



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO
Dipartimento di Farmacia

PhD Program
in **Drug Discovery and Development**
XXXII Cycle — Academic Year 2019/2020

Abstract PhD Project

***Sviluppo e Valutazione di Fasi Stazionarie
Innovative per la Separazione di Farmaci,
Metaboliti e Biocomposti***

Candidate

Giuliana Grasso

Supervisor(s)

Prof. *Carlo Crescenzi*
Prof.ssa *Nunziatina De Tommasi*

PhD Program Coordinator: Prof. Dr. *Gianluca Sbardella*

I biofluidi sono tipiche matrici complesse e rappresentano una fonte di potenziali biomarker, ma spesso richiedono elevate esigenze nella preparazione del campione prima dell'analisi. A tale scopo, sono state sviluppate diverse tecniche, tra cui l'estrazione in fase solida e metodi basati sul riconoscimento molecolare, come assorbenti di immuno-affinità e polimeri a stampo molecolare. La Lipidomica è un campo della ricerca scientifica in cui è necessario sviluppare tecniche efficienti per il pretrattamento dei campioni al fine di ottenere risultati affidabili e riproducibili. I lipidi sono coinvolti in molti processi, come strutture cellulari, la segnalazione, all'interno della cellula e tra le cellule, e rappresentano una fonte di energia. A causa del ruolo dei lipidi e di tutte le loro funzioni, il campo della Lipidomica sta emergendo con l'obiettivo di identificare le alterazioni del metabolismo dei lipidi e dei processi di segnalazione lipido-mediati che regolano l'omeostasi cellulare, e cerca di comprendere la relazione tra questi processi nei casi di salute e di malattia (Han & Gross, 2003). A seguito di ciò, quando si verifica un'interruzione del metabolismo lipidico, esiste una connessione con l'insorgenza e la progressione di varie malattie metabolicamente legate, incluso il cancro (Santos & Schulze, 2012). La complessità della Lipidomica, espressa in classi e sottoclassi di lipidi presenti nel plasma umano, mette in evidenza che l'intervallo di concentrazione è piuttosto ampio, passando da poche pmol/L a mmol/L (Burla et al., 2018). Tra tutti i fosfolipidi, in questo progetto ci siamo concentrati sulla sfingosina 1-fosfato (S1P), i cui livelli nel flusso circolatorio sono stati recentemente determinati al di sotto delle nanomoli (Yatomi et al., 1997). La S1P è uno sfingolipide bioattivo con un'ampia gamma di attività dovute al suo ruolo nella segnalazione cellulare legata a recettori accoppiati a proteine G. È anche un biomarker emergente per una varietà di condizioni tra cui cancro, sclerosi multipla, artrite reumatoide e sepsi (Maceyka et al., 2012). In considerazione della natura dinamica della segnalazione cellulare, la quantificazione della S1P risolta nel tempo e nello spazio è cruciale sia per una profonda comprensione o per lo sviluppo di migliori test diagnostici. Metodi di quantificazione lipidica in tempo reale in situ devono ancora essere realizzati e ciò richiede lo sviluppo di tecniche o sensori di affinità (per esempio, gli immunosensori) in grado di riportare continuamente i livelli lipidici nei biofluidi. Tali metodi sarebbero particolarmente utili per il monitoraggio di S1P nel sangue o nelle cellule viventi, ma di pari urgenza sono i sensori per il Fingolimod (FTY720, Gilenya™, Novartis), un analogo strutturale della sfingosina e antagonista del recettore della S1P, approvato dalla Food and Drug Administration (FDA) per il trattamento della sclerosi multipla recidivante-remittente (Aktas et al., 2010). Qui riportiamo tre approcci per raggiungere tale scopo. Il *primo* si basa sull'analisi LC-MS per profilare in profondità classi selezionate di lipidi nei biofluidi. Tale metodo combina l'uso di fasi stazionarie solide per la cattura dei fosfolipidi, in particolare selettive per i fosfomonoesteri, con l'analisi MS/MS e consente un rilevamento estremamente sensibile degli sfingofosfolipidi. Il *secondo* approccio riguarda l'uso di sensori nanoparticelle fluorescenti realizzate con la tecnica dello stampo molecolare (MIP) sensibili a livelli fisiologicamente rilevanti di S1P e l'antagonista del recettore S1P Fingolimod fosfato (FP) in campioni di siero umano addizionato. L'imprinting è stato ottenuto utilizzando sale FP-TBA o sale di sodio 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfato (DPPA (Na)) come modelli, in combinazione con un monomero polimerizzabile nitrobenzodiazolo (NBD) con il doppio ruolo di catturare l'anione fosforo e segnalarne la presenza. Al fine di estendere la capacità e la capacità delle fasi stazionarie di trattenere molecole di fosforo, come fosfolipidi, molecole bersaglio dei nostri studi, il terzo approccio sviluppato era focalizzato sulla sintesi di materiali creati dalla combinazione di due monomeri funzionali (FM), FM a base di 1,3-diarilurea (neutro) e bis-imidazolio (cationico), utilizzando due diversi modelli, acido fenil fosfonico (PPA) e DPPA (Na), entrambi che imitano la porzione comune di fosforo dei fosfolipidi e sondano l'affinità verso il gruppo fosfato. Infine, abbiamo dimostrato il potenziale utilizzo delle tecniche di cui sopra per monitorare S1P e FTY720-P nel plasma umano e nel siero umano. Tuttavia, abbiamo considerato questo lavoro come un primo passo verso una piattaforma sensoriale generale per il rilevamento dei fosfolipidi.