

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE
“AMEDEO AVOGADRO”

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Corso di Laurea Magistrale in Farmacia

TESI DI LAUREA

**Studio del modulatore negativo del SOCE CIC-39 e di inibitori dual-targeting
SOCE/DHODH: prospettive terapeutiche innovative per la sclerosi multipla**

Relatore

Prof. Rita Maria Concetta Di Martino

Correlatore

Dott.ssa Beatrice Riva

Candidato

Carlotta Muschitiello



Firmato digitalmente da Rita Maria
Concetta Di Martino
Data: 27.09.2024 10:49:12 CEST
Organizzazione: UNIVERSITA' DEGLI STUDI
DEL PIEMONTE ORIENTALE/01943490027

SESSIONE AUTUNNALE 2023-24

1. Lista delle abbreviazioni	3
2. Introduzione	6
2.1 <i>Sclerosi Multipla</i>	6
2.1.1 Farmaci approvati per il trattamento della sclerosi multipla	9
2.1.2 Nuovi approcci terapeutici e bersagli farmacologici per la sclerosi multipla	17
2.2 <i>Store Operated Calcium Entry (SOCE)</i>	18
2.2.1 Ruolo fisiopatologico di SOCE	21
2.2.2 Ruolo di SOCE nel sistema immunitario e sue alterazioni nelle patologie autoimmuni	21
2.2.3 Modulatori di SOCE	25
2.2.4 CIC-39 (3-(1-(2',3'dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl) benzoic acid)	27
3. Scopo del lavoro	30
4. Materiali e metodi	31
4.1 <i>Isolamento ed estrazione di cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs) da sangue intero</i>	31
4.2 <i>Colture cellulari</i>	32
4.3 <i>Saggio di vitalità con bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT)</i>	32
4.4 <i>Disegno sperimentale dei trattamenti utilizzati in PBMCs</i>	33
4.4.1 Saggio di proliferazione con il colorante fluorescente 5(6)-carbossifluoresceina diacetato N-succinimidil estere (CFSE)	34
4.4.2 Analisi del Ca ²⁺ Intracellulare	34
4.4.3 Real Time PCR	35
4.5 <i>Analisi Statistiche</i>	36
5. Risultati e Discussione	37
5.1 <i>Caratterizzazione delle alterazioni di SOCE e dell'efficacia di CIC-39 in PBMCs derivanti da pazienti affetti da SM-RR</i>	37
5.2 <i>Valutazione degli effetti di CIC-39 sulla vitalità cellulare in cellule Jurkat e in PBMCs di pazienti SM-RR</i>	38
5.3 <i>Caratterizzazione degli effetti di CIC-39 sulla proliferazione di linfociti T CD4⁺ e linfociti B CD19⁺ derivanti da pazienti affetti da SM-RR</i>	40
5.4 <i>Analisi dei livelli di espressione di citochine pro-infiammatorie in PBMCs di pazienti SM-RR trattate con CIC-39 o TERI</i>	41
5.5 <i>Progettazione e valutazione di inibitori dual SOCE-DHODH come nuovo approccio terapeutico per la SM</i>	43
5.6 <i>Studio preliminare del composto 10 in PBMCs di pazienti affetti da SMS-RR</i>	46
6. Conclusioni	48
7. Bibliografia	50

1. Lista delle abbreviazioni

APC	cellule presentanti l'antigene
BCR	<i>B cell receptor</i>
Ca²⁺	calcio
CAD	<i>CRAC Activation Domain</i>
CaN	calcineurina
CFSE	5(6)-carbossifluoresceina diacetato N-succinnimidil estere
CRAC	<i>Ca²⁺ release-activated Ca²⁺</i>
CS-1	<i>connecting segment-1</i>
DAG	diacilglicerolo
DHODH	diidroorotato deidrogenasi
DMD	distrofia muscolare di Duchenne
DMTs	<i>disease modifying treatments</i>
EAS	encefalomielite autoimmune sperimentale
EBV	virus di Epstein-Barr
EMA	agenzia europea per i medicinali
ER/SR	reticolo endo(sarco)plasmatico
FAME	edema maculare associato a fingolimod
FDA	<i>food and drug administration</i>
GA	Glatiramer acetato
GI	gastrointestinali
GM-CSF	fattore stimolante le colonie di granulociti e monociti
GPCR	G-protein coupled receptor
GSK	GlaxoSmithKline
IFN-γ	interferon-gamma

IgM immunoglobulina-M

IL-2 interleuchina 2

IL-21 interleuchina 21

IL-4 interleuchina 4

IL17 interleuchina-17

INF- β Interferoni

IP₃ inositolo trifosfato

JCV virus di John Cunningham

KRB KREB-ringer buffer

LES lupus eritematoso sistemico

m1Y 1-metilpseudouridina

MadCAM-1 *mucosal adressin cell adhesion molecole-1*

MHC Complesso maggiore di istocompatibilità

MRI risonanza magnetica per immagini

MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

NFAT fattore nucleare dei linfociti T attivati

NF- κ B fattore di trascrizione nucleare kappa-B

Nrf2 fattore nucleare 2

PBMC cellule mononucleate del sangue periferico

PBS buffer salino

PIP₂ fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato

PLC fosfolipasi C

PLC- γ 1 fosfolipasi C gamma 1

PML: *progressive multifocal leukoencephalopathy*

Pyrs pirazoli

RBL-H1 Rat Basophilic Leukemia

RCF *relative centrifugal force*

RE/RS reticolo endo(sarco)plasmatico

RPMI-1640 Roswell Park Memorial Institute

S1P sfingosina-1-fosfato

S1PR1 recettore 1 della sfingosina-1-fosfato

SAM *Sterile Alpha Motif*

SERCA *Sarco-Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase*

SK2 sfingosina chinasi 2

SM sclerosi Multipla

SM-PP sclerosi multipla primariamente progressiva

SM-RR sclerosi multipla recidivante-remittente

SM-SP sclerosi multipla secondariamente progressiva

SNC Sistema nervoso centrale

SOCE Store-operated Ca^{2+} entry

STIM *Stromal Interaction Molecule*

TAM miopatia ad aggregati tubulari

t-BHQ terz-butilidrochinone

TCR *T cell receptor*

TERI teriflunomide

Th1 linfociti T helper 1

Th2 linfociti T helper 2

TLR7 toll like receptor-7

TM1 transmembrane domain 1

TM4 transmembrane domain 4

Treg linfociti T regolatori

TRPCs *Transient Receptor Potential Canonical*

VCAM-1 *vascular cell adhesion molecule-1*

2. Introduzione

2.1 Sclerosi Multipla

La Sclerosi Multipla (SM) rappresenta ancora oggi un importante bisogno terapeutico a causa di significativi effetti invalidanti correlati alle terapie attualmente disponibili.

La SM è una malattia autoimmune cronica e progressiva del sistema nervoso centrale (SNC), caratterizzata da infiammazione, demielinizzazione e neurodegenerazione. Colpisce circa 3 milioni di persone nel mondo, in un'età compresa tra i 15 e i 45 anni, e con una maggiore incidenza nelle donne¹. La SM è una patologia eterogenea a genesi multifattoriale in cui il sistema immunitario colpisce erroneamente la guaina mielinica nel SNC, comportando l'insorgenza di lesioni demielinizzanti². In base al distretto coinvolto all'esordio della malattia, possono insorgere svariati sintomi, fra i più caratteristici vi sono sintomi sensoriali, visivi e motori^{3,4}. Tra questi uno dei sintomi più comuni è la *fatigue*, presente in circa l'83% dei pazienti, che si manifesta come una sensazione persistente di stanchezza, spesso aggravata durante le fasi attive della malattia. La depressione, che colpisce tra il 30% e il 45% dei pazienti, può essere sia una conseguenza psicologica della malattia sia derivare da alterazioni neurologiche. I pazienti possono anche manifestare alterazioni della visione, comunemente nota come diplopia, causata da un danno a carico del nervo ottico. Questo disturbo visivo, che coinvolge circa il 20% dei pazienti con SM al momento della diagnosi, può causare dolore oculare e desaturazione dei colori.

I dolori muscolari, insieme a debolezza, rigidità e spasmi, contribuiscono significativamente alla compromissione della funzione motoria, comportando disfunzioni nella deambulazione, oltre a vertigini e disturbi dell'equilibrio associati alla demielinizzazione del tronco encefalico. Problemi come la costipazione e l'incontinenza urinaria sono comuni a causa del coinvolgimento aree cerebrali dedite al controllo del sistema urinario e intestinale. Infine, circa l'80% degli uomini e il 70% delle donne con SM riferiscono disfunzioni sessuali, spesso correlate a problemi neurologici e psicologici⁵ (Figura 1)⁶.

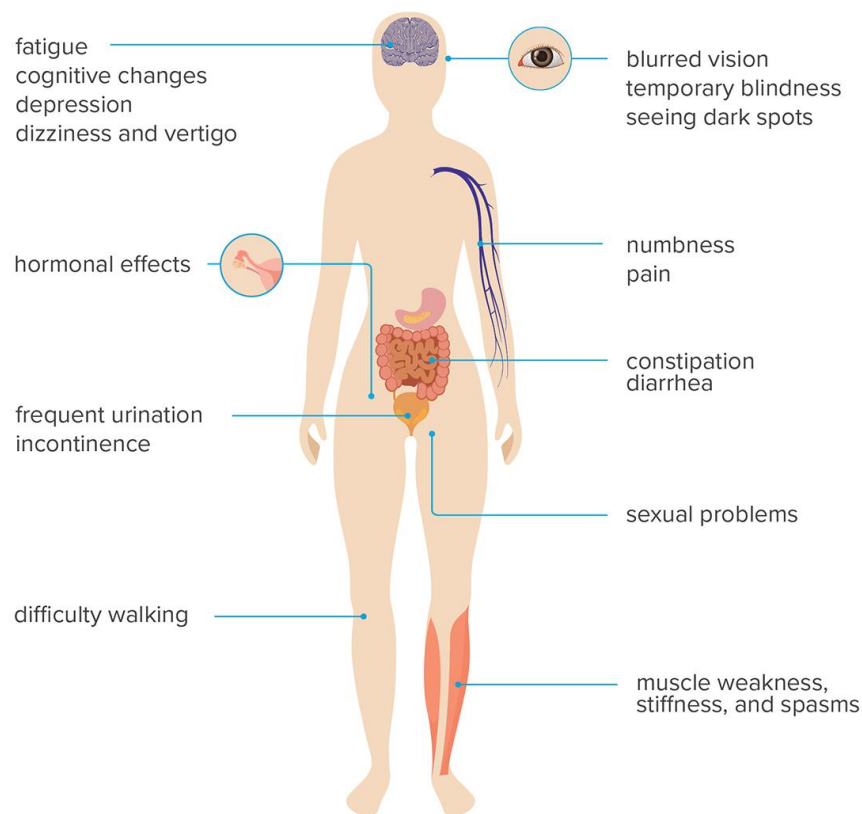


Figura 1. Rappresentazione grafica dei principali sintomi associati alla SM⁶.

L'eziologia della SM è complessa e multifattoriale in quanto l'interazione tra fattori genetici e ambientali provoca una cascata di eventi, tra cui: (i) l'attivazione del sistema immunitario adattativo e innato; (ii) la rottura della barriera emato-encefalica; (iii) la demielinizzazione del SNC, e (iv) il danno neuronale.

Sebbene la SM non sia una patologia ereditaria, diverse evidenze hanno dimostrato una forte componente genetica nella sua eziologia. In particolare, il rischio di sviluppare SM tra consanguinei di primo grado dei pazienti affetti è significativamente maggiore rispetto al resto della popolazione (circa 35 volte)⁷.

Inoltre, alcuni studi riportano una correlazione tra portatori della variante del gene HLA DRB1*15:01, facente parte del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), e un rischio maggiore di sviluppare SM⁸⁹. Studi *genome-wide* hanno identificato 551 geni correlabili ad un maggior rischio di sviluppo della patologia sia all'interno che al di fuori del complesso maggiore di istocompatibilità¹⁰.

Sebbene la predisposizione genetica sia fondamentale per lo sviluppo della SM, studi epidemiologici hanno evidenziato un'associazione rilevante fra l'ambiente e il rischio di contrarre la patologia. I fattori con la più forte evidenza di coinvolgimento nella SM sono il

virus di Epstein-Barr (EBV), il fumo di sigaretta e la carenza di vitamina D¹¹. È stato infatti riscontrato che la quasi totalità di individui affetti da SM (> 99%) ha subito un'infezione EBV rispetto a circa il 94% dei soggetti sani di pari età¹². Inoltre, è stata dimostrata la capacità del virus di riprogrammare le cellule B infettate inducendo una auto-reattività cronica e la conseguente attivazione del meccanismo di mimetismo molecolare o *molecular mimicry*^{13,14}.

Una diagnosi accurata di SM si basa sui criteri di McDonald (criteri di diagnosi di sclerosi multipla)¹⁵ che includono una combinazione di segni clinici, sintomi, reperti radiografici (e.g., lesioni T2 da risonanza magnetica per immagini, MRI) e reperti di laboratorio (e.g., bande oligoclonali nel liquido cerebrospinale)¹⁶. Nel dettaglio, la diagnosi di SM è definita dalla dimostrazione della disseminazione della malattia nello spazio e nel tempo. La disseminazione nello spazio si riferisce alla presenza di lesioni in distinte posizioni anatomiche del SNC, tra cui infratentoriale, iuxtacorticale, corticale, periventricolare e del midollo spinale. Queste lesioni possono essere identificate come iper-intense in T2 alla risonanza magnetica. La diffusione nel tempo si riferisce allo sviluppo di nuove lesioni nel tempo. La risonanza magnetica può dimostrare la disseminazione nel tempo attraverso la presenza simultanea di lesioni captanti (acute) e non captanti (croniche) il gadolinio o lo sviluppo di una nuova lesione T2 alla risonanza magnetica di follow-up. La diffusione nel tempo può anche essere definita da più attacchi clinici distinti e dalla presenza di bande oligoclonali specifiche del liquido cerebrospinale.

A seconda del decorso della malattia, la SM può essere classificata in diverse forme cliniche: (i) recidivante-remittente (SM-RR); (ii) secondariamente progressiva (SM-SP); (iii) primariamente progressiva (SM-PP); (iv) sindrome clinicamente isolata (*clinically isolated syndrome, CIS*), e (v) sindrome radiologicamente isolata (*radiologically isolated syndrome, RIS*). Il fenotipo clinico più comune è la SM-RR, che interessa circa l'85% dei pazienti. Questa forma clinica spesso ha inizio con un singolo evento di demielinizzazione ed è caratterizzata da episodi acuti di malattia (recidive), alternati a recupero totale o parziale (remissioni). La forma SM-SP è l'evoluzione di SM-RR, caratterizzata da una progressione dopo una fase a ricadute. Al contrario, SM-PP, che interessa il 15% dei pazienti, non prevede una prima fase di SM-RR, ed è caratterizzata da un andamento progressivo e continuo. Infine, CIS è caratterizzata dall'insorgenza di un singolo episodio neurologico della durata di oltre 24 ore causato da un attacco demielinizzante, il quale non necessariamente evolve in SM. Discorso analogo per RIS, che prevede un evento radiologico assimilabile ad una malattia demielinizzante, ma priva di segni e sintomi clinici caratteristici di SM¹⁷.

Oggi esistono vari approcci farmacologici per il trattamento della SM che mirano a ridurre gli eventi infiammatori, intesi sia come ricadute cliniche che nuove lesioni radiologiche. È stato ampiamente dimostrato che un'azione sulla componente infiammatoria può prevenire anche il danno cronico e la neurodegenerazione¹⁸. Tuttavia, nonostante i progressi terapeutici, gli invalidanti effetti collaterali di queste terapie rendono necessaria la costante ricerca di trattamenti più efficaci e specifici.

2.1.1 Farmaci approvati per il trattamento della sclerosi multipla

Ad oggi esistono differenti approcci farmacologici per il trattamento della SM, in particolare si tratta di farmaci attivi sulla prevenzione di nuovi eventi infiammatori, intesi sia come ricadute cliniche che come nuove lesioni radiologiche e, pertanto, in grado di rallentare il danno cronico e la neurodegenerazione. In relazione a queste peculiarità, queste classi di farmaci vengono definite “terapie modificanti il decorso della malattia” (*disease modifying treatments, DMTs*)¹⁹. Le DMTs disponibili per la SM-RR possiedono meccanismi d'azione e vie di somministrazione variabili. Tra i principali si ricordano: interferoni, glatiramer acetato, teriflunomide, dimetilfumarato, modulatori del recettore della sfingosina 1-fosfato, cladribina e anticorpi monoclonali (in particolare ocrelizumab e natalizumab).

Di base la terapia ha inizio mediante l'impiego di farmaci meno potenti con relativamente pochi effetti avversi (e.g., interferoni o fumarato). Nel caso in cui la progressione della malattia persista, si passa ad un'*escalation* terapeutica, ricorrendo alla somministrazione di farmaci ad efficacia superiore²⁰ (e.g., anticorpi monoclonali).

I farmaci di prima linea per il trattamento della SM-RR includono gli interferoni β , glatiramer acetato, dimetil fumarato, e teriflunomide. Questi farmaci sono caratterizzati da una modesta efficacia, ma da un buon profilo di sicurezza e tollerabilità, con effetti collaterali generalmente moderati²¹.

- Interferoni β (IFN- β ; nello specifico IFN- β 1a e IFN- β 1b) esistono in tre formulazioni principali: Avonex (30 mg intramuscolare una volta alla settimana), Rebif (22 e 44 mg sottocutanei tre volte alla settimana) e Betaseron (250 mg sottocutanei a giorni alterni). Ad oggi, il meccanismo d'azione degli IFN- β non è ancora completamente noto, ma i benefici per i pazienti affetti da SM-RR sono correlati alle loro proprietà antiinfiammatorie e agli effetti sulle cellule endoteliali della barriera ematoencefalica²⁰. È noto, infatti, che gli IFN- β sono in grado di ridurre l'espressione del complesso maggiore di istocompatibilità (*major histocompatibility complex, MHC*)

di classe II nei monociti del sangue, portando così all'inibizione della proliferazione dei linfociti T helper 1 (Th1) e aumentando il rilascio di interleuchina 10 (IL-10)²². I farmaci a base di IFN- β sono largamente utilizzati per il trattamento della SM, con milioni di pazienti trattati nell'ultimo ventennio. Gli effetti indesiderati più comuni includono reazioni nel sito di iniezione e sintomi simil-influenzali come febbre, mialgia e mal di testa, ma generalmente rimangono effetti lievi o moderati. Tuttavia, l'insorgenza di anticorpi neutralizzanti può limitare l'efficacia della terapia in circa il 30-50% dei pazienti²³.

- Glatiramer acetato (GA), approvato in Italia nell'aprile del 2005 e noto anche come Copaxone, è un polimero sintetico di quattro amminoacidi naturali e viene somministrato quotidianamente per via sottocutanea alla dose di 20 mg²⁰. Sebbene anche il meccanismo d'azione del GA non sia completamente noto, è stato ipotizzato che agisca modulando la risposta immunitaria attraverso un effetto primario sulle cellule presentanti l'antigene (*antigen presenting cells, APC*), che, inglobando peptidi di GA si trasformano in cellule APC di tipo II, con proprietà antinfiammatorie. Questo cambiamento induce una riduzione delle citochine pro-infiammatorie, un aumento di citochine antinfiammatorie, che favoriscono la differenziazione delle cellule T *naïve* in linfociti T helper 2 (Th2) e linfociti T regolatori (Treg). Nel complesso, infatti, si osserva una riduzione delle cellule Th1 e Th17 pro-infiammatorie e un'espansione delle popolazioni di Th2 e Treg, con un miglioramento del decorso della malattia²⁴. Studi clinici hanno dimostrato l'efficacia di GA nel ridurre il tasso di recidiva e migliorare i parametri di risonanza magnetica nei pazienti affetti da SM-RR. Un importante studio clinico di Fase 2 ha mostrato una riduzione del 76% del tasso di recidiva con il trattamento con GA²⁵. Altri studi clinici multicentrici hanno confermato che GA è in grado di ridurre la frequenza delle nuove lesioni captanti il contrasto e il carico lesionale rispetto ai valori di base²⁶. Studi tossicologici indicano che il GA è ben tollerato alle dosi terapeutiche. La somministrazione sottocutanea quotidiana può portare a effetti avversi nel sito di iniezione come eritema, bruciore, dolore o edema. Oltre a questo, l'effetto avverso più comune è la reazione definita *immediate post injection systemic reaction*, che si manifesta, in circa il 10% dei pazienti, come dolore al torace, rossore generalizzato e dispnea. Nonostante tali effetti avversi, il profilo di sicurezza ed il rapporto rischio-beneficio del farmaco sono considerati buoni²⁷.

- Dimetilfumarato (Tecfidera), approvato in Italia nel marzo 2013, è il terzo DMTs somministrato per via orale entrato in commercio dopo altri farmaci come fingolimod e teriflunomide. Ad oggi il meccanismo d'azione di dimetilfumarato non è completamente noto, ma si distingue dalle terapie precedenti poiché agisce a livello del fattore nucleare (Nrf2), che media la risposta cellulare allo stress ossidativo, e inibisce il fattore di trascrizione kappaB (NF-kB), riducendo conseguentemente la produzione di citochine pro-infiammatorie. Questi effetti antinfiammatori e antiossidanti rallentano la demielinizzazione e la neurodegenerazione associate alla SM. Il dimetilfumarato possiede un profilo di sicurezza migliore rispetto agli altri agenti orali per SM-RR ed è ampiamente utilizzato anche per il trattamento della psoriasi²⁸. Gli effetti indesiderati più comuni sono rossore, percezione di un improvviso aumento della temperatura corporea e disturbi gastrointestinali, oltre a riduzione della conta leucocitaria e aumento del rischio di infezioni. La posologia approvata per SM-RR prevede una capsula da 120 mg una volta al giorno per i primi 7 giorni, seguita da una capsula da 240 mg due volte al giorno²⁹.
- Teriflunomide (Aubagio), approvato in Italia nel settembre 2013 per il trattamento della SM-RR, è un immunosoppressore in grado di inibire in modo selettivo e reversibile l'enzima mitocondriale diidroorotato deidrogenasi (DHODH), una proteina di membrana mitocondriale, fondamentale per la sintesi "*de novo*" delle pirimidine. Si ritiene che gli effetti immunomodulanti di teriflunomide siano legati all'inibizione della sintesi di pirimidine, essenziali per le cellule in rapida proliferazione, come linfociti B e T, coinvolte in malattie autoimmuni come la SM²⁰. Gli effetti indesiderati più comuni comprendono mal di testa, diarrea, nausea oltre a epatotossicità, immunosoppressione e neuropatia periferica. La terapia, approvata per pazienti adulti affetti da SM-RR, prevede la somministrazione orale di 14 mg di farmaco una volta al giorno, ma per raggiungere livelli plasmatici stabili è necessario un trattamento continuativo di almeno 20 settimane³⁰.

I trattamenti di seconda linea della SM includono terapie di elevata efficacia, ma spesso associate ad effetti collaterali rilevanti. Tra questi rientrano fingolimod e anticorpi monoclonali quali natalizumab, ocrelizumab e alemtuzumab.

- Fingolimod (Gilenya), approvato in Italia nel novembre 2011 come primo trattamento orale per la SM-RR, è un farmaco ad azione immunosoppressiva. Fingolimod è un analogo della sfingosina-1-fosfato (S1P) e, agendo da antagonista funzionale, è in

grado di sequestrare i linfociti nei linfonodi, impedendo loro di migrare nel SNC e di determinare l'insorgenza di ulteriori risposte autoimmuni. Essendo un profarmaco, il meccanismo d'azione del fingolimod prevede la sua fosforilazione da parte della sfingosina chinasi 2 (SK2), trasformandolo nel suo metabolita attivo, fingolimod-fosfato. Questo metabolita è un analogo strutturale della sfingosina-1-fosfato e agisce impedendo il legame di quest'ultima ai suoi recettori, in particolare al recettore 1 della sfingosina-1-fosfato (S1PR1). Tale meccanismo determina desensibilizzazione e internalizzazione dei recettori sui linfociti T e B, riducendo la loro fuoriuscita nei compartimenti periferici con conseguente diminuzione di cellule T e B nel sangue periferico³¹. Fingolimod è, inoltre, in grado di superare la barriera ematoencefalica ed esplicare effetti neuroprotettivi e di riparazione assonale, favorendo la rigenerazione della guaina mielinica³². Tra gli effetti avversi correlati al farmaco si riportano quelli più comuni come mal di testa, visione offuscata, nausea, diarrea, malessere generale, disturbi gastrointestinali oltre ad un'aumentata probabilità di sviluppare infezioni da herpes zoster, associate a complicazioni neurologiche²⁰ e FAME (edema maculare associato a fingolimod)³³. Ad oggi fingolimod rappresenta una valida alternativa terapeutica per pazienti affetti da SM-RR grazie alla via di somministrazione orale (una capsula da 0.56 mg al giorno) associata ad un buon profilo di sicurezza e a comprovati benefici clinici²⁰.

- Natalizumab (Tysabri), approvato in Italia nel dicembre del 2006, è un anticorpo ricombinante umanizzato anti- $\alpha 4$ -integrina prodotto in una linea cellulare murina mediante la tecnologia del DNA ricombinante. È un inibitore selettivo della subunità $\alpha 4$ delle integrine umane, subunità altamente espressa sulla superficie di tutti i leucociti, ad eccezione dei neutrofili. Nel dettaglio, natalizumab si lega all'integrina $\alpha 4\beta 1$, bloccando così l'interazione con il suo recettore complementare, VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*), e con i ligandi osteopontina e CS-1 (*connecting segment-1*, un dominio di splicing alternativo della fibronectina), bloccando così l'interazione dell'integrina $\alpha 4\beta 7$ con MadCAM-1 (*mucosal addressin cell adhesion molecule-1*). L'alterazione di queste interazioni molecolari ostacola la migrazione dei leucociti attraverso l'endotelio fino al tessuto infiammato³⁴. Inoltre, mediante l'inibizione dell'interazione dei leucociti che esprimono $\alpha 4$ -integrina con i loro ligandi nella matrice extracellulare, natalizumab è anche in grado di sopprimere reazioni infiammatorie in atto in tessuti già infiammati. Pertanto, con questo duplice

meccanismo, questo anticorpo umanizzato è in grado sia di sopprimere l'attività infiammatoria presente in un'area infiammata sia di inibire un'ulteriore migrazione nei tessuti infiammati di cellule del sistema immunitario. Natalizumab viene somministrato per via endovenosa, ad una dose di 300 mg, ogni 4 settimane e, nonostante abbia rivoluzionato il trattamento della SM-RR, un monitoraggio regolare ed una continua valutazione del rapporto rischio/beneficio sono fondamentali per continuare a garantirne la sicurezza. È infatti noto che, uno degli effetti indesiderati più gravi associati al natalizumab è la leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML: *progressive multifocal leukoencephalopathy*), una malattia virale dovuta al virus di John Cunningham (JCV), che causa un severo stato di infiammazione generalizzata nella sostanza bianca cerebrale³⁵. Tale virus è presente in più dell'80% della popolazione e, nonostante rimanga latente nella maggior parte dei casi, può scatenare la malattia quando il sistema immunitario è fortemente indebolito, arrivando a causare esiti persino letali. Risultano infatti particolarmente colpiti dalla PML soggetti immunocompromessi o che soffrono di grave immunodeficienza³⁶. Inoltre, è stato dimostrato che il rischio di PML aumenta con trattamenti prolungati oltre i 2 anni e nei pazienti sieropositivi per il JCV³⁴. Infine, un'altra problematica associata alla terapia con natalizumab è correlata al fatto che circa 9% dei pazienti sviluppa anticorpi contro il farmaco e il 6% di essi diviene permanentemente immunizzata, portando ad una riduzione dell'efficacia e all'insorgenza di recidive³⁷.

- Ocrelizumab (Ocrevus), approvato in Italia nell'aprile 2018, è un anticorpo monoclonale umanizzato anti-CD20 progettato per colpire le cellule B CD20⁺, un tipo di cellula immunitaria ritenuta responsabile del danno alla mielina e all'assone che si verifica nella SM. Ocrelizumab è attualmente approvato come farmaco di seconda linea per il trattamento della SM-RR ma anche come farmaco di prima linea per pazienti adulti affetti da SM-PP. Il meccanismo d'azione di ocrelizumab non è stato del tutto chiarito, ma è noto che il farmaco induce l'immunomodulazione mediante la deplezione selettiva sia del numero che della funzione delle cellule B esprimenti CD20, portando a riduzione dell'infiammazione e dell'attacco autoimmune contro il SNC. In aggiunta, grazie alla selettività nei confronti delle cellule B CD20⁺, ocrelizumab non altera la funzionalità di altre cellule del sistema immunitario, portando alla riduzione delle recidive e al rallentamento dell'attività della malattia in pazienti con SM-RR e della progressione delle disabilità in pazienti SM-PP. Per

queste sue caratteristiche, ocrelizumab è generalmente ben tollerato, i principali effetti indesiderati comprendono: mal di schiena, depressione, reazioni nel sito di infusione, severa neutropenia, leucopenia ed infezioni delle vie respiratorie inferiori e superiori³⁸. Il piano terapeutico con ocrelizumab prevede un'infusione endovenosa ogni sei mesi alla dose di 600 mg. Ad oggi, questo farmaco rappresenta l'unica terapia efficace ed approvata per pazienti adulti affetti da SM-PP³⁹.

- Alemtuzumab (Lemtrada), è un anticorpo monoclonale umanizzato anti-CD52, approvato nel settembre del 2013 per pazienti affetti da SM-RR. CD52 è una glicoproteina di membrana presente sulla superficie di diversi tipi di cellule del sistema immunitario, in particolare linfociti T e B, monociti, macrofagi e cellule dendritiche. Alemtuzumab si lega specificatamente alla proteina CD52 innescando meccanismi immunologici, quali attivazione del complemento o fagocitosi, che portano alla distruzione delle cellule stesse. Questo porta ad una significativa deplezione dei linfociti B e T seguita da una lenta e regolata rigenerazione che permette di controllare la reazione autoimmunitaria nel lungo termine. Alemtuzumab, oltre ad essere impiegato nel trattamento che per la SM-RR, è utilizzato anche per la leucemia linfoide cronica^{40,41}.

Circa il 70-80% dei pazienti in terapia con alemtuzumab all'infusione del farmaco manifesta febbre, rush, nausea, ipotensione e meno frequentemente dispnea. Inoltre, è possibile che i pazienti manifestino trombocitopenia tra la seconda e la quarta settimana di trattamento e neutropenia fra la quarta e l'ottava settimana. La linfocitopenia severa è l'effetto indesiderato più comune nei pazienti e nella maggior parte dei casi predispone gli stessi a infezioni virali (e.g. virus varicella-zoster, herpes simplex)⁴². La posologia prevede la somministrazione endovenosa di due cicli di trattamento: il primo consiste in una somministrazione di 12 mg di farmaco al giorno per 5 giorni consecutivi, seguito da un secondo ciclo a distanza di dodici mesi che prevede somministrazione di 12 mg al giorno per 3 giorni consecutivi⁴³.

Farmaco	Linea	Meccanismo d'azione	Via di somministrazione	Posologia	Effetti avversi
Interferoni (INF-β)	1°	Inibizione della proliferazione di Th1, effetto antinfiammatorio	Intramuscolare, sottocutanea	1/3 volte alla settimana in base al tipo di interferone	Sintomi simil-influenzali, reazioni nel sito d'iniezione, febbre e mialgia
Glatiramer acetato (GA)	1°	Modulazione delle APC, riduzione di Th1 e Th17	Sottocutanea	20 mg una volta al giorno	Reazioni nel sito d'iniezione, vampate, dolori toracici, dispnea
Dimetil fumarato	1°	Attiva vie antiossidanti e antinfiammatorie (via Nrf2), rallentando demielinizzazione	Orale	-120 mg una volta al giorno per 7 gg -240 mg due volte al giorno	Vampate, sintomi gastrointestinali (nausea, diarrea), riduzione della conta dei linfociti, aumentato rischio di infezioni
Teriflunomide	1°	Inibizione DHODH, della sintesi di pirimidine e della proliferazione linfocitaria	Orale	14 mg una volta al giorno	Leucopenia, neutropenia, tossicità epatica, sintomi gastrointestinali, neuropatia periferica
Fingolimod	2°	Profarmaco, antagonista di S1P, diminuzione dei linfociti nel sangue	Orale	0,5 mg una volta al giorno	Leucopenia, neutropenia, disturbi GI, complicazioni neurologiche da herpes zoster, FAME
Natalizumab	2°	Anticorpo monoclonale, Inibitore delle integrina $\alpha 4 \beta 1$	Infusione EV	Ogni 4 settimane	Rischio di leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML), reazioni all'infusione, infezioni
Ocrelizumab	2°	Anticorpo monoclonale anti-CD20	Infusione EV	Ogni 6 mesi	Severa neutropenia, leucopenia, infezioni del tratto respiratorio superiore
Alemtuzumab	2°	Anticorpo monoclonale anti-CD52	Infusione EV	2 cicli, ad una distanza di 12 mesi	Reazioni all'infusione, trombocitopenia, neutropenia, leucopenia

Tabella 1. Principali farmaci utilizzati nel trattamento della sclerosi multipla. La tabella riassume le caratteristiche di ciascun farmaco: linea di utilizzo, meccanismo d'azione, via di somministrazione, posologia e principali effetti avversi.

In considerazione delle linee terapeutiche precedentemente descritte e riassunte in Tabella 1, è importante evidenziare come il piano terapeutico si riferisce strettamente allo stadio di avanzamento della patologia, ed è stabilito sulla base dell'algoritmo di seguito riportato (Figura 2).

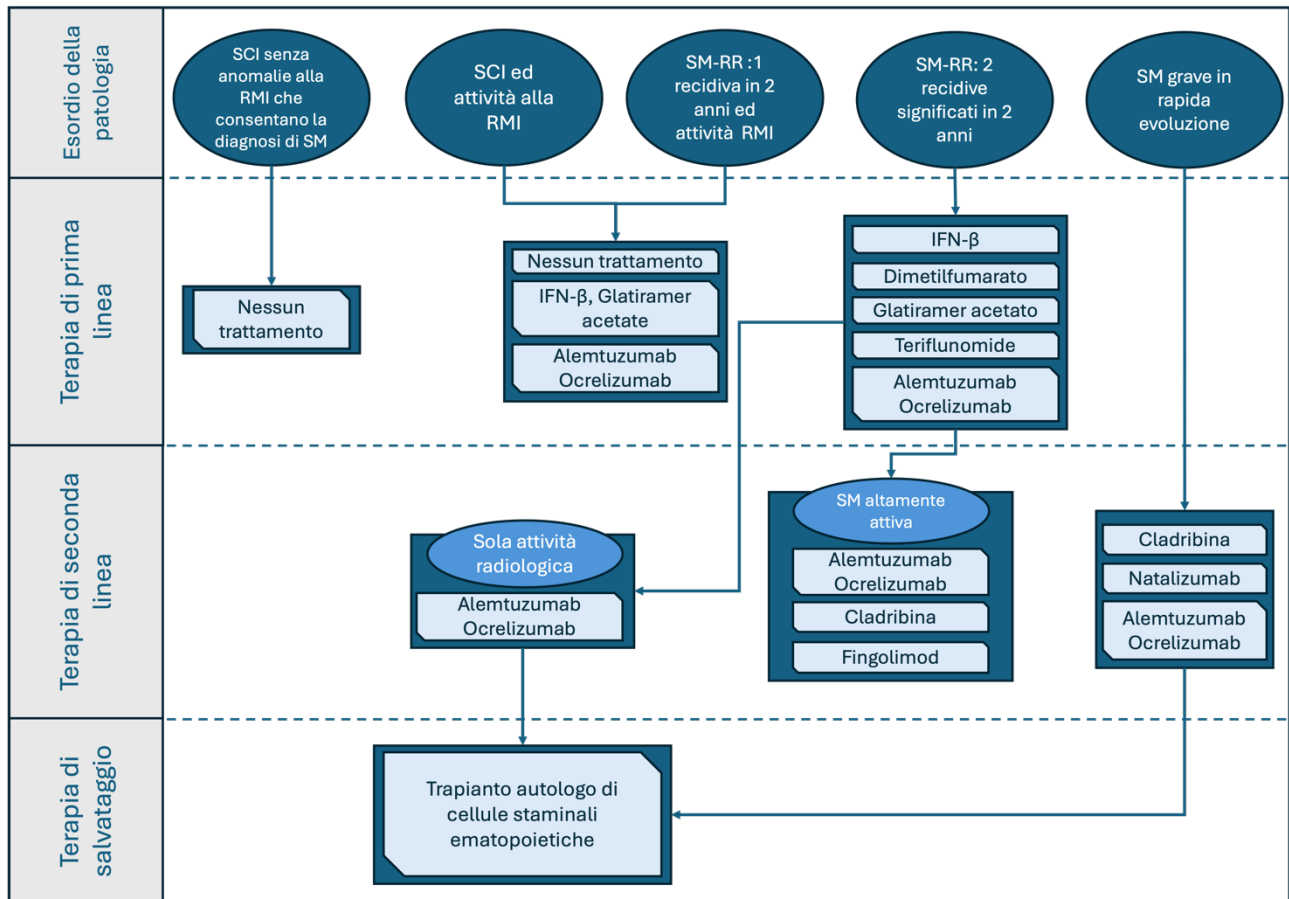


Figura 2. Algoritmo di trattamento per la SM.

2.1.2 Nuovi approcci terapeutici e bersagli farmacologici per la sclerosi multipla

Negli ultimi decenni sono stati esplorati diversi approcci terapeutici, come l'impiego di antigeni autoimmuni attraverso DNA, peptidi sintetici e proteine ricombinanti. Tuttavia, la loro complessità e l'elevata variabilità tra individui hanno portato a risultati non soddisfacenti negli studi clinici sull'uomo, e solo pochi approcci sono attualmente in fase di sperimentazione clinica preliminare^{44,45}.

In questo contesto, il vaccino a mRNA per la SM rappresenta un approccio innovativo, volto a ridurre l'autoimmunità senza compromettere la normale funzionalità del sistema immunitario. Questo metodo utilizza una formulazione liposomiale di mRNA codificato per antigeni specifici della SM, che viene veicolato verso le APC all'interno dei linfonodi. L'approccio induce una risposta delle cellule Th1 grazie al rilascio di IFN- α da parte delle APC stesse. La chiave di questo metodo è l'impiego di mRNA modificato con 1-metilpseudouridina (m1Y), che riduce le proprietà infiammatorie dell'mRNA e impedisce l'attivazione del recettore (*toll like receptor-7*, *TLR7*). Questa modifica promuove la tolleranza immunitaria nei tessuti linfatici, riducendo l'autoimmunità in modo mirato e minimizzando gli effetti collaterali⁴⁶.

Per quanto concerne lo studio di nuovi bersagli farmacologici nel contesto di SM, un nuovo promettente *target* è rappresentato da un meccanismo di regolazione del calcio (Ca^{2+}) intracellulare, definito *store-operated Ca^{2+} entry* (SOCE) o ingresso di Ca^{2+} capacitativo. Nel dettaglio, il meccanismo SOCE consiste nella capacità delle cellule di percepire una riduzione del Ca^{2+} nel reticolo endo(sarco)plasmatico (RE/RS) e indurre il conseguente ingresso di questo ione attraverso la membrana plasmatica⁴⁷. Le correnti di Ca^{2+} associate a SOCE sono state inizialmente identificate nei linfociti e nei mastociti, in cui i canali SOCE (definiti *CRAC*, *Ca^{2+} release-activated Ca^{2+}*) hanno dimostrato un ruolo cruciale nel differenziamento e nell'attivazione di diverse sottopopolazioni di linfociti T coinvolte nella regolazione della risposta immunitaria (e.g. mediazione dell'infiammazione e prevenzione della risposta autoimmune)⁴⁸. Nella SM, è stato dimostrato che le cellule B e T dei pazienti presentano un'iper-attivazione del meccanismo SOCE (e conseguente *overload* di Ca^{2+} citosolico), suggerendo, quindi, un ruolo chiave di SOCE nella fisiopatologia di questo disturbo^{49, 50, 51}. Recenti studi hanno, inoltre, evidenziato come la teriflunomide, sia in grado di modulare negativamente il meccanismo SOCE ad elevate concentrazioni, quali 20 μM e 50 μM , nella linea cellulare RBL-H1 (Rat Basophilic Leukemia-H1). Nel dettaglio, mediante

un approccio di *calcium imaging* con la sonda Fura-2, Rahman e colleghi hanno dimostrato la capacità della teriflunomide di inibire significativamente l'ingresso di Ca^{2+} SOCE-mediato⁵², aggiungendo questo meccanismo di azione a quello di inibizione dell'enzima DHODH.

Alla luce di tali premesse ed evidenze sperimentali, il meccanismo SOCE rappresenta un promettente bersaglio farmacologico per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche per la SM.

2.2 Store Operated Calcium Entry (SOCE)

SOCE è un meccanismo centrale nella regolazione del Ca^{2+} intracellulare e nel mantenimento dell'omeostasi del Ca^{2+} all'interno della cellula. In particolare, il meccanismo SOCE consiste nell'ingresso di Ca^{2+} attraverso la membrana plasmatica in risposta a una deplezione di questo ione a livello del RE.

L'idea di SOCE fu proposta negli anni '70 e '80 da numerosi studi di *calcium signaling* sulla funzione del Ca^{2+} come messaggero; tuttavia, solo nel 1986 James W. Putney ne formalizzò il concetto, dimostrando che le cellule possiedono riserve di Ca^{2+} intracellulari dalle quali questo ione può essere rilasciato in risposta a differenti stimoli fisiologici. Il rilascio di Ca^{2+} intracellulare stimola il reintegro di tale ione dai compartimenti extracellulari, dimostrando il ruolo fondamentale del Ca^{2+} extracellulare nel ripristino dei livelli fisiologici nei depositi intracellulari^{53, 47, 54}.

I principali componenti di SOCE sono due proteine: STIM (*Stromal Interaction Molecule*, *STIM*) ed ORAI (o *CRACM1: Calcium Release-Activated Calcium Channel Protein 1*).

La proteina STIM, di cui esistono 2 isoforme, STIM1 e STIM2, è localizzata sulla membrana del RE, dove funge da sensore di Ca^{2+} ^{47, 53}. STIM1 (Figura 3) è una proteina a singolo dominio transmembrana con 685 amminoacidi, maggiormente coinvolta nel funzionamento di SOCE rispetto a STIM2. La sua parte *N*-terminale si trova nel lume del RE ed è costituita da: (i) un dominio *EF-hand*, contenente residui di aspartato e glutammato per il legame al Ca^{2+} e preposto a percepire le variazioni delle concentrazioni di questo ione e (ii) un dominio *Sterile Alpha Motif* (SAM) per il mantenimento della corretta conformazione. La porzione C-terminale di STIM1, che costituisce la parte citosolica della proteina, è deputata all'interazione con ORAI1 in seguito alla deplezione del Ca^{2+} nel RE ed è caratterizzata da tre domini coiled-coil (CC) e da un dominio ricco in lisine (K-rich)⁵⁵.

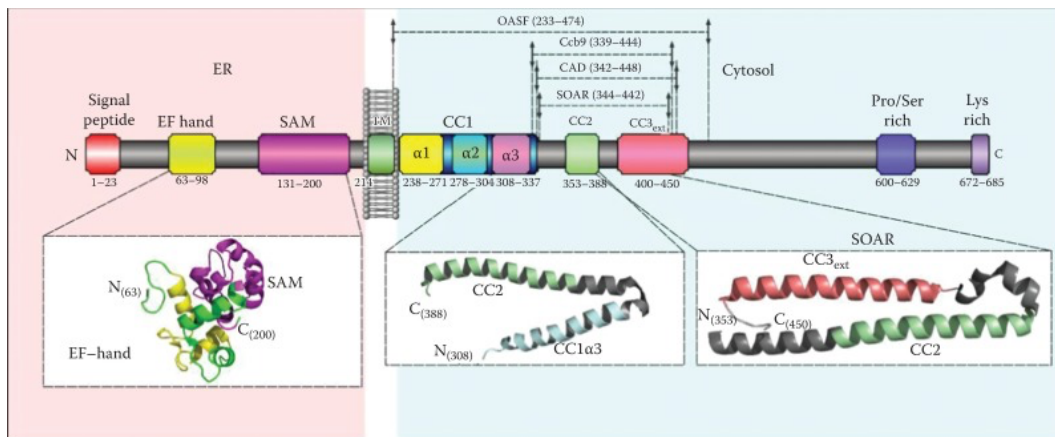


Figura 3. Rappresentazione schematica delle regioni principali di STIM1. NMR e struttura cristallina dei domini EF-hand, SAM e dei tre coiled-coil CC1, CC2 e CC3.
Groschner, K. et al. (2017). *(Store-Operated Ca^{2+} Entry (SOCE) Pathways - Emerging Signaling Concepts in Human (Patho)physiology. Second edition Springer.* ⁵⁶

La proteina ORAI, presente in 3 isoforme (1, 2, e 3), è localizzata sulla membrana plasmatica e appartiene ai CRAC, canali a struttura esamerica che regolano il flusso di ioni Ca^{2+} all'interno della cellula. L'isoforma ORAI1 (Figura 4), la più studiata e caratterizzata, è costituita da 301 amminoacidi e presenta quattro domini transmembrana rappresentati da domini α -elica (TM1-TM4) con un N e un C terminale citosolici. Il poro centrale è delimitato da sei domini TM1⁵⁷. È stato, inoltre, dimostrato che questi canali presentano una specifica corrente elettrofisiologica, detta I_{CRAC} , altamente selettiva per il Ca^{2+} e attivata, seppur con una cinetica lenta, in seguito alla deplezione di questo ione dagli store intracellulari⁵⁸.

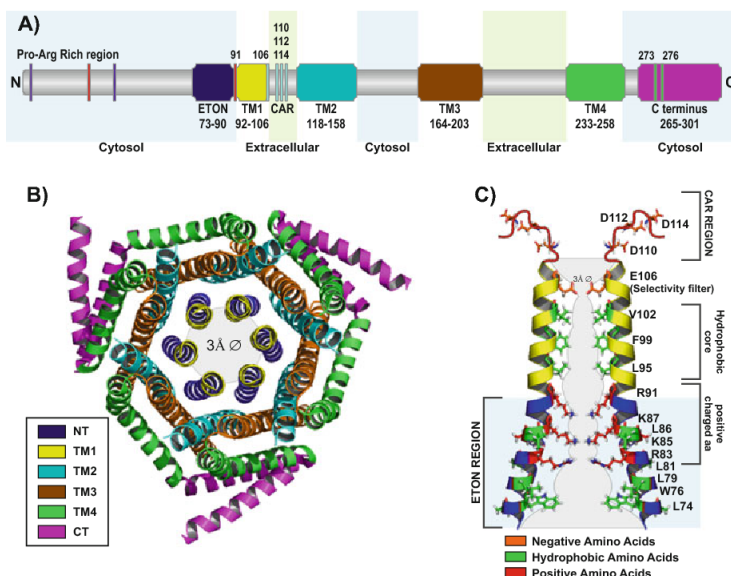


Figura 4. Rappresentazione schematica delle regioni principali di ORAI1.

(A) Rappresentazione schematica delle regioni principali della proteina. (B) Struttura cristallografica di un canale omologo isolato da *Drosophyla melanogaster*. (C) Rappresentazione del dominio TM1 con riferimento alle regioni principali che lo costituiscono.

Groschner, K. et al. (2017). *(Store-Operated Ca^{2+} Entry (SOCE) Pathways - Emerging Signaling Concepts in Human (Patho)physiology. Second edition Springer.* ⁵⁶

Il meccanismo SOCE (Figura 5)⁵⁹ si innesca attraverso una cascata di trasduzione del segnale, che parte dall'attivazione di specifici recettori, come i *T cell receptor* (TCR) o *G-protein coupled receptor* (GPCR), che determinano una deplezione dei depositi di Ca^{2+} intracellulari con conseguente attivazione dei canali CRAC⁵⁵.

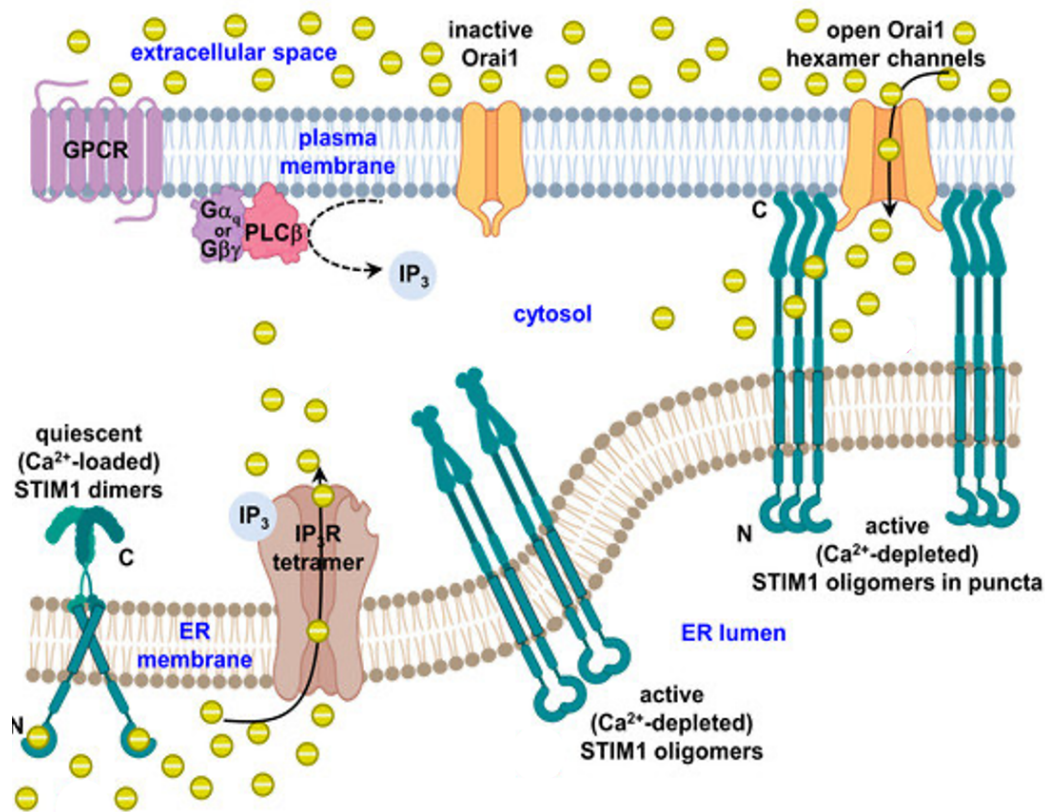


Figura 5. Meccanismo SOCE. Noble M. *et al.* 2020.⁵⁹

Questi recettori, posti sulla membrana plasmatica (*i.e.*, recettori α_1 -adrenergici e colinergici muscarinici M1, M3 e M5), in seguito all'attivazione, innescano un *pathway* di trasduzione del segnale, che vede inizialmente l'attivazione della fosfolipasi C (PLC) con conseguente idrolisi del substrato fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato (PIP_2), portando alla formazione di diacilglicerolo (DAG) e inositolo trifosfato (IP_3). Quest'ultimo, data la sua maggior idrofilia, diffonde nel citoplasma e raggiunge i recettori canale $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3\text{R}$ posti a livello della membrana del RE. L'attivazione di questi ultimi genera un flusso di ioni Ca^{2+} , secondo gradiente, dal lume dell'organello verso il citosol. La diminuzione della concentrazione di Ca^{2+} nel RE determina la dissociazione dello ione dalla regione EF-*hand* di STIM1 con conseguente dimerizzazione dei domini EF *hand*-SAM della proteina. In questa condizione, STIM1 subisce un cambiamento conformazionale nella parte C-terminale, passando da uno stato chiuso e inattivo ad uno stato esteso e attivato. Questo cambiamento permette la

dimerizzazione e la successiva oligomerizzazione della parte citoplasmatica di STIM1, formando una struttura definita "puncta". Questi cambiamenti conformazionali determinano una riduzione della distanza tra la membrana del RE e quella plasmatica, permettono il *binding* tra STIM1 e ORAI1. Questo processo porta all'apertura dei canali CRAC, permettendo il flusso di ioni Ca^{2+} all'interno della cellula⁵⁵. L'attivazione del canale ORAI1 avviene attraverso il legame con il dominio CAD (CRAC Activation Domain) di STIM1, il quale induce un cambiamento conformazionale che apre il poro centrale del canale, favorendo l'ingresso di Ca^{2+} nella cellula (Figura 5)⁵⁹. Infine, la pompa ATPasica SERCA (*Sarco-Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase*), che utilizza l'energia dell'idrolisi dell'ATP per trasportare ioni Ca^{2+} dal citoplasma al lume del RE, svolge un ruolo chiave per il successivo deposito di Ca^{2+} negli store.

In conclusione, è importante sottolineare che questo *crosstalk* tra la membrana del RE e la membrana plasmatica coinvolge anche altre proteine fondamentali, come i canali ionici *Transient Receptor Potential Canonical* (TRPCs)⁶⁰.

2.2.1 Ruolo fisiopatologico di SOCE

Il meccanismo SOCE svolge un ruolo chiave in differenti tipologie di cellule, organi e distretti corporei ed è fondamentale per la funzionalità fisiologica del tessuto muscolare e del sistema immunitario. SOCE partecipa infatti al differenziamento dei linfociti T, alla formazione delle fibre muscolari e all'attivazione piastrinica. Alterazioni a carico di questo meccanismo sono responsabili di uno squilibrio delle concentrazioni citoplasmatiche di Ca^{2+} , determinando così l'insorgenza di una serie di patologie fra cui: (i) patologie autoimmuni, come SM e lupus eritematoso sistemico (LES), (ii) immunodeficienze correlate a mutazioni *loss-of-function* di STIM1 e ORAI1, (iii) miopatie, distrofie e ipotonie muscolari e (iv) difetti di coagulazione correlabili ad un'aumentata funzionalità di STIM1 e ORAI1 o a mutazioni *gain-of-function* a loro carico^{61, 62}.

2.2.2 Ruolo di SOCE nel sistema immunitario e sue alterazioni nelle patologie autoimmuni

Nel contesto dei disordini autoimmuni, si può affermare che SOCE sia essenziale per molteplici funzioni cellulari nel sistema immunitario. Fra i differenti canali del Ca^{2+} , è noto che i canali CRAC svolgono un ruolo fondamentale nelle cellule immunitarie, soprattutto a

livello dei linfociti, la cui attivazione avviene attraverso una complessa cascata di segnalazione da cui derivano funzioni a breve e lunga durata.

Le funzioni a breve durata sono generalmente coinvolte nella modulazione della motilità dei linfociti e nella degranulazione delle cellule CD8⁺ T citotossiche. In particolare, l'interazione fra i recettori delle cellule T (TCR) o B (BCR) con le APC, determina un rapido aumento delle concentrazioni intracellulari di Ca²⁺ ^{63, 64}, portando all'arresto del movimento delle cellule T e alla formazione di sinapsi immunologiche.

Le funzioni a lunga durata richiedono, invece, un afflusso continuo di Ca²⁺ per mantenerne i livelli intracellulari superiori rispetto alla condizione basale anche per diverse ore ed includono l'espressione di geni correlati all'attivazione, alla produzione di citochine/chemochine e al differenziamento dei linfociti⁶⁵.

Durante la risposta immunitaria, l'attivazione dei recettori antigenici su cellule T e B innesca un rilascio di Ca²⁺ dai depositi intracellulari, principalmente dal RE. In seguito al legame fra i complessi antigene/MHC e TCR, si ha l'attivazione di una serie di proteine regolatorie, tra cui tirosinchinasi e la fosfolipasi C gamma 1 (PLC-γ1). Quest'ultima catalizza la formazione di inositolo trifosfato (IP₃) e diacilglicerolo (DAG) a partire dal fosfolipide di membrana, fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato (PIP₂). L'IP₃ attiva i recettori (IP₃R), consentendo l'efflusso di Ca²⁺ dal RE al citosol. In questo contesto, STIM, in quanto sensore di Ca²⁺ nel RE, rileva la riduzione della concentrazione dello ione attraverso i propri domini EF *hands* localizzati nel lume del RE. Conseguentemente, la dissociazione del Ca²⁺ da questi domini EF *hands* determina l'attivazione di STIM che porta alla formazione di tipici *clusters* a livello della membrana del RE, stabilendo così l'interazione con la subunità del canale ORAI1 e attivando il meccanismo SOCE⁶⁶.

L'influsso di Ca²⁺ nella cellula tramite ORAI determina un aumento della concentrazione intracellulare di questo ione portando all'attivazione di altre vie di segnalazione e fattori di trascrizione. Fra le vie di segnalazione attivate, quella Ca²⁺-calcineurina-NFAT (Figura 6) riveste un importante ruolo nel contesto delle patologie autoimmuni ed è oggetto di grande interesse. La calcineurina (CaN) è una serina/treonina fosfatasi, la cui attivazione è dipendente dalla calmodulina, una proteina messaggera che, legandosi al Ca²⁺, attiva diverse chinasi e fosfatasi, fra cui la CaN. La CaN è composta da una subunità catalitica, CaN A, che lega la calmodulina, e da una subunità regolatoria, CaN B. In seguito ad un aumento della concentrazione di Ca²⁺ nel citosol, la calmodulina si lega alla CaN determinando l'attivazione di quest'ultima e promuovendo la de-fosforilazione e la

conseguente traslocazione del fattore di trascrizione NFAT (fattore nucleare dei linfociti T attivati) nel nucleo, dove quest'ultimo regola la trascrizione di geni essenziali per l'immunità innata e adattativa⁶⁷.

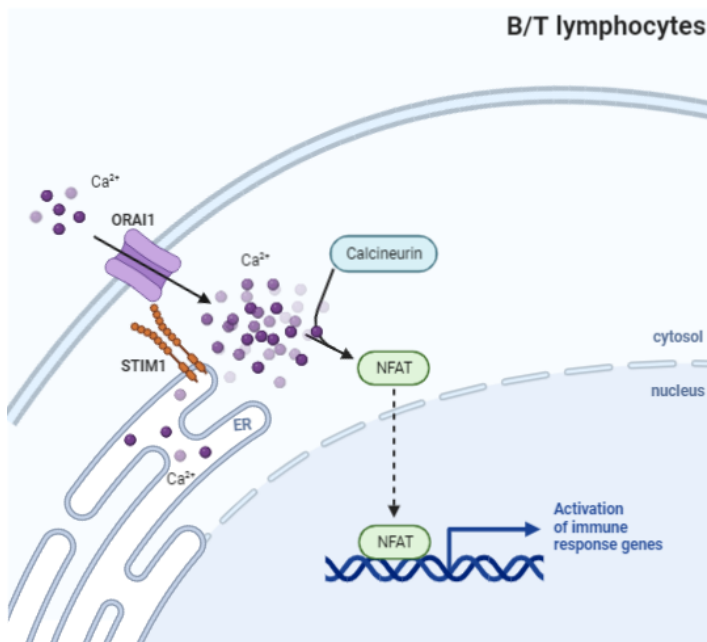


Figura 6. Meccanismo della via Ca^{2+} -calcineurina-NFAT.

Adattata da Park Y. J. et al. 2020.⁴⁸

La de-fosforilazione di NFAT mediata dalla CaN è quindi un passaggio cruciale per l'attivazione dei linfociti T, poiché consente la trascrizione di geni che regolano la produzione di citochine pro-infiammatorie e il differenziamento dei linfociti T-CD4⁺ in sottotipi effettori, tra cui Th1 e Treg.

Tra le citochine pro-infiammatorie maggiormente coinvolte nel contesto autoimmune, con particolare riferimento alla SM, vi sono:

- citochine prodotte da Th1, come IL-2 (interleuchina 2), la cui funzione principale è la stimolazione della proliferazione dei linfociti T ed il loro differenziamento in linfociti T effettori⁶⁸, ed IFN γ (interferone γ). Ad oggi la funzione di IFN γ è ancora controversa in quanto è associabile sia ad un avanzamento della patogenesi della SM in una fase iniziale della patologia, sia ad una riduzione della comparsa di ricadute in fasi più avanzate⁶⁹.
- citochine prodotte da Th17, come IL-17 (interleuchina 17), una famiglia di citochine composta da sei ligandi strutturalmente simili e cinque recettori associati, prodotta da diverse cellule dell'immunità innata ed adattiva, la cui disregolazione causa gravi danni ai tessuti e reazioni autoimmuni⁷⁰, e GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), il quale induce l'attivazione e la migrazione di cellule

mieloidi verso siti di infiammazione, stimolando il rinnovamento di granulociti e macrofagi⁷¹.

Sulla base di quanto descritto, il SOCE è coinvolto nella regolazione della risposta immunitaria (Figura 7). Di conseguenza, alterazioni a suo carico sono in grado di determinare un'attivazione incontrollata delle cellule T, portando a risposte immunitarie aberranti contro i tessuti autologhi⁴⁸.

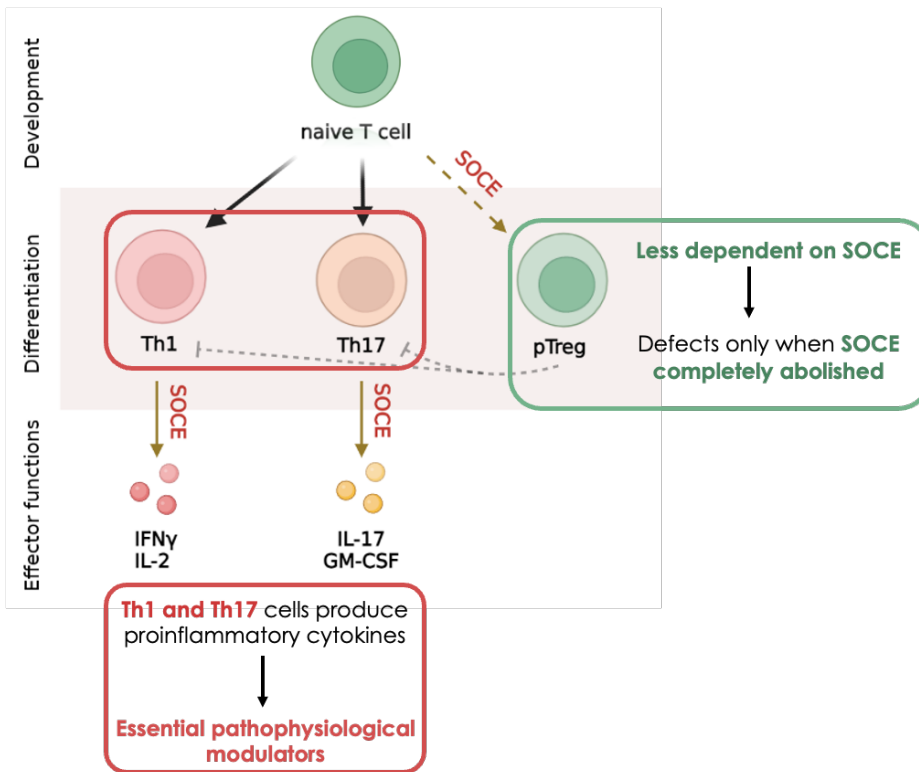


Figura 7. Rappresentazione grafica del coinvolgimento di SOCE nell'attivazione della risposta immunitaria. Adattata da Vaeth M. et al. 2020.⁵⁰

In questo contesto, evidenze di letteratura hanno riportato una correlazione diretta fra le alterazioni di SOCE e la SM. È stato, infatti, dimostrato che la delezione specifica di STIM1 o STIM2 a livello dei linfociti T protegge dall'insorgenza di encefalomielite autoimmune sperimentale (EAS), caratterizzante il modello murino di SM. Tale protezione è stata ricondotta all'assenza di STIM, che comporta una riduzione significativa della capacità dei linfociti T di mediare l'infiammazione nel SNC e, di conseguenza, il danno alla mielina¹⁰.

Ulteriori evidenze sono state discusse anche da Kaufmann e colleghi, i quali hanno dimostrato una gravità attenuata della encefalomielite autoimmune in seguito a delezione specifica o inibizione farmacologica di ORA11 nelle cellule T di topi EAS. In particolare, gli autori, in seguito ad una parziale inibizione dell'influsso di Ca^{2+} hanno evidenziato una

significativa riduzione di cellule T e di cellule dell'immunità innata nel SNC ed una produzione di citochine pro-infiammatorie (IL-17, IFN- γ e GM-CSF) quasi completamente abolita⁴⁹.

Questi studi suggeriscono, quindi, che la modulazione del meccanismo SOCE potrebbe non solo ridurre l'infiammazione, ma anche prevenire il danno neuronale, offrendo una protezione contro la progressione della malattia. Inoltre, da un punto di vista di sicurezza, poichè il SOCE è coinvolto a livello delle funzioni effettrici responsabili della produzione di citochine pro-infiammatorie Th1 e Th17 (a valle del differenziamento linfocitario), è possibile ipotizzare che un trattamento farmacologico con un modulatore negativo di SOCE possa essere ben tollerato e privo di effetti indesiderati associati ai farmaci immunosoppressori. Tale ipotesi trova riscontro anche da dati relativi alla molecola RP3128, modulatore di SOCE in trial clinico per il trattamento dell'asma, che risulta ben tollerato e privo di tossicità limitanti^{72, 73}. Tali evidenze suggeriscono un buon profilo di sicurezza associato all'inibizione di SOCE, rendendo questa strategia terapeutica attuabile anche in altre patologie croniche ed autoimmuni^{51, 74}.

2.2.3 Modulatori di SOCE

Ad oggi, sono noti una serie di composti in grado di modulare o inibire SOCE, ma la loro principale limitazione è correlata ad una scarsa efficacia e/o selettività⁷⁵. Fra queste molecole è possibile annoverare: (i) i lantanidi (Ga^{3+} , La^{3+}), bloccanti non selettivi dei canali cationici, (ii) il 2-amminoetil difenilborinato (2-APB), inibitore del recettore $Ins(1,4,5)IP_3R$, noto per avere effetti sia attivatori che inibitori su SOCE. È stato, infatti, dimostrato che 2-APB può potenziare il SOCE a basse concentrazioni micromolari, mentre a concentrazioni più elevate ne provoca inibizione⁷⁶.

Fra i modulatori di SOCE di seconda generazione, particolare attenzione è stata rivolta a *small molecules* con un maggior livello di selettività rispetto a 2-APB (e.g., Synta66, GSK7975A, CM4620).

Synta66 (GSK1349571A) è un inibitore selettivo dei canali CRAC, sviluppato da GlaxoSmithKline (GSK). Studi iniziali hanno dimostrato che tale molecola causa una significativa inibizione della corrente I_{CRAC} e del SOCE in linee cellulari linfocitarie di ratto RBL (Rat Basophilic Leukemia cells) e umane Jurkat, con un valore di IC_{50} inferiore a 1 μM . Inoltre, Synta66 è stato valutato in studi di selettività, mostrando un profilo farmacologico

selettivo, senza attività aggiuntiva su bersagli *off-target* (e.g., bersagli enzimatici, recettoriali e canali ionici) fino alla concentrazione di 10 μ M. Ad oggi, Synta66 non è in fase di sviluppo pre-clinico come modulatore del SOCE a causa di una serie di limitazioni da un punto di vista farmacocinetico, ma, grazie al suo ottimo profilo di selettività, viene utilizzato come *tool* farmacologico per lo studio del meccanismo in modelli *in vitro*⁷⁷.

In seguito, Hoffmann-La Roche indentificò la molecola RO2959, un potente inibitore di SOCE con valori IC₅₀ di circa 200 nM. Tale valore di potenza fu calcolato a seguito di pre-incubazione per 30-60 minuti, suggerendo un meccanismo di inibizione indiretto di ORAI1⁷⁸. Nel corso negli ultimi decenni, grande interesse è stato rivolto ad una serie di derivati di 3,5-bistrifluorometilpirazolo, indicati come BTP e divulgati da Abbott nel 2000⁷⁹. Nello specifico, BTP2 (Pyr2, YM-58483) è un potente inibitore di SOCE, ma con effetti pleiotropici su entrambi i canali ORAI e TRPC⁸⁰. Attualmente, viene utilizzato in modelli di studio *in vitro* per delucidare il ruolo di SOCE in contesti patologici come i disordini immunitari e il cancro⁸¹. Successivamente, sono stati identificati altri pirazoli (Pyr3). Pyr3, inizialmente suggerito come inibitore selettivo di TRPC3⁸², si è poi rivelato capace di inibire sia l'ingresso di Ca²⁺ mediato da TRPC3 che da ORAI1. Al contrario, i derivati pirazolici Pyr6 e Pyr10 sono in grado di distinguere tra l'ingresso di Ca²⁺ mediato da TRPC e da ORAI e mostrano maggiore potenza e selettività rispetto ai composti precedenti. Attualmente questi inibitori vengono ampiamente utilizzati per uno studio funzionale di questi canali in ambiti di ricerca di base per comprendere i dettagli del ruolo di SOCE nella fisiologia cellulare⁶¹.

Oltre alle molecole precedentemente descritte, è importante sottolineare che esistono alcuni modulatori di SOCE che hanno proseguito nelle fasi di *drug development* e si trovano attualmente in fase clinica per il trattamento di disturbi caratterizzati da iperattivazione di questo meccanismo. Tra questi, L-651582 (CAI), CM4620 e RP3128 hanno suscitato particolare interesse.

L-651582 (CAI) è stato il primo inibitore dei canali del Ca²⁺ non voltaggio-dipendenti a entrare in sperimentazioni cliniche per il trattamento del carcinoma polmonare metastatico. Sebbene il suo sviluppo fosse stato inizialmente interrotto a causa della mancanza di efficacia, recentemente sono stati avviati degli studi per il trattamento del glioblastoma⁸³. Lo studio clinico di Fase Ib per questa condizione patologica ha dimostrato che il farmaco possiede un buon profilo di tollerabilità senza tossicità dose dipendente⁸⁴.

Attualmente, diversi inibitori del SOCE sono oggetto di studi clinici per altre condizioni patologiche, tra cui la pancreatite acuta, considerato il ruolo chiave di SOCE nell'esocitosi

dei granuli di zimogeno⁸⁵. A questo proposito, il composto CM4620 (nota anche come Auxora), sviluppata dall'azienda californiana CalciMedica, ha completato gli studi clinici di Fase I e si trova attualmente in Fase II per la pancreatite acuta⁸⁶ e in Fase I/II per la pancreatite acuta associata ad asparaginasi, una forma della patologia scatenata dal trattamento con asparaginasi⁸⁷. Inoltre, grazie al suo potenziale nel ridurre l'infiammazione polmonare, CM4620 è in trial clinico di Fase II anche per il trattamento della polmonite grave da COVID-19⁸⁸. Un primo studio pubblicato nel 2021 relativo principalmente agli studi di Fase I, ha evidenziato che CM4620 possiede un discreto profilo di sicurezza, risultando ben tollerato dopo quattro giorni di trattamento alle dosi di 1.0 mg/Kg e 1.4 mg/Kg⁸⁹.

Infine, come precedentemente accennato, RP3128 rappresenta un altro modulatore di SOCE in fase clinica, sviluppato per il trattamento dell'asma. Dati relativi alla prima sperimentazione clinica di Fase I sull'uomo hanno dimostrato che anche questo farmaco risulta bene tollerato e privo di tossicità limitanti⁷³. Inoltre, uno studio clinico relativo al composto PRCL-2 per il trattamento della psoriasi, si trova attualmente in fase di arruolamento⁹⁰.

Dalle evidenze di cui sopra, è possibile affermare che la sicurezza associata all'inibizione di SOCE è gestibile anche da un punto di vista clinico e ciò ha reso questo meccanismo un nuovo ed interessante target farmacologico nei confronti del quale le aziende farmaceutiche stanno focalizzando in maniera significativa il loro interesse.

2.2.4 CIC-39 (3-(1-(2',3'dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl) benzoic acid)

Durante il mio progetto di tesi, che ho svolto presso ChemiCare Srl, spin-off del Dipartimento di Scienze del Farmaco (DSF), mi sono focalizzata in primo luogo sullo studio di un nuovo modulatore di SOCE (CIC-39, Figura 8) sviluppato da ChemiCare in collaborazione con il laboratorio della Prof.ssa Pirali e della Dott.ssa Di Martino.

La molecola CIC-39 si trova attualmente in fase di sviluppo preclinico e appartiene ad una nuova classe di molecole brevettate (bifenil triazoli)⁹¹.

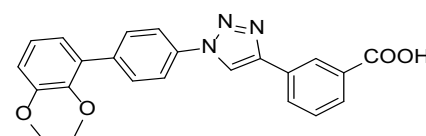


Figura 8. Struttura chimica di CIC-39.

Gli studi condotti finora hanno dimostrato che CIC-39 possiede un ottimo profilo sia in termini di sicurezza che efficacia terapeutica. In particolare, questo candidato farmaco: (i) inibisce il meccanismo SOCE con un'elevata potenza (inibizione del 96.5% a 3 μ M, IC₅₀ di 851 nM); (ii) è dotato di buona solubilità acquosa ed elevata stabilità metabolica *in vitro*; (iii) è

caratterizzato da un ottimo profilo farmacocinetico ($t_{1/2}$ 10 h, V_d 6,49 L/kg, C_{max} di 16248,8 $\mu\text{g/L}$) associato ad una biodisponibilità orale dell' 85% (in ratti e minipig) e da un eccellente profilo di sicurezza e tollerabilità (non mostra cardiotoxicità, mutagenicità e genotossicità alle dosi efficaci). Inoltre, CIC-39 ha dimostrato efficacia in due malattie rare causate da iperattivazione di SOCE: la distrofia muscolare di Duchenne (DMD), in cui riduce il danno muscolare nel modello murino di malattia *mdx*, e la miopatia ad aggregati tubulari (TAM), dove contrasta la trombocitopenia e il danno muscolare nel modello murino di malattia (KI-STIM1^{I115F})⁹². Tali risultati hanno permesso di ottenere la designazione di farmaco orfano per entrambe le patologie da parte dell'Agenzia Europea per i Medicinali (EMA)^{93,94}. Inoltre, recentemente lo stesso *status* è stato riconosciuto anche dalla Food and Drug Administration (FDA)⁹⁵.

Per quanto concerne il contesto delle patologie autoimmuni, dati preliminari su linfociti B di pazienti affetti da LES suggeriscono che CIC-39 è in grado di modulare la risposta immunitaria senza causare immunosoppressione.

Infine, ad ulteriore conferma dell'assenza di una compromissione del sistema immunitario, sono stati eseguiti trattamenti di 14 giorni con tre dosaggi di CIC-39 (60, 180, 300 mg/kg) nel modello preclinico di ratto (*Sprague-Dawley*), confermandone l'ottimo profilo di sicurezza con assenza di alterazioni del sistema immunitario, di segni clinici e di morte degli animali.

Composti	Attività inibitoria su SOCE	Selettività
Lantanidi	Inibizione totale di SOCE a concentrazioni inferiori al micromolare	Non selettivo per SOCE. Blocca altri canali cationici come canali voltaggio dipendenti e canali TRP
2-APB	Attivazione di SOCE a concentrazioni micromolari e inibizione ad elevate concentrazioni	Selettivo per i canali potassio, pompe SERCA, TRPV1, canali TRPM8
Pyr2 BTP2	IC ₅₀ TRPC3 4.21 μM IC ₅₀ STIM1/ORAI1 0.59 μM	Blocca TRV1, VOCCs e TRPM8
Pyr3	IC ₅₀ TRPC3 0.54 μM IC ₅₀ STIM1/ORAI1 0.54 μM	Blocca TRV1, VOCCs e TRPM8
Pyr6	IC ₅₀ TRPC3 18.46 μM IC ₅₀ STIM1/ORAI1 0.49 μM	Blocca TRV1, VOCCs e TRPM8
Pyr10	IC ₅₀ TRPC3 0.72 μM IC ₅₀ STIM1/ORAI1 13.08 μM	Blocca TRV1, VOCCs e TRPM8
Synta66	IC ₅₀ : 1.4 μM (IC _{RAC} in cellule HEK293)	Selettivo, metabolicamente instabile
CAI (L-651582)	IC ₅₀ : 0.5 μM (IC _{RAC} in cellule HEK293)	Bassa selettività
RO2959	IC ₅₀ : 400 nM (IC _{RAC} in cellule RBL-2H3)	Nessun dato riportato sulla selettività per i canali CRAC

CM4620	IC ₅₀ : ~ 500 nM (in cellule HEK293)	Dichiarato come selettivo ma non vengono forniti dati sperimentali. In sperimentazione clinica per pancreatite acuta e polmonite grave da COVID-19
RP3128	IC ₅₀ : ~ 200 nM (in cellule Jurkat)	Buon profilo di sicurezza e farmacocinetica. Studio clinico di Fase I suggerisce la potenzialità di sviluppo per patologie infiammatorie.
PRCL-2	IC ₅₀ : N.R.	In sperimentazione clinica per il trattamento della psoriasi.
CIC-39	IC ₅₀ : ~ 800 nM (in cellule HEK293) ~ 500 nM (in cellule Jurkat)	Selettivo e privo di effetti off-target Dotato di: buona solubilità acquosa; elevata stabilità metabolica <i>in vitro</i> ; ottimo profilo farmacocinetico associato ad elevata biodisponibilità orale; eccellente profilo di sicurezza e tollerabilità. Efficace in modelli murini di DMD e TAM.

Tabella 2. Composti con proprietà modulanti il meccanismo SOCE. N.R.= non riportata.

Inoltre, considerando quanto dimostrato in letteratura per il farmaco teriflunomide, ovvero la sua capacità di inibire non solo il suo principale target, l'enzima DHODH (IC₅₀ 0.4 μ M)⁹⁶, ma anche il SOCE a partire dalla concentrazione 10 μ M, durante il mio percorso di tesi mi sono occupata della valutazione preliminare di nuove molecole *dual-target* SOCE/DHODH in collaborazione con il laboratorio di chimica farmaceutica della Prof.ssa Pirali e della Dott.ssa Di Martino. La rilevanza dell'approccio *dual-targeting* SOCE/DHODH risiede in un potenziale sinergismo terapeutico che può essere ottenuto da nuove molecole in grado di modulare entrambi i target in modo bilanciato (Figura 9). In questo scenario, un'interessante prospettiva può essere rappresentata da molecole dotate di una bassa affinità per la DHODH e una moderata affinità per il SOCE. Questo approccio potrebbe fornire un equilibrio ottimale tra l'inibizione della risposta autoimmune e il mantenimento di una sufficiente risposta immunitaria, minimizzando così gli effetti collaterali associati all'immunosoppressione.

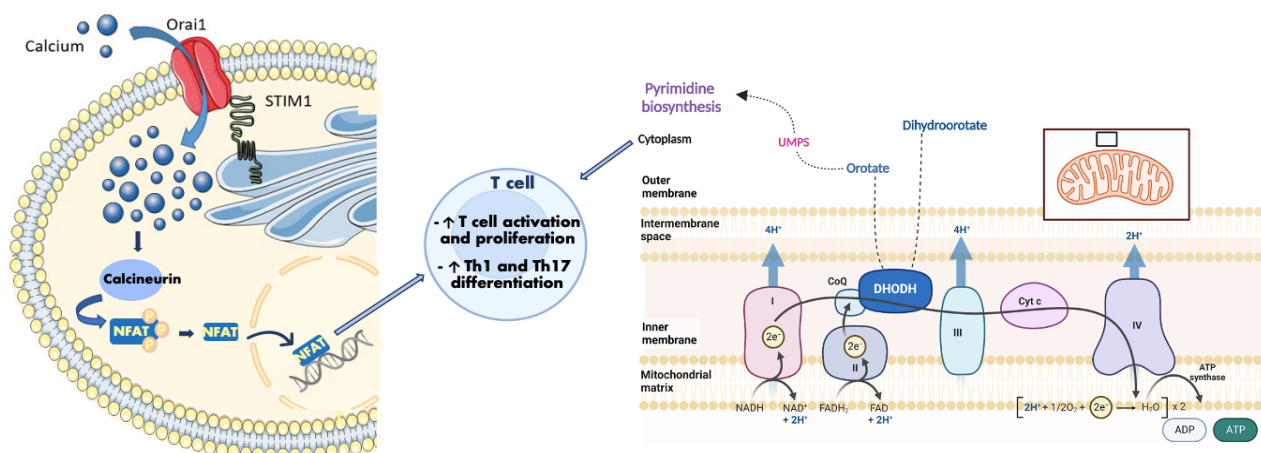


Figura 9. Rappresentazione schematica delle funzioni e degli effetti di SOCE e DHODH nell'attivazione e nella proliferazione dei linfociti T.

3. Scopo del lavoro

La SM è una malattia autoimmune cronica del SNC caratterizzata da infiammazione, neurodegenerazione e demielinizzazione. Nel corso degli anni, diversi farmaci sono stati sviluppati per ridurre la progressione della malattia, modulare la risposta immunitaria e attenuare i sintomi. Tuttavia, nonostante i progressi negli approcci terapeutici, la mancanza di una completa elucidazione dei meccanismi molecolari alla base della SM, unita ai significativi effetti invalidanti dei farmaci attualmente disponibili, evidenzia la necessità di nuove ricerche mirate all'identificazione di nuovi bersagli molecolari e approcci terapeutici. La letteratura esaminata in questo lavoro di tesi suggerisce che un elemento cruciale nei processi infiammatori della SM è il SOCE (*Store-Operated Calcium Entry*), un meccanismo di regolazione del Ca^{2+} , che controlla l'ingresso di questo ione nei linfociti, in risposta alla deplezione degli *stores* intracellulari nel RE. Alterazioni a carico di SOCE sono state riscontrate nei linfociti di pazienti affetti da SM, e considerate la causa fisiopatologica di una risposta infiammatoria eccessiva e di una regolazione immunitaria disfunzionale. Pertanto, modulare negativamente questo meccanismo rappresenta una potenziale strategia terapeutica per ridurre l'infiammazione e la demielinizzazione causate dalla malattia.

Nel mio lavoro di tesi sperimentale ho analizzato l'efficacia di un modulatore negativo di SOCE, denominato CIC-39, sui linfociti di pazienti con SM-RR. In particolare, ho studiato come il trattamento con CIC-39 influenzi la risposta immunitaria, valutando la capacità del composto di modulare l'attivazione e la proliferazione cellulare, ma senza causare immunosoppressione.

Inoltre, sulla base di recenti studi che hanno evidenziato come il farmaco teriflunomide, inibitore dell'enzima DHODH e approvato per il trattamento della SM, sia in grado di modulare negativamente SOCE ad elevate concentrazioni, parte del mio lavoro di tesi si è focalizzato sulla valutazione di potenziali inibitori *dual-targeting* SOCE/DHODH. Questa valutazione ha portato all'identificazione della molecola denominata composto 10 come potenziale nuovo approccio terapeutico per il trattamento della SM.

4. Materiali e metodi

I protocolli relativi agli esperimenti condotti durante il mio periodo di tesi che hanno previsto l'utilizzo di campioni umani si riferiscono allo studio clinico sperimentale con impiego di campioni biologici dal titolo "Studio di inibitori dello *store-operated calcium entry* nelle cellule immunitarie derivanti da pazienti affetti da Sclerosi Multipla" approvato con codice identificativo CE152/2024 dal Comitato Etico Interaziendale dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Maggiore della Carità di Novara in (codice identificativo CE152/2024).

4.1 Isolamento ed estrazione di cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs) da sangue intero

Le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) sono state isolate da campioni di sangue di pazienti affetti da SM e da volontari sani come previsto mediante centrifugazione in gradiente di densità con soluzioni a base di Ficoll.

Dopo il prelievo, i campioni di sangue intero sono stati inizialmente diluiti con il mezzo di coltura Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640, Sigma Aldrich) in rapporto 1:1. Successivamente, è stata preparata una miscela contenente due soluzioni a base di Ficoll Histopaque H-11191 e H-10771 (Sigma Aldrich) in rapporto 1:1 a cui è stato aggiunto un volume equivalente dei campioni di sangue precedentemente diluiti in RPMI-1640. Al termine di questo passaggio, i campioni sono stati sottoposti a centrifugazione a 300 g(RCF) (accelerazione 3, decelerazione 2) per 30 minuti a temperatura ambiente (TA). Al termine della centrifugazione è stato ottenuto un sistema multifasico con uno specifico anello di separazione contenente le PBMCs (Figura 10).

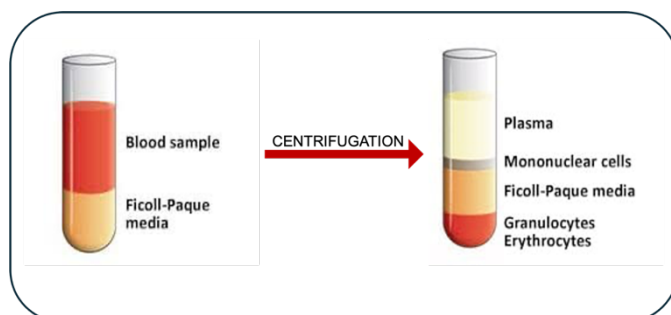


Figura 10. Schema grafico della procedura di isolamento delle PBMCs.

Adattato da www.sigmaaldrich.com

Le PBMCs ottenute sono state sottoposte a lavaggi con buffer salino a pH 7.2 (PBS) e, per gli esperimenti condotti su cellule B, sottoposte a separazione magnetica con REAlease CD19 MICROBead KIT, human (Miltenyi Biotec) secondo le istruzioni fornite dall'azienda

produttrice. Per quanto riguarda gli esperimenti condotti su linfociti T CD4⁺, al momento della piastratura è stato effettuato un *coating* con anticorpo anti-CD3 (OKT3, Miltenyi Biotec) alla concentrazione di 1 µg/mL, per 2/3 ore circa prima dell'uso, ad una temperatura di 4°C, seguita da un lavaggio con PBS. La selezione di questa sottopopolazione è stata effettuata in citofluorimetria, con l'anticorpo specifico *CD4 Monoclonal Antibody (S3.5)*, *APC-Cyanine5.5* (Thermo Fisher Scientific).

4.2 Colture cellulari

Nel mio progetto di tesi sono state utilizzate sia PBMCs umane che la linea cellulare immortalizzata di linfociti T umani (Jurkat). Le PBMCs umane, isolate come descritto in precedenza, sono state coltivate in mezzo di coltura RPMI-1640 addizionato con siero fetale bovino (decomplementato termicamente a 57°C per 30 minuti), L-glutamina 50 µg/mL, penicillina 10 U/mL e streptomina 100 µg/mL in presenza delle seguenti citochine:

- Interleuchina 21 (IL-21, Miltenyi Biotec, 25 µg/mL) utilizzata ad una concentrazione di 50 ng/mL
- Interleuchina 4 (IL-4, Miltenyi Biotec, 25 µg/mL) utilizzata ad una concentrazione di 25 ng/mL
- Interleuchina 2 (IL-2, Miltenyi Biotec, 50 µg/mL) utilizzata ad una concentrazione di 20 ng/mL
- Anti-CD40 (Miltenyi Biotec, 100 µg/mL) utilizzata ad una concentrazione di 1 µg/mL
- IgM (Immunoglobuline-M, Miltenyi Biotec, 1 µg/mL) utilizzata ad una concentrazione di 1 µg/mL solamente in linfociti B CD19⁺

Il mantenimento e le incubazioni sono stati effettuati a 37°C in atmosfera modificata satura d'acqua con CO₂ al 5%. La linea cellulare Jurkat è stata mantenuta in coltura nelle stesse condizioni, ma in assenza di citochine.

4.3 Saggio di vitalità con bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT)

Il saggio MTT misura l'attività metabolica delle cellule pertanto è un indicatore della proliferazione e della vitalità cellulare. È un saggio di tipo colorimetrico che si basa sulla riduzione di un sale di tetrazolio giallo a cristalli viola di formazano da parte di cellule

metabolicamente attive. In questo progetto il saggio MTT è stato svolto nella linea cellulare Jurkat. Per quanto riguarda i trattamenti con CIC-39, le cellule sono state trattate alla densità iniziale di 5×10^4 e poste in piastra da 96 pozzetti (100 μ L per pozzetto). Allo scadere dei tempi di trattamento di 72 ore (h), al terreno di coltura è stato aggiunto MTT (Sigma) alla concentrazione di 2.5 mg/mL. In seguito ad un'incubazione di 90 minuti (37°C, 5% CO₂), la reazione colorimetrica è stata arrestata mediante l'aggiunta di una soluzione di 2-propanolo addizionato con triton 10% e acido cloridrico 0.1%, in modo da garantire la solubilizzazione di cristalli. L'assorbanza di ogni campione è stata valutata alla lunghezza d'onda di 570 nm mediante analisi spettrofotometrica con lo strumento 1420 Multilabel Counter Victor³ V. Per quanto concerne la valutazione degli inibitori duali SOCE/DHODH, le cellule Jurkat sono state trattate (densità 5×10^4), per 72 h con i composti di interesse alla concentrazione di 50 μ M, in presenza o assenza di uridina (100 μ M), substrato di DHODH, al fine di valutare gli effetti di tali composti sull'enzima. Le analisi spettrofotometriche sono state effettuate come sopra descritto.

4.4 Disegno sperimentale dei trattamenti utilizzati in PBMCs

Il protocollo sperimentale utilizzato per il trattamento delle PBMCs da pazienti e volontari sani con i relativi saggi è illustrato come segue (Figura 11).

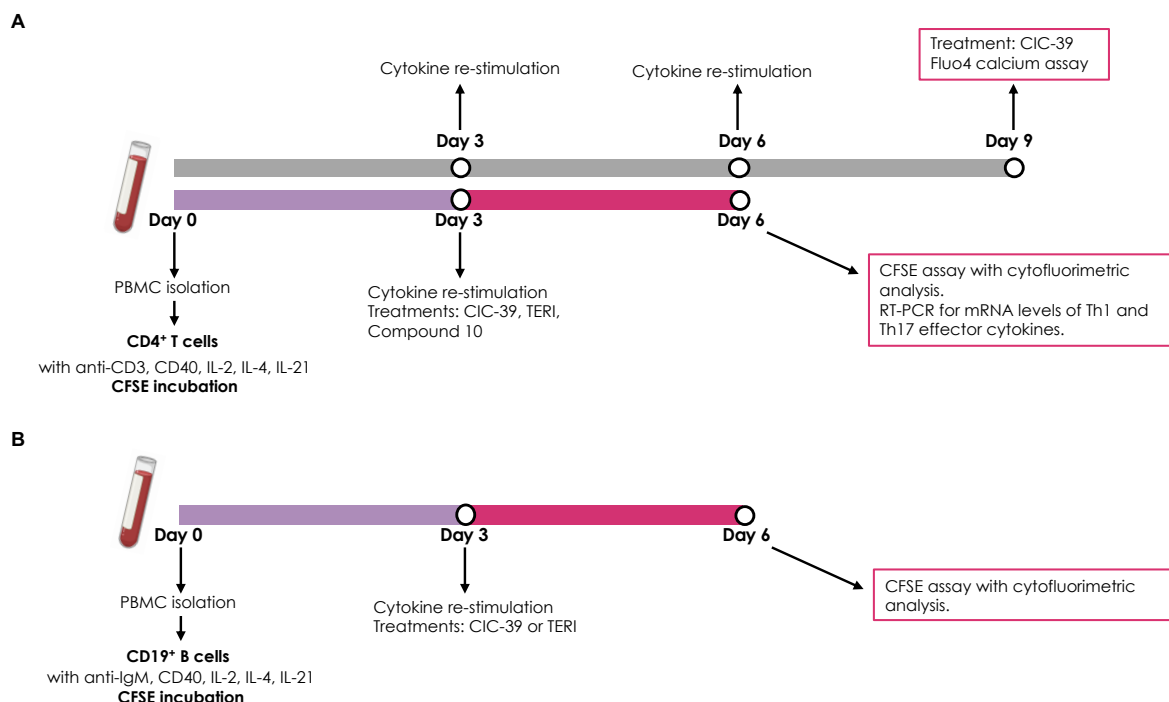


Figura 11. Protocollo sperimentale utilizzato per il trattamento e la stimolazione di linfociti T CD4⁺ (A) e linfociti B CD19⁺ (B).

4.4.1 Saggio di proliferazione con il colorante fluorescente 5(6)-carbossifluoresceina diacetato *N*-succinnimidil estere (CFSE)

CFSE (CellTrace Thermo Fisher Scientific) è un marcatore utilizzato per il tracciamento della proliferazione cellulare, comunemente impiegato per studi su cellule in coltura, ma anche in esperimenti *in vivo*. Nello specifico, la molecola penetra per diffusione nelle membrane cellulari, qui viene convertita in un derivato fluorescente dalle esterasi cellulari. L'estere attivo si lega covalentemente ai gruppi amminici delle proteine, rendendo possibile la permanenza del colorante nella cellula anche in divisioni cellulari successive.

La fluorescenza, che decresce progressivamente, viene rilevata attraverso citometria a flusso e permette di tracciare il numero di divisioni a cui le cellule sono andate incontro, quindi il numero di generazioni in base all'intensità del segnale emesso.

Nel mio progetto di tesi, il saggio di proliferazione con CFSE è stato utilizzato per valutare l'effetto dei trattamenti con CIC-39 e composto 10 (3 μ M, 10 μ M, 72h di trattamento) sulla proliferazione e sul numero di generazioni di PBMCs derivanti da pazienti affetti da SM.

4.4.2 Analisi del Ca^{2+} Intracellulare

I livelli intracellulari di Ca^{2+} sono stati valutati in PBMCs di pazienti affetti da SM-RR e volontari sani in presenza e assenza dei seguenti trattamenti: CIC-39, composto 10 (3 μ M, 10 μ M) ed in cellule Jurkat trattate con nuovi inibitori *dual-targeting* SOCE/DHODH (10 μ M). Per questa metodica, le cellule sono state incubate in KREB-Ringer buffer (KRB, 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM KH_2PO_4 , 1 mM MgSO_4 , 5.5 mM glucose, 20 mM HEPES, pH 7.4) con il tracciante fluorescente Fluo-4-AM (1 μ M) addizionato di acido pluronico al 2% e 10 μ M sulfinpirazone per 30 minuti a TA. Al termine della prima incubazione, le cellule sono state poste per ulteriori 30 minuti in KRB-Ringer buffer al fine di consentire la desterificazione del Fluo-4-AM. Per valutare il SOCE, le variazioni di Ca^{2+} citosolico sono state analizzate in seguito allo svuotamento degli *stores* intracellulari del RE indotto ponendo le cellule in una soluzione priva di Ca^{2+} contenente 500 μ M EGTA e *t*-BHQ (terz-butildidrochinone) 50 μ M (Sigma-Aldrich), inibitore specifico di SERCA, una Ca^{2+} ATPasi di tipo P presente nel RE. Al termine di questa fase, è stata effettuata una addizione di Ca^{2+} 2 mM dall'ambiente esterno che ha permesso la valutazione del SOCE.

Lo schema riportato di seguito riassume il protocollo utilizzato per le misurazioni sopradescritte (Figura 12).

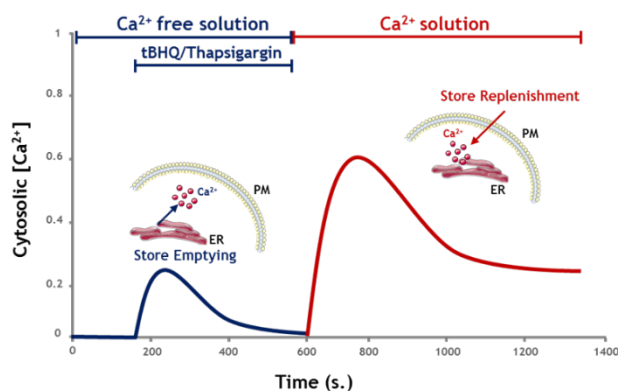


Figura 12. Protocollo sperimentale per la valutazione di SOCE.

La fluorescenza è stata valutata ad una lunghezza d'onda di 516 nm mediante lo strumento 1420 Multilabel Counter Victor³ V. Al fine di generare delle curve temporali, la fluorescenza è stata monitorata in sequenza per almeno 300 in secondi.

4.4.3 Real Time PCR

La Real-Time PCR (Polymerase Chain Reaction), è una tecnica che permette di misurare l'amplificazione durante la fase esponenziale di PCR, sfruttando sonde fluorescenti, e rendendo la metodica più accurata rispetto alla PCR tradizionale.

Le strategie utilizzate per monitorare in tempo reale l'amplificazione sono molteplici, ma nel caso specifico di questo progetto di tesi, è stata utilizzata la sonda fluorescente SYBR Green. Il colorante agisce intercalandosi nella doppia elica di DNA e, successivamente è possibile stabilire il numero di copie di sequenza amplificata sulla base della fluorescenza emessa.

La realizzazione di questa tecnica prevede delle metodiche propedeutiche all'ottenimento del materiale necessario ed in particolare, nel caso di questo progetto di tesi, si tratta dell'estrazione dell'RNA cellulare e la successiva retrotrascrizione di questo a cDNA.

Al termine dei trattamenti sopradescritti (CIC-39 3, 10 μ M; composto 10 10 μ M e teriflunomide 10 μ M), l'RNA totale è stato isolato utilizzando il reagente TRIzol (Ambion-Life Technologies), che permette la lisi delle cellule pur mantenendo intatto il materiale genetico. L'RNA è stato successivamente sottoposto ad un processo di retrotrascrizione al fine di ottenere il cDNA da utilizzare per la metodica di Real-Time PCR. Nel dettaglio, la metodica di retrotrascrizione è una tecnica che permette di sintetizzare una molecola di cDNA partendo dall'RNA utilizzato come stampo, servendosi di un enzima specifico, la trascrittasi inversa.

Questo protocollo è stato effettuato seguendo le linee guida fornite dall'azienda produttrice SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit (Meridian Bioscience). Al termine di questo procedimento, il cDNA è stato conservato alla temperatura di -20°C fino al momento dell'utilizzo.

Le Real Time PCR sono state eseguite su piastre da 96 pozzetti (CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems, Bio-Rad Inc), in triplicato e con intensità di fluorescenza valutata utilizzando i CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad Inc.).

I primers utilizzati sono riportati di seguito: *human* INF- γ : forward 5'-TGGAAGAGGAGAGTGACAGA-3', reverse 5'-CACTCTTTTGGATGCTCTGGT-3'; *human* IL-2: 5'-CCAAGAAGGCCACAGAACTG-3'; reverse 5'-AGTCCCTGGGTCTTAAGTGA-3'; *human* IL-17: forward 5'-TACAACCGATCCACCTCACC-3', reverse 5'-ACTTTGCCTCCCAGATCACA-3'; *human* GM-CSF: forward 5'-CCAGCCACTACAAGCAGCA-3', reverse 5'-CAAAGGGGATGACAAGCAGA-3'.

La temperatura di *annealing* fissata a 60°C. I livelli dei trascritti sono stati normalizzati all'espressione dei livelli di mRNA della proteina ribosomiale S18 (forward: 5'-TGCGAGTACTCAACACCAACA-3', reverse: 5'-CTGCTTTCCTCAACACCACA-3') e per ogni gene è stato calcolato il *threshold cycle* (ΔCt).

4.5 Analisi Statistiche

I dati sono presentati come media $\pm$ errore standard della media (SEM). La normalità delle distribuzioni dei dati è stata valutata con il test di Shapiro Wilk. Per la comparazione dei dati sono state utilizzate analisi statistiche parametriche (*unpaired* t-test di Student, *ordinary one-way* Anova) o non parametriche (Mann-Whitney test, Kruskal - Wallis test). Tutte le valutazioni statistiche sono state bidimensionali e un valore di $P < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo. Le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., USA).

5. Risultati e Discussione

5.1 Caratterizzazione delle alterazioni di SOCE e dell'efficacia di CIC-39 in PBMCs derivanti da pazienti affetti da SM-RR

Al fine di stabilire una correlazione fra l'iperattivazione di SOCE e la fisiopatologia della SM, sono stati eseguiti esperimenti volti a determinare la concentrazione di Ca^{2+} intracellulare in PBMCs derivanti da pazienti affetti da SM-RR (alla diagnosi o in fase di *wash out*) in comparazione con volontari sani (HV).

La valutazione del SOCE è stata effettuata con un protocollo standard, nel quale, come descritto nella sezione Materiali e Metodi (paragrafo 4.4.2), è previsto un iniziale svuotamento degli *stores* intracellulari del RE indotto ponendo le cellule in una soluzione priva di Ca^{2+} e contenente *t*-BHQ, un inibitore della SERCA, seguita da una fase di ri-addizione di una soluzione contenente Ca^{2+} 2 mM, in modo tale da valutare l'ingresso di questo ione all'interno delle cellule.

La figura 13A, riporta le tracce medie di due esperimenti rappresentanti i livelli di SOCE in due pazienti affetti da SM-RR. Dalle tracce di Ca^{2+} si evince come le PBMCs derivanti da pazienti affetti da SM-RR presentino livelli di Ca^{2+} citosolico maggiori rispetto alle PBMCs derivanti da soggetti sani. Pertanto, a conferma delle ipotesi precedentemente discusse e di quanto già riportato in letteratura nel modello murino EAS, in un modello *ex vivo* di SM, *i.e.*, PBMCs derivanti da pazienti, è possibile identificare un'iper-attivazione del SOCE e un suo diretto coinvolgimento nella fisiopatologia della SM.

Parallelamente, con l'obiettivo di valutare se il modulatore di SOCE, CIC-39, fosse in grado di contrastare l'iperattivazione di questo meccanismo, sono stati eseguiti esperimenti analoghi in presenza di tale composto a 3 μM e 10 μM , concentrazioni che hanno già dimostrato efficacia e tollerabilità in altri modelli *in vitro* ed *ex vivo*^{97,98}. Come mostrato in Figura 13A, il trattamento con CIC-39 determina un'inibizione significativa di SOCE, portando i livelli di Ca^{2+} a dei valori simili a quelli osservati nelle PBMCs derivanti da soggetti sani, suggerendo quindi la sua efficacia nel ristabilire le condizioni fisiologiche.

I risultati sopra descritti trovano riscontro anche nelle analisi quantitative volte a valutare alcuni parametri fondamentali, area sottesa alla curva (AUC) e picco massimo. Per quanto riguarda l'AUC, rappresentativa della quantità di Ca^{2+} presente all'interno della cellula, la Figura 13B mostra sia come le PBMCs derivanti da pazienti SM-RR presentino livelli

significativamente più elevati rispetto alle cellule derivanti da soggetti sani, ma anche come tali livelli vengano significativamente ridotti dal trattamento con CIC-39 ad entrambe le concentrazioni studiate. Evidenze analoghe all'AUC sono state identificate anche per il picco massimo, come mostrato in Figura 13C.

Questi dati dimostrano come l'iperattivazione di SOCE sia coinvolta nella fisiopatologia della SM, rendendo questo meccanismo un potenziale nuovo target farmacologico e CIC-39 un promettente modulatore negativo anche in questo contesto patologico.

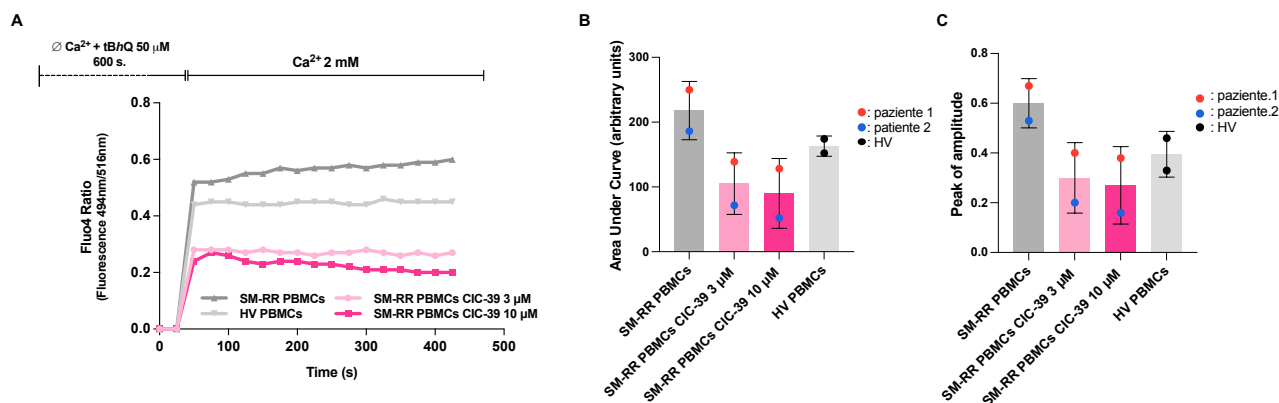


Figura 13. Caratterizzazione dell'effetto CIC-39 dell'alterazione SOCE sulla modulazione del Ca^{2+} nelle PBMCs derivati dai pazienti con SM.

(A) Tracce rappresentative di SOCE in PBMCs derivate da 2 HV e 2 pazienti affetti da SM-RR in presenza o assenza di CIC-39 (3 μM e 10 μM). Le tracce rappresentano la media di almeno 6 replicati per ciascuna condizione di trattamento. (B; C) Valutazione dell'area sotto la curva (AUC, B) e del picco massimo (C) nelle PBMCs di HV e pazienti affetti da SM-RR in presenza o assenza di CIC-39 (3 μM e 10 μM). I valori rappresentano le medie $\pm$ SEM di 2 pazienti.

5.2 Valutazione degli effetti di CIC-39 sulla vitalità cellulare in cellule Jurkat e in PBMCs di pazienti SM-RR

Come descritto in precedenza nella sezione Introduzione (paragrafo 2.2.4), la molecola CIC-39 si trova attualmente in fase di sviluppo preclinico per il trattamento della DMD. Ad oggi, gli studi preclinici di sicurezza e tollerabilità condotti in conformità con le linee guida GLP (*Good Laboratory Practice*), hanno dimostrato che CIC-39 è dotato di un buon profilo di sicurezza e non induce effetti immunosoppressivi in ratti (somministrazione orale di 2 settimane, dosaggi 60, 180, 300 mg/Kg).

In questo progetto, al fine di confermare il profilo di CIC-39 in un modello cellulare di linfociti umani (cellule Jurkat) e in PBMCs di pazienti affetti da SM-RR, sono stati eseguiti saggi di vitalità e proliferazione cellulare in comparazione con teriflunomide (TERI), inibitore della DHODH e farmaco di prima linea per il trattamento della SM, che ha dimostrato un'attività inibitoria su SOCE ad elevate concentrazioni (20 e 50 μM)⁵².

Per quanto concerne le cellule Jurkat, è stata valutata la vitalità cellulare in presenza e assenza di CIC-39 o TERI mediante saggio MTT.

Più precisamente, le cellule Jurkat sono state trattate con concentrazioni crescenti di CIC-39 o TERI (0.1, 0.3, 1, 3, 10 e 30 μM) e con dimetil-solfossido (DMSO 0.1%, come condizione di controllo) per 72h. Come mostrato in Figura 14A, è stato possibile riscontrare che CIC-39 determina una riduzione minima della vitalità cellulare a tutte le concentrazioni testate (massima riduzione del 20% a 30 μM), mentre TERI causa una riduzione significativa a partire dalle concentrazioni più basse (circa 40 % a 0.1 e 0.3 μM).

Al fine di confermare i dati ottenuti in cellule Jurkat in un modello *ex-vivo* di SM-RR, sono stati eseguiti saggi di proliferazione con il colorante fluorescente CFSE (5 μM) in PBMCs derivanti da pazienti. Al terzo giorno di coltura (DIV3), le PBMCs sono state sottoposte a trattamento con concentrazioni crescenti di CIC-39 o TERI (0.1, 0.3, 1, 3, 10 e 30 μM) e con DMSO 0.1% (*vehicle*) per 72h. Come mostrato dalle curve dose-risposta riportate in Figura 14B, il trattamento con CIC-39 causa una riduzione minima della proliferazione solo alle concentrazioni 10 e 30 μM (massima riduzione del 25% a 30 μM), viceversa TERI riduce significativamente la proliferazione delle PBMCs già a partire dalle concentrazioni 0.3 e 1 μM . Il relativo protocollo sperimentale è riportato in Figura 11 (sezione Materiali e Metodi, paragrafo 4.4).

Questi dati hanno consentito di confermare il buon profilo di sicurezza di CIC-39 e di dimostrare che, a differenza del farmaco TERI, la modulazione negativa di SOCE mediata da CIC-39 non influenza significativamente la vitalità cellulare e permette il mantenimento dell'omeostasi immunitaria. Pertanto, CIC-39, grazie alla sua capacità di modulare negativamente il SOCE, rappresenta un promettente approccio farmacologico per il trattamento della SM.

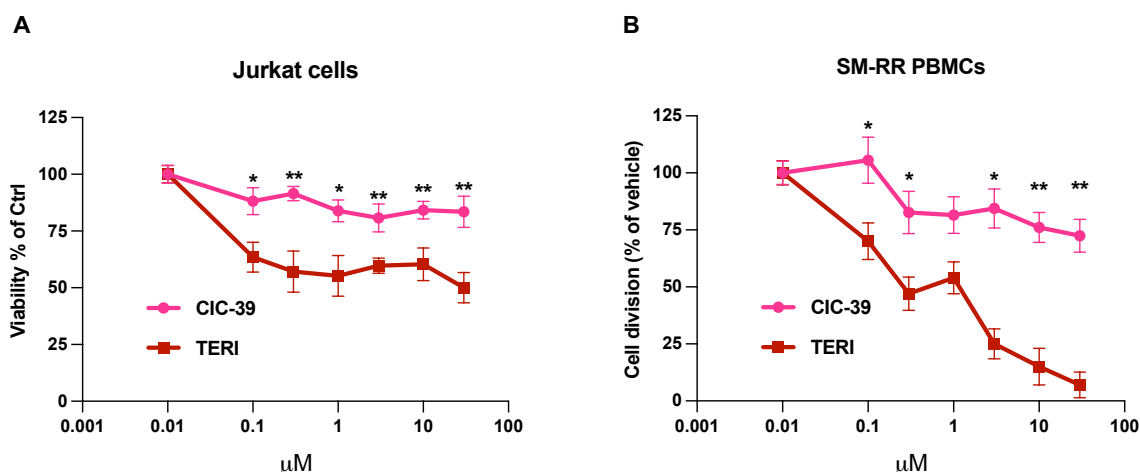


Figura 14. Effetti di CIC-39 e TERI su vitalità e proliferazione di cellule Jurkat e PBMCs di pazienti SM-RR. (A) Curve dose-risposta degli effetti di CIC-39 e TERI (0.1, 0.3, 1, 3, 10 e 30 μM) sulla vitalità di cellule Jurkat trattate per 72h. I valori rappresentano le medie $\pm$ SEM di 6 replicati derivanti da 3 esperimenti indipendenti rispetto alla condizione di controllo (DMSO 0.1%). *Unpaired t-test*: * $P \leq 0.045$; ** $P \leq 0.029$ CIC-39 vs TERI. (B) Valutazione della proliferazione cellulare in PBMCs di pazienti SM-RR trattate per 72 h con concentrazioni crescenti di CIC-39 o TERI (0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 μM). I valori rappresentano le medie $\pm$ SEM di 3 pazienti e rappresentano la percentuale di cellule proliferanti rispetto al veicolo (vehicle DMSO 0.1%). *Unpaired t-test*: * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.021$ CIC-39 vs TERI.

5.3 Caratterizzazione degli effetti di CIC-39 sulla proliferazione di linfociti T CD4⁺ e linfociti B CD19⁺ derivanti da pazienti affetti da SM-RR

Al fine di analizzare più nel dettaglio eventuali effetti antiproliferativi di CIC-39, sono stati valutati gli effetti della molecola in comparazione con TERI in due sottopopolazioni linfocitarie isolate da PBMCs di pazienti affetti da SM-RR, i linfociti T CD4⁺ e i linfociti B CD19⁺. Al terzo giorno di coltura (DIV3), i linfociti T e B isolati da PBMCs sono stati sottoposti a marcatura con il colorante fluorescente CFSE (5 μM) e, successivamente trattati con CIC-39 o TERI alle concentrazioni di 3 e 10 μM per 72h. La scelta delle concentrazioni è stata effettuata sulla base sia degli esperimenti di Ca^{2+} *imaging* che sui saggi di proliferazione nei quali CIC-39 ha dimostrato efficacia nel modulare SOCE senza compromettere la vitalità e la proliferazione cellulare.

Per un'analisi più dettagliata, in questi esperimenti è stato analizzato il *rate* proliferativo delle cellule andando a valutare il numero di generazioni caratterizzanti entrambe le sottopopolazioni linfocitarie. Per quanto concerne i linfociti T CD4⁺, come mostrato in Figura 15A, CIC-39, alle concentrazioni 3 e 10 μM , riduce di circa il 10% la percentuale di cellule proliferanti nelle generazioni 3, 4, 5 rispetto alle cellule trattate con veicolo (DMSO 0.1%), mentre TERI (10 μM) sopprime completamente la proliferazione cellulare.

Risultati analoghi sono stati ottenuti anche in linfociti B CD19⁺. Come mostrato nella Figura 15B, CIC-39 (10 μ M), non altera la proliferazione cellulare, in quanto la percentuale di cellule proliferanti nelle diverse generazioni risulta comparabile al trattamento con veicolo (DMSO 0.1%). Al contrario, il trattamento con TERI alla stessa concentrazione (10 μ M) causa una riduzione significativa della percentuale di cellule proliferanti a partire dalla seconda generazione.

Queste evidenze costituiscono un'ulteriore conferma dei dati precedentemente descritti in cellule Jurkat e in PBMCs di pazienti affetti da SM-RR e permettono di affermare che la modulazione negativa di SOCE non influisce sulla proliferazione delle cellule immunitarie (linfociti T CD4⁺ e linfociti B CD19⁺). Ciò indica che la modulazione di SOCE potrebbe rappresentare una strategia terapeutica con un profilo di tollerabilità migliore rispetto all'inibizione di DHODH indotta da TERI.

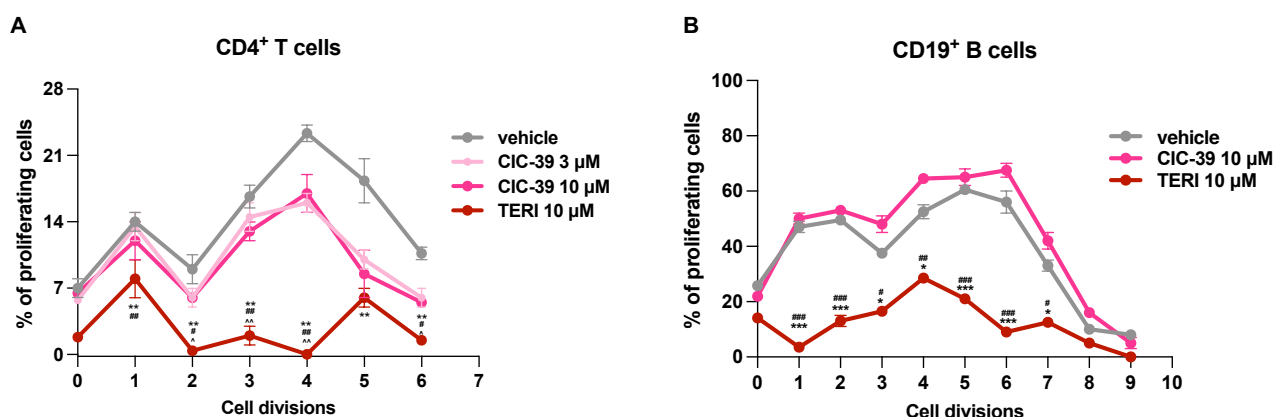


Figura 15. Effetti di CIC-39 e TERI sulla proliferazione di linfociti T CD4⁺ e linfociti B CD19⁺ derivanti da pazienti affetti da SM-RR. (A) Valutazione della proliferazione cellulare di linfociti T CD4⁺ mediante colorante CFSE in seguito a trattamento di 72h con CIC-39 3 e 10 μ M o TERI 10 μ M. I valori sono le medie di 3 pazienti $\pm$ SEM e rappresentano la % delle cellule in generazioni distinte (dalla generazione 1 alla generazione 6). One - way Anova test seguito da test di comparazione multipla di Tukey. $^{**}P \leq 0.018$ TERI 10 μ M vs vehicle; $^{\#}P \leq 0.05$, $^{\#\#}P \leq 0.023$ TERI 10 μ M vs CIC-39 3 μ M; $^{\wedge}P \leq 0.05$, $^{\wedge\wedge}P \leq 0.016$ TERI 10 μ M vs CIC-39 10 μ M. (B) Valutazione della proliferazione cellulare mediante colorante CFSE per citometria a flusso in cellule B MS CD19⁺ stimulate con un cocktail di citochine (IL-4, IL-2, CD40L, IL-21, anti-IgM) per 3 giorni e trattate per ulteriori 72h con CIC-39 o TERI 10 μ M. I valori sono le medie di 3 pazienti $\pm$ SEM e rappresentano la % delle cellule in generazioni distinte (dalla generazione 1 alla generazione 9). One - way Anova seguito da test di comparazione multipla di Tukey. $^{***}P \leq 0.001$, $^{*}P \leq 0.05$ TERI 10 μ M vs vehicle, $^{\#}P \leq 0.05$, $^{\#\#}P \leq 0.025$, $^{\#\#\#}P \leq 0.001$ TERI 10 μ M vs CIC-39 10 μ M.

5.4 Analisi dei livelli di espressione di citochine pro-infiammatorie in PBMCs di pazienti SM-RR trattate con CIC-39 o TERI

Come descritto nell'introduzione, nella SM, l'infiammazione è principalmente guidata da linfociti Th1 e Th17. In considerazione di questo, in PBMCs isolate da pazienti affetti da SM-

RR, sono stati valutati gli effetti dei trattamenti farmacologici con CIC-39 e TERI (3 e 10 μ M per 72h) sui livelli di espressione genica delle citochine IL-17a, GM-CSF, IFN- γ e IL-2, le principali citochine pro-infiammatorie coinvolte nel contesto autoimmune della SM, e che permettono il differenziamento linfocitario nei sottotipi effettori.

I dati ottenuti tramite qRT-PCR e rappresentati in Figura 16A-B, hanno dimostrato che CIC-39 ad entrambe le concentrazioni testate (3 e 10 μ M) riduce significativamente i livelli di mRNA delle citochine pro-infiammatorie secrete sia da Th1 che da Th17, mentre TERI modera solo l'espressione di GM-CSF, citochina secreta da Th17, coinvolta nella stimolazione della migrazione delle cellule mieloidi verso i siti di infiammazione. Tali evidenze risultano coerenti con i meccanismi d'azione dei due composti secondo i quali CIC-39 agisce modulando il rilascio di citochine pro-infiammatorie da parte di Th1 e Th17, mentre TERI interferisce direttamente con la proliferazione linfocitaria, non avendo dunque un effetto diretto sul rilascio di citochine pro-infiammatorie. Pertanto, si può supporre che l'efficacia di CIC-39 nel ridurre i livelli di infiammazione che mediano la risposta autoimmune, sia superiore a quella di TERI utilizzata alle stesse concentrazioni.

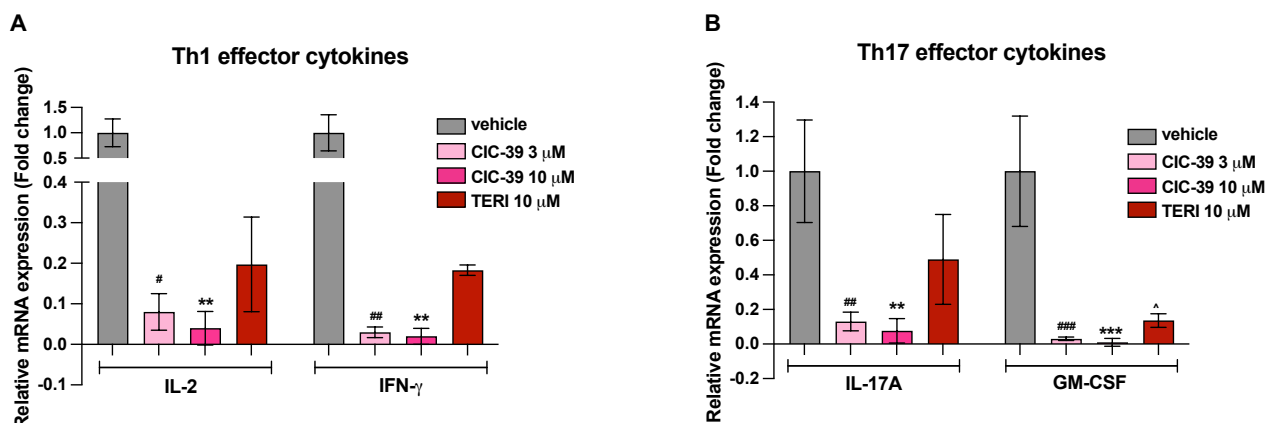


Figura 66. Effetto di CIC-39 e TERI sulle citochine pro-infiammatorie in linfociti T CD4⁺ derivanti da pazienti affetti da SM-RR. (A) livelli di mRNA delle citochine effettrici Th1 (IL-2 e IFN) in PBMCs trattate con veicolo (DMSO 0.1 %), CIC-39 (3 e 10 μ M) o TERI (10 μ M). I dati riportati rappresentano la media $\pm$ SEM di 3 pazienti. One-way Anova test seguito dal test di confronto multiplo di Tukey. $**P \leq 0.0034$ CIC-39 10 μ M vs vehicle; $\#P \leq 0.05$, $##P \leq 0.003$ CIC-39 3 μ M vs vehicle. (B) livelli di mRNA delle citochine effettrici Th17 (IL-17A e GM-CSF) in PBMCs trattate con veicolo (DMSO 0,1 %), CIC-39 (3 e 10 μ M) o TERI (10 M). I dati riportati rappresentano la media $\pm$ SEM di 3 pazienti. One-way Anova test seguito dal test di confronto multiplo di Tukey. $**P \leq 0.0034$, $***P \leq 0.001$ CIC-39 10 μ M vs vehicle; $##P \leq 0.003$, $###P \leq 0.001$ CIC-39 3 μ M vs vehicle; $^AP \leq 0.05$ TERI 10 μ M vs vehicle.

5.5 Progettazione e valutazione di inibitori dual SOCE-DHODH come nuovo approccio terapeutico per la SM

La progettazione e sintesi di nuovi inibitori dual SOCE/DHODH è stata svolta in collaborazione con il laboratorio della Dott.ssa Rita Di Martino e della Prof.ssa Tracey Pirali ed è stata guidata dalla scoperta del composto 1 (SO-MUST), un modulatore negativo di SOCE ($IC_{50} = 3.2 \mu M$), che si è dimostrato un inibitore duale ben bilanciato, esibendo un valore simile di IC_{50} di $3.2 \mu M$ anche sull'enzima DHODH umano in un saggio biochimico. A conferma dell'attività inibitoria del composto nei confronti di DHODH, mediante saggio MTT, è stato dimostrato che la riduzione della vitalità cellulare indotta da SO-MUST ($50 \mu M$) in cellule Jurkat (circa 60%, Tabella 3) veniva contrastata da co-trattamento con uridina ($100 \mu M$), nucleoside in grado di attivare la sintesi *de novo* delle pirimidine. I dati precedentemente ottenuti con SO-MUST hanno però evidenziato che, in analogia a inibitori DHODH noti, tale composto influenza significativamente la proliferazione alterando il ciclo cellulare in cellule Jurkat a partire dalla concentrazione $3 \mu M$ e causando apoptosi a 30 e $50 \mu M$. Pertanto, con l'obiettivo di minimizzare tali effetti immunosoppressivi e identificare potenziali inibitori *dual* SOCE/DHODH caratterizzati da un'attività inibitoria su SOCE simile a quella di CIC-39 e da una potenza sull'enzima DHODH inferiore a quella di TERI, sono state progettate due diverse serie di molecole (Figura 17, Tabella 3).

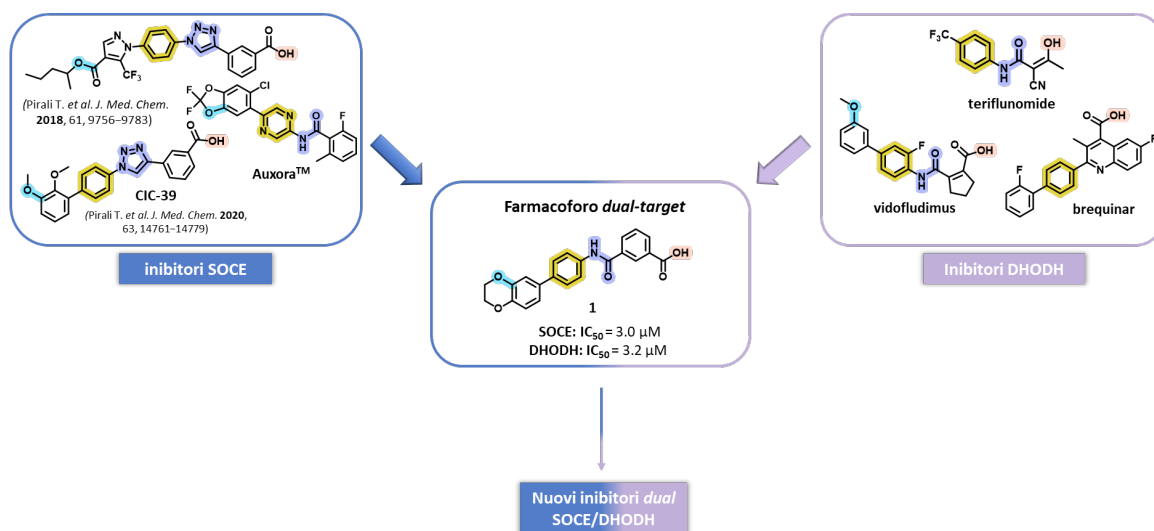


Figura 17. Elementi farmacoforici comuni a inibitori SOCE and DHODH *one-target*; struttura dell'inibitore SOCE/DHODH 1 e progettazione di nuovi composti ad attività *dual-targeting* su SOCE e DHODH.

Le 11 molecole progettate (Tabella 3) sono state valutate per la loro capacità inibitoria sia nei confronti di SOCE, mediante analisi dei livelli di Ca^{2+} intracellulare (con tracciante Fluo4-AM), che nei confronti di DHODH mediante saggio MTT.

La valutazione del SOCE è stata effettuata in cellule Jurkat con il protocollo standard, precedentemente descritto, che prevede uno svuotamento degli *stores* intracellulari del RE indotto ponendo le cellule in una soluzione priva di Ca^{2+} e contenente *t*-BHQ, seguita da una fase di ri-addizione di una soluzione contenente Ca^{2+} 2 mM, in modo tale da valutare l'ingresso di questo ione all'interno delle cellule in presenza e assenza delle molecole valutate. Al fine di selezionare candidati con una potenza paragonabile a SO-MUST, sono stati presi in considerazione i composti che determinano un'inibizione del SOCE $\geq$ al 55% alla concentrazione 10 μM . Come riportato in Tabella 3 (colonna % inib. SOCE (10 μM)), da questi esperimenti sono stati selezionati i composti 3, 4, 5, 7, 10 e 12 per i quali sono state eseguite curve dose-risposta per l'inibizione di SOCE (0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 μM) al fine di determinare i valori di IC_{50} , riscontrando che i composti 4, 7 e 10 presentavano valori comparabili a SO-MUST (colonna SOCE IC_{50} (μM), Tabella 3).

Al fine di identificare molecole con un miglior profilo di tollerabilità rispetto a SO-MUST, sono stati eseguiti saggi MTT sottoponendo le cellule Jurkat a trattamento di 72h con le nuove molecole progettate alla concentrazione di 50 μM (concentrazione a cui SO-MUST causa apoptosi) e sono state selezionate le molecole che garantivano una vitalità cellulare $\geq$ al 60%. Secondo questo criterio, sono stati identificati i composti 7, 9, 10, 11 e 12 (Vitalità cellulare % (50 μM), Tabella 3). I dati ottenuti da questi saggi hanno portato all'esclusione dei composti 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 e 11. Nel dettaglio, i composti 2, 6 e 8 non hanno dimostrato una potenza sufficiente nell'inibizione di SOCE (inibizione di SOCE a 10 μM compresa fra 45 e 54%) e compromettono significativamente la vitalità cellulare (riduzione vitalità compresa fra il 46 e il 69% a 50 μM). I composti 3, 4 e 5, nonostante presentassero una potenza superiore al 55% nell'inibizione di SOCE, sono risultati citotossici nel saggio MTT comportando una riduzione della vitalità compresa fra il 53 e il 59%. Infine, i composti 9 e 11, nonostante non alterassero la vitalità cellulare, non hanno raggiunto il 55% di inibizione di SOCE alla concentrazione 10 μM .

Pertanto, i composti 7, 10 e 12 sono stati selezionati per un'ulteriore caratterizzazione volta a esplorare la loro attività *dual-targeting* SOCE/DHODH.

In analogia a quanto valutato per SO-MUST, le cellule Jurkat sono state trattate per 72h con i composti 7, 10 e 12 alla concentrazione 50 μM in presenza e assenza di Uridina (100 μM)

al fine di valutare se la riduzione della vitalità cellulare indotta dai composti venisse controbilanciata dal co-trattamento, suggerendo così un effetto inibitorio anche nei confronti di DHODH. I dati ottenuti da questi saggi di vitalità (MTT) hanno dimostrato che il co-trattamento con Uridina controbilancia l'effetto antiproliferativo del solo composto 10, suggerendo quindi che i composti 7 e 12 non presentino un effetto *dual-targeting* SOCE/DHODH. Inoltre, come riportato in Tabella 3 (% inib. *h*DHODH (10 μ M), *h*DHODH IC₅₀ (μ M)) l'ulteriore conferma degli effetti su DHODH è stata dimostrata anche mediante saggio enzimatico in collaborazione con il laboratorio del Prof. Riccardo Miggiano.

Per le caratteristiche sopradescritte, il composto 10 possa rappresenta un ottimo inibitore *dual* SOCE/DHODH. Infatti, rispetto a SO- MUST, il composto 10 presenta un valore di IC₅₀ su SOCE simile ed una potenza inibitoria inferiore su DHODH tale da garantire un miglior profilo di tollerabilità (IC₅₀ SO-MUST 3.2 μ M vs composto 10 10 μ M).

Composto	% inib. SOCE (10 μ M)	SOCE IC ₅₀ (μ M)	Vitalità cellulare % (50 μ M)	% di reversione (con Uridina 100 μ M)	% inib. <i>h</i> DHODH (10 μ M)	<i>h</i> DHODH IC ₅₀ (μ M)
1 (SO-MUST)	57.5	3.2 $\pm$ 1.3	41.9 $\pm$ 2.22	10.3	43	3.2
2	54.5	N.D.	32.7 $\pm$ 3.79	N.D.	33	N.D.
3	58.5	5.04 $\pm$ 1.2	47.08 $\pm$ 2.78	N.D.	68	N.D.
4	58.5	3.18 $\pm$ 0.9	47.23 $\pm$ 2.33	N.D.	76	5.30
5	58.2	4.83 $\pm$ 1.01	41.49 $\pm$ 2.57	N.D.	30	N.D.
6	53.9	N.D.	31.39 $\pm$ 2.46	N.D.	N.D.	N.D.
7	61.8	3.2 $\pm$ 0.96	76.11 $\pm$ 3.04	0	N.D.	N.D.
8	45.7	N.D.	54.5 $\pm$ 5.65	N.D.	95	5.30
9	51	N.D.	80.95 $\pm$ 2.71	N.D.	98	0.028
10	64.6	2.91 $\pm$ 0.63	69.88 $\pm$ 3.91	16.5	48	10
11	53.4	N.D.	66.85 $\pm$ 4.03	N.D.	8	0.143
12	59.7	4.4 $\pm$ 1.8	88.9 $\pm$ 2.25	0	4.6	0.142

Tabella 3. Elenco delle molecole progettate e loro valutazioni in saggi biologici. N.D.= non determinato.

5.6 Studio preliminare del composto 10 in PBMCs di pazienti affetti da SMS-RR

Sulla base di quanto ottenuto dagli esperimenti di *screening* descritti nel paragrafo precedente, gli effetti del composto 10 sono stati valutati in modo preliminare in un modello *ex-vivo* di SM-RR.

Analogamente a quanto effettuato con CIC-39 e TERI (Figura 14B), sono stati eseguiti saggi di proliferazione con il colorante fluorescente CFSE (5 μ M) in PBMCs derivanti da pazienti. Al terzo giorno di coltura (DIV3), le PBMCs sono state sottoposte a trattamento con concentrazioni crescenti di composto 10 (0.1, 0.3, 1, 3, 10 e 30 μ M) in comparazione a CIC-39 e TERI alle stesse concentrazioni per 72h. Come mostrato dalle curve dose-risposta riportate in Figura 18A, il trattamento con il composto 10 ha degli effetti simili a quelli di CIC-39, causando una riduzione del 50% della proliferazione solo a 30 μ M (concentrazione superiore al valore di IC₅₀ del composto su entrambi i *target*), presentando così un profilo di tollerabilità nettamente superiore dell'inibitore DHODH, TERI.

Per un'analisi più dettagliata, anche in questo caso è stato analizzato il *rate* proliferativo delle cellule andando a valutare il numero di generazioni caratterizzanti i linfociti T CD4⁺. La Figura 18B mostra come il trattamento con composto 10 non riduca significativamente la percentuale di cellule proliferanti in tutte le generazioni, mantenendo un profilo analogo a CIC-39.

Infine, la valutazione degli effetti farmacologici del composto 10 è stata determinata analizzando i livelli di espressione delle citochine pro-infiammatorie Th1 (IFN- γ e IL-2) e Th17 (IL-17a, GM-CSF) coinvolte nel contesto autoimmune della SM. I dati ottenuti tramite qRT-PCR e rappresentati in Figura 18C-D, hanno dimostrato che, come CIC-39, anche il composto 10 (10 μ M) determina una riduzione significativa dei livelli di mRNA di queste citochine rispetto al farmaco *one-targeting* TERI.

Questi dati, seppur preliminari, hanno consentito di supportare l'ipotesi che un approccio *dual-targeting* SOCE/DHODH con un composto (*i.e.*, composto 10) dotato di un'attività inibitoria su SOCE simile a quella di CIC-39 e da una potenza sull'enzima DHODH inferiore a quella di TERI, possa rappresentare una potenziale strategia terapeutica per la SM in grado di minimizzare gli effetti immunosoppressivi di inibitori *one-targeting* DHODH e potenziare l'efficacia dei modulatori SOCE.

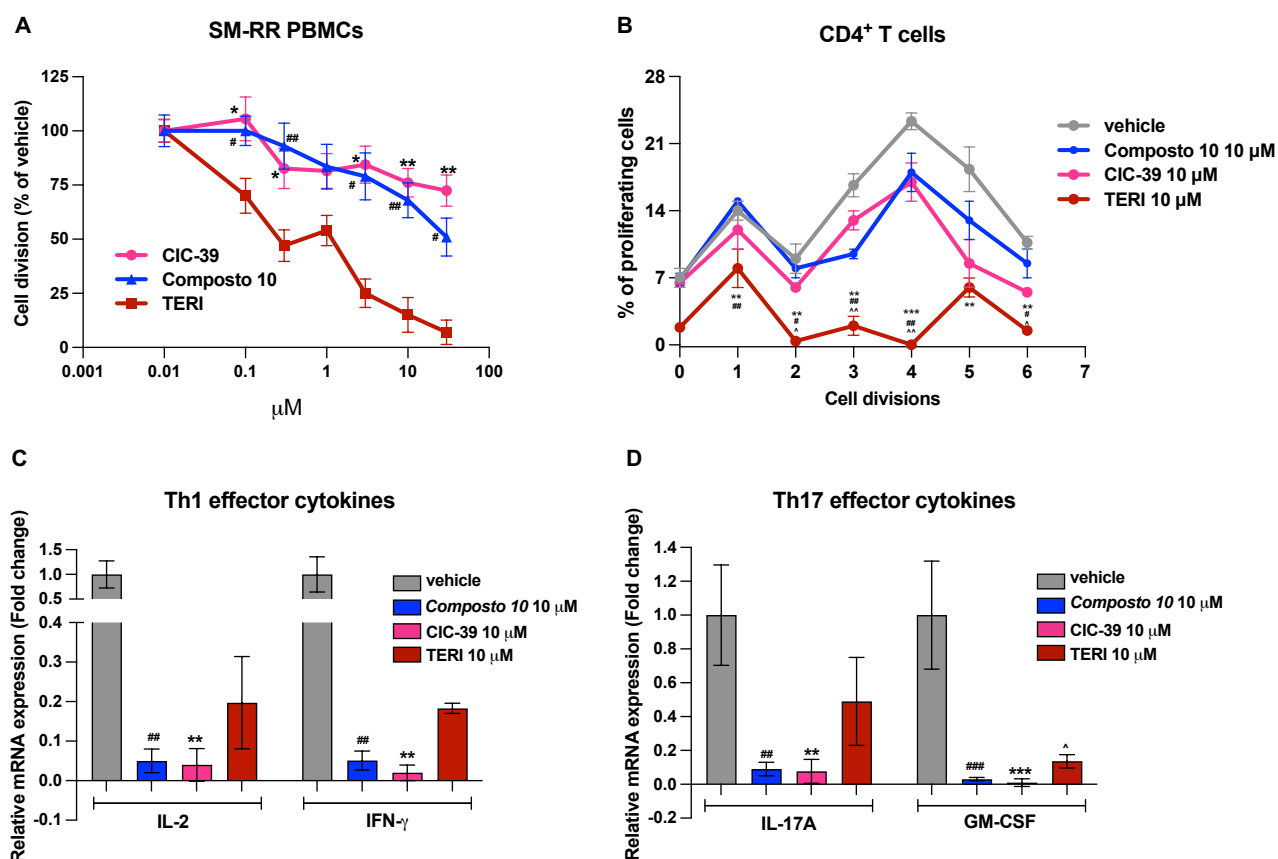


Figura 18. Effetti del composto 10 sulla proliferazione linfocitaria e sulla trascrizione di citochine pro-infiammatorie in campioni di pazienti affetti da SM-RR.

(A) Valutazione della proliferazione cellulare in PBMCs di pazienti SM-RR trattate per 72h con concentrazioni crescenti di composto 10 (0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 μM) in comparazione con CIC-39 e TERI alle stesse concentrazioni. I valori rappresentano le medie $\pm$ SEM di 2 pazienti e rappresentano la percentuale di cellule proliferanti rispetto al veicolo (vehicle DMSO 0.1%). Unpaired t-test: $*P \leq 0.05$; $**P \leq 0.021$ CIC-39 vs TERI; $#P \leq 0.05$; $##P \leq 0.023$ composto 10 vs TERI. (B) Valutazione della proliferazione cellulare di linfociti T CD4⁺ mediante colorante CFSE in seguito a trattamento di 72h con composto 10 (10 μM) in comparazione con CIC-39 e TERI 10 μM. I valori sono le medie di 2 pazienti $\pm$ SEM e rappresentano la % delle cellule in generazioni distinte (dalla generazione 1 alla generazione 6). One - way Anova test seguito da test di comparazione multipla di Tukey. $**P \leq 0.018$ TERI 10 μM vs vehicle; $#P \leq 0.05$, $##P \leq 0.021$ TERI 10 μM vs composto 10 10 μM; $^{\wedge}P \leq 0.05$, $^{\wedge\wedge}P \leq 0.016$ TERI 10 μM vs CIC-39 10 μM. (C) Livelli di mRNA delle citochine effettrici Th1 (IL-2 e IFN γ) in PBMCs trattate con veicolo (DMSO 0.1 %) o composto 10 (10 μM) in comparazione con CIC-39 e TERI (10 μM). I dati riportati rappresentano la media $\pm$ SEM di 2 pazienti. One-way Anova test seguito dal test di confronto multiplo di Tukey. $**P \leq 0.0034$ CIC-39 10 μM vs vehicle; $##P \leq 0.003$ composto 10 10 μM vs vehicle. (D) Livelli di mRNA delle citochine effettrici Th17 (IL-17A e GM-CSF) in in PBMCs trattate con veicolo (DMSO 0,1 %) o composto 10 (10 μM) in comparazione con CIC-39 e TERI (10 μM). I dati riportati rappresentano la media $\pm$ SEM di 2 pazienti. Test Anova seguito dal test di confronto multiplo di Tukey. $**P \leq 0.0034$, $***P \leq 0.001$ CIC-39 10 μM vs vehicle; $##P \leq 0.0028$, $###P \leq 0.001$ composto 10 10 μM vs vehicle; $^{\wedge}P \leq 0.05$ TERI 10 μM vs vehicle.

6. Conclusioni

In conclusione, questo progetto di tesi ha permesso di dimostrare come il meccanismo SOCE possa rappresentare un nuovo ed interessante target farmacologico per il trattamento della SM ponendo le basi per l'identificazione di nuove strategie terapeutiche in grado di contrastare la progressione della patologia senza indurre immunosoppressione.

I risultati precedentemente descritti hanno, infatti, dimostrato che l'iperattivazione di SOCE gioca un ruolo nella fisiopatologia della SM e che CIC-39 possiede un potenziale come modulatore negativo di SOCE anche in questo contesto patologico.

In particolare, i dati ottenuti in linfociti T CD4⁺ e linfociti B CD19⁺ derivanti da pazienti affetti da SM-RR hanno consentito di confermare il buon profilo di sicurezza di CIC-39 rispetto al farmaco teriflunomide (inibitore dell'enzima DHODH approvato per il trattamento della SM), suggerendo come la modulazione negativa di SOCE mediata da questo candidato farmaco (attualmente in sviluppo preclinico) non influenzi la proliferazione linfocitaria consentendo il mantenimento dell'omeostasi immunitaria.

Dal punto di vista dell'efficacia, oltre al profilo di tollerabilità, CIC-39 si è dimostrato significativamente più efficace rispetto alla teriflunomide nel ridurre i livelli di citochine pro-infiammatorie secrete sia dai linfociti Th1 (IL-2 e IFN γ) sia dai Th17 (IL-17a e GM-CSF), entrambe coinvolte nella patogenesi della SM.

Tali evidenze risultano coerenti con i meccanismi d'azione dei due composti secondo i quali CIC-39 agisce modulando il rilascio di citochine, mentre teriflunomide interferisce direttamente con la proliferazione linfocitaria, non avendo dunque un effetto diretto a livello delle citochine pro-infiammatorie.

Inoltre, la letteratura riporta come il farmaco teriflunomide sia in grado di modulare anche il meccanismo SOCE ad alte concentrazioni. Per questa ragione si è pensato di progettare e valutare nuovi composti, potenziali inibitori *dual-targeting* SOCE/DHODH. Questo studio ha portato all'identificazione del composto 10, una molecola che rispecchia le caratteristiche ricercate come inibitore *dual*. Rispetto a SO-MUST, il primo agente *dual-targeting* SOCE/DHODH identificato, il composto 10 presenta un valore di IC₅₀ sul SOCE simile, ma una potenza inibitoria inferiore sull'enzima DHODH, offrendo così un miglior profilo di tollerabilità.

Per concludere, questo lavoro di tesi suggerisce due possibili sviluppi futuri per il trattamento della SM: (i) lo sviluppo di CIC-39 per il quale sono in corso studi preclinici secondo le linee guida GLP propedeutiche a studi clinici di Fase 1; (ii) l'esplorazione di una nuova potenziale strategia terapeutica *dual-targeting* SOCE/DHODH, sempre in grado di minimizzare gli effetti immunosoppressivi degli inibitori *one-targeting* DHODH ed eventualmente potenziare l'efficacia dei modulatori SOCE.

7. Bibliografia

1. AISM: la sclerosi multipla. March 4, 2022. Accessed September 24, 2024. https://www.aism.it/cosa_e_la_sclerosi_multipla#:~:text=Alcuni%20numeri%20sulla%20sclerosi%20multipla%20in%20Italia%20e%20nel%20mondo&text=Le%20persone%20con%20SM%20stimate,circa%20137.000%20in%20Italia1.&text=Il%20numero%20di%20donne%20con,quasi%20triplo%20rispetto%20agli%20uomini.
2. Wattjes MP, Ciccarelli O, Reich DS, et al. 2021 MAGNIMS–CMSC–NAIMS consensus recommendations on the use of MRI in patients with multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2021;20(8):653-670. doi:10.1016/S1474-4422(21)00095-8
3. Walton C, King R, Rechtman L, et al. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Multiple Sclerosis Journal*. 2020;26(14):1816-1821. doi:10.1177/1352458520970841
4. Doshi A, Chataway J. Multiple sclerosis, a treatable disease. *Clinical Medicine*. 2017;17(6):530-536. doi:10.7861/clinmedicine.17-6-530
5. Gelfand JM. Multiple sclerosis. In: ; 2014:269-290. doi:10.1016/B978-0-444-52001-2.00011-X
6. I sintomi della sclerosi multipla. Accessed September 24, 2024. <https://www.medicalnewstoday.com/>
7. Ramagopalan S V., Sadovnick AD. Epidemiology of Multiple Sclerosis. *Neurol Clin*. 2011;29(2):207-217. doi:10.1016/j.ncl.2010.12.010
8. Yamout B, Alroughani R. Multiple Sclerosis. *Semin Neurol*. 2018;38(02):212-225. doi:10.1055/s-0038-1649502
9. Svejgaard A. The immunogenetics of multiple sclerosis. *Immunogenetics*. 2008;60(6):275-286. doi:10.1007/s00251-008-0295-1
10. Ma Q, Shams H, Didonna A, et al. Integration of epigenetic and genetic profiles identifies multiple sclerosis disease-critical cell types and genes. *Commun Biol*. 2023;6(1):342. doi:10.1038/s42003-023-04713-5
11. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: The role of infection. *Ann Neurol*. 2007;61(4):288-299. doi:10.1002/ana.21117
12. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: The role of infection. *Ann Neurol*. 2007;61(4):288-299. doi:10.1002/ana.21117
13. Dobson R, Giovannoni G. Multiple sclerosis – a review. *Eur J Neurol*. 2019;26(1):27-40. doi:10.1111/ene.13819
14. Soldan SS, Lieberman PM. Epstein–Barr virus and multiple sclerosis. *Nat Rev Microbiol*. 2023;21(1):51-64. doi:10.1038/s41579-022-00770-5
15. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol*. 2018;17(2):162-173. doi:10.1016/S1474-4422(17)30470-2
16. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol*. 2018;17(2):162-173. doi:10.1016/S1474-4422(17)30470-2
17. Klineova S, Lublin FD. Clinical Course of Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(9):a028928. doi:10.1101/cshperspect.a028928
18. Yong H, Chartier G, Quandt J. Modulating inflammation and neuroprotection in multiple sclerosis. *J Neurosci Res*. 2018;96(6):927-950. doi:10.1002/jnr.24090
19. McGinley MP, Goldschmidt CH, Rae-Grant AD. Diagnosis and Treatment of Multiple Sclerosis. *JAMA*. 2021;325(8):765. doi:10.1001/jama.2020.26858
20. Minagar A. Current and Future Therapies for Multiple Sclerosis. *Scientifica (Cairo)*. 2013;2013:1-11. doi:10.1155/2013/249101
21. Minagar A. Current and Future Therapies for Multiple Sclerosis. *Scientifica (Cairo)*. 2013;2013:1-11. doi:10.1155/2013/249101
22. Arnason BGW. Interferon Beta in Multiple Sclerosis. *Clin Immunol Immunopathol*. 1996;81(1):1-11. doi:10.1006/clin.1996.0149
23. Filipi M, Jack S. Interferons in the Treatment of Multiple Sclerosis. *Int J MS Care*. 2020;22(4):165-172. doi:10.7224/1537-2073.2018-063
24. Lalive PH, Neuhaus O, Benkhoucha M, et al. Glatiramer Acetate in the Treatment of Multiple Sclerosis. *CNS Drugs*. 2011;25(5):401-414. doi:10.2165/11588120-000000000-00000
25. Bornstein MB, Miller A, Slagle S, et al. A Pilot Trial of Cop 1 in Exacerbating–Remitting Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine*. 1987;317(7):408-414. doi:10.1056/NEJM198708133170703

26. Ge Y, Grossman RI, Udupa JK, et al. Glatiramer acetate (Copaxone) treatment in relapsing–remitting MS. *Neurology*. 2000;54(4):813-817. doi:10.1212/WNL.54.4.813
27. Ziemssen T, Neuhaus O, Hohlfeld R. Risk-Benefit Assessment of Glatiramer Acetate in Multiple Sclerosis. *Drug Saf*. 2001;24(13):979-990. doi:10.2165/00002018-200124130-00005
28. Reszke R, Szepletowski JC. A safety evaluation of dimethyl fumarate in moderate-to-severe psoriasis. *Expert Opin Drug Saf*. 2020;19(4):373-380. doi:10.1080/14740338.2020.1736553
29. Venci J V., Gandhi MA. Dimethyl Fumarate (Tecfidera). *Annals of Pharmacotherapy*. 2013;47(12):1697-1702. doi:10.1177/1060028013509232
30. Callegari I, Derfuss T, Galli E. Update on treatment in multiple sclerosis. *Presse Med*. 2021;50(2):104068. doi:10.1016/j.lpm.2021.104068
31. McGinley MP, Cohen JA. Sphingosine 1-phosphate receptor modulators in multiple sclerosis and other conditions. *The Lancet*. 2021;398(10306):1184-1194. doi:10.1016/S0140-6736(21)00244-0
32. Prager B, Spampinato SF, Ransohoff RM. Sphingosine 1-phosphate signaling at the blood–brain barrier. *Trends Mol Med*. 2015;21(6):354-363. doi:10.1016/j.molmed.2015.03.006
33. Mandal P, Gupta A, Fusi-Rubiano W, Keane PA, Yang Y. Fingolimod: therapeutic mechanisms and ocular adverse effects. *Eye*. 2017;31(2):232-240. doi:10.1038/eye.2016.258
34. Khoy K, Mariotte D, Defer G, Petit G, Toutirais O, Le Mauff B. Natalizumab in Multiple Sclerosis Treatment: From Biological Effects to Immune Monitoring. *Front Immunol*. 2020;11. doi:10.3389/fimmu.2020.549842
35. Berger JR, Koranik IJ. Progressive Multifocal Leukoencephalopathy and Natalizumab — Unforeseen Consequences. *New England Journal of Medicine*. 2005;353(4):414-416. doi:10.1056/NEJMe058122
36. Tornatore C, Amemiya K, Atwood W, Conant K, Major EO, Berger J. JC virus: Current concepts and controversies in the molecular virology and pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy. *Rev Med Virol*. 1994;4(3):197-219. doi:10.1002/rmv.1980040306
37. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, et al. A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Natalizumab for Relapsing Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine*. 2006;354(9):899-910. doi:10.1056/NEJMoa044397
38. Hauser SL, Bar-Or A, Comi G, et al. Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine*. 2017;376(3):221-234. doi:10.1056/NEJMoa1601277
39. Lamb YN. Ocrelizumab: A Review in Multiple Sclerosis. *Drugs*. 2022;82(3):323-334. doi:10.1007/s40265-022-01672-9
40. Cohen JA, Coles AJ, Arnold DL, et al. Alemtuzumab versus interferon beta 1a as first-line treatment for patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised controlled phase 3 trial. *The Lancet*. 2012;380(9856):1819-1828. doi:10.1016/S0140-6736(12)61769-3
41. Ruck T, Bittner S, Wiendl H, Meuth S. Alemtuzumab in Multiple Sclerosis: Mechanism of Action and Beyond. *Int J Mol Sci*. 2015;16(7):16414-16439. doi:10.3390/ijms160716414
42. Ravandi F, O'Brien S. Alemtuzumab. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2005;5(1):39-51. doi:10.1586/14737140.5.1.39
43. AISM. AISM: sclerosi multipla ed Alemtuzumab. January 23, 2023. Accessed September 24, 2024. <https://www.aism.it/sclerosi-multipla-e-alemtuzumab>
44. Serra P, Santamaria P. Antigen-specific therapeutic approaches for autoimmunity. *Nat Biotechnol*. 2019;37(3):238-251. doi:10.1038/s41587-019-0015-4
45. Miller A, Lider O, Al-Sabbagh A, Weiner HL. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of myelin basic protein. V. Hierarchy of suppression by myelin basic protein from different species. *J Neuroimmunol*. 1992;39(3):243-250. doi:10.1016/0165-5728(92)90258-M
46. Krienke C, Kolb L, Diken E, et al. A noninflammatory mRNA vaccine for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Science* (1979). 2021;371(6525):145-153. doi:10.1126/science.aay3638
47. Putney JW. Origins of the concept of store-operated calcium entry. *Frontiers in Bioscience*. 2011;S3(1):980. doi:10.2741/202
48. Park YJ, Yoo SA, Kim M, Kim WU. The Role of Calcium–Calcineurin–NFAT Signaling Pathway in Health and Autoimmune Diseases. *Front Immunol*. 2020;11. doi:10.3389/fimmu.2020.00195
49. Kaufmann U, Shaw PJ, Kozhaya L, et al. Selective ORA1 Inhibition Ameliorates Autoimmune Central Nervous System Inflammation by Suppressing Effector but Not Regulatory T Cell Function. *The Journal of Immunology*. 2016;196(2):573-585. doi:10.4049/jimmunol.1501406
50. Vaeth M, Kahlfuss S, Feske S. CRAC Channels and Calcium Signaling in T Cell-Mediated Immunity. *Trends Immunol*. 2020;41(10):878-901. doi:10.1016/j.it.2020.06.012

51. Ma J, McCarl C, Khalil S, Lüthy K, Feske S. T-cell-specific deletion of STIM1 and STIM2 protects mice from EAE by impairing the effector functions of Th1 and Th17 cells. *Eur J Immunol.* 2010;40(11):3028-3042. doi:10.1002/eji.201040614
52. Rahman S, Rahman T. Unveiling some FDA-approved drugs as inhibitors of the store-operated Ca²⁺ entry pathway. *Sci Rep.* 2017;7(1):12881. doi:10.1038/s41598-017-13343-x
53. Hogan PG, Rao A. Store-operated calcium entry: Mechanisms and modulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;460(1):40-49. doi:10.1016/j.bbrc.2015.02.110
54. Lopez JJ, Jardin I, Sanchez-Collado J, Salido GM, Smani T, Rosado JA. TRPC Channels in the SOCE Scenario. *Cells.* 2020;9(1):126. doi:10.3390/cells9010126
55. Lacruz RS, Feske S. Diseases caused by mutations in *ORAI1* and *STIM1*. *Ann N Y Acad Sci.* 2015;1356(1):45-79. doi:10.1111/nyas.12938
56. Groschner K et al. *Store-Operated Ca²⁺ Entry (SOCE) Pathways - Emerging Signaling Concepts in Human (Patho)Physiology.*; 2017.
57. Silva-Rojas R, Treves S, Jacobs H, et al. STIM1 over-activation generates a multi-systemic phenotype affecting the skeletal muscle, spleen, eye, skin, bones and immune system in mice. *Hum Mol Genet.* 2019;28(10):1579-1593. doi:10.1093/hmg/ddy446
58. Putney JW. The Physiological Function of Store-operated Calcium Entry. *Neurochem Res.* 2011;36(7):1157-1165. doi:10.1007/s11064-010-0383-0
59. Noble M, Lin QT, Sirko C, Houpt JA, Novello MJ, Stathopoulos PB. Structural Mechanisms of Store-Operated and Mitochondrial Calcium Regulation: Initiation Points for Drug Discovery. *Int J Mol Sci.* 2020;21(10):3642. doi:10.3390/ijms21103642
60. Riva B, Griglio A, Serafini M, et al. Pyrtriazoles, a Novel Class of Store-Operated Calcium Entry Modulators: Discovery, Biological Profiling, and in Vivo Proof-of-Concept Efficacy in Acute Pancreatitis. *J Med Chem.* 2018;61(21):9756-9783. doi:10.1021/acs.jmedchem.8b01512
61. Schleifer H, Doleschal B, Lichtenegger M, et al. Novel pyrazole compounds for pharmacological discrimination between receptor-operated and store-operated <scp> <scp> Ca²⁺ </scp> </scp> entry pathways. *Br J Pharmacol.* 2012;167(8):1712-1722. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.02126.x
62. Groschner K, Shrestha N, Fameli N. Cardiovascular and Hemostatic Disorders: SOCE in Cardiovascular Cells: Emerging Targets for Therapeutic Intervention. In: ; 2017:473-503. doi:10.1007/978-3-319-57732-6_24
63. Negulescu PA, Krasieva TB, Khan A, Kerschbaum HH, Cahalan MD. Polarity of T Cell Shape, Motility, and Sensitivity to Antigen. *Immunity.* 1996;4(5):421-430. doi:10.1016/S1074-7613(00)80409-4
64. PIPKIN M, LIEBERMAN J. Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Curr Opin Immunol.* 2007;19(3):301-308. doi:10.1016/j.coi.2007.04.011
65. Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* 2003;17(18):2205-2232. doi:10.1101/gad.1102703
66. Feske S. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(9):690-702. doi:10.1038/nri2152
67. Horsley V, Pavlath GK. Nfat. *J Cell Biol.* 2002;156(5):771-774. doi:10.1083/jcb.200111073
68. Peerlings D, Mimpfen M, Damoiseaux J. The IL-2 – IL-2 receptor pathway: Key to understanding multiple sclerosis. *J Transl Autoimmun.* 2021;4:100123. doi:10.1016/j.jtauto.2021.100123
69. Arellano G, Ottum PA, Reyes LI, Burgos PI, Naves R. Stage-Specific Role of Interferon-Gamma in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis. *Front Immunol.* 2015;6. doi:10.3389/fimmu.2015.00492
70. Omidian Z, Ahmed R, Giwa A, Donner T, Hamad ARA. IL-17 and limits of success. *Cell Immunol.* 2019;339:33-40. doi:10.1016/j.cellimm.2018.09.001
71. Lotfi N, Thome R, Rezaei N, et al. Roles of GM-CSF in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases: An Update. *Front Immunol.* 2019;10. doi:10.3389/fimmu.2019.01265
72. Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of Oral Doses of RP3128 of Rhizen Pharmaceuticals. April 10, 2019. Accessed September 24, 2024. <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02958982?intr=RP3128&rank=1>
73. Barde PJ, Viswanadha S, Veeraraghavan S, Vakkalanka S V., Nair A. A first-in-human study to evaluate the safety, tolerability and pharmacokinetics of RP3128, an oral calcium release-activated calcium (CRAC) channel modulator in healthy volunteers. *J Clin Pharm Ther.* 2021;46(3):677-687. doi:10.1111/jcpt.13322
74. Schuhmann MK, Stegner D, Berna-Erro A, et al. Stromal Interaction Molecules 1 and 2 Are Key Regulators of Autoreactive T Cell Activation in Murine Autoimmune Central Nervous System Inflammation. *The Journal of Immunology.* 2010;184(3):1536-1542. doi:10.4049/jimmunol.0902161

75. Sweeney ZK, Minatti A, Button DC, Patrick S. Small-Molecule Inhibitors of Store-Operated Calcium Entry. *ChemMedChem*. 2009;4(5):706-718. doi:10.1002/cmdc.200800452
76. Prakriya M, Lewis RS. Store-Operated Calcium Channels. *Physiol Rev*. 2015;95(4):1383-1436. doi:10.1152/physrev.00020.2014
77. Di Sabatino A, Rovedatti L, Kaur R, et al. Targeting Gut T Cell Ca²⁺ Release-Activated Ca²⁺ Channels Inhibits T Cell Cytokine Production and T-Box Transcription Factor T-Bet in Inflammatory Bowel Disease. *The Journal of Immunology*. 2009;183(5):3454-3462. doi:10.4049/jimmunol.0802887
78. Chen G, Panicker S, Lau KY, et al. Characterization of a novel CRAC inhibitor that potently blocks human T cell activation and effector functions. *Mol Immunol*. 2013;54(3-4):355-367. doi:10.1016/j.molimm.2012.12.011
79. Djuric SW, BaMaung NY, Basha A, et al. 3,5-Bis(trifluoromethyl)pyrazoles: A Novel Class of NFAT Transcription Factor Regulator. *J Med Chem*. 2000;43(16):2975-2981. doi:10.1021/jm990615a
80. Takezawa R, Cheng H, Beck A, et al. A Pyrazole Derivative Potently Inhibits Lymphocyte Ca²⁺ Influx and Cytokine Production by Facilitating Transient Receptor Potential Melastatin 4 Channel Activity. *Mol Pharmacol*. 2006;69(4):1413-1420. doi:10.1124/mol.105.021154
81. Liang X, Zhang N, Pan H, Xie J, Han W. Development of Store-Operated Calcium Entry-Targeted Compounds in Cancer. *Front Pharmacol*. 2021;12. doi:10.3389/fphar.2021.688244
82. Kiyonaka S, Kato K, Nishida M, et al. Selective and direct inhibition of TRPC3 channels underlies biological activities of a pyrazole compound. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(13):5400-5405. doi:10.1073/pnas.0808793106
83. Omuro A, Beal K, McNeill K, et al. Multicenter Phase IB Trial of Carboxyamidotriazole Orotate and Temozolomide for Recurrent and Newly Diagnosed Glioblastoma and Other Anaplastic Gliomas. *Journal of Clinical Oncology*. 2018;36(17):1702-1709. doi:10.1200/JCO.2017.76.9992
84. Safety and Tolerability of Carboxyamidotriazole Orotate (CTO) in Solid Tumors or With Temodar® in Glioblastoma or Other Recurrent Malignant Gliomas or in Combination With Temodar® and Radiation Therapy for Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma and Malignant Gliomas. July 9, 2024. Accessed September 24, 2024. <https://clinicaltrials.gov/study/NCT01107522?tab=results>
85. Gerasimenko J V., Gryshchenko O, Ferdek PE, et al. Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel blockade as a potential tool in antipancreatitis therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(32):13186-13191. doi:10.1073/pnas.1300910110
86. CM4620 Injectable Emulsion Versus Supportive Care in Patients With Acute Pancreatitis and SIRS. December 7, 2021. Accessed September 24, 2024. <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03401190?intr=CM4620&rank=2>
87. Study of CM4620 to Reduce the Severity of Pancreatitis Due to Asparaginase. July 10, 2024. Accessed September 24, 2024. <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04195347?intr=CM4620&rank=1>
88. A Study of Auxora in Patients With Severe COVID-19 Pneumonia. August 3, 2021. Accessed September 24, 2024. <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04345614?intr=auxora&rank=1>
89. Bruen C, Miller J, Wilburn J, et al. Auxora for the Treatment of Patients With Acute Pancreatitis and Accompanying Systemic Inflammatory Response Syndrome. *Pancreas*. 2021;50(4):537-543. doi:10.1097/MPA.0000000000001793
90. A Study of PRCL-02 in Moderate to Severe Chronic Plaque Psoriasis. March 30, 2020. Accessed September 24, 2024. <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03614078?intr=PRCL-02&rank=2>
91. RIVA Beatrice*, PIRALI Tracey*, SERAFINI Marta*, APRILE Silvio, CORDERO SANCHEZ Celia *, GROLLA Ambra. BIPHENYL COMPOUNDS AS SOCE MODULATORS, COMPOSITIONS AND USES THEREOF. Published online August 26, 2021.
92. Cordero-Sanchez C, Pessolano E, Riva B, et al. CIC-39Na reverses the thrombocytopenia that characterizes tubular aggregate myopathy. *Blood Adv*. 2022;6(15):4471-4484. doi:10.1182/bloodadvances.2021006378
93. European Medicines Agency. Orphan Designation Tubular Aggregate Myopathy.
94. European Medicines Agency. Orphan Drug Designation Duchenne Muscular Dystrophy.
95. Food and Drug Administration. Search Orphan Drug Designations and Approvals. September 23, 2024. Accessed September 24, 2024. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/opdlisting/oopd/detailedIndex.cfm?cfgridkey=1028224>
96. Muehler A, Peelen E, Kohlhof H, Gröppel M, Vitt D. Vidofludimus calcium, a next generation DHODH inhibitor for the Treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord*. 2020;43:102129. doi:10.1016/j.msard.2020.102129
97. Serafini M, Cordero-Sanchez C, Di Paola R, et al. Store-Operated Calcium Entry as a Therapeutic Target in Acute Pancreatitis: Discovery and Development of Drug-Like SOCE Inhibitors. *J Med Chem*. 2020;63(23):14761-14779. doi:10.1021/acs.jmedchem.0c01305

98. Riva B, Pessolano E, Quaglia E, et al. STIM1 and ORAI1 mutations leading to tubular aggregate myopathies are sensitive to the Store-operated Ca^{2+} -entry modulators CIC-37 and CIC-39. *Cell Calcium*. 2022;105:102605. doi:10.1016/j.ceca.2022.102605