

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI “FEDERICO II”



DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CHIMICHE

XVIII CICLO (2002-2005)

**SVILUPPO DI NUOVE MOLECOLE CHE
MODULANO L'ATTIVITÀ DI SISTEMI
COINVOLTI NELL'ANGIOGENESI**

Tutore

PROF. G. MORELLI

Candidata

ANNARITA DEL GATTO

Relatore

PROF. P. PUCCI

Coordinatore

PROF.SSA R. LANZETTA

INDICE

1. INTRODUZIONE

1.1	L'ANGIOGENESI FISIOLÓGICA E PATOLOGICA: "ANGIOGENIC SWITCH"	1
1.2	INTEGRINE	6
1.2.1	INTEGRINA $\alpha_v\beta_3$: LA FUNZIONE BIOLOGICA	8
1.2.2	INTEGRINA $\alpha_v\beta_3$: GLI ANTAGONISTI SINTETICI	11
1.2.3	INTEGRINA $\alpha_v\beta_3$: UN ANTAGONISTA NATURALE	16
1.2.4	INTEGRINA $\alpha_v\beta_3$: LA STRUTTURA	19
1.3	VEGF	24
1.3.1	VEGF: L'ATTIVITÀ BIOLOGICA	24
1.3.2	VEGF: ANALISI STRUTTURALE DEL SISTEMA	27
1.3.3	VEGF: GLI INIBITORI	30
1.4	OBIETTIVI	32

2. INIBITORI DELL'INTEGRINA $\alpha_v\beta_3$

2.1	RISULTATI E DISCUSSIONE	34
2.1.1	PROGETTAZIONE MOLECOLARE DEL PEPTIDE RGDechi	34
2.1.2	SINTESI DEL PEPTIDE RGDechi E DI SUOI ANALOGHI	38
2.1.3	STUDIO CONFORMAZIONALE DEL PEPTIDE RGDechi MEDIANTE DICROISMO CIRCOLARE	47
2.1.4	STUDI BIOLOGICI DEL PEPTIDE RGDechi E DEI SUOI ANALOGHI	48
2.2	PARTE SPERIMENTALE	53
2.2.1	COSTRUZIONE DEL MODELLO	53
2.2.2	APPARECCHIATURE E STRATEGIE DI SINTESI	54
2.2.3	DICROISMO CIRCOLARE: APPARECCHIATURE E CONDIZIONI SPERIMENTALI ADOTTATE	57
2.2.4	TEST BIOLOGICI: CONDIZIONI SPERIMENTALI	58

3. ANTAGONISTI DEL VEGF

3.1	RISULTATI E DISCUSSIONE	62
3.1.1	PROGETTAZIONE DELLE SEQUENZE PEPTIDICHE	62
3.1.2	SINTESI DEI PEPTIDI PROGETTATI	70
3.1.3	STUDIO CONFORMAZIONALE MEDIANTE DICROISMO CIRCOLARE DEI PEPTIDI PROGETTATI	73
3.1.4	STUDI BIOLOGICI DEI PEPTIDI PROGETTATI	77
3.2	PARTE SPERIMENTALE	84
3.2.1	COSTRUZIONE DEL MODELLO	84
3.2.2	STRATEGIE DI SINTESI E CONDIZIONI SPERIMENTALI	85
3.2.3	DICROISMO CIRCOLARE: APPARECCHIATURE E CONDIZIONI SPERIMENTALI ADOTTATE	88
3.2.4	TEST BIOLOGICI: CONDIZIONI SPERIMENTALI	89

4. CONCLUSIONI	93
5. TECNICHE UTILIZZATE	
5.1 SINTESI PEPTIDICA	98
5.2 DICROISMO CIRCOLARE	106
<i>ABBREVIAZIONI</i>	109
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	112
<i>APPENDICE</i>	
PhD THESIS SUMMARY	
LAVORI SOTTOMESSI:	
❖ Novel and Selective $\alpha_v\beta_3$ Receptor Peptide Antagonist: Design, Synthesis and Biological Behaviour	
❖ Peptide-based molecules in angiogenesis	

1. INTRODUZIONE

1.1 *L'ANGIOGENESI FISIOLÓGICA E PATOLOGICA: "ANGIOGENIC SWITCH"*

I tumori rappresentano attualmente, dopo gli infarti cardiaci, la seconda causa di mortalità nei paesi industrializzati e un milione di nuovi casi si verificano ogni anno. I metodi di terapia dei tumori solidi nell'adulto vanno dalla chirurgia e radioterapia per il trattamento dei tumori primari localizzati, alla chemioterapia, immunoterapia e ormonoterapia per il trattamento delle forme metastatiche. In particolare la chemioterapia, che prevede l'utilizzo di farmaci citotossici, ha rappresentato per molti anni la principale metodologia terapeutica nelle neoplasie in fase avanzata; tuttavia, è stato dimostrato che l'efficacia della chemioterapia è solo parziale e transitoria^[1] a causa, principalmente, della instabilità delle cellule tumorali, della loro eterogeneità, del loro elevato indice mutazionale e della resistenza farmacologica acquisita.^[2] Ciò ha portato negli ultimi dieci anni alla ricerca e allo sviluppo di nuove strategie terapeutiche antitumorali, legate alla definizione di nuove forme di immunoterapia, alla neutralizzazione di specifici fattori di crescita tumorale, alla terapia genica e all'inibizione dell'angiogenesi.^[3] Lo studio di quest'ultima, in particolare, e dei processi biologici alla sua base ha consentito una migliore conoscenza dei meccanismi molecolari coinvolti nella crescita tumorale e nella generazione di metastasi e ha permesso lo sviluppo di nuovi agenti antitumorali che inibiscono selettivamente differenti bersagli biochimici nella neovascolarizzazione.

L'angiogenesi è un processo fisiologico che implica una cascata di eventi sequenziali che portano alla formazione di nuovi capillari da vasi sanguigni preesistenti. Ciò si realizza attraverso la dissoluzione della membrana del vaso originale, la migrazione e proliferazione delle cellule endoteliali (EC) che lo costituiscono e la generazione di un nuovo tubo vascolare. L'angiogenesi avviene principalmente durante lo sviluppo embrionale, mentre negli organismi adulti il sistema vascolare è normalmente in uno stato quiescente, con solo lo 0.01% di EC che vanno incontro a mitosi. Negli adulti la produzione di nuovi vasi si verifica unicamente durante alcuni processi fisiologici, come la cicatrizzazione delle ferite, l'ovulazione, la gravidanza e il ciclo mestruale.^[4] In ognuno di questi casi l'evento angiogenico è strettamente regolato grazie al bilancio tra fattori pro- e anti-angiogenici, in grado rispettivamente di attivare la proliferazione e la migrazione delle EC, come ad es. i fattori di crescita (VEGF, PlGF, bFGF, etc.) e le molecole di adesione cellulare (integrine, selectine, caderine, etc.), o di sopprimerla come le molecole della matrice extracellulare derivanti da plasminogeno e collagene (angiostatina, endostatina, etc.). In risposta ad appropriati stimoli si può verificare, tuttavia, quello che viene definito "*angiogenic switch*", condizione nella quale il bilancio di suddetti fattori viene meno e l'angiogenesi, non più soggetta a regolazione fine, diventa patologica dando luogo a numerose e differenti malattie quali artrite reumatoide, retinopatia diabetica, psoriasi, emangioma giovanile, e in particolare crescita tumorale e generazione di metastasi.^[5] Diversi sono i fattori che possono indurre lo "*switch*", tra cui stress metabolico (bassa pressione di ossigeno, basso pH, ipoglicemia, etc.), meccanico (ad es., pressione generata dalla proliferazione cellulare) risposta immuno/infiammatoria (ad es., cellule immuno/infiammatorie che hanno invaso i tessuti), e mutazioni geniche (ad es, attivazione di oncogeni o delezione di geni soppressori tumorali che controllano la produzione dei regolatori di angiogenesi).^[6,7]

In che modo la relazione fra meccanismi genetici ed ambientali influenzi l'angiogenesi e la crescita tumorale è un problema complesso e non ancora del tutto risolto. Di certo è che le cellule tumorali, una volta generate per

poter sopravvivere e proliferare hanno bisogno dell'apporto di nutrienti e di ossigeno che possono essere loro assicurati solo attraverso il sistema vascolare, motivo per il quale attivano le EC verso la formazione di nuovi vasi sanguigni.

L'angiogenesi è un evento notevolmente complicato e numerosi sono i sistemi molecolari coinvolti nella sua regolazione fine sia al livello della proliferazione, che della migrazione e dell'assemblaggio delle EC. Fra questi particolare interesse hanno suscitato negli ultimi anni tre sistemi molecolari: il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF), le metalloproteinasi della matrice (MMP) e i recettori per le proteine delle matrice (integrine $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$).

Il processo angiogenico può essere schematizzato nel seguente modo (Fig. 1): le cellule neoplastiche rilasciano fattori pro-angiogenici, come il VEGF, che diffondono nei tessuti vicini e si legano ai recettori delle EC dei vasi sanguigni preesistenti, portando alla loro attivazione e proliferazione.

L'interazione fra cellule tumorali ed endoteliali conduce alla secrezione e all'attivazione di vari fattori proteolitici, come le MMP, in grado di degradare la membrana basale e la matrice extracellulare (ECM); tale degradazione permette alle cellule attivate di migrare verso il tumore formando nuovi vasi grazie al riconoscimento e all'interazione delle integrine con diversi ligandi liberati dall'ECM (come fibrinogeno, vitronectina, fibronectina e trombospondina).

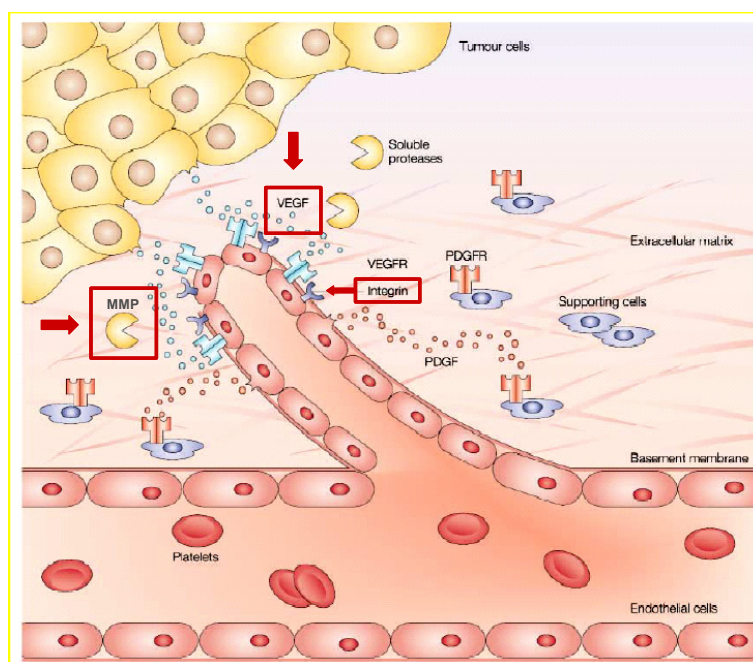


Fig.1. Schema esemplificativo dei passaggi chiave nella angiogenesi tumorale.

Sebbene le modalità di cooperazione tra i sistemi molecolari indicati non siano state ancora completamente chiarite, è indubbio che in condizioni fisiologiche l'interazione tra i vari fattori coinvolti consente lo sviluppo armonico di una rete di nevasi funzionalmente organizzata ed efficiente. Contrariamente ai vasi che si formano in condizioni fisiologiche, i nevasi tumorali sono strutturalmente e funzionalmente anomali, la vascolatura tumorale è altamente disorganizzata, i vasi sono tortuosi e dilatati, di diametro non uniforme, eccessivamente ramificati e deviati. Conseguentemente il flusso ematico all'interno del tumore risulta caotico e variabile,^[8] comportando la presenza di vaste aree ipossiche e talvolta necrotiche.^[9] Inoltre i vasi tumorali mancano dei meccanismi di protezione che i vasi normali acquistano durante la crescita. Mancano ad es., di cellule perivascolari funzionali che sono necessarie per proteggere i vasi contro le variazioni ormonali e di ossigeno, fornendo loro il necessario controllo

vasoattivo per soddisfare i bisogni metabolici e indurre la quiescenza vascolare.^[10]

Tutte queste condizioni riducono notevolmente le possibilità terapeutiche di farmaci antiblastici, che raggiungono il tumore attraverso il circolo, e facilitano la selezione di cloni tumorali più aggressivi e maligni.

Bersagliare le EC che supportano la crescita del tumore, piuttosto che le stesse cellule cancerose, è un approccio relativamente nuovo nella terapia del cancro, particolarmente promettente poiché queste cellule sono geneticamente stabili e, quindi, meno soggette ad accumulare mutazioni che permetterebbero loro di sviluppare rapidamente resistenza al trattamento farmacologico.^[11] Inoltre dati sperimentali sull'angiogenesi hanno evidenziato che le EC dei neovasi tumorali si distinguono dalle endoteliali quiescenti per l'espressione di specifici "marker" che potrebbero essere utilizzati come bersagli molecolari sia per la diagnosi che per la terapia dei tumori.

Numerosi studi clinici hanno dimostrato che l'angiogenesi è un processo essenziale per la crescita di tumori solidi e che la soppressione anche di una sola delle sue fasi inibisce la formazione di nuovi vasi, influenzando così sulla crescita del tumore e la generazione di metastasi.^[12]

Sono attualmente note e già in fase avanzata di sperimentazione numerose molecole che interferiscono a vari livelli del processo di angiogenesi, impedendo la formazione di neovasi e, quindi, la crescita tumorale.

In tale contesto si inserisce il presente lavoro di tesi avente come obiettivo la progettazione, lo sviluppo e la caratterizzazione di nuove molecole di natura peptidica e peptidomimetica in grado di modulare, positivamente o negativamente, l'attività di sistemi molecolari coinvolti nella cascata angiogenica.

A tale scopo sono stati scelti due sistemi modello che sono tra quelli più noti e studiati nell'ambito della regolazione del processo di angiogenesi patologica: il sistema dei recettori di membrana per le proteine della matrice (integrine) e quello dei fattori di crescita vascolari endoteliali.

1.2 INTEGRINE

Le integrine sono glicoproteine transmembrana che fanno parte di un'ampia famiglia di recettori di adesione cellulare coinvolti nelle interazioni cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare. Il nome integrine si riferisce appunto alla loro funzione di integrare e mettere in comunicazione l'esterno della cellula (ECM) con il suo interno (citoscheletro).

Le integrine sono costituite da due subunità α e β non covalentemente associate. Sono attualmente note 18 subunità α e 8 subunità β che combinandosi fra loro possono dar luogo a più di 20 diverse combinazioni di eterodimeri^[13] (Tab. 1), la maggior parte dei quali interagisce con specifici ligandi dell'ECM attraverso il riconoscimento di specifiche sequenze amminoacidiche. La sequenza più ampiamente studiata è rappresentata dal dominio RGD che risulta presente in numerose proteine della matrice quali fibrinogeno, vitronectina, fibronectina e trombospondina.

Oltre a riconoscere ligandi specifici con il loro dominio extracellulare, le integrine sono provviste di un dominio immerso nella membrana cellulare e di una porzione intracitoplasmatica capace di reclutare numerose molecole coinvolte nei meccanismi di trasduzione del segnale. Quindi il legame delle integrine al proprio ligando comporta una cascata di eventi intracellulari sequenziali necessari per numerosi processi, quali migrazione, proliferazione e differenziamento.

Integrin	Ligand		
	ECM	Soluble	Cell-cell
$\alpha_1 \beta_1$	Co; Ln		
$\alpha_2 \beta_1$	Co; Ln; Chad	MMP-1	
$\alpha_3 \beta_1$	Ln; Rn; Tsp-1 (Co; Fn)		$(\alpha_2 \beta_1; \alpha_3 \beta_1)$
$\alpha_4 \beta_1$	β_1 Fn; Op	pp-vWF; tTG; FXIII; angiostatin	VCAM-1; (α_4)
	β_7 Fn		VCAM-1; MAdCAM; (α_4)
$\alpha_5 \beta_1$	Fn	tTG; endostatin	ADAM-15,17; L1
$\alpha_6 \beta_1$	Ln	Fisp12/mCTGF; Cyr61	ADAM-2,9
	β_4 Ln		
$\alpha_7 \beta_1$	Ln		
$\alpha_8 \beta_1$	Fn; Tn; Nn	TGF β 1-LAP	
$\alpha_9 \beta_1$	Tn; Op; Co; Ln	pp-vWF; tTG; FXIII; angiostatin	VCAM-1; ADAM-12,15
$\alpha_{10} \beta_1$	Co		
$\alpha_{11} \beta_1$	Co		
$\alpha_V \beta_1$	β_1 Fn; Vn	TGF β 1-LAP	
	β_3 Vn; Fn, vWF; Op; Tn; Bsp; Tsp-1	Fg; Cyr61; Fisp12/mCTGF; MMP2; endostatin; angiostatin; tumstatin	ADAM-15, 23; CD31
	β_5 Vn; Bsp	TGF β 1-LAP; Cyr61; endostatin	
	β_6 Fn; Tn	TGF β 1-LAP	
	β_8 Co; Ln; Fn	TGF β 1-LAP	
$\alpha_{IIb} \beta_3$	Vn; Fn; vWF	Fg; Cyr61; Fisp12/mCTGF; prothrombin	
$\alpha_L \beta_2$			ICAM-1-5
$\alpha_M \beta_2$		Fg; iC3b; FX	ICAM-1; VCAM-1
$\alpha_X \beta_2$		Fg; iC3b	
$\alpha_D \beta_2$			ICAM-3; VCAM-1
$\alpha_E \beta_7$			E-cadherin

Tab. 1. Rappresentazione delle subunità α e β delle integrine note e loro combinazioni. Sono riportati i principali ligandi presenti nell'ECM, quelli solubili e quelli di interazione cellula-cellula.

1.2.1 INTEGRINA $\alpha_V\beta_3$: LA FUNZIONE BIOLOGICA

Nell'ampio spettro di integrine espresse sulla superficie cellulare, il recettore della vitronectina, integrina $\alpha_V\beta_3$, sembra rivestire un ruolo di primaria importanza nel processo di angiogenesi.^[14] In particolare è stato dimostrato che l'integrina $\alpha_V\beta_3$ insieme all'integrina $\alpha_V\beta_5$, entrambe normalmente espresse sulla superficie cellulare in bassa concentrazione, risultano sovraespresse in presenza di patologie neoplastiche sia sulla superficie delle EC sia su quella delle cellule cancerose, fungendo da veri e propri *marker* tumorali^[15] (Fig. 2).

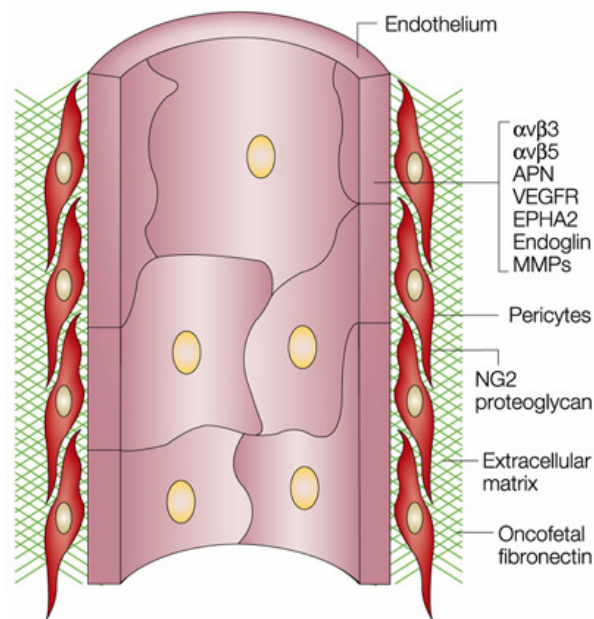


Fig. 2. Rappresentazione della parete cellulare di un vaso sanguigno tumorale e dei “*marker*” selettivamente espressi sulla sua superficie.

Numerose evidenze sperimentali indicano che, in seguito all'interazione con opportuni ligandi dell'ECM, le integrine $\alpha_V\beta_3$ formano dei *cluster* molecolari e attivano uno o più *pathway* di segnali intracellulari che sono necessari per

la sopravvivenza, la proliferazione, la differenziazione e la migrazione cellulare.^[16] Tra questi si ha reclutamento di componenti del citoscheletro (come vinculina, actina, talina), attivazione di chinasi come MAP e FAK, che legano a loro volta ed attivano fattori di crescita e piccole proteine G, in grado di continuare la lunga e complessa cascata di trasduzione del segnale attraverso un meccanismo che è definito di “*outside-in signalling*” (Fig. 3).

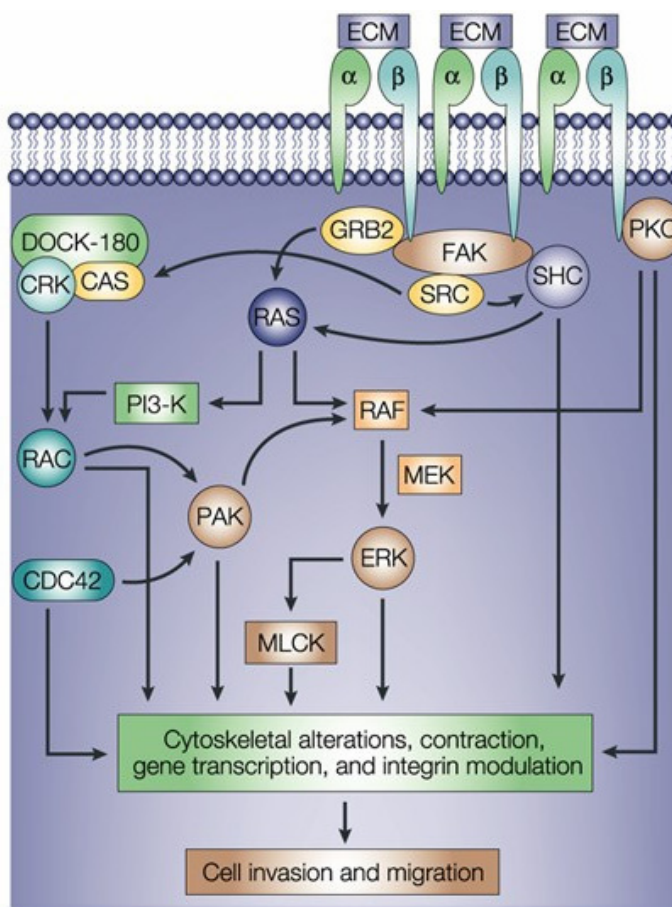


Fig. 3. Regolazione della trasduzione dei segnali extracellulari mediati dall'integrina $\alpha_v\beta_3$ attraverso il meccanismo di “*outside-in signalling*”.

Tutto ciò porta come conseguenza ad un aumento dell'affinità e dell'avidità delle cellule per i componenti dell'ECM, requisiti essenziali perché le cellule acquistino la forza necessaria al movimento. Le cellule, infatti, diventano polarizzate con una distribuzione asimmetrica di molecole sulla loro superficie: le integrine si concentrano sulla zona anteriore delle cellule nella

direzione della migrazione favorendo, in tal modo, la formazione di contatti di adesione.

Le integrine $\alpha_v\beta_3$ non solo trasducono messaggi dall'esterno all'interno delle cellule, ma rispondono anche a stimoli intracellulari legando specifiche molecole citoplasmatiche che alterano il modo in cui le integrine interagiscono con l'ambiente extracellulare secondo un processo definito "*inside-out signalling*" (Fig. 4).

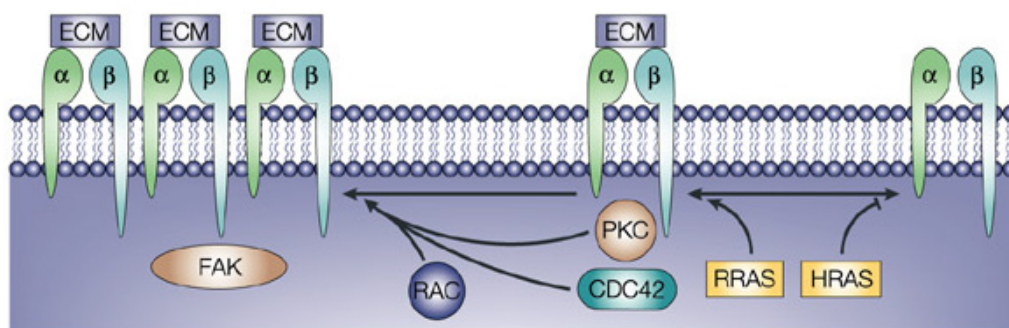


Fig. 4 Regolazione della trasduzione dei segnali intracellulari mediati dall'integrina $\alpha_v\beta_3$ attraverso il meccanismo di "*in-outside signalling*".

L'interazione con tali molecole, infatti, induce una variazione conformazionale della porzione extracellulare delle integrine che risulta in una maggiore capacità di interazione di queste con i propri ligandi.

Diversi studi indicano che antagonisti in grado di inibire tale legame inducono l'apoptosi e bloccano il processo angiogenico.^[17]

1.2.2 INTEGRINA $\alpha_V\beta_3$: GLI ANTAGONISTI SINTETICI

L'identificazione nel 1984 della sequenza di riconoscimento RGD come sito di adesione cellulare nella fibronectina ha segnato una svolta storica nella caratterizzazione molecolare delle interazioni cellula-ECM.^[18,19]

Fu scoperto successivamente che molte altre proteine, compresa la vitronectina, ligando naturale dell'integrina $\alpha_V\beta_3$, possiedono la stessa sequenza che permette loro di interagire in maniera promiscua con quasi tutte le integrine note.

È stato dimostrato che ogni residuo della sequenza tripeptidica è fondamentale per il legame ai recettori, in quanto la sostituzione anche di uno solo dei tre residui ne comporta la totale perdita di attività.^[19, 20]

Tale scoperta ha aperto la strada a nuove ed intense ricerche tutte miranti alla individuazione e alla sintesi di nuove molecole in grado di fungere da antagonisti delle integrine ed, in particolare, della integrina $\alpha_V\beta_3$ allo scopo di bloccare il processo angiogenico e, quindi, il diffondersi di malattie neoplastiche. Il problema fondamentale che in ogni caso tutti si sono trovati ad affrontare è quello della selettività, cioè quello di riuscire ad individuare dei composti che non solo fossero attivi ma anche selettivi nei confronti dell'integrina $\alpha_V\beta_3$, in modo da interagire solo ed esclusivamente con il bersaglio in esame senza interferire con le normali funzioni biologiche espletate dalle altre integrine.

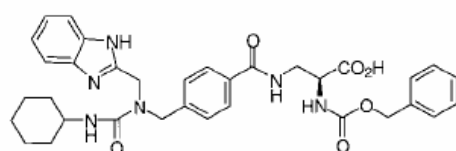
Sono stati in tal modo sintetizzati decine di composti tutti nuovi candidati terapeutici, tra cui si annoverano piccole molecole organiche^[21-23] che mimano le strutture dei residui carichi di Arg e Asp; vari peptidi, lineari e ciclici,^[24-26] e numerosi peptidomimetici;^[27-28] inoltre, sono stati individuati anticorpi specifici come l'anticorpo monoclonale umano LM609 denominato Vitaxin, attualmente in fase clinica.^[29]

Fra tutte le nuove molecole ottenute sin ora, in particolare, il peptide ciclico ciclo(RGDf-NMeV) (f= D-Phe), noto come Cilengitide,^[30] è riportato in

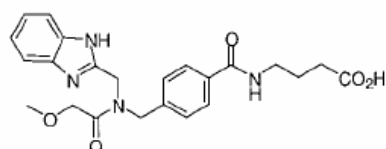
letteratura come uno tra i più potenti antagonisti dell' $\alpha_v\beta_3$. Tale peptide è stato progettato sulla base dell'osservazione che la selettività nei confronti del recettore, se non nella sequenza amminoacidica, dovesse risiedere nella conformazione assunta dagli atomi dei residui RGD nello spazio. Ed effettivamente studi di attività hanno dimostrato che la restrizione conformazionale realizzata ciclizzando opportunamente il peptide comporta una buona selettività di questo nei confronti dell'integrina $\alpha_v\beta_3$ rispetto all'integrina $\alpha_v\beta_5$ e un valore di IC_{50} nel range nanomolare.^[23]

Sulla base del modello del ciclo(RGDf-NMeV) sono stati in seguito progettati molti altri peptidi e peptidomimetici, alcuni dei quali con attività paragonabile al peptide progenitore.

Alcuni esempi di antagonisti dell'integrina $\alpha_v\beta_3$ sono di seguito riportati:

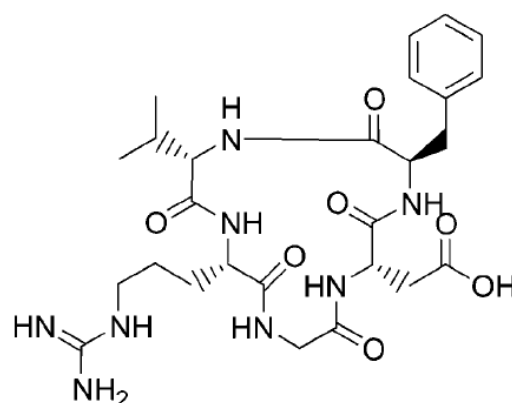


SCH 221153

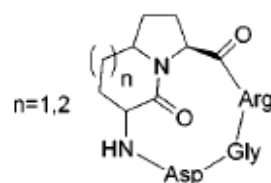


SCH 216687

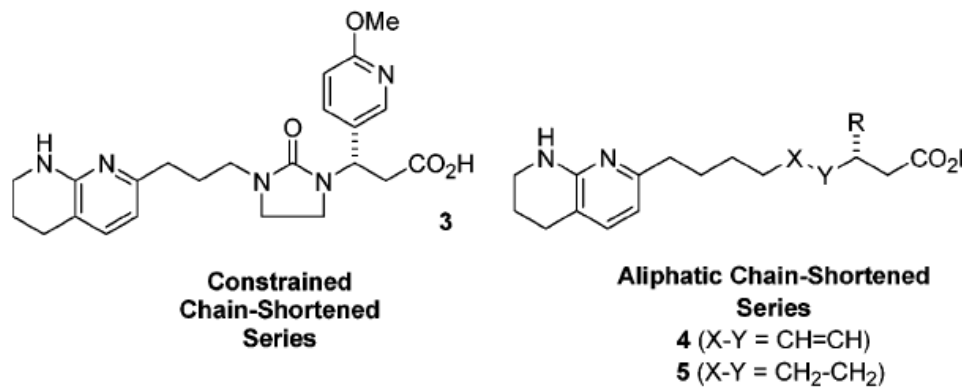
Strutture di mimetici sintetici dell'RGD^[31]



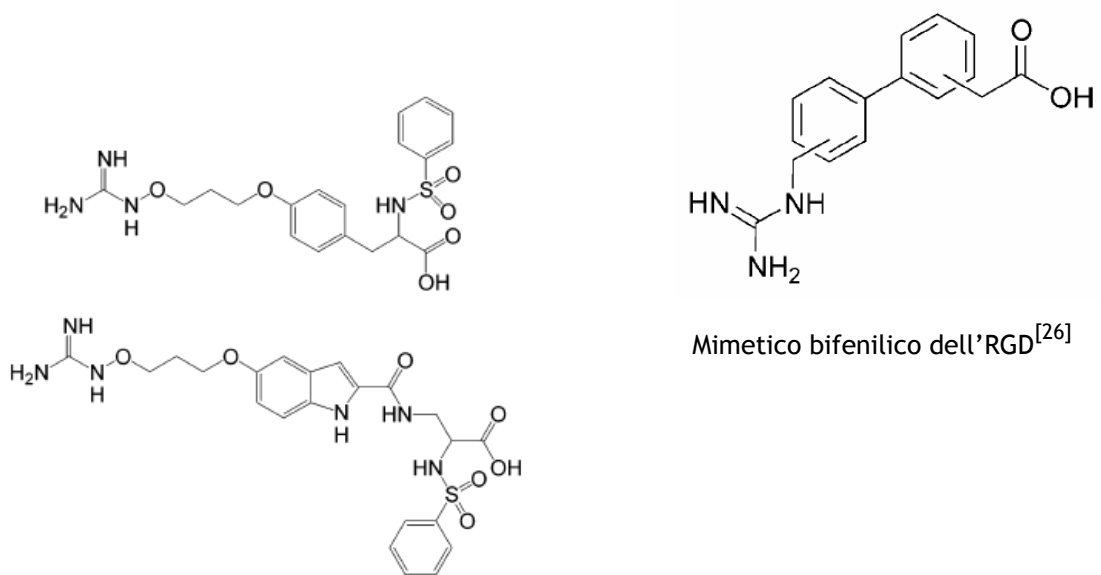
Peptide ciclo(RGDf-NMeV)^[32]



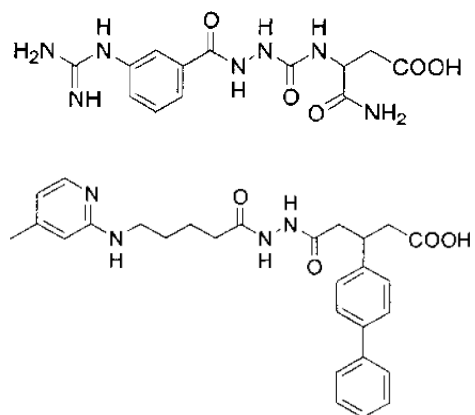
Pseudopeptidi ciclici RGD incorporanti lattami biciclici condensati^[28]



Derivati degli acidi nonanoici a catena corta^[33]

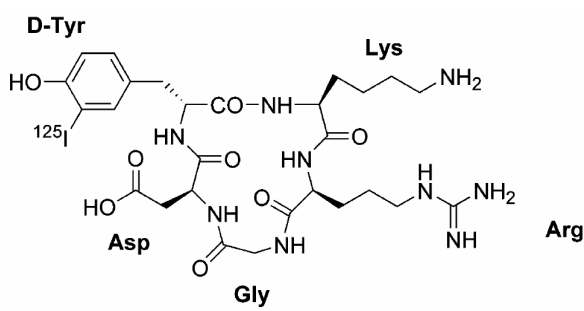


Mimetici del gruppo guanidinio con aumentata rigidità^[22]

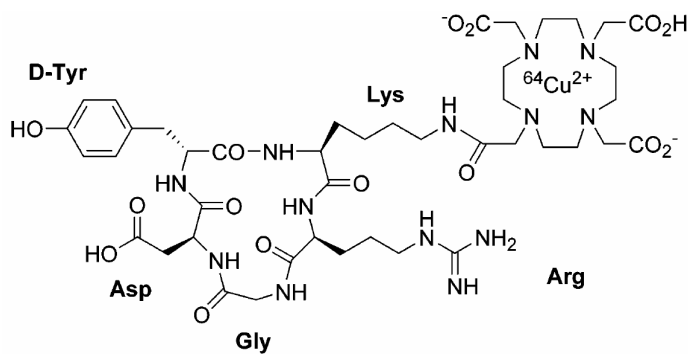
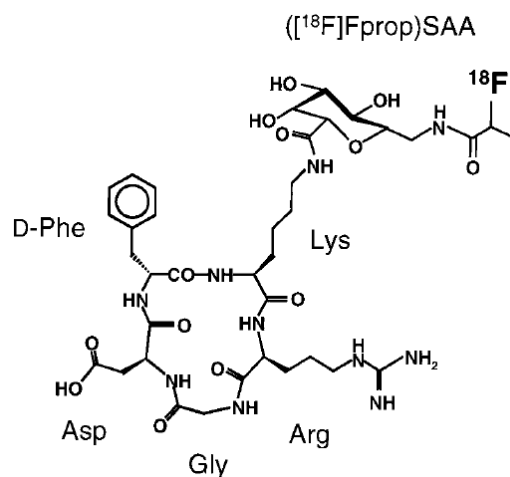


Mimetici dell'RDG contenenti aza-glicina^[23,27]

Sempre basati sul modello del ciclo(RGDf-NMeV) sono stati recentemente sviluppati antagonisti radiomarcanti per analisi tomografica a singolo fotone ed ad emissione positronica (PET).^[34,35] Sono noti, tra gli altri, composti in cui il residuo di Phe del ciclo è stato sostituito con uno di Tyr per la marcatura con ¹²⁵I;^[36] altri in cui il residuo di Lys è stato coniugato con il DOTA in grado di coordinare il ⁶⁴Cu^[37], o coniugato con un residuo di galattosio e marcato con ¹⁸F, allo scopo di aumentare la solubilità e migliorare la farmacocinetica del tracciante,^[38-40] etc. Di seguito sono riportati alcuni esempi.

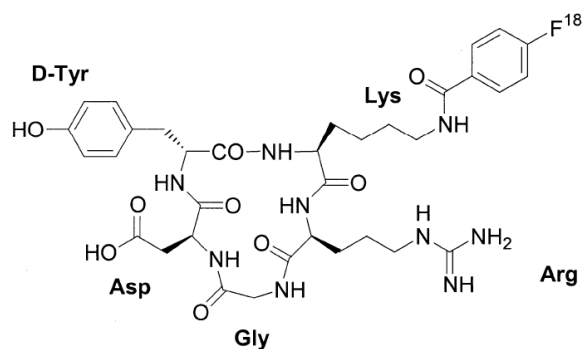


Struttura di ¹²⁵I-RGD^[36]



Struttura di ⁶⁴Cu-DOTA-RGD^[37]

Struttura schematica di [¹⁸F]Galacto-RGD^[38-40]



Struttura schematica di [¹⁸F]FB-RGD^[41]

Alcuni di questi traccianti si sono dimostrati realmente efficaci nel monitorare in maniera non invasiva l'espressione dell'integrina $\alpha_v\beta_3$ in pazienti affetti da tumori maligni, facendo prevedere e sperare nel loro impiego per ottenere utili informazioni che permettano di scegliere la terapia anti-cancro più adatta ad ogni paziente e di studiarne la risposta farmacologia.

1.2.3 INTEGRINA $\alpha_v\beta_3$: UN ANTAGONISTA NATURALE

Oltre gli antagonisti sintetici dell'integrina $\alpha_v\beta_3$ in natura sono presenti molte altre molecole tra cui le disintegrine, proteine che comprendono fra i più potenti inibitori di integrine isolati dal veleno di varie vipere.^[42]

I membri della famiglia delle disintegrine presentano proprietà comuni; tutti infatti, possiedono la sequenza di riconoscimento RGD, tutti sono caratterizzati da sequenze relativamente piccole (50-80 aa) che presentano elevata omologia, sono ricchi di cisteine, e tutti sono in grado di inibire l'aggregazione delle piastrine e l'adesione cellulare. Ma la caratteristica fondamentale di cui i membri delle disintegrine sono dotati è la capacità di interagire in maniera selettiva con le varie integrine, requisito che le ha poste negli ultimi anni al centro di numerose ricerche.

L'Echistatina è una delle più piccole proteine (49 aa, seq: ECESGPCCRNCKFLKEGTICKRARGDDMDDYCNGKTCDCPRNPHKGPAT) appartenente alla famiglia delle disintegrine isolata nel 1988 dal veleno di *Echis carinatus*.^[43] Questa proteina risulta un potente inibitore dell'integrina $\alpha_v\beta_3$, in grado di legarsi in maniera irreversibile al recettore e bloccare il *binding* dei ligandi naturali, come la vitronectina.^[44]

Studi di mutagenesi volti a spiegare il motivo di una così forte interazione hanno indicato che il *pattern* di ponti disolfuro che caratterizzano l'echistatina, la sequenza RGD, i residui amminoacidici adiacenti e il suo dominio C-terminale sono critici per l'affinità e il riconoscimento selettivo del recettore.^[45] Inoltre, grazie all'impiego di anticorpi monoclonali,^[46] è stato dimostrato che l'interazione dell'echistatina con l'integrina $\alpha_v\beta_3$ comporta una variazione conformazionale nel recettore che risulta in una esposizione di epitopi definiti "*ligand-induced binding site*" (LIBS). Ciò sembra sia dovuto all'interazione del recettore con la porzione C-terminale della disintegrina, in quanto la sua eliminazione comporta una completa

perdita della capacità di indurre gli epitopi, oltre che una diminuzione del numero di siti di *binding* e dell'affinità di tale disintegrina per le piastrine. Studi strutturali mediante tecniche NMR^[47] tra l'echistatina e l'integrina $\alpha_V\beta_3$ indicano che la sequenza RGD dell'echistatina è bloccata in una conformazione estesa mediante formazione di quattro ponti disolfuro. Esperimenti di "photoaffinity cross-linking"^[48,49] e studi di docking^[50] indicano che l'estremità C-terminale interagisce con uno specifico sito all'interno della subunità β_3 distinto dal sito di interazione della sequenza RGD con il recettore e dai residui fiancheggianti (Fig. 5 e Fig.6).

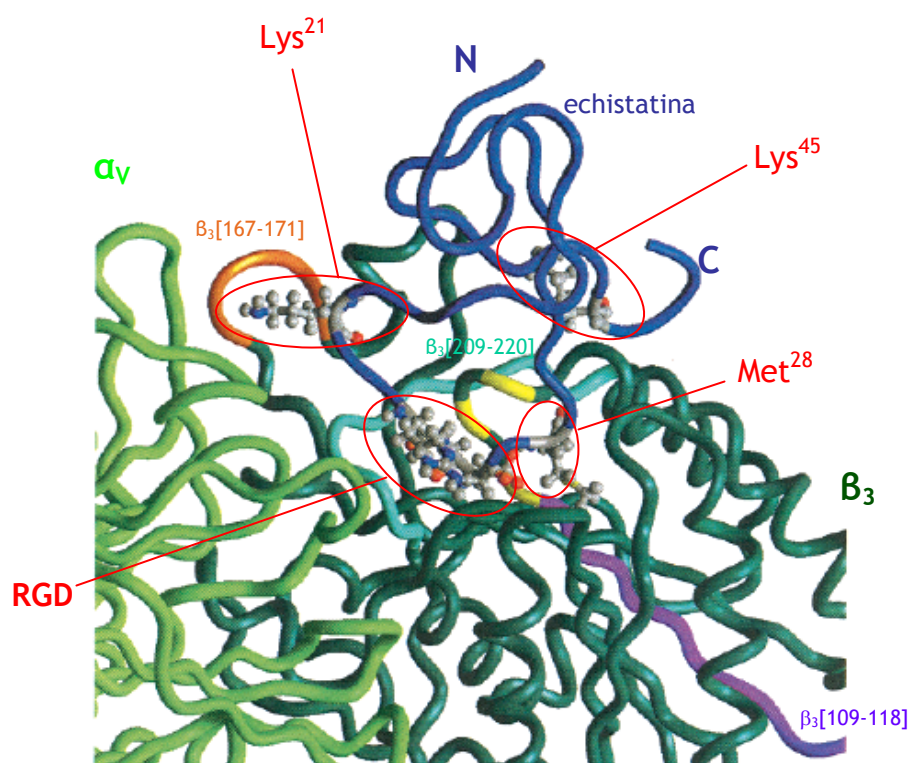


Fig.6. Illustrazione del modello del sito di *binding* dell'echistatina all'integrina $\alpha_V\beta_3$. Il recettore è mostrato in verde (chiaro per la subunità α_V , scuro per quella β_3). Le regioni di β_3 identificate come punti di contatto con l'echistatina (in blu scuro) sono denotate rispettivamente in viola ($\beta_3[109-118]$), arancione ($\beta_3[167-171]$) e in verde ($\beta_3[209-220]$). Sono inoltre indicati i residui dell'echistatina che interagiscono con le subunità dell'integrina (Lys^{21} , seq. $R^{24}GD^{26}$, Met^{28} e Lys^{45}).^[50]

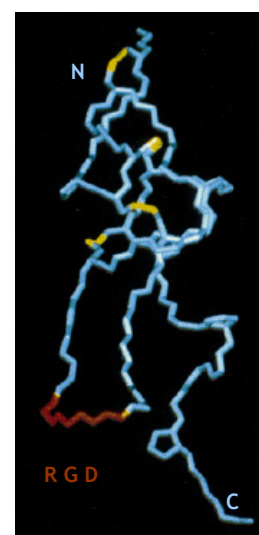


Fig.5. Modello della struttura dell'echistatina. In rosso sono evidenziati i residui RGD, in giallo i ponti disolfuro.^[49]

A partire dai risultati ottenuti dai vari esperimenti condotti, è stata avanzata un'ipotesi per spiegare l'interazione dell'echistatina con l'integrina $\alpha_v\beta_3$. Tale ipotesi prevede un meccanismo a due *step* secondo il quale inizialmente la struttura del *loop* RGD, dettata dai residui adiacenti, determina il riconoscimento selettivo dell'integrina con bassa affinità e induce in essa solo piccole variazioni conformazionali; successivamente, l'interazione del dominio C-terminale con il recettore implica variazioni conformazionali più marcate che portano ad un ulteriore aumento dell'affinità di *binding* della molecola per il sito di riconoscimento. Questi due *step* sembrerebbero essenziali e spiegherebbero l'elevato effetto inibitorio esercitato dall'echistatina nei confronti del recettore $\alpha_v\beta_3$.

1.2.4 INTEGRINA $\alpha_V\beta_3$: LA STRUTTURA

Studi di microscopia elettronica indicano che la struttura generale delle integrine è caratterizzata da due domini base: una grossa “testa” globulare immersa nello spazio extracellulare e che contiene il sito di legame per i ligandi e due lunghe “gambe” che attraversano la membrana e sporgono nello spazio citoplasmatico.

Negli ultimi anni sono state risolte le strutture ai raggi X del dominio extracellulare dell'integrina $\alpha_V\beta_3$ ^[51] e del complesso che questa forma con il ciclo-(RGDf-NMeV).^[52]

La struttura cristallografica dell'integrina $\alpha_V\beta_3$, determinata in presenza di ioni Ca^{2+} , indica che la testa ovoidale ($\sim 90\text{\AA} \times 60\text{\AA} \times 45\text{\AA}$) contiene le estremità N-terminali delle subunità α e β . La subunità α_V consiste di un *β -propeller* di sette filamenti, ognuno formato da un *β -sheet* antiparallelo a quattro *strands* (Fig.7 A), mentre la subunità β_3 è costituita da un “*von Willebrand factor A-domain*” (denominato *BA-domain*, Fig.7 D). Il *BA-domain* assume una struttura tipo “*Rossmann fold*”, con sei *β -sheets* circondati da otto eliche, ed è ancorato alla faccia superiore del *β -propeller* mediante il residuo di Arg²⁶¹ di un segmento di elica 3_{10} che si inserisce nel core idrofobico della parte centrale del *β -propeller*. Possiede, inoltre, un motivo di interazione con metalli bivalenti, definito MIDAS (*metal ion-depend adhesin site*) che sembra avere una potenziale funzione regolatoria nel *binding* dei ligandi. È universalmente noto, infatti, che il legame dei ligandi alle integrine è catione-dipendente.

La coda della subunità α_V è composta da tre ampi domini *β -sandwich*: un “*thight domain*” di tipo immunoglobulinico e due domini molto simili che formano il “*calf module*”. La coda della subunità β_3 consiste di un “*PSI domain*” (PSI: plexine, semaforine, integrine), quattro “*EGF domain*” (EGF: epidermal growth factor), e un “*BTD-domain*” (BTD: B tail).

Nella struttura cristallografica è evidente come le code delle subunità α e β si ripieghino di un angolo di 135° formando una struttura a V con una sorta di ginocchio (“*genu*”) fra il *thigh domain* e il *calf module* dell’ α_v . (Fig. 7 B e C).

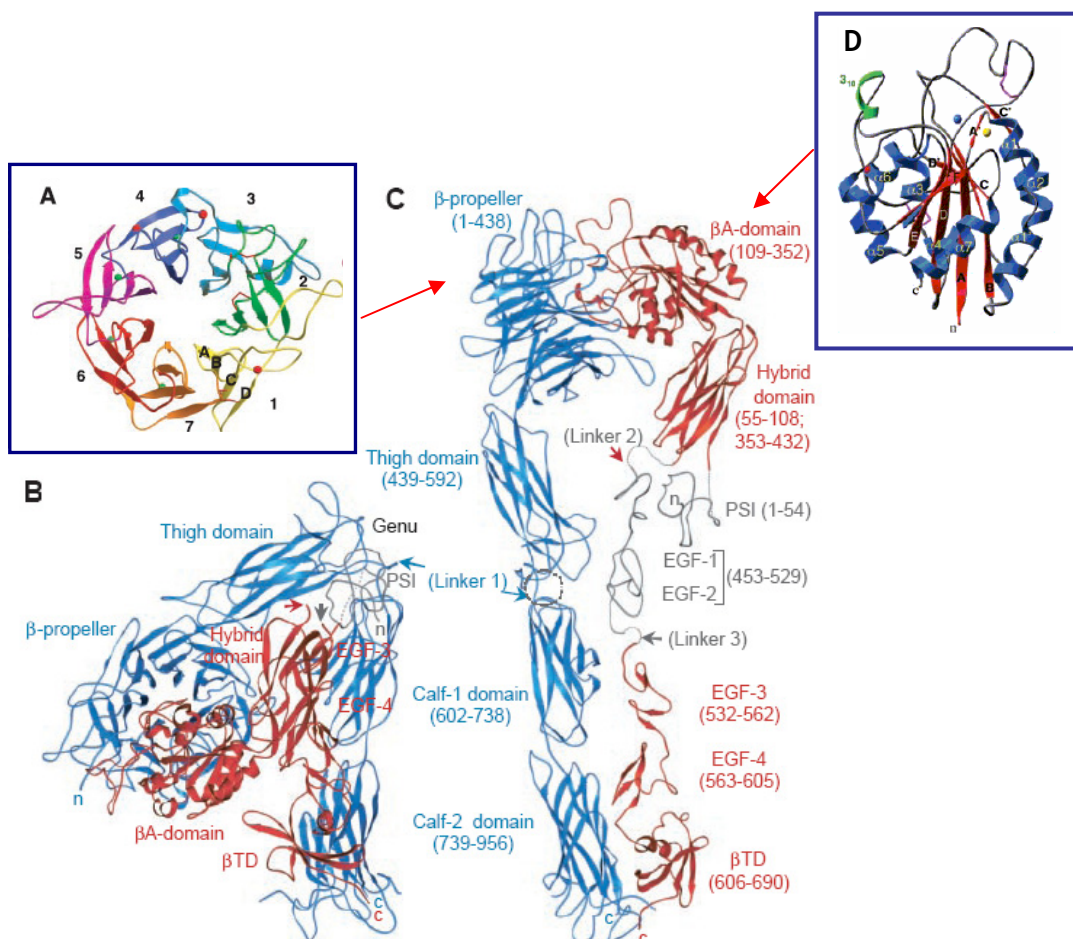


Fig.7. A) Vista dall’alto del *beta-propeller* della subunità α . B) e C) Rappresentazione del segmento extracellulare dell’integrina $\alpha_v\beta_3$. D) Rappresentazione del *betaA-domain* della subunità β .

La struttura cristallografica del complesso integrina $\alpha_v\beta_3$ -ciclo(RGDf-NMeV) indica che il pentapeptide si inserisce in una fessura tra il *beta-propeller* e il *betaA-domain* della testa del recettore (Fig. 8). La sequenza RGD mantiene i maggiori contatti con le due subunità dell’integrina e ogni residuo partecipa ampiamente all’interazione. Le catene laterali dei residui di Arg e Asp puntano in direzioni opposte. L’ Arg si inserisce in un solco alla sommità del *beta-propeller* della subunità α e il suo gruppo guanidinio interagisce con le

catene laterali dei residui di Asp²¹⁸ e Asp¹⁵⁰ mediante ponti salini, mentre la funzione carbossilica dell'Asp interagisce con il *BA-domain* mediante formazione di legami idrogeno con il *backbone* ammidico di Tyr¹²² e Asn²¹⁵ e interazioni con ioni metallici al motivo MIDAS. Contrariamente al residuo di Arg, che presenta una parte esposta al solvente, quello di Asp appare completamente immerso nel sito recettoriale.

Il residuo di Gly, che completa il prototipo della sequenza RGD del ligando, si trova all'interfaccia delle subunità α e β , stabilendo interazioni di tipo idrofobico con l' α_V , in particolare con l'ossigeno carbonilico del residuo di Arg²¹⁶. Gli altri due residui del pentapeptide sono rivolti verso l'esterno e non interagiscono con il recettore.

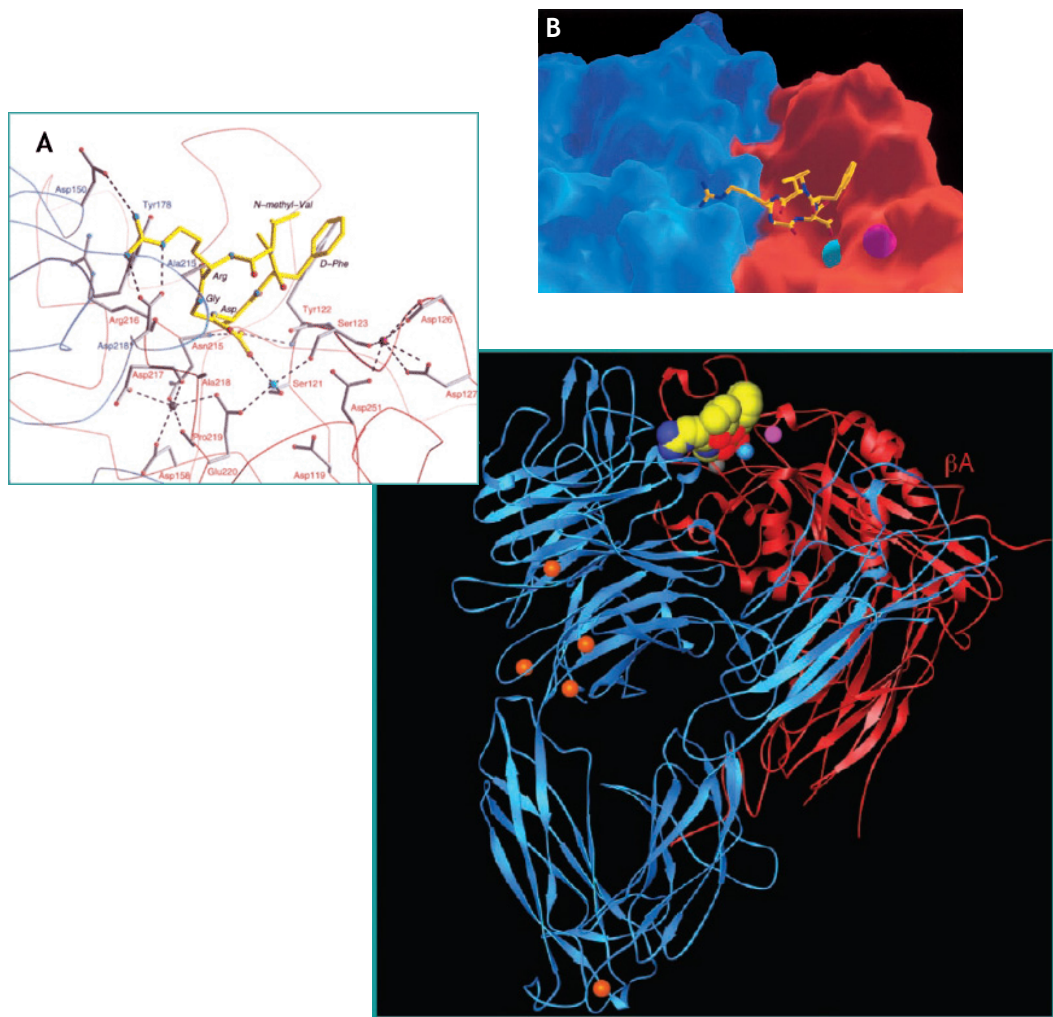


Fig. 8. Struttura del complesso integrina $\alpha_v\beta_3$ -ciclo(RGDf-NMeV). A) e B) Particolari del sito di legame al recettore.

È stato dimostrato che il legame del ciclo(RGDf-NMeV) al recettore è associato ad evidenti variazioni sia nella struttura terziaria dell'integrina $\alpha_v\beta_3$ che in quella quaternaria.

Le variazioni al livello della struttura terziaria riguardano il *BA domain* e, in particolare, l'elica $\alpha 1$ che nello stato legato si avvicina al motivo MIDAS permettendo contatti di questo con ioni metallici. Il confronto tra il motivo MIDAS nello stato legato e in quello non legato mette in chiara evidenza che in quest'ultimo il residuo di Glu²²⁰ del recettore si sporge nel sito del MIDAS formando un legame idrogeno con il residuo di Asp¹¹⁹, impedendo in tal modo la coordinazione di ioni metallici. Nello stato legato, invece, la presenza del ligando fa sì che il Glu²²⁰ si riorienta, permettendo l'accesso dello ione metallico al sito MIDAS e la sua interazione con il residuo di Asp della sequenza RGD (Fig. 9).

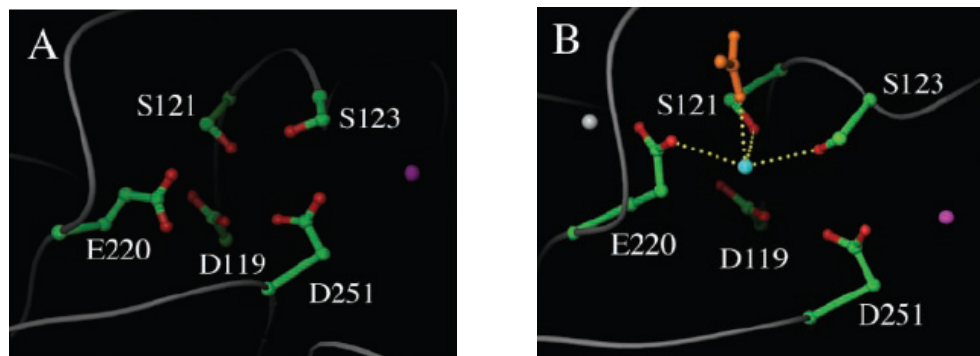


Fig.9. Rappresentazione del motivo MIDAS A) nello stato non legato B) nello stato legato.

Per quanto riguarda i riarrangiamenti nella struttura quaternaria dell'integrina $\alpha_v\beta_3$ ciò che si osserva è un movimento congiunto dei due domini α e β in corrispondenza del sito di *binding* del ligando, che definisce il passaggio da stato non legato o “inattivo” a stato legato o “attivo”.

Esistono attualmente diverse teorie che cercano di spiegare come avviene il processo di attivazione e prevedono meccanismi a due stati o meccanismi a stati multipli. Tra questi, la teoria più accreditata sembra quella del modello a tre stati.^[53]

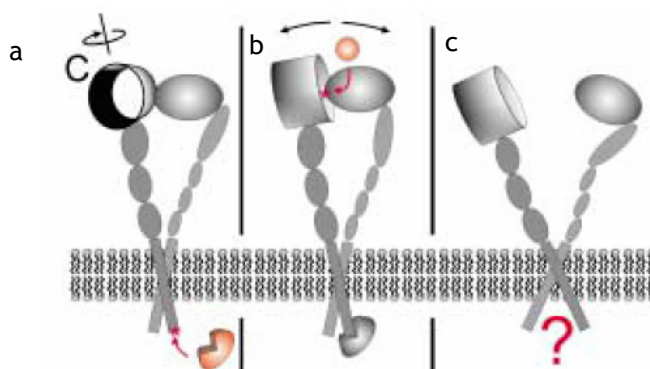


Fig.10. Modello a tre stati della trasduzione del segnale nelle integrine.^[53]

In tale modello lo stato inattivo (Fig. 10a) è bloccato nella sua conformazione da interazioni intracellulari. Proteine dello spazio intracellulare possono legare la coda citoplasmatica dell'integrina inducendo un movimento rotazionale nel β -propeller che porta l'integrina in uno stato preattivato, in una conformazione più adatta ad accogliere il ligando (Fig. 10b). Il successivo legame del ligando al sito di *binding* induce ulteriori variazioni conformazionali che portano alla separazione delle subunità α e β nel loro dominio extracellulare (Fig. 10c).

1.3 VEGF

Nel 1989, dopo anni di intensi studi volti a chiarire la funzione svolta dai fattori di crescita nella formazione di nuovi vasi sanguigni, fu identificato ed isolato dalle cellule follicolari pituitarie di bovino una nuova proteina in grado di legare l'eparina con elevata affinità. Poiché tale proteina presentava una forte attività proliferativa unicamente nei confronti delle EC vascolari fu denominata "*Vascular Endothelial Growth Factor*".^[54]

1.3.1 VEGF: L'ATTIVITÀ BIOLOGICA

Il VEGF, noto anche come VEGF-A, è una proteina omodimerica appartenente alla famiglia dei *cystine knot growth factors*. Esistono diversi analoghi strutturali del VEGF (VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PlGF) e 5 diverse specie molecolari derivanti da uno *splicing* alternativo dell'mRNA del gene codificante il VEGF, rispettivamente di 121, 145, 165, 189 e 206 amminoacidi.^[55,56] VEGF₁₆₅, l'isoforma più abbondante, è una glicoproteina di 45 KD secreta normalmente in forma libera, sebbene una significativa frazione rimanga legata alla superficie dell'ECM. VEGF₁₂₁ è un polipeptide prodotto in forma solubile, debolmente acido e non in grado di legare l'eparina; al contrario, VEGF₁₈₉ e VEGF₂₀₆ presentano caratteristiche basiche, legano l'eparina con affinità maggiore rispetto al VEGF₁₆₅ e sono quasi completamente sequestrati dall'ECM.^[57]

La funzione biologica del VEGF è mediata dall'interazione con due recettori appartenenti alla famiglia delle tirosin chinasi, il *Kinase domain receptor* (KDR) e *Fms-like tirosine kinase* (Flt-1)^[58] (Fig. 11).

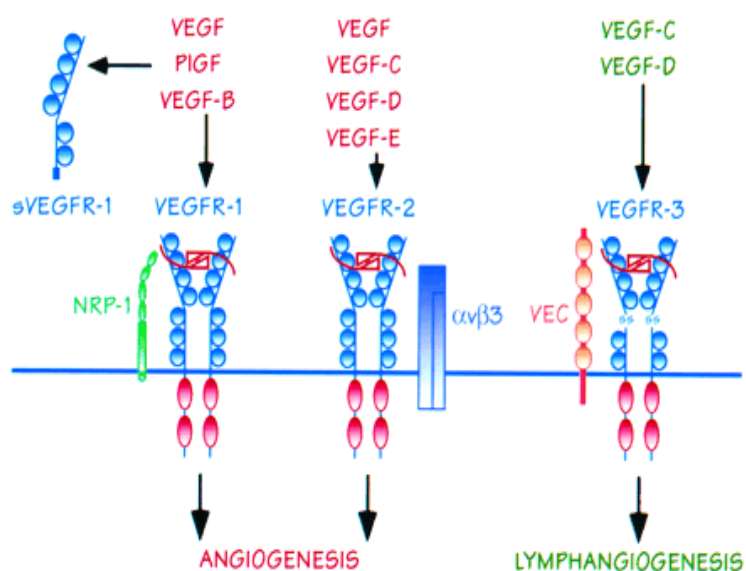


Fig.11. Rappresentazione delle interazioni del VEGF e dei suoi analoghi con alcuni recettori espressi dalle EC.^[59]

Tali recettori sono localizzati sulla superficie di diversi tipi di EC^[60] e sono entrambi costituiti da sette domini immunoglobulinici nella porzione extracellulare, da una singola regione transmembrana e da un dominio chinamico intracellulare.

Il VEGF interagisce con i recettori KDR e Flt-1 inducendone la dimerizzazione come diretta conseguenza della simmetria stessa della molecola del VEGF, la quale presenta siti identici di legame localizzati ai poli del dimero. L'attivazione dei recettori comporta la fosforilazione della loro porzione citoplasmatica in corrispondenza di residui di Tyr necessari a controllare l'attività chinamica dei recettori stessi e a creare siti di *docking* per specifiche molecole citoplasmatiche che fungono da substrati per le chinasi, come ad es. MAPK. La cascata di segnali intracellulari che viene in questo

modo generata si traduce in un segnale di proliferazione delle EC, la cui conoscenza dettagliata è tuttavia ancora incompleta e oggetto di intense ricerche. Molti studi indicano per Flt-1 e KDR differenti proprietà e modi di trasdurre il segnale ed è stato dimostrato che il VEGF presenta un'affinità per Flt-1 dieci volte superiore rispetto a KDR, anche se l'interazione con quest'ultimo genera un segnale a monte più forte.^[61-63]

Diversi meccanismi sembrano partecipare alla regolazione dell'espressione genica del VEGF, come la concentrazione di ossigeno,^[64] la presenza di citochine^[65] e la differenziazione cellulare.^[66]

Tra questi la pressione di ossigeno gioca di sicuro un ruolo principale, come dimostrato da studi sia *in vitro* che *in vivo*. L'espressione dell'mRNA codificante per il VEGF è, infatti, indotta in maniera rapida e reversibile dall'esposizione a bassa pressione di ossigeno in diversi tipi di cellule sia sane che tumorali.^[63] In qualunque modo sia stato indotto, è stato dimostrato che con l'aumento del livello di concentrazione del VEGF si verifica in combinazione anche una sovraespressione dei recettori Flt-1 e KDR delle EC.^[67]

1.3.2 VEGF: ANALISI STRUTTURALE DEL SISTEMA

In letteratura sono riportate diverse strutture del VEGF sia allo stato libero^[68,69] sia complessato con un anticorpo^[70], con un inibitore peptidico^[71] e con il dominio 2 del recettore Flt-1.^[72]

La struttura cristallografica del frammento 8-109 del VEGF, che lega i recettori con affinità paragonabile al *wild-type*, dimostra che il VEGF è un omodimero antiparallelo legato covalentemente da due ponti disolfuro. Esso è caratterizzato da un motivo *cystine knot* che consiste di un anello di otto residui formato da due ponti disolfuro (Cys⁵⁷-Cys¹⁰² e Cys⁶¹-Cys¹⁰⁴) tra due β -strands adiacenti e di un terzo ponte disolfuro (Cys²⁶-Cys⁶⁸) penetrante questo anello (Fig. 12).^[69]

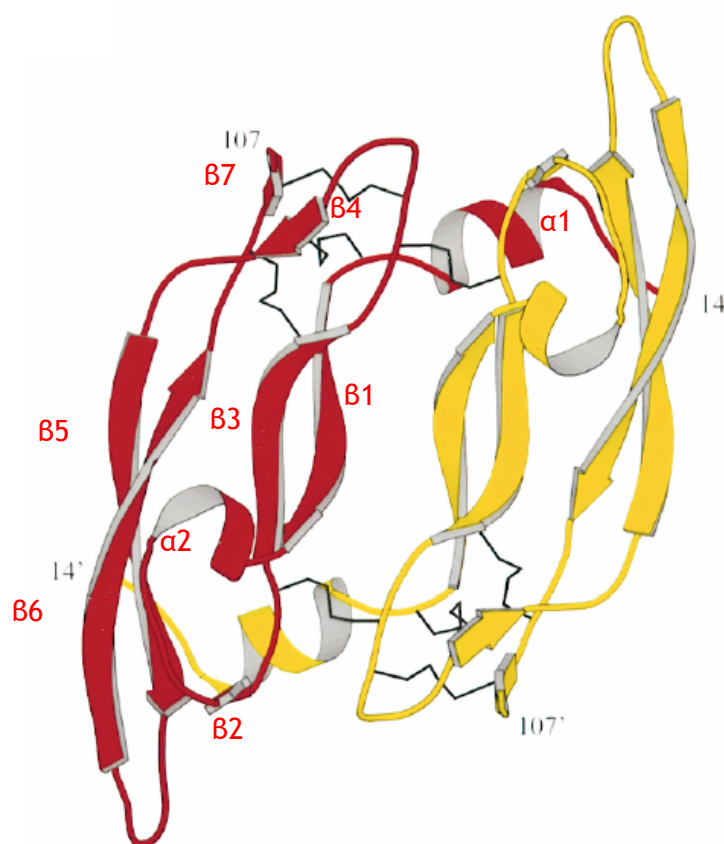


Fig. 12. Struttura ribbon del VEGF. Sono evidenziati i due monomeri.^[69]

Nella struttura del VEGF sono presenti un totale di 7 segmenti *B-strands* (B1-B7) e due segmenti ad α -elica (α 1 e α 2). Il core idrofobico situato al centro di ogni monomero è costituito dai quattro *stranded B-sheets* antiparalleli e si presenta irregolare a causa della mancanza del caratteristico *pattern* di legami idrogeno al centro degli *sheets*. Una seconda regione idrofobica è situata all'interfaccia tra i due monomeri e comprende i residui nel *loop* che unisce B1 a B3 e il segmento che unisce B5 a B6 di un monomero, e l' α -elica N-terminale dell'altro monomero.

Ogni monomero del VEGF contiene tre *loops* esposti al solvente che connettono gli *strands* B1 a B3, B3 a B4, e B5 a B6. Il segmento che connette B1 a B3 (residui 35-50) contiene un singolo *turn* di un α -elica (α 2) seguito da residui in una conformazione irregolare e un piccolo *B-strand*. Questo *B-strand* insieme agli *strands* B5 e B6, forma un piccolo foglietto B alla fine del monomero dalla parte opposta rispetto al *cystine knot*, ed è stato dimostrato far parte del sito di *binding* al recettore.^[68]

Studi di delezione hanno permesso di identificare il secondo dominio extracellulare di Flt-1 (Flt-1_{D2}) come il maggior responsabile del riconoscimento specifico del VEGF.^[73] Flt-1_{D2}, infatti, lega il VEGF con un'affinità solo 60 volte inferiore rispetto alla proteina *wild-type*, mentre la sua delezione abolisce completamente il legame con il VEGF.

Flt-1_{D2} è un membro della famiglia delle immunoglobuline e consiste di un *sandwich* di due foglietti B, formati rispettivamente da 3 e 5 *strands*. Gli *strands* del primo foglietto sono piuttosto corti e consistono di 3 o 4 residui, mentre gli *strands* del secondo foglietto B sono più grandi e formati da 9 e 11 residui.^[72]

L'inusuale caratteristica di Flt-1_{D2} rispetto ad un dominio immunoglobulinico standard è la formazione di un *bulge* all'N-terminale nella regione 137-143. Poiché molti dei residui in contatto con il VEGF si trovano in questa regione, la presenza del *bulge* può essere una conseguenza della formazione del complesso.

Per quanto riguarda la struttura del VEGF₈₋₁₀₉ nel complesso con Flt-1_{D2}, i dati conformazionali indicano che essa resta sostanzialmente identica alla struttura del VEGF₈₋₁₀₉ non complessato.

L'analisi dell'interfaccia VEGF-Flt-1_{D2} rivela che il recettore è in contatto con entrambe le subunità del ligando. La superficie di contatto è divisa in circa 65% e 35% tra le due subunità del VEGF. Il segmento del VEGF₈₋₁₀₉ in contatto con Flt-1_{D2} include i residui dell'elica N-terminale (17-25), il *loop* che connette B3 e B4 (61-66) e lo *strand* B7 (103-106) di un monomero, così come i residui dello *strand* B2 (46-48) e degli *strands* B5 e B6 (79-91) dell'altro monomero. Se si esclude l'interazione fra Arg²²⁴ di Flt-1_{D2} e Asp⁶³ del VEGF, tutti i contatti sono di tipo idrofobico (Fig. 13).

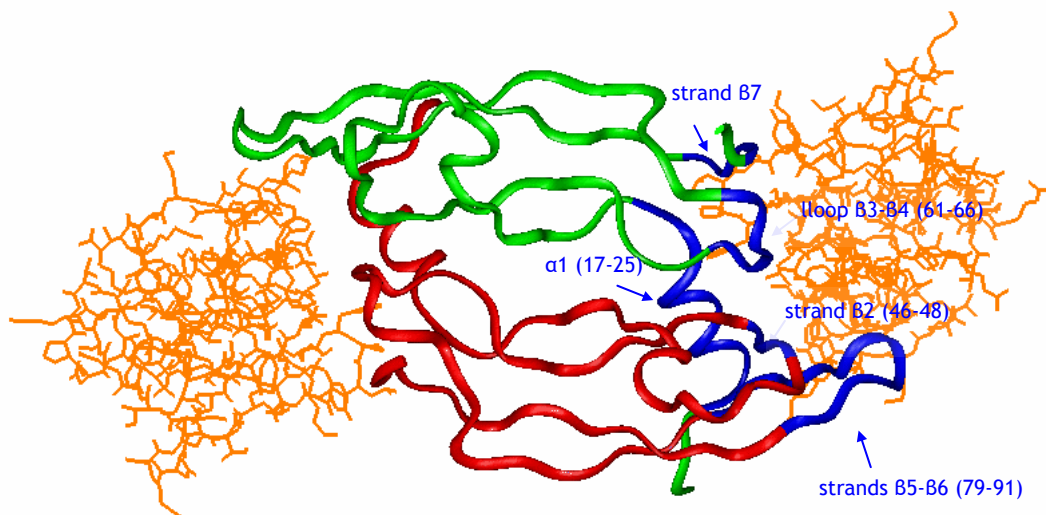


Fig. 13. Dominio 2 di Flt-1 complessato con VEGF₈₋₁₀₉.

Il confronto dei dati strutturali con i risultati degli studi di mutagenesi, che hanno permesso di identificare i residui coinvolti nel *binding* al recettore KDR,^[68] mette chiaramente in evidenza che i siti di *binding* presenti sui due recettori devono essere molto simili in quanto ben 5 dei 7 residui fondamentali per il legame al KDR fanno parte anche della regione di *binding* a Flt-1_{D2}.

1.3.3 VEGF: GLI INIBITORI

Sono attualmente noti numerosi inibitori dell'attività biologica del VEGF che possono avere come bersaglio sia il VEGF stesso che i suoi recettori. Tali inibitori appartengono a differenti classi di biomolecole, come anticorpi, peptidi e piccole molecole organiche.

Tra gli anticorpi sviluppati alcuni sono in fase avanzata di sperimentazione, come un anticorpo monoclonale umanizzato anti-VEGF^[74] e un anticorpo anti-KDR.^[75] Del primo è stata risolta la struttura tridimensionale del complesso fra il frammento Fab e il VEGF che ha messo in evidenza come la struttura del VEGF nel complesso non presenti sostanziali variazioni conformazionali rispetto a quella libera. In tal caso però, a differenza della regione di *binding* del VEGF al recettore Flt-1_{D2}, quella responsabile dell'interazione con il frammento Fab coinvolge un solo monomero del VEGF. In letteratura è, inoltre, riportato un anticorpo contro il complesso VEGF-KDR che è in grado di riconoscere il VEGF complessato e, quindi, si presenta come ottimo candidato per l'utilizzo nel *targeting* del tessuto vascolare tumorale.^[73]

Oltre gli anticorpi, altra classe di inibitori è rappresentata dai peptidi in grado di interagire con il VEGF e da quelli capaci di competere con esso nell'interazione con i suoi recettori. Tra questi sono note tre classi di peptidi ottenute dallo *screening*, mediante *phage display*, di librerie di piccoli peptidi eterodetici.^[76] I migliori composti presentano una costante di *binding* per i recettori del VEGF dell'ordine micromolare e per uno di questi è stata anche risolta la struttura in complesso con il recettore.^[77,78] In un altro studio è riportata l'inibizione dell'angiogenesi, mediata dal VEGF, e del *binding* a KDR da parte di alcuni piccoli peptidi isolati mediante *phage display libraries*. Dallo *screening*, effettuato contro KDR o contro un anticorpo anti-VEGF è risultato particolarmente attivo il peptide di sequenza ATWLPPR anche se con una costante di *binding* per KDR circa 80 μM .^[79]

Sempre mediante *phage display libraries*, sono stati identificati due nuovi peptidi, K237-(HTMYYHHYQHHL)^[80] e F56 (WHSDMEWWYLLG)^[81]. Il peptide K237 è in grado di legare il recettore KRD con alta affinità e specificità interferendo con l'interazione VEGF-KDR. Test di proliferazione indicano che la proliferazione cellulare è ridotta del 90% quando il peptide K237 è presente in concentrazione 300 μM . Il peptide F56, invece, blocca l'interazione del VEGF con Flt-1 inibendo la formazione di nuovi vasi sanguigni già ad una concentrazione di 0.1 $\mu\text{l/ml}$.

Sono note anche diverse molecole di natura organica capaci di inibire entrambi i recettori.^[82] Tra questi il composto ZD4190, una 4-anilinochinazolina sostituita (Fig. 14), è un potente inibitore dell'attività di KDR ed Flt-1.^[83] Test di *binding* indicano che esso è in grado di inibire la proliferazione delle EC indotta dal VEGF con valori di IC_{50} rispettivamente di 29nM per KDR e 708nM per Flt-1. Il composto PTK787/ZK 222584^[84] (1-[4-cloroanilino]-4-[4-piridilmetil] ftalazinsuccinato) (Fig. 15) inibisce la fosforilazione di KDR e Flt-1 con valori di IC_{50} nel range nanomolare (rispettivamente 37 nM e 77 nM).

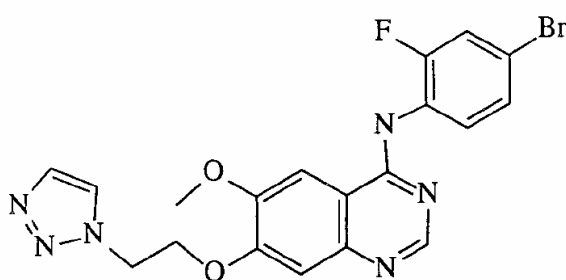


Fig. 14 Struttura chimica del composto ZD4190^[83]

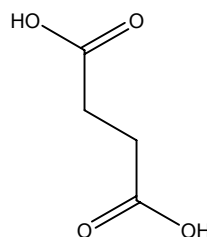
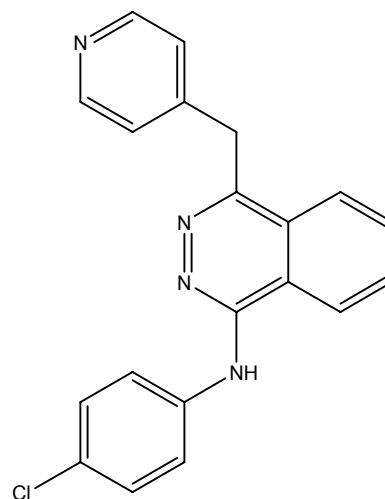


Fig. 15 Struttura chimica del composto PTK787/ZK 222584^[84]

1.4 OBIETTIVI

La crescita tumorale è supportata dallo sviluppo di nuovi vasi sanguigni attraverso la produzione di un ampio spettro di molecole angiogeniche, che permettono la proliferazione, la migrazione e l'assemblaggio delle EC.

La soppressione anche di una sola delle fasi dell'angiogenesi inibisce la formazione dei nuovi vasi influenzando sullo sviluppo tumorale e la generazione di metastasi.

In tale contesto l'obiettivo del presente lavoro di tesi è stato lo sviluppo di nuove molecole di natura peptidica e peptidomimetica in grado di modulare l'attività di sistemi coinvolti nell'angiogenesi tumorale.

Un accurato studio dei dati di letteratura ha portato alla scelta di due sistemi tra quelli più noti e studiati negli ultimi anni nell'ambito della regolazione del processo angiogenico: l'integrina $\alpha_v\beta_3$ e il fattore di crescita VEGF.

Per quanto riguarda l'integrina $\alpha_v\beta_3$, partendo dai dati strutturali presenti in letteratura relativi al recettore libero, al suo complesso con il ciclo(RGDf-NMeV) e al suo più potente inibitore (echistatina), il presente lavoro di tesi si è proposto la progettazione di una nuova molecola che sia non solo capace di interagire con elevata affinità, ma che sia anche selettiva nei confronti dell'integrina in studio. Pertanto alla prima fase di progettazione è seguita quella di sintesi e purificazione della molecola disegnata e di suoi analoghi. La caratterizzazione strutturale mediante Dicroismo Circolare della nuova molecola, come terza fase del lavoro di tesi, ha permesso di ottenere informazioni preliminari sulla conformazione da questa assunta. Infine, la quarta ed ultima fase ha riguardato la determinazione dell'attività delle molecole sintetizzate, effettuata mediante studi di *binding* su opportune linee cellulari tumorali iperesprimenti l'integrina $\alpha_v\beta_3$.

Per quanto riguarda il fattore di crescita VEGF come prima fase ci si è proposti lo studio delle interazioni del VEGF stesso con i suoi recettori. A questa è seguita la fase di progettazione di peptidi con i requisiti strutturali adatti all'interazione con i recettori. Tali molecole sono state progettate in modo da mimare strutturalmente e funzionalmente la regione di *binding* 17-25 del VEGF, la cui caratteristica conformazione elicoidale è stata stabilizzata introducendo appropriati *tools* molecolari. Le fasi successive hanno riguardato la sintesi e la purificazione dei peptidi disegnati, e la caratterizzazione strutturale mediante Dicroismo Circolare. L'ultima fase del presente lavoro di tesi ha riguardato, infine, la realizzazione di test di *binding* sui peptidi ottenuti allo scopo di determinarne l'attività biologica.

2. INIBITORI DELL'INTEGRINA $\alpha_v\beta_3$

2.1. RISULTATI E DISCUSSIONE

2.1.1 PROGETTAZIONE MOLECOLARE DEL PEPTIDE RGD*echi*

La conoscenza delle proprietà conformazionali di un ligando è importante per la comprensione delle basi molecolari del riconoscimento ligando-recettore. Lo studio delle relazioni struttura-attività rappresenta, infatti, il punto di partenza per la progettazione di analoghi con proprietà agoniste o antagoniste.

La struttura cristallografica del complesso dell'integrina $\alpha_v\beta_3$ con il ciclo(RGDf-NMeV) (cilengitide) riportata in letteratura^[52] mette in evidenza come l'interazione della sequenza RGD con l'integrina $\alpha_v\beta_3$ dipenda dalla conformazione assunta nello spazio dalle catene laterali dei suddetti residui. Tale conformazione è favorita dalla presenza del ciclo in grado di indurre e bloccare le catene laterali degli amminoacidi nella giusta orientazione rispetto al sito di *binding*. Allo stesso modo, la struttura NMR dell'echistatina^[49] mostra come i residui RGD siano bloccati nella loro conformazione all'estremità di una sorta di forcina indotta dalla presenza di quattro ponti disolfuro. Questi requisiti sembrano fondamentali per il legame al recettore, non a caso dati di letteratura indicano che la cilengitide e l'echistatina sono tra i più potenti inibitori dell'integrina $\alpha_v\beta_3$.

L'echistatina, inoltre, presenta una sequenza C-terminale che sembra essere determinante non solo per l'affinità di binding, ma anche per la selettività. Sulla base di queste considerazioni, come punto di partenza per la progettazione sono state utilizzate la struttura cristallografica del complesso integrina $\alpha_V\alpha_3$ -ciclo(RGDf-NMeV) e quella dell'echistatina, depositate nel *Protein Data Bank* (PDB).

Il primo *step* nella procedura di *modelling*, è stata la costruzione di un modello del complesso tra il segmento extracellulare dell'integrina $\alpha_V\alpha_3$ e l'echistatina. Ciò è stato realizzato secondo il seguente protocollo: la sequenza RGD dell'echistatina è stata sovrapposta a quella del ciclo(RGDf-NMeV) nel complesso con l'integrina; successivamente il peptide ciclico è stato rimosso dal modello ed è stata effettuata una minimizzazione dell'energia sul complesso echistatina-recettore, mantenendo fissi gli atomi del *backbone* peptidico, allo scopo di raffinare la posizione spaziale delle catene laterali. Infine, è stata applicata una minimizzazione dell'energia totale per raffinare la posizione relativa del ligando rispetto al recettore.

Le caratteristiche conformazionali e strutturali del modello così ottenuto risultano in buon accordo con quelle riportate in letteratura. Lo studio effettuato indica, in particolare, che la porzione C-terminale (Arg⁴¹-Thr⁴⁹) e la sequenza Met²⁸-Asp³⁰ dell'echistatina interagiscono principalmente con la subunità α_3 dell'integrina, come riportato negli esperimenti di *photoaffinity cross-linking*.^[47,48] Infatti, i residui Met²⁸-Asp³⁰ sembrano essere in contatto con i residui Tyr¹²²-Lys¹²⁵ della catena α_3 e l'estremità C-terminale assume una conformazione che dà luogo ad interazioni sia di tipo idrofobico che idrofilico con detta subunità. Ciò si realizza grazie ad un ripiegamento in posizione 47, dovuto al residuo di Pro che permette di accomodare la porzione C-terminale dell'echistatina in una tasca del recettore senza interazioni sfavorevoli. I risultati ottenuti dall'analisi del modello sottolineano, quindi, l'importanza dei residui R⁴¹NPHKGPAT⁴⁹ per la selettività dell'echistatina nei confronti del recettore $\alpha_V\alpha_3$. Per quanto riguarda il *loop* RGD dell'echistatina nel modello, questo mostra un *pattern* di interazione con il recettore molto simile a quello trovato per il ciclo(RGDf-NMeV).

Come secondo *step*, alla luce dei risultati ottenuti, si è pensato di disegnare una nuova molecola legando covalentemente le tre sequenze amminoacidiche che nel modello sono apparse direttamente coinvolte nell'interazione con l'integrina $\alpha_V\alpha_3$, cioè le sequenze Met²⁸-Asp³⁰ e Arg⁴¹-Thr⁴⁹ dell'echistatina e il peptide ciclico contenente il motivo RGD.

Come terzo *step*, i due segmenti dell'echistatina sono stati covalentemente legati impiegando la sequenza Pro-Gly allo scopo di stabilizzare ulteriormente l'orientazione relativa delle due sequenze peptidiche nel modello. Inoltre, il residuo D-Phe della cilengitide è stato sostituito con un residuo di D-Glu e il gruppo α CO carbossilico del D-Glu è stato legato covalentemente all' α NH della Met²⁸ mediante un legame ammidico. Infine, il residuo di NMeVal è stato sostituito con uno di Lys allo scopo di poterlo eventualmente in futuro funzionalizzare e impiegare per la diagnosi e la terapia dei tumori. La sequenza amminoacidica del peptide disegnato, denominato RGDechi, è di seguito riportata (Fig. 16).

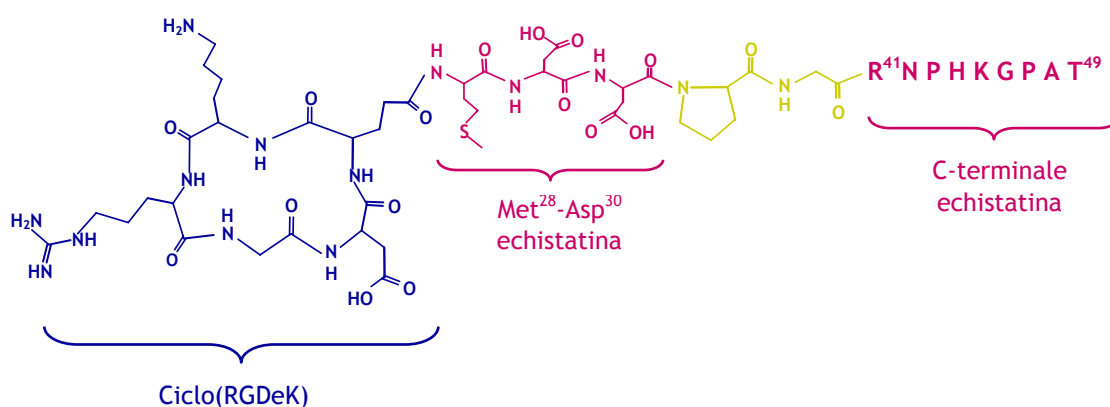


Fig. 16. Rappresentazione schematica della molecola RGDechi. In **blu** è riportato il ciclo RGD derivato dalla cilengitide (e = D-Glu); in **fucsia** sono riportate le due sequenze derivanti dall'echistatina e in **giallo** la sequenza Pro-Gly.

Il modello finale del complesso RGDechi-recettore è stato in ultima analisi minimizzato per raffinarne la struttura, eliminando le eventuali conformazioni ad alta energia. Il modello minimizzato è rappresentato in Fig. 17.

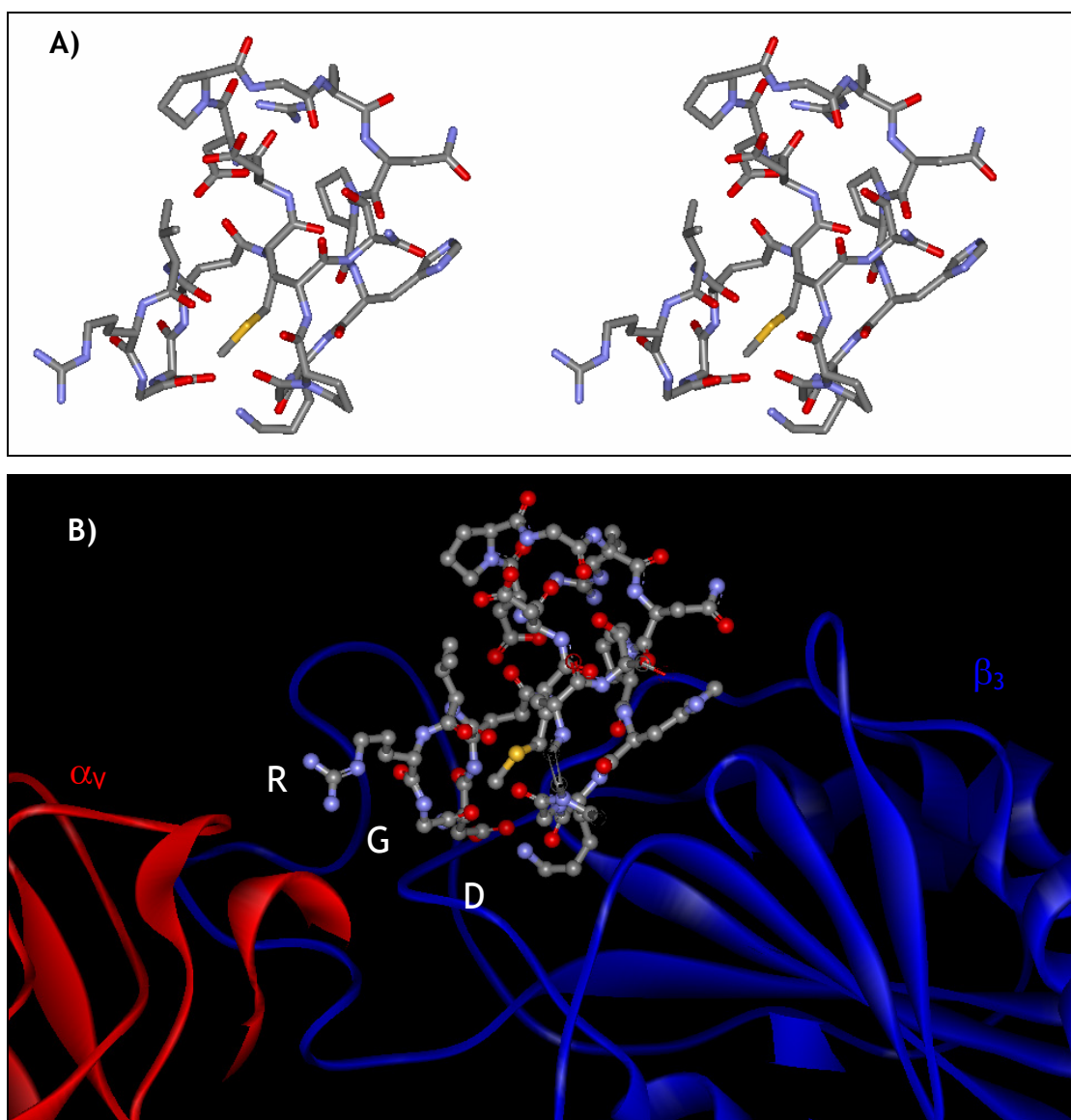


Fig. 17. A) Rappresentazione del modello molecolare di RGDechi ottenuto in seguito alla procedura di minimizzazione dell'energia. B) Modello teorico del complesso RGDechi-recettore $\alpha_V\beta_3$.

2.1.2 SINTESI DEL PEPTIDE *RGDechi* E DI SUOI ANALOGHI

Nel presente lavoro di tesi è stato sintetizzato il peptide **RGDechi**, la cui sequenza di 19 amminoacidi è stata disegnata sulla base degli studi di *modelling* effettuati. Inoltre, sono stati sintetizzati tre analoghi dell' *RGDechi*, allo scopo di evidenziarne le differenze nel *binding* all'integrina $\alpha_V\beta_3$ rispetto alla sequenza ciclica completa. Il primo analogo è costituito dalla sequenza completa di *RGDechi*, ma in forma lineare, ed è stato denominato **RGDeL**; gli altri due, invece, sono comprensivi solo degli ultimi 14 e 9 residui della sequenza originale e sono stati indicati rispettivamente come **Echi 14** e **Echi 9**.



I quattro peptidi sono stati sintetizzati in fase solida mediante chimica Fmoc. La sintesi è stata realizzata in "batch" su scala 0.25 mmol, utilizzando il sintetizzatore automatico di peptidi ABI433A e come supporto solido la resina *Novasyn TGA*. In Fig. 18 è rappresentata la struttura del *linker* della resina.

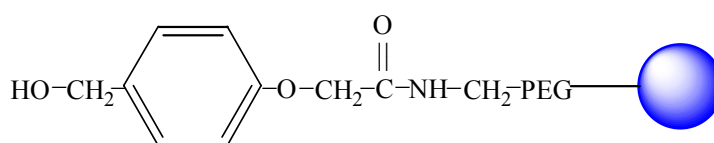


Fig. 18. Resina *Novasyn TGA*.

La percentuale di accoppiamento del primo amminoacido alla resina, effettuato in manuale impiegando MSNT/Melm come agenti accoppianti (Fig. 19), è risultata del 99%.

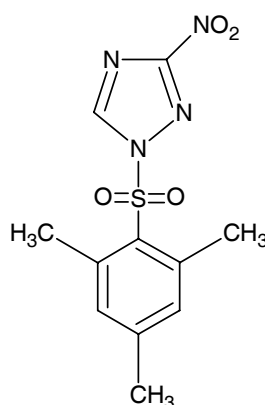
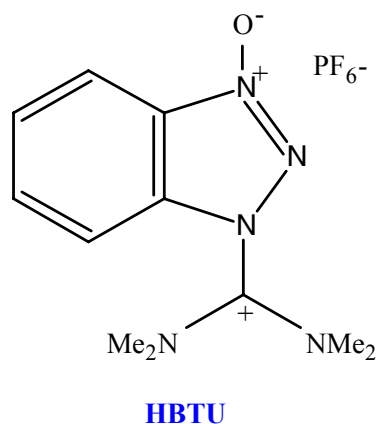
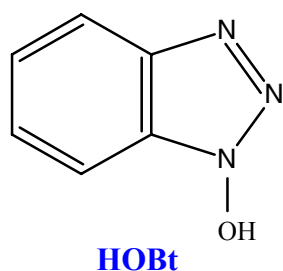


Fig. 19. Struttura dell'agente accoppiante MSNT

Tutti gli amminoacidi della sequenza sono stati inseriti mediante attivazione *in situ* con HOBt/HBTU.

Di seguito sono riportate le strutture degli attivanti e accoppianti utilizzati:



Nella miscela di reazione è stata aggiunta la base DIPEA in modo da stabilizzare l'estremità carbossilica dell'amminoacido nella sua forma deprotonata e, quindi, favorirne l'attacco nucleofilo sull'agente attivante.

Le reazioni di accoppiamento sono state effettuate utilizzando un eccesso di amminoacido (4 equivalenti rispetto alla scala di sintesi) e la strategia del doppio accoppiamento, che consiste nel ripetere due volte la fase di accoppiamento dell'amminoacido prima di procedere alle fasi successive. La deprotezione delle estremità amminiche di ogni amminoacido dal gruppo Fmoc è stata realizzata impiegando piperidina; mentre per la reazione di acetilazione è stata utilizzata una soluzione di anidride acetica/HOBt/DIPEA.

Le sintesi sono state condotte tutte sequenzialmente. A partire dalla resina iniziale, infatti, sono stati legati tutti gli amminoacidi fino all'Arg¹¹. La resina è stata quindi suddivisa in due parti, su tre quarti di essa è stata continuata la sintesi, mentre dal restante quarto si è ottenuto il primo dei tre peptidi, **Echi 9**. Questo è stato distaccato dalla resina mediante trattamento con TFA e precipitato in etere etilico a freddo. La successiva fase di purificazione è stata eseguita mediante RP-HPLC; la purezza e

l'identità del peptide **Echi 9** sono state confermate mediante RP-HPLC analitico e spettroscopia di massa ESI-MS.

In Fig. 20 A è rappresentato il profilo cromatografico del prodotto puro con $t_r = 9.60$ min, mentre in Fig. 20 B è riportato lo spettro di massa contenente il picco corrispondente allo ione molecolare $[M+H]^+$ a m/z 978.0.

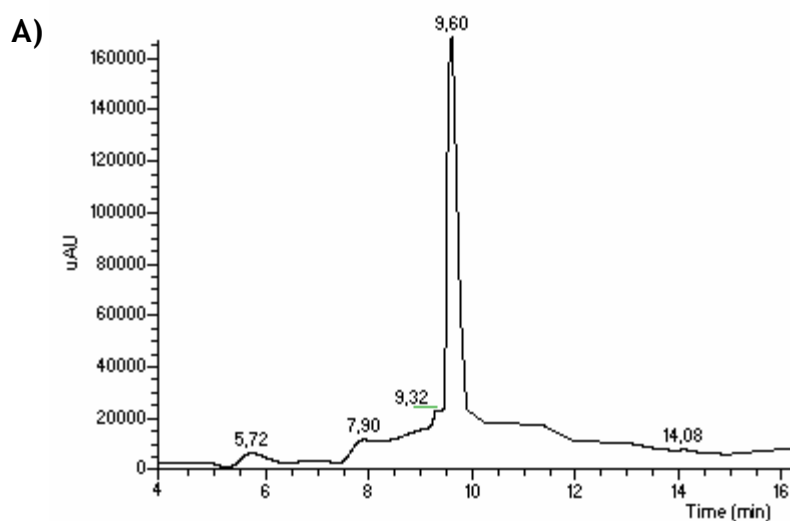


Fig. 20. A) Profilo cromatografico RP-HPLC di **Echi 9** puro: $t_r = 9.60$ min.

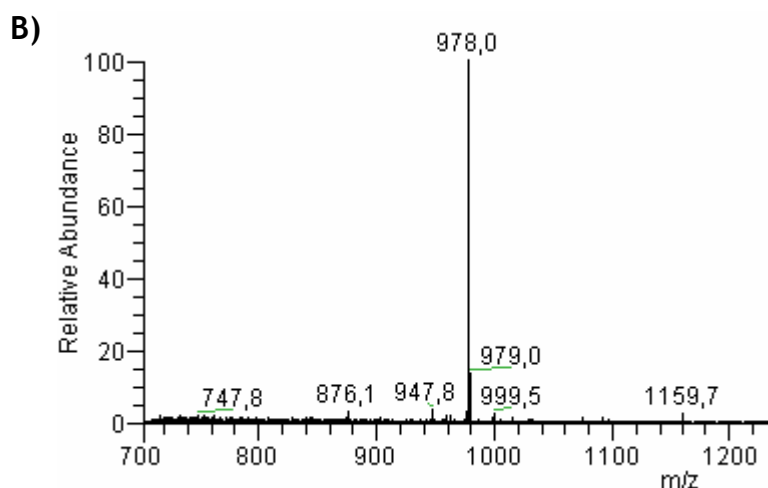


Fig. 20. B) Spettro di massa ESI-MS di **Echi 9** puro: picco $[M+H]^+$ a m/z 978.0 ($PM_{teor} = 977.1$ Da).

Sui tre quarti di resina rimasti si è continuata la sintesi fino al residuo di Met⁶, in corrispondenza del quale si è nuovamente suddivisa la resina ma questa volta in tre parti. Come fatto in precedenza, su due terzi di resina si è proseguita la sintesi, la restante parte è stata trattata con TFA per ottenere il secondo peptide, **Echi 14**. La purificazione mediante RP-HPLC e l'identificazione mediante spettrometria di massa ESI-MS sono state condotte come per Echi 9 e hanno fornito il profilo cromatografico ($t_r=10.41\text{min}$) e lo spettro di massa ($[M+H]^+$ a m/z 1493) riportati rispettivamente in Fig. 21 A e B.

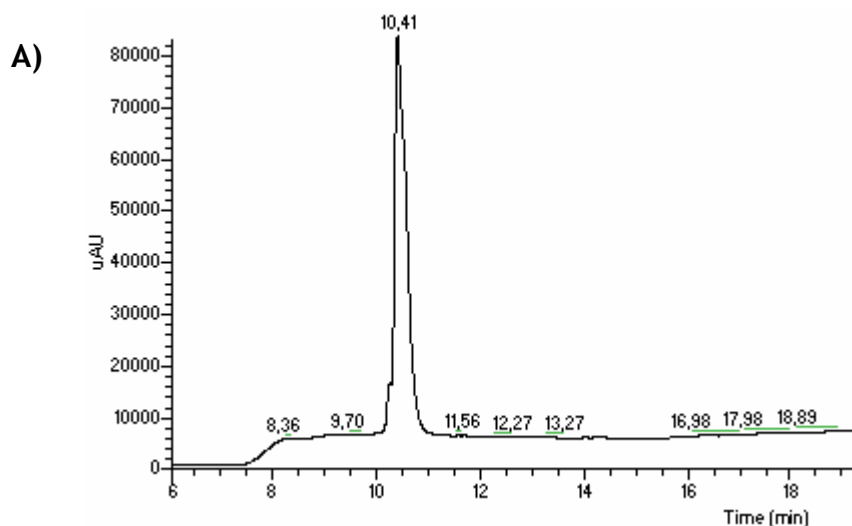


Fig. 21. A) Profilo cromatografico RP-HPLC di **Echi 14** puro: $t_r=10.41$ min.

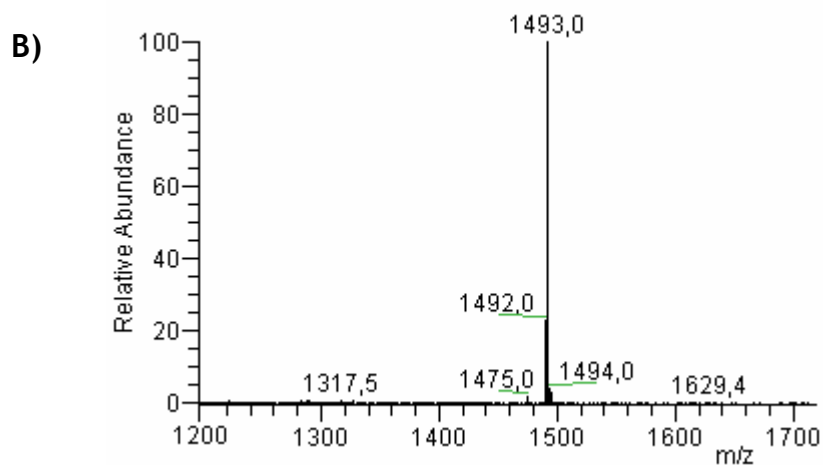


Fig. 21. B) Spettro di massa ESI-MS di **Echi 14** puro: picco molecolare $[M+H]^+$ a m/z 1493.0 ($PM_{teor}=1492.6$ Da).

La sintesi è stata poi completata fino alla Lys¹ e si è suddivisa la restante resina in due aliquote. Da una di queste, per trattamento con TFA, precipitazione e purificazione nelle condizioni utilizzate per i precedenti peptidi, si è ottenuto il peptide **RGDeL**, il cui profilo cromatografico RP-HPLC ($t_r=10.78$ min) e spettro di massa ESI-MS ($[M+2H]^{2+}$ a m/z 1040.6) sono riportati rispettivamente in Fig. 22. A e B.

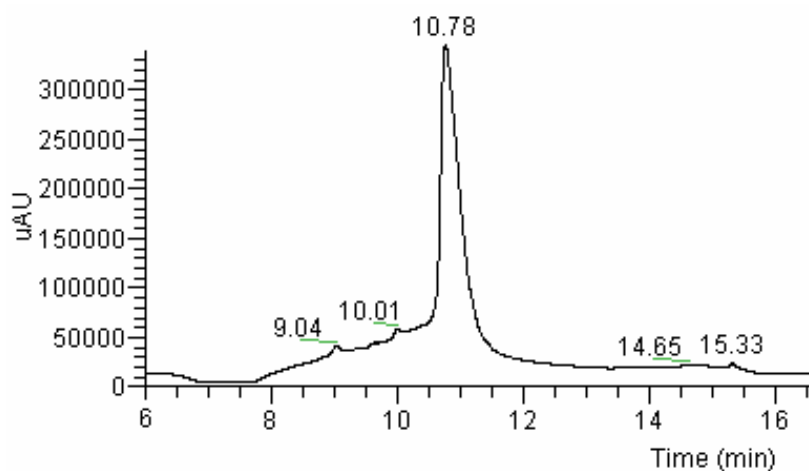


Fig. 22. A) Profilo cromatografico RP-HPLC di **RGDeL** puro: $t_r=10.78$ min.

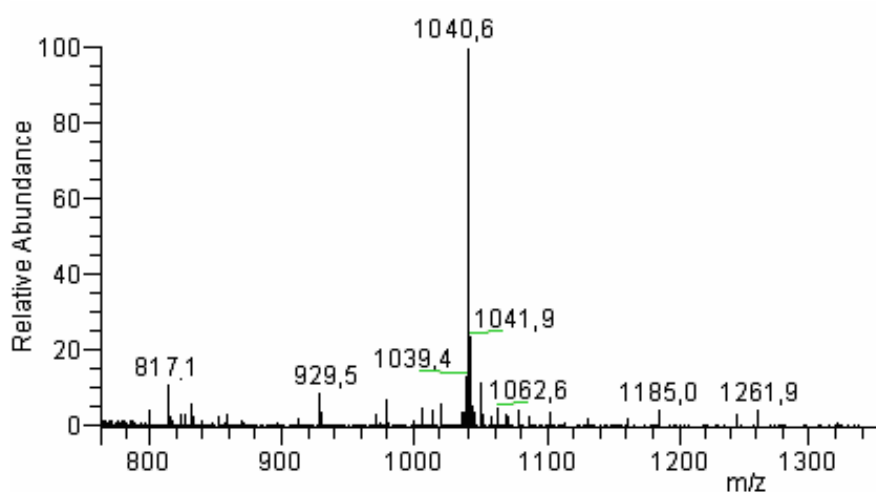
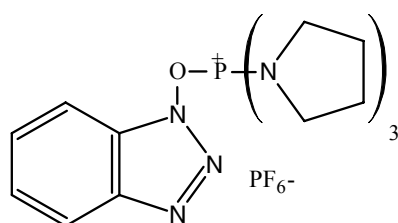


Fig. 22. B) Spettro di massa ESI-MS di **RGDeL** puro: picco molecolare $[M+2H]^{2+}$ a m/z 1040.6 ($PM_{teor}=2078.2$ Da).

Dall'ultima aliquota di resina è stato ottenuto, infine, il peptide **RGDechi**. In tal caso, prima di deproteggere dal gruppo Fmoc la Lys¹ all'N-terminale e distaccare la sequenza peptidica dalla resina, è stata eseguita una deprotezione selettiva del D-Glu⁵ dal gruppo allilico, mediante trattamento con PhSiH₃/Pd(PPh₃)₄. Ciò allo scopo di condurre in fase solida la successiva reazione di ciclizzazione tra la funzione amminica N α della Lys¹ e quella carbossilica C α del D-Glu⁵. La ciclizzazione è stata effettuata utilizzando PyBop/HOBt come agenti accoppianti. Di seguito è riportata la struttura del PyBop.



PyBop

Il peptide ottenuto è stato purificato mediante RP-HPLC e lo spettro di massa ESI-MS registrato ha confermato l'identità del prodotto. In Fig. 23 A è rappresentato il profilo cromatografico di **RGDechi** puro con $t_r = 11.36$ min; mentre in Fig. 23 B è riportato lo spettro di massa contenente il picco corrispondente allo ione molecolare $[M+2H]^{2+}$ a m/z 1030.6.

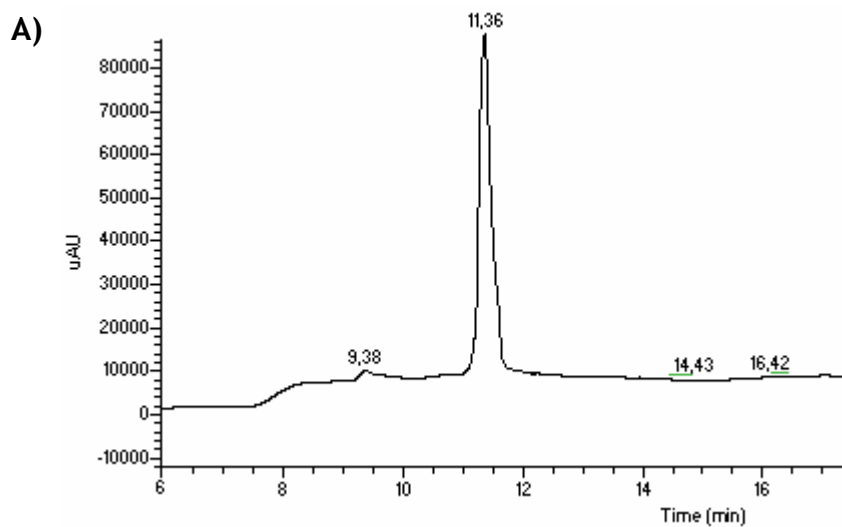


Fig. 23. A) Profilo cromatografico RP-HPLC di **RGDechi** puro: $t_r=11.36$ min.

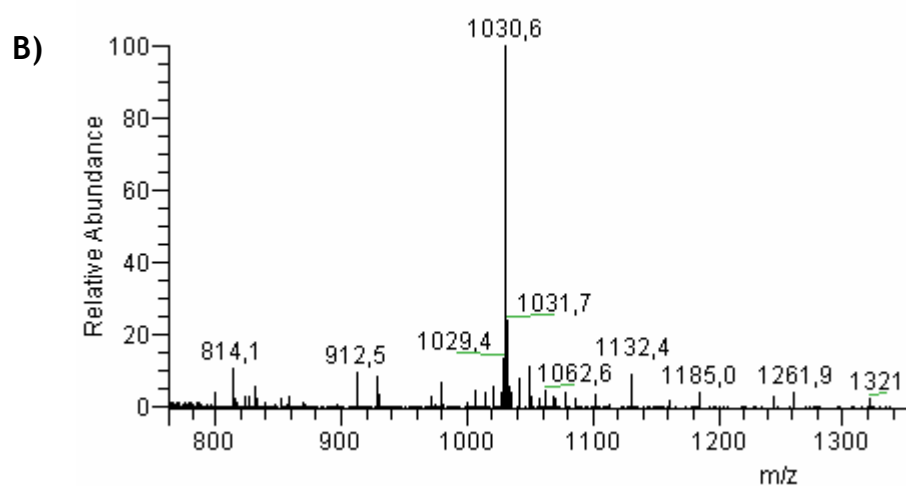


Fig. 23. B) Spettro di massa ESI-MS di **RGDechi** puro: picco molecolare $[M+2H]^{2+}$ a m/z 1030,6 ($PM_{teor} = 2060,2$ Da).

Le rese di sintesi ottenute per i quattro peptidi sintetizzati sono riportate nella seguente tabella:

<i>RESE DI SINTESI</i>	
Echi 9	58%
Echi 14	55%
RGDeL	30%
RGDechi	24%

Dalle percentuali ottenute risulta evidente come le rese di sintesi diminuiscano all'aumentare della lunghezza dei peptidi. Nel caso del peptide RGDechi, si verifica una ulteriore diminuzione della resa attribuibile alla reazione di deprotezione dal gruppo allile e alla successiva reazione di ciclizzazione.

2.1.3 STUDIO CONFORMAZIONALE DEL PEPTIDE RGDechi MEDIANTE DICROISMO CIRCOLARE

L'acquisizione dello spettro di RGDechi è stata effettuata a temperatura ambiente utilizzando una soluzione di peptide 8.0×10^{-6} M in tampone fosfato 10 mM a pH= 7.2. In Fig. 24 è riportato lo spettro CD del peptide ottenuto in tali condizioni:

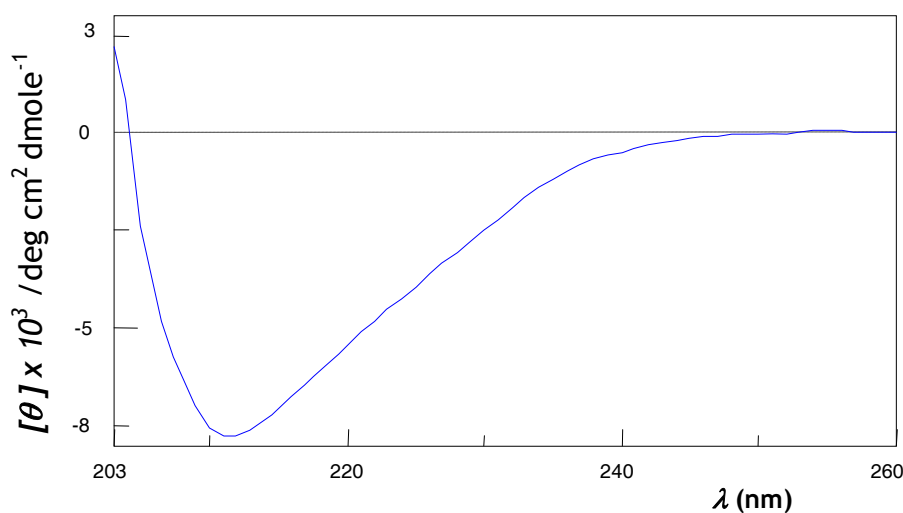


Fig. 24. Spettro CD di RGDechi in tampone fosfato 10 mM pH= 7.2

Come è evidente, lo spettro mostra un minimo intorno a 212 nm, caratteristico di un peptide che non presenta preferenze conformazionali.^[85]

Nella tabella che segue vengono riportati i risultati ottenuti dalla deconvoluzione dello spettro (tra 204 e 260 nm) utilizzando il programma CDNN.^[86]

<u>RGDechi</u>	α-elica	conformazione estesa	β-turn	random coil
CDNN	11.83%	30.41%	19.46%	33.94%

L'analisi dello spettro e i dati di deconvoluzione indicano in maniera piuttosto evidente che il peptide RGDechi non mostra alcuna preferenza conformazionale.

2.1.4 *STUDI BIOLOGICI DI RGDechi E DEI SUOI ANALOGHI*

Allo scopo di valutare l'attività biologica e la selettività del peptide RGDechi, in collaborazione con ricercatori dell'Istituto di Biostrutture e Bioimmagini-CNR di Napoli, sono stati realizzati esperimenti di *binding* su linee cellulari iperesprimenti le integrine $\alpha_V\alpha_3$ e $\alpha_V\alpha_5$. Per fare ciò si è provveduto ad allestire un sistema cellulare idoneo allo *screening* di peptidi anti- $\alpha_V\alpha_3$ impiegando cellule di eritroleucemia umana K562 (generosamente donate dal Dr. S.D. Blystone, SUNY Upstate Medicinal University, Syracuse, NY, USA). Queste cellule sono state stabilmente cotrasfettate con plasmidi contenenti cDna codificante, rispettivamente, per le subunità α_V e α_3 e per quelle α_V e α_5 , ottenendo in tal modo i cloni ricombinanti K562- $\alpha_V\alpha_3$ e K562- $\alpha_V\alpha_5$. L'espressione delle integrine nelle due linee transfettate e nella linea parentale è stata valutata mediante citofluorimetria, utilizzando anticorpi specifici per $\alpha_V\alpha_3$ e $\alpha_V\alpha_5$ marcati con FITC (LM609 e P1F6). Si è passati, quindi, ad analizzare il legame dei quattro peptidi sintetizzati (RGDechi, RGDeL, Echi 14 ed Echi 9) alle cellule K562- $\alpha_V\alpha_3$ impiegando come termine di confronto il peptide ciclo(RGDfV) (gentilmente donato da ricercatori della Facoltà di Farmacia di Napoli) precursore della cilengitide con attività paragonabile. Per testare la capacità di ciascun peptide di legarsi al bersaglio specifico, sono stati eseguiti saggi di adesione incubando le cellule K562- $\alpha_V\alpha_3$ in presenza di concentrazioni crescenti di peptide in esame. Successivamente le cellule sono state fatte aderire su piastre in precedenza ricoperte con vitronectina, substrato specifico dell'integrina $\alpha_V\alpha_3$, e sono state contate al microscopio. I dati ottenuti da questi esperimenti sono stati analizzati con un *software* dedicato (Prisma) derivando i valori di IC_{50} per ciascun peptide testato. I risultati, riportati in Fig. 25 A e B, sono espressi come percentuale di cellule aderenti considerando pari al 100% il controllo (cellule non trattate).

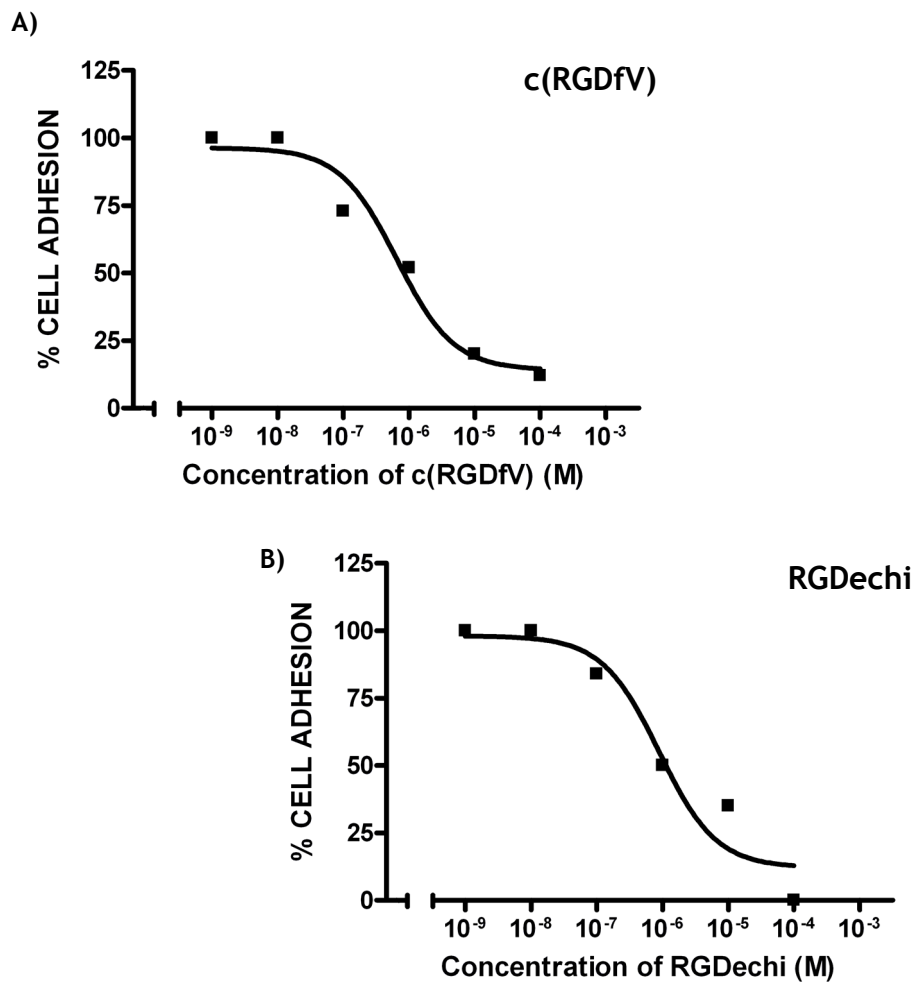


Fig. 25. Curve relative ai saggi di adesione di K562- $\alpha_v\beta_3$ su vitronectina in presenza di concentrazioni crescenti rispettivamente di **A)** peptide ciclo(RGDfV) e di **B)** peptide RGDechi.

Il confronto delle curve di inibizione dei peptidi RGDechi e ciclo(RGDf-NMeV) indica chiaramente che RGD-echi ($IC_{50} = 0.88 \mu M$) mostra una affinità per l'integrina $\alpha_v\beta_3$ paragonabile a quella del peptide ciclo(RGDfV) ($IC_{50} = 0.64 \mu M$), inibendo l'adesione dei cloni K562- $\alpha_v\beta_3$ alla vitronectina.

Al contrario i saggi condotti su RGD_{eL}, Echi 14 ed Echi 9, incubati con le cellule K562- $\alpha_v\beta_3$, indicano che tali peptidi non sono in grado di inibire l'adesione cellulare, che resta rispettivamente del 89.5%, 99% e 97.5%, rispetto alle cellule non trattate (Figure 26 A, B e C).

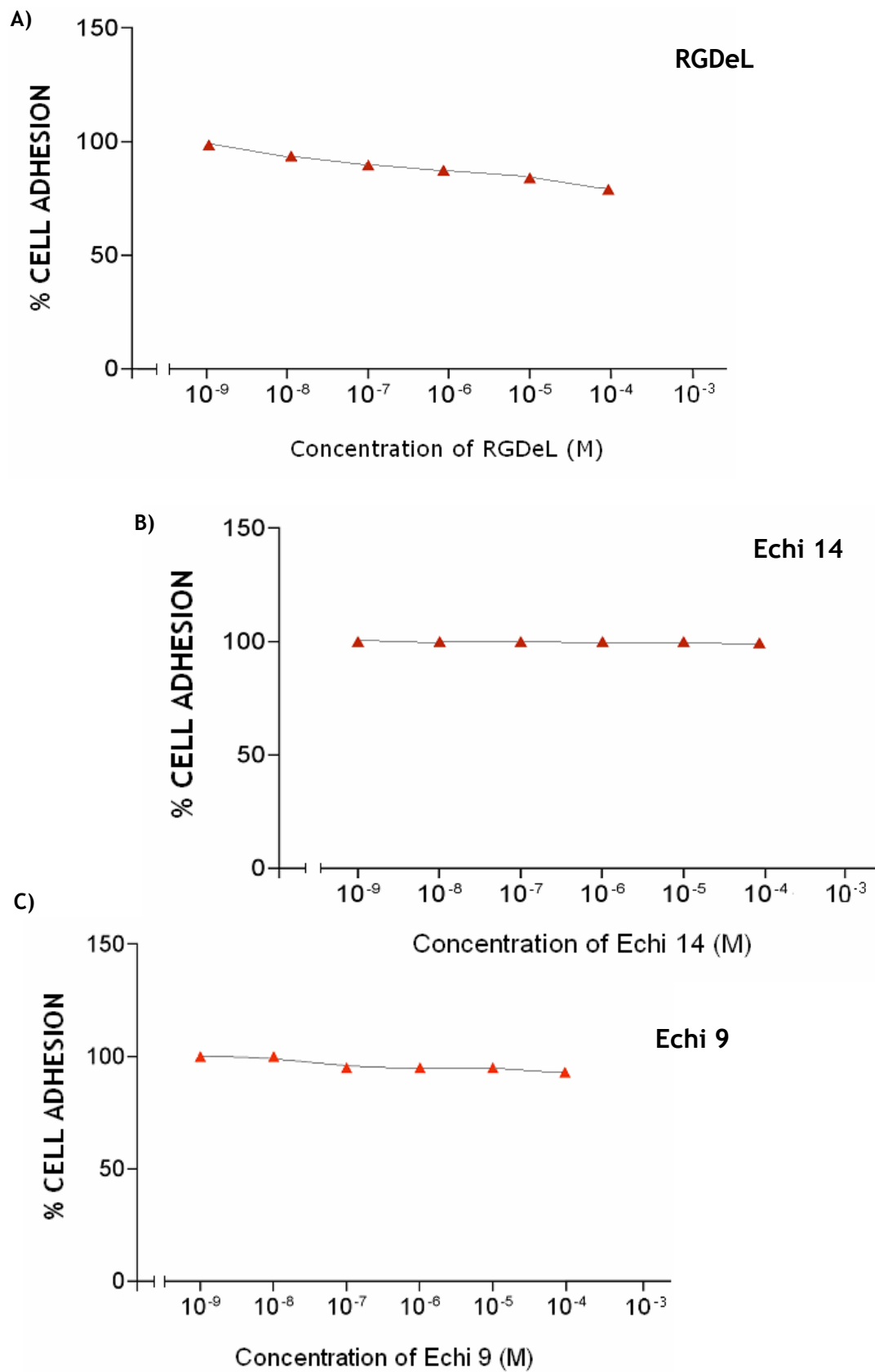


Fig. 26. Curve relative ai saggi di adesione di K562- $\alpha_V\beta_3$ su vitronectina in presenza di concentrazioni crescenti rispettivamente di A) peptide RGDeL, B) peptide Echi 14 e C) peptide Echi 9.

La mancanza di affinità riscontrata in questo caso mette chiaramente in evidenza l'importanza non solo della sequenza RGD per il *binding* al recettore $\alpha_V\alpha_3$, ma anche della conformazione da questa assunta determinata dalla presenza del ciclo.

Parallelamente ai saggi di adesione sono stati condotti esperimenti di competizione con ligandi radiomarcanti. A tale scopo è stato impiegato come termine di confronto il peptide ciclico ciclo(RGDyV), analogo del ciclo(RGDfV), fornito dallo stesso gruppo della Facoltà di Farmacia, ma con un residuo di tirosina al posto della fenilalanina in modo tale da poterne effettuare la marcatura con ^{125}I . La iodinazione del peptide è stata effettuata con il metodo dello Iodo-Gen, separando successivamente il prodotto radiomarcato dallo ^{125}I libero mediante cromatografia a esclusione su colonna di poliacrilammide. Le frazioni eluite contenenti il peptide radiomarcato sono state successivamente sottoposte a controllo di qualità mediante RP-HPLC per verificare che la presenza di radioattività fosse coniugata esclusivamente al peptide.

I saggi di competizione di ^{125}I -ciclo(RGDyV) condotti sulle cellule K562- $\alpha_V\alpha_3$, in presenza e in assenza di un largo eccesso molare rispettivamente dello stesso peptide freddo e del peptide RGDechi, forniscono valori di IC_{50} consistenti con quelli ottenuti nei saggi di adesione.

Allo scopo di determinare la selettività del peptide RGDechi nei confronti dell'integrina $\alpha_V\alpha_3$, sono stati eseguiti infine saggi di adesione sulle cellule K562- $\alpha_V\alpha_5$, impiegando ancora una volta il ciclo(RGDfV) come peptide di confronto. Gli esperimenti, condotti come descritto in precedenza, indicano che il ciclo(RGDfV) è in grado di inibire marcatamente l'adesione del clone cellulare K562- $\alpha_V\alpha_5$, mentre per il peptide RGDechi non si osserva una significativa inibizione (Fig. 27).

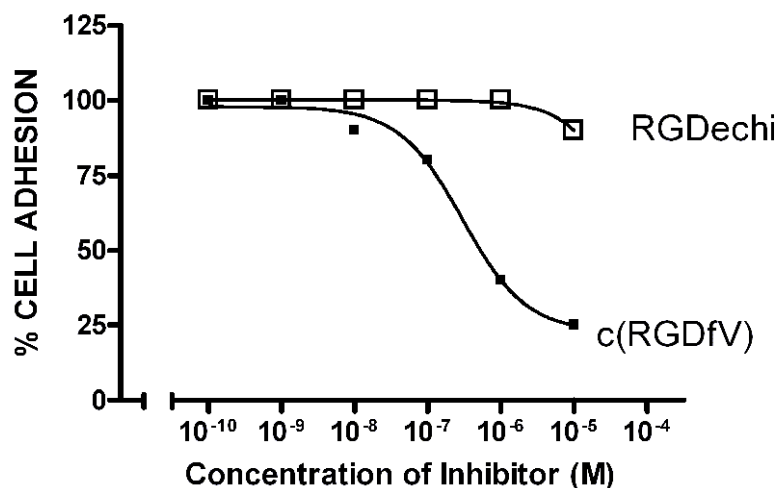


Fig. 27. Curva relativa ai saggi di adesione di K562- $\alpha_V\alpha_5$ su vitronectina, in presenza di concentrazioni crescenti rispettivamente del peptide ciclo(RGDfV) (■) e del peptide RGDechi (□).

In conclusione, i risultati dei saggi di adesione e di competizione condotti sull'integrina $\alpha_V\alpha_3$ indicano senza dubbio una elevata riproducibilità nei dati ottenuti, dimostrando per il nuovo peptide progettato, RGDechi, non solo un'elevata affinità nei confronti dell'integrina $\alpha_V\alpha_3$, ma anche una maggiore selettività rispetto al ciclo(RGDfV) riportato in letteratura.

2.2. PARTE SPERIMENTALE

2.2.1 COSTRUZIONE DEL MODELLO

Il pacchetto integrato INSIGHT/DISCOVER (Accelrys, San Diego, CA USA) è stato impiegato per costruire tutte le strutture e per effettuare le minimizzazioni di energia a pH=7 utilizzando il campo di forza CVFF (*Consistent Valence Force Fields*).^[87-89]

Tutti i calcoli e le analisi conformazionali sono stati eseguiti su una *workstation* Silicon Graphics Octene2. Le minimizzazioni dell'energia sono state eseguite utilizzando un *conjugate gradient algorithm*. Queste procedure sono state interrotte quando la derivata massima è risultata ≤ 0.01 Kcal/mol.

Per la costruzione del modello si è partiti dalla struttura cristallografica dell'integrina $\alpha_v\alpha_3$ in complesso con il ligando ciclo(RGDf-NMeV) (codice d'accesso PDB: 1L5G) e da quella NMR dell'echistatina (codice d'accesso PDB: 1RO3).

2.2.2 APPARECCHIATURE E STRATEGIE DI SINTESI

Le sintesi del peptide RGDechi e degli analoghi RGDeL, Echi 14 ed Echi 9 sono state effettuate in fase solida con chimica Fmoc utilizzando un sintetizzatore automatico di peptidi ABI433A e, come supporto solido, la resina *Novasyn TGA* (grado di sostituzione 0.29 mmol/g) che consente di ottenere al termine della sintesi i peptidi con l'estremità C-terminale nella forma carbossilica.^[90]

Sono stati impiegati tutti amminoacidi con protezioni standard per la sintesi Fmoc ad eccezione del D-Glu-OAll.

Fmoc-Ala-OH	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	Fmoc-Asn(Trt)-OH
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	Fmoc-Gln(Trt)-OH	Fmoc-DGlu-OAll
Fmoc-Gly-OH	Fmoc-His(Trt)-OH	Fmoc-Lys(Boc)-OH
Fmoc-Met-OH	Fmoc-Pro-OH	Fmoc-Thr(tBu)-OH
Fmoc-Tyr(tBu)-OH		

Poiché i tre peptidi presentano una parte della sequenza amminoacidica in comune, le sintesi sono state condotte in maniera sequenziale. Partendo, infatti, da una scala di sintesi di 0.25 mmol sono stati sintetizzati in sequenza i peptidi Echi 9, Echi 14, RGDeL ed RGDechi interrompendo di volta in volta la sintesi e prelevando un'aliquota di resina in corrispondenza della sequenza peptidica desiderata.

L'attivazione della resina con il primo amminoacido è stata eseguita sciogliendo 5 eq (rispetto alla scala di sintesi) di amminoacido Fmoc-Tyr-OH in DCM anidro (in modo da ottenere una soluzione 0.1 M), aggiungendo alcune gocce di DMF per favorirne la solubilizzazione e di seguito 3.75 eq di Melm (rispetto alla scala di sintesi). La soluzione è stata poi trasferita in un

pallone contenente 5 eq (rispetto alla scala di sintesi) di MSNT e la miscela risultante è stata aggiunta alla resina e lasciata sotto agitazione magnetica per 90 min. Successivamente, la soluzione è stata filtrata e sono stati effettuati una serie di lavaggi con DCM, DMF ed etere etilico. La percentuale di accoppiamento dell'amminoacido alla resina è stata determinata per via spettroscopica calcolando la concentrazione di addotto Fmoc-piperidina (dibenzofulvene) della soluzione dopo diluizione (40 volte). La specie dibenzofulvene, infatti, è caratterizzata da un massimo di assorbimento a 301 nm e da un $\epsilon=7800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.^[91]

La fase di deprotezione dell' N-terminale di ogni amminoacido dal gruppo Fmoc è stata effettuata trattando la resina-peptide con una soluzione di piperidina in DMF (30:70 v/v), due volte per un tempo di 10 min.

Nella fase di accoppiamento, per ogni ciclo sono stati impiegati, rispetto alla scala di sintesi, 4 eq di Fmoc-amminoacido, 4 eq di HBTU 0.45 M in DMF, 4 eq di HOBt 0.45 M in DMF ed 8 eq di DIPEA 2 M in NMP. Ogni ciclo è stato condotto per un tempo di 1h ed è stato ripetuto due volte, nelle stesse condizioni, per ciascun amminoacido. Per le sintesi dei peptidi Echi 14 ed Echi 9 sono stati impiegati tutti amminoacidi standard; nel caso dei peptidi RGDeL ed RGDechi è stato utilizzato un amminoacido in configurazione D, il D-Glu. Questo inoltre, al contrario degli altri amminoacidi, è stato scelto con il gruppo protettore (gruppo allilico) sulla funzione carbossilica terminale, in modo tale da poterlo legare al residuo che lo precede nella sequenza peptidica attraverso la sua catena laterale.

Dopo ogni ciclo di accoppiamento è stata effettuata una reazione di acetilazione per bloccare i gruppi amminici che non hanno reagito nella precedente fase. La reazione è stata eseguita utilizzando una soluzione di anidride acetica 0.5 M, HOBt 0.015 M, DIPEA 0.125 M in DMF per 5 min.

Al termine della sintesi sono stati eseguiti una serie di lavaggi della resina con DMF, MeOH anidro ed etere etilico.

La deprotezione finale e il distacco dei peptidi dalla resina sono stati effettuati con una miscela di TFA/H₂O/EDT/TIS (94:2.5:2.5:1 v/v/v/v). La reazione è stata condotta a temperatura ambiente per 3 h sotto agitazione; successivamente, la miscela di reazione è stata filtrata e la resina è stata

lavata ripetutamente con TFA; la soluzione ottenuta è stata poi concentrata sotto vuoto. I peptidi sono stati, quindi, precipitati con etere etilico a freddo, disciolti in una miscela di H₂O/CH₃CN e liofilizzati.

Nel caso del peptide RGDechi, al termine della sintesi, prima della deprotezione finale da Fmoc e del distacco dalla resina, è stata effettuata una reazione di deprotezione selettiva della catena laterale del D-Glu⁵ dal gruppo allilico, trattando per due volte la resina-peptide con 24 eq di PhSiH₃ e 0.25 eq di Pd(PPh₃)₄ in DCM. La reazione è stata condotta secondo il seguente protocollo: si lavano 500 mg di resina-peptide 3 volte per 2 min con DCM sotto Argon, si aggiunge la prima soluzione e dopo 2 min la seconda lasciando andare la deprotezione per 30 min in presenza di Argon.

La ciclizzazione finale tra la funzione amminica N-terminale della Lys¹ e quella carbossilica C-terminale del D-Glu⁵ è stata effettuata utilizzando 1.5 eq di PyBop, 1.5 eq di HOBt e 3 eq di DIPEA in DMF (rispetto alle mmol di peptidil-resina) in condizioni molto diluite per evitare reazioni intercatena.

I peptidi grezzi ottenuti sono stati analizzati utilizzando un cromatografo Hewlett-Packard Serie 1100, collegato ad un rivelatore a serie di diodi serie HP 1100. Sono stati utilizzati una colonna Phenomenex C₁₈ (4.6 x 250 mm, 5 µm, 300 Å) e come eluenti H₂O/0.1% TFA (eluente A) e CH₃CN/0.1% TFA (eluente B). L'analisi cromatografica è stata effettuata impiegando un gradiente lineare che va dal 5% al 70% dell'eluente B in 30 min (variazione di 2.17% di B al min) ad un flusso di 1 ml/min.

Gli spettri di massa sono stati effettuati con un sistema automatizzato LC-ESI-MS (ThermoFinnigan, San Jose, CA) composto da un cromatografo HPLC, con colonna Jupiter C₁₈ (4.6 x 150 mm, 5 µm, 300 Å) e rivelatore a serie di diodi, accoppiato ad una sorgente electrospray e analizzatore a quadrupolo.

La purificazione dei peptidi grezzi è stata effettuata mediante RP-HPLC preparativo con un cromatografo Shimadzu, collegato ad un rivelatore spettrofotometrico UV-VIS Shimadzu SPD-10A interfacciato alle pompe LC-8A mediante un sistema di controllo SCL-10A. Sono stati utilizzati una colonna Phenomenex C₁₈ (21.6 x 250 mm, 15µm, 300 Å) e un gradiente lineare che va dal 5 al 70% di B in 30 min con un flusso di 20 ml/min.

2.2.3 *DICROISMO CIRCOLARE: APPARECCHIATURE E CONDIZIONI SPERIMENTALI ADOTTATE*

L'acquisizione degli spettri è stata effettuata a temperatura ambiente con uno spettropolarimetro Jasco J-710. I dati sono stati raccolti utilizzando una velocità di scansione pari a 10 nm/min, una larghezza di banda di 1.0 nm ed una costante di tempo di 16 sec. Le scansioni sono state effettuate da 260 a 203 nm, usando una cella di quarzo di cammino ottico di 1 cm.

La soluzione di peptide è stata preparata sciogliendo 5 mg di RGDechi in 500 µl di tampone fosfato 10mM a pH 7.2.

Le intensità delle bande CD sono state espresse come ellitticità molare per residuo, calcolata dividendo l'ellitticità molare totale per il numero di residui amminoacidici delle molecole in esame.

2.2.4 TEST BIOLOGICI: CONDIZIONI SPERIMENTALI

SAGGIO DI ADESIONE

Il saggio di adesione è stato effettuato seguendo la seguente procedura:^[92]

- ↪ sono state ricoperte piastre da 24 pozzetti con 5 µg/ml di vitronectina e lasciate per la notte a 4 °C
- ↪ sono stati effettuati tre lavaggi con PBS ed è stato aggiunto PBS + 1% BSA per bloccare l'adsorbimento aspecifico su piastra
- ↪ le cellule trasfettate (K562- $\alpha_V\alpha_3$ e K562- $\alpha_V\alpha_5$) sono state staccate con tripsina e messe in incubatore per 1h
- ↪ dopo un'ora sono stati effettuati lavaggi con PBS
- ↪ le cellule sono state incubate per 1h a 4°C con concentrazioni crescenti di peptide in esame (RGDechi, Echi 14, Echi 9, RGDeL e ciclo(RGDfV): concentrazione da 100 µM a 0.1 nM) o di anticorpo integrina-specifico
- ↪ le cellule pre-trattate ($0.5 \times 10^6 / 100 \mu\text{l} / \text{well}$) sono state piastrate sui pozzetti precedentemente ricoperti di vitronectina e lasciate aderire in incubatore per 1 h a 37 °C in 5% CO₂

- ↪ è stato effettuato un lavaggio con PBS per rimuovere le cellule che non hanno aderito mentre quelle che hanno aderito sono state trattate con tripsina ed infine contate

- ↪ i risultati ottenuti sono stati riportati in grafico espressi come percentuale di cellule aderenti e analizzati con un software dedicato (*GraphPad Prism Software Inc, San Diego, CA USA*) derivando i valori di IC_{50} per ciascun peptide.

SAGGIO DI COMPETIZIONE

Il saggio di competizione è stato realizzato impiegando il seguente protocollo:^[93]

- ↪ è stata effettuata la radiomarcatura con ^{125}I mediante metodo Iodo-Gen lasciando in incubazione per 15 min 100 μg di peptide in esame ciclo(RGDyV) con 500 μCi di Na^{125}I e 12 μg di Iodo-Gen (Pierce)
- ↪ dopo 15 min la reazione è stata interrotta aggiungendo 1 μmol di N-acetiltirosina
- ↪ il peptide marcato è stato separato dallo iodio non incorporato mediante purificazione su colonna *D-salt polyacrylamide plastic desalting columns (gel exclusion limit: 100-1,800)*, e si è eluito con PB 0.05 M e PENTASYL 0,1% (5mg/5ml)
- ↪ sono state raccolte circa 10 frazioni da 1 ml e contate al \square -counter
- ↪ le frazioni contenenti il peptide marcato sono state analizzate all'HPLC
- ↪ le cellule trasfettate K562- $\square_V\square_3$ (1×10^6) sono state incubate con concentrazioni crescenti di peptide freddo da testare (RGDechi e ciclo(RGDyV): concentrazioni da 100 μM a 0.1 nM) e tenute in agitazione per 1 h a 4°C
- ↪ è stata aggiunta una quantità fissa di peptide radiomarcato c(RGDyV) e si è lasciato reagire per 1 h a 4°C

- ↪ le cellule sono state lavate più volte con PB per rimuovere il peptide non legato ed è stata valutata la variazione di radioattività mediante conta al β -counter

- ↪ i risultati sono stati analizzati con un software dedicato (*GraphPad Prism Software Inc, San Diego, CA USA*) derivando i valori di IC₅₀ per ciascun peptide.

3. ANTAGONISTI DEL VEGF

3.1. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1.1 PROGETTAZIONE DELLE SEQUENZE PEPTIDICHE

Il primo passo verso la progettazione di nuove molecole in grado di interferire con l'azione svolta da recettori bersaglio è lo studio delle interazioni tra il recettore in esame e i suoi ligandi naturali che costituisce la base del loro riconoscimento molecolare.

A tale scopo si è intrapreso lo studio delle interazioni del VEGF con i suoi recettori attraverso l'analisi del sistema VEGF/Flt-1.

Dati di letteratura indicano che la risoluzione della struttura tridimensionale del complesso VEGF/Flt-1_{D2} e studi di mutagenesi hanno permesso di individuare i residui importanti per il legame di VEGF ai recettori KDR e Flt-1.^[68,69,72] Questi dati hanno dimostrato che la regione di *binding* al recettore è situata all'estremità dell'unità dimerica (polo) e consiste di residui forniti da entrambe le subunità. In particolare, è possibile individuare su VEGF tre regioni che contengono i determinanti strutturali necessari per l'interazione

con il recettore: l'elica $\alpha 1$ (17-25), il *loop* B3-B4 (61-66) e lo *strand* B7 (103-106) del monomero 1, e il *B-hairpin* (79-91) del monomero 2.

Nel presente lavoro di tesi l'attenzione è stata focalizzata su una di queste regioni, la sequenza elicoidale (17-25) rappresentata in Fig. 28, il cui modello è stato la base per la progettazione di antagonisti del VEGF di natura peptidica.

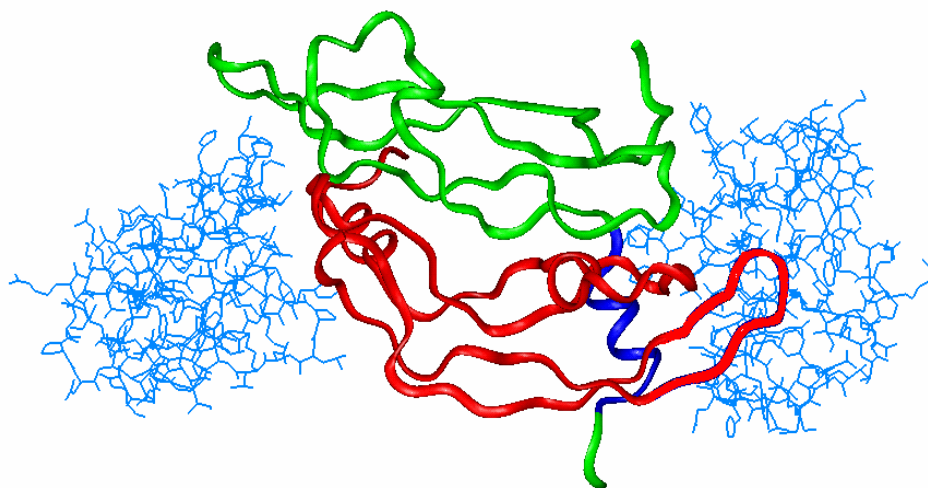


Fig. 28. Rappresentazione *ribbon* del complesso VEGF₈₋₁₀₉/Flt-1_{D2}. In blu è evidenziata una delle regioni di binding al recettore: l'elica $\alpha 1$ (17-25).

L'analisi del sistema ha indicato i residui Phe¹⁷, Met¹⁸, Tyr²¹, Gln²² e Tyr²⁵ come diretti responsabili dell'interazione con Flt-1_{D2}. Questi 5 residui occupano una faccia dell'elica e sono situati ad una distanza minore di 4.5 Å dal recettore con il quale stabiliscono interazioni di tipo idrofobico (Fig. 29).

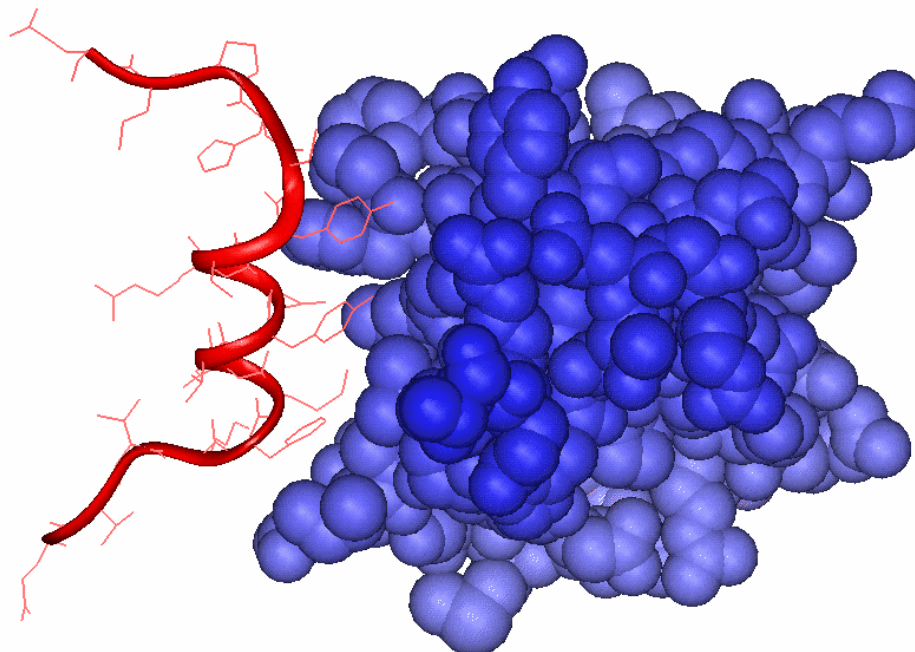


Fig. 29. Dettaglio dell'interazione fra la regione elicoidale 17-25 del VEGF (rosso) ed il dominio 2 del recettore Flt-1 (blu).

Studi di mutagenesi indicano che quando il residuo di Phe¹⁷ è sostituito con uno di Ala l'affinità del VEGF per il recettore KDR è ridotta di 90 volte, mentre le mutazioni degli altri amminoacidi influenzano solo lievemente il legame al recettore.^[69]

Per quanto riguarda i residui che si trovano sul lato opposto dell'elica, questi protendono verso l'interno della proteina e nel peptide isolato risulterebbero esposti al solvente.

Visto il contributo della regione 17-25 del VEGF nel *binding* al recettore, attribuibile alla conformazione assunta dalla sequenza amminoacidica, la strategia che si è pensato di adottare ha previsto la conservazione dei

residui fondamentali per l'interazione e l'inserimento di opportuni amminoacidi allo scopo di stabilizzare la conformazione elicoidale.

I requisiti alla base della stabilità di un' α -elica sono ampiamente descritti in letteratura,^[94,95] la loro conoscenza permette di progettare sequenze peptidiche capaci di adottare e/o stabilizzare questa conformazione. Tali requisiti sono di seguito riassunti in maniera schematica:

- ✧ intrinseca preferenza conformazionale dei residui amminoacidici;
- ✧ formazione di legami a idrogeno tra catene laterali e catena principale;
- ✧ interazioni catena laterale-catena laterale;
- ✧ legami a idrogeno, interazioni aromatiche e elettrostatiche tra residui separati da un *turn* di elica;
- ✧ interazioni elettrostatiche tra residui parzialmente carichi e le estremità N- e C terminale.

Inoltre, per stabilizzare ulteriormente un' α -elica, le estremità N- e C-terminali possono essere rispettivamente acetilate e ammidate in modo da eliminare le cariche su di esse presenti la cui interazione con il dipolo dell'elica costituirebbe un fattore destabilizzante. Un'altra strategia a cui si può ricorrere consiste nell'inserimento di sequenze che siano capaci di formare legami ad idrogeno con i gruppi amminici o carbonilici (*N-capping* e *C-capping*) presenti alle estremità.

Sulla base di queste conoscenze le sequenze dei peptidi progettati sono riportate in Fig. 30, insieme alla sequenza del frammento naturale 15-28 del VEGF (denominata VEGF 15).

	15	20	25
VEGF 15	Ac-K V K F M D V Y Q R S Y C H P-NH ₂		
FMK	Ac-K L T F M E L Y Q L K Y K G I-NH ₂		
MA	Ac-K L T W M E L Y Q L A Y K G I-NH ₂		
KA	Ac-K L T W K E L Y Q L A Y K G I-NH ₂		
MK	Ac-K L T W M E L Y Q L K Y K G I-NH ₂		
QA	Ac-K L T W Q E L Y Q L A Y K G I-NH ₂		
KK	Ac-K L T W K E L Y Q L K Y K G I-NH ₂		

Fig. 30. Sequenze amminoacidiche (codice monoletterale) dei peptidi progettati. In rosso sono evidenziati i 5 residui ritenuti responsabili dell'interazione con Flt-1; in blu i residui mutati.

Come si può osservare dalle sequenze, i principali accorgimenti per stabilizzare il motivo elicoidale sono stati: l'inserimento dei motivi N- e C-capping alle due estremità, l'impiego di residui con propensione per la conformazione elicoidale, l'acetilazione e l'ammidazione rispettivamente delle estremità N- e C-terminali.

L'N-capping è stato modellato sul motivo *capping box*.^[96] Esso permette di formare legami ad idrogeno con due dei quattro protoni ammidici iniziali del *backbone* dell'elica. In particolare, la catena laterale del residuo Ncap (Fig. 31) forma un legame ad idrogeno con l'NH ammidico del *backbone* del residuo N3

e, reciprocamente, la catena laterale di N3 forma un legame ad idrogeno con il *backbone* del residuo Ncap.

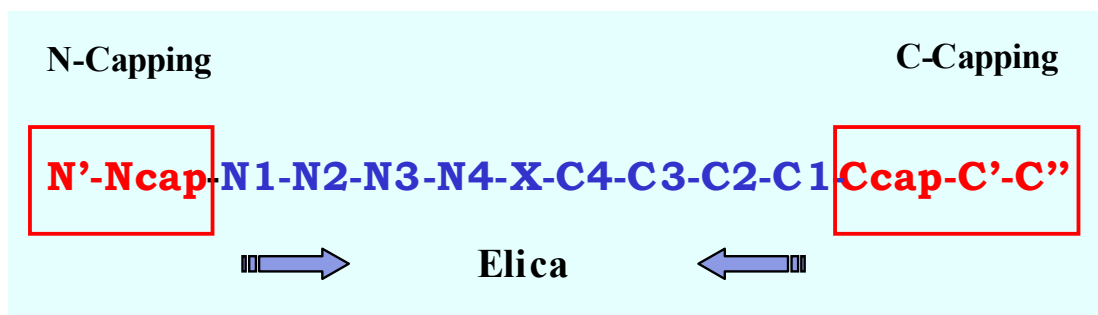


Fig. 31. Schema e nomenclatura delle posizioni di una α -elica e delle regioni di *capping*.

In posizione N' e Ncap sono stati inseriti, rispettivamente, un residuo di Leu e Thr perché presentano un'elevata propensione per queste posizioni.^[96] Le posizioni N1 e N2 sono state lasciate inalterate in quanto corrispondono ai residui che interagiscono con il recettore. E' stata, inoltre, effettuata la sostituzione Asp→Glu (N3) perché quest'ultimo ha maggiore propensione ad assumere una conformazione elicoidale.^[96] Infine, nella posizione N4 è stato inserito un residuo di Leu sia perché stabilizza il capping mediante interazione idrofobiche con N', sia per la elevata propensione per una conformazione elicoidale.

Per quanto riguarda la regione C-terminale questa è stata stabilizzata introducendo una sequenza che potenzialmente può assumere una conformazione tipo motivo di Schellman.^[97] Essa prevede un doppio *pattern* di legame ad idrogeno tra NH al C'' e il CO del residuo C3 e tra NH del C' e il CO del C2. Inoltre, è presente un'associazione idrofobica tra il C3 e il C''. I vincoli conformazionali dovuti a queste interazioni impongono al residuo C' una conformazione tipica di un residuo con configurazione D. Per questa ragione un residuo di Gly è stato inserito in C', mentre per la posizione C'' e Ccap sono stati scelti residui con elevata propensione a stabilizzare l'elica, rispettivamente Ile e Lys.

In posizione C3 è stato inserito un residuo di Leu per favorire le interazioni idrofobiche tipiche di questo motivo *C-capping*. In posizione C2 è stato inserito un residuo di Ala (elevata propensione per l'elica) o Lys (aumenta la solubilità del peptide conservando la propensione per la conformazione elicoidale) così da ottenere due serie di mutanti. La posizione C1 è occupata dal residuo di Tyr della regione di *binding* del VEGF.

All'N-terminale è stata, inoltre, aggiunta una Lys per permetterne la funzionalizzazione con fluoresceina, e le estremità amminica e carbossilica dei peptidi sono state rispettivamente acetilata e amidata.

In Fig. 32 sono riportate le rappresentazioni delle “eliche *wheel*” di VEGF 17-25 e di uno dei peptidi progettati, MA, che permettono di evidenziare la disposizione amminoacidica lungo l'elica.

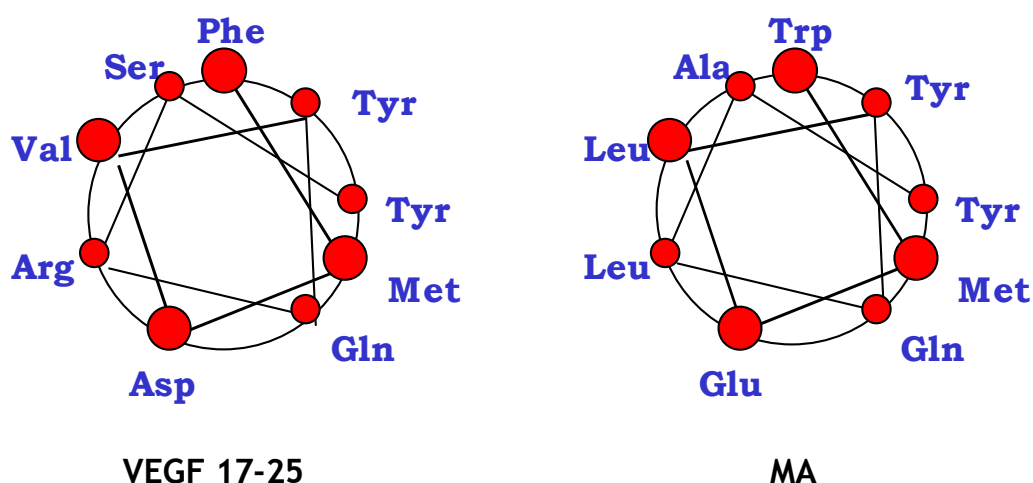


Fig. 32. Rappresentazione mediante elica *wheel* della disposizione amminoacidica della sequenza naturale VEGF (17-25) e del peptide progettato MA.

La sostituzione della Phe¹⁷ con Trp è stata effettuata perché studi di *modelling* hanno indicato che la cavità sul recettore che ospita la Phe¹⁷ potrebbe alloggiare residui con maggiore ingombro sterico. L'introduzione di un residuo di Trp dovrebbe permettere di rafforzare le interazioni con il recettore aumentando la superficie di contatto. Inoltre, il triptofano può fungere da *probe* sia per la determinazione della concentrazione sia per eventuali studi di *binding* mediante spettrofluorimetria.

Infine, poiché la tasca che ospita la Met¹⁸ presenta sul fondo due residui che potenzialmente possono formare legami idrogeno (Asp²¹⁹ e Thr²⁰⁶), sono state inserite le due mutazioni Met¹⁸→Lys e Met¹⁸→Gln.

Dopo aver modellato la sequenza è stata eseguita una minimizzazione energetica per raffinare a livello conformazionale il modello, eliminando le conformazioni ad alta energia. Successivamente è stata eseguita una simulazione di dinamica molecolare in solvente in presenza del recettore. La sequenza è stata posizionata correttamente nel sito del recettore sovrapponendo gli atomi del *backbone* delle due eliche dal residuo 17 al 25. L'analisi ha indicato che la struttura elicoidale disegnata risulta conformazionalmente stabile e che è in grado di conservare i contatti con il recettore in modo analogo al composto naturale (Fig. 33).

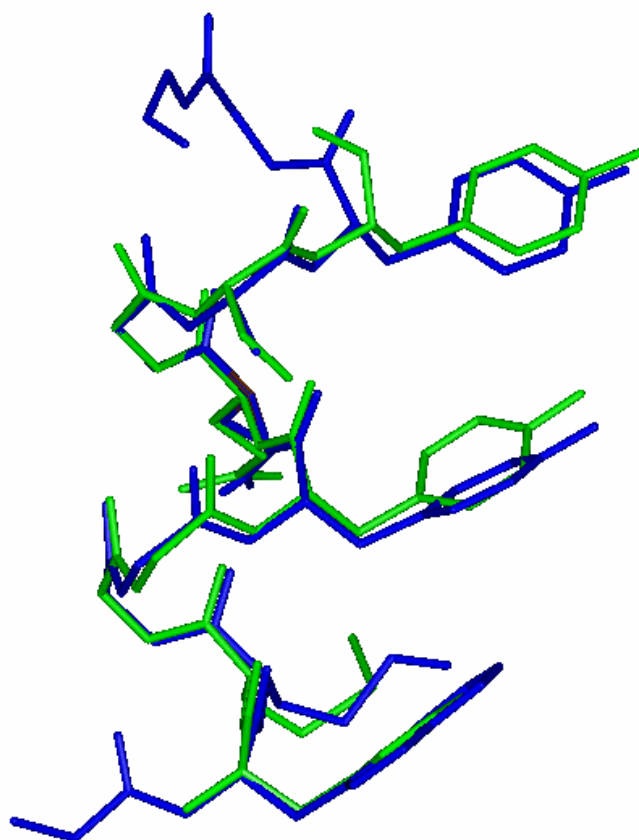


Fig. 33. Sovrapposizione fra la struttura della regione 17-25 del VEGF (verde) nel complesso con il recettore e l'analogo tratto del modello molecolare del peptide MA (blu). Per chiarezza sono mostrate solo le catene laterali degli amminoacidi coinvolti nell'interazione con il recettore.

3.1.2 SINTESI DEI PEPTIDI PROGETTATI

Tutti i peptidi sono stati sintetizzati in fase solida con chimica Fmoc utilizzando il sintetizzatore automatico di peptidi ADVANCED CHEMTECH 348 Ω e la resina *Rink-Amide MBHA*. In Fig. 34 è rappresentata la struttura del *linker* della resina.

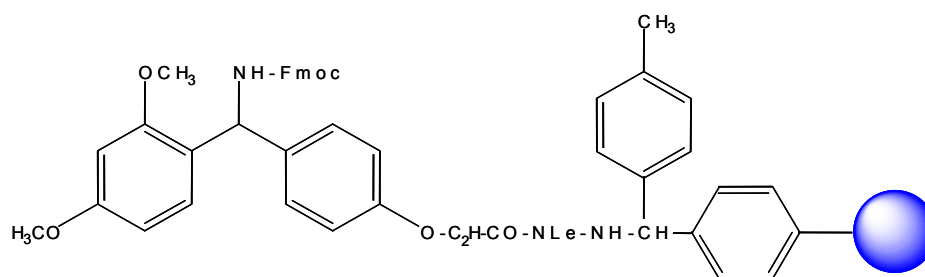
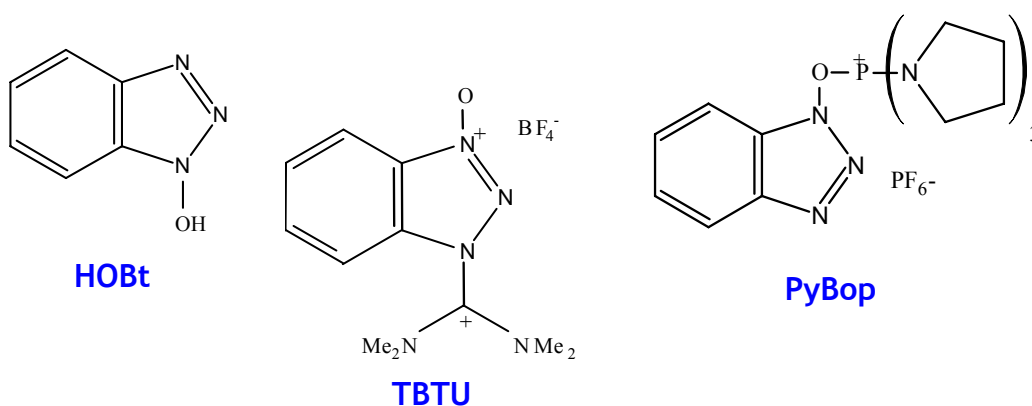


Fig. 34. Resina *Rink-Amide MBHA*.

Le sintesi sono state condotte su scala 0.03 mmol e sono stati impiegati tutti amminoacidi con gruppi protettori standard. Tutti gli amminoacidi della sequenza sono stati inseriti mediante attivazione *in situ* con HOBt/TBTU o HOBt/PyBop.



Nella miscela di reazione è stata aggiunta la base DIPEA in modo da stabilizzare l'estremità carbossilica dell'amminoacido nella sua forma deprotonata e, quindi, favorirne l'attacco nucleofilo sull'agente attivante.

Le reazioni di accoppiamento sono state effettuate utilizzando un eccesso di amminoacido (4 equivalenti rispetto alla scala di sintesi) e la strategia del doppio accoppiamento, che consiste nel ripetere due volte la fase di accoppiamento dell'amminoacido prima di procedere alle fasi successive. La deprotezione delle estremità amminiche di ogni amminoacido dal gruppo Fmoc è stata realizzata impiegando piperidina/DMF; mentre per la reazione di acetilazione è stata utilizzata una soluzione di anidride acetica/Piridina/DMF.

I peptidi, infine, sono stati distaccati dalla resina mediante trattamento con TFA e precipitati in etere etilico a freddo. La successiva fase di purificazione è stata eseguita mediante RP-HPLC mentre la purezza e l'identità dei peptidi sintetizzati sono state confermate mediante RP-HPLC analitico e spettroscopia di massa MALDI-TOF.

I peptidi sono stati ottenuti tutti in buone rese e con elevato grado di purezza, come si può osservare dalla Tab. 2 in cui sono riportati i dati riassuntivi riguardanti le sintesi del VEGF 15 e dei sei peptidi progettati.

PEPTIDE	PM _{teor}	PM _{sper}	t _R	RESE
VEGF 15	1942	1943	14.2 min	52 %
FMK	1916	1917	16.13 min	51 %
MA	1898	1899	18.3 min	53 %
KA	1895	1896	16.4 min	54 %
MK	1955	1956	15.6 min	53 %
QA	1896	1897	15.4 min	48 %
KK	1952	1953	14.3 min	53 %

Tab. 2. Parametri e Rese di purificazione dei peptidi sintetizzati

In Fig. 35 A e B sono riportati, come esempio, rispettivamente il cromatogramma e lo spettro MALDI-TOF del peptide MA.

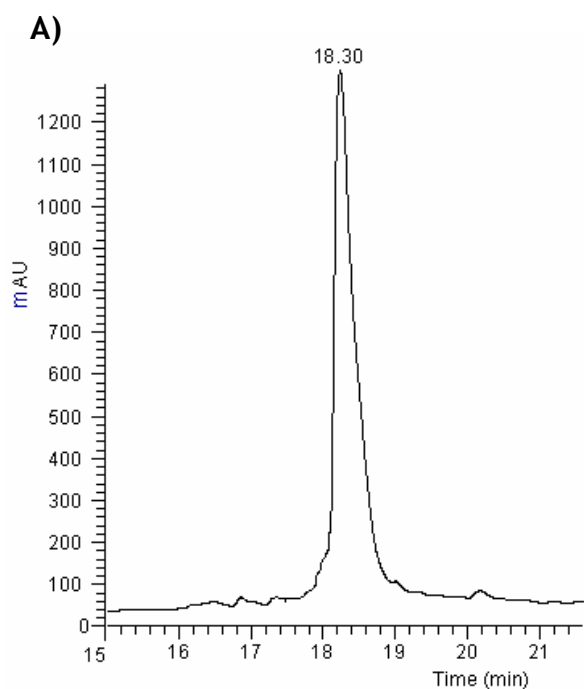


Fig. 35 A) Profilo cromatografico RP-HPLC del peptide MA puro: $t_r = 18.30$ min.

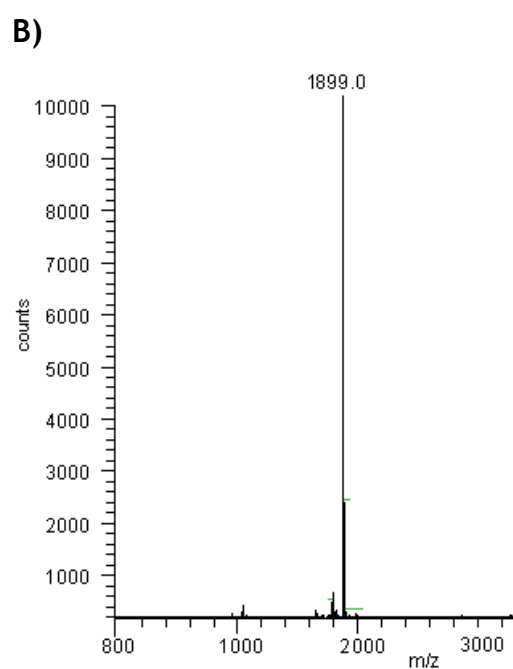


Fig. 35 B) Spettro di massa MALDI-TOF di MA puro: picco molecolare $[M+H]^+$ a m/z 1899 ($PM_{teor} = 1898$ Da).

3.1.3 STUDIO CONFORMAZIONALE MEDIANTE DICROISMO CIRCOLARE DEI PEPTIDI PROGETTATI

Al fine di studiare le proprietà conformazionali dei peptidi sintetizzati sono state effettuate misure di dicroismo circolare nel lontano-UV in tampone fosfato 5 mM a pH=7, in modo da riprodurre le condizioni fisiologiche.

Sono state impiegate soluzioni di peptidi 50 μM controllandone la concentrazione mediante lettura UV-Vis a 280 nm.

I parametri CD relativi ai peptidi in tampone fosfato sono riportati in Tab. 3.

PEPTIDE	λ_{\max}	$[\theta]_{\min} \cdot 10^{-3} (\lambda_{\min})$	$[\theta]_{207} \cdot 10^{-3}$	$[\theta]_{222} \cdot 10^{-3}$	$[\theta]_{222}/[\theta]_{\min}$	λ_0
FMK	190.2	-14.2(203.8)	-12.9	-7.2	0.5	194.8
MA	190.4	-9.7 (204.9)	-9.4	-6.9	0.7	196.8
KA	190.8	-11.2 (203.0)	-9.8	-5.7	0.5	194.4
MK	191.0	-11.0 (206.6)	-11.0	-7.3	0.7	197.2
QA	190.4	-5.1 (204.8)	-5.0	-3.5	0.7	196.6
KK	191.2	-11.0 (204.2)	-10.1	-6.1	0.6	195.2

Tab. 3. Parametri CD relativi ai peptidi in tampone fosfato 5mM (pH=7)

In Fig. 36 sono riportati gli spettri CD dei peptidi esaminati.

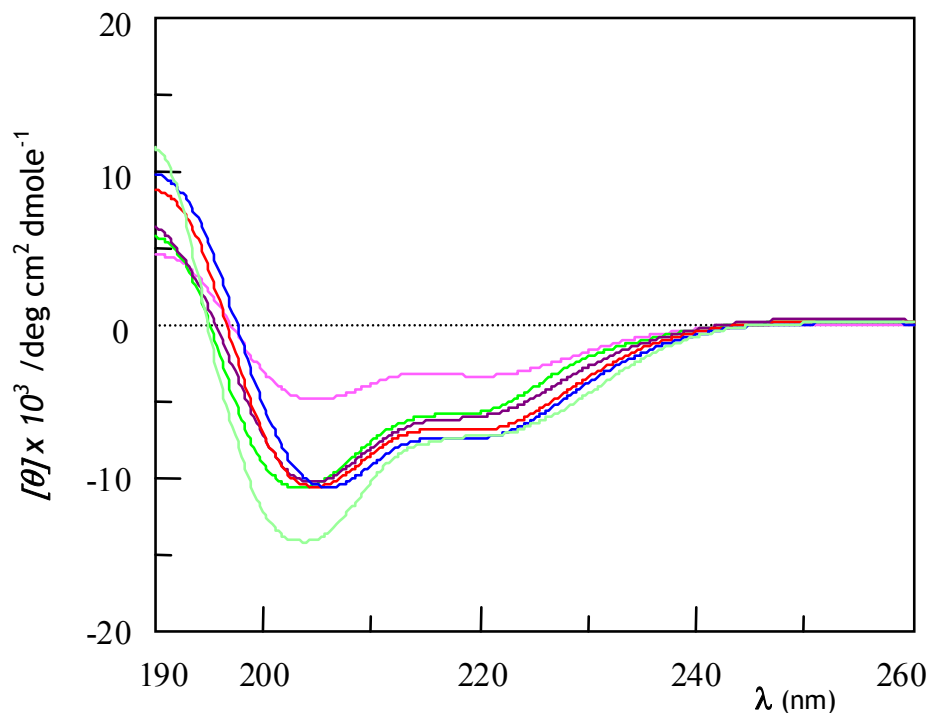


Fig. 36. Spettri CD nel lontano-UV in tampone fosfato 5 mM a pH=7: — FMK; — KA; — KK; — MA; — MK; — QA.

Dall'analisi degli spettri e dei valori riportati in Tab. 3 si evince che tutti i peptidi tendono ad assumere in parte una conformazione elicoidale. In particolare, i peptidi MA ed MK presentano il contenuto elicoidale maggiore, mentre il peptide FMK presenta il contenuto minore. E' interessante, inoltre, notare come anche i peptidi con la Lys in posizione 18 (KA e KK) abbiano minore propensione per la struttura elicoidale, probabilmente a causa della destabilizzazione indotta dalla carica positiva presente nella regione N-terminale che può interagire sfavorevolmente con il dipolo dell'elica.

Infine, sono stati realizzati spettri in tampone fosfato a pH=7 anche della sequenza VEGF 15. In Fig. 37 è riportata, come esempio, la sovrapposizione degli spettri del VEGF 15 con il peptide MA.

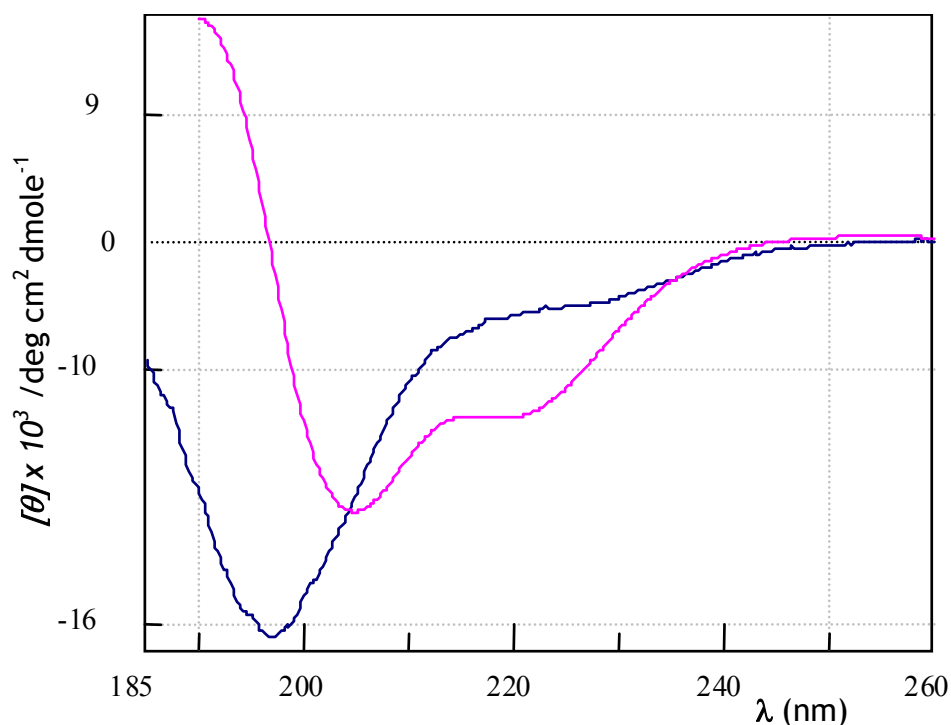


Fig. 37. Sovrapposizione degli spettri CD del peptide MA (—) e del VEGF 15 (—) in tampone fosfato 5 mM a pH=7.

E' evidente dall'analisi degli spettri che il VEGF 15, cioè la sequenza naturale, non presenta struttura secondaria definita contrariamente al peptide MA.

I dati ottenuti da questi esperimenti risultano estremamente interessanti in quanto è noto, da dati di letteratura, che piccole sequenze naturali difficilmente presentano in soluzione una conformazione ben definita. Non a caso il peptide VEGF 15, tratto dalla sequenza naturale del VEGF, non sembra presentare preferenze conformazionali. Al contrario i peptidi disegnati, ed in particolare il peptide MA, sono un chiaro esempio di come

l'introduzione di opportune modifiche nella sequenza amminoacidica, cioè la progettazione razionale, abbia permesso di ottenere uno *scaffold* stabile impiegando solo amminoacidi naturali e la sostituzione di alcuni amminoacidi responsabili del legame al recettore non ne modifica le preferenze conformazionali.

3.1.4 STUDI BIOLOGICI DEI PEPTIDI PROGETTATI

I peptidi progettati e la sequenza VEGF 15 sono stati sottoposti a diversi saggi biologici, condotti con ricercatori della Facoltà di Scienze Farmaceutiche di Salerno, allo scopo di valutarne l'attività nei confronti del VEGF.

E' noto che una delle principali funzioni biologiche del VEGF è la capacità di recuperare dall'apoptosi le cellule endoteliali,^[98] motivo per il quale per analizzare la capacità dei peptidi in esame di antagonizzare tale attività biologica, sono stati impiegati saggi di valutazione dell'apoptosi in cellule endoteliali umane primarie da vena ombelicale (HUVEC).

Il primo saggio effettuato, impiegato come controllo iniziale, è stato l'analisi dell'apoptosi in citofluorimetria attraverso la valutazione della frazione cellulare con contenuto di DNA ipodiploide (percentuale di cellule in fase sub-G₁).^[99]

Le cellule HUVEC sono state incubate, rispettivamente, in presenza del mezzo di coltura (EGM), in assenza di siero e in presenza del VEGF₁₆₅ *human recombinant* a concentrazione di 5 e 20 ng/ml. Successivamente le cellule sono state trattate con ioduro di propidio e, quindi, analizzate in citometria a flusso (Fig. 38).

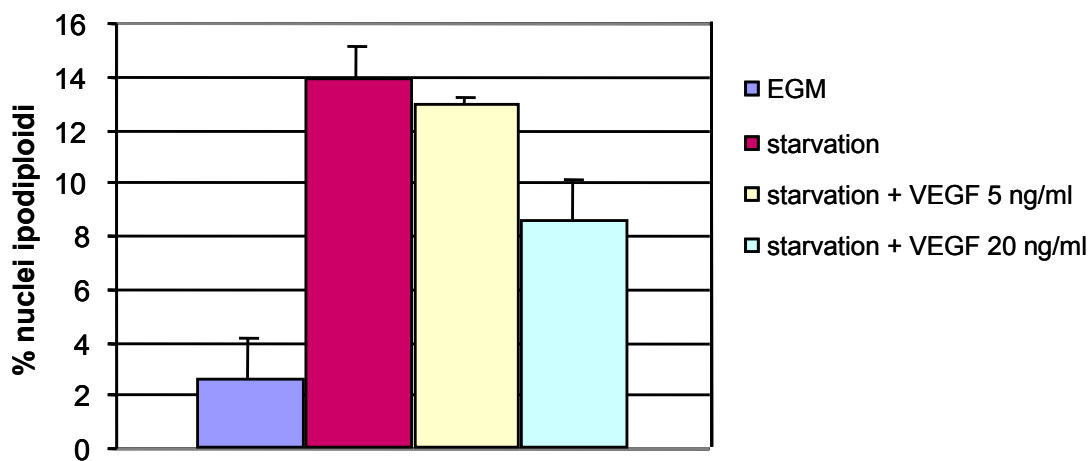


Fig. 38. Rappresentazione ad istogrammi del saggio citofluorimetrico dell'ipodiploidia in cellule HUVEC.

I risultati ottenuti hanno indicato, in accordo con i dati di letteratura,^[100] che il VEGF ad una concentrazione di 20 ng/ml (valutata come miglior dose per indurre l'effetto desiderato) è in grado di inibire di circa il 40% l'apoptosi indotta dalla deprivazione di siero (*starvation*).

Essendo l'iploidia un evento tardivo nel processo apoptotico, i dati ottenuti risultano riproducibili in termini relativi ma non assoluti, in quanto l'ipodiploidia varia a seconda delle condizioni delle cellule (Fig. 39).

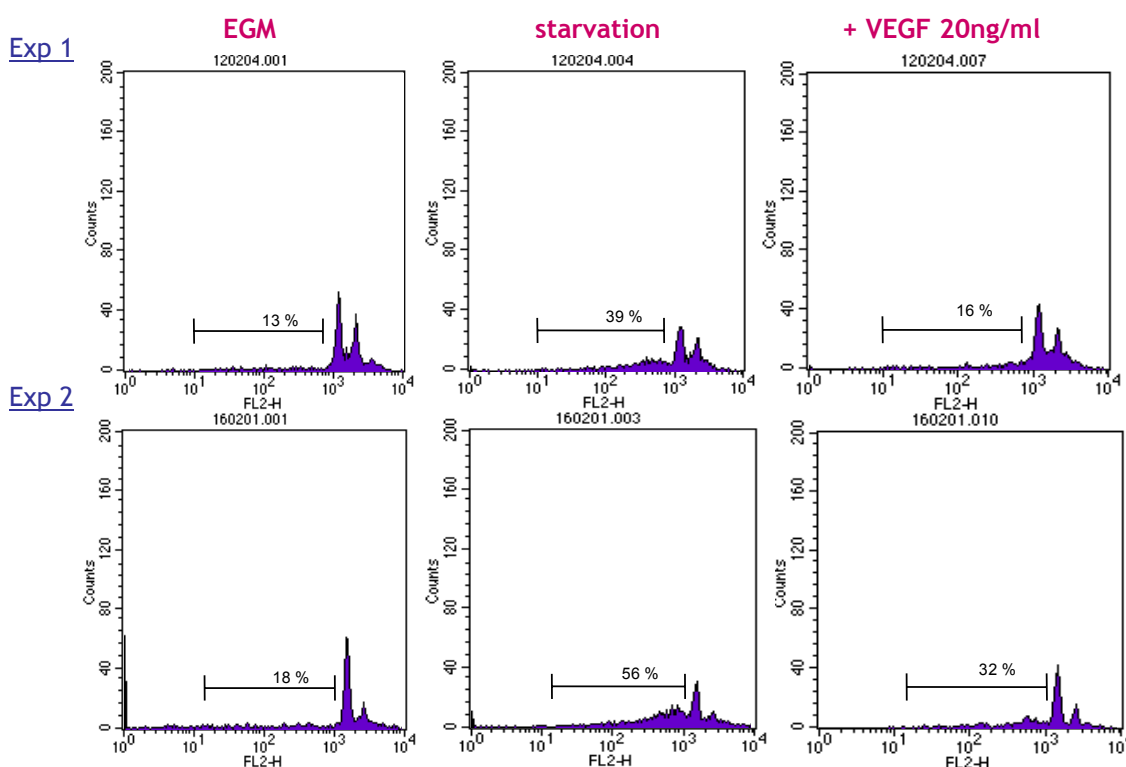


Fig. 39. Saggio citofluorimetrico dell'ipodiploidia in cellule HUVEC. Il saggio è ripetuto due volte e condotto rispettivamente in mezzo completo EGM, in assenza di siero (*starvation*) e in presenza di VEGF (20 ng/ml).

Per tale motivo, allo scopo di confermare i risultati ottenuti nel primo saggio è stato messo a punto, nello stesso sistema cellulare, un test fluorimetrico per un evento più precoce, l'attivazione di caspasi 3, enzima specifico dell'apoptosi.^[101]

Il test è stato condotto incubando le cellule, deprivate di siero, per un tempo variabile da due a sei ore in assenza e in presenza del VEGF (concentrazione di 20 ng/ml). L'attività della caspasi è stata, quindi, determinata in estratti citosolici cellulari attraverso l'analisi del rilascio di 7-amino-4-metilcumarina (AMC) dalla N-acetil-DEVD-AMC, uno specifico substrato della caspasi. Il miglior risultato è stato ottenuto dopo quattro ore di incubazione (Fig. 40) e ha fornito, anche con questo test, una percentuale di inibizione dell'attività di caspasi 3 (e quindi dell'apoptosi) da parte del VEGF di circa il 40%.

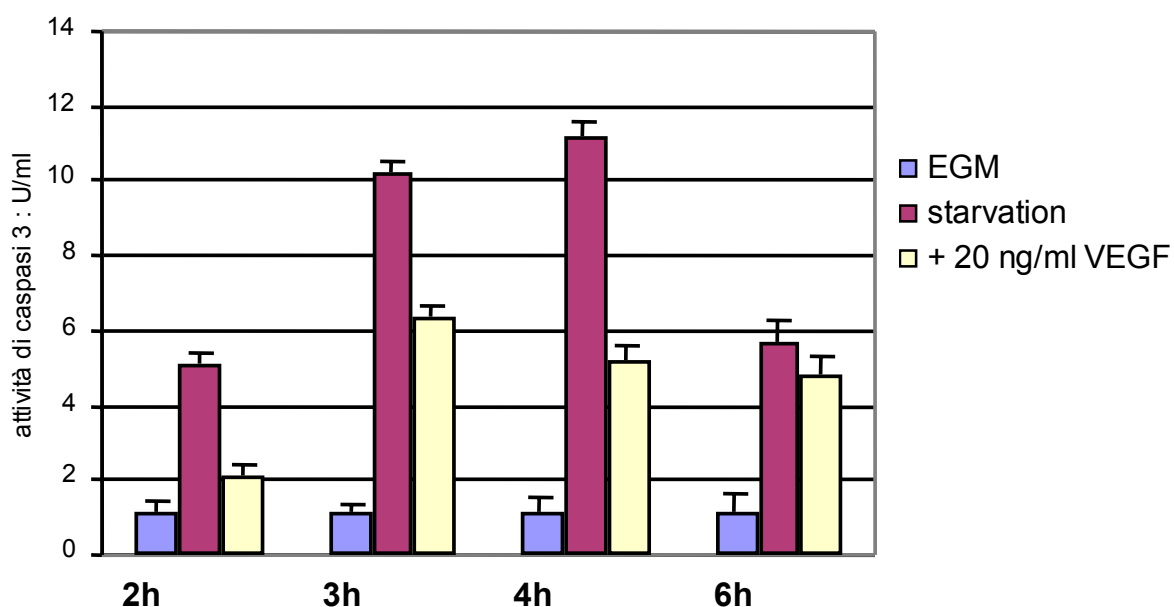


Fig. 40. Rappresentazione ad istogrammi del saggio fluorimetrico dell'attività di caspasi 3.

Essendo quest'ultimo test più riproducibile rispetto a quello citofluorimetrico di valutazione dell'ipodiploidia, si è deciso di impiegarlo per la valutazione dell'attività biologica dei peptidi in esame. Di ogni peptide è stata testata la capacità di inibire l'azione di recupero dall'apoptosi che il VEGF esplica sulle HUVEC sottoposte a *starvation*. Sono stati eseguiti 3 esperimenti in duplicato incubando le cellule prima con i

peptidi alla concentrazione di 20 ng/ml e, successivamente, in assenza o in presenza del VEGF (20 ng/ml).

I risultati sono stati riportati in grafico (Fig. 41) come percentuale di “Rescue” rispetto al recupero effettuato dal VEGF da solo considerato come il 100%.

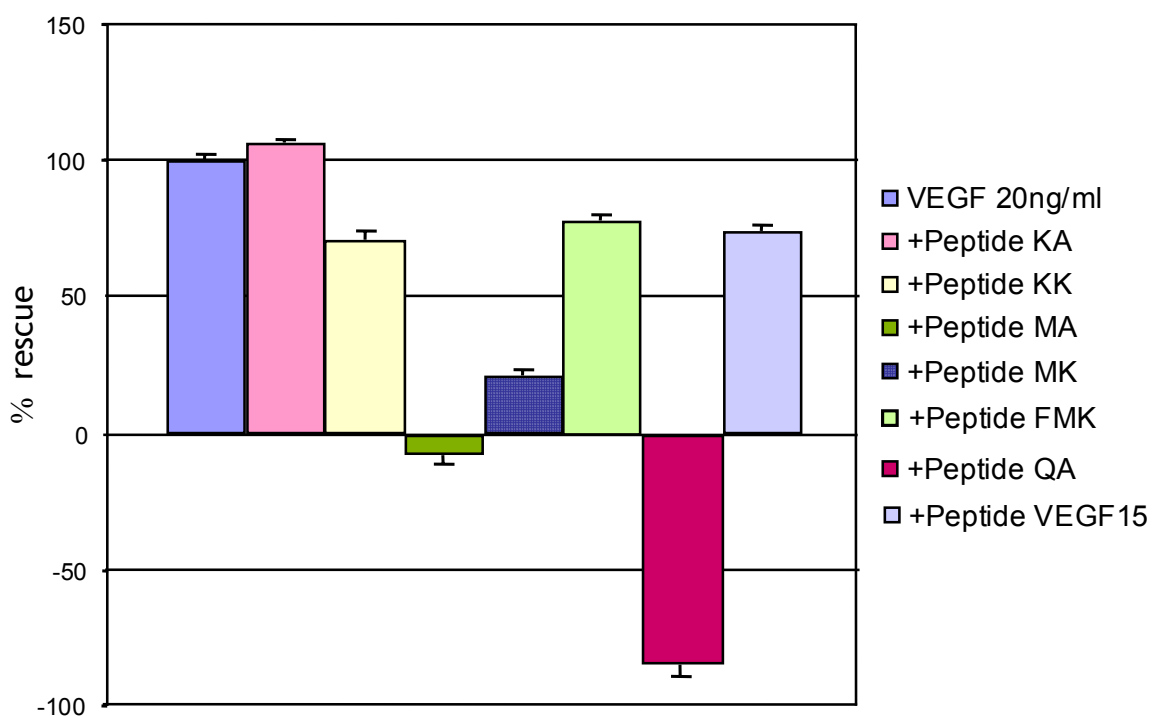
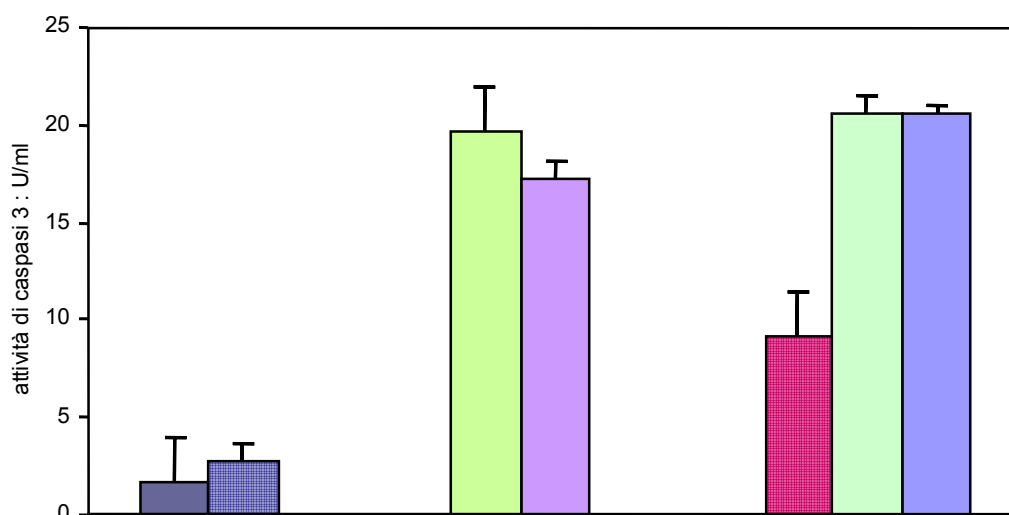


Fig. 41. Rappresentazione ad istogrammi del saggio fluorimetrico dell'attività di caspasi 3.

I dati ottenuti indicano chiaramente che i peptidi MA e MK sono in grado di inibire per più dell' 80% l'attività antiapoptotica del VEGF; il peptide QA risulta tossico, mentre i peptidi KA, KK e VEGF 15 non variano sostanzialmente l'azione di recupero esplicata dal VEGF.

Per il peptide MA è stata, inoltre, valutata la dose- e tempo-dipendenza dell'effetto antagonista (Fig. 42).

Le cellule sono state prima incubate con il peptide MA alle concentrazioni rispettivamente di 1 ng/ml e 20 ng/ml e, successivamente, sono state incubate in assenza e in presenza del VEGF (20 ng/ml).



Starvation	-	-	+	+	+	+	+
Peptide MA 1 ng/ml	-	+	-	+	-	+	-
Peptide MA 20 ng/ml	-	-	-	-	-	-	+
VEGF 20 ng/ml	-	-	-	-	+	+	+

Fig. 42. Rappresentazione dell'effetto antagonista del peptide MA in dipendenza della dose e del tempo.

Dal grafico appare evidente che, nel caso in cui il peptide MA sia aggiunto alle cellule in mezzo completo o deprivato di siero, la variazione dell'attività di caspasi 3 risulta poco significativa; al contrario, se MA viene aggiunto successivamente al VEGF, che induce una diminuzione nei livelli di caspasi 3, il peptide è in grado di antagonizzare l'effetto antiapoptotico del VEGF, riportando la concentrazione di caspasi al livello iniziale.

Contemporaneamente ai saggi dell'ipodiploidia e dell'attivazione di caspasi 3 sono stati messi a punto preliminari saggi di *binding* del VEGF su cellule HUVEC mediante tecnica FACS. Alla luce dei risultati ottenuti dai precedenti saggi di apoptosi si è pensato di testare il peptide MA ed un suo analogo (MA *scramble*) impiegato come controllo e costituito dagli stessi residui

amminoacidici di MA ma disposti in maniera del tutto casuale (sequenza: Ac-KQMYLELGYATIKWL-NH₂).

I due peptidi da testare sono stati opportunamente marcati legando la catena laterale del residuo di Lys¹⁴ alla funzione carbossilica di una fluoresceina derivatizzata con uno *spacer* di acido esamminocaproico.

I saggi sono stati realizzati incubando le cellule HUVEC in presenza rispettivamente dei peptidi fluoresceinati MA e MA *scramble* alla concentrazione di 1 µg/ml ciascuno e del peptide MA fluoresceinato (1 µg/ml) e dello *human recombinant* VEGF a concentrazione variabile (da 20 a 0.002 µg/ml). I risultati ottenuti sono riportati in Fig. 43 dove in viola è mostrata l'autofluorescenza intrinseca delle cellule, mentre in verde e rosa la fluorescenza relativa al peptide MA rispettivamente in assenza e in presenza del VEGF.

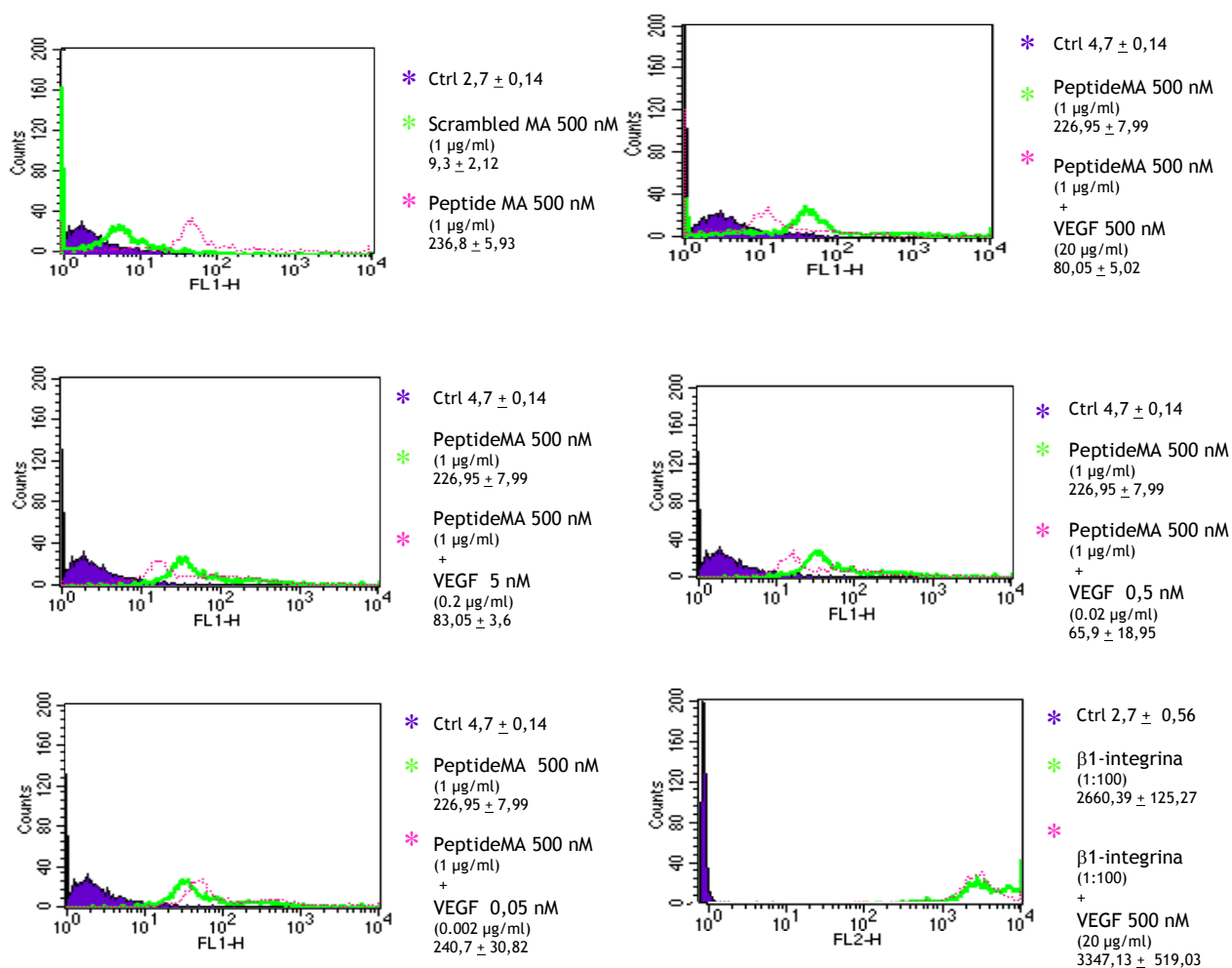


Fig. 43. Saggio di *binding* del peptide MA su cellule HUVEC mediante tecnica FACS

Come evidente dal primo grafico, quando le cellule vengono incubate con il peptide MA *scramble* si osserva una variazione trascurabile del segnale di fluorescenza rispetto al livello basale, mentre quando le cellule sono incubate con il peptide MA l'intensità del segnale di fluorescenza risulta notevole. Il trattamento con la miscela di MA e VEGF mostra in maniera chiara come l'intensità del segnale ottenuto si avvicini sempre di più a quella del peptide MA al diminuire della concentrazione del VEGF.

Allo scopo di evidenziare il *binding* specifico del VEGF e del peptide MA ai recettori del VEGF, è riportato per confronto un esperimento condotto incubando le cellule HUVEC con anticorpi anti β 1-integrina e con il VEGF. Ciò che si osserva in questo caso è un'intensità di fluorescenza molto forte dovuta alla elevata concentrazione di recettori integrine sulla superficie cellulare. Tale segnale non sembra variare per aggiunta del VEGF, indicando l'incapacità di questa molecola di interagire con le integrine e, quindi, di legarsi in maniera aspecifica ai recettori espressi sulla superficie cellulare.

I dati collazionati in questa serie di esperimenti lasciano dedurre che, fra tutti i peptidi progettati, il peptide MA potrebbe essere un candidato ideale per la futura sperimentazione in vivo e per poter essere eventualmente adoperato, una volta funzionalizzato, come sonda biospecifica per il riconoscimento selettivo dei recettori del VEGF sovraespressi nei fenomeni di angiogenesi patologica.

3.2. PARTE SPERIMENTALE

3.2.1 COSTRUZIONE DEL MODELLO

L'analisi conformazionale è stata eseguita su una *workstation* Silicon Graphics Octene. Il pacchetto integrato INSIGHT/DISCOVER della MSI è stato utilizzato per le minimizzazioni energetiche dei sistemi progettati e per le successive simulazioni di dinamica molecolare. L'algoritmo "*steepest descent*" è stato impiegato nei primi stadi di raffinamento, mentre l'algoritmo "*Quasi-Newton-Raphson*" è stato utilizzato negli stadi finali. Per tutte le simulazioni è stato adoperato il campo di forza CVFF.^[87-89]

Il modello di partenza per la simulazione del complesso recettore/peptide modello, condotte a 300 K in soluzione, è stato costruito utilizzando il programma Insight II. Durante la fase di minimizzazione e di dinamica molecolare il recettore è stato tenuto fisso, tranne per i residui distanti dall'elica del VEGF entro i 4.5 Å. La dinamica molecolare in solvente è stata condotta per 100 ps con *step* di 0.5 fs per la prima fase di equilibratura del sistema, e per ulteriori 100 ps senza *rescaling* della velocità per studiare il comportamento del sistema.

3.2.2 STRATEGIE DI SINTESI E CONDIZIONI SPERIMENTALI

Le sintesi dei peptidi progettati sono state effettuate tutte in fase solida con chimica Fmoc su scala 0.03 mmol, utilizzando un sintetizzatore automatico di peptidi ADVANCED CHEMTECH 348 Ω e, come supporto solido, la resina *Rink-Amide MBHA* (grado di sostituzione 0.59 mmol/g) che rilascia il peptide con l'estremità carbossilica amidata.

Fmoc-Ala-OH	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	Fmoc-Cys(Trt)-OH
Fmoc-Gln(Trt)-OH	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	Fmoc-Gly-OH
Fmoc-His(Trt)-OH	Fmoc-Ile-OH	Fmoc-Leu-OH
Fmoc-Lys(Boc)-OH	Fmoc-Lys(Mtt)-OH	Fmoc-Met-OH
Fmoc-Phe-OH	Fmoc-Pro-OH	Fmoc-Ser(tBu)-OH
Fmoc-Thr(tBu)-OH	Fmoc-Trp(Boc)-OH	Fmoc-Tyr(tBu)-OH
Fmoc-Val-OH		

La fase di deprotezione dell' N-terminale di ogni amminoacido dal gruppo Fmoc è stata effettuata trattando la resina-peptide con una soluzione di piperidina in DMF (30:70 v/v), due volte per un tempo di 10 min.

Nella fase di accoppiamento, per ogni ciclo sono stati impiegati, rispetto alla scala di sintesi, 4 eq di Fmoc-amminoacido, 3.9 eq di TBTU 0.45 M in DMF, 3.9 eq di HOBt 0.45 M in DMF ed 8 eq di DIPEA 2 M in NMP. Ogni ciclo è

stato condotto per un tempo di 45 min ed è stato ripetuto due volte, nelle stesse condizioni, per ciascun amminoacido.

Dopo ogni ciclo di accoppiamento è stata effettuata una reazione di acetilazione per bloccare i gruppi amminici che non hanno reagito nella precedente fase. La reazione è stata eseguita trattando la resina-peptide con una soluzione di anidride acetica e piridina in DMF (4.7:4:91.3 v/v/v), due volte per 10 min.

Ogni *step* è stato seguito da 5 lavaggi di 1 min con DMF.

Alla fine della sintesi il gruppo Fmoc terminale è stato rimosso dal gruppo amminico, ed è stata eseguita l'acetilazione finale a cui sono seguiti una serie di lavaggi della resina con DMF, DCM, MeOH anidro ed etere etilico.

Nel caso dei peptidi da fluoresceinare, prima del distacco dalla resina, è stata eseguita la deprotezione selettiva della Lys¹⁴ dall'Mtt mediante ripetuti trattamenti della resina-peptide con una soluzione 1% TFA/5% TIS in DCM, fino a completa scomparsa della colorazione gialla indicativa della presenza del gruppo Mtt. E' stata, quindi, effettuata la fluoresceinazione della Lys deprotetta trattando i peptidi con 2 eq di acido Fluorescein-5(6)-carbossiammidocaproico in presenza di 2 eq di HATU e 5 eq di DIPEA in DMF. La reazione è stata lasciata proseguire per l'intera notte.

Il distacco dei peptidi dalla resina è stato effettuato mediante trattamento con una miscela TFA/Tis/H₂O/EDT (94.5:1:2.5:2.5 v/v/v/v) per 3h a temperatura ambiente.

La resina è stata, quindi, separata dalla soluzione per filtrazione e lavata ripetutamente con TFA. Il filtrato e i lavaggi sono stati poi riuniti e concentrati. I peptidi grezzi sono stati precipitati con etere etilico a 0 °C. I precipitati sono stati quindi seccati, disciolti in una miscela di H₂O/CH₃CN e liofilizzati.

I peptidi grezzi sono stati analizzati e purificati mediante RP-HPLC. Tutte le analisi di tipo analitico sono state eseguite su un cromatografo liquido serie Hewlett-Packard Serie 1100 collegato ad un rivelatore UV e ad un autocampionatore. Sono stati utilizzati una colonna Phenomenex Juppiter C₁₈ (4.6 x 250 mm, 5µm, 300 Å) e, come eluenti, H₂O/0.1% TFA (eluente A) e CH₃CN/0,1% TFA (eluente B). L'analisi cromatografica è stata effettuata

adoperando un gradiente lineare che va dal 20% al 80% dell'eluente B in 30 min (variazione di 2% di B al min) ad un flusso di 1 ml/min.

Le purificazioni sono state condotte su uno SHIMADZU LC-8A collegato ad un rivelatore UV SPD-10A, usando una colonna Vydac 218TP C₁₈ (15 µm, 22x250 mm) con gli stessi eluenti e gradienti impiegati nella scala analitica e con una velocità di flusso di 20 ml/min.

Gli spettri di massa sono stati effettuati su uno spettrometro MALDI-TOF Voyager-DE della Perseptive Biosystem utilizzando come matrice l'acido α -ciano-4-idrossicinnamico e come standard l'insulina bovina.

3.2.3 *DICROISMO CIRCOLARE: APPARECCHIATURE E CONDIZIONI SPERIMENTALI ADOTTATE*

Spettroscopia di Dicroismo Circolare

L'acquisizione degli spettri è stata effettuata a 20°C con uno spettropolarimetro Jasco-J715. I dati sono stati raccolti utilizzando una velocità di scansione pari a 10 nm/min, una larghezza di banda di 2.0 nm ed una costante di tempo di 16 sec. Le scansioni sono state effettuate da 260 a 190 nm usando celle di quarzo da 0.1 cm. Gli esperimenti sono stati condotti in tampone fosfato 5 mM a pH=7, utilizzando soluzioni di peptidi con concentrazione 50 µM. Le intensità delle bande CD sono state espresse come ellitticità molare per residuo, calcolata dividendo l'ellitticità molare totale per il numero di residui amminoacidici delle molecole in esame.

Spettroscopia UV-Vis

Gli spettri UV-Vis sono stati registrati utilizzando uno spettrofotometro Jasco V-550, adoperando celle di quarzo di cammino ottico di 1 cm (Hellma). Tutti gli spettri sono stati acquisiti nell'intervallo 200-400 nm, con una velocità di scansione pari a 100 nm/min e una larghezza di banda di 1 nm.

I reagenti utilizzati per la preparazione dei campioni sono gli stessi utilizzati per l'acquisizione degli spettri mediante dicroismo circolare.

3.2.4 TEST BIOLOGICI: CONDIZIONI SPERIMENTALI

ANALISI DELLA IPODIPLOIDIA

L'analisi dell'apoptosi in citofluorimetria attraverso la valutazione della frazione cellulare con contenuto di DNA ipodiploide è stata effettuata seguendo la seguente procedura:

- ↪ le cellule HUVEC (Promocell, Heidelberg, Germany) sono state piastrate in duplicato alla densità di 1.0×10^5 cellule/cm² con EGM-2 (FBS 2%, Idrocortisone, hFGF-B, VEGF, acido ascorbico, hEGF, GA-1000, eparina) in *multiwell* da sei e incubate a 37 °C, 5% CO₂
- ↪ dopo 24 ore le cellule sono state lavate con HBSS e incubate per 24 ore in assenza di siero e in assenza o presenza di VEGF (*human recombinant*, Vinci-Biochem, Vinci, Italia) alla concentrazione di 20 ng/ml

L'ipodiploidia è stata, quindi, misurata mediante analisi citofluorimetrica di cellule trattate con l'agente intercalante ioduro di propidio:

- ↪ le cellule sono state risospese in una soluzione ipotonica contenente ioduro di propidio (50 µg/ml), 0.1% sodio citrato e 0.1% Triton X-100, a 4 °C per 30 min e, quindi, analizzate in citometria a flusso (Becton Dickinson FACScan, San Diego, CA) con un filtro a 585 nm (lambda emissione dello ioduro di propidio) (10,000 eventi per ciascun campione)
- ↪ il contenuto di DNA nei nuclei è stato registrato su scala logaritmica ed è stata calcolata la percentuale di cellule ipodiploidi.

SAGGIO FLUORIMETRICO DELL'ATTIVITA' DI CASPASI 3

L'analisi è stata condotta come riportato di seguito:

- ↪ le cellule HUVEC sono state piastrate in duplicato alla densità di 1.0×10^5 cellule /cm² con EGM-2 (FBS 2%, Idrocortisone, hFGF-B, VEGF, acido ascorbico, hEGF, GA-1000, eparina) in multiwell da sei e incubate a 37°C, 5% CO₂
- ↪ dopo 24 ore le cellule sono state lavate con HBSS e incubate per 30 min con EBM-2 (eparina 0.1%, BSA 0.1%) contenente i peptidi alla concentrazione di 20 ng/ml
- ↪ dopo 30 min le cellule sono state incubate per 4 ore in presenza di VEGF alla concentrazione di 20 ng/ml

L'attività della caspasi 3 è stata determinata per via fluorimetrica in estratti citosolici di cellule Jurkat attraverso l'analisi del rilascio di 7-amino-4-metilcumarina (AMC) dalla N-acetil-DEVD-AMC, substrato specifico della caspasi:

- ↪ 3×10^6 cellule sono state lisate in *caspase 3 reaction buffer* 1X (10mmol/l Tris pH= 7.5, 130 mmol/l NaCl, 1% Triton X-100, 10 mmol/l NaPi and 10 mmol/l NaPPi)
- ↪ 100 µg/ml di proteina sono stati incubati con il substrato 3 µM (BD) in un buffer contenente 20 mmol/l HEPES (pH 7.5), 10% glicerolo e 2 mmol/l ditiotreitolo (DTT) a 37°C per 3h

- ↳ il rilascio di AMC è stato monitorato attraverso analisi spettrofluorimetrica con un raggio d'eccitazione di 380 nm ed una lunghezza d'onda della radiazione di emissione di 430-460 nm

- ↳ a partire dai risultati ottenuti è stata calcolata la percentuale di "rescue".

SAGGI DI *BINDING* MEDIANTE TECNICA FACS

Determinazione della immunofluorescenza di superficie:

- ↪ 2×10^6 cellule sono state raccolte, centrifugate a 600 g per 5 min e lavate 2 volte in PBS 1X
- ↪ il lisato ottenuto è stato risospeso in 200 μ mol di PBS 1X (Cambrex Bio Science, Belgium), a cui è stato aggiunto l'anticorpo primario ad una concentrazione di 1 μ g/ml, e incubato a 4°C per 1h
- ↪ dopo 2 lavaggi in PBS 1X, le cellule sono state incubate a 4°C per 1h con l'anticorpo secondario policlonale (*goat anti-mouse IgG*) coniugato a fluoresceina isotiocianato (FITC) (Molecular probes, Eugene, Oregon, USA) ed analizzate mediante citofluorimetria a flusso (FACSCalibur, BD)
- ↪ i dati sono stati elaborati mediante il programma CellQuest program (BD Biosciences).

Determinazione della fluorescenza accoppiata alle molecole testate:

- ↪ le cellule HUVEC sono state tripsinizzate e risospese alla densità di 3×10^5 cellule/cm² in EBM-2 contenente 0.1% di eparina e 0.1% di BSA
- ↪ il lisato cellulare è stato incubato in ghiaccio per 5 min rispettivamente con il peptide *MA scramble* fluoresceinato (1 μ g/ml), con il peptide *MA* fluoresceinato (1 μ g/ml) e con la miscela peptide *MA* (1 μ g/ml) e concentrazioni variabili di *human recombinant* VEGF (da 20 a 0.002 μ g/ml), infine analizzato in citofluorimetria a flusso (FACSCalibur, BD)
- ↪ i dati sono stati elaborati mediante il programma CellQuest program (BD Biosciences).

4. CONCLUSIONI

Nel presente lavoro di tesi sono state effettuate la progettazione, la sintesi e la caratterizzazione di nuove molecole di natura peptidica e peptidomimetica in grado di modulare l'attività di sistemi molecolari coinvolti nella cascata angiogenica.

A tale scopo sono stati scelti due sistemi che sono tra quelli più noti e studiati nell'ambito della regolazione del processo di angiogenesi patologica: il sistema dei recettori di membrana per le proteine della matrice (integrine) e quello dei fattori di crescita vascolari endoteliali.

Per quanto concerne il sistema delle integrine, l'attenzione è stata rivolta all'integrina $\alpha_v\beta_3$ allo scopo di sviluppare nuove molecole in grado di inibire in maniera selettiva il *binding* dei ligandi naturali e, quindi bloccare la cascata angiogenica.

Per tale motivo il punto di partenza di questa prima parte del lavoro di tesi è stato lo studio delle interazioni del recettore $\alpha_v\beta_3$ con molecole descritte in letteratura note per il loro marcato effetto antagonista nei confronti dell'integrina in esame. Tra queste sono state selezionate, in particolare, due molecole: l'echistatina e il ciclo(RGDf-NMeV).

L'echistatina è una proteina appartenente alla famiglia delle disintegrine ed è un antagonista naturale, il più potente fra quelli noti, specifico per l'integrina $\alpha_v\beta_3$; il ciclo(RGDf-NMeV), invece, è un peptide che è stato dimostrato essere la più piccola molecola di natura sintetica capace di inibire il *binding* dei ligandi naturali dell'integrina $\alpha_v\beta_3$.

Partendo dai dati strutturali presenti in letteratura relativi all'echistatina, al recettore $\alpha_v\beta_3$ libero e in complesso con il ciclo(RGDf-NMeV), sono stati

effettuati studi di *modelling* sovrapponendo la sequenza RGD dell'echistatina con quella del ciclo(RGDf-NMeV) nel complesso con l'integrina e valutando l'orientazione degli altri residui della sequenza proteica. I dati ottenuti hanno indicato che la porzione C-terminale dell'echistatina entra in una tasca di legame del recettore dando luogo ad interazioni sia di tipo idrofobico che idrofilico con la subunità β_3 . Sulla base di questi risultati è stata progettata e sintetizzata una nuova molecola bifunzionale, denominata RGDechi, costituita da una porzione ciclica derivante dal ciclo(RGDf-NMeV), allo scopo di conservare l'affinità di *binding* al recettore, e da una sequenza lineare derivante dalla porzione C-terminale dell'echistatina, al fine di preservare ed eventualmente migliorare la selettività nei confronti dell'integrina in esame. Insieme al peptide RGDechi sono stati inoltre sintetizzati, in fase solida mediante chimica Fmoc, l'analogo lineare e due peptidi costituiti rispettivamente dagli ultimi 14 e 9 residui della sequenza di RGDechi, allo scopo di testarne la differente attività nei successivi saggi di *binding*. Questi ultimi sono stati condotti incubando le cellule K562- $\alpha_v\beta_3$ in presenza di concentrazioni crescenti di peptide in esame e successivamente facendole aderire su piastre in precedenza ricoperte con vitronectina, ligando naturale dell'integrina $\alpha_v\beta_3$. Come confronto è stato utilizzato il peptide ciclo(RGDfV), precursore del ciclo(RGDf-NMeV) ad attività paragonabile. I risultati ottenuti hanno indicato che RGDechi è in grado di legare l'integrina $\alpha_v\beta_3$ con elevata affinità paragonabile a quella del ciclo(RGDfV); al contrario i saggi condotti sui peptidi RGDeL, Echi 14 ed Echi 9, hanno indicato che tali peptidi non sono in grado di interagire con le cellule K562- $\alpha_v\beta_3$, mettendo chiaramente in evidenza l'importanza non solo della sequenza RGD per il *binding* al recettore, ma anche della conformazione da questa assunta determinata dalla presenza del ciclo.

Al fine di verificare la selettività del peptide RGDechi nei confronti dell'integrina $\alpha_v\beta_5$, analoghi saggi di *binding* sono stati condotti su cellule K562- $\alpha_v\beta_5$. Questi hanno indicato che il ciclo(RGDfV) interagisce marcatamente con il clone cellulare K562- $\alpha_v\beta_5$, mentre per il peptide RGDechi non si osserva una significativa interazione.

In conclusione, per quanto concerne la prima parte del lavoro di tesi, mediante progettazione razionale e studi di *modelling* si è riusciti a sviluppare una nuova molecola bifunzionale costituita da una porzione ciclica e da una sequenza lineare, entrambe derivanti da composti noti in letteratura come potenti inibitori dell'integrina $\alpha_v\beta_3$, legate mediante amminoacidi opportunamente scelti. Questa nuova molecola presenta non solo un'elevata affinità nei confronti dell'integrina $\alpha_v\beta_3$, ma anche una maggiore selettività rispetto al ciclo(RGDfV) riportato in letteratura, soddisfacendo pienamente gli obiettivi proposti.

È attualmente in corso la caratterizzazione strutturale mediante tecnica NMR del peptide RGDechi che permetterà di ottenere informazioni circa la conformazione assunta dagli amminoacidi della sequenza. I dati ottenuti potranno essere utilizzati per ulteriori studi volti a sviluppare una seconda classe di molecole costituite dalla minima sequenza in grado di conservare la stessa attività e selettività nei confronti dell'integrina $\alpha_v\beta_3$.

Per quanto riguarda il sistema dei fattori di crescita l'attenzione è stata rivolta al VEGF. Anche in questo caso l'obiettivo è stato quello di individuare nuovi peptidi in grado di interferire con il legame del VEGF ai suoi recettori e bloccare il processo angiogenico. A tale scopo è stato condotto un accurato studio del sistema VEGF-recettore Flt-1 e, delle tre regioni del VEGF riportate in letteratura comprendere i determinanti strutturali per l'interazione con il recettore, è stata scelta la regione elicoidale 17-25.

Individuata la regione di interesse ed analizzate le sue caratteristiche di *binding* al recettore mediante determinazione dei residui direttamente coinvolti nell'interazione, l'approccio seguito è stato quello di progettare dei peptidi capaci di riprodurre le caratteristiche strutturali della regione elicoidale 17-25, introducendo appropriati *tools* molecolari e conservando i residui fondamentali per l'interazione con il recettore. Ciò allo scopo di ottenere composti con migliori capacità di *binding*, in modo da competere con il legame del VEGF, e maggiore solubilità tale da permetterne la caratterizzazione strutturale mediante NMR. Sono state in tal modo progettate e sintetizzate, in fase solida mediante chimica Fmoc, sei molecole peptidiche che sono state purificate mediante RP-HPLC.

Sulle molecole così ottenute sono stati condotti studi conformazionali in soluzione mediante dicroismo circolare, per valutare l'attendibilità del modello ottenuto in fase di progettazione. I dati ottenuti dall'esame degli spettri CD in tampone fosfato a pH=7 hanno indicato che tutti i peptidi tendono ad assumere una conformazione elicoidale. Inoltre, misure CD condotte sulla sequenza originale del VEGF (VEGF 15) hanno mostrato in maniera evidente che la sequenza naturale non presenta struttura secondaria definita contrariamente ai peptidi disegnati, dimostrando che le modifiche introdotte effettuando una progettazione razionale hanno permesso di ottenere uno *scaffold* stabile e la sostituzione di amminoacidi responsabili del legame al recettore non ne modificano le preferenze conformazionali.

Infine, sulle sequenze progettate sono stati condotti saggi biologici di apoptosi che hanno permesso di individuare fra questi, due peptidi che fungono da antagonisti del VEGF, inibendone per più dell'80% l'azione antiapoptotica. Per uno di questi, il peptide MA, è stata valutata anche la dose- e tempo-dipendenza dell'effetto antagonista e sono stati condotti saggi di *binding* mediante tecnica FACS in assenza e presenza del VEGF. I risultati ottenuti hanno indicato che il peptide MA è in grado di legarsi in maniera specifica ai recettori del VEGF espressi sulla superficie cellulare competendo con il *binding* del VEGF stesso, come evidenziato dallo spostamento dell'intensità del segnale di fluorescenza verso il segnale del peptide MA da solo al diminuire della concentrazione del VEGF.

È attualmente in corso la caratterizzazione strutturale del peptide MA mediante tecnica NMR che permetterà di ottenere dettagli conformazionali utili per il *design* di nuove molecole eventualmente più specifiche e selettive nei confronti dei recettori del VEGF.

In conclusione, in questa seconda parte del lavoro di tesi si è riusciti a stabilizzare una sequenza peptidica naturale nella conformazione attesa, utilizzando peptidi di piccole dimensioni (15 residui) che hanno un potenziale impiego per il *targeting* di cellule tumorali ed eventualmente per la terapia. Tali peptidi funzionando da antagonisti della proteina naturale, potrebbero trovare impiego, opportunamente funzionalizzati, come sonde

per il riconoscimento selettivo dei recettori del VEGF (KDR o Flt-1) overespressi nei fenomeni di angiogenesi patologica.

Riassumendo, nell'ambito del presente lavoro di tesi, attraverso l'impiego di differenti tecniche quali la progettazione razionale, la sintesi in fase solida, la caratterizzazione strutturale mediante dicroismo circolare e i saggi biologici, è stato possibile sviluppare nuovi *lead compound* in grado di interagire in maniera specifica con *target* cellulari quali l'integrina $\alpha_V\beta_3$ e i recettori del VEGF, entrambi coinvolti nell'angiogenesi tumorale e interferire, quindi, con il processo angiogenico a differenti livelli di formazione dei nuovi vasi sanguigni.

Bersagliare le EC che supportano la crescita del tumore, piuttosto che le stesse cellule cancerose, è un approccio relativamente nuovo nella terapia del cancro, particolarmente promettente poiché queste cellule sono geneticamente stabili e, quindi, meno soggette ad accumulare mutazioni che permetterebbero loro di sviluppare rapidamente resistenza al trattamento farmacologico.

Per tale motivo i risultati ottenuti nel presente lavoro risultano particolarmente interessanti in quanto, nel caso in cui la caratterizzazione e l'ottimizzazione delle molecole sintetizzate permetta di ottenerne altre che preservino la dimostrata attività e selettività, aprono la strada al possibile utilizzo di tali molecole come sonde biospecifiche per la diagnosi o eventualmente per la terapia delle malattie neoplastiche.

5. TECNICHE UTILIZZATE

5.1. *SINTESI PEPTIDICA*

I numerosi progressi compiuti nel campo della sintesi peptidica e la possibilità di disporre di apparecchiature automatiche, rendono attualmente possibile la sintesi di sequenze peptidiche e peptido-mimetiche di diversa lunghezza e complessità.

Negli ultimi anni la tecnica di sintesi in fase solida sta dominando il campo della chimica dei peptidi in quanto è particolarmente rapida ed efficiente.^[102]

Il principale vantaggio, rispetto alla sintesi in soluzione, consiste nel far crescere il peptide direttamente ancorato ad un supporto solido costituito da una resina polimerica opportunamente funzionalizzata. In questo modo durante la sintesi è possibile eliminare l'eccesso di reagenti e sottoprodotti, semplicemente lavando la resina con solventi appropriati. Al contrario, nella sintesi in soluzione dopo ogni reazione di acilazione, è necessaria una fase di purificazione per allontanare l'eccesso di reagenti ed i sottoprodotti. Ciò comporta un dispendio di tempo e risorse oltre a perdite di prodotto dovute ai passaggi di purificazione.

Il supporto solido utilizzato nella sintesi in fase solida deve soddisfare una serie di requisiti.^[103]

- ✎ deve contenere siti reattivi ai quali il peptide possa essere legato durante la procedura di sintesi e dai quali possa essere facilmente staccato a sintesi ultimata;
- ✎ deve essere stabile alle condizioni chimiche e fisiche della sintesi;
- ✎ deve permettere un rapido e facile contatto tra la catena peptidica crescente ed i reagenti;
- ✎ deve essere facilmente separabile dalla fase liquida ad ogni stadio della sintesi e fisicamente stabile durante tali operazioni;
- ✎ deve fornire al primo amminoacido un numero sufficiente di siti di attacco per consentire una buona resa in termini di peptide per unità di volume;
- ✎ deve minimizzare le interazioni tra i peptidi ad essa ancorati.

Generalmente, queste resine sono costituite da una matrice polimerica (polistirene, poliacrilammidi o copolimeri di stirene e divinilbenzene) a cui è legato un linker che termina con un gruppo alcolico o amminico avente la funzione di ancorare il peptide alla resina. I diversi gruppi funzionali caratterizzano i vari tipi di resine e consentono di ottenere peptidi aventi gruppi C-terminali (dopo distacco del peptide dalla resina) di tipo amminico o carbossilico.

Gli amminoacidi utilizzati durante la sintesi peptidica hanno il gruppo amminico legato al C^α ed i gruppi funzionali presenti sulle catene laterali opportunamente protetti allo scopo di evitare reazioni collaterali ed eliminare il carattere dipolare degli amminoacidi e dei peptidi.

In particolare, la protezione delle catene laterali degli amminoacidi viene definita "permanente", in quanto persiste durante tutte le fasi della sintesi, mentre quella del gruppo amminico legato al C^α viene definita "temporanea", perché viene rimossa prima dell'accoppiamento dell'amminoacido che segue nella sequenza. Questi gruppi protettori sono scelti in modo da soddisfare i seguenti requisiti:^[104]

- ✎ facilità di inserimento;
- ✎ stabilità durante la reazione di accoppiamento;

- 🌀 riduzione della reattività del gruppo funzionale a cui sono legati;
- 🌀 protezione del C^α dalla racemizzazione;
- 🌀 rimozione in condizioni blande.

Nel caso della chimica Fmoc la funzione amminica legata al C^α viene protetta con il gruppo base-labile 9-fluorenil metossicarbonile^[105,106] (Fmoc) (Fig. 44), attraverso la formazione di un legame di tipo uretano tra l'NH₂ dell'aminoacido e la funzione carbonilica del gruppo protettore.

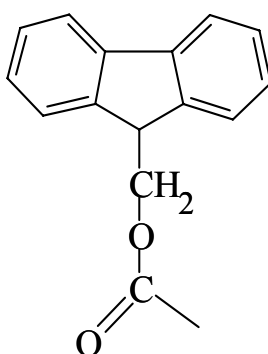


Fig. 44 Gruppo Fmoc

In questo tipo di strategia sintetica le catene laterali dei vari aminoacidi sono protette con gruppi acido-labili in modo tale che i gruppi protettori scelti siano presenti durante tutte le fasi della sintesi (Fig. 45).

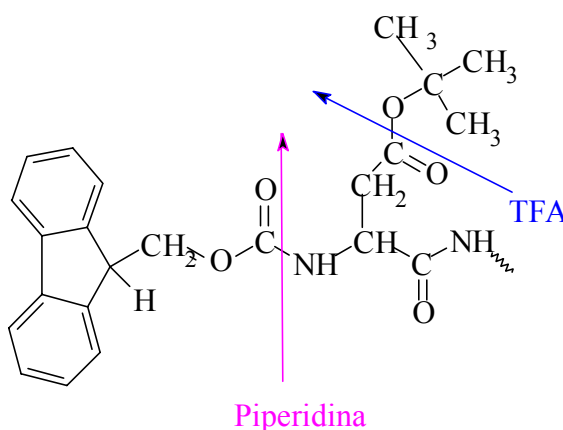


Fig. 45. Strategia della rimozione della protezione “permanente” e di quella “temporanea”

In Fig. 46 sono rappresentate le fasi principali che caratterizzano la sintesi peptidica in fase solida

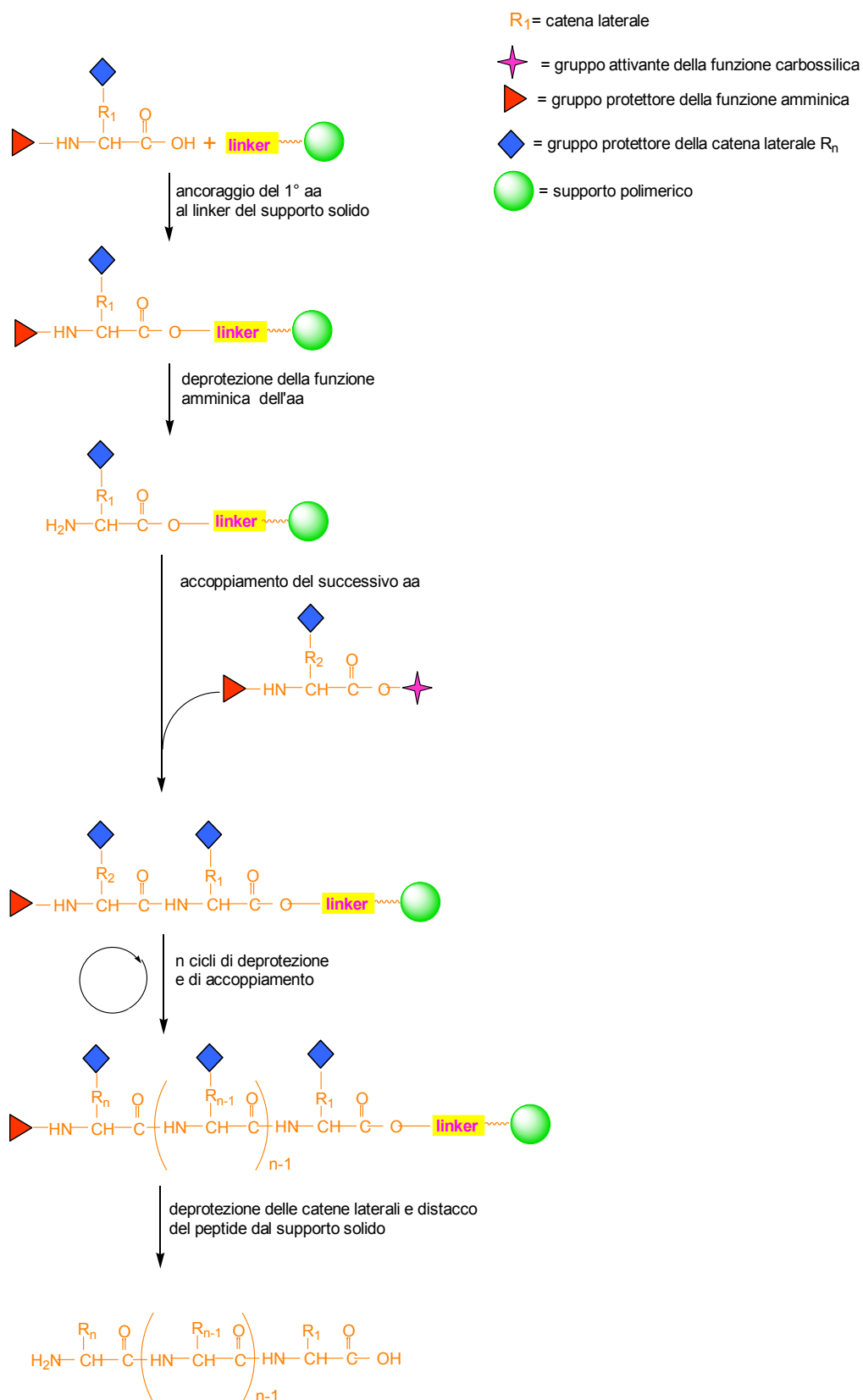


Fig. 46. Schema di sintesi peptidica in fase solida

La sintesi ha inizio dall'amminoacido C-terminale, il quale viene legato chimicamente al supporto insolubile attraverso il suo gruppo carbossilico, formando un legame estereo o ammidico a seconda della natura del supporto solido utilizzato.

Successivamente la sintesi si articola attraverso la ripetizione ciclica di una serie di fasi, che comprendono:

- ❖ **FASE DI DEPROTEZIONE:** Rimozione del gruppo protettore Fmoc dal gruppo amminico dell'ultimo residuo amminoacidico inserito nella sequenza peptidica, in condizioni basiche blande. A tale scopo può essere utilizzata una soluzione al 20 o al 30% di piperidina in DMF.^[107,108] La base rimuove l'idrogeno in posizione 9 (molto acido a causa della stabilizzazione per risonanza del derivato anionico ciclopentadienilico) con formazione dell'anione e successiva β -eliminazione che porta alla formazione del dibenzofulvene, il quale reagisce a sua volta con la base formando l'addotto dibenzofulvene-base (Fig. 47):

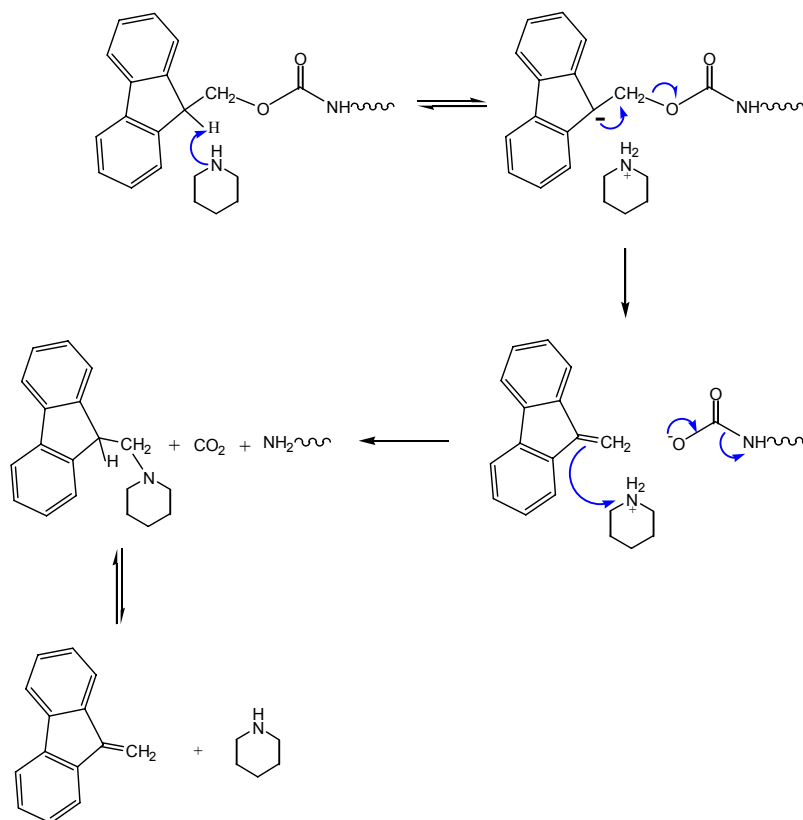


Fig. 47. Rimozione del gruppo Fmoc con piperidina

- ❖ **FASE DI ATTIVAZIONE:** Attivazione esterea di tipo idrossibenzotriazolica, *in situ*, del gruppo carbossilico dell'amminoacido libero coinvolto nella formazione del legame, con PyBOP, TBTU, HBTU o HATU ed HOBT come catalizzatore.^[109] Il meccanismo di reazione è riportato in Fig. 48:^[110]

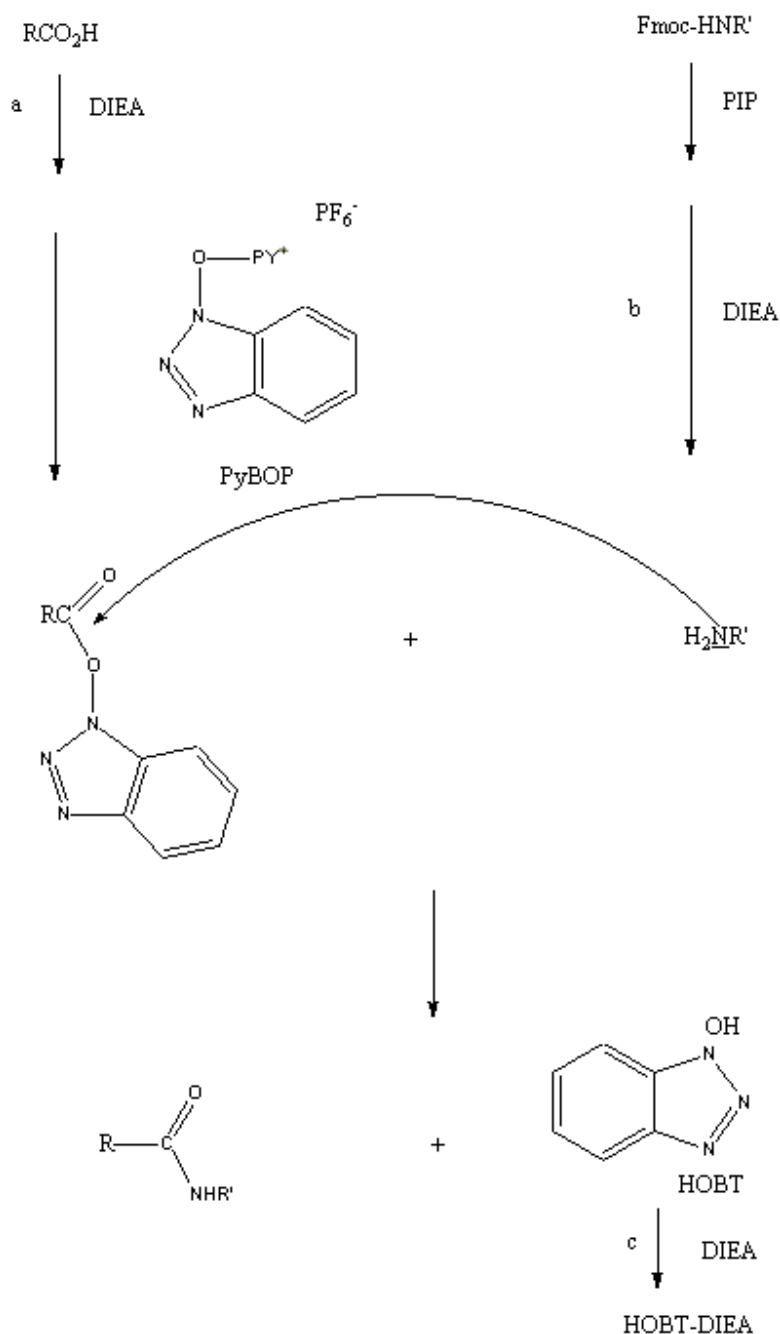


Fig. 48. Meccanismo di attivazione e condensazione *in situ* con PyBop.

❖ **FASE DI ACCOPPIAMENTO:** Accoppiamento tra l'amminoacido attivato e l'estremità N-terminale dell'ultimo amminoacido della catena peptidica in crescita con formazione del legame peptidico. In alcuni casi, per essere sicuri che l'accoppiamento sia avvenuto, si ripete due volte questa fase. Per controllare la completezza delle reazioni di accoppiamento e di deprotezione, allo scopo di limitare la formazione di prodotti indesiderati, possono essere eseguiti dei controlli mediante test qualitativo e quantitativo con ninidrina,^[111] prelevando una piccola aliquota di peptidil-resina e trattandola con ninidrina dopo ciascuna fase di accoppiamento e deprotezione. Tale test rivela la presenza di gruppi amminici liberi sulla resina. La reazione con ninidrina è riportata in Fig. 49:^[112]

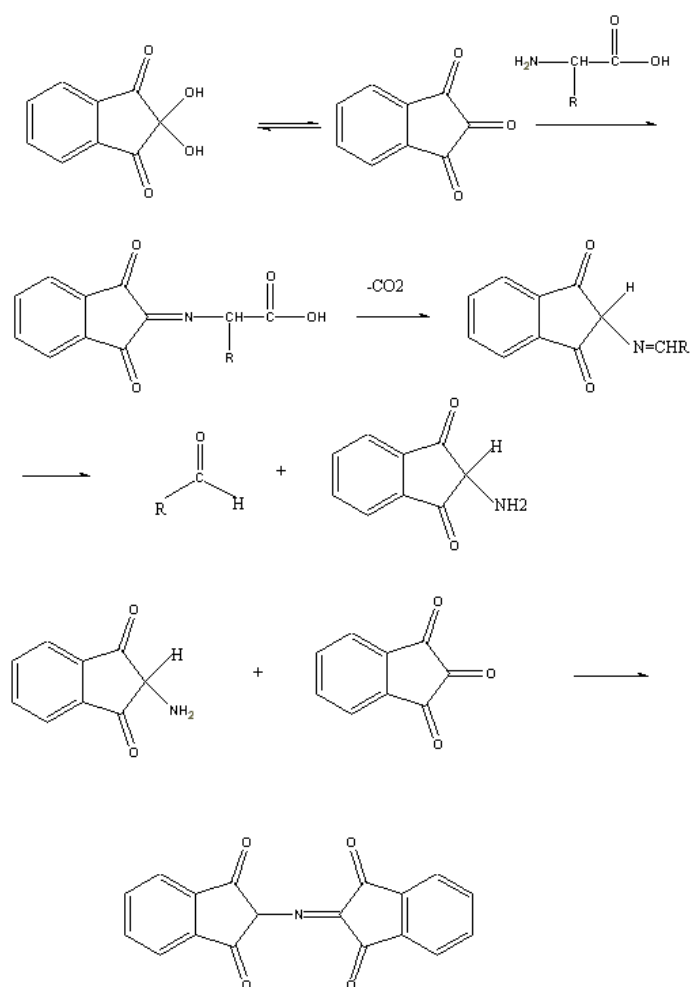


Fig. 49. Reazione tra la ninidrina e l' α -NH₂ di un amminoacido

Il prodotto altamente coniugato assorbe nella regione del visibile, ed ha un intenso colore viola (λ_{\max} 570). Questo colore è caratteristico per α -amminoacidi ed è usato per la loro determinazione.

- ❖ FASE DI ACETILAZIONE: Saturazione dei gruppi amminici che non hanno reagito durante la fase di accoppiamento, in modo da limitare la crescita di catene peptidiche aventi sequenze parziali rispetto al peptide da sintetizzare e rendere più semplice il processo di separazione dal peptide grezzo durante le fasi di purificazione.
- ❖ FASE DI DISTACCO E DEPROTEZIONE: Terminata la sintesi, il peptide viene distaccato dalla resina unitamente alla rimozione dei gruppi protettori presenti sulle catene laterali degli amminoacidi. Ciò viene realizzato, nel caso della sintesi con chimica Fmoc, trattando la peptidil-resina con TFA^[113] (Fig. 50). Alla soluzione acida vengono aggiunti opportuni *scavenger* per bloccare i radicali e i cationi liberatisi durante la reazione di deprotezione delle catene laterali. La scelta degli *scavenger* da utilizzare nella miscela di distacco dipende dalla natura chimica dei gruppi protettori sulle catene laterali dei vari amminoacidi.

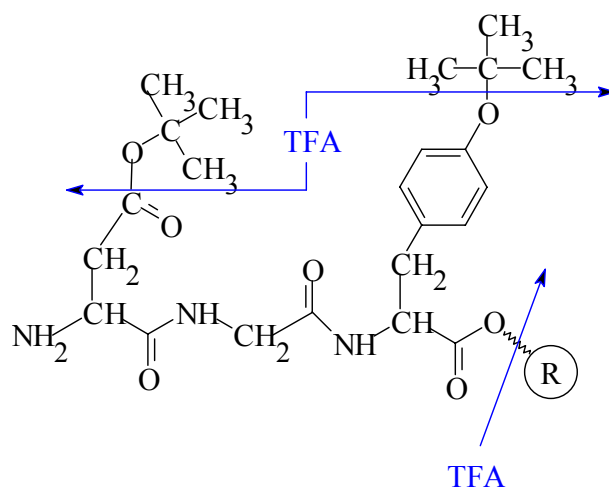


Fig. 50. Esempio di reazione di distacco e contemporanea deprotezione delle catene laterali di un peptide con TFA.

Dopo il distacco del peptide si procede alla purificazione e all'identificazione del prodotto ottenuto.

5.2. DICROISMO CIRCOLARE

Il dicroismo circolare è una tecnica spettroscopica diffusamente utilizzata per lo studio della natura e del contenuto di struttura secondaria di sistemi bioattivi.

Rispetto alle altre tecniche, il dicroismo circolare presenta il vantaggio di una rapida esecuzione e di una relativa facilità di interpretazione dei risultati ottenuti.

Il fenomeno alla base dell'effetto dicroico è la differenza di assorbimento tra la luce polarizzata circolarmente in senso orario e antiorario da parte di centri con sostituenti chirali oppure di cromofori chiralmente disposti nello spazio.

Nello studio di macromolecole biologiche il CD fornisce informazioni su:

- * contenuto di strutture secondarie;
- * transizioni conformazionali, indotte dalla complessazione con altre molecole o da parametri chimico-fisici come la temperatura;
- * proprietà di simmetria di piccole molecole cromoforiche in cui l'attività ottica viene indotta dall'interazione con macromolecole.

In particolare, volendo studiare la struttura secondaria di proteine e peptidi è conveniente sfruttare come cromofori i legami peptidici perché possiedono le seguenti proprietà:

- ✧ la loro disposizione nello spazio è chirale nel caso delle principali strutture secondarie;
- ✧ il numero di cromofori non dipende dalla composizione della sequenza peptidica, ma solo dalla sua lunghezza e dalle concentrazioni utilizzate;

✧ le diversità di disposizione spaziale secondo il tipo di struttura secondaria genera segnali ben distinti per strutture secondarie differenti.

La prima di queste proprietà è all'origine stessa del segnale di dicroismo circolare.^[114]

La seconda consente di confrontare tra loro gli spettri di dicroismo circolare (cioè il segnale di dicroismo in funzione della lunghezza d'onda utilizzata) di peptidi differenti ed è di fondamentale importanza nell'analisi quantitativa del contenuto di struttura secondaria. Disponendo, infatti, di spettri di riferimento adeguati per polipeptidi a struttura nota, è possibile operare la deconvoluzione di uno spettro di dicroismo circolare nelle sue componenti, stimando la percentuale delle varie strutture secondarie presenti in proteine e peptidi.

La terza proprietà è ugualmente importante nel permettere la deconvoluzione dello spettro perché, se i vari tipi di struttura secondaria dessero origine allo stesso spettro CD, non sarebbe ovviamente possibile con questo metodo discernere tra le varie componenti strutturali.

In particolare, il doppio minimo a 222 e 207 nm così come il massimo intorno a 190 nm sono parametri indicativi di una conformazione α -elicoidale^[115]. L'ellitticità ($[\theta]$) a 222 nm è il parametro più utilizzato per seguire la formazione di una struttura elicoidale. Calcoli teorici suggeriscono che questo valore è molto sensibile sia alla lunghezza che alla conformazione locale di ogni residuo.^[116] Sebbene il valore dell'ellitticità a 222 nm può essere correttamente utilizzato per stimare la percentuale di α -elica in proteine, non è strettamente corretto utilizzarlo per calcolare il contenuto di elica in piccoli peptidi. È stato riportato^[117] che per piccoli peptidi tre parametri spettrali sono significativi per valutare la propensione per una conformazione elicoidale:

- il rapporto fra il valore di $[\theta]$ a 222 nm ed il valore di $[\theta]$ del minimo a lunghezza d'onda minore ($[\theta]_{222}/[\theta]_{\min}$)
- la posizione del minimo a lunghezza d'onda minore (λ_{\min})
- la lunghezza d'onda del punto di *crossover* (λ_0).

In particolare un aumento del rapporto $[\theta]_{222}/[\theta]_{\min}$ verso l'unità insieme ad uno spostamento di λ_{\min} verso 207 nm e uno spostamento di λ_0 a valori di lunghezza d'onda maggiori sono parametri indicativi di un'alta propensione per una conformazione α -elicoidale.

Un esempio di spettro CD dell' α -elica nel lontano-UV è riportato in Fig. 51.

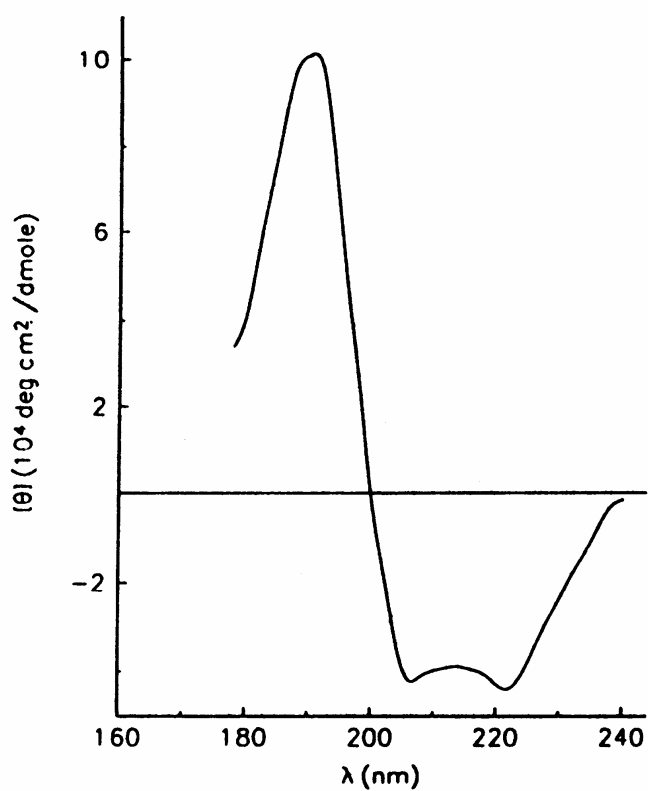


Fig. 51. Spettro CD di una struttura α -elica

ABBREVIAZIONI

Boc	Butossicarbonile
BSA	Albumina da siero bovino
CD	Dicroismo Circolare
cDNA	DNA (Acido deossiribonucleico) complementare
DCM	Diclorometano
DIPEA	Diisopropiletilenammina
DMAP	4-Dimetilamminopiridina
DMF	N, N-Dimetilformammide
DTNB	5,5'-Ditiobis-(2 acido nitrobenzoico)
EDT	Etanditiolo
ESI-MS	<i>Electrospray Ionization - Mass Spectrometry</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FAK kinase	<i>Focal Adhesion kinase</i>
FBS	<i>Precolostral Bovine Serum</i>
FITC	Fluoresceina Isotiocianato
Fmoc	9-Fluorenilmetossicarbonile

HATU	2-(1H-9-Azobenzotriazolo-1-yl)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato
HBSS	<i>Hanks balanced salt solution</i>
HBTU	2-(1H-Benzotriazolo-1-ile)-1,1,3,3-tetrametiluronio esafluorofosfato
hEGF	<i>human Epidermal Growth Factor</i>
hFGF-B	<i>human Fibroblast Growth Factor-Basic</i>
HEPES	N-(2-idrossietil) piperazina-N'-(Acido 2-etanol-sulfonico)
HOBt	N-Idrossibenzotriazolo
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight</i>
MAP kinase	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
Melm	N-metilimidazolo
MeOH	Metanolo
MSNT	1-(mesitilene-2-sulfonil)-3-nitro-1H-1,2,4-triazolo
Mtt	Metiltritile
NMP	N-metil-pirrolidone
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
OAll	O-allile
OtBu	O-t-Butile
Pbf	2,2,4,6,7-pentametil diidrobenzofuran-5 sulfonil
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PyBop	Esafluorofosfato di (benzotriazolil)-N- Ossitripirrolidiniofosfonio
PIGF	<i>Placenta Growth Factor</i>
RP-HPLC	<i>Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography</i>

StBu	tio-tButile
TBTU	2-(1H-Benzotriazolo-1-ile)-1,1,3,3-tetrametiluronio tetrafluoroborato
tBu	t-Butile
TIS	triisopropilsilano
TFA	acido trifluoroacetico
Trt	Tritile
UV-Vis	Spettroscopia UltraVioletta-Visibile

BIBLIOGRAFIA

- [1] B.A. Chabner, Clinical strategies for cancer treatment: the role of drugs 1990, 1-15.
- [2] M.M. Gottesman, Cancer Res. 1993, 53, 747-754.
- [3] J. Folkman, N. Engl. J. Med. 1971, 285, 1182-1186.
- [4] S.M. Hyder, G.M. Stancel, Mol. Endocrinol. 1999, 13, 806-811.
- [5] J. Folkman, Nat. Med. 1995, 1, 27-31.
- [6] R.S. Kerbel, Carcinogenesis 2000, 21, 505-515.
- [7] P. Carmeliet, Nature 1999, 401, 657-658.
- [8] J.W. Baish, R.K. Jain, Cancer Res. 2000, 60, 3683-3688.
- [9] G. Helmlinger, F. Yuan, M. Dellian, R.K. Jain, Nature Med. 1997, 3, 177-182.
- [10] L.E. Benjamin, D. Golijanin, A. Itin, D. Pode, E. Keshet, J. Clin. Invest. 1999, 103, 159-165.
- [11] R. Kerbel, J. Folkman, Nature Rev. Cancer 2002, 2, 727-739.
- [12] P.E. Thorpe, F.J. Burrows, Breast Cancer Res. Treat. 1995, 36, 237-251.
- [13] F.G. Giancotti, E. Ruoslahti, Science 1999, 285, 1028-1032.
- [14] B.P. Eliceiri, D.A. Cheresh, J. Clin. Invest. 1999, 103, 1227-1230.

- [15] P.C. Brooks, R.A. Clark, D.A. Cheresch, *Science* 1994, 264, 569-571.
- [16] D.D. Schlaepfer, C.R. Hauck, D.J. Sieg, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 1999, 71, 435-478.
- [17] D.G. Stupack, X.S. Puente, S. Boutsaboualoy, C.M. Storgard, D.A. Cheresch, *J. Cell. Biol.* 2001, 155, 459-470.
- [18] M.D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *Nature* 1984, 309, 30-33.
- [19] M.D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984, 81, 5985-5988.
- [20] A. Hautanen, J. Gailit, D.M. Mann, E. Ruoslahti, *J. Biol. Chem.* 1989, 264, 1437-1442.
- [21] W.H. Miller, R.M. Keenan, R.N. Willette, M.W. Lark, *Drug Discovery Today* 2000, 5(9), 397-408.
- [22] J.J. Marugàn, C. Manthey, B. Anaclerio, L. Lafrance, T. Lu, T. Markotan, K.A. Leonard, C. Crysler, S. Eisennagel, M. Dasgupta, B. Tomczuk, *J. Med. Chem.* 2005, 48, 926-934.
- [23] S.L. Goodman, G. Hölzemann, G.A.G. Sulyok, H. Kessler, *J. Med. Chem.* 2002, 45, 1045-1051.
- [24] R. Haubner, R. Gratias, B. Diefenbach, S.L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 7461-7472.
- [25] F. Mitjans, T. Meyer, C. Fittschen, S. Goodman, A. Jonczyk, J.F. Marshall, G. Reyes, J. Piulats, *Int. J. Cancer*, 2000, 87(5), 716-723.
- [26] K. Urbahns, M. Härter, M. Albers, D. Schmidt, B. Stelte-Ludwig, U. Brüggemeier, A. Vaupel, C. Gerdes, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2002, 12, 205-208.

- [27] G.A.G. Sulyok, C. Gibson, S.L. Goodman, G. Hölzemann, M. Wiesner, H. Kessler, *J. Med. Chem.* 2001, 44, 1938-1950.
- [28] L. Belvisi, A. Bernardi, A. Checchia, L. Manzoni, D. Potenza, C. Scolastico, M. Castorina, A. Cupelli, G. Giannini, P. Carminati, C. Pisano, *Org. Chem.* 2001, 3(7), 1001-1004.
- [29] J.A. Posey, M.B. Khazaeli, A. Del Grosso, M.N. Saleh, C.Y. Lin, W. Huse, A.F. LoBuglio., *Cancer Biother. Radiopharmacol.* 2001, 16, 125-132.
- [30] F.A.L.M. Eskens, H. Dumez, R. Hoekstra, A. Perschl, C. Brindley, S. Böttcher, W. Wynendaele, J. Drevs, J. Verweij, A.T. van Oosterom, *Eur. J. Cancer* 2003, 39, 917-926.
- [31] C.C. Kumar, M. Malkowski, Z. Yin, E. Tanghetti, B. Yaremko, T. Nechuta, J. Varner, M. Liu, E.M. Smith, B. Neustadt, M. Presta, L. Armstrong, *Cancer Res.* 2001, 61, 2232-2238.
- [32] M.A. Dechantsreiter, E. Planker, B. Mathä , E. Lohof, G. Hölzemann, A. Jonczyk, S.L. Goodman, H. Kessler, *J. Med. Chem.* 1999, 42, 3033-3040.
- [33] P.J. Coleman, K.M. Brashear, B.C. Askew, J.H. Hutchinson, C.A. McVean, L.T. Duong, B.P. Feuston, C. Fernandez-Metzler, M.A. Gentile, G.D. Hartman, D.B. Kimmel, C.T. Leu, L. Lipfert, K. Merkle, B. Pennypacker, T. Prueksaritanont, G.A. Rodan, G.A. Wesolowski, S.B. Rodan, M.E. Duggan, *J. Med. Chem.* 2004, 47, 4829-4837.
- [34] R.H. Haubner, H.J. Wester, W.A. Weber, M. Schwaiger, *J. Nucl. Med.* 2003, 47, 189-199.
- [35] R. Haubner, H.J. Wester, *Curr. Pharm. Des.* 2004, 10, 1439-1455.
- [36] X. Chen, R. Park, A.H. Shahinian, J.R. Bading, P.S. Conti, *Nucl. Med. Biol.* 2004, 31, 11-19.

- [37] X. Chen, R. Park, M. Tohme, A.H. Shahinian, J.R. Bading, P.S. Conti, *Bioconj. Chem.* 2004, 15, 41-49.
- [38] R. Haubner, H.J. Wester, W.A. Weber, C. Mang, S.I. Ziegler, S.L. Goodman, R. Senekowitsch-Schmidtke, H. Kessler, M. Schwaiger, *Cancer Res.* 61, 2001, 1781-1785.
- [39] R. Haubner, B. Kuhnast, C. Mang, W.A. Weber, H. Kessler, H.J. Wester, M. Schwaiger, *Bioconj. Chem.* 2004, 15, 61-69.
- [40] R. Haubner, W.A. Weber, A.J. Beer, E. Vabulienė, D. Reim, M. Sarbia, K.F. Becker, M. Goebel, R. Hein, H.J. Wester, H. Kessler, M. Schwaiger, *PLoS Med.* 2005, 2(3), 244-252.
- [41] X. Chen, R. Park, A.H. Shahinian, M. Tohme, V. Khankaldyian, M.H. Bozorgzadeh, J.R. Bading, R. Moats, W.E. Laug, P.S. Conti, *Nucl. Med. Biol.* 2004, 31, 179-189.
- [42] R.J. Gould, M.A. Polokoff, P.A. Friedman, T.F. Huang, J.C. Holt, J.J. Cook, S. Niewiarowski, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1990, 195, 168-171.
- [43] Z.R. Gan, R.J. Gould, J.W. Jacobs, P.A. Friedman, M.A. Polokoff, *J. Biol. Chem.* 1988, 263, 19827-19832.
- [44] C.C. Kumar, H. Nie, C. Prorock Rogers, M. Malkowski, E. Maxwell, J.J. Catino, L. Armstrong, *J. Pharmacol. Experim. Ther.* 1997, 283, 843-853.
- [45] M.A. McLane, S. Vijay-Kumar, C. Marcinkiewicz, J.J. Calvete, S. Niewiarowski, *FEBS Lett.* 1996, 391, 139-143.
- [46] C. Marcinkiewicz, S. Vijay-Kumar, M.A. McLane, S. Niewiarowski, *Blood* 1997, 90(4), 1565-1575.
- [47] V. Saudek, R.A. Atkinson, J.T. Pelion, *Biochemistry* 1991, 30, 7369-7372.

- [48] L. Scheibler, D.F. Mierke, G. Bitan, M. Rosenblatt, M. Chorev, *Biochemistry* 2001, 40, 15117-15126.
- [49] D. Yahalom, A. Wittelsberger, D.F. Mierke, M. Rosenblatt, J.M. Alexander, M. Chorev, *Biochemistry* 2002, 41, 8321-8331.
- [50] R.A. Atkinson, V. Saudek, J.T. Pelton, *Int. J. Pep. Prot. Res.* 1994, 43, 563-572.
- [51] J.P. Xiong, T. Stehle, B. Diefenbach, R. Zhang, R. Dunker, D.L. Scott, A. Joachimiak, S.L. Goodman, M.A. Arnaout, *Science* 2001, 294, 339-345.
- [52] J.P. Xiong, T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S.L. Goodman, M.A. Arnaout, *Science* 2002, 296, 151-155.
- [53] K.E. Gottschalk, R. Günther, H. Kessler, *Chem. Bio. Chem.* 2002, 5, 470-473.
- [54] N. Ferrara, W.J. Henzel, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1989, 161, 851-858.
- [55] K.A. Houck, N. Ferrara, J. Winer, G. Cachianes, B. Li, D.W. Leung, *Mol. Endocrinol.* 1991, 5(12), 1806-1814.
- [56] E. Tischer, R. Mitchell, T. Hartman, M. Silva, D. Gospodarowicz, C.J. Fiddes, J.A. Abraham, *J. Biol. Chem.* 1991, 266(18), 11947-11954.
- [57] K.A. Houck, D.W. Leung, A.M. Rowland, J. Winer, N. Ferrara, *J. Biol. Chem.* 1992, 267, 26031-26037.
- [58] N. Ferrara, *Curr. Opin. Biotech.* 2000, 11, 617-624.
- [59] T. Veikkola, M. Karkkainen, L. Claesson-Welsh, K. Alitalo, *Cancer Res.* 2000, 60, 203-212.
- [60] N. Ferrara, H.P. Gerber, J. LeCouter, *Nat. Med.* 2003, 9, 669-676.

- [61] C. deVries, J.A. Escobedo, H. Ueno, K.A. Houck, N. Ferrara, L.T. Williams, *Science* 1992, 255, 989-991.
- [62] B.I. Terman, M.D. Vermazen, M.E. Carrion, D. Dimitrov, D.C. Armellino, D. Gospodarowicz, P. Bohlen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992, 34, 1578-1586.
- [63] B. Li, G. Fuh, G. Meng, X. Xin, M.E. Gerritsen, B. Cunningham, A.M. de Vos, *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 29823-29828.
- [64] D.T. Shima, A.P. Adamis, N. Ferrara, K.T. Yeo, T.K. Yeo, M. Allende, J. Folkman, P.A. D'Amore, *Mol. Med.* 1995, 2, 64-71.
- [65] S. Frank, G. Haubner, G. Breier, M.T. Longaker, D.G. Greenhalgh, S. Werner, *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 12607-12613.
- [66] K.P. Claffey, W.O. Wilkinson, B.M. Spiegelman, *J. Biol. Chem.* 1992, 267, 16317-16322.
- [67] N. Ferrara, K. Altalo, *Nat. Med.* 1999, 5, 1359-1364.
- [68] Y.A. Muller, H.W. Christinger, B.A. Keyt, A.M. de Vos, *Structure* 1997, 5, 1325-1338.
- [69] Y.A. Muller, B.Li, H.W. Christinger, J.A. Wells, B.C. Cunningham, A.M. de Vos, *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* 1997, 94, 7192-7197.
- [70] Y.A. Muller, Y. Chen, H.W. Christinger, B. Li, B.C. Cunningham, H.B. Lowman, A.M. de Vos, *Structure* 1998, 6, 1153-1167.
- [71] N. Ferrara, T. Davis-Smyth, *Endocrine Rev.* 1997, 18, 4-25.
- [72] C. Wiesman, G. Fuh, H.W. Christinger, C. Eigenbrot, A.J. Wells, A.M. de Vos, *Cell* 1997, 91, 695-704.
- [73] S.P. Cooke, G.M. Boxer, L. Lawrence, R.B. Pedley, D.I. Spencer, R.H.J. Begent, K.A. Chester, *Cancer Res.* 2001, 61, 3653-3659.

- [74] G. Presta, H. Chen, S.J. O' Connor, V. Chishom, Y.G. Meng, L. Krummen, M. Winkler, N. Ferrara, *Cancer Res.* 1997, 57, 4593-4599.
- [75] M. Prewett, J. Huber, Y. Li, A. Santiago, W. O' Connor, K. King, J. Overholser, A. Hooper, B. Pytowski, L. Witte, *Cancer Res.* 1999, 59, 5209-5218.
- [76] W.J. Fairbrother, H.W. Christinger, A.G. Cochran, G. Fuh, C.J. Keenan, C. Quan, S.K. Shriver, J.Y.K. Tom, J.A. Welles, B.C. Cunningham, *Biochemistry* 1998, 37, 17754-17764.
- [77] C. Wiesman, H.W. Christinger, A.G. Cochran, B.C. Cunningham, W.J. Fairbrother, C.J. Keenan, G. Meng, A.M. de Vos, *Biochemistry* 1998, 37, 17765-17772.
- [78] T. Asai, M. Nagatsuka, K. Kuromi, S. Yamakawa, K. Kurohane, K. Ogino, M. Tanaka, T. Taki, N. Oku, *FEBS Lett.* 2002, 510, 206-210.
- [79] R. Binétruy-Tournaire, C. Demangel, B. Malavaud, R. Vassy, S. Rouyre, M. Kraemer, J. Plouet, C. Derbin, G. Perret, J.C. Mazié, *EMBO J.* 2000, 19, 1525-1533.
- [80] L. Hetian, A. Ping, S. Shumei, L. Xiaoying, H. Luowen, W. Jian, M. Lin, L. Meisheng, Y. Junshan, S. Chengchao, *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 43137-43142.
- [81] A. Ping, L. Hetian, J. Zhang, S. Song, H. Luowen, J. Genglin, L. Xiaoying, W. Jian, M. Lin, L. Meisheng, S. Chengchao, *Int. J. Cancer* 2004, 111, 165-173.
- [82] L.M. Strawn, G. McMahon, H. App, R. Schreck, W.R. Kuchler, M.P. Longhi, T.H. Hui, C. Tang, A. Levitzki, A. Gazit, I. Chen, G. Keri, L. Orfi, W.

- Risau, I. Flamme, A. Ullrich, K.P. Hirth, L.K. Shawver, *Cancer Res.* 1996, 56, 3540-3545.
- [83] S.R. Wedge, D.J. Ogilvie, M. Dukes, J. Kendrew, J.O. Curwen, L.F. Hennequin, A.P. Thomas, *Cancer Res.* 2000, 60, 970-975.
- [84] J.M. Wood, G. Bold, E. Buchdunger, R. Cozens, S. Ferrari, J. Frei, F. Hofman, *Cancer Res.* 2000, 60, 2178-2189.
- [85] D.W. Fitzgerald, J.E. Coleman, *Biochemistry* 1991, 30, 5195-5201.
- [86] N. Sreerama, R.W. Woody, *Anal. Biochem.* 2000, 287, 252-260.
- [87] A.T. Hagler, S. Lifson, P. Dauber, *J. Am. Chem. Soc.* 1979, 101, 5122-5130.
- [88] A.T. Hagler, P. Dauber, S. Lifson, *J. Am. Chem. Soc.* 1979, 101, 5131-5141.
- [89] A.T. Hagler, P.S. Stern, R. Sharon, J.M. Becker, F. Naider, *J. Am. Chem. Soc.* 1979, 101, 6842-6852.
- [90] K. Barlos, O. Chatzi, D. Gatos, G. Stavropoulos, *Int. J. Pept. Prot. Res.* 1991, 37, 513-520.
- [91] C. Chang, A.M. Felix, M.H. Jimenez, J. Meienhofer, *Int. J. Pept. Prot. Res.* 1980, 15, 485-494.
- [92] F. Chiaradonna, L. Fontana, C. Iavarone, M.V. Carriero, G. Scholz, M.V. Barone, M.P. Stoppelli, *Embo J.* 1999, 18, 3013-3023.
- [93] A.J. Reynolds, I.A. Hendry, *Brain Res. Prot.* 1999, 3, 308-312.
- [94] W.F. De Grado, C.M. Summa, V. Pavone, F. Nastri, A. Lombardi, *Annu. Rev. Biochem.* 1999, 68, 779-819.
- [95] R. Parthasarathy, S. Chaturvedi, K. Go, *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 1996, 64, 1-54.

- [96] R. Aurora, T.P. Creamer, R. Scrivivasan, G.D. Rose, *Prot. Sci.* 1998, 7, 21-38.
- [97] C. Schellman, *Protein Folding*, Elsevier New York, 53-61.
- [98] D.A. Greenberg, K. Jin, *Trends Mol. Med.* 2004, 10, 1-3.
- [99] I. Nicoletti, G. Migliorati, M.C. Pagliacci, F. Grignani, C. Riccardi, *J. Immunol. Methods* 1991, 139, 271-9.
- [100] A. Yilmaz, S. Kliche, U. Mayr-Beyrle, G. Fellbrich, J. Waltenberger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003, 306, 730-736.
- [101] J.M. Adams, *Genes. Dev.* 2003, 20, 2481-95.
- [102] B. Merrifield *Science* 1986, 232, 341.
- [103] B.W. Erickson, R.B. Merrielfield, *The proteins 3-rd edn.*, Academic Press. New York 1976, 2, 255.
- [104] E. Gross, J. Meienhofer, *The Peptides: Analysis, Synthesis and Biology*, Academic Press 1981, 3.
- [105] G.B. Fields, R.L. Noble, *Int. J. Pept. Prot. Res.* 1990, 35, 161-214.
- [106] E. Atherton, R.C. Sheppard, IRL Press, Oxford, England. 1989.
- [107] L.A. Carpino, G.Y. Han, *J. Org. Chem.* 1972, 37, 3404.
- [108] L.A. Carpino, G.Y. Han, *J. Org. Chem.* 1970, 92, 5748-5749.
- [109] W. Konig, R. Geiger, *Chem. Berichte*, 1973, 106, 3626-3635.
- [110] D. Le Nguyen, A. Heitz, B. Castro, *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* 1987, 1915-1919.
- [111] E. Kaiser, R.L. Colescott, C.D. Bossinger, P.I. Cook, *Anal. Biochem.* 1970, 34, 595.

- [112] P.D. Bailey, *An Introduction to Peptide Chemistry*, Wiley J. and Sons, New York, 1990.
- [113] C.D. Chang, J. Meienhofer, *Intl. J. Pept. Prot. Res.* 1978, 11, 246-246.
- [114] A.J. Adler, N.J. Greenfield, *Meth. Enzimology* 1973, 27, 675-735.
- [115] G.D. Fasman (Ed.), *Plenum Press* 1996, New York, USA.
- [116] M.C. Manning, R.W. Woody, *Biopolymers* 1991, 31, 569-586.
- [117] S. Vuilleumier, M. Mutter, *Biopolymers* 1993, 33, 389-400.

APPENDICE

PhD THESIS SUMMARY

LAVORI SOTTOMESSI:

- ❖ Novel and Selective $\alpha_v\beta_3$ Receptor Peptide Antagonist: Design, Synthesis and Biological Behaviour
- ❖ Peptide-based molecules in angiogenesis

DEVELOPMENT OF NEW MOLECULES ABLE TO MODULATE ACTIVITY OF MOLECULAR SYSTEMS INVOLVED IN THE ANGIOGENESIS

Angiogenesis is a physiological process which implicates a complex pathway of sequential events that lead to new vessels formation starting from a pre-existing blood vessel. This process is active during embryonic development, while during adult life vascular system is normally in a quiescent state and new vessels generation is limited to particular physiological phenomena, in each of which angiogenic process is finely regulated by pro- and anti-angiogenic factors. Yet it may turn on into pathological in presence of particular stimulus induced by tumor cells through the release of pro-angiogenic factors, such as VEGF, that spread into near tissues and bind to endothelial cells (EC) receptors of pre-existing blood vessels, leading to their activation and proliferation.^[1]

Interaction between tumor and endothelial cells leads to secretion and activation of various proteolytic factors, such as MMP, able to degrade the basal membrane and the extracellular matrix (ECM); this degradation allows to activated cells to migrate towards the tumor by generating new vessels through the recognition and interaction of specific receptors, like integrins $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_{IIb}\beta_3$, with different ligands released by ECM.

Several clinical studies have proved that angiogenesis is an essential process for the growth of solid tumor and that the suppression of even only one of its phases inhibits new vessels formation, thus affecting tumor growth and metastasis generation.^[2]

Starting from these data the aim of the present work is the design, synthesis and characterization of new peptidic or peptidomimetic molecules able to modulate activity of molecular systems involved in the angiogenic process.

Two systems that are the most important and known in the field of regulation of pathological angiogenesis have been selected: the receptor for matrix protein integrin $\alpha_v\beta_3$ and the vascular endothelial growth factor VEGF.

Integrin $\alpha_v\beta_3$ is a heterodimeric transmembrane glycoprotein consisted of non-covalently bound α - and β -subunits. This integrin belongs to a large family of cellular adhesion receptors made of different α - and β -subunits which can form more than 20 different heterodimeric combinations^[3] most of which interact with specific ECM ligands that present RGD recognition sequence. In particular it was shown that integrin $\alpha_v\beta_3$ together with $\alpha_v\beta_5$, both normally present in few copy on cellular surface, are overexpressed in presence of neoplastic pathology by endothelial and tumor cells surface, acting as “angiogenic markers”.^[4]

After binding to specific ECM ligands, integrins $\alpha_v\beta_3$ form molecular clusters and activate one or more pathway of sequential intracellular events that control migration, proliferation and differentiation processes.^[4] Several clinical studies indicate that antagonists able to prevent this bond induce apoptosis and block angiogenic process.^[5] Among these echistatin, one of the smallest protein (49 residues) of the viper (*Echis carinatus*) disintegrins, has shown to be the most potent inhibitor of integrin $\alpha_v\beta_3$ ^[6]. As all integrin $\alpha_v\beta_3$ ligands, echistatin presents RGD recognition motif and structural^[7] and mutagenesis^[8] studies proved that RGD loop structure, its flanking sequences and C-terminal residues are essential for receptor affinity and selective recognition.

The crystal structures of the extracellular segment of integrin $\alpha_v\beta_3$ in its unligated state^[9] and in complex with cyclo(RGDf-NMeV)^[10] (f= D-Phe), the smallest synthetic molecule able to inhibit natural ligands binding to integrin $\alpha_v\beta_3$, are actually known. These show that the main interactions are between the positively charged arginine and the α subunit and between the anionic aspartic acid and the β subunit, and that selectivity between different subunits is achieved by the RGD sequence conformation.

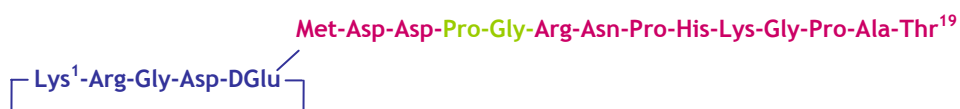
Starting from these literature data it was performed the design a bifunctional molecule based on cyclo(RGDf-NMeV) model, in order to ensure binding affinity, and on echistatin one, in order to increase selectivity towards integrin $\alpha_v\beta_3$.

To this aim docking studies have been carried out by superimposing RGD motif of echistatin structure onto the RGD sequence of cyclo(RGDf-NMeV) in complex with integrin and evaluating the orientation of the other echistatin residues with respect integrin receptor. The conformational and structural features of the obtained model showed, in particular, that the C-terminal moiety (Arg⁴¹-Thr⁴⁹)

and the Met²⁸-Asp³⁰ sequence interact mainly with the β_3 subunit, in good agreement with literature data.^[8,11]

On the base of this result a cyclic peptide with sequence RGDeK (e= D-Glu) has been synthesized and linked to Met²⁸-Asp³⁰ sequence and to the C-terminal moiety (Arg⁴¹-Thr⁴⁹) of echistatin by the Pro-Gly dipeptide in order to further stabilize the relative orientation of the two peptidic sequence in the model. Moreover, the D-Phe residue of cyclo(RGDf-NMeV) was replaced with a D-Glu residue and the γ CO carboxyl of Glu group was covalently linked via an amide bond with the α NH of the Met²⁸. Finally, the NMeVal residue was substituted with a Lys residue in order to further label the peptide for the tumor imaging studies and therapy. Modelling studies were performed using drug design techniques with the support of molecular graphic and energy minimization programs.

The obtained final sequence of designed molecule, named RGDechi, is following schematized:



RGDechi peptide was synthesized on an ABI433A automated peptide synthesizer using Fmoc solid-phase strategy and Novasyn TGA resin. Each synthetic cycle consisted in:

- ❖ Fmoc deprotection of amino acid N-terminal with 30% piperidine in DMF
- ❖ Double coupling under a fourfold excess of amino acid using 0.45M HBTU (4 eq)/0.45M HOBt (4 eq)/2M DIPEA (8 eq) in DMF
- ❖ Capping with a solution of 0.5M acetic anhydride/0.015 M HOBt/0.125M DIPEA in DMF.

At the end of the synthesis, before Fmoc deprotecting of the last amino acid residue (Lys¹), selective C ^{α} -carboxyl group deprotection of D-Glu⁵ residue from allyl group was carried out by treatment of the peptidil-resin with PhSiH₃ (24 eq)/Pd(PPh₃)₄ (0.25 eq) in DCM. Finally, cyclization between α NH of Lys¹ and C ^{α} -carboxyl group of D-Glu⁵ was performed with PyBop (1.5 eq) /HOBt (1.5 eq) /DIEA (2 eq) in DMF.

The peptide was cleaved from the resin and deprotected using a mixture of TFA/H₂O/EDT/TIS (94:2.5:2.5:1 v/v/v/v). The resin was then filtered and RGDechi peptide was precipitated using ethyl ether and purified by preparative RP-HPLC. Peptide purity was confirmed by analytical RP-HPLC and the identity by mass spectrometry ESI-MS, giving 24% of yield.

In order to evaluate the activity of the bifunctional molecule RGDechi, three analogs RGDeL, Echi14 and Echi9 were synthesized following the same synthetic approach. Echi14 and Echi9 encompass respectively the last 14 and 9 amino acids of the RGDechi sequence, and RGDeL corresponds to the linear precursor of RGDechi.

All synthesized peptides were tested for their ability to inhibit cell adhesion to vitronectin. Human erythroleukemia K562 cells overexpressing $\alpha_v\beta_3$ (K $\alpha_v\beta_3$) were incubated with increasing concentration of the tested peptide and then allowed to adhere to vitronectin-coated plates. Both cyclo(RGDfV), a cyclo(RGDf-NMeV) analog, and RGDechi were able to inhibit adhesion of K $\alpha_v\beta_3$ cells to vitronectin. The IC₅₀ value for cyclo(RGDfV) was 0.68 μ M whereas the IC₅₀ of RGDechi was 0.88 μ M. Then, RGDechi analogs were tested for their ability to inhibit K $\alpha_v\beta_3$ cell adhesion. Incubation with Echi9, Echi14 and RGDeL peptides failed to inhibit cell adhesion which remained respectively 97.5%, 99%, and 89.5 % as compared to untreated control cells. These results showed that not only RGD motif is essential for receptor binding but also its conformation determined by the presence of the cyclic structure.

Finally to test the binding selectivity of the novel peptide with respect integrin $\alpha_v\beta_3$, adhesion assay on $\alpha_v\beta_5$ overexpressing cells (K $\alpha_v\beta_5$) were carried out. The obtained data showed that cyclo(RGDfV) was able to efficiently inhibit adhesion of cells to vitronectin, while RGDechi did not show any significant inhibitory effect on K $\alpha_v\beta_5$ cell adhesion indicating lack of cross-reactivity with $\alpha_v\beta_5$.

In conclusion, obtained results indicate that the new chimeric peptide designed, RGDechi, is a novel and selective ligand for $\alpha_v\beta_3$ integrin and that it may represent the lead compound for the development of novel anticancer drugs and/or new class of diagnostic non-invasive tracers as suitable tools for $\alpha_v\beta_3$ -targeted therapy and imaging.

VEGF is a potent angiogenic factor, a mitogen specific for vascular EC playing a major role in angiogenesis. It has been shown that both VEGF and its receptors are overexpressed in pathological angiogenesis, making this system a potential target for therapeutic and diagnostic applications.^[12,13]

VEGF is a homodimeric protein belonging to the cystine knot growth factors family. It is encoded by a single gene that is expressed in four different isoforms (VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ and VEGF₂₀₅) due to different splicing events. VEGF₁₆₅, the most abundant isoform, is a 45KD glycoprotein and it binds to heparin with high affinity. The biological function of VEGF is mediated through binding to two tyrosine kinases receptors, the kinase domain receptor (KDR, Flk-1 or VEGFR-2) and the Fms-like tyrosine kinase (Flt-1 or VEGFR-1)^[14] both localized on the cell surface of various EC types.^[13] VEGF induces receptors dimerization which stimulates EC mitogenesis. Increased expression of KDR and Flt-1 receptor occurs in response to several stimulations and results in priming of EC toward cell proliferation, migration and angiogenesis.^[15]

Several VEGF structures have been reported. In particular crystal structure of VEGF in complex with domain 2 of the extracellular region of Flt-1 receptor (Flt-1_{D2}), the major responsible for the specific recognition, indicates that VEGF is an antiparallel homodimer, covalently linked through two disulfide bridges.^[16] The analysis of structural and mutagenesis data allowed to identify residues involved in the binding to the receptors. These are distributed over a discontinuous surface which includes residues from the N-terminal helix (17-25), the loop connecting strand B3 to B4 (61-66) and strand B7 (103-106) of one monomer, as well as residues from strand B2 (46-48) and from strand B5 and B6 together with the connecting turn (79-91) of the other monomer. Among these regions the attention has been focused on the α -helical region (17-25) and its interaction with VEGF receptor has been studied with the aim to develop a new class of small peptidic and/or peptidomimetic molecules able to recognize VEGF receptors modulating angiogenic response.

The followed approach has consisted in designing peptides able to reproduce the structural characteristics of α -helical region preserving the residues essential for receptor binding.

On the base of the requisites that confer stability to an α -helix, the main

changes have been: insertion of N- and C-capping motifs at the ends, use of residues with strong propensity for helical conformation, elimination of unfavourable interaction of helix dipole with the charges present at the two ends by acetylating of N-terminal aminic group and by amidation of C-terminal carboxylic group.

Seven peptidic sequences thus have been designed and synthesized including the natural fragment from VEGF protein (residues 15-28) named VEGF15. All sequences are following reported (residues responsible for receptor interaction are in red, mutated residues in bleu):

	15	20	25	
VEGF15	Ac-K V K	F M D V	Y Q R S	Y C H P-NH ₂
FMK	Ac-K L T	F M E L	Y Q L K	Y K G I-NH ₂
MA	Ac-K L T	W M E L	Y Q L A	Y K G I-NH ₂
KA	Ac-K L T	W K E L	Y Q L A	Y K G I-NH ₂
MK	Ac-K L T	W M E L	Y Q L K	Y K G I-NH ₂
QA	Ac-K L T	W Q E L	Y Q L A	Y K G I-NH ₂
KK	Ac-K L T	W K E L	Y Q L K	Y K G I-NH ₂
QK	Ac-K L T	W Q E L	Y Q L K	Y K G I-NH ₂

All peptides were synthesized by Fmoc strategy on an ADVANCED CHEMTECH 348 Ω automated peptide synthesizer using a Rink-Amide MBHA resin that leaves C-terminal end in the amidic form. Each synthetic cycle was performed as described:

- ❖ Fmoc deprotection of amino acid N-terminal with 30% piperidine in DMF
- ❖ Double coupling under a fourfold excess of amino acid using 0.45M TBTU (4 eq)/0.45M HOBt (4 eq)/2M DIPEA (8 eq) in DMF
- ❖ Capping with a solution of acetic anhydride/HOBt/DIEA/DMF (4.7:4:91.3 v/v/v)

At the end of the synthesis all peptides were cleaved from the resin and deprotected using a mixture of TFA/H₂O/EDT/TIS (94:2.5:2.5:1 v/v/v/v). The resins were then filtered and peptides were precipitated using ethyl ether and purified by preparative RP-HPLC. Peptides purity was confirmed by analytical

RP-HPLC and their identity by mass spectrometry MALDI-TOF, giving all products in good yield.

Since it is known from literature data^[17] that one of the main biological functions of VEGF is apoptosis inhibition in the EC, in order to test the ability of designed peptides to antagonize this biological activity, apoptosis assays in HUVEC cells were performed. In particular, fluorimetric analysis of caspase 3 activity, enzyme specific of apoptotic process, was carried out.^[18] The assays indicated, in good agreement with literature data,^[19] that VEGF was able to inhibit about 40% caspase 3 activity. Subsequently, each peptide was tested for its capacity to inhibit the function of rescue from apoptosis that VEGF effects on HUVEC cells in starvation. Obtained results indicated that two of the six designed peptides, MA and MK, were able to inhibit more than 80% VEGF activity. Furthermore for MA peptide the dose- time- dependence of antagonist effect and binding assay by FACS technique were performed. Binding tests indicated that MA was able to bind VEGF receptors expressed on cell surface in a specific way competing with VEGF binding.

In conclusion it has been possible to stabilize a natural peptidic sequence in the attended conformation using small peptides (15 amino acids) that have a potential application in tumor cells targeting and therapy. These peptides, working as antagonists of natural protein, may be used opportunely functionalized as biospecific probe for the selective recognition of VEGF receptors overexpressed in pathological angiogenesis.

- [1] P. Carmeliet, *Nature Med.* 2003, 9, 653-660.
- [2] P.E. Thorpe, F.J. Burrows, *Breast Cancer Res. Treat.* 1995, 36, 237-251.
- [3] F.G. Giancotti, E. Ruoslahti, *Science* 1999, 285, 1028-1032.
- [4] P.C. Brooks, R.A. Clark, D.A. Cheresh, *Science* 1994, 264, 569-571.
- [5] D.D. Schlaepfer, C.R. Hauck, D.J. Sieg, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 1999, 71, 435-478.
- [6] R.J. Gould, M.A. Polokoff, P.A. Friedman, T.F. Huang, J.C. Holt, J.J Cook, S. Niewiarowski, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1990, 195, 168-171.
- [7] M.A. McLane, S. Vijay-Kumar, C. Marcinkiewicz, J.J. Calvete, S. Niewiarowski, *FEBS Lett.* 1996, 391, 139-143.
- [8] V. Saudek, R.A. Atkinson, J.T. Pelion, *Biochemistry* 1991, 30, 7369-7372.
- [9] J.P. Xiong, T. Stehle, B. Diefenbach, R. Zhang, R. Dunker, D.L. Scott, A. Joachimiak, S.L. Goodman, M.A. Arnaout, *Science* 2001, 294, 339-345.
- [10] J.P. Xiong, T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S.L. Goodman, M.A. Arnaout, *Science* 2002, 296, 151-155.
- [11] D. Yahalom, A. Wittelsberger, D.F. Mierke, M. Rosenblatt, J.M. Alexander, M. Chorev, *Biochemistry* 2002, 41, 8321-8331.
- [12] N. Ferrara, *Curr Opin Biotechnol* 2000, 11, 617-624.
- [13] N. Ferrara, H.P. Gerber, J. LeCouter, *Nat. Med.* 2003, 9, 669-676.
- [14] N. Ferrara, T. Davis-Smyth, *Endocr. Rev.* 1997, 18, 4-25.
- [15] H. Abedi, I. Zachary, *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 15442-15451.
- [16] C. Wiesmann, G. Fuh, H.W. Christinger, C. Eigenbrot, J.A. Wells, A.M. deVos, *Cell* 1997, 91, 695-704.
- [17] D.A. Greenberg, K. Jin, *Trends Mol Med.* 2004, 10, 1-3.
- [18] J.M. Adams, *Genes Dev.* 2003, 20, 2481-2495.
- [19] A. Yilmaz, S. Kliche, U. Mayr-Beyrle, G. Fellbrich, J. Waltenberger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003, 306, 730-736.

Novel and Selective $\alpha_v\beta_3$ Receptor Peptide Antagonist: Design, Synthesis and Biological Behaviour**

Annarita Del Gatto^[a], Laura Zaccaro^[a], Paolo Grieco^[b], Ettore Novellino^[b], Antonella Zannetti^[c], Silvana Del Vecchio^[c], Francesca Iommelli^[c], Marco Salvatore^[c], Carlo Pedone^[a], and Michele Saviano^{[a]*}

[a] Dr. A. Del Gatto, Dr. L. Zaccaro, Prof. C. Pedone and Dr. M. Saviano, Institute of Biostructures and Bioimaging, CNR, Department of Biological Sciences. University of Naples “Federico II” and C. I. R. Pe. B. Via Mezzocannone 16, 80134 Naples, Italy.

[b] Prof. P. Grieco and Prof. E. Novellino, Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, University of Naples “Federico II”, via D. Montesano 49, 80131 Naples, Italy.

[c] Dr. A. Zannetti, Dr. S. Del Vecchio, Dr. F. Iommelli and Prof. M. Salvatore, Institute of Biostructures and Bioimages, CNR and Department of Biomorphological and Functional Sciences, University of Naples “Federico II”, via S. Pansini 5, 80121 Naples, Italy.

* Corresponding author: Dr. Michele Saviano - Institute of Biostructures and Bioimaging, CNR Via Mezzocannone 16 - 80134 Napoli, Italy. Fax: +39-081-2534560; E-mail: msaviano@unina.it

[**] This study was supported by the “Centro Regionale di Competenza in Diagnostica e Farmaceutica Molecolari” of the Regione Campania, by Italian C.N.R. and, partly, by FIRB-MIUR. Dr. A. Del Gatto and Dr. L. Zaccaro contributed equally to this work.

Integrins are a family of heterodimeric transmembrane cell surface receptors that play a crucial role in cell-cell and cell-matrix adhesion processes.^[1] These receptors consist of an α - and β -subunit, which associate non-covalently in defined combinations^[2] and recognize the Arg-Gly-Asp (RGD) sequence found in many extracellular matrix proteins, such as vitronectin, and snake venom disintegrins.^[3-5] Even if different integrins recognize different RGD containing proteins, the specificity is due to the sequence flanking the RGD motif and its conformation. Despite the numerous studies reported in literature, ligand selectivity toward different integrin subtypes is still a challenging problem mainly due to the fact that 3D structures of most of the integrin subtypes remain unknown.^[6]

An extensively studied member of this receptor class is the integrin $\alpha_v\beta_3$. This integrin is expressed on activated endothelial cells, melanoma and other cell types, such as M21 melanoma cells and glioblastoma multiforme (GBM),^[7] where it is involved in physiological processes that include angiogenesis (new blood vessel formation) and tissue repair as well as pathological conditions such as apoptosis^[8], tumor cell metastasis^[9] and tumor induced angiogenesis^[10]. In particular, high levels of $\alpha_v\beta_3$ have been found in various malignant tumor cells, with high invasive and metastatic potential^[11]. Due to its role in mediating both angiogenesis and tumor cell metastasis, $\alpha_v\beta_3$ is currently being evaluated as a target for innovative approaches of cancer treatment and detection.^[12] For these reasons, the development of new

compounds with selectivity for $\alpha_v\beta_3$ receptor is required for specific tumor targeting in new therapeutic and diagnostic approaches to cancer diseases.

To date various therapeutic candidates, including antibodies^[13], small molecules^[14], peptidomimetics^[15] and cyclic peptides^[16] have been clinically evaluated and have shown to successfully modulate $\alpha_v\beta_3$ -mediated processes. In particular so far the pentapeptide cyclo (-Arg-Gly-Asp-D-Phe-NMeVal-) referred as c(RGDf[NMe]V)^[17] is one of the most active $\alpha_v\beta_3$ antagonists reported in literature^[18]. Previous activity studies have demonstrated the selectivity of this peptide for integrin $\alpha_v\beta_3$ with respect to $\alpha_v\beta_5$ and have reported inhibition of $\alpha_v\beta_3$ -mediated cell adhesion with IC₅₀ values in the micromolar range^[14c].

The crystal structures of the extracellular segment of integrin $\alpha_v\beta_3$ in its unligated state and in complex with c(RGDf[NMe]V) confirm that the main interactions are between the positively charged arginine and the α subunit and between the anionic aspartic acid and the β subunit^[19], and that selectivity between different subunits is achieved by the RGD sequence conformation. Previous studies also reported that echistatin, the smallest (49 residues) of the viper (*Echis carinatus*) disintegrins, is a potent antagonist of the integrins $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_{IIb}\beta_3$ ^[20] and that the amino acids adjacent to the RGD motif together with 41-49 C-terminus residue appear to be critical for selective recognition of integrins. Mutation and photoaffinity cross-linking experiments^[21], and NMR conformational analysis^[22] combined with docking studies^[21] have provided evidences showing that the C-terminal region of echistatin

binds to a site within the β_3 subunit of the $\alpha_v\beta_3$ receptor, which is distinct from the sites that bind residues flanking the RGD triad in small peptide ligands.

Starting from these structural information we have attempted to design and synthesize a novel and selective peptidomimetic $\alpha_v\beta_3$ receptor antagonist, referred as RGDechi. This peptide is a bifunctional chimeric molecule containing a cyclic RGD motif and a sequence corresponding to echistatin C-terminal tail connected by a linker.

As starting point for the rational design, we have used as template the crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha_v\beta_3$ in complex with c(RGDf[NMe]V)^[19] and the NMR structure of echistatin^[22].

As a first step of the modeling procedure, we have built a theoretical model of the complex between the extracellular segment of integrin $\alpha_v\beta_3$ and the echistatin, using the following protocol: a) the RGD sequence of echistatin was superimposed onto the RGD sequence of c(RGDf[NMe]V) in complex with integrin; b) the cyclic peptide c(RGDf[NMe]V) was removed from the model; c) an energy minimization on the echistatin/receptor complex was carried out keeping all backbone atoms fixed to refine the spatial position of sidechains; d) a full energy minimization was employed to refine the relative position of ligand with respect to the receptor. The conformational and structural features of the obtained model are in good agreement with that is reported in literature. In particular, the C-terminal moiety (Arg⁴¹-Thr⁴⁹) and the Met²⁸-Asp³⁰ sequence interact mainly with the β_3 subunit as reported also in photoaffinity cross-linking experiments. In depth, the residues from Met²⁸ to Asp³⁰ seem to contact the β_3 loop residues from Tyr¹²² to Lys¹²⁵. The C-terminal moiety

assumes a conformation that gives rise to hydrophobic and hydrophilic interactions with β_3 subunit, and with a kink in position 47 due to the Pro residue that allows the moiety to accommodate on the β_3 subunit surface, without unfavourable interactions. Then, the analysis underlines the importance of the $^{41}\text{RNPHKGPAT}^{49}$ residues for the selectivity of echistatin towards the $\alpha_v\beta_3$ receptor. Finally, the RGD loop shows an interaction pattern with the receptor similar to that found for c(RGDf[NMe]V).

As a second step, on the superimposed models of echistatin/receptor and c(RGDf[NMe]V)/receptor complexes, we have selected the Met²⁸-Asp³⁰ and the Arg⁴¹-Thr⁴⁹ sequences of the echistatin and the RGD cyclic peptide with the aim to covalently bind these three “modules”.

As a third step, the two echistatin fragments were covalently linked using a Pro-Gly segment, that further stabilizes the relative orientation of the two peptide sequences in the model. Then, the D-Phe residue of c(RGDf[NMe]V), was replaced with a D-Glu residue and the γCO carboxyl of Glu group was covalently linked *via* an amide bond with the αNH of the Met²⁸. Finally, the NMeVal residue was substituted with a Lys residue in order to further label the peptide for the tumor imaging studies and therapy. The obtained final sequence for RGDechi is schematized in Figure 1.

The final model of RGDechi/receptor complex was minimized to refine the complex structure and to verify if we have introduced in the design phases interaction regions with high energy. The minimized model is represented in Figure 2 and keeps all predicted interactions.

In order to evaluate the activity of the bifunctional molecule RGDechi, echiL, echi6-19 and echi11-19 peptides (Figure 1) were designed. Echi6-19 and echi11-19 encompass the 6-19 and 11-19 RGDechi sequence respectively, and echiL corresponds to the linear precursor of RGDechi.

All peptides were synthesized by solid-phase method using Fmoc chemistry. The overall yields of RGDechi, echiL, echi6-19 and echi11-19, purified by preparative HPLC, were 24%, 30 %, 54% and 58% , respectively. The purity and the identity were confirmed by analytical RP-HPLC (RGDechi Figure 3A) and MALDI-TOF (RGDechi Figure 3B) mass spectrometry.

All newly synthesized peptides were tested for their ability to inhibit cell adhesion to vitronectin. Human erythroleukemia K562 cells overexpressing $\alpha_v\beta_3$ ($K\alpha_v\beta_3$) were incubated with increasing concentration of the tested peptide and then allowed to adhere to vitronectin-coated plates. Both c(RGDfV), a c(RGDf[NMe]V) analog, and RGDechi were able to inhibit adhesion of $K\alpha_v\beta_3$ cells to vitronectin. Figure 4 panels A and B show representative inhibition curves obtained by incubating $K\alpha_v\beta_3$ with c(RGDfV) and RGDechi, respectively. The IC_{50} value for c(RGDfV) ranged between 0.64 μ M and 3.48 μ M whereas the IC_{50} of RGDechi ranged between 0.79 μ M and 7.59 μ M. Then, RGDechi fragments were tested for their ability to inhibit $K\alpha_v\beta_3$ cell adhesion. Incubation with 10 μ M of selected aminoacidic sequences such as echi11-19, echi6-19 and echiL failed to inhibit cell adhesion which remained 97.5%, 99%, and 89.5 % as compared to untreated control cells.

To test the selectivity of binding of the novel peptide, $\alpha_v\beta_5$ overexpressing cells ($K\alpha_v\beta_5$) were used in the adhesion assay and Figure 5 shows representative inhibition curves. While c(RGDfV) was able to efficiently inhibit adhesion of cells to vitronectin, RGDechi did not show any significant inhibitory effect on $K\alpha_v\beta_5$ cell adhesion indicating lack of cross-reactivity with $\alpha_v\beta_5$.

Consistent results were obtained from competition binding experiments indicating that the novel peptide RGDechi efficiently competed with ^{125}I -labeled c(RGDyV) for the binding to $\alpha_v\beta_3$ overexpressing cells and not to $\alpha_v\beta_5$ overexpressing clones (data not shown).

In conclusion, our findings indicate that RGDechi chimeric peptide is a novel and selective ligand for $\alpha_v\beta_3$ integrin. The design of new molecules, based on the lead compound presented here, is currently ongoing with the aim to develop novel anticancer drugs and/or new class of diagnostic noninvasive tracers as suitable tools for $\alpha_v\beta_3$ -targeted therapy and imaging.

MATERIALS AND METHODS

Synthesis

All peptides were synthesized on a ABI433A automated peptide synthesizer using Fmoc solid-phase strategy (0.25 mmol). The synthesis was carried out with Novasyn TGA resin (substitution 0.29 mmol g⁻¹), using all standard amino acids except for Fmoc-DGlu-*OAll*. The first amino acid was bound onto the resin by treatment with Fmoc-Thr(*tBu*)-OH (5 eq)/MSNT (5 eq)/ MeIm (3.75 eq) in DCM for 3 h. The Fmoc deprotection step was performed with 30% piperidine in DMF for 10 min and active ester coupling reactions were carried out under a fourfold excess of amino acid and HBTU (4 eq)/HOBT (4 eq)/DIPEA (8 eq) in DMF. Each coupling was repeated twice for 1 h followed by a capping step (5 min) performed with acetic anhydride/DIPEA/DMF (2.6:4.8:92.6 v/v/v)^[23].

After the Arg¹¹ coupling reaction an aliquota of the peptidyl-resin was removed to yield the echi11-19 peptide. At the end of the of Met⁶ coupling, another part of the resin was removed in order to obtain echi6-19 peptide. During the RGDechi synthesis before the Fmoc deprotection of Lys¹, C^α-carboxyl selective deprotection of D-Glu⁵ residue from allyl group was carried out by treatment of the peptidyl-resin with PhSiH₃ (24eq)/Pd(PPh₃)₄ (0.25 eq) in DCM. Before the final cyclization the resin was divided in two part, in order to obtain the echiL and to continue the synthesis of RGDechi. The cyclization between αNH of Lys¹ and αCO of D-Glu⁵ was performed with PyBop (1.5 eq) /HOBT (1.5 eq) /DIPEA (2 eq) in DMF.

The peptides were cleaved off the resin and deprotected using a mixture of TFA/H₂O/EDT/TIS (94:2.5:2.5:1 v/v/v/v). The resins were then filtered off and the peptides were precipitated using cold anhydrous ethyl ether.

The crude products were purified by preparative RP-HPLC on the HP 1100 system equipped with a Diode Array HP 1100 using a Phenomenex C₁₈ column (4.6 x 250 mm; 5 μ m; 300 Å) and a linear gradient of H₂O (0.1% TFA)/CH₃CN (0.1% TFA) from 5% to 70% of CH₃CN (0.1% TFA) in 30 min at flow rate of 20 ml/min. The purified peptides were characterized using MALDI-TOF spectrometry on a MALDI-TOF Voyager-DE (Perseptive Biosystem) spectrometer, which gave the expected molecular ion peak [M-H⁺] of 2061.2, 978.1, 1493.6, 2079.2 for RGDechi, echi11-19, echi 8-19 and echiL, respectively.

The peptide c(RGDfV) was synthesized as reported in the literature.^[24]

Model Building

The INSIGHT/DISCOVER package (Accelrys, San Diego, CA USA) was used to build all structures and to perform energy minimizations, pH 7.0, using the CVFF force field^[25]. All calculations and graphical analyses were run on a Silicon Graphics Octene2 workstation. Energy minimizations were carried out using the conjugate gradient algorithm. These procedures were stopped when the maximum derivative was ≤ 0.01 Kcal/mol. The template used was the X-ray structure of the $\alpha_v\beta_3$ integrin in complex with the c(RGDf[NMe]V) (PDB entry code: 1L5G). The starting

structure for the echistatin was that obtained from NMR analysis (PDB entry code: 1RO3).

Cell adhesion and competitive assay

Human erythroleukemia K562 cells, stably cotransfected with cDNA of α_v and β_3 or β_5 subunits were a generous gift from Dr S. D. Blystone (SUNY Upstate Medical University, Syracuse, NY, USA). Cells were maintained in Iscove's Modified Dubecco's Medium (IMDM) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 100 IU/ml penicillin, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin and 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418 in a humidified incubator with 5% CO_2 at 37°C. Expression of $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ in the transfected clones was confirmed by flow cytometry using FITC-labeled LM609 and P1F6 monoclonal antibodies. Cells were used to determine affinity for $\alpha_v\beta_3$ and cross-reactivity with $\alpha_v\beta_5$ integrin. RGDechi was tested for its ability to inhibit cell adhesion to immobilized vitronectin and to compete for the binding with ^{125}I -labeled cyclic RGD peptides. Other cyclic peptides such as c(RGDfV) and its variant c(RGDyV) as well as specific sequence of RGDechi were used for comparison.

Cell adhesion assays were performed as previously described.^[26] Briefly, 24-well flat-bottom plates were incubated overnight with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vitronectin. The pre-coated plates were rinsed with PBS, incubated for 1 h at 23°C with 1% heat-denatured bovine serum albumin and rinsed again. Then, $\alpha_v\beta_3$ overexpressing K562 cells ($\text{K}\alpha_v\beta_3$) were incubated with various concentrations of cyclic RGD peptides or diluents for 1 h at 4°C. Peptide-treated cells ($0.2\text{-}0.5 \times 10^6/100 \mu\text{L}/\text{well}$) were seeded

onto pre-coated plates and allowed to adhere for 1 h at 37°C in 5% CO₂. Non-adherent cells were removed with gentle washing whereas adherent cells were detached by trypsinization and counted. Three different adhesion assays were performed in duplicates. The results of each assay were analysed by GraphPad Prism Software Inc, San Diego, CA USA using nonlinear regression least squares method to estimate the IC₅₀ values for each peptide.

In order to test the selectivity of the novel peptide, $\alpha_v\beta_5$ overexpressing K562 cells (K $\alpha_v\beta_5$) were incubated with increasing concentration of c(RGDfV) or RGDchi and cell adhesion was determined as previously described.

The peptide c(RGDyV) was labelled with ¹²⁵I using the Iodo-Gen method as previously described [27]. Briefly, 100 ug of peptide was reacted with 500 μ Ci of Na-¹²⁵I and 12 μ g of Iodo-Gen (Pierce). After 15 min the reaction was stopped by the addition of 1 μ mol of N-acetyltyrosine. The radiolabeled peptide was purified by unbound Iodide by size exclusion polyacrylamide (Pierce) chromatography. The radiolabeled product contained less than 3% of free iodide as assessed by HPLC. Cells (1 x 10⁶) were then incubated with ¹²⁵I-labeled c(RGDyV) in the presence or absence of a large excess of unlabeled competitors for 1 h at 4°C . After extensive washing, cell-associated radioactivity was determined by gamma counter.

Acknowledgements

The authors wish to thank Dr S. D. Blystone (SUNY Upstate Medical University, Syracuse, NY,USA) for providing tumor cell lines.

References

- [1] R.O. Hynes, *Cell* **1992**, *69*, 11-25.
- [2] J.A. Eble in *Integrin-Ligand Interaction*, Springer, Heidelberg, **1997**, pp. 1-40.
- [3] E. Rouslahti, M.D. Pierschbacher, *Cell* **1986**, *44*, 517-518.
- [4] S.E. D'Souza, M.H. Ginsberg, E.F. Plow, *Trends Biochem. Sci.* **1991**, *16*, 246-150.
- [5] R.J. Gould, M.A. Polokoff, P.A. Friedman, T.F. Huang, J.C Holt, J.J Cook, S. Niewiarowski, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1990**, *195*, 168-171.
- [6] L. Marinelli, K.E. Gottschalk, A. Meyer, E. Novellino, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4166-4177.
- [7] a) E. Petitclerc, S. Stromblad, T.L. von Schalscha, F. Mitjans, J. Piulats;, A.M. Montgomery, D.A. Cheresh, P.C. Brooks, *Cancer Res.* **1999**, *59*, 2724-30; b) M. Kanamori; S.R. Vanden Berg, G. Bergers, M.S. Berger, R.O. Pieper, *Cancer Res.* **2004**, *64*, 2751-8.
- [8] a) J.D. Hood, D.A. Cheresh, *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*(2), 91-100; b) E. Ruoslahti, *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 83-90.
- [9] P. Clezardin, *Cell Mol. Life Sci.* **1998**, *54*, 541-548.
- [10] a) B.P.Eliceiri, D.A. Cheresh, *J. Clin. Invest.* **1999**, *103*, 1227-30; b) C.C. Kumar, *Curr. Drug Targets* **2003**, *4*, 123-131.
- [11] B. Felding-Habermann, *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* **2003**, *33*, 56-58.
- [12] R. Haubner, W.A. Weber, A.J. Beer, E. Vabuliene, D. Reim, M. Sarbia, K.F. Becker, M. Goebel, R. Hein, H.J. Wester, H. Kessler, M. Schwaiger, *PloS Medicine* **2005**, *2*, 244-252.
- [13] J.C. Gutheil, T.N. Campbell, P.R. Pierce, J.D. Watkins, W.D. Huse, *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 3056-3061.

- [14] a) W.H. Miller, R.M. Keenan, R.N. Willette, M.W. Lark, *Drug Discovery Today*, **2000**, *5*, 397-408; b) J.J. Marugàn, C. Manthey, B. Anaclerio, L. Lafrance, T. Lu, T. Markotan, K.A. Leonard, C. Crysler, S. Eisennagel, M. Dasgupta, B. Tomczuk, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 926-934; c) G.A.G. Sulyok, C. Gibson, S.L. Goodman, G. Hölzemann, M. Wiesner, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1938-1950.
- [15] a) G.A.G. Sulyok, C. Gibson, S.L. Goodman, G. Hölzemann, M. Wiesner, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1938-1950; b) L. Belvisi, A. Bernardi, A. Checchia, L. Manzoni, D. Potenza, C. Scolastico, M. Castorina, A. Cupelli, G. Giannini, P. Carminati, C. Pisano, *Org. Chem.* **2001**, *3*, 1001-1004.
- [16] a) F. Mitjans, T. Meyer, C. Fittschen, S. Goodman, A. Jonczyk, J.F. Marshall, G. Reyes, J. Piulats, *Int. J. Cancer*, **2000**, *87*, 716-723; b) M. A. Dechantsreiter, E. Planker, B. Matha, E. Lohof, G. Hölzemann, A. Jonczyk, S.L. Goodman, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3033-3040.
- [17] F.A.L.M. Eskens, H. Dumez, R. Hoekstra, A. Perschl, C. Brindley, S. Böttcher, W. Wynendaele, J. Drevs, J. Verweij, A.T. van Oosterom, *Eur. J. Cancer* **2003**, *39*, 917-926.
- [18] L. Marinelli, A. Lavecchia, K.E. Gottschalk, E. Novellino, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4393-4404.
- [19] a) J.P. Xiong, T. Stehle, B. Diefenbach, R. Zhang, R. Dunker, D.L. Scott, A. Joachimiak, S.L. Goodman, M.A. Arnaout, *Science* **2001**, *294*, 339-345; b) J.P. Xiong, T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S.L. Goodman, M.A. Arnaout, *Science* **2002**, *296*, 151-155.
- [20] I. Wierzbicka-Patynowski, S. Niewiarowski, C. Marcinkiewicz, J.J. Calvete, M.M. Marcinkiewicz, M.A. McLane, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 37809-37814.
- [21] D. Yahalom, A. Wittelsberger, D.F. Mierke, M. Rosenblatt, J.M. Alexander, M. Chorev, *Biochemistry* **2002**, *41*, 8321-8331.
- [22] V. Saudek, R.A. Atkinson, J.T. Pelton, *Biochemistry* **1991**, *30*, 7369-7372.

- [23] C.G. Fields, D.H. Lloyd, R.L. Macdonald, K.M. Otteson, R.L. Noble, *Pep. Res.* **1991**, *4*, 95-101.
- [24] M. Aumailley, M. Gurrath, G. Müller, J. Calvete, R. Timpl, H. Kessler, *FEBS Lett.* **1991**, *291*, 50-54.
- [25] a) A.T. Hagler, P. Dauber, S. Lifson, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 5131-5141;
b) A.T. Hagler, S. Lifson, P. Dauber, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 5122-5130;
c) A.T. Hagler, P.S. Stern, R. Sharon, J.M. Becker, F. Naider, *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, *101*, 6842-6852.
- [26] F. Chiaradonna, L. Fontana, C. Iavarone, M.V. Carriero, G. Scholz, M.V. Barone, M.P. Stoppelli, *EMBO Journal* 1999, *18*, 3013-3023.
- [27] S. Del Vecchio, M.P. Stoppelli, M.V. Carriero, R. Fonti, O. Massa, P.Y. Li, G. Botti, M. Cerra, G. D'Aiuto, G. Esposito, *Cancer Research* **1993**, *53*, 3198-206.

Figure Legends

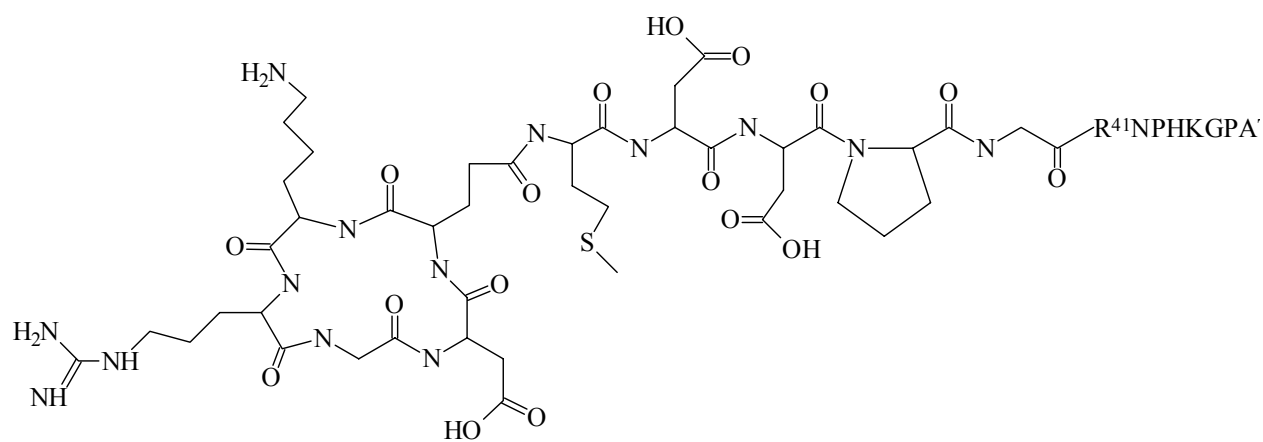
Figure 1. Schematic representation of the RGDechi molecules.

Figure 2. A) Stereo drawing of molecular model of RGDechi as obtained after energy minimization procedure. B) Theoretical model of the complex RGDechi/ $\alpha_v\beta_3$ receptor, the receptor is represented with solid ribbons.

Figure 3. A) RP-HPLC profile and B) MALDI-TOF spectrum of RGDechi

Figure 4. Representative inhibition curves obtained from adhesion assays performed in $K\alpha_v\beta_3$ cells. Cells were preincubated with increasing concentration of c(RGDfV) (panel A, IC_{50} 0.68 μ M) and RGDechi (panel B, IC_{50} 0.88 μ M) for 1 h at 4 °C and then seeded on vitronectin-coated plates. Cells were allowed to adhere for 1 h at 37 °C and finally counted.

Figure 5. Representative inhibition curves obtained from adhesion assays performed in $K\alpha_v\beta_5$ cells. Cells were preincubated with increasing concentration of c(RGDfV) (closed squares) and RGDechi (open squares) for 1 h at 4 °C and adhesion was determined as described in Figure 4. The results are expressed as the percentage of adherent cells considering the untreated control sample as 100%. No significant inhibition of cell adhesion could be observed with RGDechi whereas c(RGDfV) caused a marked decrease of cell adhesion.



RGDechi

echiL

¹KRGDeMDDPGRNPHKGPA¹⁹

echi6-19

M⁶DDPGRNPHKGPA¹⁹

echi11-19

¹¹RNPHKGPA¹⁹

Figure 1

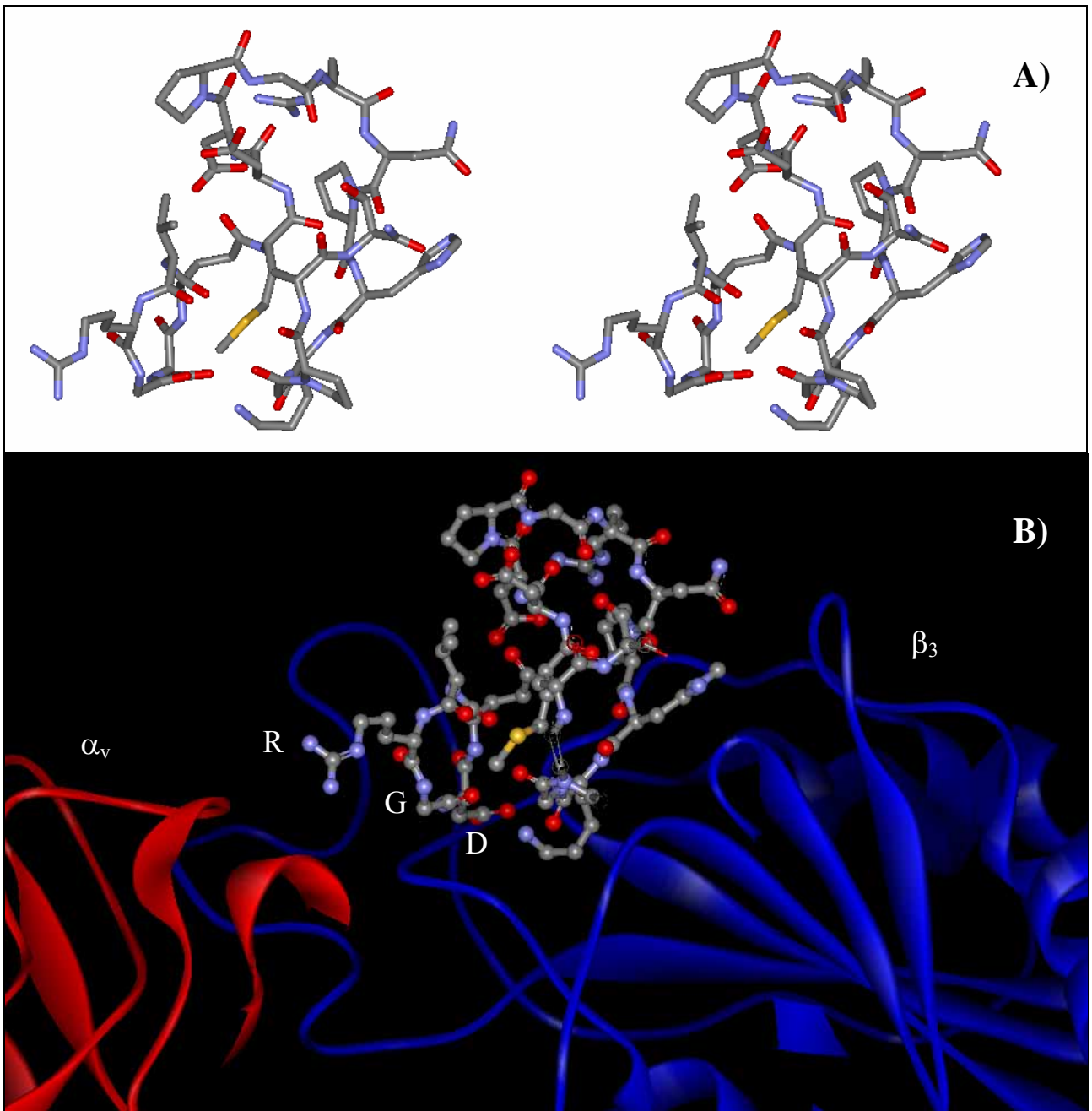


Figure 2

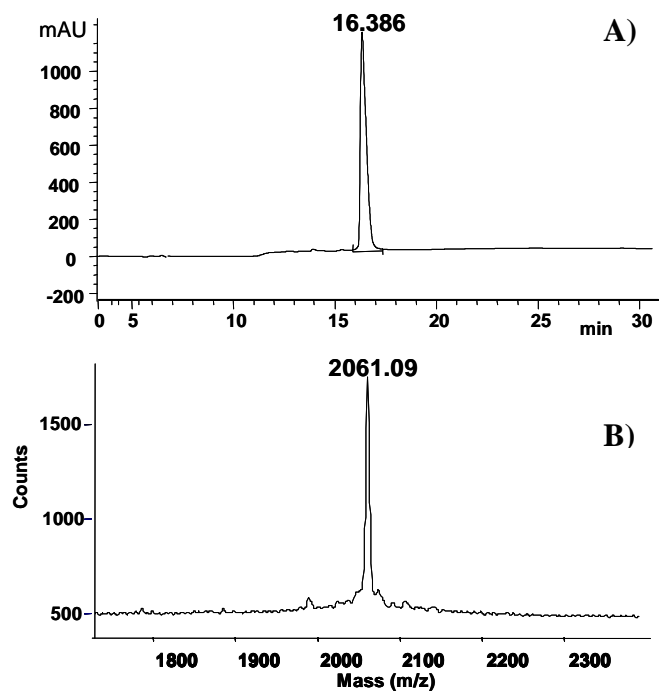


Figure 3

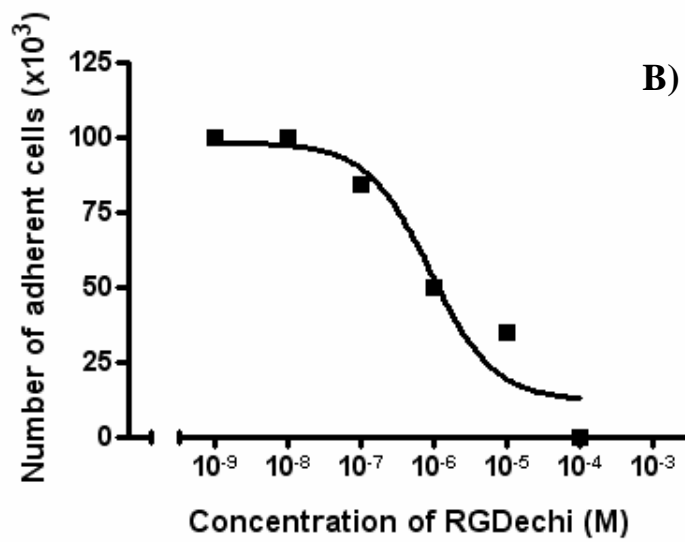
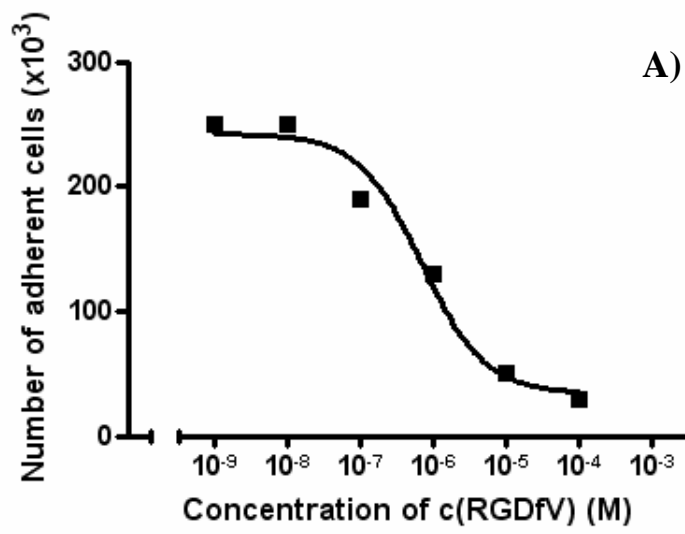


Figure 4

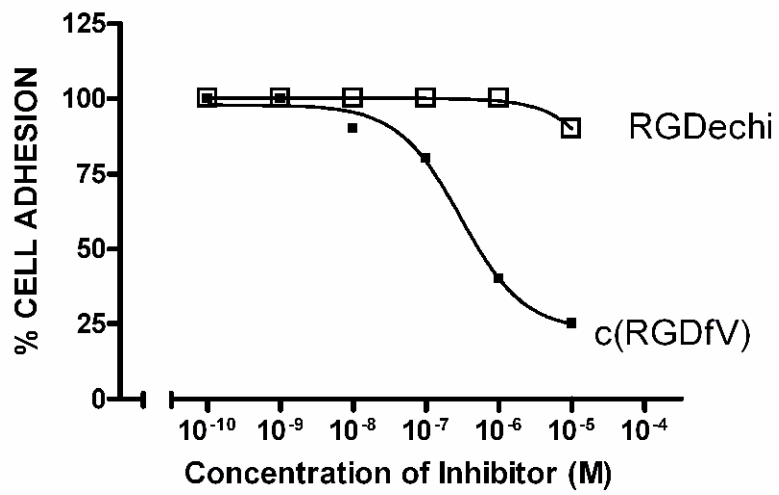


Figure 5

Keywords: Angiogenesis, $\alpha_v\beta_3$ integrin, rational design, anticancer drugs, $\alpha_v\beta_3$ -targeted therapies.

Abbreviations

HATU, N-[(dimethylamino)-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridine-1-ylmethylene]-N-methylmethanaminium; HOBt, N-Hydroxybenzotriazole; PyBop, benzotriazol-1-yloxytris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate; EDT, 1,2-ethanedithiol; MSNT, 1-(mesitylene-2-sulphonyl)-3-nitro-1H-1,2,4-triazole; MeIm, 1-methylimidazole.

Peptide-based molecules in angiogenesis

Luca Domenico D'Andrea, Annarita Del Gatto, Carlo Pedone and Ettore Benedetti

Institute of Biostructure and Bioimaging, CNR, via Mezzocannone 16, 80134 Napoli (Italy) and Department of Biological Sciences, CIRPEB, University of Napoli "Federico II"; via Mezzocannone 16, 80134 Napoli (Italy)

Corresponding author: Prof. Ettore Benedetti – Department of Biological Sciences, University of Naples "Federico II"; via Mezzocannone 16, 80134 Napoli (Italy); Tel +39 081 2536653; email ettore.benedetti@unina.it.

Key words: Angiogenesis, Integrins, Peptide, VEGF, Cancer, Ischemia

Running title: Peptides and angiogenesis

Abstract

Angiogenesis refers to the process of remodeling the vascular tissue characterized by the branching out of a new blood vessel from a pre-existing vessel. The angiogenesis is particularly active during embryogenesis, while during adult life it is quiescent and limited to particular physiological phenomena. Recently, the study of molecular mechanisms of angiogenesis has stirred renewed interest due on one hand to the recognition of the role played by angiogenesis in several pathologies of large social impact, such as tumors and cardiovascular disease and on the other hand to the pharmacological interest rising from the possibility of modulating this phenomenon.

Antibodies, peptides and small molecules targeting active endothelial cells represent an innovative tool in therapeutic and diagnostic fields. In this article we reviewed the literature of peptide and peptidomimetics in angiogenesis and their potential applications. Two specific protein systems, namely the Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and its receptor and Integrins, will be discussed in detail.

ABBREVIATIONS

EC	Endothelial Cell
ECM	Extracellular Matrix
FGF	Fibroblast Growth Factor
Flt-1	Fms-related tyrosine kinase-1
HIF-1	Hypoxia-Inducible Factor
KDR	kinase domain receptor
MMP	Matrix metalloproteases
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

For Peer Review Only

The angiogenesis

Angiogenesis is a physiological process which refers to the remodeling of the vascular tissue characterized by the branching out of a new blood vessel from a pre-existing vessel. It is intimately associated with endothelial cells (ECs) migration and proliferation. ECs are particularly active during embryonic development while during adult life EC turnover is very low and limited to particular physiological phenomena (1). In a healthy individual angiogenesis is finely tuned by pro- and anti-angiogenic factors (Table 1), the shift from this equilibrium (angiogenic switch), under specific stimuli such as hypoxia, is related to several human diseases (pathological angiogenesis) (2). The prevalence of pro-angiogenic factors (excessive angiogenesis), is associate with cancer, proliferating retinopathy, rheumatoid arthritis and psoriasis. Whereas, insufficient angiogenesis is at the basis of coronary diseases, ischemia and a reduced capacity for tissue regeneration (3).

The mechanism of angiogenesis is very complex and its description is beyond the aim of this review; many excellent papers (1, 4) have been published on this topic and the reader can refer to them for a detailed description.

In a simplified overview, the angiogenesis starts with the release of angiogenic factors which bind to their cognate receptors present on the membrane of ECs, allowing the transmission of the signal which leads to the transcription of several genes. Following angiogenic stimulus, the ECs express integrins, in particular $\alpha_v\beta_3$, thus facilitating the ECs adhesion to the extracellular matrix (ECM) components and their migration. Moreover, ECs secrete and activate many proteolytic factors, such as Matrix metalloproteases (MMP), which degrade the ECM facilitating the migration of ECs. Since a functional vascular network is formed, it is necessary that the new-formed vessel is remodeled to form a mature vessel. The release of Platelet-derived growth factor (PDGF) is fundamental for this maturation, as it stimulates the recruitment of pericytes and smooth muscle cells which stabilize the morphology of the vessel and prevent the regression of endothelial cells.

Angiogenesis and diseases

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Angiogenesis is involved in many diseases, some of large social impact, such as cancer and ischemia.

Cancer. A number of different clinical studies have shown that angiogenesis is an essential process for the solid tumors growth. The suppression of any phases of angiogenesis inhibits the formation of new vessels thus influencing the growth of the tumor and the generation of metastases. Tumor cells, as normal tissues, need to receive oxygen and metabolites to survive. Initially, when the neoplastic lesion is small (diameter less than 2 mm), tumor is able to receive these substances through diffusion (avascular phase) and it can remain dormant reaching a stationary state between proliferation and apoptosis. Successively (vascular phase), when tumor cells begin to duplicate indiscriminately, they induce a shift in the equilibrium between pro- and anti-angiogenic factors (angiogenic switch), promoting the formation of a vascular network in order to satisfy the growing need of oxygen and nutrients thus allowing the exponential growth of the tumor (2). Moreover, the new vessels are one of the ways through which the tumor can lead to the formation of metastases.

The angiogenic switch can occur at different phases of the tumor progression, depending on the type of tumor, but, in most cases, it is a prerequisite for the growth of the tumor.

The newly formed vessels show characteristics which are different from the normal one. In fact, the vessels are structurally disorganized, tortuous and dilated and they express on membrane surface peculiar markers which can be used for the selective targeting of tumor blood vessels (5, 6).

Cardiovascular disease. The primary physiological response to ischemia is the local growth of capillaries. The occlusion of a major artery leads to a fall in poststenotic pressure and to a redistribution of the blood to existing arterioles. The resulting stretch and shear forces lead to the expression of endothelial chemokines, adhesion molecules and growth factors (7). The vessels undergo an immense growth process with active proliferation of both endothelial and vascular smooth muscle cells. In the case of coronary artery disease or peripheral vascular disease this angiogenic response is frequently associated

1
2
3 with arteriogenesis. Collateral vessels can develop around the site of coronary
4 occlusion. Although the exact mechanism of arteriogenesis is not clear, there
5 are two distinct possibilities: to remodel the pre-existing vessels enlarging the
6 point at which they can carry the bulk of blood flow; to involve budding of new
7 vessels from post-capillary venules on the adventitial surface of the occluded
8 artery that gradually expand and connect to the distal arterial segment. The
9 excess vessels undergo apoptosis once sufficient flow has been established (8).
10 It is very important for individuals the ability to form a good collateral
11 circulation and to increase capillary bed size in order to compensate after an
12 ischemic insult and thus limiting the damage (9, 10). It is not uncommon that
13 individuals with peripheral artery disease, in spite of extensive lower extremity
14 arterial occlusions, remain nearly asymptomatic because of a naturally robust
15 collateral network (7). Because the degree of collateral blood vessels formation
16 in chronic ischemia is different from an individuals to another it is important to
17 elucidate the basis of the interindividual differences in the angiogenic response
18 (11). Several observations suggest that the genetic background may at least in
19 part account for the lack of collateral development during chronic coronary
20 artery disease.
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36

37 Experimental data shows that hypoxic induction of VEGF is significantly
38 reduced in patients with poor collateral development (11). Individual variations
39 in the potential for endogenous neovascularization are not likely limited to
40 upstream deregulation of Hypoxia inducing Factor-1 (HIF-1) mediating VEGF
41 expression. Defective expression of tissue metalloproteinases, tissue
42 plasminogen activators, or other components of the cascade responsible for
43 neovascularization, including variations in intracellular signaling may prove to
44 be contributory (12).
45
46
47
48
49
50
51
52
53

54 *Therapeutic angiogenesis.*

55 Over sixty compounds, stimulators and/or inhibitors, are currently in a clinical
56 phase for a number of different types of cancer pathologies and heart diseases.
57 Considering the anti-tumor therapy, the angiogenic inhibitors are, generally,
58 more safe and less toxic than chemotherapeutic substances, but their exclusive
59
60

1
2
3 administration as drugs in the treatment of tumors is rare. In fact, a wide
4 range of different growth factors are involved in the stimulation of
5 angiogenesis and the blockage of one factor alone might not be sufficient to
6 inhibit the angiogenesis for a prolonged time period, as tumors could
7 compensate by overproducing other growth factors. Furthermore, these
8 compounds can arrest the growth of the tumor but they are not necessarily
9 able to eliminate it and clinical studies have shown that the various tumors
10 respond differently to the anti-angiogenic therapy (13).

11
12 One of the advantages of this approach is represented by the targeting of
13 active endothelial cells, which support tumor growth (and therefore the newly
14 formed tumor vessels), rather than the tumor cells themselves: ECs are
15 genetically stable and therefore less prone to accumulate mutations which
16 allow them to develop a resistance to drugs (5). Despite the problems
17 involved, the anti-angiogenic therapy continues to arouse notable interest. In
18 fact angiogenic inhibitors, if used in conjunction with traditional therapies,
19 have the ability to enhance therapeutic efficacy without significantly raising the
20 risk of toxic side effects.

21
22 This synergetic action could be explained by the discovery that inhibitors of
23 angiogenesis seem to normalize tumor vessels before eliminating them, thus
24 allowing the drug to reach the tumor more easily (14). In definitive, the aim of
25 the anti-angiogenic therapy in cancer is to induce the arrest of the tumor
26 growth creating the conditions for a further pharmacological intervention with
27 substances which act on the tumor with a different mechanism. Indeed, the
28 presence of a synergic effect makes anti-angiogenic drug an innovative and
29 precious pharmacological instrument in the treatment of tumors.

30
31 Stimulating revascularization in ischemic regions is an attractive novel
32 therapeutic strategy and several angiogenic agents have been clinically
33 evaluated in recent years. Only one molecule has been approved so far: the
34 recombinant human PDGF (Regranex). It was approved in 1997 for the
35 treatment of diabetic foot ulcers. Other growth factors, such as VEGF and
36 Fibroblast Growth Factor 2 have been under investigation in large clinical trials,
37 but they have not shown sufficient efficacy to be approved (8). However, there

1
2
3 are still nearly a dozen of angiogenesis stimulator drugs in the companies'
4 pipeline.
5

6
7 Other therapies have been suggested such as the combination of two or more
8 growth factors acting on different mechanisms of neoangiogenesis, the use of
9 transcription factor lying upstream of the angiogenic cascade such as HIF-1 or
10 the employment of pleiotropic agents (15).
11

12
13 However, collateral effects have been reported for VEGF administration such as
14 uncontrolled neoangiogenesis and lymphatic edema, precluding its use in a
15 large share of ischemic population (16). The alternative could be to use
16 angiogenic stimulators of smaller size, such as peptides, with a well
17 characterized (biological) mechanism. Because of the less molecular
18 complexity peptides could be candidate lead compounds for a safer pro-
19 angiogenic drug.
20
21
22
23
24
25
26
27

28 29 *Angiogenic modulators*

30
31 Many new angiogenic modulators have been developed in the last years. They
32 mainly fall in three classes: antibodies, peptides and small molecules. Some of
33 these molecules have been approved for treatment of cancer (Avastin) or are
34 in phase III of clinical trials. In this paper we focus on the development and
35 role of peptide-based molecules in modulating angiogenesis. In particular, we
36 focus on molecules targeting two specific protein systems, VEGF/receptors and
37 integrins. A short description of selected peptide-based molecules acting on
38 other angiogenic-related targets than VEGF or integrins is also reported; while
39 an exhaustive description of antibodies and small molecules in angiogenesis
40 can be find elsewhere (17, 18).
41
42
43
44
45
46
47
48
49

50 Asai et al. isolated a new peptide sequence (ASSYPLIHWRPWAR) from a
51 phage display library against tumor angiogenic vasculature (19, 20). This
52 peptide shows a sequence homology with the sequence of the VEGF-C receptor
53 and the authors localized in the WRP motif the minimal sequence for its
54 biological activity. The peptide inhibits tumor growth and Human Umbilical Vein
55 Endothelial cells migration after VEGF stimulation. Mayo and coworkers
56 designed a mimetic of the peptide anginex, (6DBF7: SVQMKL-[Dibenzofuran]-
57
58
59
60

IIVKLNND) which inhibits angiogenesis and tumor growth in mice. They identified in the β -sheet region of the anginex peptide the key residues for its biological activity. In order to mimic the natural conformation, a dibenzofuran molecule was used as β -sheet inducing unit (21). An antiangiogenic and anticancer activity against human tumors in mice were obtained by linking four cyclic hexapeptide to a calix[4]arene scaffold. Several peptide sequences were synthesized and molecules were screened for the binding to PDGF in a cell-based assay (22).

Angiogenesis inhibition could be also achieved targeting matrix metalloproteinase (MMP), in particular MMP2 and MMP9. An example is the selection of a cyclic heterodetic peptide (CTTHWGFTLC) from a phage display library against MMP9. This peptide is selective for MMP2 and MMP9 and inhibits the ECs migration and tumor cells. It prevents tumor growth and invasion *in vivo* and it specifically targets angiogenic blood vessels *in vivo* (23).

Few peptides as angiogenic stimulators have been reported. Li and coworkers describe the biological activity of a 39 amino acids peptide derived by macrophages. The proline- and arginine-rich peptide, PR39, induced considerable angiogenesis by increasing cellular levels of HIF-1 α protein. PR39 achieved this effect inhibiting HIF-1 α degradation by the ubiquitin-proteasome system (24). Finally, Hamada and coworkers reported the angiogenic activity of osteopontin-derived peptide SVVYGLR (25).

VEGF and its receptors

VEGF is a potent angiogenic factor, a mitogen specific for vascular ECs playing a major role in angiogenesis. VEGF and its receptors are overexpressed in pathological angiogenesis, making this system a potential target for therapeutic and diagnostic applications (26, 27).

VEGF is an homodimeric protein belonging to the cystine knot growth factor family. It is encoded by a single gene that is expressed in four different isoforms (VEGF121, VEGF165, VEGF189, VEGF206) due to different splicing events. VEGF165, the most abundant isoform, is a 45 KDa glycoprotein and it binds to heparin with high affinity. VEGF121 is a soluble protein; VEGF165 is

1
2
3 also secreted although a significant fraction remain bound to the cell surface
4 and the extracellular matrix. In contrast, VEGF189 and VEGF206 are almost
5 completely sequestered in the ECM. Four structural VEGF analogues (VEGF-B,
6 VEGF-C, VEGF-D, Placenta Growth Factor), with specific preference for
7 receptor binding, are also known (27, 28).
8
9
10
11
12

13 *Biological function*

14
15 The biological function of VEGF is mediated through binding to two tyrosine
16 kinase receptors, the kinase domain receptor (KDR) and the Fms-like tyrosine
17 kinase (Flt-1). VEGF induces receptor dimerization which stimulates ECs
18 mitogenesis. KDR and Flt-1 are localized on the cell surface of various EC types
19 (28). These receptors are composed of an extracellular region constituted of
20 seven immunoglobulin-like domains, a transmembrane region and a
21 cytoplasmatic kinase domain. VEGF binds to Flt-1 with higher affinity than to
22 KDR and different biological roles have been suggested for these two
23 receptors. In particular, experimental evidences indicate that KDR is essential
24 for the development of endothelial cells and mitotic activity, while Flt-1 is
25 necessary for the organization of the vascular system of the embryo (27).
26 Recently, a cross-talk between the VEGF receptors was reported (29).
27 Increased expression of these receptors occurs in response to several stimuli
28 and results in priming of EC towards proliferation, migration and angiogenesis
29 (30). Oxygen concentration plays a major role in the regulation of VEGF. Its
30 mRNA expression is rapidly and reversibly induced by hypoxia in a variety of
31 normal and transformed cultured cell types (31). The increased VEGF
32 concentration up-regulate the expression of Flt-1 and KDR in endothelial cells
33 (27).
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52

53 *Structural data*

54
55 Several VEGF structures have been reported: free (32, 33), bound to peptide
56 inhibitors (34, 35), to a neutralizing antibody (36) and to the domain 2 of the
57 extracellular region of Flt-1 receptor, Flt-1_{D2}, (Figure 1) (37).
58
59
60

VEGF is an antiparallel homodimer, covalently linked through two disulfide

1
2
3 bonds. It is characterized by a cystine knot motif. The knot consists of two
4 disulfide bridges, with a third disulfide bond passing through them. Domain
5 deletion studies on Flt-1 have shown that the ligand binding site resides within
6 the first three domains. The second domain binds VEGF about 60-times less
7 tight than wild type protein, but its removal abolish the binding. Flt-1_{D2} is a
8 member of the immunoglobulin family. It consists of a sandwich formed by two
9 sheets, one consisting of five strands and the other by three.

10
11 The overall structure of the VEGF/Flt-1_{D2} complex possesses approximately a
12 two-fold simmetry. The VEGF recognition interface is divided about 65% and
13 35% between both monomers. The analysis of structural and mutagenesis data
14 allowed to identify residues involved in the binding to the receptors. They are
15 distributed over a discontinuous surface which include residues from the N-
16 terminal helix (17-25), the loop connecting strand β 3 to β 4 (61-66) and strand
17 β 7 (103-106) of one monomer, as well as residues from strand β 2 (46-48) and
18 from strand β 5 and β 6 together with the connecting turn (79-91) of the other
19 monomer. The recognition interface is manly hydrophobic, except for the polar
20 interaction between Arg224 (Flt-1) and Asp63 (VEGF).

21
22 KDR and Flt-1 share the same VEGF binding region, in fact 5 out of 7 most
23 important VEGF binding residues are present in both interfaces (32, 37, 38).

24 25 26 *Peptide-based molecules*

27
28 Many approaches have been pursued to modulate the VEGF-receptors
29 interaction and new molecular entities as peptides, antibodies (39-43) and
30 small molecules have been reported (44). Antibodies which recognize receptors
31 or ligand are known, but Avastatin is the only one that has been approved as
32 therapeutic agent, in particular for treatment of colorectal cancer (39). Small
33 molecules are kinase inhibitors and act intracellularly, no small molecules
34 targeting the extracellular domain of receptor have been reported so far. Sun
35 et al. reported, instead, new synthetic molecules which bind to VEGF blocking
36 receptors interaction and inhibiting angiogenesis and tumorigenesis (45, 46).
37 VEGF dependent angiogenesis has been inhibited also by using a soluble decoy
38 receptor (47, 48), small interfering RNA (49) and a DNA vaccine (50).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Several peptides have been reported to modulate VEGF-dependent angiogenesis. They bind to the extracellular region of the VEGF receptors or to the ligand (Table 2). A large number of them showed an antagonist behavior and only few act as agonists. The use of phage display libraries screening has been widely used to develop peptides interfering with the VEGF-receptors interaction, few examples of rational design approaches have been also reported.

A research team at Genentech, screening a phage library against VEGF, found several disulfide-constrained peptide sequences. Peptide hits were divided in three classes; the representative sequences bind to VEGF with micromolar affinity and prevent the interaction with the receptors. Peptides were further optimized by other rounds of randomization. The peptide with the highest affinity (v114) was able to antagonize the VEGF-induced proliferation of Human Umbilical Vein Endothelial cells (51). Peptide representatives of two classes were also structurally characterized in complex with VEGF (34, 35) (Figure 2a-b). Binetruy-Tournaire et al. screened a phage-display library against KDR and an anti-VEGF neutralizing antibody, they found a peptide ATWLPPR which totally abolished VEGF-induced angiogenesis in a rabbit corneal model (52). El-Mousawi et al., instead, used as target the receptor Flt-1 coated on magnetic particle; the peptide SP5.2 inhibited the VEGF-induced angiogenesis *in vitro* on matrigel substrate (53). Hetian and coworkers reported two peptides with antiangiogenic properties *in vivo*. The peptide K237 was obtained screening a 12 mer phage library against the extracellular domain of KDR (54), whereas F56 peptide was derived screening against the first four domain of the extracellular region of Flt-1 (55). Both peptides suppress tumor growth and metastasis. The design of a peptide antagonist was reported by Zilberberg et al. A cyclopeptide was tailored on the β -hairpin region 79-93 of VEGF. The peptide was unstructured in water and showed an helical conformation in 30%TFE. The peptide exhibit anti-angiogenic properties in a Chorioallantoic Membrane assay and blocks the growth of intracranial glioma in nude mice (56). An Arg-rich hexapeptide was identified by screening a peptide library (57). The peptide binds to VEGF and interferes with receptors

1
2
3 recognition. It inhibits the VEGF-induced neovascularization *in vivo*, in the
4 chick Chorioallantoic Membrane and rabbit cornea models, and prevents
5 growth and metastasis of human colon carcinoma cells in nude mice. Jia et al.
6 reported that peptides encoded by exon 6 of VEGF inhibit the VEGF-dependent
7 angiogenesis (58), whereas Piossek et al. identified, using cellulose-bound
8 peptides overlapping the amino acid sequence of the extracellular domain of
9 KDR, a peptide which binds to VEGF and inhibits the proliferation and migration
10 of ECs (59).
11

12
13
14
15
16
17
18 Only few peptides have been reported so far to act as VEGF agonist. Albin et
19 al. showed that the HIV-1 Tat protein is an angiogenic factor and they
20 demonstrate that Tat binds and activates KDR through the basic region 46-60
21 (60). In a recent paper D'Andrea and coworkers reported the structural
22 characterization and the biological properties of a designed VEGF mimicking
23 peptide (61). The peptide, modeled on the VEGF helix region 17-25 bound to
24 and activated the VEGF receptors, starting the VEGF-dependent proliferative
25 pathway and inducing ECs proliferation. The designed peptide recapitulated
26 and potentiated the VEGF biological response and promoted capillary formation
27 and organization in an *in vitro* assay. At the best of our knowledge this is the
28 only example in literature of a synthetic peptide able to activate VEGF
29 receptors.
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41

42 **INTEGRIN $\alpha_v\beta_3$**

43 Integrins are a family of glycosylated, heterodimeric transmembrane adhesion
44 receptors involved in cell-cell and cell-ECM interactions.
45

46
47 Integrins consist of non-covalently associated α - and β -subunits. There are
48 actually known 18 α and 8 β -subunits which can combine in more than 20
49 different heterodimeric receptors (62), most of which interact with specific ECM
50 ligands through recognition of specific aminoacidic sequences. Among these
51 sequences, the most relevant and investigated is the RGD sequence that is
52 present in several matrix proteins as fibrinogen, vitronectin, fibronectin and
53 thrombospondin (63).
54
55
56
57
58
59
60

Besides of recognizing specific ligands with their extracellular domain, integrins

1
2
3 are able to recruit with a short non-catalytic cytoplasmatic tail numerous
4 molecules involved in the signal transduction mechanisms. Integrins are
5 involved in many biological process, the integrin subtype directly involved in
6 angiogenesis is the vitronectin receptor, integrin $\alpha_V\beta_3$ (64).
7
8
9

10 11 12 *Biological function*

13 It has been shown that integrin $\alpha_V\beta_3$ together with $\alpha_V\beta_5$, both normally present
14 in few copy on cellular surface, are overexpressed in presence of neoplastic
15 pathology by endothelial and tumor cells surface, acting as "angiogenic
16 markers"(64).
17

18 Experimental evidences indicate that after interaction with specific ECM
19 ligands, integrins $\alpha_V\beta_3$ form molecular clusters and activate one or more
20 intracellular signaling necessary to cell survival, proliferation, differentiation
21 and migration (65). These pathways typically involve recruitment of
22 cytoskeleton components (like vinculin, actin, talin), Mitogen-Activated Protein
23 and Focal Adhesion kinase activation which, in turn, bind and activate growth
24 factors and small G-protein able to continue the complex signal transduction
25 through an "outside-in signalling" mechanism (66). This conduces to an
26 increase of cells affinity and avidity towards ECM components essential for the
27 cells to acquire the force necessary to movement. Integrins $\alpha_V\beta_3$ not only
28 transduct signals from the external to internal environment of the cell, but
29 they also respond to intracellular cues by binding specific cytoplasmatic
30 molecules that alter the way in which integrins interact with extracellular
31 environment through a process termed "inside-out signalling" (66). In fact,
32 integrins interaction with such molecules at the cytoplasmatic tail is believed to
33 induce a modifications in the integrin's quaternary structure, resulting in the
34 head group becoming 'open' and available for ligand binding. Several studies
35 indicate that antagonists able to inhibit such cytoplasmatic interaction induce
36 apoptosis and block the angiogenic process (67).
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Structural data

Electron microscopy studies indicate that the integrins is constituted of two

1
2
3 domains: a large globular "head" extending in the extracellular space and
4 containing ligand binding site, and two long "legs" membrane-spanning and
5 protruding into the cytoplasmatic space.
6
7

8
9 Recently, it the crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha_v\beta_3$
10 (68) in its unligated state and in complex state with cyclo-(RGDf-NMeV) (69)
11 were solved (Figure 3).
12

13
14 The crystal structure of the extracellular segment of the integrin $\alpha_v\beta_3$,
15 determined in the presence of Ca^{2+} , indicates that the ovoid head ($\sim 90\text{\AA} \times 60\text{\AA}$
16 $\times 45\text{\AA}$) contains N-terminal region of both α and β subunits. The α_v subunit
17 consists of seven radially arranged "blades," each formed by a four-stranded
18 antiparallel sheet, while the β_3 subunit is composed by a von Willebrand factor
19 A-domain (named βA -domain). The βA domain presents a metal ion-depend
20 adhesion site (MIDAS) that seems to have a regulatory function in ligand
21 binding.
22
23

24
25 The α_v tail is composed of three β -sandwich domains: an Ig-like "thigh"
26 domain and two very similar domains that form the "calf " module. The β_3 tail
27 consists of a Plexins-Semaphorins-Integrins domain, four epidermal growth
28 factor (EGF) domains, and a β -tail domain. The α and β integrin tails fold back
29 at a 135° angle, forming a V-shaped structure with a "genu" between the thigh
30 domain and the calf module of α_v .
31
32

33
34 Crystallographic structure of integrin $\alpha_v\beta_3$ -cyclo(RGDf-NMeV) complex reveals
35 that the pentagonal peptide inserts into a crevice on the integrin head between
36 the two subunits (69). The RGD sequence makes the main contact area with
37 the integrin, and each residue participates extensively in the interaction. The
38 Arg and Asp side chains point in opposite directions, exclusively contacting
39 respectively the α and β subunits.
40
41

42
43 It has been shown that cyclo(RGDf-NMeV) binding to integrin $\alpha_v\beta_3$ is associated
44 with significant conformational changes in the tertiary and quaternary protein
45 structure. Rearrangements in the integrin $\alpha_v\beta_3$ head region are also observed
46 in the complex. The interface between α and β subunits undergoes a small
47 change, with the two domains moving closer together at the peptide-binding
48 site. This determines the transition from unligated or "inactive" state to
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

liganted or "active" state (69).

To date various theories have tried to explain the integrin activation mechanism and models hypothesizing two or multiple activation mechanisms have been proposed. In one of these models (70) the inactive state is locked in its conformation by intracellular interaction. Intracellular proteins bind to $\alpha_v\beta_3$ and trigger a rotational movement of the head groups, which conduces integrin in a pre-activated state exposing the extracellular ligand binding site. Binding of ligands at this site leads to further conformational changes in the head group region, which in turn cause the separation of the integrin α and β subunits in their extracellular domain.

Peptide-based molecules

The identification of the Arg-Gly-Asp (RGD) sequence as a cell adhesion site in fibronectin (71, 72) was a an important finding in the molecular characterization of cell-matrix interactions. It was subsequently shown that several proteins such as vitronectin, fibrinogen, thrombospondin, etc. are RGD-dependent adhesion proteins which bind to a variety of integrin receptors (73-76). Each residue in the tripeptide sequence appears to be crucial since amino acid substitution abolished the activity of synthetic peptides like GRGDS (72, 77),. Furthermore, contributions by residues adjacent to RGD sequence are also known (78).

This discovery opened the way to new and intense researches towards the development of new molecules able to inhibit integrins $\alpha_v\beta_3$ activity with the aim of blocking the angiogenic process and prevent neoplastic diseases.

The main issue of this approach is related to the need of new active compounds selective for integrins $\alpha_v\beta_3$ without interfering with the normal biological functions of the other integrins.

To date various therapeutic candidates have been clinically evaluated. These include small organic molecules (79-81), linear and cyclic peptides (81-84), peptidomimetics (85, 86), and specific antibodies, like human monoclonal antibody LM609, Vitaxin (87).

One of the first RGD-containing peptide inhibitor reported in literature is the

1
2
3 cyclic peptide GRGDSPC (derived from fibronectin binding site) (78). Based on
4 this sequence many molecules have been investigated to optimize binding
5 affinity and specificity of the inhibitors, restricting the conformational space of
6 active sequences by cyclization (88). Then the research focused on the
7 development of new conformational constrained linker to cyclize the RGD
8 sequence.

9
10 RGD pentapeptides were used (89) in which a single D-amino acid induces
11 defined conformational motifs and facilitates cyclization without requiring
12 disulfide bonds. Among these, the peptide cyclo(RGDfV) (f=D-Phe) proved to
13 be the most active and selective ligand for the $\alpha_v\beta_3$ integrin receptor.

14
15 The conformational constraint imposed by the cyclic template was shown to be
16 a valuable tool in the determination of the bioactive conformation. Starting
17 from this data, in fact, cyclo(RGDfV) (90, 91) served as a lead structure for the
18 development of stereoisomeric libraries (82), peptides and peptidomimetics
19 (92-94) and small organic molecules (80, 81, 95, 96).

20
21 For example, extensive modifications on the cyclo(RGDfV) lead structure have
22 been performed by peptidomimetics and carbohydrate scaffolds to obtain a
23 further reduction of the molecular flexibility. New potent antagonists such as a
24 small library of RGD-containing cyclic pseudopentapeptides incorporating
25 stereoisomeric 6,5- and 7,5-fused bicyclic lactams 1-8 were developed was
26 synthesized (86).

27
28 Furthermore, a nine amino acid peptide that contains an RGD sequence in a
29 cyclic conformation with two disulfide bonds (CDCRGDCFC) was selected from
30 a phage library. This cyclic nonapeptide demonstrated high selectivity for the
31 α_v integrin (97) and is mainly concentrated in tumors.

32
33 A critical element in the design of RGD mimetics is the correct spatial
34 arrangement of arginine and aspartic acid residues around a central core. The
35 discovery of cyclo(RGDfV) highlighted the importance of beta-turn mimetic
36 templates. Since biphenyls have been extensively used as beta-turn mimetics,
37 a biphenyl series of new small molecules RGD mimetics was synthesized and
38 proved a good integrin antagonist (98). Furthermore, cyclic RGD peptides
39 containing either one or two furanoid sugar amino acids were also obtained
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 (99).

5
6 Moreover, a variety of potent, small-molecule $\alpha_v\beta_3$ antagonists constituted of a
7 rigid template flanked by acidic and basic moieties were designed to mimic
8 respectively Asp and Arg residues. High biological activity and selectivity
9 towards integrin $\alpha_v\beta_3$ were obtained when an O-guanidine moiety (100) or a
10 (2-pyridylamino)propoxy group (80) was employed as basic or carboxylic
11 mimetic linked to indole, benzofuran or benzothiophene ring system.
12

13
14
15
16 Systematic modification of cyclo(RGDfV) peptide resulted in the N-alkylated
17 cyclopeptide c(-RGDf[NMe]V-) (84), named Cilengitide, which has entered
18 clinical phase II studies as angiogenesis inhibitor (code EMD 121974, Merck
19 KGaA). Cilengitide has demonstrated excellent clinical safety, even for a
20 prolonged treatment, and a predictable pharmacokinetic profile (101).
21

22
23
24
25 More recently a novel peptidomimetic approach is focused on the development
26 of selective nonpeptide $\alpha_v\beta_3$ integrin antagonists (79). Because of enhanced
27 metabolic stability, bioavailability, and biological absorption of aza-amino acid
28 containing peptides (102, 103), aza-glycine containing RGD mimetics were
29 developed. Glycine was replaced by aza-glycine in RGD-containing
30 cyclopeptides with preservation of biological activity and selectivity (104).
31

32
33
34
35
36 Small RGD-containing proteins, derived from snake venoms, the disintegrins,
37 are known as integrin antagonists (105). Disintegrins are a family of naturally
38 occurring, cysteine-rich, small (5–9 kDa) polypeptides that potently inhibit
39 platelet aggregation and cell adhesion (105, 106). The biological activity of
40 disintegrins depends on the structure of an RGD-containing loop constrained in
41 an appropriate conformation by disulfide bridges. Since they are relatively
42 small (50–80 amino acids), they provide a unique opportunity to gain insight
43 into the three-dimensional structure of RGD-active proteins and the factors
44 that are important in controlling specificity. Echistatin from the venom of *Echis*
45 *carinatus* (107) is the smallest (49 amino acids) member of the family and has
46 been the focus of intense research because of its capacity to bind $\alpha_v\beta_3$ integrin
47 with high affinity and selectivity (108).
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Role of peptide-based molecules in angiogenesis

1
2
3 In this survey we have reviewed the bioactive peptide-based molecules which
4 have been developed in order to modulate angiogenesis with special emphasis
5 on VEGF/receptors and integrins. As described, several antagonists and few
6 agonists have been developed for the VEGF system mainly by means of a
7 phage display library approaches. This is quite reasonable because in this case
8 antagonists are inhibitor of protein-protein interaction and phage display
9 library have demonstrated to be able to select peptide sequences which
10 recognize protein hot spots. Other than few structural characterizations no
11 much insight is known about the inhibition mechanism. This could preclude the
12 optimization of those molecules for possible therapeutic applications.

13
14
15
16
17
18
19
20
21
22 The development of an integrin antagonist is instead an example of how
23 powerful can be the approach of designing peptides by structure-activity
24 correlations. Integrins, a large family of protein receptors, are not always
25 implicated in cancer, and from this derives the importance of selectivity which
26 is still an unsolved issue. Learning more from natural antagonists could be a
27 possible way to design more selective inhibitors.

28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
The obvious use of these molecules is as therapeutic agents, even if there is
still some skepticism on behalf of pharmaceutical companies on the use of
peptides as drug. Nevertheless, peptides present characteristics such as well
known synthetic procedures, possibility to modulate easily physico-chemical
properties and conformation by replacing amino acid residues, and possibility
to study deeply structure-activity relationships. All of this makes the use of
peptides in drug discovery an advantageous process. If a drug needs to target
protein-protein interactions peptide-based molecules remain the molecules of
choice. The use of peptides allow to understand at molecular level the
interaction with the target providing a leading molecules for the design of
inexpensive drugs that can be administered orally. This strategy could be the
winning one compared with the completely random approach, such high
throughput screening, in which big pharmaceutical company have heavily
invested in the last decade without getting back the desired results as testified
by the lower number of new molecules reaching the clinical trials.

Angiogenesis plays a role in several pathologies of large social impact; in fact,

1
2
3 there is a tremendous interest rising from the possibility of modulating this
4 phenomenon pharmacologically. According to the Angiogenesis Foundation at
5 least 184 millions and 310 millions patients in the Western Nations can benefit
6 respectively from anti- and pro-angiogenic therapy. Currently more than 200
7 biotech companies, as well as large pharmaceutical companies, have programs
8 aimed at the development of new pharmaceuticals which act on the angiogenic
9 process and it has been estimated that so far the research and development of
10 angiogenesis-based molecules is one of the most well-financed field of medical
11 research.
12

13
14 Many protein systems are involved in the regulation of angiogenesis and, in
15 particular VEGF and integrins are implicated in crucial steps. Interesting, it has
16 been reported that integrin can cross talk with growth factor receptors such as
17 Epidermal Growth Factor, PDGF and FGF (109) and an interaction with MMP2
18 was observed (110). Recently, it was also shown a cross-talk between VEGF
19 and integrin $\alpha_v\beta_3$ (111). Activation of this receptor regulates the production of
20 VEGF in tumor cells expressing the integrin. These data suggest that
21 combination of molecules targeting more than one system could be very
22 effective in blocking neoangiogenesis. In fact, very recently Mizukami et al.
23 (112) have shown the importance of targeting more than one protein system
24 (combination strategy) showing how colon cancer cells can compensate for the
25 blocking of just one factor.
26

27
28 Much efforts are addressed at the search of angiogenic antagonists. The main
29 application of inhibitors is as anti-cancer agents but they could also find
30 application in the treatment of several other human diseases. It is worth noting
31 that not much is done in search of angiogenesis stimulators. So far researches
32 have mainly focused on the clinical use of recombinant growth factors such as
33 VEGF. In these trials, the VEGF protein showed collateral effects, such as
34 uncontrolled neoangiogenesis and lymphatic edema, precluding its use in a
35 large share of ischemic population (16, 113, 114). An alternative route could
36 be the use of an angiogenic stimulators of smaller molecular weight, such as a
37 small peptide, with a well characterized (biological) mechanism of action.
38 Because of the reduced molecular complexity they could be a candidate lead
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 compound for a safer pro-angiogenic drugs.

4
5 Another application of bioactive peptides concerns with their use as
6
7 biochemical tools. They are more stable and inexpensive than proteins or
8
9 antibodies. Furthermore, because of their easy derivatization and specific
10
11 recognition, they can be used to dissect biological response, to study molecular
12
13 pathway, to probe enzymatic activity or to visualize specific targets.

14
15 Furthermore peptides could find large application in diagnosis. In this case
16
17 peptides are good candidates because of their optimal properties (115).
18
19 Targeting of receptors overexpressed in angiogenesis was shown to be
20
21 feasible. Radiolabeled VEGF has been used to visualize gastrointestinal tumors
22
23 and metastases expressing VEGF receptors (116). Haubner and Wester have
24
25 recently reviewed other targets used for imaging of tumor angiogenesis (77).
26
27 Potentially the imaging could be used to visualize tumor vasculature too, but
28
29 unfortunately vascular ECs are presents in much smaller number than tumor
30
31 cells. Molecular agents for imaging angiogenesis must therefore bind the
32
33 targets with high affinity and specificity and be detectable at low concentration
34
35 (117). The ability to detect the formation of new vessels, based on
36
37 overexpression of VEGF receptors, in individuals after an ischemic insult, is
38
39 intriguing and may permit to identify individuals who are least capable of
40
41 mounting a satisfactory response and to develop appropriate therapeutic
42
43 interventions to help them.

44
45 In conclusion, we believe that peptides could be widely used as modulators of
46
47 angiogenesis . These molecules have already proved to be of great interest in
48
49 this field and the preparation of new entities based on rational design could in
50
51 the near future improve the understanding of the mechanisms responsible for
52
53 the biological effects, the selectivity and potency of them in stimulating or
54
55 inhibiting angiogenesis. The development of marketable products, not
56
57 necessarily peptides but molecules mimicking the pharmacophore groups of
58
59 peptides will require intense researches in the near future which could lead to
60
61 rewarding result.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review Only

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Acknowledgements

We would thank Dr. Guido Iaccarino for helpful discussions, Dr. Alessandra Romanelli and Dr. Laura Zaccaro for careful reading the manuscript and suggestions. This work was supported by the Centro Regionale di Competenza in Diagnostica e Farmaceutica Molecolari della Regione Campania. We thank for partial support the MIUR (PRIN 2003 prot. 2003058409) and Ministero della Salute "Programmi Speciali – Art.12 bis, 229/99.

For Peer Review Only

References

1. Carmeliet, P. (2003) Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* **9**: 653-660.
2. Hanahan, D., Folkman, J. (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**: 353-364.
3. Carmeliet, P., Jain, R.K. (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**: 249-257.
4. Yancopoulos, G.D., Davis, S., Gale, N.W., Rudge, J.S., Wiegand, S.J., Holash, J. (2000) Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* **407**: 242-248.
5. Bergers, G., Benjamin, L.E. (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* **3**: 401-410.
6. Ruoslahti, E. (2002) Specialization of tumour vasculature. *Nat Rev Cancer* **2**: 83-90.
7. Helisch, A., Schaper, W. (2000) Angiogenesis and arteriogenesis--not yet for prescription. *Z Kardiol* **89**: 239-244.
8. Simons, M., Ware, J.A. (2003) Therapeutic angiogenesis in cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov* **2**: 863-871.
9. Schaper, W., Ito, W.D. (1996) Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. *Circ Res* **79**: 911-919.
10. Helisch, A., Schaper, W. (2003) Arteriogenesis: the development and growth of collateral arteries. *Microcirculation* **10**: 83-97.
11. Schultz, A., Lavie, L., Hochberg, I., Beyar, R., Stone, T., Skorecki, K., Lavie, P., Roguin, A., Levy, A.P. (1999) Interindividual heterogeneity in the hypoxic regulation of VEGF: significance for the development of the coronary artery collateral circulation. *Circulation* **100**: 547-552.
12. Isner, J.M. (2000) Tissue responses to ischemia: local and remote responses for preserving perfusion of ischemic muscle. *J Clin Invest* **106**: 615-619.
13. Featherstone, J., Griffiths, S. (2002) From the analyst's couch. *Drugs that target angiogenesis. Nat Rev Drug Discov* **1**: 413-414.
14. Jain, R.K., Carmeliet, P.F. (2001) Vessels of death or life. *Sci Am* **285**: 38-45.
15. Emanuelli, C., Madeddu, P. (2005) Changing the logic of therapeutic angiogenesis for ischemic disease. *Trends Mol Med* **11**: 207-216.
16. Lee, C.G., Link, H., Baluk, P., Homer, R.J., Chapoval, S., Bhandari, V., Kang, M.J., Cohn, L., Kim, Y.K., McDonald, D.M., Elias, J.A. (2004) Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces remodeling and enhances TH2-mediated sensitization and inflammation in the lung. *Nat Med* **10**: 1095-1103.
17. Tozer, G.M., Kanthou, C., Baguley, B.C. (2005) Disrupting tumour blood vessels. *Nat Rev Cancer* **5**: 423-435.
18. Cristofanilli, M., Charnsangavej, C., Hortobagyi, G.N. (2002) Angiogenesis modulation in cancer research: novel clinical approaches. *Nat Rev Drug Discov* **1**: 415-426.
19. Oku, N., Asai, T., Watanabe, K., Kuromi, K., Nagatsuka, M., Kurohane, K., Kikkawa, H., Ogino, K., Tanaka, M., Ishikawa, D., Tsukada, H., Momose,

- 1
2
3 M., Nakayama, J., Taki, T. (2002) Anti-neovascular therapy using novel
4 peptides homing to angiogenic vessels. *Oncogene* **21**: 2662-2669.
- 5
6 20. Asai, T., Nagatsuka, M., Kuromi, K., Yamakawa, S., Kurohane, K., Ogino,
7 K., Tanaka, M., Taki, T., Oku, N. (2002) Suppression of tumor growth by novel
8 peptides homing to tumor-derived new blood vessels. *FEBS Lett* **510**: 206-
9 210.
- 10
11 21. Mayo, K.H., Dings, R.P., Flader, C., Nesmelova, I., Hargittai, B., van der
12 Schaft, D.W., van Eijk, L.I., Walek, D., Haseman, J., Hoyer, T.R., Griffioen,
13 A.W. (2003) Design of a partial peptide mimetic of anginex with antiangiogenic
14 and anticancer activity. *J Biol Chem* **278**: 45746-45752.
- 15
16 22. Blaskovich, M.A., Lin, Q., Delarue, F.L., Sun, J., Park, H.S., Coppola, D.,
17 Hamilton, A.D., Sefti, S.M. (2000) Design of GFB-111, a platelet-derived
18 growth factor binding molecule with antiangiogenic and anticancer activity
19 against human tumors in mice. *Nat Biotechnol* **18**: 1065-1070.
- 20
21 23. Koivunen, E., Arap, W., Valtanen, H., Rainisalo, A., Medina, O.P.,
22 Heikkila, P., Kantor, C., Gahmberg, C.G., Salo, T., Konttinen, Y.T., Sorsa, T.,
23 Ruoslahti, E., Pasqualini, R. (1999) Tumor targeting with a selective gelatinase
24 inhibitor. *Nat Biotechnol* **17**: 768-774.
- 25
26 24. Li, J., Post, M., Volk, R., Gao, Y., Li, M., Metais, C., Sato, K., Tsai, J.,
27 Aird, W., Rosenberg, R.D., Hampton, T.G., Sellke, F., Carmeliet, P., Simons, M.
28 (2000) PR39, a peptide regulator of angiogenesis. *Nat Med* **6**: 49-55.
- 29
30 25. Hamada, Y., Nokihara, K., Okazaki, M., Fujitani, W., Matsumoto, T.,
31 Matsuo, M., Umakoshi, Y., Takahashi, J., Matsuura, N. (2003) Angiogenic
32 activity of osteopontin-derived peptide SVVYGLR. *Biochem Biophys Res*
33 *Commun* **310**: 153-157.
- 34
35 26. Ferrara, N. (2000) VEGF: an update on biological and therapeutic
36 aspects. *Curr Opin Biotechnol* **11**: 617-624.
- 37
38 27. Ferrara, N., Gerber, H.P., LeCouter, J. (2003) The biology of VEGF and
39 its receptors. *Nat Med* **9**: 669-676.
- 40
41 28. Ferrara, N., Davis-Smyth, T. (1997) The biology of vascular endothelial
42 growth factor. *Endocr Rev* **18**: 4-25.
- 43
44 29. Autiero, M., Waltenberger, J., Communi, D., Kranz, A., Moons, L.,
45 Lambrechts, D., Kroll, J., Plaisance, S., De Mol, M., Bono, F., Kliche, S.,
46 Fellbrich, G., Ballmer-Hofer, K., Maglione, D., Mayr-Beyrle, U. et al. (2003) Role
47 of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors
48 Flt1 and Flk1. *Nat Med* **9**: 936-943.
- 49
50 30. Brogi, E., Schatteman, G., Wu, T., Kim, E.A., Varticovski, L., Keyt, B.,
51 Isner, J.M. (1996) Hypoxia-induced paracrine regulation of vascular endothelial
52 growth factor receptor expression. *J Clin Invest* **97**: 469-476.
- 53
54 31. Abedi, H., Zachary, I. (1997) Vascular endothelial growth factor
55 stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of
56 focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells. *J Biol Chem* **272**: 15442-
57 15451.
- 58
59 32. Muller, Y.A., Li, B., Christinger, H.W., Wells, J.A., Cunningham, B.C., de
60 Vos, A.M. (1997) Vascular endothelial growth factor: crystal structure and
functional mapping of the kinase domain receptor binding site. *Proc Natl Acad
Sci U S A* **94**: 7192-7197.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
33. Muller, Y.A., Christinger, H.W., Keyt, B.A., de Vos, A.M. (1997) The crystal structure of vascular endothelial growth factor (VEGF) refined to 1.93 Å resolution: multiple copy flexibility and receptor binding. *Structure* **5**: 1325-1338.
 34. Wiesmann, C., Christinger, H.W., Cochran, A.G., Cunningham, B.C., Fairbrother, W.J., Keenan, C.J., Meng, G., de Vos, A.M. (1998) Crystal structure of the complex between VEGF and a receptor-blocking peptide. *Biochemistry* **37**: 17765-17772.
 35. Pan, B., Li, B., Russell, S.J., Tom, J.Y., Cochran, A.G., Fairbrother, W.J. (2002) Solution structure of a phage-derived peptide antagonist in complex with vascular endothelial growth factor. *J Mol Biol* **316**: 769-787.
 36. Muller, Y.A., Chen, Y., Christinger, H.W., Li, B., Cunningham, B.C., Lowman, H.B., de Vos, A.M. (1998) VEGF and the Fab fragment of a humanized neutralizing antibody: crystal structure of the complex at 2.4 Å resolution and mutational analysis of the interface. *Structure* **6**: 1153-1167.
 37. Wiesmann, C., Fuh, G., Christinger, H.W., Eigenbrot, C., Wells, J.A., de Vos, A.M. (1997) Crystal structure at 1.7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor. *Cell* **91**: 695-704.
 38. Keyt, B.A., Nguyen, H.V., Berleau, L.T., Duarte, C.M., Park, J., Chen, H., Ferrara, N. (1996) Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* **271**: 5638-5646.
 39. Ferrara, N., Hillan, K.J., Gerber, H.P., Novotny, W. (2004) Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* **3**: 391-400.
 40. Cooke, S.P., Boxer, G.M., Lawrence, L., Pedley, R.B., Spencer, D.I., Begent, R.H., Chester, K.A. (2001) A strategy for antitumor vascular therapy by targeting the vascular endothelial growth factor: receptor complex. *Cancer Res* **61**: 3653-3659.
 41. Lu, D., Shen, J., Vil, M.D., Zhang, H., Jimenez, X., Bohlen, P., Witte, L., Zhu, Z. (2003) Tailoring in vitro selection for a picomolar affinity human antibody directed against vascular endothelial growth factor receptor 2 for enhanced neutralizing activity. *J Biol Chem* **278**: 43496-43507.
 42. Prewett, M., Huber, J., Li, Y., Santiago, A., O'Connor, W., King, K., Overholser, J., Hooper, A., Pytowski, B., Witte, L., Bohlen, P., Hicklin, D.J. (1999) Antivascular endothelial growth factor receptor (fetal liver kinase 1) monoclonal antibody inhibits tumor angiogenesis and growth of several mouse and human tumors. *Cancer Res* **59**: 5209-5218.
 43. Willett, C.G., Boucher, Y., di Tomaso, E., Duda, D.G., Munn, L.L., Tong, R.T., Chung, D.C., Sahani, D.V., Kalva, S.P., Kozin, S.V., Mino, M., Cohen, K.S., Scadden, D.T., Hartford, A.C., Fischman, A.J. et al. (2004) Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. *Nat Med* **10**: 145-147.
 44. Underiner, T.L., Ruggeri, B., Gingrich, D.E. (2004) Development of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) kinase inhibitors as anti-angiogenic agents in cancer therapy. *Curr Med Chem* **11**: 731-745.

- 1
2
3 45. Sun, J., Wang, D.A., Jain, R.K., Carie, A., Paquette, S., Ennis, E.,
4 Blaskovich, M.A., Baldini, L., Coppola, D., Hamilton, A.D., Sebti, S.M. (2005)
5 Inhibiting angiogenesis and tumorigenesis by a synthetic molecule that blocks
6 binding of both VEGF and PDGF to their receptors. *Oncogene* **24**: 4701-4709.
7
8 46. Sun, J., Blaskovich, M.A., Jain, R.K., Delarue, F., Paris, D., Brem, S.,
9 Wotoczek-Obadia, M., Lin, Q., Coppola, D., Choi, K., Mullan, M., Hamilton,
10 A.D., Sebti, S.M. (2004) Blocking angiogenesis and tumorigenesis with GFA-
11 116, a synthetic molecule that inhibits binding of vascular endothelial growth
12 factor to its receptor. *Cancer Res* **64**: 3586-3592.
13
14 47. Holash, J., Davis, S., Papadopoulos, N., Croll, S.D., Ho, L., Russell, M.,
15 Boland, P., Leidich, R., Hylton, D., Burova, E., Ioffe, E., Huang, T.,
16 Radziejewski, C., Bailey, K., Fandl, J.P. et al. (2002) VEGF-Trap: a VEGF
17 blocker with potent antitumor effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 11393-
18 11398.
19
20 48. Kim, E.S., Serur, A., Huang, J., Manley, C.A., McCrudden, K.W., Frischer,
21 J.S., Soffer, S.Z., Ring, L., New, T., Zabski, S., Rudge, J.S., Holash, J.,
22 Yancopoulos, G.D., Kandel, J.J., Yamashiro, D.J. (2002) Potent VEGF blockade
23 causes regression of coopted vessels in a model of neuroblastoma. *Proc Natl*
24 *Acad Sci U S A* **99**: 11399-11404.
25
26 49. Takei, Y., Kadomatsu, K., Yuzawa, Y., Matsuo, S., Muramatsu, T. (2004)
27 A small interfering RNA targeting vascular endothelial growth factor as cancer
28 therapeutics. *Cancer Res* **64**: 3365-3370.
29
30 50. Niethammer, A.G., Xiang, R., Becker, J.C., Wodrich, H., Pertl, U.,
31 Karsten, G., Eliceiri, B.P., Reisfeld, R.A. (2002) A DNA vaccine against VEGF
32 receptor 2 prevents effective angiogenesis and inhibits tumor growth. *Nat Med*
33 **8**: 1369-1375.
34
35 51. Fairbrother, W.J., Christinger, H.W., Cochran, A.G., Fuh, G., Keenan,
36 C.J., Quan, C., Shriver, S.K., Tom, J.Y., Wells, J.A., Cunningham, B.C. (1998)
37 Novel peptides selected to bind vascular endothelial growth factor target the
38 receptor-binding site. *Biochemistry* **37**: 17754-17764.
39
40 52. Binetruy-Tournaire, R., Demangel, C., Malavaud, B., Vassy, R., Rouyre,
41 S., Kraemer, M., Plouet, J., Derbin, C., Perret, G., Mazie, J.C. (2000)
42 Identification of a peptide blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-
43 mediated angiogenesis. *Embo J* **19**: 1525-1533.
44
45 53. El-Mousawi, M., Tchistiakova, L., Yurchenko, L., Pietrzynski, G., Moreno,
46 M., Stanimirovic, D., Ahmad, D., Alakhov, V. (2003) A vascular endothelial
47 growth factor high affinity receptor 1-specific peptide with antiangiogenic
48 activity identified using a phage display peptide library. *J Biol Chem* **278**:
49 46681-46691.
50
51 54. Hetian, L., Ping, A., Shumei, S., Xiaoying, L., Luowen, H., Jian, W., Lin,
52 M., Meisheng, L., Junshan, Y., Chengchao, S. (2002) A novel peptide isolated
53 from a phage display library inhibits tumor growth and metastasis by blocking
54 the binding of vascular endothelial growth factor to its kinase domain receptor.
55 *J Biol Chem* **277**: 43137-43142.
56
57 55. An, P., Lei, H., Zhang, J., Song, S., He, L., Jin, G., Liu, X., Wu, J., Meng,
58 L., Liu, M., Shou, C. (2004) Suppression of tumor growth and metastasis by a
59 VEGFR-1 antagonizing peptide identified from a phage display library. *Int J*
60 *Cancer* **111**: 165-173.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
56. Zilberberg, L., Shinkaruk, S., Lequin, O., Rousseau, B., Hagedorn, M., Costa, F., Caronzolo, D., Balke, M., Canron, X., Convert, O., Lain, G., Gionnet, K., Goncalves, M., Bayle, M., Bello, L. et al. (2003) Structure and inhibitory effects on angiogenesis and tumor development of a new vascular endothelial growth inhibitor. *J Biol Chem* **278**: 35564-35573.
57. Bae, D.G., Gho, Y.S., Yoon, W.H., Chae, C.B. (2000) Arginine-rich anti-vascular endothelial growth factor peptides inhibit tumor growth and metastasis by blocking angiogenesis. *J Biol Chem* **275**: 13588-13596.
58. Jia, H., Jezequel, S., Lohr, M., Shaikh, S., Davis, D., Soker, S., Selwood, D., Zachary, I. (2001) Peptides encoded by exon 6 of VEGF inhibit endothelial cell biological responses and angiogenesis induced by VEGF. *Biochem Biophys Res Commun* **283**: 164-173.
59. Piossek, C., Schneider-Mergener, J., Schirner, M., Vakalopoulou, E., Germeroth, L., Thierauch, K.H. (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor II-derived peptides inhibit VEGF. *J Biol Chem* **274**: 5612-5619.
60. Albini, A., Soldi, R., Giunciuglio, D., Giraudo, E., Benelli, R., Primo, L., Noonan, D., Salio, M., Camussi, G., Rockl, W., Bussolino, F. (1996) The angiogenesis induced by HIV-1 tat protein is mediated by the Flk-1/KDR receptor on vascular endothelial cells. *Nat Med* **2**: 1371-1375.
61. D'Andrea, L.D., Iaccarino, G., Fattorusso, R., Sorriento, D., Carannante, C., Capasso, D., Trimarco, B., Pedone, C. (2005) Targeting angiogenesis: structural characterization and biological properties of a de novo engineered VEGF mimicking peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 14215-14220.
62. Giancotti, F.G., Ruoslahti, E. (1999) Integrin signaling. *Science* **285**: 1028-1032.
63. van der Flier, A., Sonnenberg, A. (2001) Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* **305**: 285-298.
64. Brooks, P.C., Clark, R.A., Cheresch, D.A. (1994) Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science* **264**: 569-571.
65. Schlaepfer, D.D., Hauck, C.R., Sieg, D.J. (1999) Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol* **71**: 435-478.
66. Longhurst, C.M., Jennings, L.K. (1998) Integrin-mediated signal transduction. *Cell Mol Life Sci* **54**: 514-526.
67. Stupack, D.G., Puente, X.S., Boutsaboualoy, S., Storgard, C.M., Cheresch, D.A. (2001) Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *J Cell Biol* **155**: 459-470.
68. Xiong, J.P., Stehle, T., Diefenbach, B., Zhang, R., Dunker, R., Scott, D.L., Joachimiak, A., Goodman, S.L., Arnaout, M.A. (2001) Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science* **294**: 339-345.
69. Xiong, J.P., Stehle, T., Zhang, R., Joachimiak, A., Frech, M., Goodman, S.L., Arnaout, M.A. (2002) Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science* **296**: 151-155.
70. Gottschalk, K.E., Gunther, R., Kessler, H. (2002) A three-state mechanism of integrin activation and signal transduction for integrin alpha(v)beta(3). *ChemBiochem* **3**: 470-473.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

71. Pierschbacher, M.D., Ruoslahti, E. (1984) Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 5985-5988.
72. Pierschbacher, M.D., Ruoslahti, E. (1984) Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* **309**: 30-33.
73. Ruoslahti, E., Pierschbacher, M.D. (1987) New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* **238**: 491-497.
74. Albelda, S.M., Buck, C.A. (1990) Integrins and other cell adhesion molecules. *Faseb J* **4**: 2868-2880.
75. Humphries, M.J. (1990) The molecular basis and specificity of integrin-ligand interactions. *J Cell Sci* **97 (Pt 4)**: 585-592.
76. Ruoslahti, E. (1991) Integrins. *J Clin Invest* **87**: 1-5.
77. Hautanen, A., Gailit, J., Mann, D.M., Ruoslahti, E. (1989) Effects of modifications of the RGD sequence and its context on recognition by the fibronectin receptor. *J Biol Chem* **264**: 1437-1442.
78. Pierschbacher, M.D., Ruoslahti, E. (1987) Influence of stereochemistry of the sequence Arg-Gly-Asp-Xaa on binding specificity in cell adhesion. *J Biol Chem* **262**: 17294-17298.
79. Miller, W.H., Keenan, R.M., Willette, R.N., Lark, M.W. (2000) Identification and in vivo efficacy of small-molecule antagonists of integrin α v β 3 (the vitronectin receptor). *Drug Discov Today* **5**: 397-408.
80. Marugan, J.J., Manthey, C., Anaclerio, B., Lafrance, L., Lu, T., Markotan, T., Leonard, K.A., Crysler, C., Eisennagel, S., Dasgupta, M., Tomczuk, B. (2005) Design, synthesis, and biological evaluation of novel potent and selective α v β 3/ α v β 5 integrin dual inhibitors with improved bioavailability. Selection of the molecular core. *J Med Chem* **48**: 926-934.
81. Goodman, S.L., Holzemann, G., Sulyok, G.A., Kessler, H. (2002) Nanomolar small molecule inhibitors for α v β 6, α v β 5, and α v β 3 integrins. *J Med Chem* **45**: 1045-1051.
82. Haubner, R., Gratias, R., Diefenbach, B., Goodman, S., Joachimiak, A., Kessler, H. (1996) Structural and Functional Aspects of RGD-Containing Cyclic Pentapeptides as Highly Potent and Selective Integrin α v β 3 Antagonists. *J. Am. Chem. Soc.* **118**: 7461-7472.
83. Mitjans, F., Meyer, T., Fittschen, C., Goodman, S., Jonczyk, A., Marshall, J.F., Reyes, G., Piulats, J. (2000) In vivo therapy of malignant melanoma by means of antagonists of α v integrins. *Int J Cancer* **87**: 716-723.
84. Dechantsreiter, M.A., Planker, E., Matha, B., Lohof, E., Holzemann, G., Jonczyk, A., Goodman, S.L., Kessler, H. (1999) N-Methylated cyclic RGD peptides as highly active and selective α v β 3 integrin antagonists. *J Med Chem* **42**: 3033-3040.
85. Sulyok, G.A., Gibson, C., Goodman, S.L., Holzemann, G., Wiesner, M., Kessler, H. (2001) Solid-phase synthesis of a nonpeptide RGD mimetic library: new selective α v β 3 integrin antagonists. *J Med Chem* **44**: 1938-1950.
86. Belvisi, L., Bernardi, A., Checchia, A., Manzoni, L., Potenza, D., Scolastico, C., Castorina, M., Cupelli, A., Giannini, G., Carminati, P., Pisano, C. (2001) Potent integrin antagonists from a small library of RGD-including cyclic pseudopeptides. *Org Lett* **3**: 1001-1004.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
87. Posey, J.A., Khazaeli, M.B., DelGrosso, A., Saleh, M.N., Lin, C.Y., Huse, W., LoBuglio, A.F. (2001) A pilot trial of Vitaxin, a humanized anti-vitronectin receptor (anti alpha v beta 3) antibody in patients with metastatic cancer. *Cancer Biother Radiopharm* **16**: 125-132.
88. Kessler. (1982) Peptide conformations. Part 16. Solid-state carbon-13 NMR spectra of cyclotriprolines. *Angewandte Chemie* **94**: 509-520.
89. Aumailley, M., Gurrath, M., Muller, G., Calvete, J., Timpl, R., Kessler, H. (1991) Arg-Gly-Asp constrained within cyclic pentapeptides. Strong and selective inhibitors of cell adhesion to vitronectin and laminin fragment P1. *FEBS Lett* **291**: 50-54.
90. Kessler, H., Gratias, R., Hessler, G., Gurrath, M., Mueller, G. (1996) Conformation of cyclic peptides. Principle concepts and the design of selectivity and superactivity in bioactive sequences by spatial screening. *Pure and Applied Chemistry* **68**: 1201-1205.
91. Kessler, H., Diefenbach, B., Finsinger, D., Geyer, A., Gurrath, M., Goodman, S.L., Hoelzemann, G., Haubner, R., Jonczyk, A. (1995) Design and superactive and selective integrin receptor antagonists containing the RGD sequence. *Letters in Peptide Science* **2**: 155-160.
92. Haubner, R., Schmitt, W., Holzemann, G., Goodman, S., Jonczyk, A., Kessler, H. (1996) Cyclic RGD Peptides Containing beta-turn mimetics. *J. Am. Chem. Soc.* **118**: 7881-7891.
93. Haubner, R., Finsinger, D., Kessler, H. (1997) Stereoisomeric peptide libraries and peptidomimetics for designing selective inhibitors of the avb3 integrin for a new cancer therapy. *Angewandte Chemie, International Edition in English* **36**: 1374-1389.
94. Kawaguchi, M., Hosotani, R., Ohishi, S., Fujii, N., Tulachan, S.S., Koizumi, M., Toyoda, E., Masui, T., Nakajima, S., Tsuji, S., Ida, J., Fujimoto, K., Wada, M., Doi, R., Imamura, M. (2001) A novel synthetic Arg-Gly-Asp-containing peptide cyclo(-RGDf==V-) is the potent inhibitor of angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* **288**: 711-717.
95. Coleman, P.J., Brashear, K.M., Hunt, C.A., Hoffman, W.F., Hutchinson, J.H., Breslin, M.J., McVean, C.A., Askew, B.C., Hartman, G.D., Rodan, S.B., Rodan, G.A., Leu, C.T., Prueksaritanont, T., Fernandez-Metzler, C., Ma, B. et al. (2002) Non-peptide alpha(v)beta(3) antagonists. Part 3: identification of potent RGD mimetics incorporating novel beta-amino acids as aspartic acid replacements. *Bioorg Med Chem Lett* **12**: 31-34.
96. Kumar, C.C., Malkowski, M., Yin, Z., Tanghetti, E., Yaremko, B., Nechuta, T., Varner, J., Liu, M., Smith, E.M., Neustadt, B., Presta, M., Armstrong, L. (2001) Inhibition of angiogenesis and tumor growth by SCH221153, a dual alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 integrin receptor antagonist. *Cancer Res* **61**: 2232-2238.
97. Pasqualini, R., Koivunen, E., Ruoslahti, E. (1997) Alpha v integrins as receptors for tumor targeting by circulating ligands. *Nat Biotechnol* **15**: 542-546.
98. Urbahns, K., Harter, M., Albers, M., Schmidt, D., Stelte-Ludwig, B., Bruggemeier, U., Vaupel, A., Gerdes, C. (2002) Biphenyls as potent vitronectin receptor antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* **12**: 205-208.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
99. van Well, R.M., Overkleeft, H.S., van der Marel, G.A., Bruss, D., Thibault, G., de Groot, P.G., van Boom, J.H., Overhand, M. (2003) Solid-phase synthesis of cyclic RGD-furanoid sugar amino acid peptides as integrin inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **13**: 331-334.
100. Manthey, C., Lee, Y., Wang, A., Crysler, C., Zhao, S., Bone, R.F., Tomczuk, B.E. (2001) Characterization of O-Guanidines as Novel α V β 3 Inhibitors. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **42**: 368.
101. Eskens, F.A., Dumez, H., Hoekstra, R., Perschl, A., Brindley, C., Bottcher, S., Wynendaele, W., Dreves, J., Verweij, J., van Oosterom, A.T. (2003) Phase I and pharmacokinetic study of continuous twice weekly intravenous administration of Cilengitide (EMD 121974), a novel inhibitor of the integrins α v β 3 and α v β 5 in patients with advanced solid tumours. *Eur J Cancer* **39**: 917-926.
102. Gante, J. (1994) Peptidomimetics - Tailored Enzyme Inhibitors. *Angewandte Chemie International Edition in English* **33**: 1699-1720.
103. Gante, J. (1989) Azapeptides. *Synthesis*: 405-413.
104. Gibson, C., Goodman, S.L., Hahn, D., Hoelzemann, G., Kessler, H. (1999) Novel solid-phase synthesis of azapeptides and azapeptoids via Fmoc-strategy and its application in the synthesis of RGD-mimetics. *Journal of Organic Chemistry* **64**: 7388-7394.
105. Gould, R.J., Polokoff, M.A., Friedman, P.A., Huang, T.F., Holt, J.C., Cook, J.J., Niewiarowski, S. (1990) Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. *Proc Soc Exp Biol Med* **195**: 168-171.
106. Niewiarowski, S., McLane, M.A., Kloczewiak, M., Stewart, G.J. (1994) Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. *Semin Hematol* **31**: 289-300.
107. Gan, Z.R., Gould, R.J., Jacobs, J.W., Friedman, P.A., Polokoff, M.A. (1988) Echistatin. A potent platelet aggregation inhibitor from the venom of the viper, *Echis carinatus*. *J Biol Chem* **263**: 19827-32.
108. Marcinkiewicz, C., Rosenthal, L.A., Mosser, D.M., Kunicki, T.J., Niewiarowski, S. (1996) Immunological characterization of eristostatin and echistatin binding sites on α IIb β 3 and α V β 3 integrins. *Biochem J* **317 (Pt 3)**: 817-825.
109. Yamada, K.M., Even-Ram, S. (2002) Integrin regulation of growth factor receptors. *Nature Cell Biology* **4**: E75-E76.
110. Brooks, P.C., Stromblad, S., Sanders, L.C., von Schalscha, T.L., Aimes, R.T., Stetler-Stevenson, W.G., Quigley, J.P., Cheresch, D.A. (1996) Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin α v β 3. *Cell* **85**: 683-693.
111. De, S., Razorenova, O., McCabe, N.P., O'Toole, T., Qin, J., Byzova, T.V. (2005) VEGF-integrin interplay controls tumor growth and vascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 7589-7594.
112. Mizukami, Y., Jo, W.S., Duerr, E.M., Gala, M., Li, J., Zhang, X., Zimmer, M.A., Iliopoulos, O., Zukerberg, L.R., Kohgo, Y., Lynch, M.P., Rueda, B.R., Chung, D.C. (2005) Induction of interleukin-8 preserves the angiogenic response in HIF-1 α -deficient colon cancer cells. *Nat Med* **11**: 992-997.
113. Carmeliet, P. (2000) VEGF gene therapy: stimulating angiogenesis or angioma-genesis? *Nat Med* **6**: 1102-1103.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
114. Weis, S.M., Cheresh, D.A. (2005) Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature* **437**: 497-504.
115. Liu, S., Edwards, D.S. (1999) ^{99m}Tc-Labeled Small Peptides as Diagnostic Radiopharmaceuticals. *Chem Rev* **99**: 2235-2268.
116. Li, S., Peck-Radosavljevic, M., Kienast, O., Preitfellner, J., Hamilton, G., Kurtaran, A., Pirich, C., Angelberger, P., Dudczak, R. (2003) Imaging gastrointestinal tumours using vascular endothelial growth factor-165 (VEGF165) receptor scintigraphy. *Ann Oncol* **14**: 1274-1277.
117. Miller, J.C., Pien, H.H., Sahani, D., Sorensen, A.G., Thrall, J.H. (2005) Imaging angiogenesis: applications and potential for drug development. *J Natl Cancer Inst* **97**: 172-187.

Legends

Figure 1. X-ray structure of VEGF-Flt1_{D2} complex (pdb 1FLT). Domain 2 of Flt-1 receptor is reported in orange, VEGF monomers are in green and red.

Figure 2. Structure of known peptide modulating the VEGF-dependent angiogenesis. A) Crystallographic structure of peptide v114 (yellow) in complex with VEGF; B) NMR structure of peptide v114 (yellow) bound to VEGF; C) backbone superposition of the NMR structure of peptide QK (red) and the VEGF helix structure (blue). Side-chains of the residues interacting with receptor are shown.

Figure 3. Ribbon drawing of the structure of integrin $\alpha_v\beta_3$ -cyclo(RGDf-NMeV) complex. α_v and β_3 subunits are shown in red and blue, respectively, while cyclo(RGDf-NMeV) peptide is shown in yellow

Table 1: Endogenous angiogenic regulators

Pro-angiogenic	Anti-angiogenic
Acidic fibroblast growth factor	2-Methoxyoestradiol
Angiogenin	Angioarrestin
Angiopoietin-1	Angiostatin
B61/LERK-1	Angiotensin
Basic fibroblast growth factor	Antiangiogenic antithrombin III
Del-1	Endostatin
Erythropoietin	Fibronectin peptide
Follistatin	Gro- β
Gangliosides	Human chorionic gonadotropin (hCG)
Granulocyte colony-stimulating factor	Hyaluronan
Granulocyte macrophage colony-stimulating factor	Interferon γ -inducible protein 10
Hepatocyte growth factor	Interferons
Hyaluronan oligosaccharides	Interleukin 12
Insulin-like growth factor	Kringles 5
Interleukin 8	Laminin peptide
Leptin	Plasminogen activator inhibitors
Midkine	Platelet factor 4
Monocyte chemoattractant protein 1	Prolactin 16kD fragment
Oestrogens	Proliferin-related protein
Placenta growth factor	Thrombospondin
Platelet-derived endothelial cell growth factor	Thrombospondin-1
Platelet-derived growth factor	Tissue inhibitors of metalloproteinase
Pleiotrophin	Transforming growth factor-beta (TGF- β)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Progranulin	Tumour necrosis factor α (high dose)
Proliferin	Tumstatin
Prostaglandin E ₁ , E ₂	Vasculostatin
Transforming growth factor α and β	Vasostatin (calreticulin fragment)
Tumour necrosis factor α (low dose)	
Vascular endothelial growth factor	

For Peer Review Only

Table 2: Peptide modulating the VEGF-dependent angiogenesis

Name	Sequence	Method	Target	Ref.
<i>Antagonist</i>				
V114	VEPN C DIHVMWEW E CFERL-amide	Phage library	VEGF	(51)
KDR 247-261	RTELNVGIDFNWEYP	Sequence analysis	VEGF	(59)
AR peptide	RRKRRR	Peptide library	VEGF	(57)
V1	ATWLPPR	Phage library	KDR	(52)
VEGF 125-136	QKRKRKKSRYKS	Sequence analysis	KDR/Flt-1	(58)
K237	HTMYHHYQHHL	Phage library	KDR	(54)
Ciclo-VEGI	Cycle(fPQIMRIKPHQGQHIGE)	Peptide design	KDR/Flt-1	(56)
SPV5.2	NGYEIEWYSWVTHGMY	Phage library	Flt-1	(53)
F56	WHSDMEWWYLLG	Phage library	Flt-1	(55)
<i>Agonist</i>				
HIV TAT 46-60	SYGRKKRRQRRRAPQ	Sequence analysis	KDR/Flt-1	(60)
QK	Ac-KLTWQELYQLKYKGI-amide	Peptide design	KDR/Flt-1	(61)

In bold cystine forming disulfide bridge

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

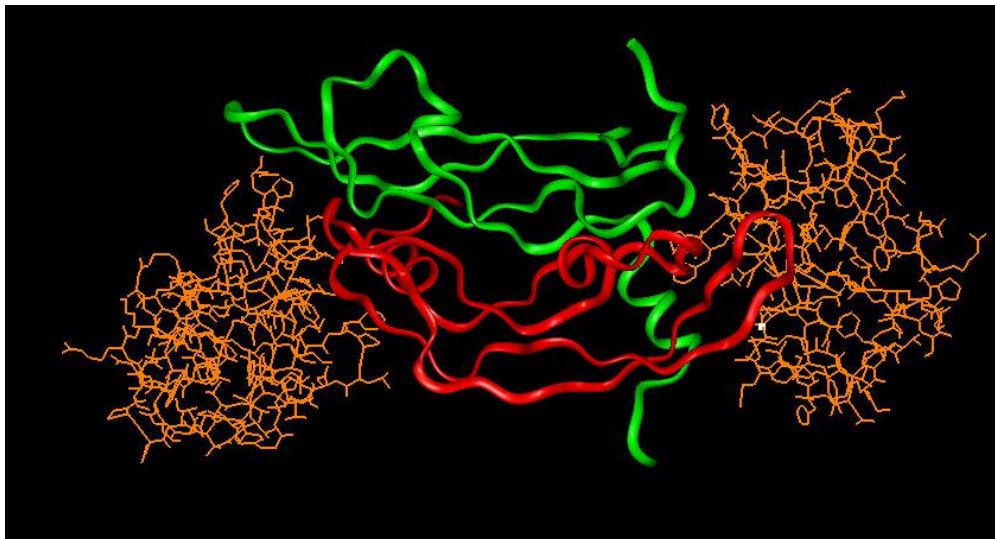


Figure 1

Review Only

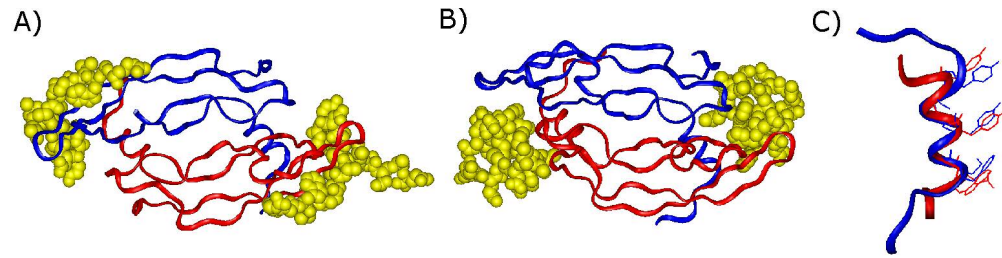


Figure 2

Peer Review Only

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

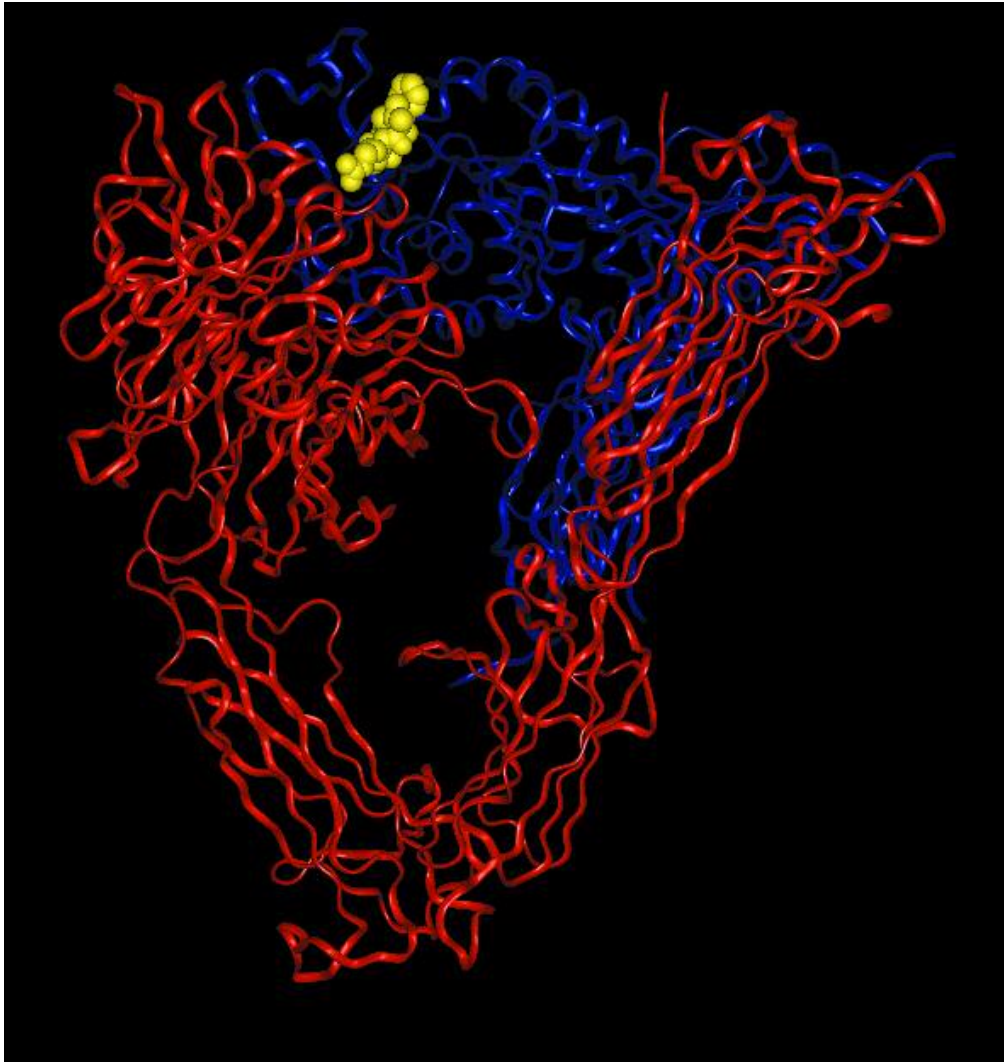


Figure 3

