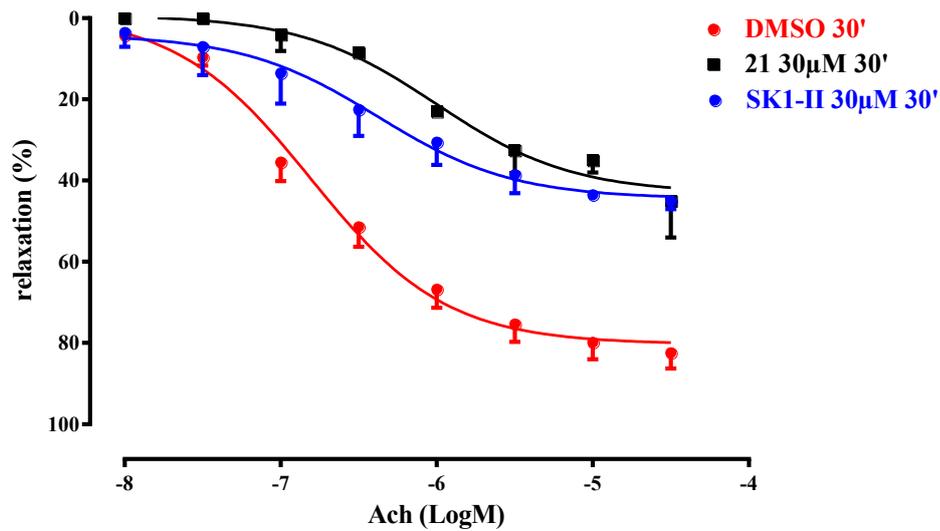


**Figura 11.** Effetto del composto **18** sul rilassamento degli anelli di aorta Ach-indotto.

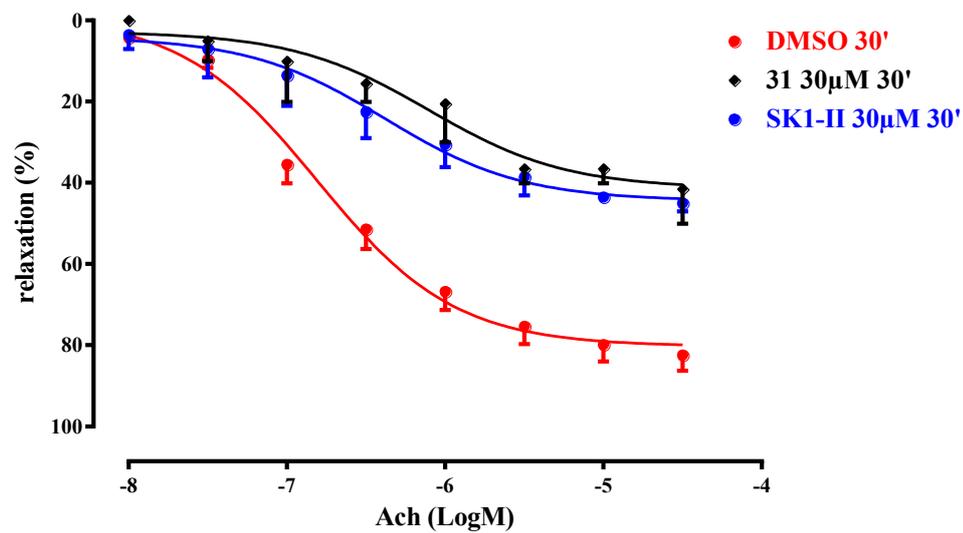


**Figura 12.** Effetto del composto **19** sul rilassamento degli anelli di aorta Ach-indotto.

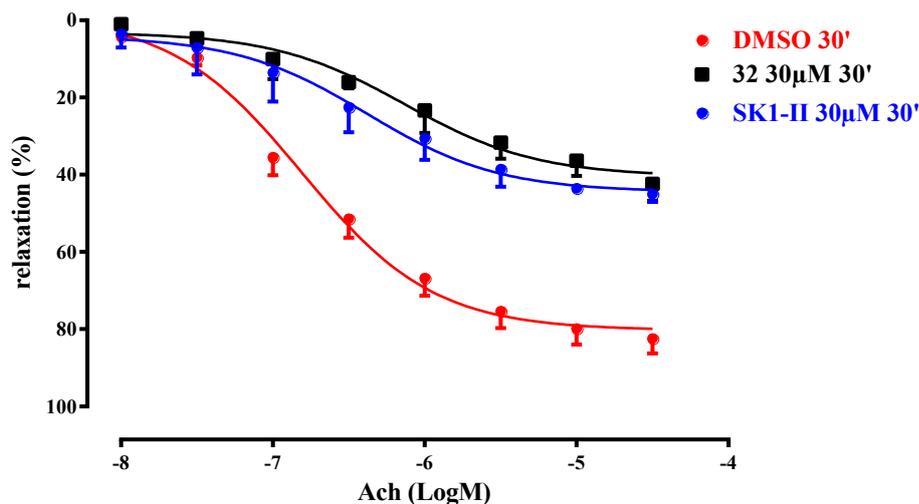
Per i derivati a nucleo 1,2,3-triazolico (**20-37**, tabella 4), solo i composti **21**, 1-(4-octilfenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il metanolo (figura 13), **31**, 2-(1-(4-octilfenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)etanolo (figura 14) e **32**, 3-(1-(4-octilfenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)propan-1-olo (figura 15), sono risultati in grado di inibire le due isoforme di sfingosina chinasi. Il composto **34**, 3-(1-(4-octilfenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)piridina, non è stato saggiato in quanto, alla più bassa concentrazione testata (10 µM) non è risultato solubile nel veicolo (DMSO).



**Figura 13.** Effetto del composto 21 sul rilassamento degli anelli di aorta Ach-indotto.



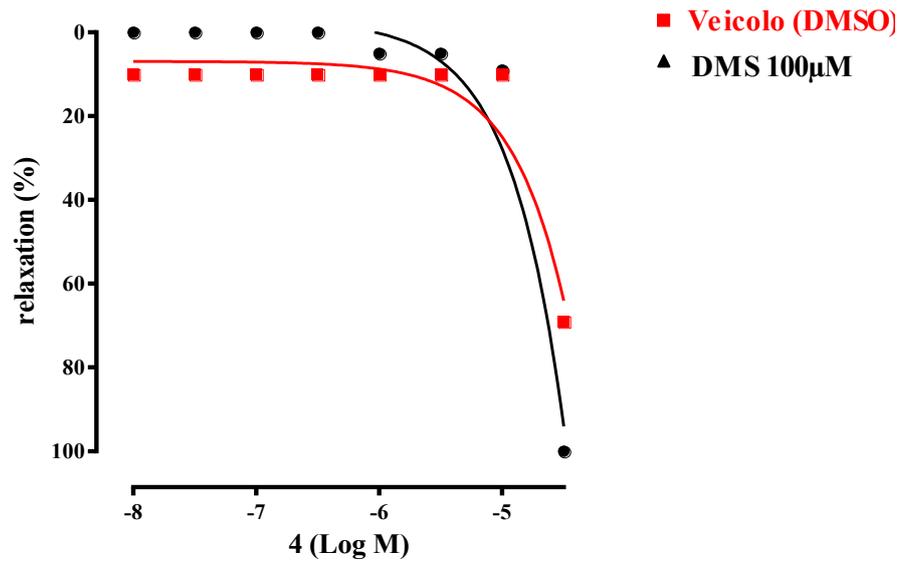
**Figura 14.** Effetto del composto 31 sul rilassamento degli anelli di aorta Ach-indotto.



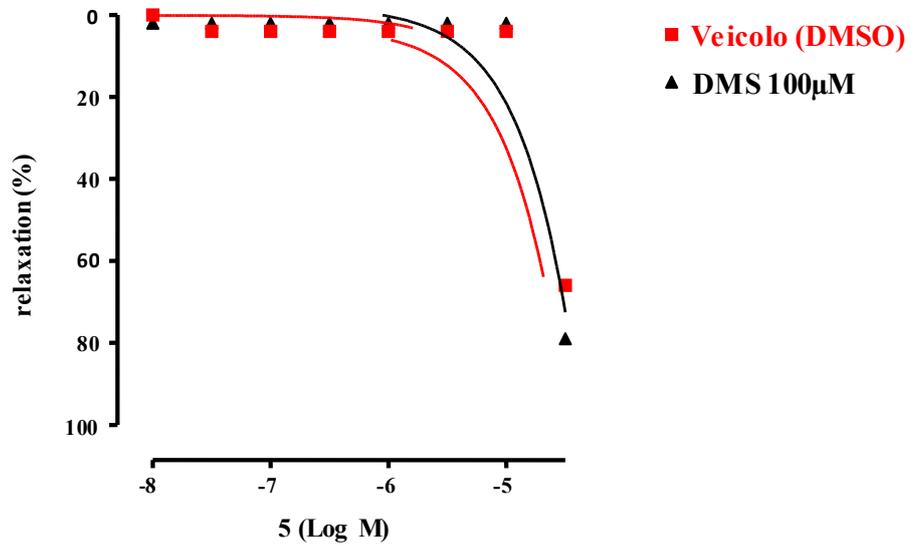
**Figura 15.** Effetto del composto **32** sul rilassamento degli anelli di aorta Ach-indotto.

Tra tutti i derivati sintetizzati, degno di nota risulta il profilo farmacologico del composto **4**, N-(1,1'-bifenil-4-il)-1-(2-idrossietil)pirrolidin-2-carbossamide, e del composto **5**, N-(4-esilfenil)-1-(2-idrossietil)pirrolidin-2-carbossamide. Il primo, infatti, una volta incubato, non induce più la contrazione alla PE, in quanto prevale il suo effetto vasodilatante; il secondo, a sua volta, anziché ridurre la vasodilatazione acetilcolina-indotta, la potenzia (dati non mostrati).

Ciò ha suggerito che queste due molecole potessero fungere da substrato delle chinasi, subendo una fosforilazione sul gruppo alcolico che le rendesse capaci di legare i recettori della S1P presenti a livello del letto vascolare. Al fine di verificare tale ipotesi, sui prodotti suddetti è stato condotto un secondo saggio in presenza di un inibitore noto delle sfingosina chinasi, la DMS (figure 16-17).



**Figura 16.** Valutazione dell'effetto vasodilatante di **4** in presenza di DMS.



**Figura 17.** Valutazione dell'effetto vasodilatante di **5** in presenza di DMS.

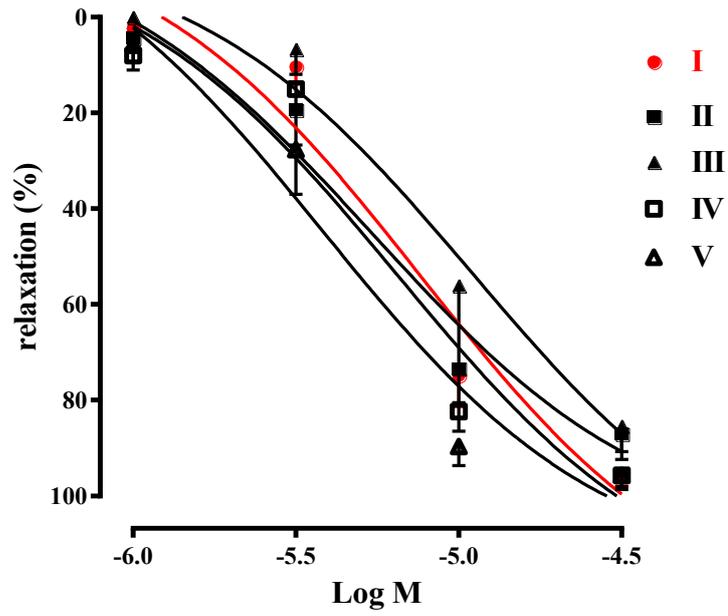
I risultati ottenuti dimostrano che l'attività vasodilatatoria viene conservata anche in presenza di inibitore e ciò permette di fare due ipotesi che necessitano di conferme sperimentali:

1. l'attività vasodilatatoria può essere dovuta all'azione agonista dei composti sui recettori della S1P, che si manifesta anche in assenza di fosforilazione (in letteratura sono riportati esempi di agonisti pieni che non richiedono la fosforilazione in vivo in quanto vanno ad interagire con una tasca accessoria presente nella struttura tridimensionale del recettore);
2. l'attività vasodilatatoria potrebbe essere dovuta all'interazione con un altro *target* recettoriale non noto.

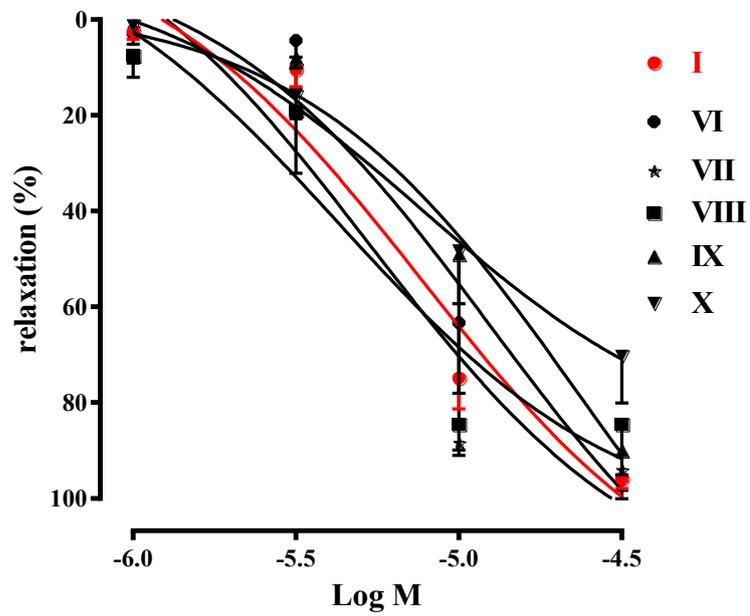
## 4.2 DERIVATI PEPTIDICI I-XX

L'attività dei peptidi sintetizzati **I-XX** è stata valutata costruendo una curva cumulativa dose-effetto ( $10^{-6}$  -  $3 \times 10^{-5}$  M) con tali composti su anelli di aorta di topo precontratti con PE ( $10^{-6}$  M). I risultati ottenuti sono riportati in forma grafica nelle figure 18-22, dove sull'asse delle ascisse è riportata la concentrazione dei derivati saggati espressa sotto forma di logM e, sull'asse delle ordinate, la percentuale di rilassamento indotto.

Come precedentemente detto, la sistematica sostituzione di ciascun aminoacido della sequenza primaria con L-Ala consente di ricavare informazioni circa l'importanza dei singoli residui aminoacidici nell'interazione recettoriale. Tenendo conto che la somministrazione della pepducina di partenza **I** induce una vasodilatazione concentrazione-dipendente, dai grafici (figure 18-19) si può dedurre che gli analoghi di **I** L-Ala sostituiti, **II-X**, non hanno mostrato una significativa riduzione nella loro attività vasorilassante rispetto a **I**. Solo nel caso del peptide **X**, caratterizzato dalla sostituzione del residuo di Arg carbossi-terminale, si è osservata una piccola e poco significativa riduzione di attività.

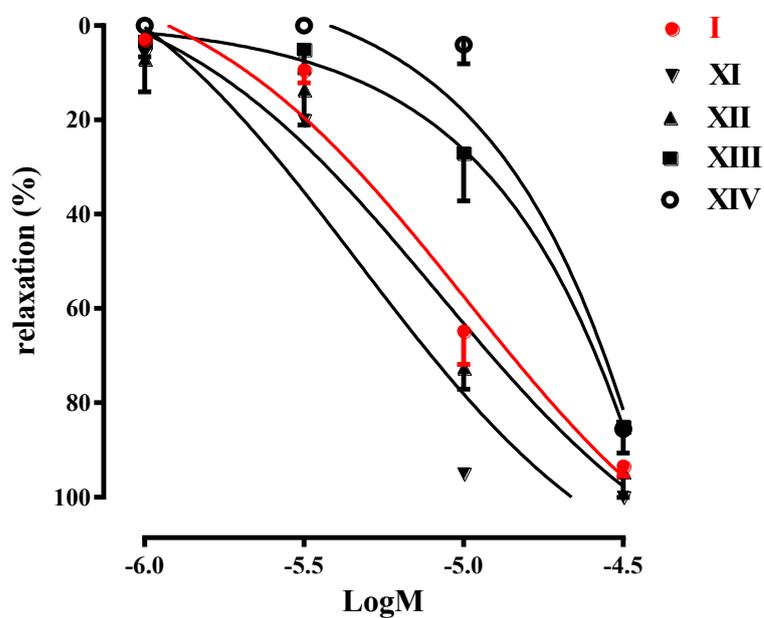


**Figura 18.** Confronto tra l'effetto di I e l'effetto dei peptidi II-V su anelli di aorta precontratti con PE.

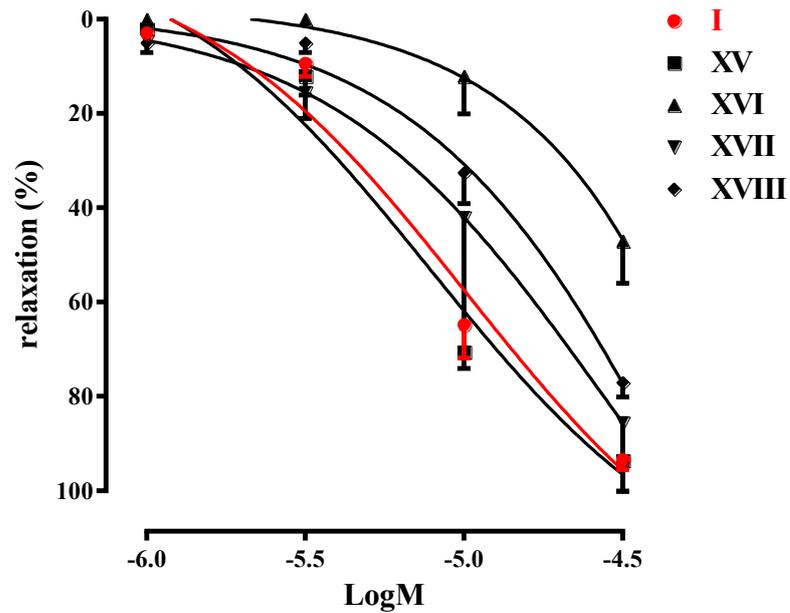


**Figura 19.** Confronto tra l'effetto di I e l'effetto dei peptidi VI-X su anelli di aorta precontratti con PE.

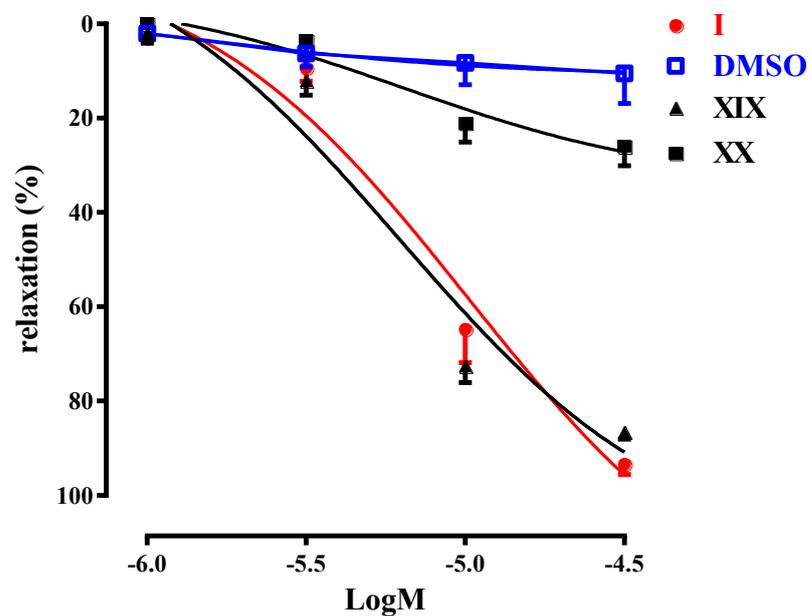
Per quanto concerne i derivati ottenuti mediante delezione N- e C-terminale (figure 20-22), solo i composti **XI**, **XII**, **XV** e **XIX** hanno mostrato un profilo di attività sovrapponibile a quello della pepducina di partenza **I**. Invece, in seguito alla somministrazione cumulativa dei composti **XIII**, **XIV**, **XVI**, **XVII** e **XVIII**, sugli anelli di aorta precontratti, si è osservata una significativa riduzione della loro attività vasorilassante.



**Figura 20.** Risultati ottenuti con i peptidi derivati dalla delezione N-terminale, **XI-XIV**.



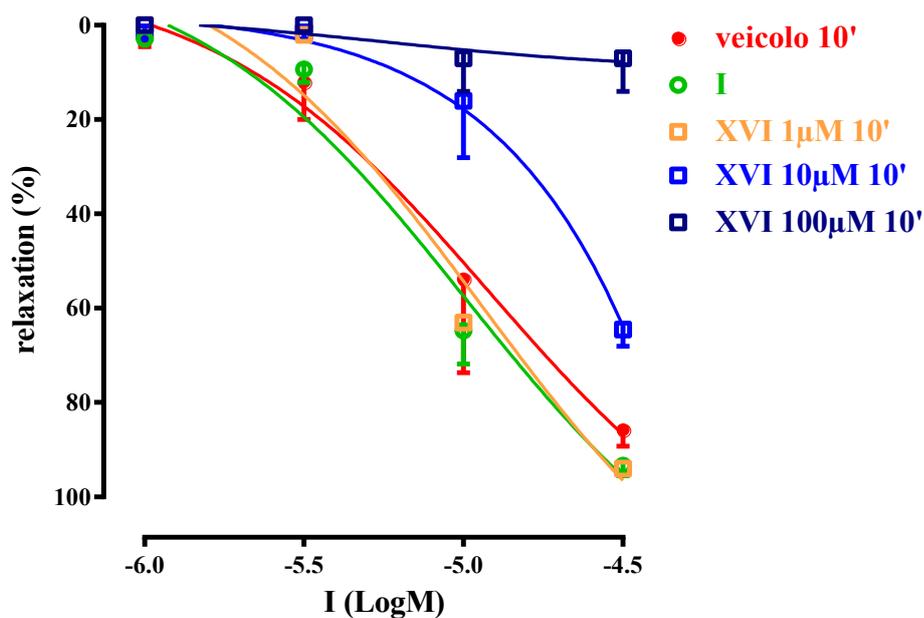
**Figura 21.** Risultati ottenuti con i peptidi derivati dalla delezione C-terminale, XV-XVII.



**Figura 22.** Risultati ottenuti con i peptidi derivati dalla delezione C-terminale, XIX-XX.

Allo scopo di verificare se queste sequenze con ridotta attività vasorilassante fossero in grado di svolgere un'azione antagonista nei confronti di S1P<sub>3</sub>, è stato testato il loro effetto sulla vasodilatazione indotta da **I**. A tale scopo gli anelli di aorta sono stati incubati per 10 minuti con i composti selezionati ed è stata costruita una curva cumulativa dose-effetto in presenza dell'agonista **I**, specifico per il sottotipo recettoriale S1P<sub>3</sub>.

I risultati ottenuti hanno mostrato che il solo composto **XVI** [61] ha la capacità di inibire completamente e in modo dose-dipendente la vasodilatazione indotta da **I** (figura 23).

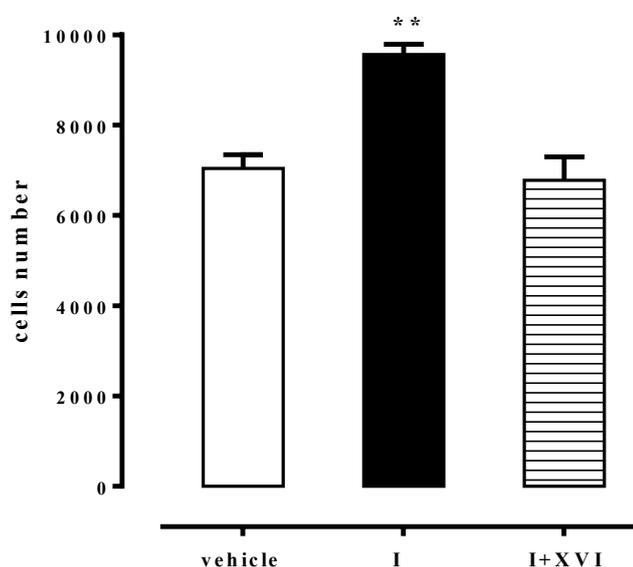


**Figura 23.** Valutazione dell'attività antagonista di **XVI**.

Anche il peptide **XVII** ha mostrato un effetto antagonista ma solo alla massima concentrazione testata (dati non mostrati).

Un risultato analogo è stato ottenuto mediante un saggio di proliferazione condotto su fibroblasti murini. La pepducina **I** aumenta in maniera dose-

dipendente la velocità di proliferazione dei fibroblasti; tale effetto viene inibito mediante un pretrattamento con il composto **XVI** (Figura 24).



**Figura 24.** Saggio di proliferazione su fibroblasti murini.

Il confronto tra le sequenze dei peptidi oggetto di questo lavoro di tesi ha permesso di fare una serie di considerazioni sulle relazioni struttura-attività.

I dati raccolti dall'Ala-scan hanno suggerito un'alta tolleranza della pepducina **I** alle sostituzioni aminoacidiche ed hanno motivato la semplificazione della sequenza nativa sia dal lato N- che C-terminale, al fine di ottenere gli oligopeptidi **XI-XX**, che consentissero di identificare i requisiti strutturali necessari all'attività agonista. Il peptide **XVI** differisce da **I** poiché manca dei residui Met<sup>2</sup>, dal lato N-terminale, e Lys<sup>9</sup>/Arg<sup>10</sup> dal lato C-terminale. Il fatto che **XI** conservi la piena azione agonista suggerisce che la presenza della metionina non è essenziale ai fini dell'interazione con il bersaglio recettoriale; tale considerazione è stata anche alla

base della scelta di sintetizzare i peptidi deleti dal lato C-terminale (**XVI-XIX**) senza metionina, in quanto quest'ultima richiedeva anche delle precauzioni maggiori nella procedura sintetica, derivanti dalla possibilità di incorrere in reazioni di ossidazione, o durante le fasi di *coupling* o durante il *cleavage*.

Un ruolo essenziale ai fini dell'attivazione del processo di *signaling* è svolto dai residui di Lys<sup>9</sup> e Arg<sup>10</sup>; la loro assenza, infatti, fa sì che il composto **XVI** conservi la capacità di legarsi al recettore ma non quella di attivarlo. Il residuo di Asn<sup>8</sup>, invece, contribuisce a rendere più stabile il legame con il bersaglio recettoriale e, infatti, il peptide **XVII** manifesta la propria azione antagonista solo alla massima concentrazione testata. Il residuo di Arg<sup>3</sup>, infine, svolge un ruolo cruciale nel riconoscimento da parte della proteina G. Ciò è dimostrato dal fatto che il peptide **XX**, che differisce da **XVI** solo per l'assenza del suddetto residuo, non presenta alcuna capacità né vasorilassante né antagonista.

Tale risultato è in apparente contrasto con i dati ottenuti dallo studio Ala-scan in cui il peptide **IV** non mostrava alcuna riduzione significativa di attività rispetto a **I**. È probabile, però, che nella sequenza decapeptidica l'assenza del residuo di Arg<sup>3</sup> sia compensata da interazioni accessorie che, invece, risultano assenti nella sequenza dei peptidi più corti, nei quali, quindi, la mancanza di questo specifico residuo determina effetti drastici sulla capacità di interazione con la proteina G.

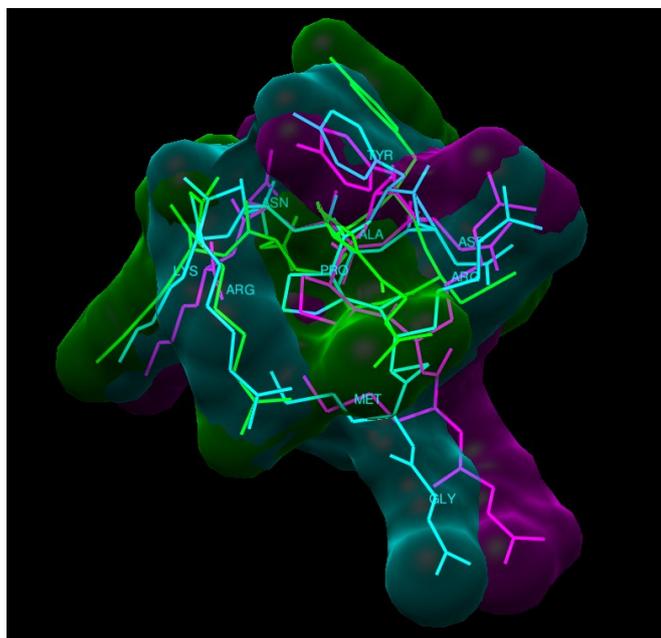
#### 4.2.1 STUDI COMPUTAZIONALI

I risultati farmacologici ottenuti sono stati confermati mediante studi computazionali. Tenendo conto che il residuo di acido miristico si posiziona all'interno del *bilayer* fosfolipidico, il primo passaggio dell'analisi computazionale è stato il disegno di N-acetil peptidi con Marvin Sketch v5.10, seguito dalla ricerca del conformero con la più bassa energia all'interno del campo di forza MMFF94. Dopo aver visualizzato questi conformeri, sono state allineate rispettivamente le strutture dei supposti agonisti ed antagonisti. Dalla sovrapposizione è risultato che l'orientazione delle catene laterali dei peptidi è generalmente conservata.

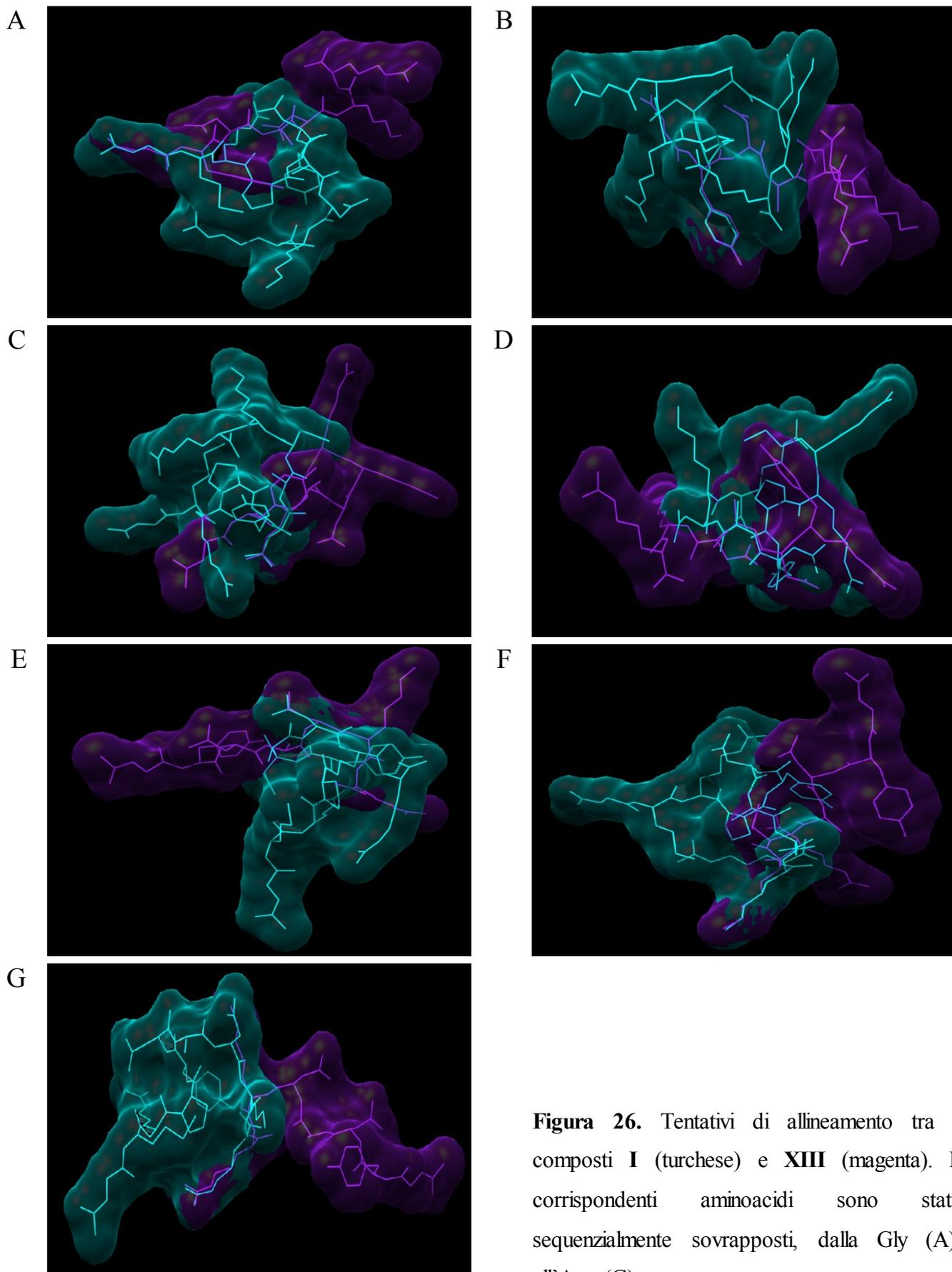
In figura 25 sono riportate le strutture sovrapposte dei composti **I**, **II** e **XV**. I peptidi **XIII** e **XIV**, che inducono un rilassamento notevolmente inferiore rispetto a quelli sopra menzionati, risultano allineati l'uno all'altro, ma non perfettamente allineati con **I**, **II** e **XV**.

La figura 26 mostra i tentativi di sovrapposizione dei composti **I** e **XIII**, considerando ogni singolo aminoacido.

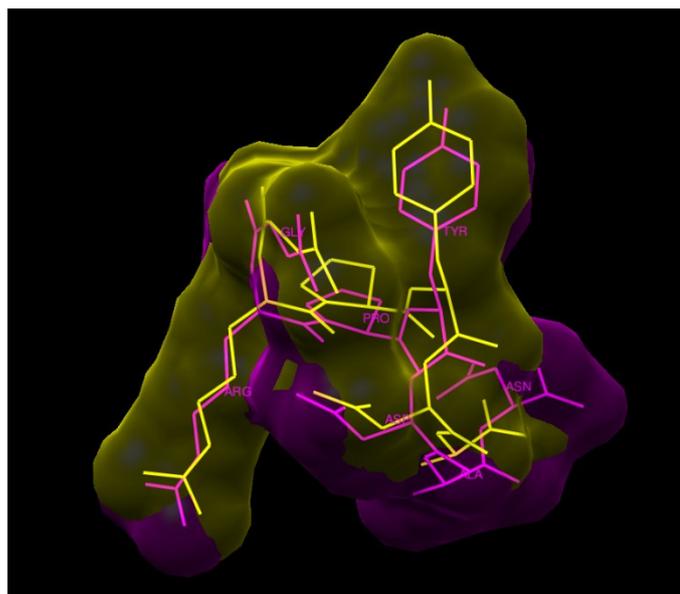
Infine le strutture dei composti **XVI** e **XVII**, che si suppone siano antagonisti, sono allineate tra di loro, ma non con le altre (figura 27). Questi risultati suggeriscono una correlazione tra specifiche conformazioni ed attività.



**Figura 25.** Sovrapposizione dei composti I (turchese), II (magenta), XV (verde).



**Figura 26.** Tentativi di allineamento tra i composti **I** (turchese) e **XIII** (magenta). I corrispondenti aminoacidi sono stati sequenzialmente sovrapposti, dalla Gly (A) all'Arg (G).



**Figura 27.** Sovrapposizione dei composti XVI (magenta) e XVII (giallo).

## **5. CONCLUSIONI**

Lo sviluppo di agenti farmacologici mirati agli enzimi che producono la S1P (SphK1 e SphK2) o ai suoi recettori (S1P<sub>1-5</sub>) potrebbe fornire benefici ad ampio raggio, dato il coinvolgimento di questo mediatore lipidico in diverse funzioni cellulari.

Numerosi studi hanno sottolineato la sovraespressione delle SphKs nei disordini infiammatori e nelle patologie tumorali, evidenziando la funzione chiave di queste due isoforme enzimatiche nell'omeostasi degli sfingolipidi.

Sebbene la SphK1 e la SphK2 presentino molte caratteristiche comuni, hanno differenti funzioni biologiche. L'isoforma 1 promuove la crescita e la sopravvivenza cellulare in molti tipi di tumore, tra cui quello al cervello, al seno, al colon, alla prostata, alla pelle e così via. Anche l'isoforma 2, che ha effetti opposti in quanto inibisce la crescita cellulare ed induce apoptosi, sembra essere implicata nella progressione tumorale nelle cellule MCF-7, una linea di cancro al seno positiva al recettore dell'estrogeno. Questi effetti contrapposti, unitamente all'enigmatico ruolo della SphK2, richiedono ulteriori studi al fine di comprendere l'utilità terapeutica di un'inibizione selettiva o meno delle SphKs.

In questo lavoro di tesi è stato sintetizzato un *set* di *small molecules* (**1-37**) come potenziali inibitori delle sfingochinasi. Il modello farmacologico utilizzato per valutare la loro attività, ha consentito di identificare sette derivati (**7, 14, 18, 19, 21, 31, 32**) in grado di inibire le due isoforme enzimatiche; tuttavia ulteriori studi sono richiesti al fine di migliorare i requisiti che consentano un'inibizione potente e selettiva nei confronti degli enzimi *targets*.

Parallelamente al filone dell'inibizione delle SphKs, considerando i noti ruoli patologici del recettore S1P<sub>3</sub>, l'attenzione è stata focalizzata sulla ricerca di

specifici antagonisti di tale recettore che potrebbero avere un potenziale ruolo protettivo in caso di tumore al seno e di infiammazione sistemica acuta.

La progettazione e la sintesi di piccole molecole antagoniste è risultata molto complessa a causa delle similarità strutturali esistenti tra i recettori S1P<sub>1-5</sub>. Per tale ragione l'interesse è stato rivolto allo sviluppo di peptidici derivanti dall'agonista selettivo S1P<sub>3</sub> riportato in letteratura, il **KRX-725 (I)**, la cui specificità è stata dimostrata dall'internalizzazione peptide-indotta dell'S1P<sub>3</sub>, ma non dell'S1P<sub>1</sub>.

La penetrazione intracellulare di peptidici è stata dimostrata in diversi studi, proponendo che la coda idrofobica (di acido palmitico o miristico) consente l'attraversamento da parte del peptide della membrana plasmatica e allo stesso tempo lo ancora al *bilayer* lipidico.

In questo lavoro di tesi è riportato il primo sistematico studio condotto su peptidici, con lo scopo di definire i requisiti strutturali necessari per l'attività biologica. A tale studio è stata associata l'analisi computazionale di questa classe di composti, al fine di ottenere ulteriori chiarimenti circa le caratteristiche conformazionali che determinano il loro comportamento agonista o antagonista sul sottotipo S1P<sub>3</sub>. È stato identificato un derivato di delezione, l'oligopeptide **XVI**, che agisce come antagonista in due differenti modelli farmacologici. Ulteriori studi chimici saranno necessari per ottimizzare l'antagonista S1P<sub>3</sub>-specifico; tuttavia le proprietà biologiche uniche di **XVI** lo rendono un utile e maneggevole *tool* farmacologico per lo studio del *signaling* S1P mediato dal recettore S1P<sub>3</sub>.

## BIBLIOGRAFIA

1. Yatomi Y., Igarashi Y., Yang L., Hisano N., Qi R., Asazuma N., Satoh K., Ozaki Y., and Kume S. (1997). Sphingosine 1-phosphate, a bioactive sphingolipid abundantly stored in platelets, is a normal constituent of human plasma and serum. *J. Biochem. (Tokyo)*. 121:969–973.
2. Obeid L.M., Linardic C.M., Karolak L.A., Hannun Y.A. (1993). Programmed cell death induced by ceramide. *Science* 259:1769–1771.
3. Venable M.E., Lee J.Y., Smyth M.J., Bielawska A., Obeid L.M. (1995). Role of ceramide in cellular senescence. *J. Biol. Chem.* 270:30701–30708.
4. Hla T., Venkataraman K., Michaud J. (2008). The vascular S1P gradient-cellular sources and biological significance. *Biochim. Biophys Acta* 1781:477–482.
5. Hänel P., Andréani P., Graler M.H. (2007). Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood. *FASEB J.* 21:1202–1209.
6. Spiegel S., Milstien S. (2007). Functions of the multifaceted family of sphingosine kinases and some close relatives. *J. Biol. Chem.* 282:2125–2129.
7. Mizugishi K., Yamashita T., Olivera A., Miller G.F., Spiegel S., Proia R.L. (2005) Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. *Mol. Cell. Biol.* 25:11113–11121.
8. Xia P., Wang L., Moretti P.A.B., Albanese N., Chai F., Pitson S.M., D'Andrea R.J., Gamble J.R., Vadas M.A. (2002). Sphingosine kinase interacts with TRAF2 and dissects tumor necrosis factor-alpha signaling. *J. Biol. Chem.* 277:7996–8003.
9. Pyne S., Long J.S., Ktistakis N.T., Pyne N.J. (2005). Lipid phosphate phosphatases and lipid phosphate signalling. *Biochem. Soc. Trans.* 33:1370–1374.
10. Schwab S.R., Pereira J.P., Matloubian M., Xu Y., Huang Y., Cyster J.G. (2005). Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients. *Science* 309:1735–1739.
11. Lee Y., Venkataraman K., Hwang S., Han D., Hla T. (2007). A novel method to quantify sphingosine 1-phosphate by immobilized metal affinity chromatography (IMAC). *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 84:154–162.
12. Kawahara A., Nishi T., Hisano Y., Fukui H., Yamaguchi A., Mochizuki N. (2009). The sphingolipid transporter spns2 functions in migration of zebrafish myocardial precursors. *Science* 323:524–527.
13. Murata N., Sato K., Kon J., Tomura H., Yanagita M., Kuwabara A., Ui M., Okajima F. (2000). Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma

components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions. *Biochem. J.* 352:809–815.

**14.** Christoffersen C., Obinata H., Kumaraswamy S.B., Galvani S., Ahnström J., Sevvana M., Egerer-Sieber C., Muller Y.A., Hla T., Nielsen L.B., Dahlbäck B. (2011). Endothelium-protective sphingosine-1-phosphate provided by HDL-associated apolipoprotein M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108:9613–9618.

**15.** Lee M., Van Brocklyn J., Thangada S., Liu C., Hand A., Menzeleev R., Spiegel S., Hla T. (1998). Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1. *Science* 279:1552.

**16.** Chun J., Goetzl E.J., Hla T., Igarashi Y., Lynch K.R., Moolenaar W., Pyne S., Tigyi G. (2002). International Union of Pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol. Rev.* 54:265–269.

**17.** Gräler M.H., Bernhardt G., Lipp M. (1998). EDG6, a novel Gprotein-coupled receptor related to receptors for bioactive lysophospholipids, is specifically expressed in lymphoid tissue. *Genomics* 53:164–169.

**18.** Jolly P.S., Rosenfeldt H.M., Milstien S., Spiegel S. (2002). The roles of sphingosine-1-phosphate in asthma. *Mol. Immunol.* 38:1239–1245.

**19.** Im D.S., Heise C.E., Ancellin N., O'Dowd B.F., Shei G.J., Heavens R.P., Rigby M.R., Hla T., Mandala S., McAllister G., George S.R., Lynch K.R. (2000). Characterization of a novel sphingosine 1-phosphate receptor, Edg-8. *J. Biol. Chem.* 275:14281–14286.

**20.** Lee M.J., Thangada S., Paik J.H., Sapkota G.P., Ancellin N., Chae S.S., Wu M., Morales-Ruiz M., Sessa W.C., Alessi D.R., Hla T. (2001). Akt-mediated phosphorylation of the G protein-coupled receptor EDG-1 is required for endothelial cell chemotaxis. *Mol. Cell.* 8:693–704.

**21.** Ryu Y., Takuwa N., Sugimoto N., Sakurada S., Usui S., Okamoto H., Matsui O., Takuwa Y. (2002). Sphingosine 1-phosphate, a platelet derived lysophospholipid mediator, negatively regulates cellular Rac activity and cell migration in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 90:325–332.

**22.** Hait N.C., Allegood J., Maceyka M., Strub G.M., Harikumar K.B., Singh S.K., Luo C., Marmorstein R., Kordula T., Milstien S., Spiegel S. (2009). Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate. *Science* 325:1254–1257.

**23.** Alvarez S.E., Harikumar K.B., Hait N.C., Allegood J., Strub G.M., Kim E.Y., Maceyka M., Jiang H., Luo C., Kordula T., Milstien S., Spiegel S. (2010). Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2. *Nature* 465:1084–1088.

- 24.** Liu Y., Wada R., Yamashita T., Mi Y., Deng C.X., Hobson J.P., Rosenfeldt H.M., Nava V.E., Chae S.S., Lee M.J., Liu C.H., Hla T., Spiegel S., Proia R.L. (2000). Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J. Clin. Invest.* 106:951–961.
- 25.** Ishii I., Friedman B., Ye X., Kawamura S., McGiffert C., Contos J.J., Kingsbury M.A., Zhang G., Brown J.H., Chun J. (2001). Selective loss of sphingosine 1-phosphate signaling with no obvious phenotypic abnormality in mice lacking its G protein-coupled receptor, LP B3 /EDG-3. *J. Biol. Chem.* 276:33697–33704.
- 26.** MacLennan A.J., Carney P.R., Zhu W.J., Chaves A.H., Garcia J., Grimes J.R., Anderson K.J., Roper S.N., Lee N. (2001). An essential role for the H218/AGR16/Edg-5/LP B2 sphingosine 1-phosphate receptor in neuronal excitability. *Eur. J. Neurosci.* 14:203–209.
- 27.** Herr D.R., Grillet N., Schwander M., Rivera R., Müller U., Chun J. (2007). Sphingosine 1-phosphate (S1P) signaling is required for maintenance of hair cells mainly via activation of S1P 2. *J. Neurosci.* 27:1474–1478.
- 28.** Skoura A., Sanchez T., Claffey K., Mandala S.M., Proia R.L., Hla T. (2007). Essential role of sphingosine 1-phosphate receptor 2 in pathological angiogenesis of the mouse retina. *J. Clin. Invest.* 117:2506–2516.
- 29.** Wang F., Okamoto Y., Inoki I., Yoshioka K., Du W., Qi X., Takuwa N., Gonda K., Yamamoto Y., Ohkawa R., Nishiuchi T., Sugimoto N., Yatomi Y., Mitsumori K., Asano M., Kinoshita M., Takuwa Y. (2010). Sphingosine-1-phosphate receptor-2 deficiency leads to inhibition of macrophage proinflammatory activities and atherosclerosis in apoE-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 120:3979–3995.
- 30.** Sanna M.G., Liao J., Jo E., Alfonso C., Ahn M.Y., Peterson M.S., Webb B., Lefebvre S., Chun J., Gray N., Rosen H. (2004). Sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor subtypes S1P1 and S1P3, respectively, regulate lymphocyte recirculation and heart rate. *J. Biol. Chem.* 279:13839–13848.
- 31.** Niessen F., Schaffner F., Furlan-Freguia C., Pawlinski R., Bhattacharjee G., Chun J., Derian C.K., Andrade-Gordon P., Rosen H., Ruf W. (2008). Dendritic cell PAR1-S1P3 signalling couples coagulation and inflammation. *Nature* 452:654–658.
- 32.** Keul P., Lucke S., von Wnuck Lipinski K., Bode C., Gräler M., Heusch G., Levkau B. (2011). Sphingosine-1-phosphate receptor 3 promotes recruitment of monocyte/macrophages in inflammation and atherosclerosis. *Circ. Res.* 108:314–323.

- 33.** Golfier S., Kondo S., Schulze T., Takeuchi T., Vassileva G., Achtman A.H., Graler M.H., Abbondanzo S.J., Wiekowski M., Kremmer E., Endo Y., Lira S.A., Bacon K.B., Lipp M. (2010). Shaping of terminal megakaryocyte differentiation and proplatelet development by sphingosine-1-phosphate receptor S1P4. *FASEB J.* 24:4701–4710.
- 34.** Walzer T., Chiossone L., Chaix J., Calver A., Carozzo C., Garrigue-Antar L., Jacques Y., Baratin M., Tomasello E., Vivier E. (2007). Natural killer cell trafficking in vivo requires a dedicated sphingosine 1-phosphate receptor. *Nat. Immunol.* 8:1337–1344.
- 35.** Cohen J.A., Barkhof F., Comi G., Hartung H.P., Khatri B.O., Montalban X., Pelletier J., Capra R., Gallo P., Izquierdo G., Tiel-Wilck K., Vera A.D., Jin J., Stites T., Wu S., Aradhye S., Kappos L. (2010). Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 362:402–415.
- 36.** Kappos L., Radue E.W., O'connor P., Polman C., Hohlfeld R., Calabresi P., Selmaj K., Agoropoulou C., Leyk M., Zhang-Auberson L., Burtin P. (2010). A placebo-controlled trial of oral Fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 362:387.
- 37.** Adachi K., Kohara T., Nakao N., Arita M., Chiba K., Mishina T., Sasaki S., Fujita T. (1995). Design, synthesis, and structure-activity relationships of 2-substituted-2-amino-1,3-propanediols: discovery of a novel immunosuppressant, FTY720. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 5:853–856.
- 38.** Zemann B., Kinzel B., Müller M., Reuschel R., Mechtcheriakova D., Urtz N., Bornancin F., Baumruker T., Billich A. (2006). Sphingosine kinase type 2 is essential for lymphopenia induced by the immunomodulatory drug FTY720. *Blood* 107:1454–1458.
- 39.** Brinkmann V., Davis M.D., Heise C.E., Albert R., Cottens S., Hof R., Bruns C., Prieschl E., Baumruker T., Hiestand P., Foster C.A., Zollinger M., Lynch K.R. (2002). The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. *J. Biol. Chem.* 277:21453–21457.
- 40.** Matloubian M., Lo C.G., Cinamon G., Lesneski M.J., Xu Y., Brinkmann V., Allende M.L., Proia R.L., Cyster J.G. (2004). Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 427:355–360.
- 41.** Garcia J.G., Liu F., Verin A.D., Birukova A., Dechert M.A., Gerthoffer W.T., Bamberg J.R., English D. (2001). Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement. *J. Clin. Invest.* 108:689–701.

42. Sanchez T., Skoura A., Wu M.T., Casserly B., Harrington E.O., Hla T. (2007). Induction of vascular permeability by the sphingosine-1-phosphate receptor-2 (S1P2R) and its downstream effectors ROCK and PTEN. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27:1312–1318.
43. Sammani S., Moreno-Vinasco L., Mirzapooiazova T., Singleton P.A., Chiang E.T., Evenoski C.L., Wang T., Mathew B., Husain A., Moitra J., Sun X., Nunez L., Jacobson J.R., Dudek S.M., Natarajan V., Garcia J.G. (2010). Differential effects of sphingosine 1-phosphate receptors on airway and vascular barrier function in the murine lung. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 43:394–402.
44. Yatomi Y., Ohmori T., Rile G., Kazama F., Okamoto H., Sano T., Satoh K., Kume S., Tigyi G., Igarashi Y., Ozaki Y. (2000). Sphingosine 1-phosphate as a major bioactive lysophospholipid that is released from platelets and interacts with endothelial cells. *Blood* 96:3431–3438.
45. Matsushita K., Morrell C.N., Lowenstein C.J. (2004). Sphingosine 1-phosphate activates Weibel–Palade body exocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:11483–11487.
46. Coughlin S.R. (2000). Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 407:258–264.
47. Niessen F., Schaffner F., Furlan-Freguia C., Pawlinski R., Bhattacharjee G., Chun J., Derian C.K., Andrade-Gordon P., Rosen H., Ruf W. (2008). Dendritic cell PAR1-S1P3 signalling couples coagulation and inflammation. *Nature* 452:654–658.
48. Olivera A., Urtz N., Mizugishi K., Yamashita Y., Gilfillan A.M., Furumoto Y., Gu H., Proia R.L., Baumruker T., Rivera J. (2006). IgE-dependent activation of sphingosine kinases 1 and 2 and secretion of sphingosine 1-phosphate requires Fyn kinase and contributes to mast cell responses. *J. Biol. Chem.* 281:2515–2525.
49. Jolly P.S., Bektas M., Olivera A., Gonzalez-Espinosa C., Proia R.L., Rivera J., Milstien S., Spiegel S. (2004). Transactivation of sphingosine-1-phosphate receptors by FcεRI triggering is required for normal mast cell degranulation and chemotaxis. *J. Exp. Med.* 199:959–970.
50. Kimura T., Tomura H., Mogi C., Kuwabara A., Ishiwara M., Shibusawa K., Sato K., Ohwada S., Im D.S., Kurose H., Ishizuka T., Murakami M., Okajima F. (2006). Sphingosine 1-phosphate receptors mediate stimulatory and inhibitory signalings for expression of adhesion molecules in endothelial cells. *Cell Signal* 18:841–850.
51. Nofer J., Bot M., Brodde M., Taylor P.J., Salm P., Brinkmann V., Van Berkel T., Assmann G., Biessen E.A. (2007). FTY720, a synthetic sphingosine 1-

phosphate analogue, inhibits development of atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* 115:501–508.

**52.** Parrill A.L., Wang D.A., Bautista D.L., Van Brocklyn J.R., Lorincz Z., et al. (2000). Identification of Edg1 receptor residues that recognize sphingosine 1-phosphate. *J. Biol. Chem.* 275:39379–84.

**53.** Hanson M.A., Roth C.B., Jo E., Griffith M.T., Scott F.L., Reinhart G., Desale H., Clemons B., Cahalan S.M., Schuerer S.C., Sanna M.G., Han G.W., Kuhn P., Rosen H., Stevens R.C. (2012). Crystal structure of a lipid G protein-coupled receptor. *Science* 335,851.

**54.** Rosen H., Gonzalez-Cabrera P.J., Sanna M.G., Brown S. (2009). Sphingosine 1-phosphate receptor signaling. *Annu. Rev. Biochem.* 78:743–68.

**55.** Gao P., Peterson Y.K., Smith R.A., Smith C.D. (2012). Characterization of isoenzyme-selective inhibitors of human sphingosine kinases. *PLoS ONE* 7, 9 e44543.

**56.** Raje M.R., Knott K., Kharel Y., Bissel P., Lynch K.R., Santos W.L. (2012). Design, synthesis and biological activity of sphingosine kinase 2 selective inhibitors. *Bioorg. & Med. Chem.* 20:183-94.

**57.** O'Callaghan K., Kuliopulos A., Covic L. (2012). Turning receptors on and off with intracellular pepducins: new insights into G-protein-coupled receptor drug development. *J. Biol. Chem.* 287, 12787–12796.

**58.** Licht T., Tsiurhnikov L., Reuveni H., Yarnitzky T., Ben-Sasson S.A. (2003). Induction of pro-angiogenic signaling by a synthetic peptide derived from the second intracellular loop of S1P3 (EDG3). *Blood* 102, 2099–2107.

**59.** Watson C., Long J.S., Orange C., Tannahill C.L., Mallon E., McGlynn L.M., Pyne S., Pyne N.J., Edwards J. (2010). High expression of sphingosine 1-phosphate receptors, S1P1 and S1P3, sphingosine kinase 1, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 is associated with development of tamoxifen resistance in estrogen receptor-positive breast cancer patients. *Am. J. Pathol.* 177, 2205-2215.

**60.** Harris G.L., Creason M.B., Brulte G.B., Herr D.R. (2012). In vitro and in vivo antagonism of a G Protein-Coupled Receptor (S1P3) with a novel blocking monoclonal antibody. *PLoS ONE* 7, e35129.

**61.** Severino B., Incisivo G.M., Bertolino A., Fiorino F., Frecentese F., Barbato F., Ciano A., Corvino A., Di Vaio P., Magli E., Manganelli S., Maggioni G., Benfenati E., Caliendo G., Santagada V., Sorrentino R., Roviezzo F., Perissutti E. (2013). Structure-activity relationship, biological and conformational studies of derivatives of thepepducn S1P3 agonist KRX-725. *J. Med. Chem.* submitted.