

## ANGIOGENESI

L'angiogenesi è un processo fisiologico che permette la formazione di nuovi vasi sanguigni a partire da vasi preesistenti; in questo processo giocano un ruolo fondamentale la migrazione e la proliferazione delle cellule endoteliali. Tali cellule sono particolarmente attive durante lo sviluppo embrionale, mentre, in un adulto il loro turnover è molto lento e limitato a particolari fenomeni fisiologici, quali l'ovulazione, i processi di riparazione tissutale e di cicatrizzazione<sup>1</sup>. L'angiogenesi è finemente regolata da un equilibrio tra fattori pro-angiogenici e anti-angiogenici (Tabella 1).

**Tabella 1: Alcuni fattori regolatori endogeni dell'angiogenesi**

<b>PRO-ANGIOGENICI</b>	<b>ANTI-ANGIOGENICI</b>
Angiogenina	Angioarrestina
Angiopoietina- 1	Angiotensina
a-FGF	Tumstatina
b-FGF	Interferoni
Eritropoietina	Angiostatina
TNF- $\alpha$ (bassi livelli)	TNF- $\alpha$ (alti livelli)
Interleuchina-8	Interleuchina-12
VEGF	Inibitori tissutali delle metalloproteasi
PIGF	Vasculostatina
PDGF	Trombospondina
Prostaglandine E <sub>1</sub> , E <sub>2</sub>	Endostatina
TGF- $\alpha$ e TGF- $\beta$	Inibitori dell'attivatore del plasminogeno

Se questo equilibrio viene a mancare (switch angiogenico) a causa di specifici stimoli come l'ipossia, si genera un processo angiogenico patologico<sup>2</sup>. La prevalenza di fattori pro-angiogenici è associata a gravi malattie quali cancro, retinopatie, artrite reumatoide, psoriasi. Invece, un'insufficiente angiogenesi sta alla base di malattie vascolari a carattere obliterante, quali coronaropatie di natura ostruttiva o arteropatie ostruttive periferiche (morbo di Buerger) che hanno come comune denominatore l'ischemia tissutale che si genera a valle dell'ostruzione vasale<sup>3</sup>.

Il meccanismo dell'angiogenesi è molto complesso in quanto la formazione di un vaso a partire da vasi preesistenti passa attraverso diversi stadi ben definiti, caratterizzati da modificazioni dell'endotelio e della matrice extracellulare<sup>4</sup>.

Nella prima tappa dell'angiogenesi si verifica una “destabilizzazione” dei vasi preesistenti dovuta ad un aumento della permeabilità vasale ed una perdita delle connessioni tra le cellule endoteliali. Segue una seconda fase di migrazione e proliferazione delle cellule endoteliali nel punto del tessuto dove è necessaria la formazione di nuovi vasi. Nel corso di tale fase vengono liberati vari enzimi proteolitici che alterano la densità della matrice extracellulare allo scopo di facilitare l'attività migratoria delle cellule endoteliali. Il terzo stadio dell'angiogenesi corrisponde alla differenziazione delle cellule endoteliali ed è caratterizzata da arresto della proliferazione cellulare e formazione di capillari primitivi. L'ultima tappa di maturazione

funzionale è caratterizzata dal reclutamento di cellule periendotheliali di supporto quali periciti e cellule muscolari lisce, nonché alla riorganizzazione delle interazioni cellulari<sup>5</sup>.

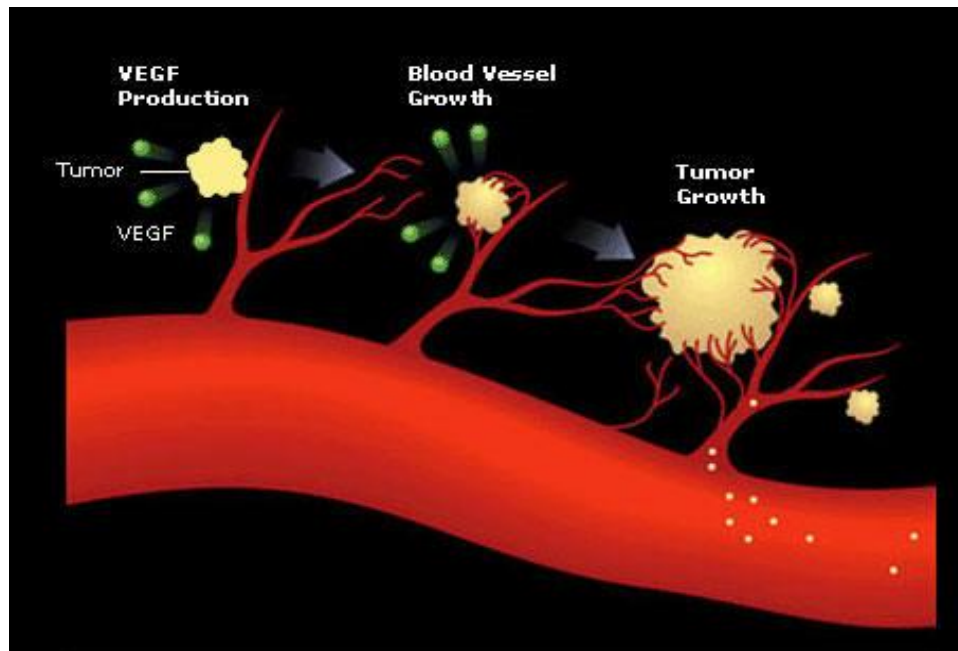
## ANGIOGENESI TUMORALE

La maggior parte dei pazienti affetti dal cancro muoiono a causa delle metastasi che si generano e che sono resistenti alle terapie convenzionali. Uno dei maggiori ostacoli al trattamento delle metastasi è l'eterogeneità biologica delle neoplasie e la capacità dei differenti organi di modificare la risposta delle cellule tumorali in metastasi alla terapia<sup>6</sup>.

Il processo di metastasi è altamente selettivo, in quanto favorisce la sopravvivenza e la crescita di una piccola sottopopolazione di cellule che preesistono nell'eterogenea neoplasia originaria<sup>7</sup>. Il progredire delle metastasi dipende strettamente dalle interazioni multiple delle cellule metastatiche con meccanismi omeostatici. Quasi tutte le neoplasie maligne sono in grado di usurpare i meccanismi omeostatici per poter crescere; l'angiogenesi tumorale è un esempio eccellente<sup>8</sup>.

La sopravvivenza e la crescita delle cellule dipende da un adeguato apporto di ossigeno e di sostanze nutritive e dall'eliminazione di tutto ciò che è tossico. L'ossigeno può diffondersi dai capillari fino a una distanza di 150-200 µm. Quando la distanza delle cellule dal vaso aumenta, non essendoci più nutrimento, le cellule muoiono<sup>9</sup>. Così, l'espansione della massa tumorale al di là del millimetro di diametro dipende dalla neovascolarizzazione e quindi dal processo di angiogenesi<sup>10</sup>. Quando le cellule tumorali cominciano a duplicarsi indiscriminatamente, viene indotto uno squilibrio tra fattori pro-angiogenici e

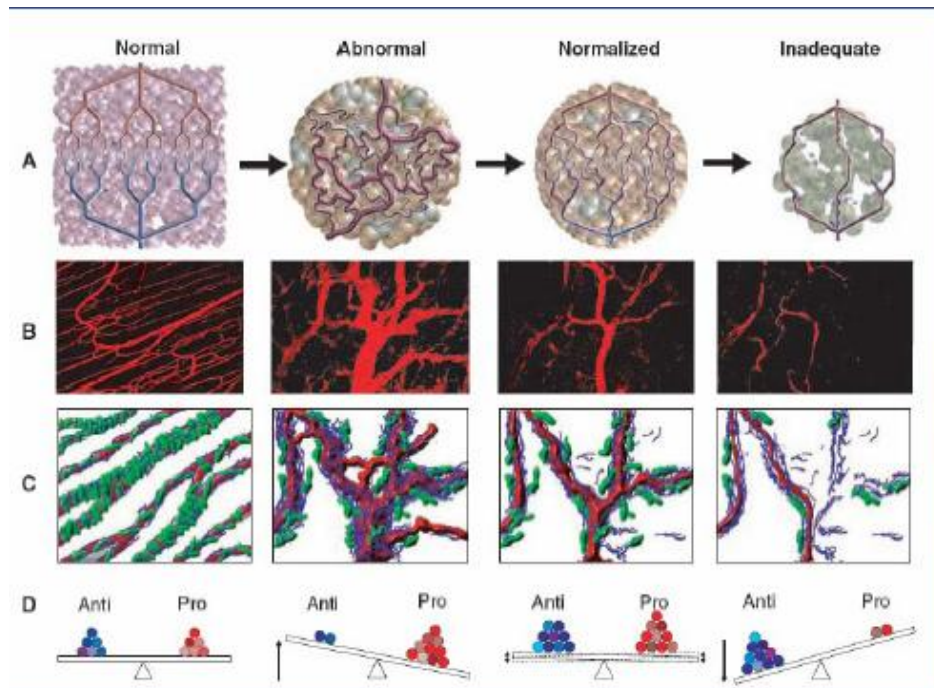
fattori anti-angiogenici, promuovendo la formazione di una rete vascolare per soddisfare il fabbisogno di ossigeno e di nutrienti permettendo la crescita del tumore<sup>11</sup>. Inoltre, i nuovi vasi sono uno dei modi attraverso cui il tumore può portare alla formazione di metastasi (Figura 1).



**Figura 1 Angiogenesi tumorale**

Lo switch angiogenico può verificarsi in qualsiasi fase della progressione tumorale, in dipendenza del tipo di tumore, ma, nella maggior parte dei casi, risulta essere un prerequisito per la crescita del tumore stesso.

Ci sono molte differenze tra i vasi del tumore e quelli normali. Infatti i vasi del tumore sono strutturalmente disorganizzati, tortuosi e dilatati ed esprimono sulla loro superficie markers peculiari, che possono essere usati come target nell'analisi dello stadio del tumore nei pazienti<sup>11,12</sup> (Figura 2).



**Figura 2 Switch angiogenico e formazione di vasi anormali**

Attualmente in fase clinica esistono oltre 60 composti, tra inibitori ed attivatori dell'angiogenesi; i primi utili in vari tipi di neoplasie, i secondi nelle patologie cardiache. Considerando la terapia antitumorale, gli inibitori angiogenici sono, generalmente più sicuri e meno tossici dei normali agenti chemioterapici attualmente in uso, anche se la loro somministrazione come farmaci antitumorali è piuttosto rara. Questo perché un grandissimo numero di fattori di crescita è coinvolto nel processo di angiogenesi tumorale ed il blocco di un solo fattore potrebbe non essere sufficiente a inibire l'angiogenesi per un lungo periodo di tempo in quanto il tumore potrebbe compensare la perdita di quel fattore di crescita mediante una massiccia produzione degli altri fattori coinvolti. Inoltre, questi composti potrebbero

arrestare la crescita del tumore ma non eliminarlo; c'è da dire, poi, che i vari tipi di tumore rispondono diversamente alla terapia angiogenica e addirittura pazienti, affetti dallo stesso tipo di neoplasia, rispondono diversamente alla medesima terapia<sup>13</sup>.

Uno dei vantaggi di questo tipo di terapia è che ha come target le cellule endoteliali, che supportano la crescita della massa tumorale, piuttosto che le cellule tumorali stesse. Le cellule endoteliali sono geneticamente stabili e perciò difficilmente riescono ad essere mutate, cosa che permette di sviluppare resistenza ai farmaci.<sup>11</sup> Nonostante i vari problemi che una terapia anti-angiogenica può presentare, il mondo scientifico continua ad interessarsi ad essa. Questo perché, gli inibitori dell'angiogenesi, se usati in associazione alle terapie tradizionali, incrementano l'efficacia terapeutica senza però aumentare il rischio di effetti collaterali tossici. Questo sinergismo potrebbe essere spiegato dalla scoperta che gli inibitori dell'angiogenesi sembrano normalizzare i vasi tumorali prima di eliminarli, permettendo al farmaco di raggiungere più facilmente il tumore<sup>14</sup>. Insomma, lo scopo della terapia anti-angiogenica nel cancro è indurre il blocco della crescita tumorale, creando le condizioni per un ulteriore intervento farmacologico con sostanze che agiscono direttamente sul tumore con differenti meccanismi d'azione.

Durante il corso di dottorato l'attività di ricerca si è incentrata sia sui fattori di crescita VEGF e PlGF, implicati nel processo di angiogenesi, che sulla

progettazione e sintesi di nuove molecole attive sui recettori delle integrine  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_5$  che, in presenza di cancro, sono superespressi sia dalle cellule endoteliali che da quelle tumorali. Poiché queste integrine normalmente sono poco espresse sulla superficie cellulare, esse rappresentano dei validi “markers angiogenici”.

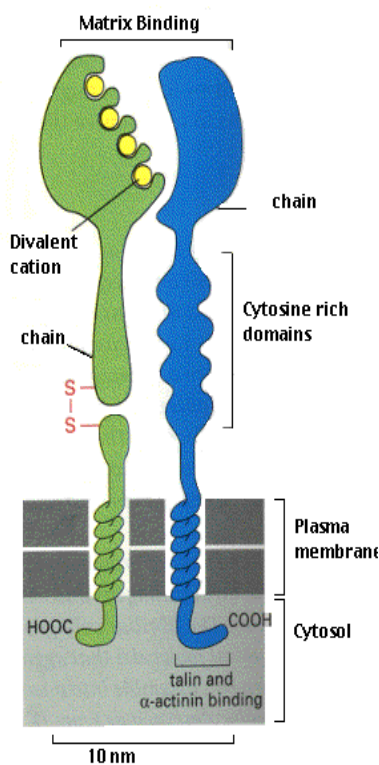
Inoltre, è stato effettuato uno studio SAR della sequenza peptidica SRSRY legata all’attivazione del recettore dell’urochinasasi uPAR.

Questi tre aspetti di ricerca, cardini dell’attività di laboratorio svolta durante il corso di dottorato, verranno esaminati e trattati separatamente di seguito; inoltre, verranno date esauriente descrizione dei risultati ottenuti e le relative discussioni degli stessi.



## ***CAPITOLO 1***

## LE INTEGRINE



**Figura 1**  
**Schematizzazione**  
**di un'integrina**

Le integrine sono glicoproteine transmembranarie eterodimeriche, costituite da una subunità  $\alpha$  e una subunità  $\beta$  e hanno un ruolo cruciale nei processi di adesione cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare<sup>1</sup>. Nei mammiferi esistono attualmente 19 diverse subunità  $\alpha$  e 8 subunità  $\beta$ , che si assemblano a formare ben 26 tipi diversi di recettori<sup>2</sup>. La subunità  $\alpha$  più grande (costituita da 1100 amminoacidi circa) è costituita da catene di diversa lunghezza tenute insieme da due ponti disolfuro. La parte

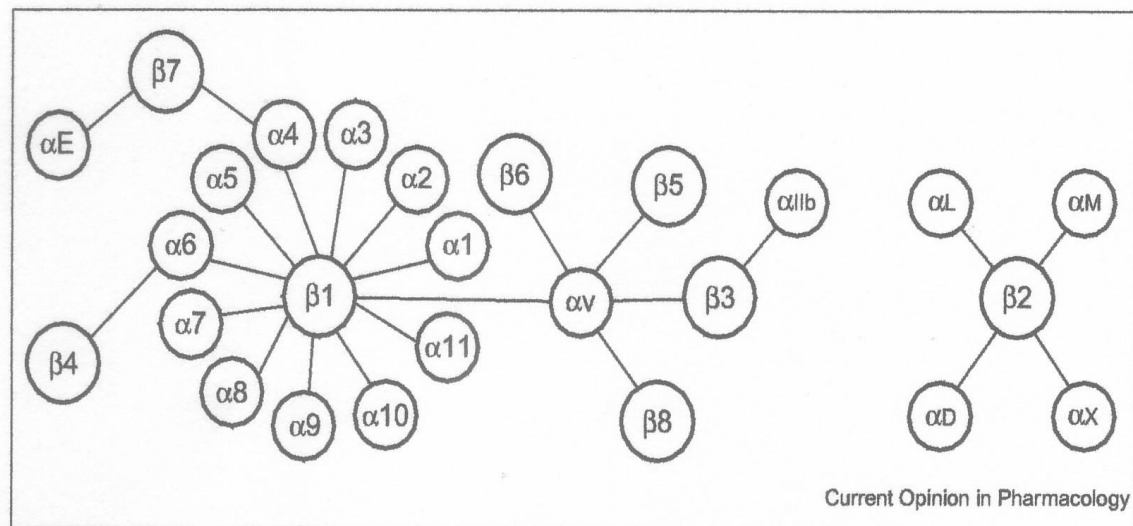
extracellulare della subunità  $\alpha$  è caratterizzata da 3 o 4 regioni, prossime al terminale amminico, costituite da 12 a 15 residui amminoacidici capaci di legare cationi bivalenti quali  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++3}$ . L'analisi ai raggi X<sup>4</sup> del dominio A della subunità  $\alpha$  indica l'importanza dei siti di interazione con i cationi per il legame con il ligando. Infatti la presenza di ioni metallici fa aumentare l'affinità di legame per il ligando<sup>5,6,7</sup>.

La subunità  $\beta$  solitamente è costituita da circa 800 amminoacidi, ad eccezione della  $\beta_4$ <sup>8</sup> (circa 1750 amminoacidi) e contiene adiacente al dominio transmembranario quattro regioni altamente conservate, ricche di residui di

cisteina e un grande loop al terminale amminico. Sia la subunità  $\alpha$  che quella  $\beta$  hanno un piccola regione transmembranaria (20-30 residui) ed una regione intracellulare (20-50 residui).

Il terminale carbossilico della subunità  $\beta^9$  mette in connessione l'integrina con i filamenti di actina del citoscheletro mediante delle proteine intracellulari quali talina, vinculina e  $\alpha$ -actinina<sup>10</sup>. Questo permette l'attacco delle cellule alla matrice extracellulare e la trasduzione del segnale all'interno della cellula (Figura 1).

Le integrine sono classificate in tre grandi sottofamiglie:  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ .



**Figura 2 Classificazione delle integrine**

Quelle appartenenti alla sottofamiglia  $\beta_1$ , ampiamente espresse, giocano un ruolo fondamentale nell'organizzazione tissutale. Esse permettono il legame di differenti cellule ad alcune proteine matriciali nei muscoli, nel sistema

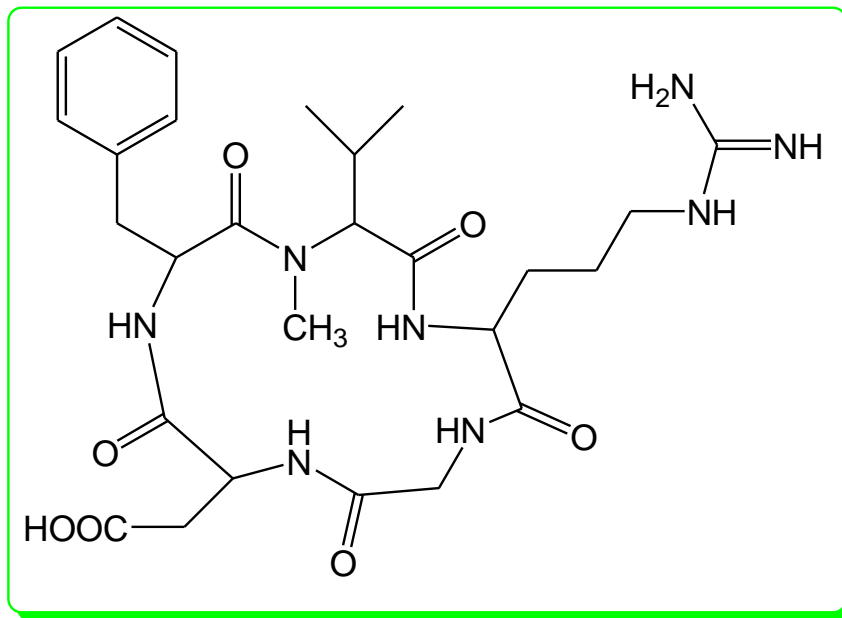
nervoso e si ritrovano anche nei leucociti<sup>9,11</sup>. Le integrine  $\beta_2$ , chiamate anche LeuCAM, si trovano principalmente sui leucociti e sulle cellule della microglia del tessuto neuronale<sup>12</sup>. Questi recettori hanno un ruolo primario nel sistema immunitario<sup>13</sup>.

Alla famiglia  $\beta_3$  appartengono 3 recettori:  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_{IIb}\beta_3$  e  $\alpha_x\beta_3$ <sup>14</sup>. Il recettore  $\alpha_{IIb}\beta_3$ <sup>15</sup> si trova soprattutto sulle piastrine ma ultimamente è stato riscontrato anche sulle cellule di melanoma<sup>16</sup>; esso è in grado di legare con diversa affinità un gran numero di proteine della matrice come il fibrinogeno, la fibronectina, la vitronectina, il fattore di von Willebrand, la trombospondina<sup>9,11</sup>.

L'integrina  $\alpha_v\beta_3$ , meglio conosciuta come recettore della vitronectina, si trova su quasi tutte le cellule originate dal mesenchima; essa può legare tutte le sopra citate proteine della matrice che legano anche il recettore  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , e poi anche la tenascina, il collagene denaturato di tipo I, l'osteopontina<sup>14</sup>.

Si è visto che questo recettore è fortemente espresso sulle cellule endoteliali attivate e su quelle di melanoma, mentre è debolmente espresso nei vasi sanguigni in quiescenza e nei melanomi pre-neoplastici<sup>17</sup>. Insieme al recettore  $\alpha_v\beta_5$ , il recettore  $\alpha_v\beta_3$  sembra essere coinvolto sia in processi fisiologici, quali l'angiogenesi e la riparazione dei tessuti che in quelli patologici, come l'angiogenesi tumore-indotta<sup>18</sup>, disturbi renali acuti, metastasi<sup>19</sup>. Contrariamente al fatto che entrambe le proteine possono legare la

vitronectina e prendono parte agli stessi processi, esse sono strutturalmente designate a rispondere a differenti cascate di segnali. Precedenti studi hanno messo in evidenza che l'angiogenesi indotta dal b-FGF è mediata dall' $\alpha_v\beta_3$ , mentre l'angiogenesi indotta dal VEGF è mediata dall' $\alpha_v\beta_5$ <sup>20</sup>. Cellule di melanoma esprimenti  $\alpha_v\beta_3$  migrano in vitro e metastatizzano in vivo senza la necessità di una stimolazione da parte di una citochina esogena<sup>21</sup>. Invece, le cellule tumorali esprimenti il recettore  $\alpha_v\beta_5$  hanno bisogno di segnali mediati da un recettore tirosin-chinasico per promuovere la motilità delle cellule<sup>22</sup>. L' $\alpha_v\beta_5$  è ampiamente espresso dalle cellule tumorali maligne, molto meno espresso è l'altro recettore<sup>23</sup>. Per questa ragione è importante sviluppare, sia a scopo diagnostico, che terapeutico, dei composti che siano selettivi verso i due recettori. Ad oggi, svariati composti, tra cui anticorpi<sup>24</sup>, piccole molecole peptidomimetiche<sup>25</sup>, peptidi ciclici<sup>26</sup>, sono stati valutati clinicamente e hanno mostrato di essere in grado di modulare i processi mediati dal recettore  $\alpha_v\beta_3$ . La cilengitide [cyclo(RGDf-NMeV)]<sup>27</sup> risulta il miglior antagonista del recettore  $\alpha_v\beta_3$  riportato in letteratura e attualmente si trova in fase clinica per la cura del sarcoma di Kaposi, dei tumori cerebrali e di altri tumori solidi molto diffusi<sup>28</sup>.

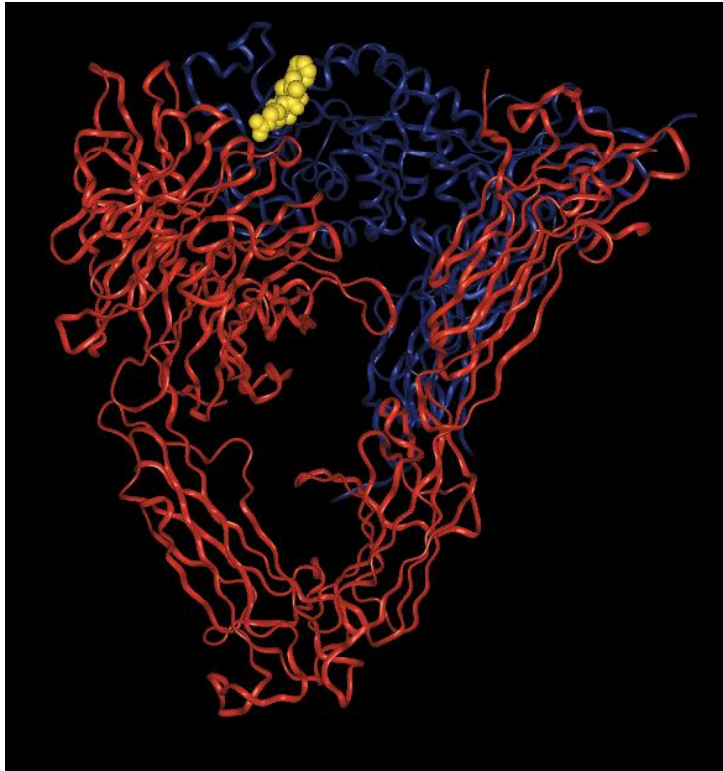


(Cilengitide)

Studi di cristallografia condotti sul segmento extracellulare dell'integrina  $\alpha_v\beta_3$ , sia nello stato libero che legato alla cilengitide e studi di docking con i ligandi hanno dimostrato che le principali interazioni avvengono tra l'arginina caricata positivamente e la subunità  $\alpha$ , e tra la catena laterale anionica dell'acido aspartico e la subunità  $\beta$ <sup>29</sup>. Inoltre studi precedenti hanno anche riportato che l'echistatina, un veleno proveniente dalla vipera, la più piccola disintegrina conosciuta, è un potente antagonista dei recettori  $\alpha_v\beta_5$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , e che gli amminoacidi adiacenti al *motif* comune RGD insieme ai residui C-terminali 41-49, sono critici per il riconoscimento selettivo delle integrine<sup>30</sup>.

## STUDI STRUTTURALI

Recentemente, la struttura cristallina del segmento extracellulare e dell'integrina  $\alpha_v\beta_3$ <sup>31</sup> è stata analizzata sia nel suo stato libero sia complessato con la cilengitide<sup>32</sup>.



**Figura 3**  
**Struttura**  
**dell'integrina**  
**alfa (come simbolo)v**  
**(come pedice)**  
**beta (come simbolo)3**  
**(come pedice)**  
**complessata con la**  
**cilengitide.**  
**Le subunità alfa v e**  
**beta3 sono**  
**rispettivamente**  
**mostrate in rosso e in**  
**blu mentre il peptide**  
**cilengitide è in giallo.**

La struttura cristallina del segmento extracellulare dell'integrina  $\alpha_v\beta_3$ , determinata in presenza di ioni  $\text{Ca}^{++}$ , indica che la testa ovoidale (approssimativamente  $90 \times 60 \times 45 \text{ \AA}$ ) contiene la regione N-terminale di entrambe le subunità. La subunità  $\alpha_v$  è costituita da 7 “*blades*” radicalmente arrangiate, ciascuna formata da *sheet* antiparalleli a quattro filamenti, mentre la subunità  $\beta_3$  è composta da un dominio A, definito “ *$\beta A$ -domain*”, in cui c'è

un sito di adesione ione-dipendente, che sembra avere una funzione di regolazione nel legame con i ligandi.

La coda della subunità  $\alpha_v$  è composta da tre domini  $\beta$ -sandwich: un dominio “*thigh*” tipo immunoglobulina e altri due domini molto simili tra loro che formano il modulo “*calf*”. La coda della subunità  $\beta_3$  è costituita da un dominio detto Plexins-Semaphorins-integrins, quattro domini EGF e un dominio  $\beta$ -tail. Le code delle due subunità si trovano sfalsate tra loro di un angolo di  $135^\circ$ , formando una struttura a V con un “*genu*” tra il dominio *thigh* ed il modulo *calf* della subunità  $\alpha_v$ .

Studi cristallografici del complesso  $\alpha_v\beta_3$ -[cyclo(RGDf-NMeV)] mettono in luce che il pentapeptide ciclico si inserisce in una cavità tra le due subunità alla testa del recettore<sup>32</sup>. Ciascun residuo della sequenza di base RGD, interagisce fortemente con il recettore; le catene laterali dell'arginina e dell'acido aspartico si dispongono in direzioni opposte. Il gruppo guanidinico della catena laterale dell'arginina interferisce solo con la subunità  $\alpha$ , mentre il gruppo carbossilico della catena laterale dell'acido aspartico solo con quella  $\beta$ <sup>32</sup>.

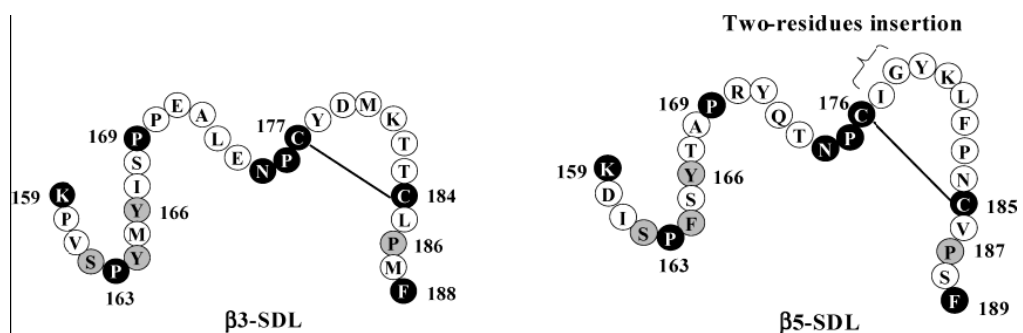
Il recettore  $\alpha_v\beta_5$ , invece, è stato studiato mediante “homology modeling” e docking ligando-recettore<sup>33</sup>.

I due recettori  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_5$  sono stati comparati nella loro sequenza primaria, nei siti di legame del *motif* comune RGD, e infine nei modi di interagire con



ligandi non selettivi e con ligandi selettivi per il recettore  $\alpha_v\beta_3$ . Le maggiori differenze tra le subunità  $\beta_3$  e  $\beta_5$  si osservano nella regione compresa tra i residui 159-188 (SDL) della  $\beta_3$ <sup>34</sup>.

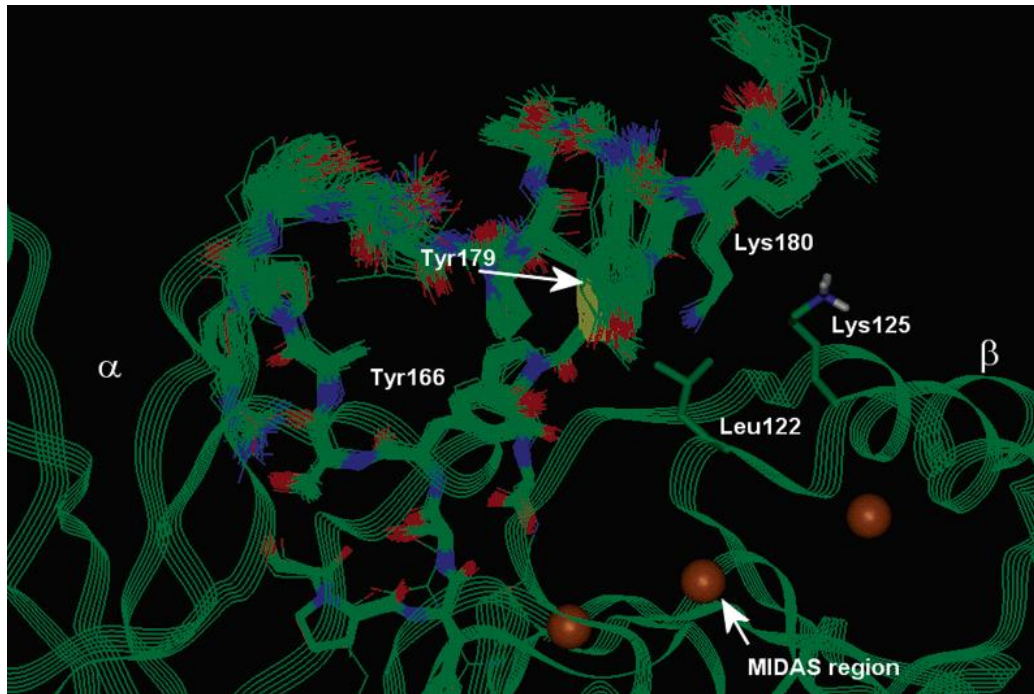
I due segmenti legati mediante un ponte disolfuro sono molto diversi nella sequenza nonché nel numero dei residui. La subunità  $\beta_5$  ha due residui in più e la maggior parte degli altri residui non è altamente conservata.



**Figura 4 Confronto tra beta3-SDL e beta-5 SDL**

La Pro<sup>163</sup>, la Pro<sup>169</sup> e la Pro<sup>176</sup> della subunità  $\beta_3$  sono tra i residui più altamente conservati all'interno delle varie subunità  $\beta$ . Inoltre il sito di legame per la sequenza RGD risulta altamente conservato nelle due integrine prese in esame. In particolare l'Arg<sup>214</sup>, l'Asn<sup>215</sup> e l'Arg<sup>216</sup> della subunità sono proprie di entrambe le integrine; invece, il residuo di Tyr in posizione 122, che interagisce con il gruppo fenolico della Phe quando l'  $\alpha_v\beta_3$  è complessato con

la cilengtide, è sostituito nell' $\alpha_v\beta_5$  da un residuo di leucina, molto più piccolo. La presenza di questa Leu permette la riorientazione della Tyr<sup>179</sup> e della Lys<sup>180</sup> e successiva formazione di un “roof” nei pressi del sito di legame per la sequenza RGD.



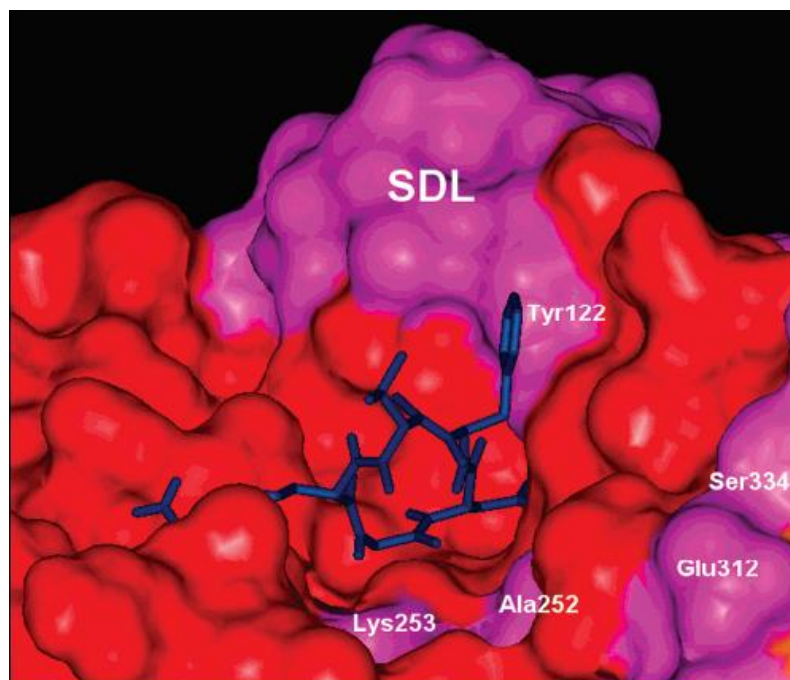
**Figura 5** Sito di legame per il ligando nell'integrina alfa v beta5

Di conseguenza il sito di legame per l'RGD nel recettore  $\alpha_v\beta_5$  è più ristretto rispetto a quello nell' $\alpha_v\beta_3$ ; questo fa sì che il legame di composti contenenti sostituenti ingombrati in prossimità della regione C-terminale risulti più difficoltoso.

Anche per il recettore  $\alpha_v\beta_5$  è indispensabile la regione dove vanno a legarsi i cationi bivalenti<sup>35</sup>; la sua importanza è testimoniata dal fatto che mutazioni

non conservative all'interno o prossime a questo *loop*, dove vanno a coordinarsi i metalli, causano la perdita dell'espressione dell'integrina<sup>36</sup>.

Ulteriori studi di docking effettuati con ligandi selettivi per l' $\alpha_v\beta_3$  contenenti la sequenza RGD e altri non selettivi per lo stesso recettore, abbinati a studi di mutagenesi, hanno permesso di comprendere che, nonostante le differenze strutturali, c'è un modo comune di legare i ligandi RGD mimetici per i due recettori  $\alpha_v$ .



**Figura 6** Disposizione del ligando nel sito di legame

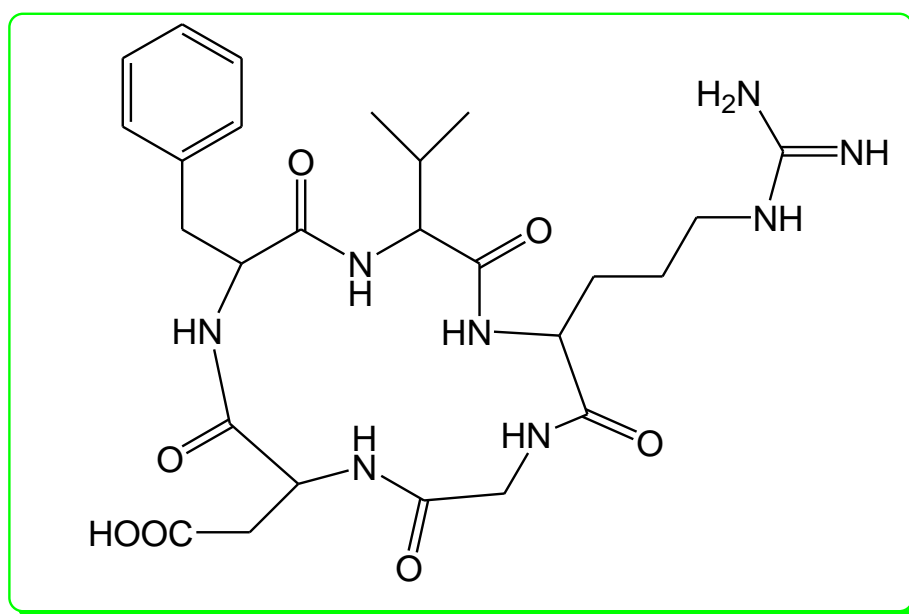
## IMPOSTAZIONE DELLA RICERCA

L'identificazione che la sequenza RGD contenuta nella fibronectina e in moltissime altre proteine della matrice<sup>37,38</sup> è fondamentale per il legame con il recettore, ha permesso di chiarire le basi molecolari dell'interazione cellula-matrice. Ciascun residuo di questo tripeptide ha un ruolo cruciale nell'interazione, in quanto, se si va a modificare anche uno solo dei tre residui, viene a mancare completamente l'affinità<sup>39</sup>. La ragione di un'elevata selettività per le diverse proteine di adesione, nonostante la presenza comune di questa piccola sequenza, non è ancora stata del tutto chiarita. Sicuramente hanno un ruolo fondamentale i residui adiacenti alla sequenza RGD e poi anche la conformazione assunta da tale sequenza è un elemento discriminante<sup>40</sup>.

In passato sono stati condotti, quindi, degli studi conformazionali su alcune proteine naturali della matrice. In ogni caso, il *motif* RGD è localizzato in un  $\beta$ II' turn tra due  $\beta$ -sheet che si estendono dal core della proteina.

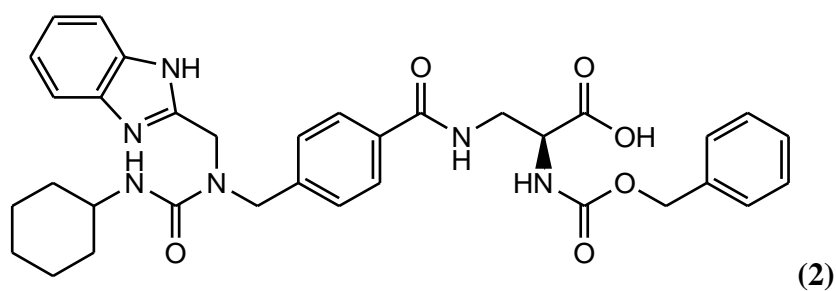
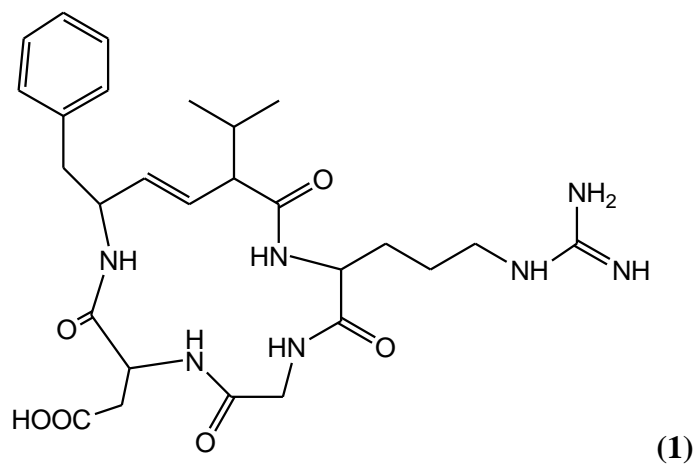
Studi strutturali sono stati condotti anche su molte disintegrine e hanno fatto evidenziare l'adattabilità strutturale della sequenza RGD. Dal momento che risulta difficile stabilire l'esatta conformazione di tale sequenza in strutture lineari dotate di elevata flessibilità e che la conoscenza della conformazione bioattiva è indispensabile per un design razionale di nuovi composti bioattivi, sono stati progettati e sintetizzati dei peptidi ciclici.

Sono stati, pertanto, sintetizzati inizialmente dei pentapeptidi ciclici in cui un singolo amminoacido con configurazione D, fosse in grado di indurre l'intera sequenza in una conformazione ben definita e ne facilitasse la ciclizzazione<sup>41,42</sup>. Tra i vari prodotti riportati in letteratura, il ciclopentapeptide [cyclo-(RGDfV)], noto anche come peptide di Kessler<sup>43</sup>, è il miglior composto, in quanto selettivo per il recettore  $\alpha_v\beta_3$ . Esso è caratterizzato dalla presenza di un residuo di D-Phe.

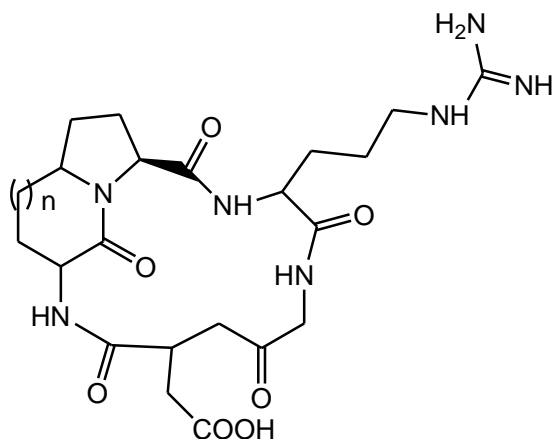


(Peptide di Kessler)

Questo composto è diventato un *lead compound* per lo sviluppo di librerie stereoisomeriche<sup>44</sup> di peptidi, peptidomimetici<sup>45,46,47</sup> e piccole molecole organiche<sup>48</sup>, quali ad esempio le strutture (1) e (2) di seguito riportate.

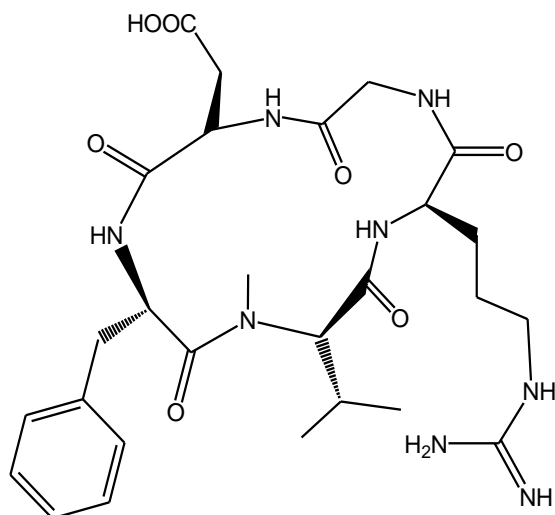


Partendo dal peptide di Kessler sono state successivamente effettuate numerose modifiche, come ad esempio l'introduzione di unità peptidomimetiche o di scaffolds zuccherini, per ottenere dei nuovi composti con una ridotta flessibilità. Tra i pseudopeptidi ciclici sintetizzati il composto (3) contiene unità di lattami biciclici legati alla classica sequenza RGD (6,5 e 7,5)<sup>49</sup> (3).



(3)

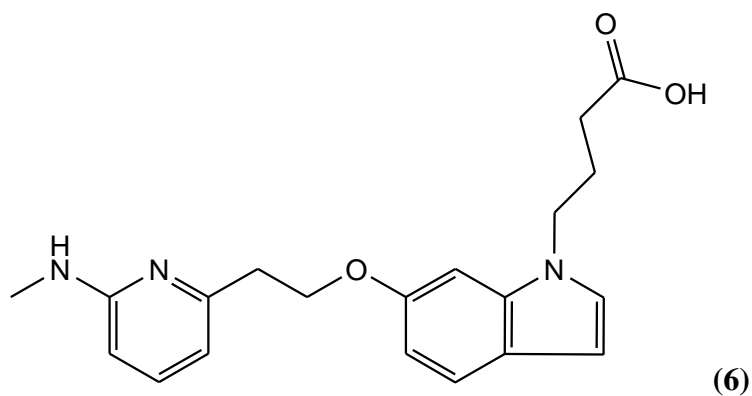
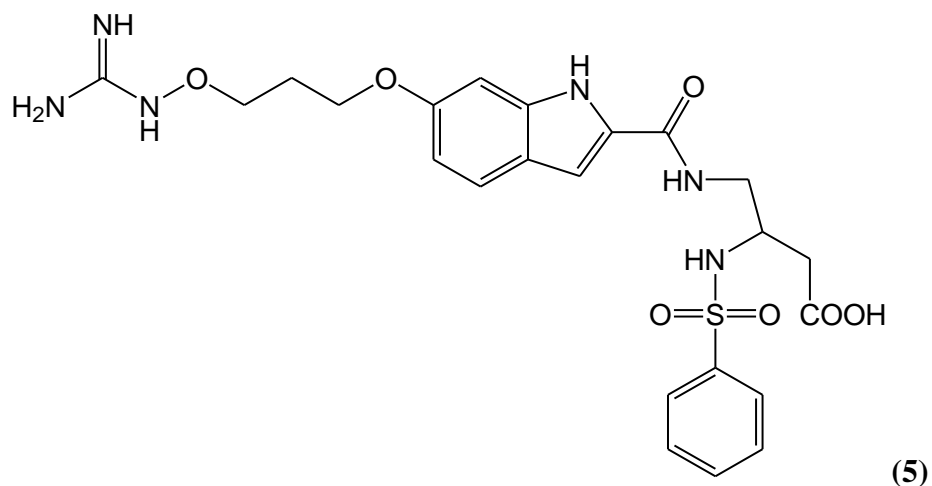
La N-metilazione dei legami ammidici presenti nella sequenza peptidica, è un valido strumento per condurre studi SAR ed esplorare gli elementi strutturali essenziali ai fini dell'attività. Infatti, l'introduzione di aminoacidi N<sup>α</sup>-metilati in diversi peptidi biologicamente attivi, ha permesso di ottenere peptidi con un profilo biologico migliorato; così, effettuando uno studio SAR mediante la N-metilazione del peptide ciclico cyclo-[RGDfV], il gruppo di Kessler ha ottenuto il peptide [cyclo(RGDf-N(Me)V)], chiamato cilengitide<sup>50</sup> (4), risultato più attivo del *lead compound*. Questo composto è in fase di studio clinico come inibitore dell'angiogenesi tumorale. La cilengitide (4) risulta essere molto sicura, anche se usata per un trattamento prolungato, ed ha un ottimo profilo farmacocinetico<sup>51</sup>.



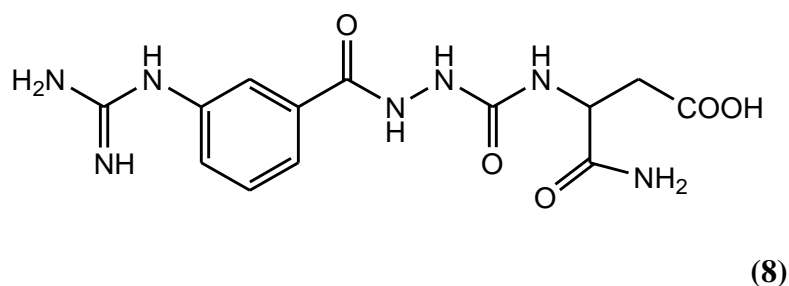
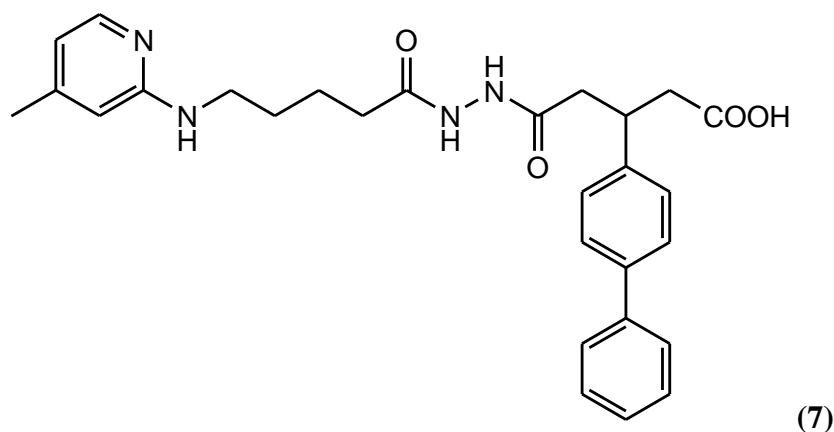
(4)

Inoltre sono state progettate e sintetizzate piccole molecole peptidomimetiche costituite da una struttura rigida, contenenti gruppi acidi e basici atti a mimare rispettivamente l'acido aspartico e l'arginina. I composti più attivi sono risultati quelli contenenti come porzione centrale rigida un indolo (5,6), un benzofurano o un benzotiofene, con la contemporanea presenza di un gruppo O-guanidinico<sup>52,53</sup> (5) o del gruppo 2-(6-metil-ammino-2-piridil)etossi<sup>54</sup> (6), con una  $\alpha$ -sostituzione al terminale carbossilico<sup>53</sup>.



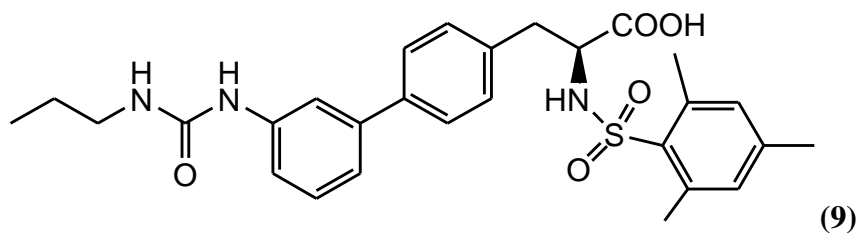


Recentemente sono stati sviluppati anche dei nuovi antagonisti peptidomimetici selettivi per l'integrina  $\alpha_v\beta_3$ , in cui è contenuta una aza-glicina<sup>55,56</sup>, in quanto peptidi che contengono aza-amminoacidi hanno migliore biodisponibilità, migliore assorbimento e una più alta stabilità metabolica<sup>57</sup> (7,8).

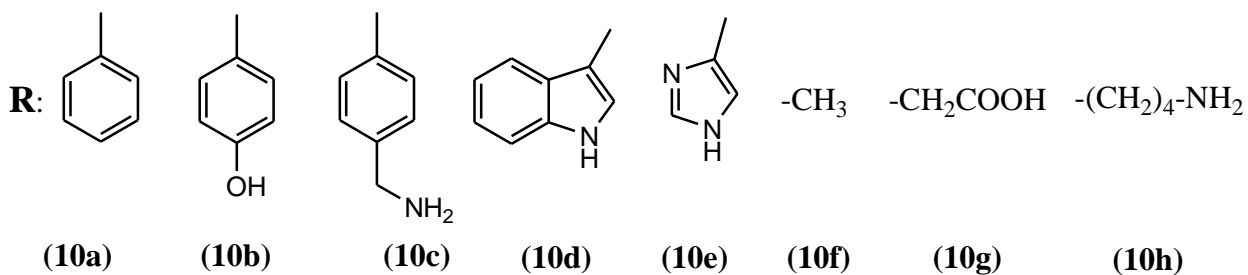
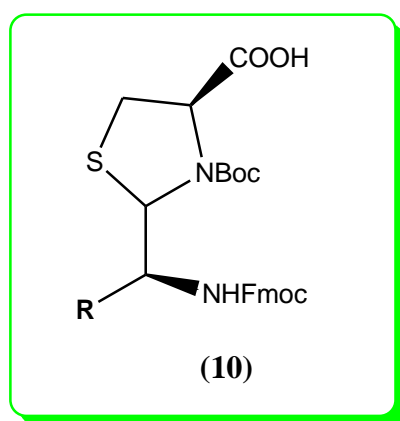


Un elemento critico per il *de novo design* di RGD mimetici è il corretto riarrangiamento spaziale dei residui di arginina e di aspartico intorno al core centrale.

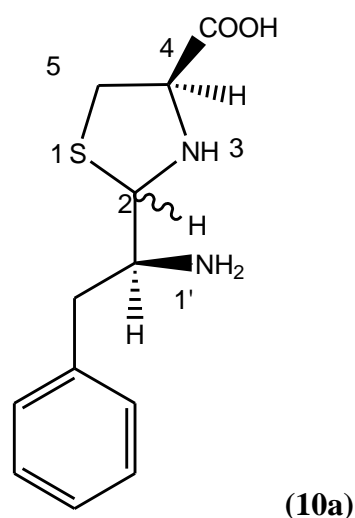
Inoltre il peptide di Kessler, che mostra un arrangiamento  $\beta\text{II}'/\gamma$ -turn con D-Phe in posizione  $i+1$  del  $\beta\text{II}'$ -turn, ha messo in evidenza l'importanza della presenza di un template  $\beta$ -turn mimetico per irrigidire ulteriormente la conformazione. La presenza di un  $\beta$ -turn mimetico irrigidisce anche la parte del composto impegnata nel  $\gamma$ -turn dotata, nonostante tutto, di una certa flessibilità. Recentemente è stata riportata la sintesi di una libreria di piccoli composti RGD mimetici contenenti una struttura difenilica<sup>58</sup> (9); tali composti si sono rivelati buoni antagonisti del recettore  $\alpha_v\beta_3$ .



Nell'ambito del mio progetto di ricerca rivolto alla progettazione di nuove molecole modulanti il processo dell'angiogenesi attraverso i recettori delle integrine, sono stati progettate e sintetizzate nuove strutture rigide in grado di indurre  $\beta$ -turn in una sequenza peptidica. I  $\beta$ -turn mimetici progettati e sintetizzati, sono costituiti da un nucleo tiazolidinico che mima bene un residuo di prolina e da un gruppo che mima la catena laterale dei vari amminoacidi naturali (10a-10h).

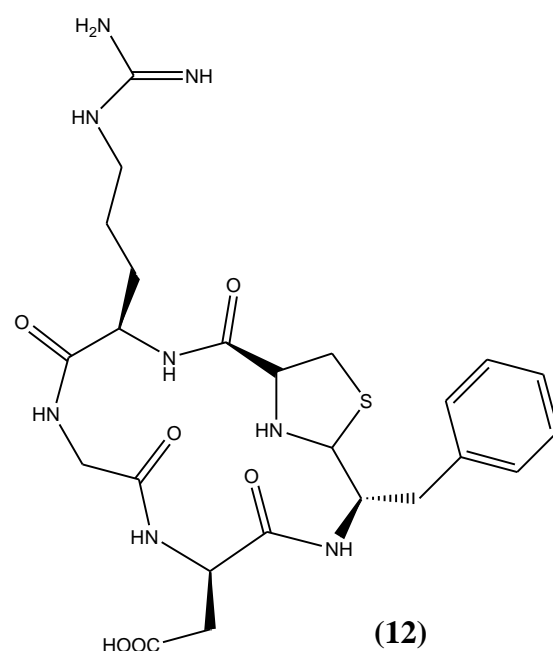
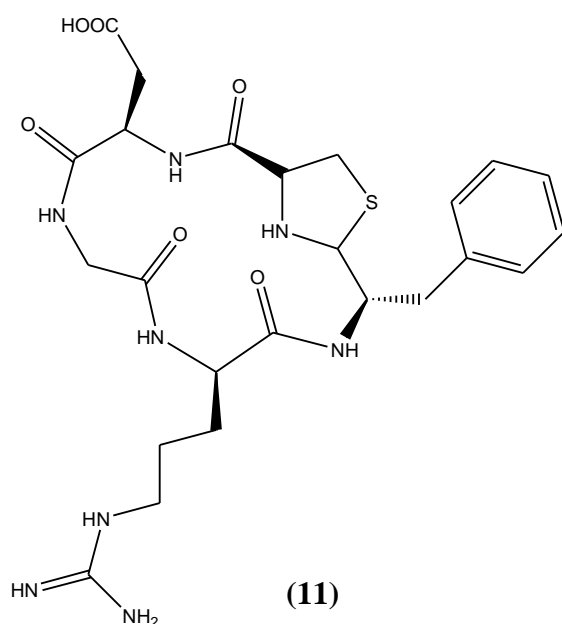


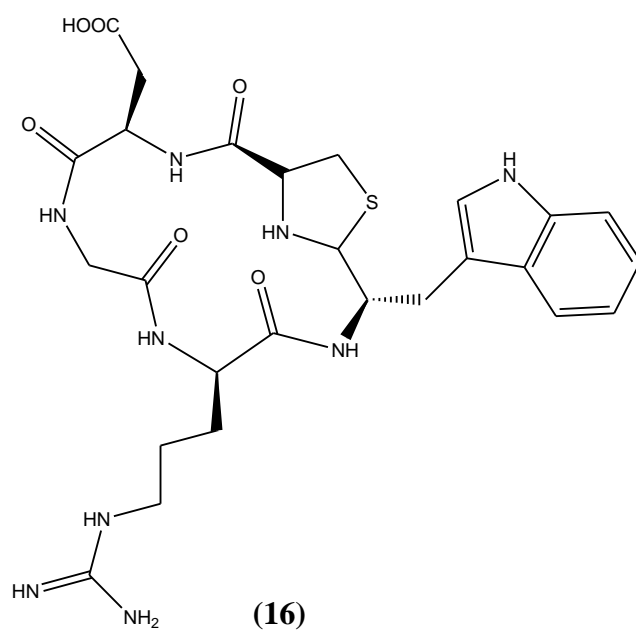
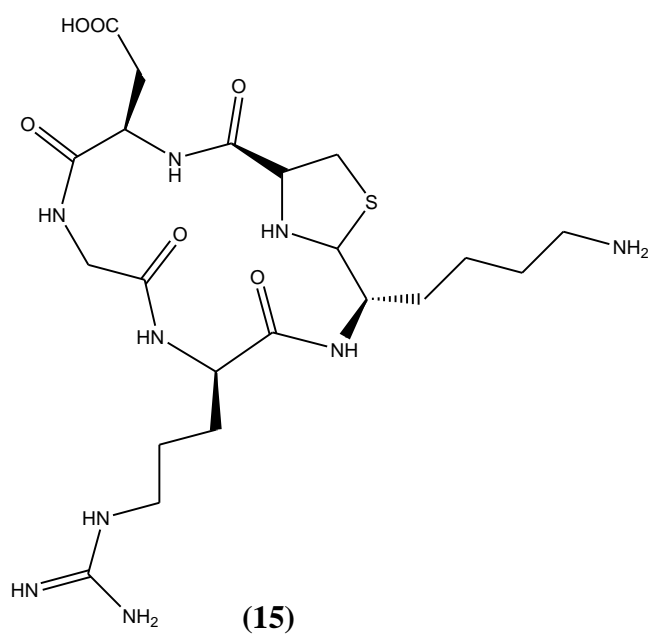
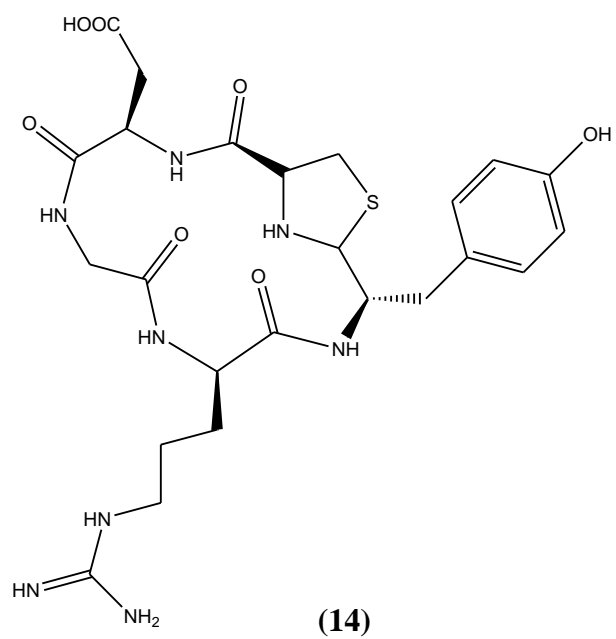
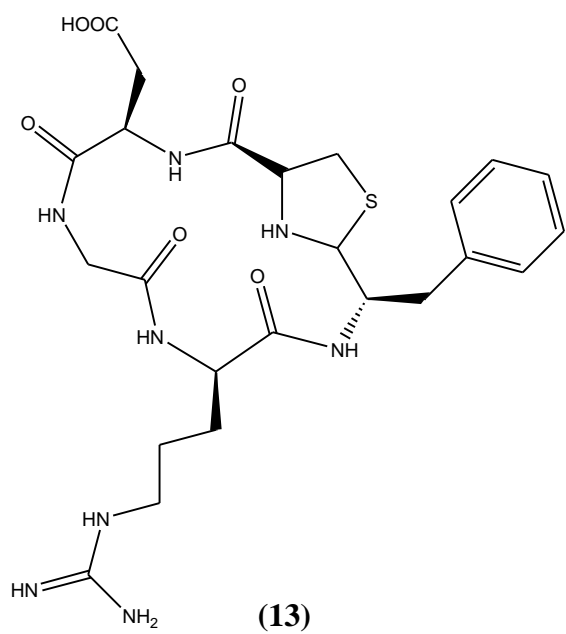
Allo scopo di valutare la fattibilità sintetica e la validità biologica di queste molecole progettate, inizialmente è stato sintetizzato il composto pilota (10a), contenente un residuo aromatico che mima la catena laterale della Phe del peptide originario<sup>59</sup>. Studi preliminari di modeling effettuati mediante SYBYL 6.0 hanno permesso di chiarire che il composto (10a) contiene una conformazione inducente il *motif* di un  $\beta$ -turn. Le configurazioni assolute del C-2, del C-4 e del C-1' influenzano la conformazione del backbone. È stato riscontrato che il miglior modello di  $\beta$ -turn mimetico si ottiene se il C-4 e il C-1' presentano configurazione *L*, invece, la configurazione del C-2 non influenza affatto l'induzione di una conformazione  $\beta$ -turn<sup>59</sup>.

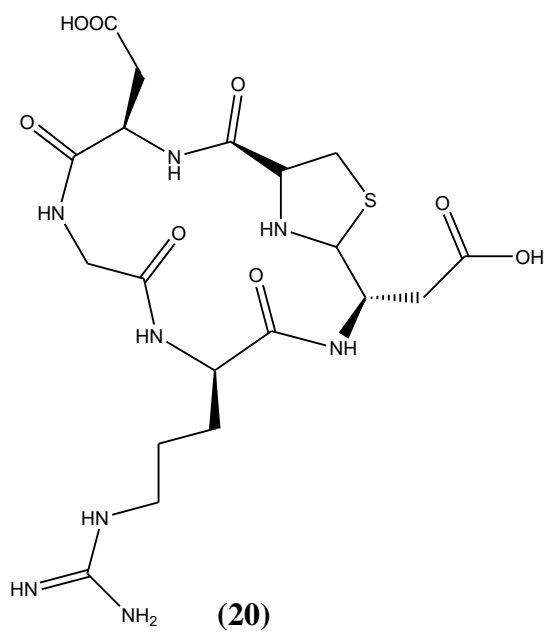
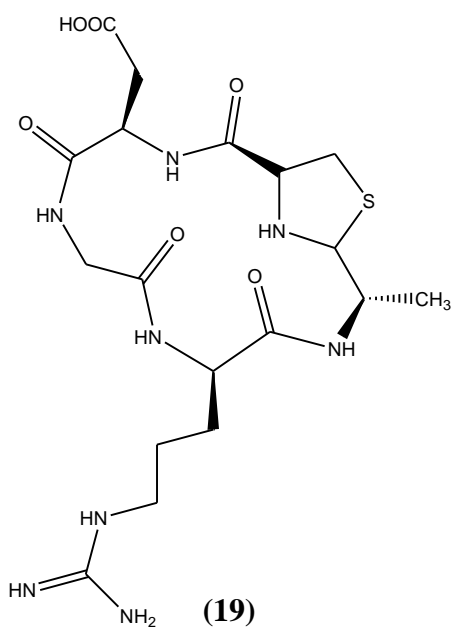
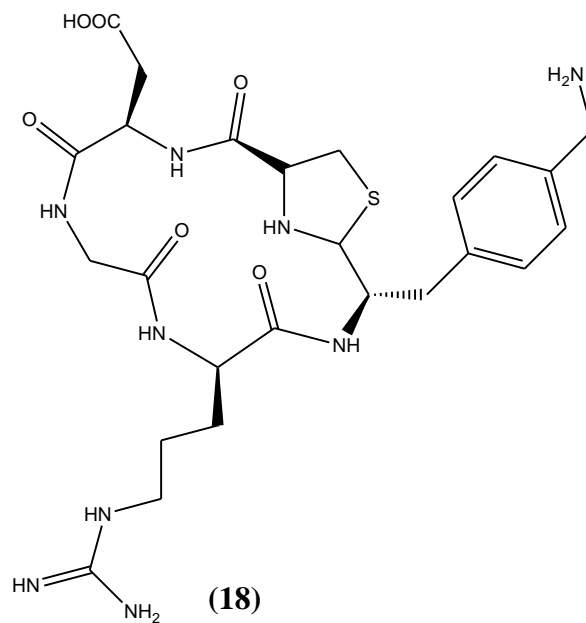
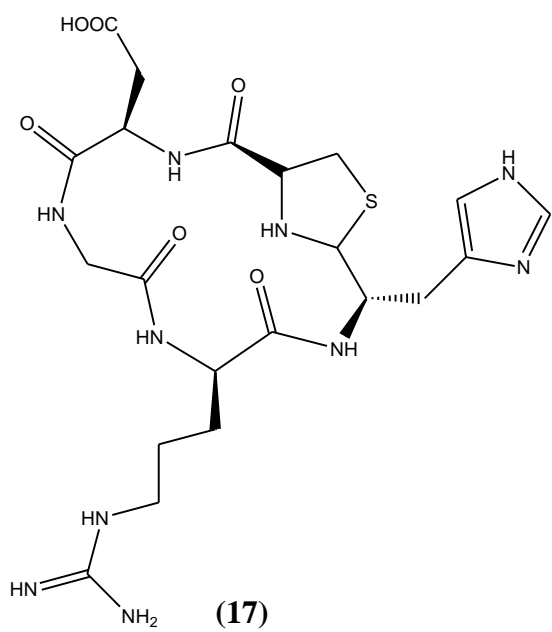


Successivamente, sono stati sintetizzati derivati che presentano come catena laterale tutte le caratteristiche chimico-fisiche individuabili negli amminoacidi. Il derivato (10f) contenente il gruppo metilico è stato sintetizzato per valutare se la tasca recettoriale, dove va a posizionarsi il fenile

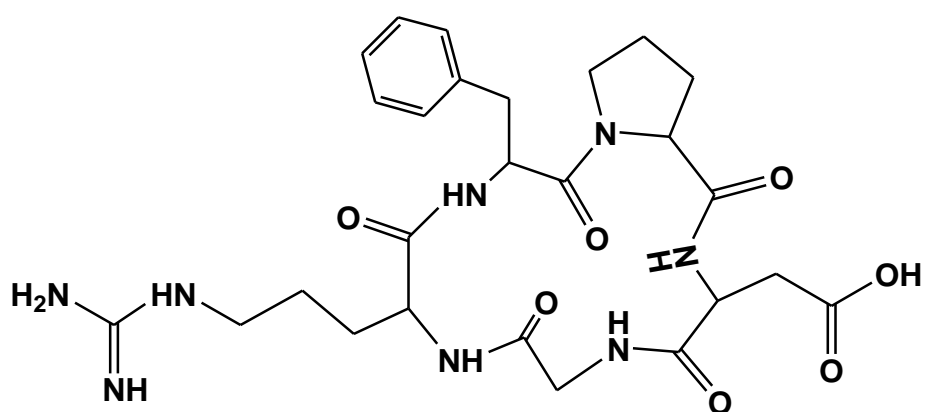
della Phe del peptide di Kessler sia necessaria e determinante ai fini dell'attività. Una volta realizzate, queste strutture inducenti il motif  $\beta$ -turn sono state introdotte nel classico peptide di Kessler, sia con la sequenza normale RGD che con quella inversa, ossia, DGR per meglio valutare l'influenza ai fini biologici delle strutture inserite. Poiché i primi composti sintetizzati hanno evidenziato che un incremento di selettività recettoriale più marcata si ha con le strutture che presentano una sequenza DGR, ossia retroinversa, si è proceduto successivamente ad inserire tali strutture  $\beta$ -turn solo nella sequenza DGR. I peptidomimetici sintetizzati sono stati i seguenti:





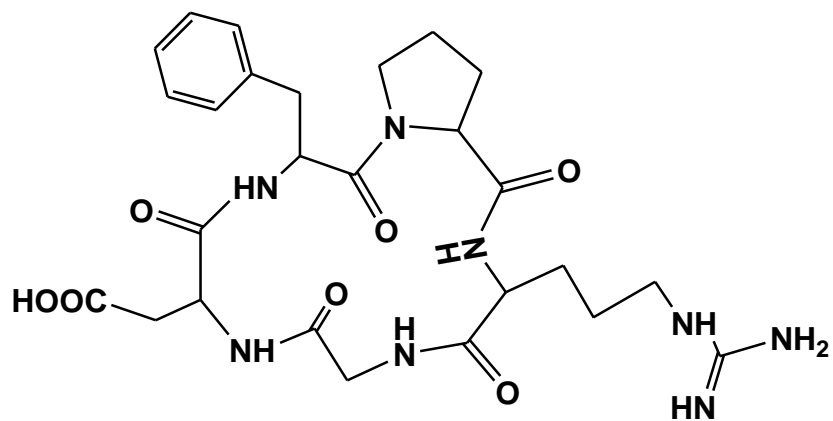


Successivamente a questa serie sono state progettate altre molecole contenenti un residuo di prolina o suoi analoghi superiori come induttori  $\beta$ -turn. Inoltre, in questa seconda serie di composti è stata inserita anche una sequenza in cui è presente un residuo di cisteina al posto della prolina per capire se la presenza di un atomo di zolfo fosse indispensabile ai fini dell'interazione con la controparte recettoriale.

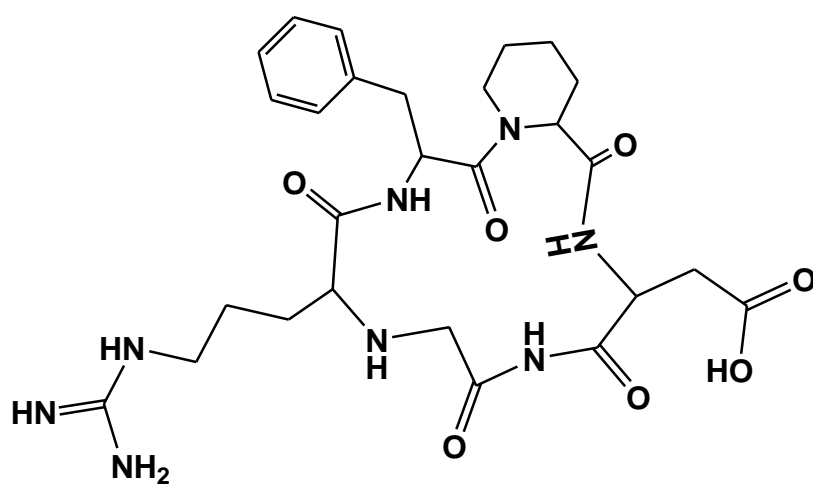


(21)

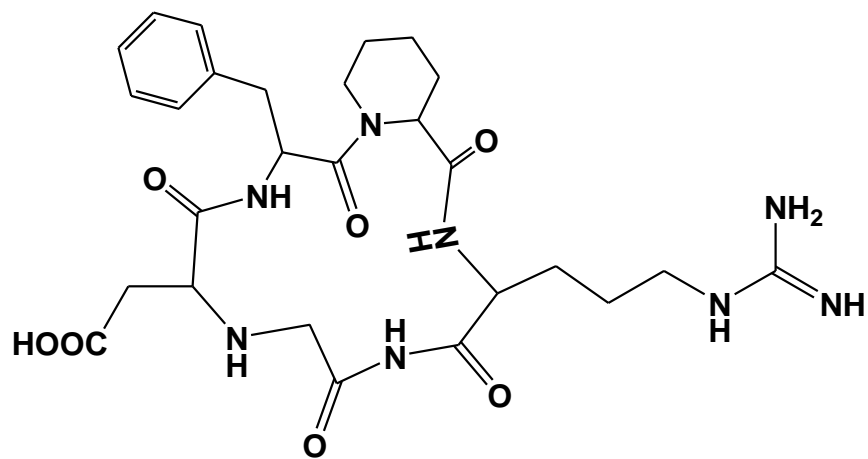




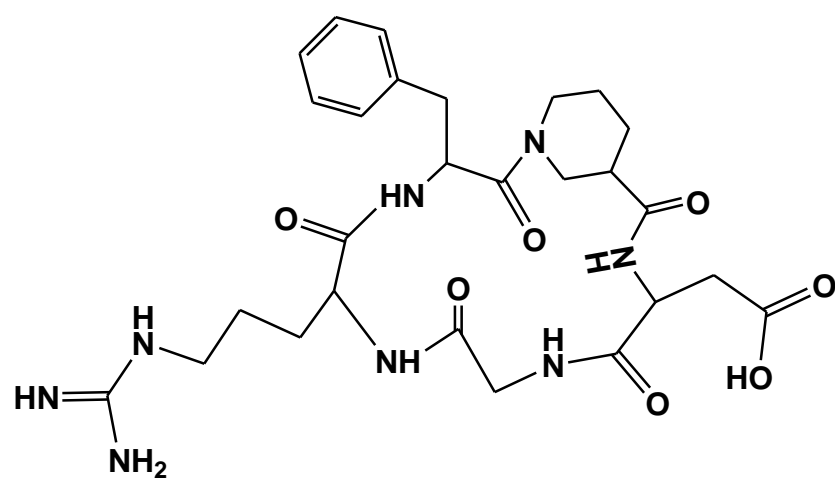
(22)



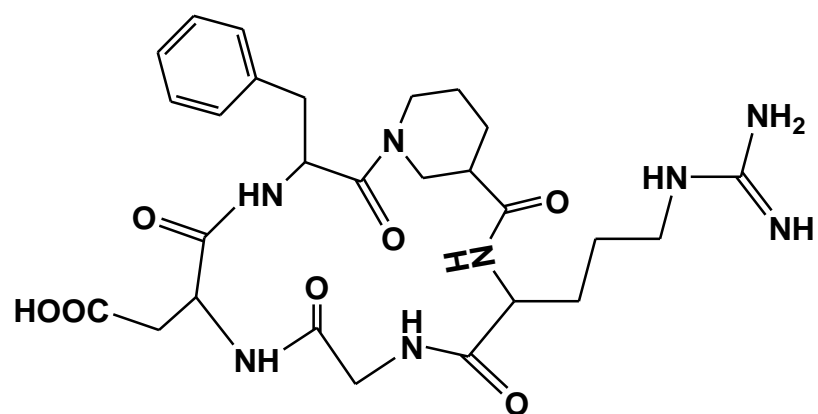
(23)



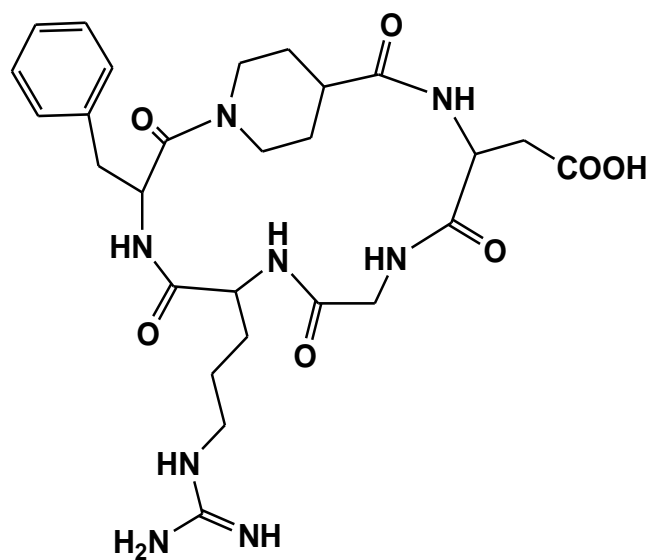
(24)



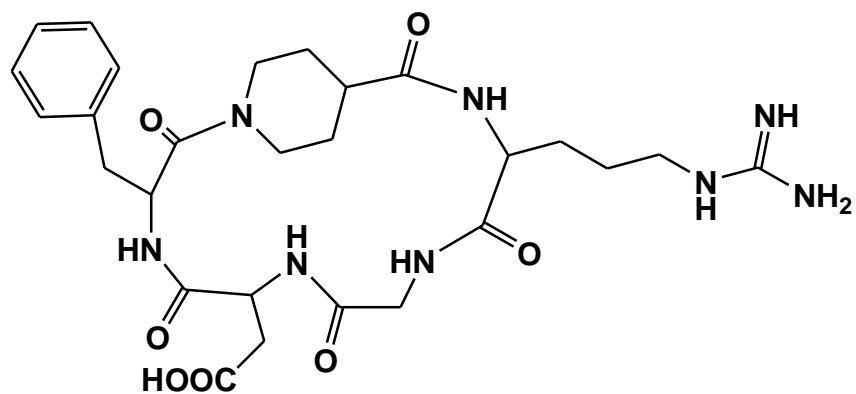
(25)



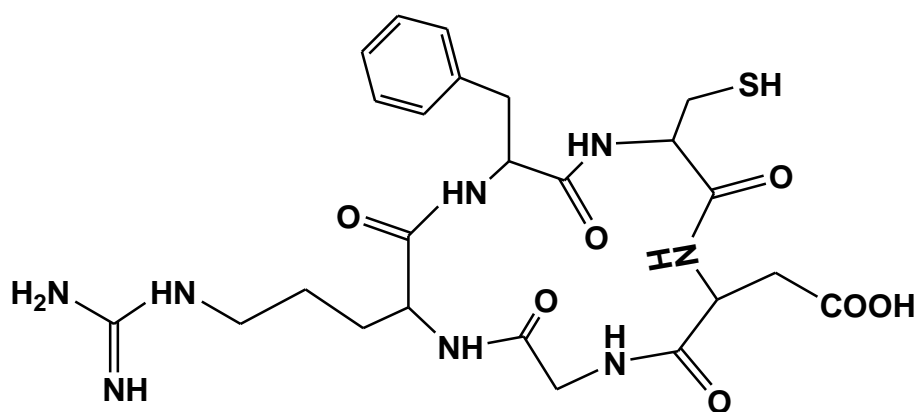
(26)



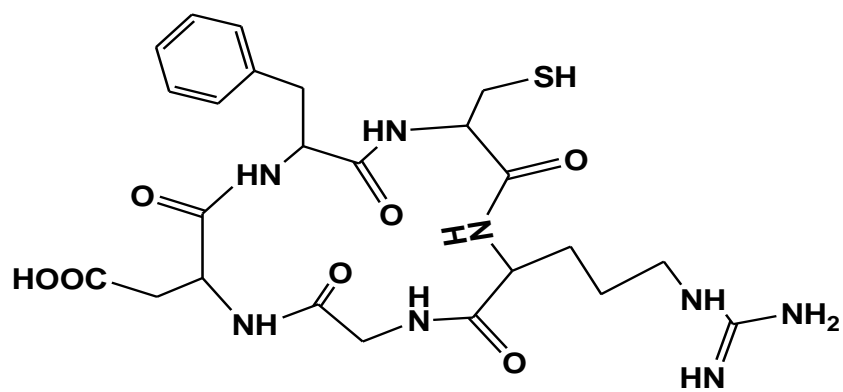
(27)



(28)



(29)



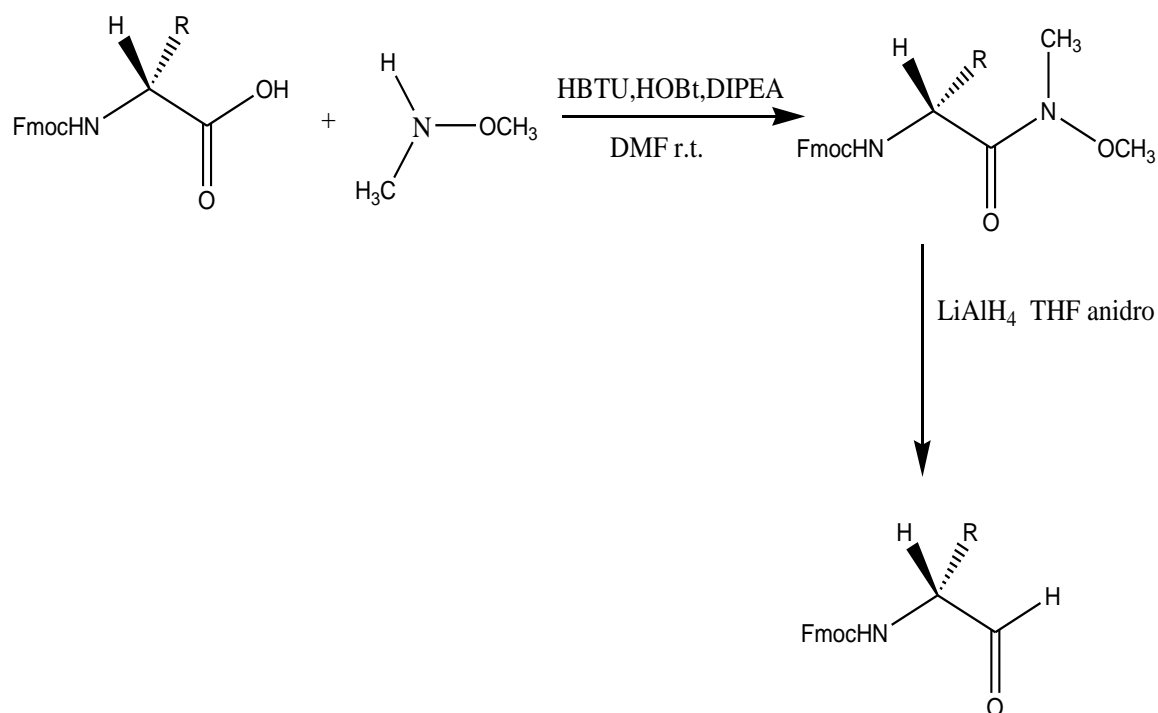
(30)

## PARTE SPERIMENTALE

### Sintesi del $\beta$ -turn mimetico

La sintesi dei diversi  $\beta$ -turn mimetici inseriti nelle nostre sequenze è stata condotta secondo una procedura di Schmidt<sup>60</sup> modificata a partire da amminoacidi protetti commercialmente disponibili.

Il composto di partenza Fmoc-L-AA-H è stato preparato a partire dall'Fmoc-L-AA-OH mediante reazione di riduzione del corrispondente derivato N,O-dimetilidrossammato con  $\text{LiAlH}_4$  in THF anidro, in accordo con il metodo sviluppato da Fehrentz e Castro e riportato da Hruby e collaboratori<sup>61,62</sup>. Il derivato N,O dimetilidrossammato è stato ottenuto facendo reagire in DMF l'amminoacido, il cui  $\text{N}^\alpha$  è protetto con il gruppo Fmoc, con l'N,O-dimetilidrossilammina (1.2 equivalenti), usando come agenti di coupling HBTU (1.2 equivalenti), HOBt (1.2 equivalenti) in presenza della base DIPEA (2.4 equivalenti) (Schema 1).

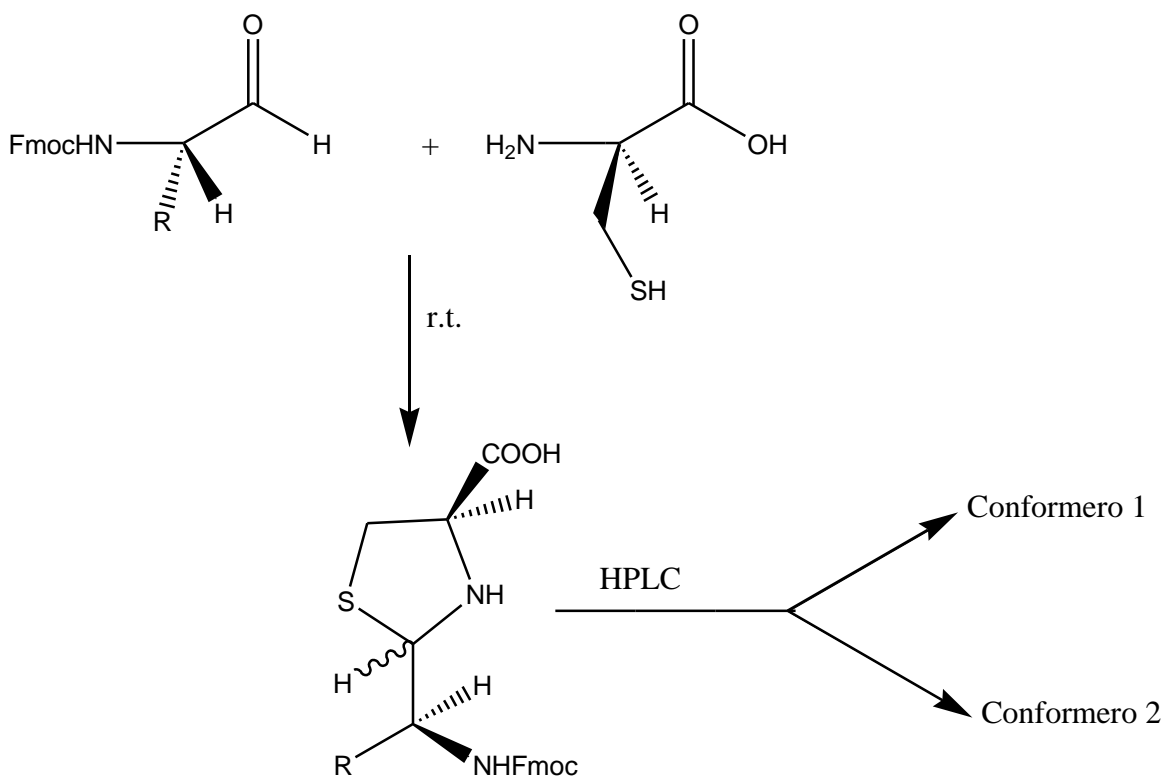


(Schema 1)

Successivamente, la cisteina cloridrato (1.2 equivalenti) è stata sciolta in acqua alcalina per idrogeno carbonato di potassio e poi è stata aggiunta la soluzione di aldeide disciolta in una miscela di acqua ed etanolo in rapporto di 1 a 4.

Ciascun composto è stato ottenuto come miscela epimerica che è stata risolta mediante la tecnica HPLC a fase inversa (Schema 2). Infatti il composto (10a) così come tutti gli altri composti presentati ha 3 carboni asimmetrici, due dei quali provengono dai carboni in  $\alpha$  dell'amminoacido di partenza e della L-Cys, entrambi a configurazione nota, invece il terzo, che si forma con la ciclizzazione che porta alla formazione della tiazolidina, è epimerico. La

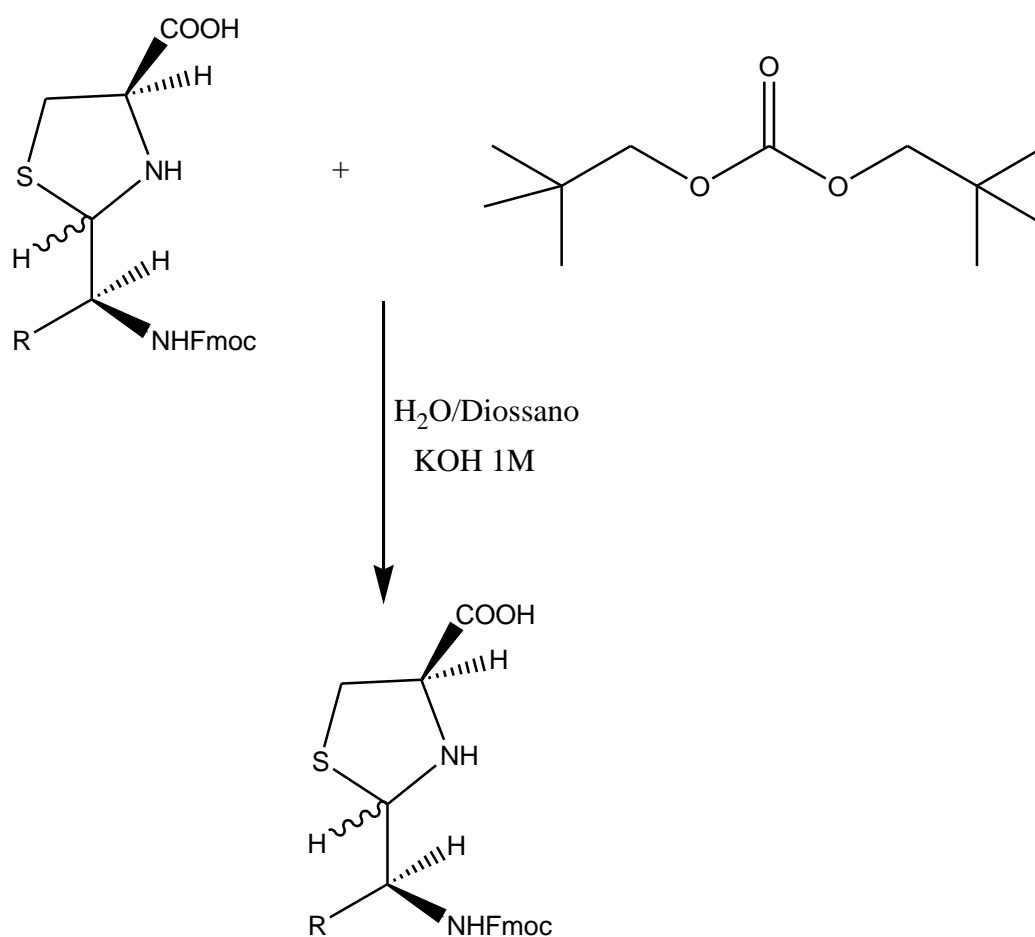
determinazione della configurazione assoluta del C2 asimmetrico è stata fatta mediante la tecnica di NMR protonico.



(Schema 2)

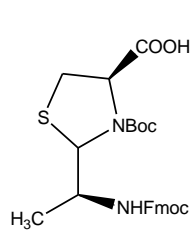
Per permettere l'inserimento del  $\beta$ -turn mimetico nelle sequenze peptidiche, il gruppo NH della tiazolidina è stato protetto con il gruppo Boc. La reazione di protezione è stata effettuata, usando anidride Boc (0.8 equivalenti) in diossano, e aggiungendo goccia a goccia fino a pH 8 una soluzione di KOH 1 M. La reazione è stata tenuta sotto agitazione elettromagnetica per circa 3 ore. Trascorso questo tempo, è stato completamente allontanato il diossano e la

parte acquosa rimasta è stata estratta con DCM; l'estratto organico è stato anidrificato con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e seccato per fornire il composto desiderato sotto forma di polvere sottile, bianca (Schema 3).

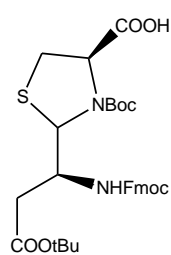


(Schema 3)

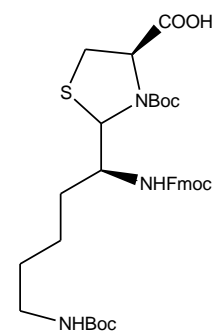
I  $\beta$ -turn mimetici sintetizzati sono stati i seguenti (31- 38):



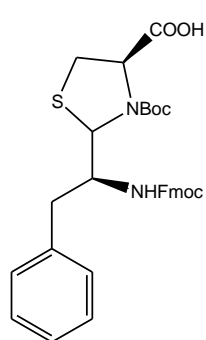
(31)



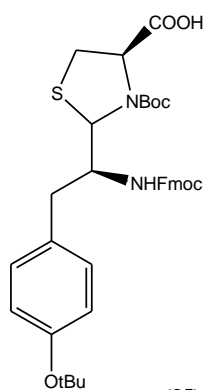
(32)



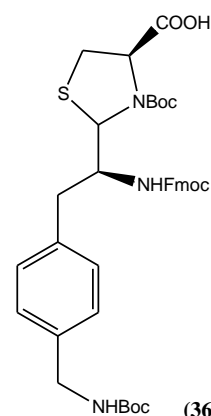
(33)



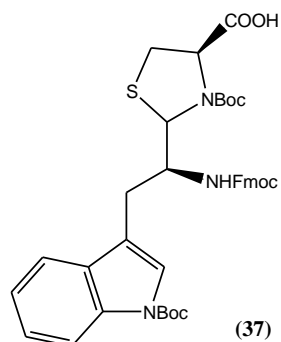
(34)



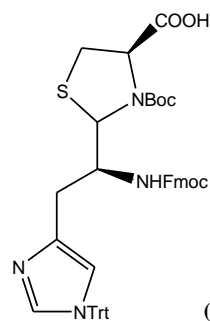
(35)



(36)



(37)



(38)

La caratterizzazione di ciascun  $\beta$ -turn mimetico finale è stata effettuata con  $^1\text{H NMR}$ .



**(2SR,4R)-2-[1-((9H-fluoren-9-yl)methoxycarbonyl)amino]ethyl-3-(tert-butoxycarbonyl)thiazolidine-4-carboxylic acid (31)**

Oil (42%). <sup>1</sup>H NMR (400MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO) δ: 1.11 and 1.21 (m, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.37 (s, 9H, Boc CH<sub>3</sub>), 3.13-3.15 (m, 1H, H-5a); 3.30-3.32 (m, 1H, H-5b); 3.81 (m, 1H, H-1'), 4.20-4.22 (m, 3H, CH<sub>2</sub>-CH Fmoc) 4.46-4.53 (m, 1H, H-4), 5.06-5.07 (m, 1H, H-2). 7.31-7.33 (t, 2H, Fmoc); 7.38-7.42 (t, 2H, Fmoc); 7.71 (d, 2H, Fmoc); 7.88 (d, 2H, Fmoc). FABMS m/z calc. per C<sub>26</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S 498.18 trovato 497.94

**(2SR,4R)-2-[1-((9H-fluoren-9-yl)methoxycarbonyl)amino-2-(tert-butyloxy)carbonyl]ethyl-3-(tert-butoxycarbonyl)-thiazolidine-4-carboxylic acid (32)**

Oil (47%). <sup>1</sup>H NMR (400MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO) δ: 1.36 and 1.41 (s, 9H, Boc CH<sub>3</sub>); 1.39 (s, 9H, *t*Bu); 2.75-2.78 (m, 1H, H-2'); 3.12-3.14 (m, 1H, H-2'); 3.32-3.36 (m, 2H, H-5); 4.18 (m, 1H, H-1'), 4.21-4.24 (m, 3H, CH<sub>2</sub>-CH Fmoc); 4.43-4.48 (m, 1H, H-4), 5.10-5.16 (m, 1H, H-2), 7.29-7.32 (t, 2H, Fmoc), 7.38-7.42 (t, 2H Fmoc); 7.70 (d, 2H, Fmoc); 7.87 (d, 2H, Fmoc). FABMS m/z calc. per C<sub>31</sub>H<sub>38</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S 597.71 trovato 597.91

**(2SR,4R)-2-[1-((9H-fluoren-9-yl)methoxycarbonyl)amino]-5-(tert-butoxycarbonyl)amino]pentyl-3-(tert-butoxycarbonyl)-thiazolidine-4-carboxylic acid (33)**

Oil (40%). <sup>1</sup>H NMR (400MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO) δ: 1.22 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1.38 (s, 9H, Boc CH<sub>3</sub>); 1.62-1.63 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 2.83-2.87 (m, 3H, H-2', CH<sub>2</sub>); 3.12-3.15 (m, 1H, H-2'); 3.30-3.34 (m, 2H, H-5); 3.63, 3.67 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 4.17 (m, 1H, H-1'); 4.18-4.23 (m, 3H, CH<sub>2</sub>-CH Fmoc); 4.47-4.52 (m, 1H, H-4), 5.04-5.08 (m, 1H, H-2), 7.30-7.33 (t, 2H, Fmoc), 7.38-7.42 (t, 2H Fmoc); 7.71 (d, 2H, Fmoc); 7.88 (d, 2H, Fmoc). FABMS m/z calc. per C<sub>34</sub>H<sub>45</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>S 655.80, trovato 655.63

**(2SR,4R)-2-[1-((9H-fluoren-9-yl)methoxycarbonyl)amino]-2-phenylethyl-3-(tert-butoxycarbonyl)thiazolidine-4-carboxylic acid (34)**

Oil (54%). <sup>1</sup>H NMR (400MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO) δ: 1.38 (s, 9H, Boc CH<sub>3</sub>), 2.69-2.72 (m, 1H, H-2'); 3.27-3.30 (m, 1H, H-2'); 3.34-3.37 (m, 2H, H-5); 3.90 (m, 1H, H-1'), 4.03-4.05 (m, 3H, CH<sub>2</sub>-CH Fmoc) 4.51-4.57 (m, 1H, H-4), 5.14-5.18 (m, 1H, H-2), 7.24-7.34 (m, 7H,

Fmoc, aryl); 7.38-7.41 (t, 2H, Fmoc); 7.61 (d, 2H, Fmoc); 7.86 (d, 2H, Fmoc). FABMS m/z calc. per C<sub>32</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S 574.69, trovato 574.41

**(2SR,4R)-2-[1-((9H-fluoren-9-yl)methoxycarbonyl)amino)-2-(4-tert-butyloxy) phenyl]ethyl-3-(tert-butoxycarbonyl)thiazolidine-4-carboxylic acid (35)**

Oil (51%). <sup>1</sup>H NMR (400MHz, d<sub>6</sub>-DMSO) δ: 1.39 (s, 9H, Boc CH<sub>3</sub>); 1.44 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu CH<sub>3</sub>), 2.95-2.98 (m, 1H, H-2'); 3.13-3.17 (m, 1H, H-2'); 3.36-3.38 (m, 1H, H-5a); 3.53-3.55 (m, 1H, H-5b); 3.81-3.86 (m, 1H, H-1'), 4.20-4.22 (m, 3H, CH<sub>2</sub>-CH Fmoc) 4.58-4.60 (m, 1H, H-4), 5.12-5.15 (m, 1H, H-2), 6.57 (d, 2H, aryl); 7.00 (d, 2H, aryl); 7.30-7.33 (t, 2H, Fmoc); 7.39-7.41 (t, 2H, Fmoc); 7.61 (d, 2H, Fmoc); 7.88 (d, 2H, Fmoc). FABMS m/z calc. per C<sub>36</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>S cald.646.73, trovato 646.52

**(2SR,4R)-2-[1-((9H-fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)amino)-2-(4-(tert-butoxycarbonyl)amino methyl)phenyl]ethyl-3-(tert-butoxycarbonyl)thiazolidine-4-carboxylic acid (36)**

Oil (41%). <sup>1</sup>H NMR (400MHz, d<sub>6</sub>-DMSO) δ: 1.39 (s, 9H, Boc CH<sub>3</sub>); 1.41 (s, 9H, Boc CH<sub>3</sub>); 2.79-2.81 (m, 1H, H-2'); 3.15-3.17 (m, 1H, H-2'); 3.36-3.38 (m, 2H, H-5); 3.98 (m, 1H, H-1'), 4.03-4.06 (m, 6H, CH<sub>2</sub>-CH Fmoc); 4.08-4.10 (m, 2H, CH<sub>2</sub>NH) 4.54-4.56 (m, 1H, H-4), 5.10-5.13 (m, 1H, H-2), 7.00 (d, 2H, aryl); 7.22 (d, 2H, aryl); 7.29-7.31 (t, 2H, Fmoc); 7.38-7.40 (t, 2H, Fmoc); 7.64 (d, 2H, Fmoc); 7.87 (d, 2H, Fmoc) FABMS m/z calc. per C<sub>38</sub>H<sub>45</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>S 703.84, trovato 703.62

**(2SR,4R)-2-[1-((9H-fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)amino)-2-((1-(tert-butoxy carbonyl)-1H-indol-3-yl)]ethyl-3-(tert-butoxycarbonyl)thiazolidine-4-carboxylic acid (37)**

Oil (46%). <sup>1</sup>H NMR (400MHz, d<sub>6</sub>-DMSO) δ: 1.34 (s, 9H, Boc CH<sub>3</sub>); 1.44 (s, 9H, Boc CH<sub>3</sub>); 2.81-2.83 (m, 1H, H-2'); 3.22-3.25 (m, 1H, H-2'); 3.35-3.38 (m, 2H, H-5); 4.06-4.11 (m, 3H, CH<sub>2</sub>-CH Fmoc); 4.20 (m, 1H, H-1'), 4.50-4.56 (m, 1H, H-4), 5.18-5.25 (m, 1H, H-2), 7.20-7.26 (m, 2H, Fmoc); 7.34-7.38 (t, 2H Fmoc); 7.45-7.55 (m, 2H, aryl); 7.61

(d, 2H, Fmoc); 7.66 (d, 1H, Aryl); 7.89 (d, 2H, Fmoc); 7.95 (s, 1H, aryl); 8.04 (d, 1H, aryl). FABMS m/z calc. per C<sub>39</sub>H<sub>43</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>S 713.84, trovato 713.61

**(2*SR*,4*R*)-2-[1-((9H-fluoren-9yl-methoxycarbonyl)amino)-2-(1-trityl-1H-imidazol-4-yl)]ethyl-3-(*tert*-butoxycarbonyl)thiazolidine-4-carboxylic acid (38)**

Oil (51%). <sup>1</sup>H NMR (400MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO) δ: 1.31 and 1.36 (s, 9H, Boc CH<sub>3</sub>), 2.79-2.81 (m, 1H, H-2'); 3.12-3.25 (m, 1H, H-2'); 3.35-3.38 (m, 2H, H-5); 4.07-4.09 (m, 1H, H-1'); 4.14-4.17 (m, 3H, CH<sub>2</sub>-CH Fmoc); 4.42-4.46 (m, 1H, H-4); 5.12-5.14 (m, 1H, H-2); 7.10 (s, 1H, aryl); 7.29-7.33 (t, 2H, Fmoc), 7.38-7.42 (m, 3H, Fmoc, aryl); 7.82 (d, 2H, Fmoc); 7.88 (d, 2H, Fmoc). FABMS m/z calc. per C<sub>48</sub>H<sub>46</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S 806.97, trovato 806.74

## **Sintesi dei peptidomimetici**

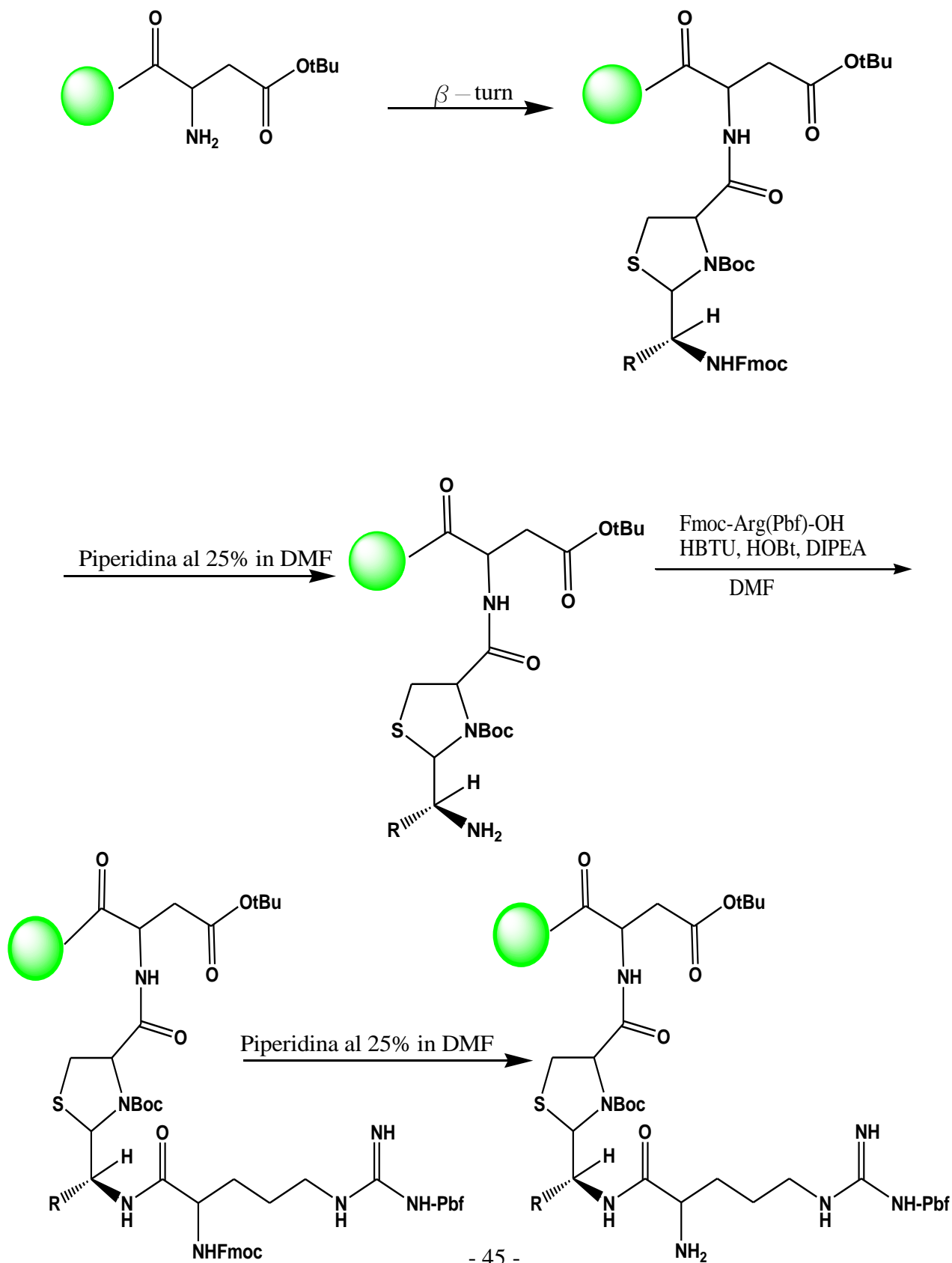
La sintesi di tutti i peptidomimetici presentati è stata realizzata in fase solida, usando come supporto la resina 2-Clorotritilica (grado di sostituzione 1.3 mmol/g), applicando la classica strategia *via Fmoc*. Il primo amminoacido, trattasi o di Fmoc-Arg(Pbf)-OH o di Fmoc-Asp(OtBu)-OH è stato legato alla resina, usando 1 equivalente di AA sciolto in circa 3 ml di DCM e 1 equivalente di DIPEA per circa 10 minuti; trascorso questo tempo, sono stati aggiunti altri 1.5 equivalenti di DIPEA e la reazione è stata mandata avanti per altri 60 minuti. Dopo questa reazione di coupling è stato effettuato il cappaggio dei gruppi del linker della resina liberi con MeOH ad elevatissimo grado di purezza per circa 60 minuti.

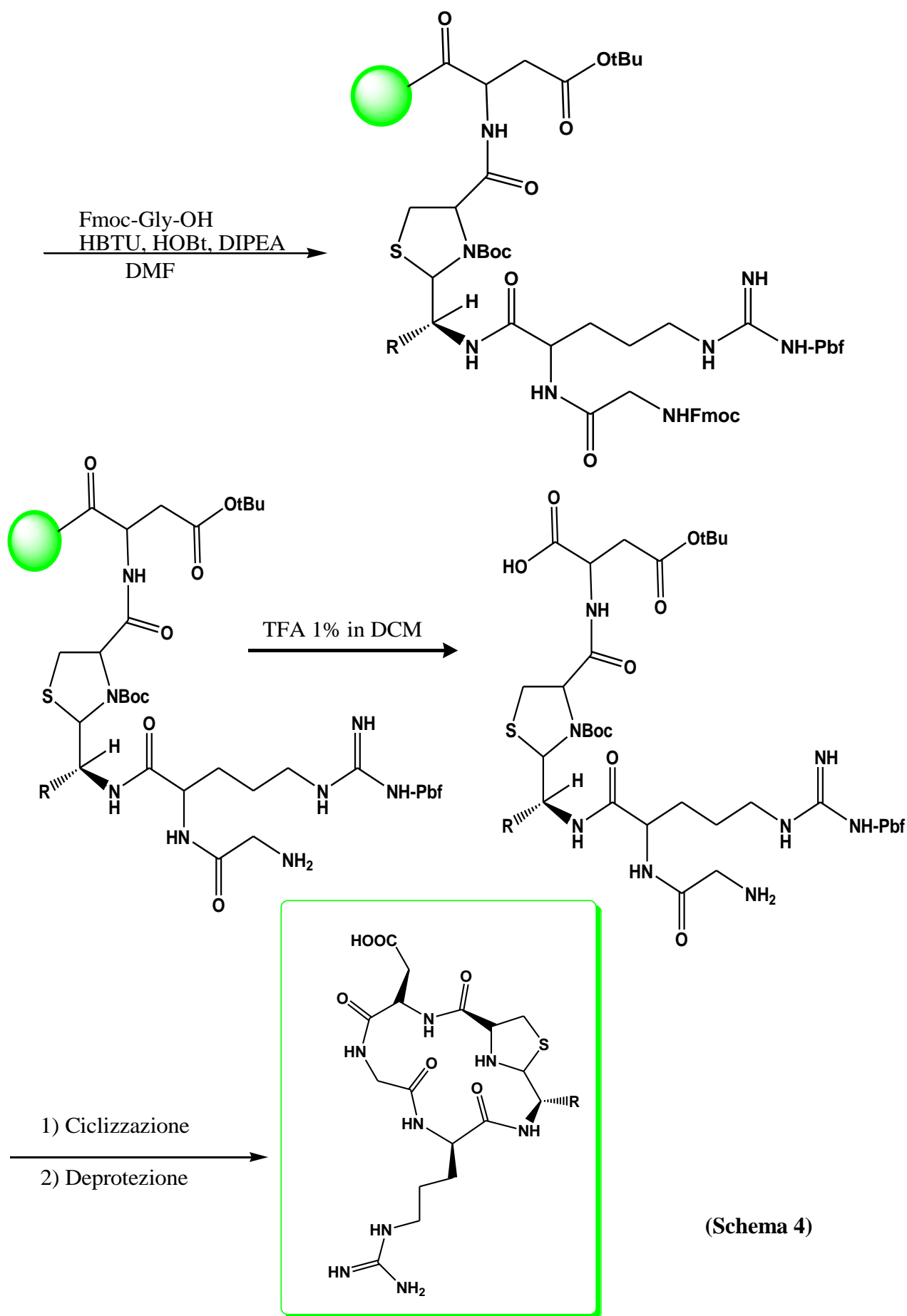
Legato il primo amminoacido alla resina, tutti gli altri Fmoc-AA-OH e anche i β-turn mimetici sono stati accoppiati in DMF per circa 120 minuti, usando

come agenti di coupling HBTU (3 equivalenti), HOBt (3 equivalenti) in presenza di DIPEA (6 equivalenti). Il gruppo Fmoc è stato rimosso con una soluzione di piperidina al 25% in DMF. Dopo ogni coupling e dopo ogni sblocco è stato effettuato il Kaiser test per verificare il buon esito della reazione di accoppiamento o la totale rimozione del gruppo protettore Fmoc.

Una volta assemblata la sequenza, i pseudopeptidi sono stati rimossi dal supporto solido con una soluzione di TFA all'1% in DCM. In tal modo sono stati mantenuti i gruppi protettori presenti sulle catene laterali dei diversi residui amminoacidici. Il buon esito della reazione è stato accertato, facendo uno spettro di massa del composto lineare. La ciclizzazione testa-coda è stata condotta in DMF mediante un'attivazione *in situ* usando un leggero eccesso di HBTU, HOBt, in presenza di DIPEA; la reazione è durata circa 18 ore. Dopo l'evaporazione all'aria del solvente di reazione, per eliminare tutto quanto non reagito e allontanare anche il composto lineare, sono state effettuate ripetute estrazioni con DCM. L'operazione è stata iterata fino a quando la lastrina cromatografia fatta salire in una miscela  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  (9:1) non ha dimostrato la totale assenza del composto lineare; per maggior conferma sulla lastrina è stata spruzzata una soluzione etanolica di ninidrina in grado di far visualizzare i gruppi amminici primari eventualmente liberi. Il solvente estraente è stato poi eliminato completamente mediante rotavapor. La deprotezione finale del peptidomimetico è stata eseguita, usando una

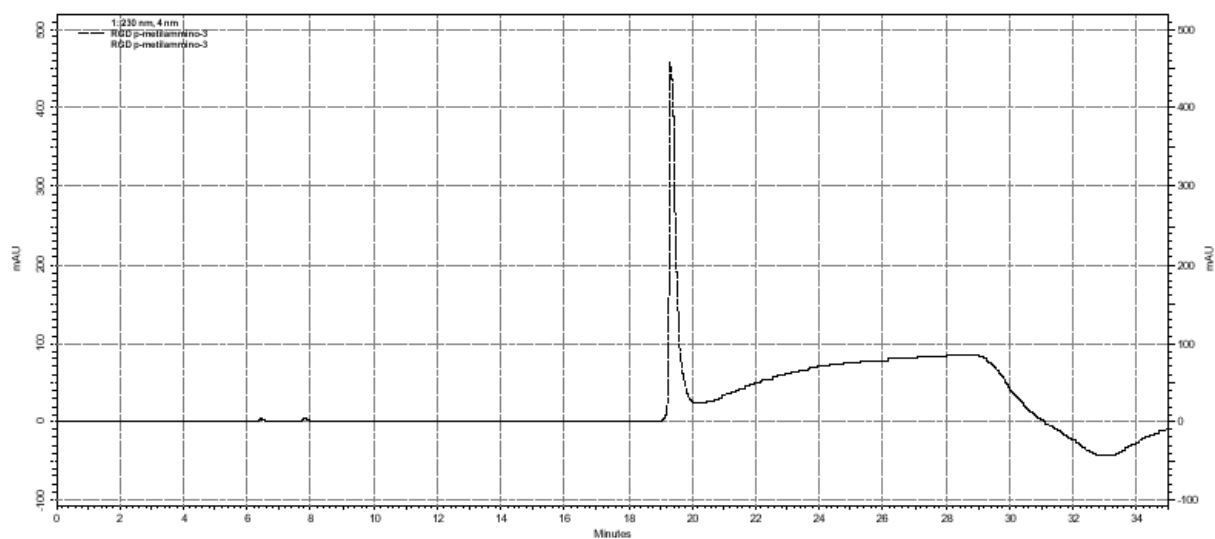
soluzione al 90% di TFA in DCM con l'aggiunta di circa 1 ml di TES  
(Schema 4).





## Purificazione dei peptidomimetici

Tutti i composti sono stati purificati mediante il sistema HPLC preparativo a fase inversa usando una colonna Vydac C-18 15  $\mu\text{m}$  usando come eluente una miscela di acqua ed acetonitrile ad un flusso costante di 15 ml al minuto con un gradiente crescente di acetonitrile dal 5% a 90% per 70 minuti. Ad entrambi i solventi, costituenti la miscela eluente, è stato aggiunto lo 0.1% di TFA. La separazione cromatografica è stata monitorata con un rivelatore UV-Vis ad una lunghezza d'onda di 220 nm. Le frazioni corrispondenti al picco di maggiore intensità sono state poi raccolte, unite e liofilizzate. I peptidomimetici desiderati sono stati ottenuti come solidi bianchi.



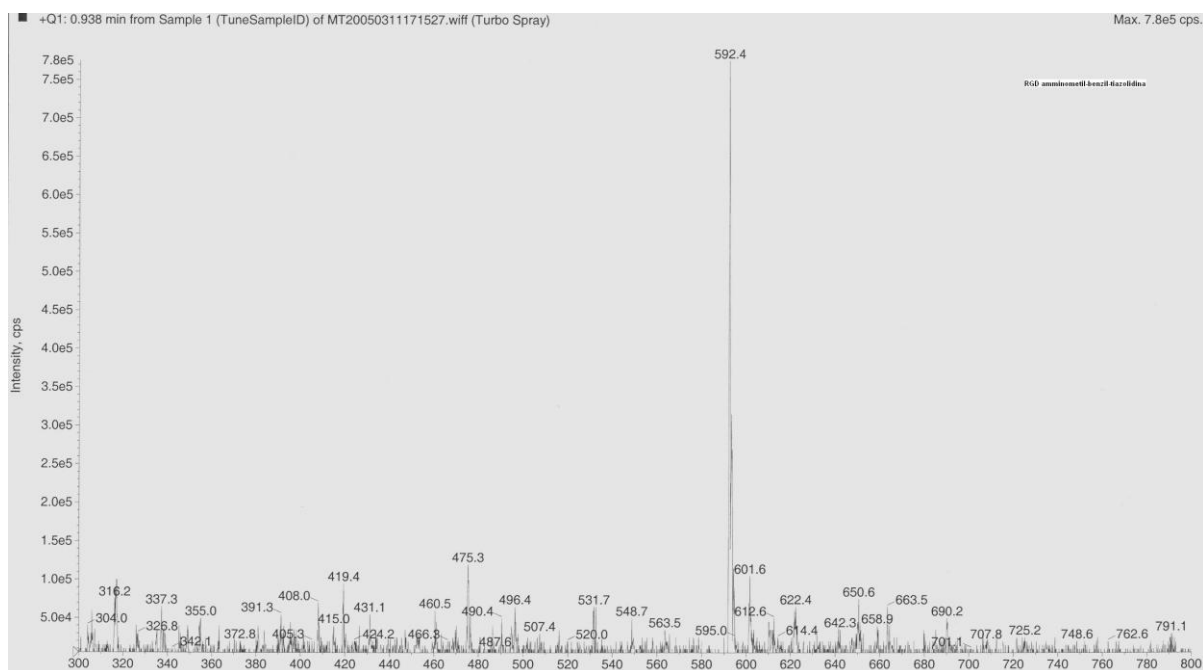
----- D:\HPLC\DATA\RGD nuova\Nuova cartella\RGD p-metilammino-3, 1: 230 nm, 4 nm

**Figura 7 Cromatogramma analitico del composto (18)**

## Caratterizzazione dei peptidomimetici

La caratterizzazione dei composti ottenuti è stata fatta mediante HPLC analitico a fase inversa, con una colonna Vydac C-18 5  $\mu\text{m}$ , usando come eluente una miscela costituita da acqua ed acetonitrile a gradiente crescente di quest'ultimo dal 5% al 90% per circa 55 minuti. Ad entrambi i solventi eluenti è stata aggiunto lo 0.1% di TFA. Il flusso di 1 ml/min è stato mantenuto costante per tutta la durata della corsa cromatografica.

I composti sono stati poi caratterizzati anche mediante massa con sorgente elettrospray.



**Figura 8 Spettro di massa del composto (18)**



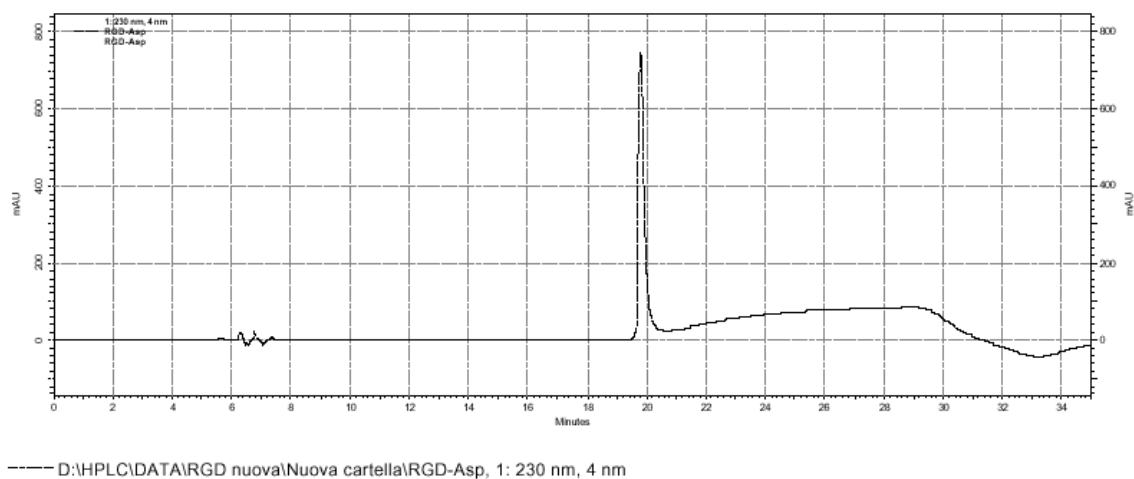
## **Sintesi dei composti peptidici**

I peptidi ciclici della seconda serie sono stati sintetizzati in fase solida, usando la classica strategia *via Fmoc*. In questo caso come supporto solido è stata usata la resina 2-Clorotritilica con il primo amminoacido già legato. La resina 2-Clorotritilica con legato già l'arginina protetta in catena laterale con il gruppo Pbf (grado di sostituzione 0.58 mmol/g) è stata usata per sintetizzare quei peptidi in cui la sequenza RGD è normale, invece la resina 2-Clorotritilica con legato già l'acido aspartico protetto in catena laterale con il gruppo OtBu (grado di sostituzione 0.69 mmol/g) è stata usata per quei peptidi in cui si desiderava la sequenza RGD inversa. Entrambe queste resine sono state acquistate presso la ditta GL-Biochem di Shanghai, Cina. La metodica sintetica usata è stata la stessa di quella adoperata per la sintesi dei peptidomimetici.

## **Purificazione dei peptidi ciclici**

Tutti i composti sono stati purificati mediante il sistema HPLC preparativo a fase inversa usando una colonna Phenomenex Combi-Chem C-18 15  $\mu\text{m}$  usando come eluente una miscela di acqua ed acetonitrile ad un flusso costante di 15 ml al minuto con un gradiente crescente di acetonitrile dal 5% a 90% per 30 minuti. Ad entrambi i solventi, costituenti la miscela eluente, è stato aggiunto lo 0.1% di TFA. La separazione cromatografica è stata

monitorata con un rivelatore UV-Vis ad una lunghezza d'onda di 220 nm. Le frazioni corrispondenti al picco di maggiore intensità sono state poi raccolte, unite e liofilizzate. I peptidi desiderati sono stati ottenuti come solidi bianchi.

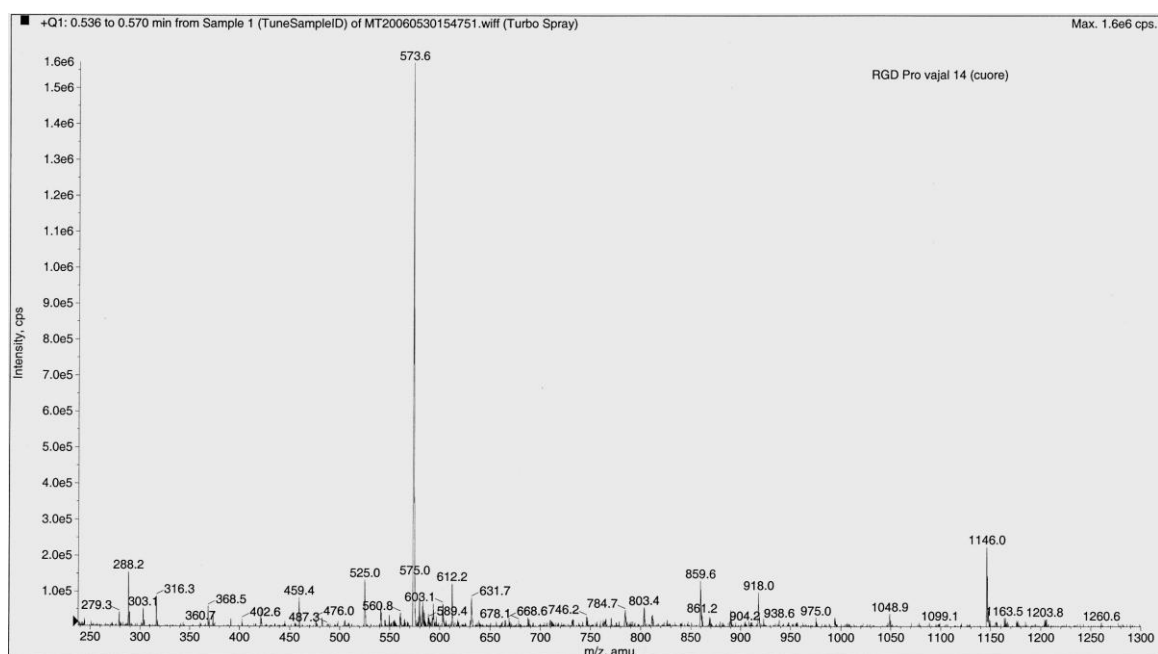


**Figura 9 Cromatogramma analitico del composto (21)**

## Caratterizzazione dei peptidi ciclici

La caratterizzazione dei composti ottenuti è stata fatta mediante HPLC analitico a fase inversa, con una colonna Phenomenex Luna C-18 5  $\mu\text{m}$ , usando come eluente una miscela costituita da acqua ed acetonitrile a gradiente crescente di quest'ultimo dal 5% al 90% per 30 minuti. Ad entrambi i solventi eluenti è stata aggiunto lo 0.1% di TFA. Il flusso di 1 ml/min è stato mantenuto costante per tutta la durata della corsa cromatografica.

I composti sono stati poi caratterizzati anche mediante massa con sorgente elettrospray.



**Figura 10 Spettro di massa del composto (21)**

## **Saggi di binding**<sup>63</sup>

I recettori purificati  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_5$  (Chemicon International Inc., Temecula, CA) sono stati diluiti, rispettivamente, a 500 e 1000 ng/mL, in un buffer di rivestimento [20 mM di Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM di NaCl, 2 mM di  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM di  $\text{MgCl}_2$  e 1mM di  $\text{MnCl}_2$ ]. Un'aliquota dei recettori diluiti (100  $\mu\text{l}$ /pozzetto) è stata aggiunta a piastre di 96 pozzetti e incubati per tutta la notte a 4 C°. La soluzione di rivestimento è stata rimossa e 200  $\mu\text{l}$  di soluzione di blocco (buffer di rivestimento più 1% di BSA) sono stati aggiunti ai pozzetti ed incubati per altre due ore circa a temperatura ambiente. Dopo l'incubazione, le piastre sono state risciacquate tre volte con 200  $\mu\text{l}$  di soluzione di blocco-legame e incubate per tre ore a temperatura ambiente con 0.05 e 0.1 nM di [<sup>125</sup>I]-echistatina (Amersham Pharmacia) per i saggi di binding per il recettore  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_5$ , rispettivamente. Trascorso il periodo di incubazione, le piastre sono state sigillate e contate con un  $\gamma$ -counter (Packard).

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Sui composti sintetizzati sono stati condotti saggi di binding per verificare la diversa affinità dei composti per i due recettori  $\alpha_v\beta_3$  ed  $\alpha_v\beta_5$  e valutarne la selettività, dal momento che, seppur implicati entrambi nello stesso processo di angiogenesi tumorale, sembra che entrano in gioco in fasi diverse e con modalità diverse.

I dati in nostro possesso sono solo quelli relativi alla prima serie di composti, in cui c'è stato l'inserimento del  $\beta$ -turn mimetico; i saggi di binding relativi alla seconda serie di composti, sono ancora in corso. I dati sono riportati nella sottostante Tabella 1.

**Tabella 1: Dati relativi ai composti sintetizzati**

STRUTTURA	NOME	$\alpha_v\beta_3$ (nM) bind	$\alpha_v\beta_5$ (nM) bind
	Peptide di Kessler c[RGDf-V-]	195±16.8	0.11±0.03
	Cilengitide <b>EMD 121974</b> c[RGDf-N(Me)V-]	18.9±3.1	0.13±0.009
	c[Arg-Gly-Asp- (Phe-tiazolidina)]	146.9±6.9	452.1±6.8
	c[Asp-Gly-Arg- (Phe-tiazolidina)]	45.4±1.0	2.43±0.1
	c[Asp-Gly-Arg- (DPhe-tiazolidina)]	-----	-----
	c[Asp-Gly-Arg- (Tyr-tiazolidina)]	2.91±0.17	0.52±0.01

STRUTTURA	NOME	$\alpha_v\beta_3$ (nM) bind	$\alpha_v\beta_5$ (nM) bind
	c[Asp-Gly-Arg- (Lys-tiazolidina)]	188.6±3.98	3.41±0.06
	c[Asp-Gly-Arg- (indol-metilene- tiazolidina)]	2235±261	>1000
	c[Asp-Gly-Arg- imidazol-metilene- tiazolidina)]	3009±231	>1000
	c[Asp-Gly-Arg- (metil-tiazolidina)]	1554±236	>1000
	c[Asp-Gly-Arg- (amminometil-benzil- tiazolidina)]	1482±146	>1000
	c[Asp-Gly-Arg- (acetil-tiazolidina)]	2821±308	>1000

Il composto (12) c[Arg-Gly-Asp-(Phe-tiazolidina)] in cui è presente la normale sequenza RGD si lega sia al recettore  $\alpha_v\beta_3$  che  $\alpha_v\beta_5$  anche se risulta avere una affinità 3 volte maggiore per  $\alpha_v\beta_3$ .

Il composto (11) c[Asp-Gly-Arg-(Phe-tiazolidina)], simile al precedente tranne che per l'inserimento della sequenza RGD in modo retroinverso, ha un'affinità molto più alta rispetto al composto precedente per entrambi i recettori presi in esame, anche se risulta essere maggiormente affine per il recettore  $\alpha_v\beta_5$  (binding circa 18 volte maggiore).

Dal momento che quest'ultimo composto ha prodotto risultati migliori, tutti gli altri composti sono stati sintetizzati con la sequenza RGD retroinversa.

Il composto (13) c[Asp-Gly-Arg-(D-Phe-tiazolidina)] non è in grado di legarsi a nessuno dei due recettori e questo vuol dire che la configurazione assoluta dell'amminoacido da cui si parte per l'ottenimento del  $\beta$ -turn mimetico è di estrema importanza nel determinare l'affinità del peptidomimetico finale per le due integrine.

Il composto (14) c[Asp-Gly-Arg-(Tyr-tiazolidina)] in cui è stato introdotto un  $\beta$ -turn mimetico costituito da un nucleo tiazolidinico e da una parte che mima la catena laterale della tirosina, risulta essere il miglior composto finora sintetizzato, in quanto risulta avere ottimo binding per entrambi i recettori. Attualmente risulta essere il composto con il miglior valore di binding verso il



recettore  $\alpha_v\beta_3$ , anche se non è altamente selettivo per quest'ultimo, se confrontato con il valore ottenuto dal peptide di Kessler e dalla cilengitide.

Il composto (15) c[Asp-Gly-Arg-(Lys-tiazolidina)] ha elevata affinità per entrambi i recettore anche se ha un binding 55 volte maggiore per il recettore  $\alpha_v\beta_5$ ; questo composto, quindi, è un potente inibitore del recettore  $\alpha_v\beta_5$ . Il fatto che il peptidomimetico in cui è inserito un  $\beta$ -turn mimetico costituito da una parte mimante la catena laterale della Lys ha buona selettività per l' $\alpha_v\beta_5$ , ci indica che questo recettore è in grado di allocare una catena flessibile basica nel punto in cui normalmente va ad allocarsi un anello fenilico. Questo smentisce l'ipotesi che sia necessaria la presenza di un'interazione  $\pi$ -stacking con la controparte recettoriale, sia che si tratti del recettore  $\alpha_v\beta_3$  o  $\alpha_v\beta_5$ . Può essere che invece sia indispensabile un'interazione ionica tra un gruppo  $\text{NH}_3^+$  e un gruppo  $\text{COO}^-$  del recettore, soprattutto se si vuol creare una certa selettività per il recettore  $\alpha_v\beta_5$ .

Si è pensato, quindi, di introdurre nelle sequenze dei  $\beta$ -turn mimetici che portassero dei gruppi aromatici basici. Sia il composto (16) c[Asp-Gly-Arg-(indol-metilen-tiazolidina)] che il composto (17) c[Asp-Gly-Arg-(imidazol-metilen-tiazolidina)] hanno però scarsa affinità per entrambi i recettori. Questo vuol dire che può essere accomodato nella tasca recettoriale solo un gruppo benzilico e non altri anelli aromatici. Dal momento che i risultati migliori si erano ottenuti con  $\beta$ -turn mimetici che presentavano catene

mimanti quelle laterali della tirosina e della lisina, si è pensato di sintetizzare il composto (18) c[Asp-Gly-Arg-(amminometil-benzil-tiazolidina)] in cui c'è la condensazione di un gruppo benzilico con un gruppo metilen-amminico, in modo da verificare se l'affinità per i due recettori aumentasse. Purtroppo, questo composto non ha prodotto i risultati sperati in quanto mostra una modesta affinità per tutti e due recettori presi in esame. Questo dato, insieme agli altri ottenuti, ci permette di asserire che per avere affinità per entrambe le integrine è necessario un gruppo benzilico che può stabilire interazioni  $\pi$ -stacking e che per avere anche solo una minima selettività per  $\alpha_v\beta_5$  ci vuole un gruppo basico.

Sono stati poi sintetizzati i composti (19) e (20). Il composto (19) c[Asp-Gly-Arg-(metil-tiazolidina)] è stato sintetizzato per accertare se fosse indispensabile il riempimento della tasca dove normalmente si alloca il gruppo aromatico. Il composto (19) ha scarsa affinità per entrambi i recettori; questo ci porta a pensare che il riempimento di quella tasca è fondamentale ai fini dell'affinità.

Il composto (20) c[Asp-Gly-Arg-(acetil-tiazolidina)] risulta anch'esso scarsamente affine per entrambi i recettori.

## CONCLUSIONI

I test di binding effettuati sui composti sintetizzati nei laboratori presso cui ho svolto il mio lavoro di ricerca hanno permesso l'individuazione di una molecola in grado di legarsi con elevata potenza ai recettori  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_5$ , e di un'altra molecola che ha una buona selettività per il recettore  $\alpha_v\beta_5$ . A partire da questi risultati incoraggianti si proseguiranno gli studi in modo da riuscire ad individuare un composto che possa essere un potente inibitore selettivo per una delle due integrine prese in esame.

Gli studi *in vitro* dimostrano che ci sono diversi vantaggi nel combinare antagonisti delle integrine con farmaci citotossici per ridurre la sopravvivenza delle cellule tumorali<sup>64</sup>. L'unione della terapia tradizionale con la terapia anti-angiogenica si è dimostrata efficace nei modelli preclinici<sup>65</sup>. Le cellule tumorali possono comunque acquisire resistenza ai trattamenti antiangiogenici in quanto dopo il blocco dell'integrine si può avere uno shift verso altri *pathways* angiogenici<sup>66</sup> (questo è confermato dal fatto che la perdita della funzionalità del recettore  $\alpha_v\beta_3$  dopo l'ablazione del gene  $\beta_3$  porta ad un aumento di angiogenesi mediata dall'overespressione del recettore VEGFR-2). C'è anche da aggiungere che, purtroppo, non tutti i pazienti rispondono alla terapia anti-angiogenica. L'ipotesi che gli inibitori delle integrine possono essere potenziali farmaci per il trattamento del cancro è una cosa già pensata ai tempi degli studi sulle MMPs. Inizialmente si pensava che queste MMPs

partecipassero soprattutto al rimodellamento della matrice extracellulare per far avviare tutti i processi indispensabili per l'invasione tumorale. Il fallimento nei trials clinici della prima generazione di inibitori delle varie MMPs ha fatto capire che le conoscenze sul contributo di ciascuna metalloproteasi della matrice negli eventi sito-specifici e tempo-specifici della progressione tumorale sono ancora insufficienti<sup>67</sup>. La comprensione dei rispettivi ruoli delle varie integrine nei vari steps della progressione del tumore permetterà senza ombra di dubbio l'uso ottimale dei corrispondenti antagonisti. Inoltre, la possibilità di trovare degli inibitori delle integrine selettivi permetterà a breve di avere delle nuove terapie anti-cancro, più sicure e meno invasive rispetto a quelle attuali. Queste ipotesi sembrano essere confermate dai promettenti studi clinici con Vitaxin<sup>TM</sup> e la cilengitide.

# BIBLIOGRAFIA

- <sup>1</sup> Hynes , R.O. “Integrins: versatility , modulation, and signaling in cell adhesion”. *Cell* (1992) , **69** , 11-25.
- <sup>2</sup> Giancotti, F. G., Ruoslahti E. “ Integrin signaling”. *Science* (1999), **285**, 1028-1032.
- <sup>3</sup> Mould, A. P., Komoriya, A., Yamada, K. M., Humphries, M. J. “The CS5 peptide is a second site in the III CS region of fibronectin recognized by the integrin  $\alpha_v\beta_1$ . Inhibition of  $\alpha_4\beta_1$  function by RGD peptide homologues”. *J. Biol. Chem.* (1991), **266**, 3579-3585.
- <sup>4</sup> Lee, J. O., Rieu, P., Bankston, L. A., Arnaout, M. A., Liddington, R. “Two conformations of the integrin A-domain (I-domain): a pathway for activation ?”. *Structure* (1995), **3**, 1333-1340.
- <sup>5</sup> Altieri, D. C. “Occupancy of CD11b/CD18 (Mac-1) divalent ion binding site(s) induces leukocyte adhesion”. *J. Immunol.* (1991), **147**, 1891-1898.
- <sup>6</sup> Yanai, T., Shimooka, T., Ii, I “Manganese ion elicits a binding activity of placenta vitronectin receptor to fibronectin cell-binding domain”. *Cell struct. Funct.* (1991), **16**, 149-156.
- <sup>7</sup> Dransfield, I., Cabanas, C., Craig, A., Hogg, N. “Divalent cation regulation of the function of the leukocyte integrin LFA-1”. *J. Cell Biol.* (1992), **116**, 219-226.
- <sup>8</sup> Suzuki, S., Naitho, Y. “Aminoacid sequenze of a novel integrin  $\beta_4$  subunit and primary expression of the mRNA in epithelial cells”. *EMBO J.* (1990), **9**, 757-763.
- <sup>9</sup> Albelda, S. M., Buck, C. A. “Integrins and other cell adhesion molecules”. *FASEB J.* (1990), **4**, 2868-2880.
- <sup>10</sup> Gilmore, A. P., Burridge, K. “Molecular mechanisms for focal adhesion assembly through regulation of protein-protein interactions”. *Structure* (1996), **4**, 647-651.
- <sup>11</sup> Springer, T. A. “Adhesion receptors of the immune system”. *Nature* (1990), **346**, 425-434.
- <sup>12</sup> Kishimoto, T. K., Larson, R. S., Corbi, A. L., Dustin, M. L., Staunton, D. E., Springer, T. A. “The leukocyte integrins”. *Adv. Immunol.* (1989), **46**, 149-182.
- <sup>13</sup> Arnaout, M.A. “Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18”. *Blood* (1990), **75**, 1037-1050.
- <sup>14</sup> Cox, D., Akoi, J., Seki, J., Motoyama, Y., Yoshida, K. “The pharmacology of the integrins”. *Med. Res. Rev.* (1994), **14**, 195-228.
- <sup>15</sup> Phillips D. R., Charo, I. F., Scarborough R. M. “GPIIb-IIIa: the responsive integrin”. *Cell* (1991), **65**, 359-362.
- <sup>16</sup> Chen, Y. Q., Gao, X., Timar, J., Tang, I., Grossi, I. M., Chelladurai, M., Kunicki, T. J., Fligiel, S. E. G., Taylor, J. D., Honn, K. V. “Identificatoion of the  $\alpha_{IIb}\beta_3$  integrin in murine tumor cells”. *J. Biol. Chem.* (1992), **267**, 17314-17320.
- <sup>17</sup> Hood, J. D., Cheresch, D. A. “Role of integrins in cell invasion and migration”. *Nat. Rev. Cancer* (2002), **2**, 91-100.
- <sup>18</sup> Kumar, C. C. “Integrin  $\alpha_v\beta_3$  as a therapeutic target for blocking tumor-induced angiogenesis”. *Curr. Drug Targets* (2003), **4**, 123-131

- 
- <sup>19</sup> Clezardin, P. "Recent insights into the role of integrins in cancer metastasis". *Cell. Mol. Life Sci.* (1998), **54**, 541-548.
- <sup>20</sup> Friedlander, M., Brooks, P. C., Shaffer, R. W., Kincaid, C. M., Varner, J. A., Cheresh, D. A. "Definition of two angiogenic pathways by distinct  $\alpha_v$  integrins". *Science* (1995), **270**, 1500-1502.
- <sup>21</sup> Filardo, E. J., Brooks, P. C., Deming, S. L., Damsky, C., Cheresh, D. A. "Requirement of the NPXY motif in the integrin beta 3 subunit cytoplasmic tail for melanoma cell migration in vitro and in vivo". *J. Cell Biol.* (1995), **130**, 441-450.
- <sup>22</sup> Brooks, P. C., Klemke, R. L., Schon, S., Lewis, J. M., Schwartz, M. A., Cheresh, D. A. "Insulin-like growth factor receptor cooperates with integrin  $\alpha_v\beta_5$  to promote tumor cell dissemination in vivo". *J. Clin. Invest.* (1997), **99**, 1390-1398.
- <sup>23</sup> Pasqualini, R., Bodorova, J., Hemler, M. E. "A study of the structure, function and distribution of  $\beta_5$  integrins using novel anti- $\beta_5$  monoclonal antibodies". *J. Cell Sci.* (1993), **105**, 101-111.
- <sup>24</sup> Gutheil, J. C., Campbell, T. N., Pierce, P. R., Watkins, J. D., Huse, W. D., Bodkin, D. J., Cheresh, D. A. "Targeted antiangiogenic therapy for cancer using vitaxin: a humanized monoclonal antibody to the integrin  $\alpha_v\beta_3$ ". *Clin. Cancer Res.* (2000), **6**, 3056-3061.
- <sup>25</sup> Belvisi, L., Bernardi, A., Checchia, A., Manzoni, L., Potenza, D., Scolastico, C., Castorina, M., Capelli, A., Giannini, G., Carminati, P., Pisano, C. "Potent integrin antagonists from a small library of RGD-including cyclic pseudopeptides". *Org. Lett.* (2001), **3**, 1001-1004.
- <sup>26</sup> Dechantsreiter, M. A., Planker, E., Matha, B., Lohof, E., Holzemann, G., Jonczyk, A., Goodman, S. L., Kessler, H. "N-methylated cyclic RGD peptides as highly active and selective  $\alpha_v\beta_3$  integrin antagonists". *J. Med. Chem.* (1999), **42**, 3033-3040.
- <sup>27</sup> Eskens, F. A., Dumez, H., Hoekstra, R., Perschl, A., Brindley, C., Bottcher, S., Wynendaele, W., Drevs, J., Verweij, J., van Oosterom, A. T. "Phase I and pharmacokinetic study of continuous twice weekly intravenous administration of cilengitide (EMD 121974), a novel inhibitor of the integrins  $\alpha_v\beta_3$  and  $\alpha_v\beta_5$  in patients with advanced solid tumours". *Eur. J. Cancer* (2003), **39**, 917-926.
- <sup>28</sup> Goodman, S. L., Holzemann, G., Sulyok, G. A., Kessler, H. "Nanomolar small molecule inhibitors for  $\alpha_v\beta_6$ ,  $\alpha_v\beta_5$ , and  $\alpha_v\beta_3$  integrins". *J. Med. Chem.* (2002), **45**, 1045-1051.
- <sup>29</sup> Marinelli, L., Lavecchia, A., Gottschalk, K. E., Novellino, E., Kessler, H. "Docking studies on  $\alpha_v\beta_3$  integrin ligands: pharmacophore refinement and implications for drug design". *J. Med. Chem.* (2003), **46**, 4393-4404.
- <sup>30</sup> Wierzbicka-Patynowski, I., Niewiarowski, S., Marcinkiewicz, C., Calvete, J. J., Marcinkiewicz, M. M., McLane, M. A. "Structural requirements of echistatin for the recognition of  $\alpha_v\beta_3$  and  $\alpha_5\beta_1$  integrins". *J. Biol. Chem.* (1999), **274**, 37809-37814.
- <sup>31</sup> Xiong, J. P., Stehle, T., Diefenbach, B., Zhang, R., Dunker, R., Scott, D. L., Joachimiak, A., Goodman, S. L., Arnaout, M. A. "Crystal structure of the extracellular segment of integrin  $\alpha_v\beta_3$ ". *Science* (2001), **294**, 339-345.
- <sup>32</sup> Xiong, J. P., Stehle, T., Zhang, R., Joachimiak, A., French, M., Goodman, S. L., Arnaout, M. A. "Crystal structure of the extracellular segment of integrin  $\alpha_v\beta_3$  in complex with an Arg-Gly-Asp ligand". *Science* (2002), **296**, 151-155.

- 
- <sup>33</sup> Marinelli, L., Gottschalk, K. E., Meyer, A., Novellino, E., Kessler, H. "Human integrin  $\alpha_v\beta_5$ : homology modeling and ligand binding". *J. Med. Chem.* (2004), **47**, 4166-4177.
- <sup>34</sup> Brower, V. "Tumor angiogenesis- new drugs on the block". *Nat. Biotechnol.* (1999), **17**, 963-968.
- <sup>35</sup> Plow, E. F., Haas, T. A., Zhang, L., Loftus, J., Smith, J. W. "Ligand binding to integrins". *J. Biol. Chem.* (2000), **275**, 21785-21788.
- <sup>36</sup> Masumoto, A., Hemler, M. E. "Mutation of putative divalent cation sites in the  $\alpha_4$  subunit of the integrin VLA-4: Distinct effects on adhesion to CS1/fibronectin, VCAM-1 and invasin". *J. Cell Biol.* (1993), **123**, 245-253.
- <sup>37</sup> Pierschbacher, M. D., Ruoslahti, E. "Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment promoting activity". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1984), **81**, 5985-5988.
- <sup>38</sup> Pierschbacher, M. D., Ruoslahti, E. "Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule". *Nature*, (1984), **309**, 30-33.
- <sup>39</sup> Hautanen, A., Gailit, J., Mann, D. M., Ruoslahti, E. "Effects of modifications of the RGD sequence and its context on recognition by the fibronectin receptor". *J. Biol. Chem.* (1989), **264**, 1437-1442.
- <sup>40</sup> Pierschbacher, M. D., Ruoslahti, E. "Influence of stereochemistry of the sequence Arg-Gly-Asp-Xaa on binding specificity in cell adhesion". *J. Biol. Chem.* (1987), **262**, 17294-17298.
- <sup>41</sup> Aumailley, M., Gurrath, M., Muller, G., Calvete, J., Timpl, R., Kessler, H. "Arg-Gly-Asp constrained within cyclic pentapeptides. Strong and selective inhibitors of cell adhesion to vitronectin and laminin fragment P1". *FEBS Lett.* (1991), **291**, 50-54.
- <sup>42</sup> Pfaff, M., Tangemann, K., Muller, B., Gurrath, M., Muller, G., Kessler, H., Timpl, R., Engel, J. "Selective recognition of cyclic RGD peptides of NMR defined conformation by alpha IIb beta 3, alpha V beta 3, and alpha 5 beta 1 integrins". *J. Biol. Chem.* (1994), **269**, 20233-20238.
- <sup>43</sup> Haubner, R., Finsinger, D., Kessler, H. "Stereoisomeric peptide libraries and peptidomimetics for design of selective inhibitors of the  $\alpha_v\beta_3$  integrin for a new cancer therapy". *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* (1997), **36**, 1374-1389.
- <sup>44</sup> Haubner, R., Gratias, R., Diefenbach, B., Goodman, S., Joachimiak, A., Kessler, H. "Structural and functional aspects of RGD-containing cyclic pentapeptides as highly potent and selective integrin  $\alpha_v\beta_3$  antagonists". *J. Am. Chem. Soc.* (1996), **118**, 7461-7472.
- <sup>45</sup> Haubner, R., Schmitt, W., Holzemann, G., Goodman, S., Jonczyk, A., Kessler, H. "Cyclic RGD peptides containing beta-turn mimetics". *J. Am. Chem. Soc.* (1996), **118**, 7881-7891.
- <sup>46</sup> Haubner, R., Finsinger, D., Kessler, H. "Stereoisomeric peptide libraries and peptidomimetics for designing selective inhibitors of the  $\alpha_v\beta_3$  integrin for a new cancer therapy". *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* (1997), **36**, 1374-1389.
- <sup>47</sup> 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. "A novel synthetic Arg-Gly-Asp-containing peptide cyclo(-RGDf = V-) is the potent inhibitor of angiogenesis". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2001), **288**, 711-717.
- <sup>48</sup> 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. "Non peptide  $\alpha(v)\beta(3)$  antagonists identification of potent

- 
- RGD mimetics incorporating novel beta-amino acids as aspartic acid replacements". *Bioorg Med Chem Lett* (2002), **3**, 31-34.
- <sup>49</sup> Belvisi, L., Bernardi, A., Checchia, A., Manzoni, L., Potenza, D., Scolastico, C., Castorina, M., Capelli, A., Giannini, G., Carminati, P., Pisano, C. "Potent integrin antagonists from a small library of RGD-including cyclic pseudopeptides". *Org Lett* (2001), **3**, 1001-1004.
- <sup>50</sup> Dechantsreiter, M. A., Planker, E., Matha, B., Lohof, E., Holzemann, G., Jonczyk, A., Goodman, S. L., Kessler, H. "N-Methylated cyclic RGD peptides as highly active and selective  $\alpha(V)\beta(3)$  integrin antagonists". *J. Med Chem* (1999), **42**, 3033-3040.
- <sup>51</sup> Eskens, F. A., Dumez, H., Hoekstra, R., Perschl, A., Brindley, C., Bottcher, S., Wynendaele, W., Drevs, J., Verweij, J., van Oosterom, A. T. "Phase I and pharmacokinetic study of continuous twice weekly intravenous administration of Cilengitide (EMD 121974), a novel inhibitor of the integrins  $\alpha(V)\beta(3)$  and  $\alpha(V)\beta(5)$  in patients with advanced solid tumours". *Eur J. Cancer* (2003), **39**, 917-926.
- <sup>52</sup> Manthey, C., Lee, Y., Wang, A., Crysler, C., Zhao, S., Bone, R. F., Tomczuk, B. E. "Characterization of O-guanidinesas novel  $\alpha v \beta 3$  inhibitors". *Proc Am Assoc Cancer Res* (2001), **42**, 368.
- <sup>53</sup> Marugan, J. J., Haslow, K. D., Crysler, C. "Design, synthesis, and biochemical evaluation of novel  $\alpha V \beta 3$  integrin ligands". *BioorgMed Chem Lett* (2004), **14**, 4553-4555.
- <sup>54</sup> Marugan, J. J., Manthey, C., Anaclerio, B., Lafrance, L., Lu, T., Markota, T., Leonard, K. A., Crysler, C., Eisennagel, S., Dasgupta, M., Tomczuk, B. "Design, synthesis, and biological evaluation of novel potent and selective  $\alpha(V)\beta(3)/\alpha(V)\beta(5)$  integrin dual inhibitors with improved bioavailability. Selection of the molecular core". *J. Med Chem* (2005), **48**, 926-934.
- <sup>55</sup> Sulyok, G. A., Gibson, C., Goodman, S. L., Holzemann, G., Wiesner, M., Kessler, H. "Solid-phase synthesis of a nonpeptide RGD mimetic library: new selective  $\alpha(V)\beta(3)$  integrin antagonist". *J. Med Chem* (2001), **44**, 1938-1950.
- <sup>56</sup> Gibson, C., Goodman, S. L., Hahn, D., Hoelzemann, G., Kessler, H. "Novel solid-phase synthesis of azapeptides and azapeptoids via Fmoc-strategy and its application in the synthesis of RGD-mimetics". *J. Org Chem* (1999), **64**, 7388-7394.
- <sup>57</sup> Gante, J., "Peptidomimetics – tailored enzyme inhibitors". *AngewChem Int Ed. Engl* (1994), **33**, 1699-1720.
- <sup>58</sup> Urbahns, K., Harter, M., Albers, M., Schmidt, D., Stelte-Ludwig, B., Bruggemeier, U., Vaupel, A., Gerdes, C. "Biphenyls as potent vitronectin receptor antagonists". *Bioorg Med Chem Lett* (2002), **12**, 205-208.
- <sup>59</sup> Grieco, P., Campiglia, P., Gomez-Monterrey, I., Novellino, E. "Synthesis of conformationally constrained  $\beta$ -turn thiazolidine mimetic". *Tetrahedron Letters* (2002), **43**, 1197-1199.
- <sup>60</sup> Ohler, E., Schimdt, U. *Chem. Ber.*(1979), **112**, 107-115.
- <sup>61</sup> Fehrentz, J. A., Castro, B. *Synthesis* (1983), 676-678.
- <sup>62</sup> Meyer, J. P., Davis, P., Lee, K. B., Porreca, F., Yamamura, H., Hruby, V. J. "Synthesis using a Fmoc-based strategy and biological activities of some reduced peptide bond pseudopeptide analogs of dinorphin A". *J. Med. Chem.*(1995), **38**, 3462-3468.
- <sup>63</sup> Casiraghi, G., Rasso, G., Auzzas, L., Burreddu, P., Gaetani, E., Battistini, L., Zanardi, F., Curti, C., Nicastro, G., Belvisi, L., Motto, I., Castorina, M., Giannini, G., Pisano, C. "Grafting aminocyclopentane carboxylic acids onto the RGD tripeptide sequence generate slow nanomolar  $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$  integrin dual binders". *J. Med. Chem.* (2005), **48**, 7675-7687.



- 
- <sup>64</sup> Aoudjit, F., Vuori, K. "Integrin signaling inhibits paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells". *Oncogene* (2001), **20**, 4995-5004.
- <sup>65</sup> Bello, L., Carrabba, G., Giussani, C., Lucini, V., Cerutti, F., Scaglione, F., Landrè, J., Pluderi, M., Tomei, G., Villani, R. "Low-dose chemotherapy combined with an antiangiogenic drug reduces human glioma growth in vivo". *Cancer Res.* (2001), **61**, 7501-7506.
- <sup>66</sup> Reynolds, L. E., Wyder, L., Lively, J. C., Taverna, D., Robinson, S. D., Huang, X., Sheppard D., Hynes, R. O., Hodivala-Dilke, K. M. "Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking  $\beta_3$  integrin or  $\beta_3$  and  $\beta_5$  integrins". *Nat. Med.* (2002), **8**, 27-34.
- <sup>67</sup> Coussens, L. M., Fingleton, B., Matrisian, L. M. "Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trias and tribulations". *Science* (2002), **295**, 2387-2392.

## ***CAPITOLO 2***

## **LA BIOLOGIA DEL VEGF E I SUOI RECETTORI**

Durante gli ultimi anni è stato dimostrato il ruolo fondamentale del VEGF nella regolazione dell'angiogenesi fisiologica e fisiopatologica. A sostegno del ruolo prioritario del VEGF nell'angiogenesi è la caratterizzazione di numerosi suoi effetti biologici. Oltre alla sua potente ed esclusiva azione mitogenica sulle cellule endoteliali, VEGF esercita i suoi effetti anche sulla matrice extracellulare, in quanto stimola l'espressione di metallo-proteinasi e la formazione di fenestrazioni endoteliali. VEGF induce inoltre aumento della permeabilità vasale, provocando accumulo extravasale di fibrina, substrato per l'attività di cellule endoteliali e tumorali. VEGF interagisce anche con cellule del sistema immunitario, tra cui le natural killer, in quanto induce l'espressione di molecole di adesione.

Il gene umano *VEGFA* è organizzato in otto esoni, separati da sette introni<sup>68</sup>; lo splicing alternativo di questo gene dà origine a quattro diverse isoforme<sup>69</sup>, aventi rispettivamente 121, 165, 189, 206 amminoacidi dopo il cleavage della sequenza segnale. L'isoforma VEGF<sub>165</sub>, presente in tutte le cellule che producono VEGF, rappresenta la specie molecolare predominante. Le isoforme VEGF<sub>189</sub> e VEGF<sub>121</sub> sono state identificate nella maggior parte delle cellule che esprimono il gene per VEGF, mentre la quarta isoforma VEGF<sub>206</sub> è stata identificata esclusivamente in epatociti fetali umani. Allo stato nativo

VEGF<sub>165</sub>, isoforma principale, si presenta come una glicoproteina di 45 KDa omodimerica, basica che si lega all'eparina<sup>70</sup>. Le differenze sia nelle caratteristiche fisiche, in particolare il punto isoelettrico, che nella capacità di legare l'eparina, influenzano la biodisponibilità delle diverse isoforme. L'isoforma 121, a carattere leggermente acido, viene interamente secreta<sup>71</sup>. L'isoforma 165 è anch'essa secreta, anche se una sua frazione significativa rimane legata alla membrana cellulare ed alla matrice extracellulare<sup>72</sup>, mentre le rimanenti isoforme, 189 e 206, rimangono associate alla matrice extracellulare. È stato mostrato *in vitro* che le forme non solubili di VEGF possono essere rilasciate tramite clivaggio proteolitico (VEGF<sub>110</sub>) da parte dell'eparina e della plasmina. L'assenza del dominio carbossi-terminale, sia essa dovuta a splicing (VEGF<sub>121</sub>) o a clivaggio proteolitico (VEGF<sub>110</sub>) è associata ad una perdita di attività mitogenica ed indica come molecola attiva l'isoforma VEGF<sub>165</sub><sup>73</sup>.

Diversi meccanismi sono coinvolti nella regolazione del gene che codifica per VEGF. Un ruolo rilevante è giocato dalla tensione tissutale di ossigeno, come dimostrato dall'aumento reversibile dei livelli di mRNA per VEGF in condizioni di ipossia in vivo ed in vitro<sup>74</sup>. Il pattern di espressione di VEGF nel glioblastoma ed altri tumori che presentano spiccate caratteristiche necrotiche, in tessuti ischemici non tumorali (ad esempio miocardio e retina) e durante l'embriogenesi, conferma l'ipotesi che l'ipossia locale è uno dei

maggiori fattori di induzione nel microambiente. L'aumento di espressione di VEGF mRNA è mediato principalmente dal fattore di trascrizione HIF-1 (Hypoxia-inducible factor-1), che si lega ad un sito di riconoscimento nella regione promotrice del gene del VEGF<sup>75</sup>. L'induzione ipossica dell'espressione di VEGF è anche mediata dall'adenosina tramite i recettori A<sub>2</sub> e il conseguente aumento di cAMP intracellulare e dall'attivazione della via di trasduzione correlata a c-Src.

L'aumento dei livelli di mRNA per VEGF in risposta all'ipossia è dovuto, oltre che ad incremento della trascrizione, ad un'aumentata stabilità del messaggero tramite fissazione di una proteina indotta da ipossia all'estremità 3' non codificante del messaggero. È stato riportato che il messaggero di VEGF è regolato, a livello trascrizionale e post-trascrizionale, anche da deficit di glucosio, suggerendo che VEGF è un gene indotto da stimoli stressanti. Numerose citochine sono, inoltre, in grado di operare indirettamente una up-regulation dell'mRNA di VEGF, con conseguente sintesi proteica e secrezione del fattore di crescita endoteliale. Il transforming growth factor (TGF- $\alpha$ ), il TGF- $\beta$  e l'EGF (epidermal growth factor) inducono l'espressione di VEGF da parte di vari tipi cellulari<sup>76</sup>. I mediatori della risposta infiammatoria, quali l'interleuchina 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), l'interleuchina 6 (IL-6) e la prostaglandina E<sub>2</sub> sono in grado di indurre in diversi modelli l'espressione di VEGF, suggerendo la partecipazione di quest'ultimo ai processi

infiammatori<sup>77</sup>. L'IGF-I (insulin-like growth factor-I), fattore di crescita tumorale in vitro ed in vivo, può indurre, oltre al suo effetto proliferativo, l'espressione di VEGF da parte delle cellule tumorali, stimolandone così non solo la proliferazione, ma anche la vascolarizzazione.

L'espressione del gene per VEGF è regolata in corso di differenziazione e trasformazione cellulare. L'induzione di VEGF durante la differenziazione è associata ad attivazione delle proteine chinasi C ed A, in accordo con la presenza dei siti AP1 e AP2 nella regione promotrice del gene di VEGF; gli esteri del forbolo, attivatori della PKC e la forskolina, attivatore dell'adenilato ciclasi, inducono l'espressione di mRNA per VEGF. Eventi specifici di trasformazione cellulare sono provocati dall'induzione dell'espressione di VEGF e, quest'ultima viene indotta dall'oncogene ras o dall'over-espressione di v-raf o v-Src<sup>78</sup>. Infine, le proteine regolatrici del ciclo cellulare, quali p53 ed il soppressore del gene di Von Hippel-Lindau (VHL), sono coinvolte nella regolazione dell'espressione di VEGF<sup>79</sup>.

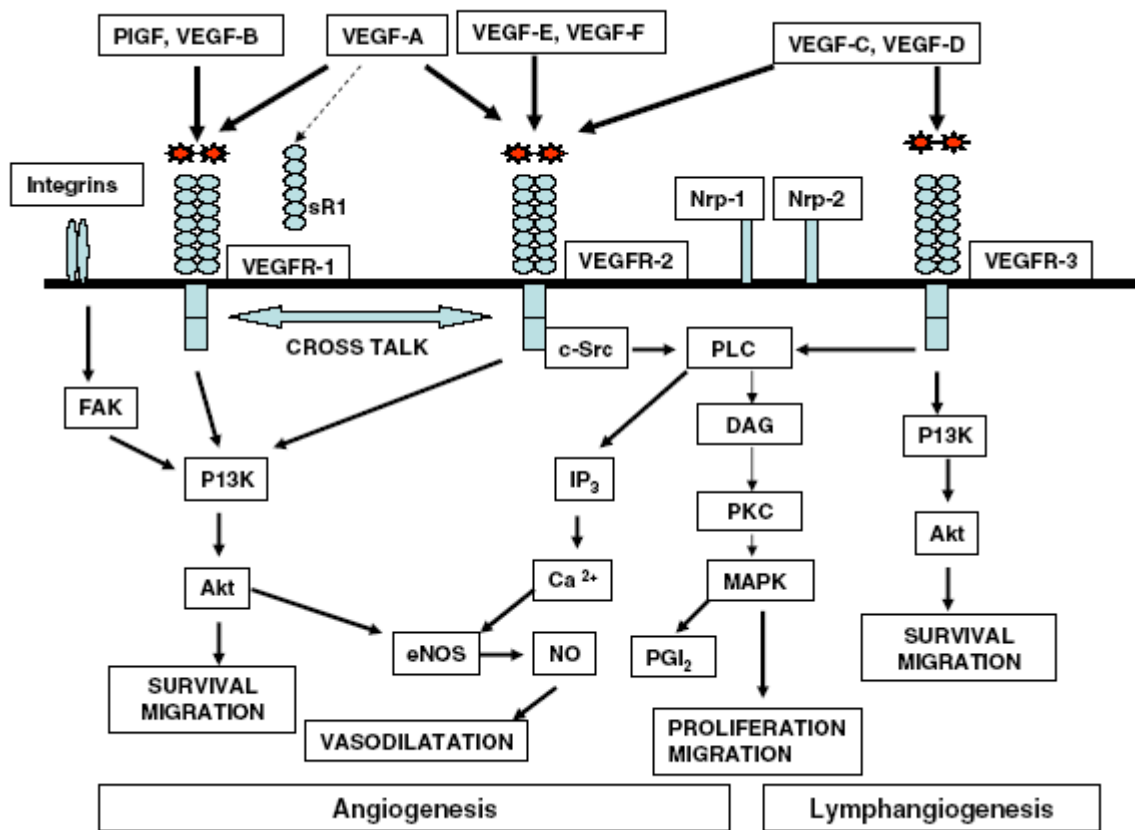
L'angiogenesi è controllata da segnali paracrini rappresentati per la maggior parte da ligandi proteici che si fissano, modulandone l'attività, su recettori transmembrana a tirosina chinasi (RTK). La proteina di VEGF umano si lega con alta affinità a due classi di recettori della famiglia delle tirosin-chinasi. *Flt-1* (*fms*-like tyrosine-kinase), il recettore con maggiore affinità (Kd: 10 pM), è espresso sulle cellule endoteliali vascolari, localizzazione che

conferma l'azione principale di VEGF sull'endotelio vascolare. *KDR* (kinase domain region), il recettore con minore affinità (Kd: 100 pM), il cui omologo murino viene denominato *flk-1* (fetal liver kinase-1), è stato identificato sulle cellule endoteliali, sui monociti e sulle cellule tumorali. Quest'ultimo lega VEGF<sub>165</sub>, ma non VEGF<sub>121</sub>. Come membri della famiglia della RTK, entrambi i recettori sono organizzati in tre domini, una regione extracellulare costituita da sette domini extracellulari simili alle immunoglobuline (*Ig-like*), una regione transmembrana ed una regione intracellulare responsabile dell'attività tirosin-chinasica<sup>80</sup>. Una forma solubile del recettore *flt-1* che lega con alta affinità VEGF e priva dei sette domini *Ig-like*, della regione transmembrana e del dominio citoplasmatico, è stata identificata nelle cellule endoteliali della vena ombelicale umana e potrebbe esercitare una regolazione fisiologica negativa degli effetti di VEGF. Nella famiglia dei recettori RTK con sette domini *Ig-like* interviene anche il recettore *flt-4*, che lega VEGF-C<sup>81</sup>. L'interazione con entrambi i recettori è essenziale per indurre lo spettro completo di risposte biologiche di VEGF. La cascata degli eventi implicati nella traduzione del segnale indotto da VEGF, che inizia con l'autofosforilazione e la dimerizzazione dei recettori in seguito all'interazione con il ligando, viene seguita da una successione di fosforilazioni che porta all'attivazione di vie alternative di traduzione del segnale, in particolare quelle correlate a ras. Gli effetti biologici di VEGF sono diversi in funzione

del tipo di recettore con il quale interagisce, i due recettori, benché fortemente omologhi, attivando vie di trasduzione distinte, trasmettono infatti segnali diversi alle cellule endoteliali. Da numerosi esperimenti effettuati utilizzando linee cellulari trasfettate con il gene di ciascuno dei due recettori, si è pervenuti alla conclusione che *flk-1/KDR* è essenziale affinché VEGF possa esprimere la maggior parte dei suoi effetti biologici. Tale ipotesi è corroborata dall'osservazione che, mentre l'interazione di VEGF con *flk-1/KDR* è seguita da proliferazione delle cellule endoteliali, nessun effetto mitogenico segue il binding di VEGF con *flt-1* in virtù della sua capacità di formare eterodimeri con KDR e di legare varianti di VEGF, è stato inoltre ipotizzato che *flt-1* possa esercitare in tal modo una regolazione negativa della traduzione del segnale dipendente da KDR<sup>82</sup>. Altri studi hanno tuttavia dimostrato, che l'interazione di VEGF con *flt-1* attiva la via del fosfatidilinositolo e potrebbe, per tale motivo, essere coinvolto nel fenomeno di migrazione monocitaria. L'espressione di recettori ad alta affinità per VEGF durante stadi precoci dello sviluppo embrionale negli emangioblasti, suggerisce un suo ruolo nella vasculogenesi e nell'angiogenesi e sarebbe uno dei primi eventi della differenziazione delle cellule endoteliali. Come per VEGF, è stata proposta una regolazione ipossica dell'espressione dei suoi recettori. È stato osservato che in vivo l'espressione di questi ultimi è aumentata in seguito a fenomeni di tipo ipossico acuti e cronici; i risultati in vitro suggeriscono tuttavia una



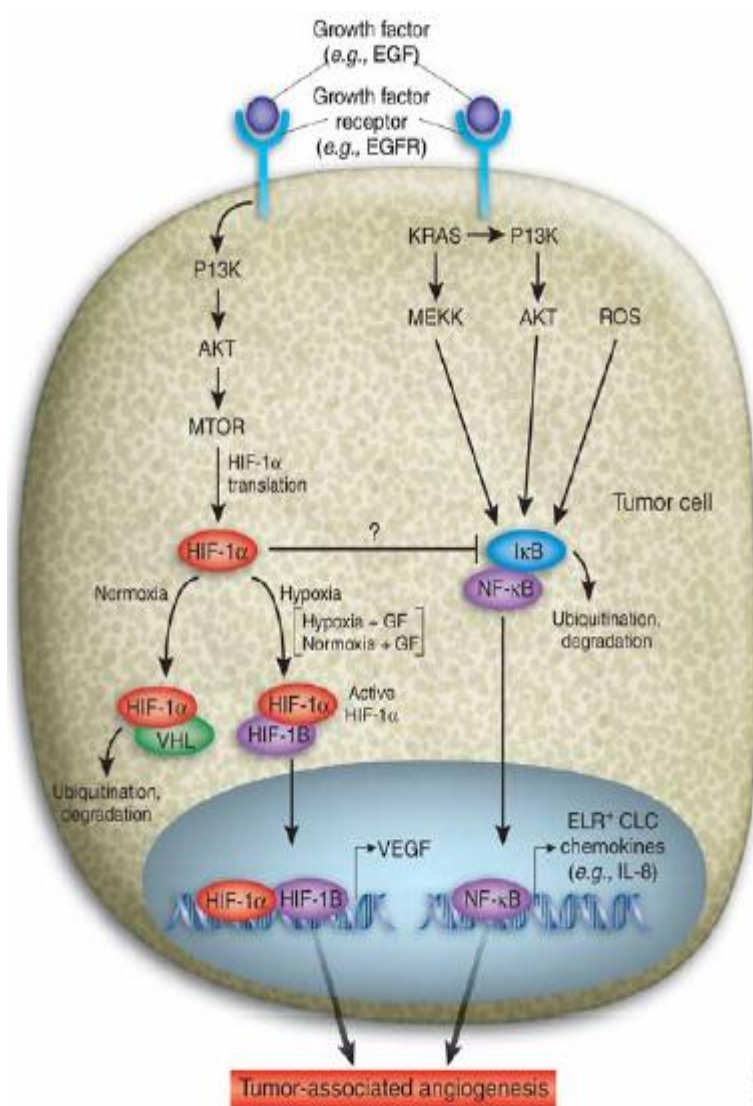
regolazione indiretta, indotta da un mediatore non ancora identificato, rilasciato da tessuti ischemici<sup>83</sup>. Inizialmente si riteneva che il recettore *flt-1* (VEGFR-1) agisse come “recettore esca”, riducendo il numero delle molecole di VEGF in grado di legarsi a *flk-1/KDR* (VEGFR-2)<sup>84</sup>, ma studi recenti hanno dimostrato che anche il VEGFR-1 legato al VEGF può indurre un segnale mitogeno<sup>85</sup> (Figura 1).



**Figura1** Cascate di segnali indotte dalle varie isoforme del VEGF legandosi ai tre recettori

## FUNZIONI DEL VEGF NEI TUMORI

Lo sviluppo della vascolarizzazione tumorale deriva dallo switch angiogenico termine che descrive lo squilibrio tra fattori pro-angiogenici e quelli anti-angiogenici. Il VEGF svolge un ruolo centrale nell'attivazione dello switch angiogenico dal momento che l'espressione di questa fondamentale molecola pro-angiogenica viene sovraregolata da molte condizioni caratteristiche dei



**Figura2 Segnali che inducono l'angiogenesi tumore-indotta**

tumori, quali l'ipossia, il rilascio di citochine, lo stress meccanico e la sovraregolazione degli oncogeni<sup>86</sup>. L'ipossia innesca la crescita dei vasi inviando un segnale attraverso i fattori indotti dall'ipossia, soprattutto l'HIF-1, il quale a sua volta induce l'espressione del VEGF, che stimola la formazione di nuovi vasi e incrementa l'apporto di ossigeno<sup>87</sup> (Figura 2).

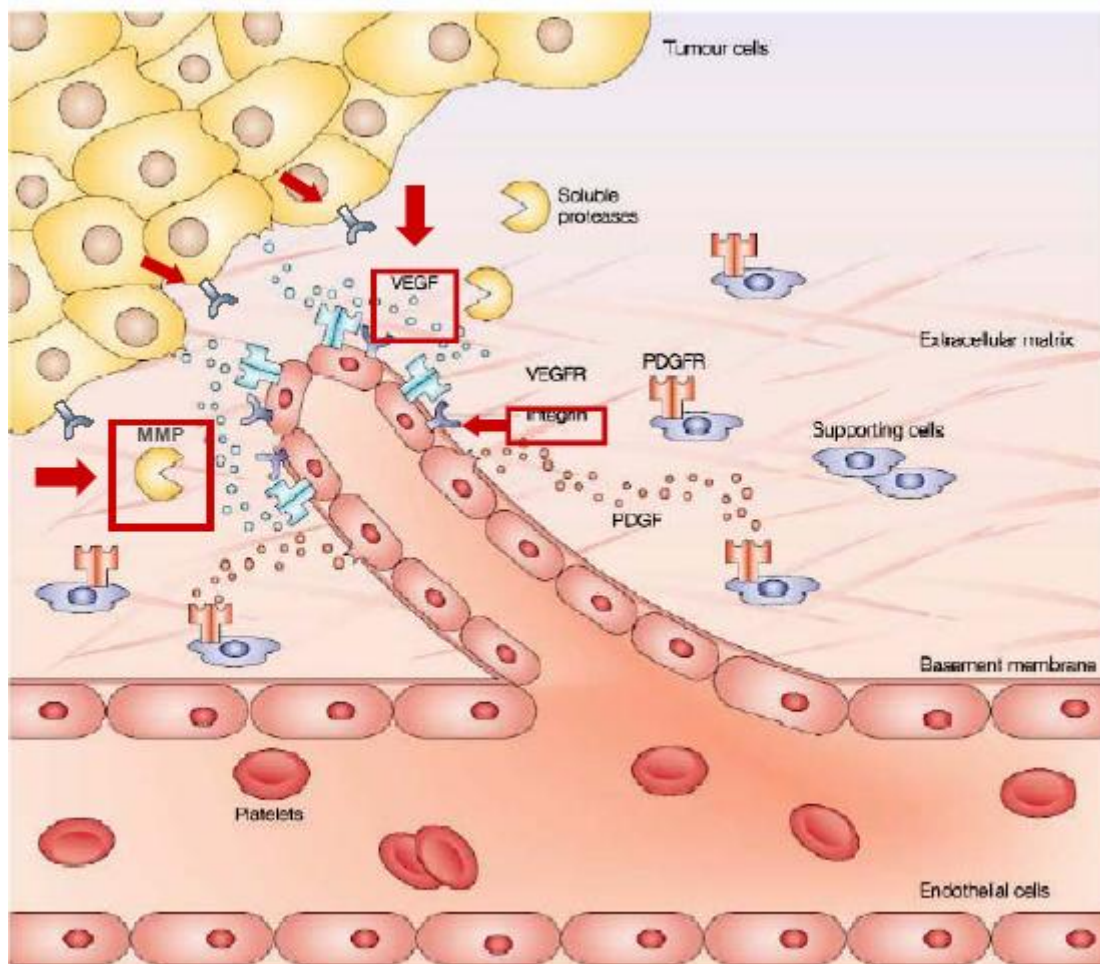
Una volta ripristinato un adeguato apporto di ossigeno, il segnale indotto dall'HIF viene inibito, i vasi maturi sopravvivono e quelli eventualmente rimasti a uno stadio immaturo regrediscono<sup>88</sup>. Il VEGF svolge un ruolo cruciale nell'accrescimento della maggior parte dei tumori primari e del successivo processo di metastasi. In molti tumori umani si osserva una sovraespressione del VEGF e del suo mRNA e del mRNA dei recettori del VEGF, con un aumento dei livelli di questo fattore di crescita riscontrabile sia all'interno del tumore che in circolo<sup>89</sup>.

Nello sviluppo del tumore si distinguono due fasi: una fase avascolare di quiescenza delle piccole lesioni (< di 2 mm.) e una seconda fase nella quale la crescita tumorale necessita della vascolarizzazione. La transizione alla seconda fase è mediata dal VEGF. Il VEGF rilasciato dal tumore agisce a livello dei recettori del VEGF presenti sulle cellule endoteliali, attivando l'angiogenesi. Come già detto in precedenza, in tal modo il VEGF stimola la formazione di una vascolarizzazione nuova ed immatura che presenta anomalie strutturali e funzionali. La produzione di VEGF da parte del tumore crea un *feedback* positivo attraverso il quale l'angiogenesi indotta dal VEGF rende possibile un'ulteriore crescita tumorale. Come risultato di questo rapido accrescimento, il tumore supera i limiti della sua vascolarizzazione e l'apporto di ossigeno e delle sostanze nutritive diviene inadeguato, dando luogo ad aree ipossiche<sup>90</sup>. L'ipossia stimola un'ulteriore produzione di VEGF,

che a sua volta stimola la formazione di nuovi vasi. Una volta che il tumore è entrato nella fase vascolare, la formazione di nuovi vasi prosegue durante tutta la crescita del tumore. Spesso i livelli più elevati di VEGF e di angiogenesi si trovano nelle zone adiacenti ai tessuti ischemici o necrotici dei tumori solidi. Tuttavia il VEGF è stato trovato in aree tumorali non ipossiche, a sostegno dell'ipotesi che la sua sovraespressione dipenda anche da altri meccanismi, quali l'attivazione degli oncogeni. Il VEGF agisce anche come fattore di permeabilità vascolare, grazie alla sua capacità di indurre la fenestrazione dei vasi e di aumentare la permeabilità del microcircolo<sup>91</sup>. L'aumento della permeabilità dei vasi sanguigni tumorali nei confronti delle macromolecole circolanti permette la fuoriuscita delle proteine plasmatiche (fibrinogeno ed altre proteine della coagulazione), con la conseguente formazione di uno stroma pro-angiogenico. Un'ulteriore conseguenza dell'aumentata permeabilità è l'innalzamento della pressione interstiziale, che inverte i gradienti di pressione normalmente presenti nel tessuto e in definitiva impedisce la penetrazione nei tessuti delle molecole, compresi gli agenti chemioterapici<sup>92</sup>.

L'angiogenesi stimolata dal VEGF favorisce il contatto delle cellule tumorali con i vasi sanguigni, offrendo alle cellule una via per invadere i vasi stessi. Un'eccessiva produzione di VEGF determina la formazione di vasi immaturi, molto permeabili, che faciliteranno l'invasione. Il VEGF è coinvolto anche

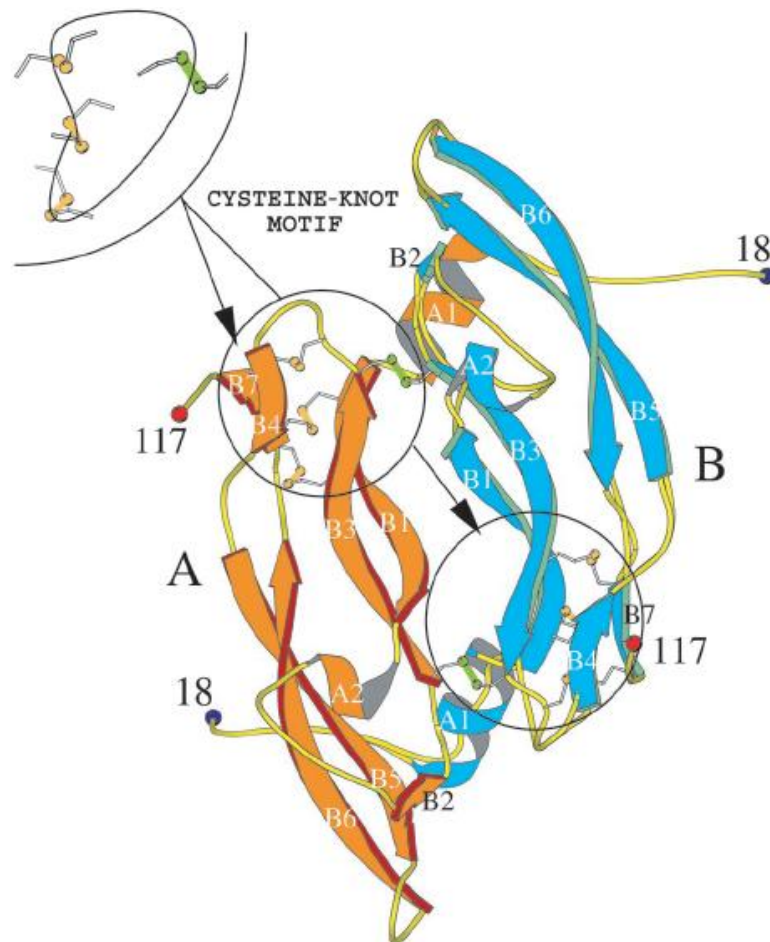
nella linfangiogenesi; stimolando la formazione di vasi linfatici giganti, il VEGF fornisce un'altra possibile via di diffusione metastatica<sup>93</sup>. Il ruolo critico nella formazione di vasi sanguigni nei tumori e nelle metastasi rende il VEGF un potenziale bersaglio nella terapia di molte neoplasie umane. Pertanto, con un'azione mirata sul VEGF si può prevedere di ottenere l'inibizione dell'angiogenesi, insieme ad altri effetti sulla vascolarizzazione tumorale volti ad inibire la crescita del tumore, senza compromettere la funzione della normale vascolarizzazione nei tessuti sani<sup>94</sup>.



**Figura 3** Angiogenesi tumorale

## LA BIOLOGIA DEL PlGF

PlGF, VEGF, VEGF-B<sup>95</sup>, VEGF-C<sup>96</sup>, VEGF-D<sup>97</sup>, VEGF-E<sup>98</sup> e FIGF<sup>99</sup> (Fos-induced growth factor) sono membri di una famiglia di fattori di crescita strutturalmente correlati. Ponti disolfuro intracatena e intercatena tra otto residui di cisteina sono coinvolti nella formazione di dimeri attivi di queste proteine; da qui il nome di proteine “*cysteine-knot*”. Inoltre PlGF e VEGF possono formare molecole eterodimeriche nelle cellule in cui sono espressi entrambi i geni<sup>100</sup>(Figura 4).



**Figura 4** Struttura del PlGF

Lo splicing alternativo del trascritto primario del PlGF dà origine a tre isoforme della proteina umana matura PlGF<sup>101</sup>. Le due isoforme principali, PlGF-1 e PlGF-2 (rispettivamente conosciute anche come PlGF-131 e PlGF-152) differiscono solo per l'inserimento di una serie di amminoacidi altamente basici al terminale carbossilico della proteina. Questa regione basica conferisce al PlGF-2 la capacità di legarsi all'eparina. Il ruolo esatto del fattore PlGF nello sviluppo vascolare non è ancora stato del tutto chiarito; tuttavia, la purificazione del PlGF-1 dalle cellule eucariotiche che lo sovraesprimono e la misura dell'attività angiogenica del PlGF-1 purificato con saggi in vivo sulla cornea del coniglio e sulla membrana corioallantoica di pollo hanno fatto evidenziare forte neovascolarizzazione, che può essere bloccata mediante degli anticorpi anti-PlGF. Nella cornea avascolare, il PlGF-1 induce angiogenesi in maniera dose-dipendente e sembra essere efficace almeno quanto lo sono il VEGF e b-FGF nelle stesse condizioni ed alle stesse concentrazioni. PlGF-1 è in grado di indurre crescita e migrazione delle cellule endoteliali provenienti dalle venule post-capillari delle coronarie di bovini e dalle vene ombelicali umane (HUVECs). In questi due saggi in vitro, il PlGF-1 sembra avere un effetto comparabile sull'endotelio microvascolare (cellule CVECs) a quello che si ha con il VEGF e b-FGF. Questi risultati mostrano chiaramente che il PlGF-1 può indurre angiogenesi in vivo e stimolare la migrazione e proliferazione delle

cellule endoteliali in vitro<sup>102</sup>. Per quanto riguarda il PlGF-2, è stato accertato che la proteina ricombinante purificata è capace di stimolare le cellule endoteliali di aorta di bovino e le HUVECs ma non quelle provenienti dalle sinusoidi epatiche.

Come già detto in precedenza, l'omodimero VEGF si lega e induce autofosforilazione di due distinti recettori tirosin-chinasici: *flt-1* (noto anche come VEGFR-1) e *flk-1/KDR* (noto anche come VEGFR-2); invece, gli omodimeri del PlGF-1 e del PlGF-2 si legano solo al recettore *flt-1*. Gli eterodimeri costituiti da VEGF e PlGF si legano anche al recettore *flk-1/KDR*<sup>103</sup>. La porzione extracellulare di entrambi i recettori di sette domini immunoglobulina-simile e i due recettori mostrano un'omologia di sequenza di oltre il 44%. Il dominio 2 immunoglobulina-simile del recettore *flt-1* è responsabile della specificità di legame con PlGF-1 e PlGF-2<sup>104</sup>. Inoltre, è stato anche riportato che solo PlGF-2 può riconoscere neuropilina-1 e 2, recettori trovati sulla superficie endoteliale<sup>105</sup>.

Dal momento che il PlGF si lega e induce autofosforilazione del recettore *flt-1* ma non del recettore *flk-1/KDR*, sembra che il PlGF eserciti i suoi effetti mitogenici e chemiotattici sulle cellule endoteliali attraverso l'attivazione di una cascata di segnali intracellulari dovuti al legame con *flt-1*. Il PlGF induce la sintesi del DNA ma non la migrazione delle cellule endoteliali dell'aorta di suino, sovraesprimenti il recettore *flt-1*. Tuttavia, la scoperta che il PlGF in



vitro ha effetti mitogenici e chemiotattici sulle cellule HUVECs e CVECs ha sollevato una questione importante e cioè se il PlGF induca direttamente *flt-1* a trasdurre i segnali mitogenici e chemiotattici all'interno della cellula o se agisca indirettamente mediante un meccanismo di *decoy*, cioè di esca, come precedentemente proposto da Park e collaboratori<sup>106</sup>. La recente osservazione che il recettore *flt-1* è capace di mediare i segnali nelle cellule HUVECs in risposta sia a VEGF che a PlGF, facendo ottenere diverse risposte biologiche, suggerisce che *flt-1* non agisce come recettore “*decoy*”, ma che è capace di indurre segnali intracellulari<sup>107</sup>. L'inibizione della sintesi proteica per la formazione del PlGF mediante mRNA antisense nelle cellule endoteliali microvascolari dermali umane, porta all'inibizione della proliferazione in condizioni di ipossia<sup>108</sup>. Queste nuove scoperte assegnano al PlGF un ruolo di controllore diretto della proliferazione delle cellule endoteliali, probabilmente competendo con il VEGF per il legame con *flt-1* e forzando, perciò, il VEGF a legarsi con *flk-1/KDR* e attivando la proliferazione cellulare. Inoltre, sia il PlGF che il VEGF sono capaci di indurre la migrazione del 39% e 51% di monociti, rispettivamente, attraverso l'attivazione del recettore *flt-1*<sup>109</sup>. Questo suggerisce che il PlGF può indurre la migrazione e la proliferazione delle cellule endoteliali mediante l'attivazione di *flt-1*, anche se non si può del tutto escludere l'esistenza di un altro recettore del PlGF ancora sconosciuto.

## STUDI STRUTTURALI

Negli ultimi anni sono stati condotti sul VEGF moltissimi studi strutturali, sia sul fattore libero<sup>110</sup>, che sul fattore legato ad inibitori peptidici<sup>111</sup>, ad anticorpi neutralizzanti<sup>112</sup> e al dominio 2 della regione extracellulare del recettore *flt-1*, chiamata *flt-1<sub>D2</sub>*<sup>113</sup>.

Il VEGF è un omodimero antiparallelo, covalentemente legato attraverso due ponti disolfuro. È definita una proteina “*cysteine knot*”. Il nodo consiste di due ponti disolfuro con un terzo legame che attraversa i primi due. Studi di delezione sul recettore *flt-1* hanno messo in luce che il sito di legame con il ligando è localizzato nel primo dei tre domini. Il secondo dominio lega il VEGF 60 volte meno intensamente rispetto al recettore completo, ma la totale rimozione di questo dominio impedisce il legame del fattore di crescita al recettore. Il dominio 2 del recettore *flt-1* è una sorta di *sandwich* costituita da due *sheet*, il primo costituito da cinque filamenti, il secondo da tre.

L'intera struttura del complesso VEGF/*flt-1<sub>D2</sub>* ha approssimativamente una simmetria “*twofold*”. Il riconoscimento del VEGF avviene per il 65% su un monomero e per il 35% sull'altro monomero. L'analisi dei dati strutturali e di mutagenesi ha permesso di identificare esattamente i residui implicati nel riconoscimento del ligando.

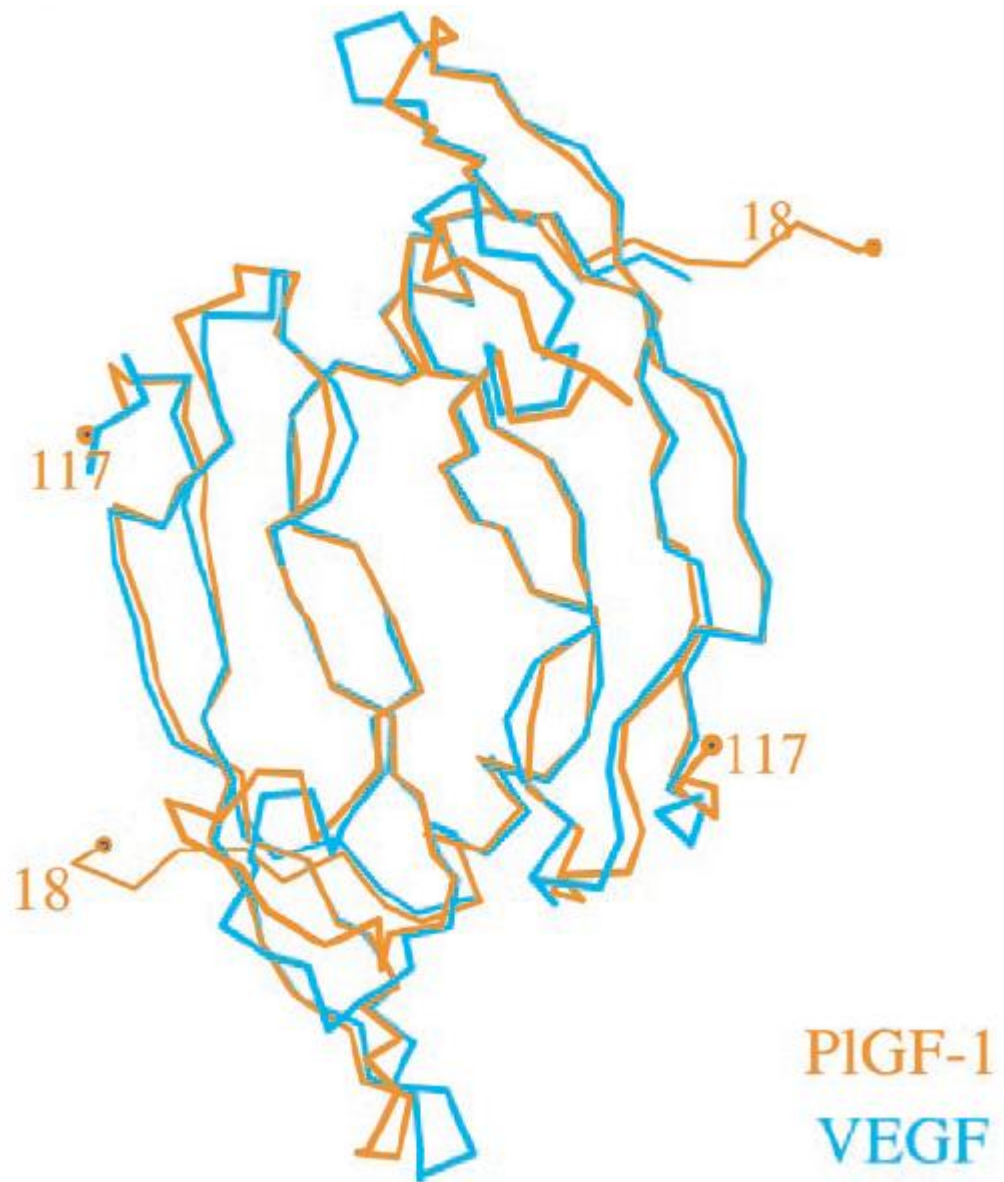
Gli amminoacidi responsabili del riconoscimento sono tutti idrofobici, eccezion fatta per l'arginina 224 che può formare un legame ionico con

l'aspartato in posizione 63 del VEGF. Il recettore *flk-1/KDR* e il recettore *flt-1* mostrano la stessa regione di legame con il VEGF, infatti cinque dei sette residui indispensabili per l'interazione sono presenti in entrambi i recettori<sup>114</sup>. La struttura cristallina del PlGF-1<sup>115</sup> consiste di un omodimero, organizzato in un arrangiamento antiparallelo con un asse perpendicolare ad un piano  $\beta$ -sheet. L'omodimero è formato da due monomeri covalentemente legati mediante due legami disolfuro intercatena tra la Cys in posizione 60 e la Cys in posizione 69. La caratteristica principale di questa struttura è la presenza di un motif "cysteine-knot", posizionato in modo simmetricamente opposto all'estremità di ciascun monomero. Il nodo è costituito da un anello di otto residui amminoacidici formato da un ponte disolfuro intercatena (Cys<sup>60</sup>-Cys<sup>69</sup>) e da tre intracatena (Cys<sup>35</sup>-Cys<sup>77</sup>, Cys<sup>66</sup>-Cys<sup>111</sup>, Cys<sup>70</sup>-Cys<sup>113</sup>). La struttura anellare è formata tra due filamenti  $\beta$  adiacenti,  $\beta_3$  e  $\beta_7$ , con il terzo ponte disolfuro intracatena che penetra l'unione covalente e mette in connessione i filamenti  $\beta_1$  e  $\beta_4$ . All'interno di questo anello c'è poi un residuo di glicina alla posizione 68, che sembra essere importante per ottimizzare la conformazione delle catene laterali degli amminoacidi costituenti il nodo.

Il core strutturale del monomero di PlGF-1 è costituito da un  $\beta$ -sheet formato da quattro filamenti, altamente irregolari. Il core centrale idrofobico è formato da residui provenienti da entrambi i monomeri e sembra che sia una parte della regione deputata al legame con il recettore.

Negli studi condotti a partire da un modello costituito da PlGF-1 complessato con *flt-1*<sub>D2</sub> si è notato che i residui Gln<sup>27</sup>, Tyr<sup>34</sup>, Ala<sup>74</sup>, Tyr<sup>100</sup> e Glu<sup>112</sup> creano interazioni polari e di van der Waals con il recettore *flt-1*, mentre i residui Phe<sup>26</sup>, Trp<sup>30</sup>, Gly<sup>31</sup>, Glu<sup>73</sup>, Leu<sup>75</sup>, Gln<sup>88</sup>, Leu<sup>90</sup>, Ile<sup>92</sup> e Pro<sup>115</sup> creano interazioni di van der Waals con la controparte recettoriale. Inoltre anche i residui di Pro<sup>25</sup>, Cys<sup>70</sup>, Gly<sup>71</sup>, Pro<sup>98</sup>, Cys<sup>111</sup>, Cys<sup>113</sup> e Arg<sup>114</sup> si trovano all'interfaccia e sono coinvolti nel riconoscimento recettoriale.

Un dettagliato studio di mutagenesi su VEGF condotto da Muller e collaboratori<sup>109</sup> ha permesso di individuare otto residui formanti il sito di legame del recettore *flk-1/KDR*. La sequenza primaria di entrambi i fattori di crescita mostra che sei degli otto residui del VEGF determinanti il legame con il recettore *flk-1/KDR* non sono conservati nel PlGF, solo i residui Glu<sup>73</sup> e Ile<sup>92</sup> sono mantenuti. Questa osservazione indica che nel PlGF c'è un differente riarrangiamento conformazionale in corrispondenza delle regioni 43-45 e 83-85. Questo potrebbe spiegare la ragione per cui il PlGF-1 non riesce a legarsi al recettore *flk-1/KDR*.



**Figura 5 Sovrapposizione del PIGF-1 con il VEGF**

## IMPOSTAZIONE DELLA RICERCA

Negli ultimi anni sono stati utilizzati diversi approcci per modulare l'interazione del VEGF con i suoi recettori e questo ha generato tutta una serie di molecole peptidiche<sup>116</sup> e non<sup>117</sup>, di anticorpi<sup>118</sup> in grado di modulare questa interazione e, quindi, tutti gli eventi a valle conseguenti a questo legame ligando-recettore.

Ad oggi, sono conosciuti diversi anticorpi che riconoscono i recettori o i ligandi, ma solo il bevacizumab (Avastin, Roche) è stato approvato in terapia, in particolare per il trattamento dei tumori del colon-retto<sup>119</sup>. Piccole molecole riportate in letteratura sono inibitori chinasi ed agiscono intracellularmente, non sono state ancora riportate, invece, molecole che si legano al dominio extracellulare del recettore. Sun e collaboratori hanno ottenuto nuove piccole molecole, che si legano al VEGF, impedendo la sua interazione con i recettori, bloccando così il processo di angiogenesi e tumorigenesi<sup>120</sup>. L'angiogenesi dipendente dal VEGF può essere inibita anche grazie all'uso di un recettore “*decoy*” solubile<sup>121</sup>. Inoltre, negli ultimi anni, sono stati riportati molti peptidi in grado di modulare l'angiogenesi VEGF-dipendente. Essi si legano alla regione extracellulare dei recettori *flt-1* e *flk-1/KDR* o al ligando (Tabella 1).

**Tabella 1: Peptidi in grado di modulare l'angiogenesi VEGF-dipendente**

<b>Nome</b>	<b>Sequenza</b>	<b>Metodo</b>	<b>Target</b>
<b><u>Antagonisti</u></b>			
V114	VEPNCDIHVMWEWECFERL-NH <sub>2</sub>	Libreria fagica	VEGF
KDR 247-261	RTELNVGIDFNWEYP	Analisi sequenza	VEGF
AR peptide	RRKRRR	Libreria peptidica	VEGF
V1	ATWLPPR	Libreria fagica	KDR
VEGF 125-136	QKRKRKKSRYKS	Analisi sequenza	KDR/flt-1
K237	HTMYHHYQHHL	Libreria fagica	KDR
Ciclo-VEGI	Cycle(fPQIMRIKPHQGQHIGE)	Design peptidico	KDR/flt-1
SPV5.2	NGYEIEWYSWVTHGMY	Libreria fagica	flt-1
F56	WHSDMEWWYLLG	Libreria fagica	flt-1
<b><u>Agonisti</u></b>			
HIVTAT 46-60	SYGRKKRRQRRRAPQ	Analisi sequenza	KDR/flt-1
QK	Ac-KLTWQELYQLKYKGI-NH <sub>2</sub>	Design peptidico	KDR/flt-1

Moltissimi agiscono da antagonisti, solo pochi hanno attività agonista.

Un gruppo di ricerca afferente alla Genentech, screenando una libreria fagica contro il VEGF, ha trovato molte sequenze peptidiche costrette a causa della presenza di ponti disolfuro. I peptidi migliori sono stati divisi in tre grandi

classi; le sequenze rappresentative della prima classe si legano al VEGF con affinità micromolare e impediscono l'interazione con i recettori. I peptidi sono stati poi ottimizzati mediante delle modifiche a random. Il peptide con la migliore affinità (v114) è capace di antagonizzare la proliferazione VEGF-indotta delle cellule HUVEC<sup>122</sup>.

I migliori peptidi appartenenti alla seconda classe, sono stati anche caratterizzati strutturalmente in complesso con il VEGF. Binetruy-Tournaire e collaboratori, screenando una libreria fagica contro il recettore *flk-1/KDR* e contro un anticorpo anti-VEGF, hanno trovato il peptide ATWLPPR che abolisce totalmente l'angiogenesi indotta dal VEGF in un modello di cornea di coniglio<sup>123</sup>. El-Mousawi e collaboratori, invece, hanno usato come target il recettore *flt-1* rivestito con una particella magnetica; il peptide SP5.2 è in grado di inibire l'angiogenesi VEGF-indotta in vitro<sup>124</sup>. Hetian e collaboratori hanno riportato due peptidi con proprietà anti-angiogeniche in vivo. Il peptide K237 è stato ottenuto screenando una libreria fagica 12-mer contro il dominio extracellulare del *flk-1/KDR*<sup>125</sup>, mentre il peptide F56 è stato ottenuto dallo screening contro il primo dei quattro domini della regione extracellulare del recettore *flt-1*<sup>126</sup>. Entrambi i peptidi sono in grado di sopprimere la crescita tumorale e la formazione di metastasi. Zilberberg e collaboratori hanno riportato il design di un peptide antagonista<sup>127</sup>. Si tratta di un ciclopeptide che è stato progettato e sintetizzato a partire dalla regione 79-93, formante una  $\beta$ -



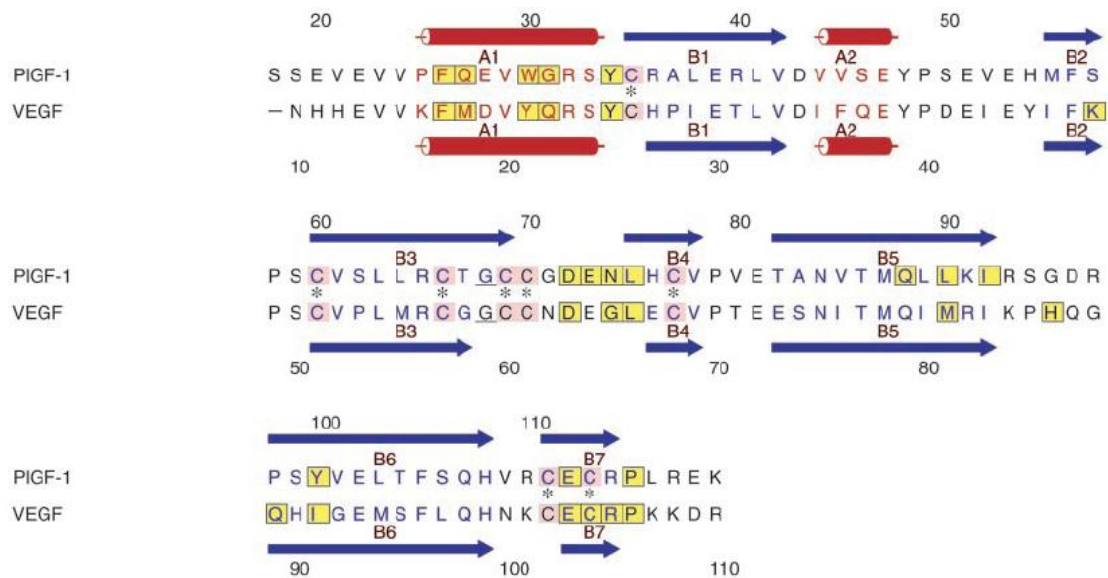
*hairpin*, del fattore VEGF. Questo peptide si destrutturava in acqua, invece in una soluzione al 30% di trifluoroetanolo mostrava una conformazione ad  $\alpha$ -elica. Il peptide mostra proprietà anti-angiogeniche nel saggio con la membrana corioallantoica e blocca la crescita del glioma intracraniale nei topi nudi<sup>127</sup>. Un esapeptide ricco di residui di arginina, identificato screenando una libreria peptidica<sup>128</sup>, si lega al VEGF ed interferisce con il riconoscimento recettoriale; inibisce la neovascolarizzazione indotta dal VEGF in vivo e nei modelli di membrana corioallantoica di pollo e di cornea di coniglio e previene nei topi nudi la crescita e la metastasi delle cellule di carcinoma umano del colon. Jia e collaboratori hanno riportato che i peptidi codificati dall'esone 6 del VEGF inibisce l'angiogenesi VEGF-dipendente<sup>129</sup>, mentre Piossek e collaboratori hanno identificato, usando peptidi legati alla cellulosa per mappare la sequenza amminoacidica del dominio extracellulare del recettore *flk-1/KDR*, un peptide che si lega al VEGF ed inibisce la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali<sup>130</sup>.

Ad oggi, sono pochi i peptidi che mostrano un'attività agonista. Albini e collaboratori hanno messo in evidenza che la proteina HIV-1 TAT è un fattore angiogenico e che TAT lega ed attiva *flk-1/KDR* attraverso la regione basica 46-60<sup>131</sup>. In uno studio molto recente, D'Andrea e collaboratori hanno caratterizzato strutturalmente e valutato le proprietà biologiche di un peptide mimante il VEGF<sup>132</sup>. Questo peptide, che va a mimare la regione elicoidale

17-25 del VEGF, è in grado di legarsi ed attivare i recettori, facendo avvenire così la proliferazione delle cellule endoteliali.

Studi di ibridizzazione *in situ* hanno dimostrato che in molti tumori di origine umana vi è un'elevata espressione dell'RNA messaggero del fattore VEGF, soprattutto in quelli a livello polmonare, della mammella, dell'ovaio, del rene e del tratto gastrointestinale; tuttavia la sua espressione può variare in funzione del tipo di tumore. Nel glioblastoma multiforme e in altri tumori con significative necrosi, l'espressione dell'RNA messaggero del VEGF è più elevata nelle cellule che si trovano adiacenti al tessuto necrotico. Questo ci suggerisce che tale espressione possa essere correlata all'ipossia, sebbene si sia constatato che anche mutazioni della Ras portano ad un *up-regulation* di questo fattore. Inoltre, sempre più frequentemente negli ultimi anni emergono evidenze sperimentali che confermano che il PlGF svolge un ruolo fondamentale nel processo angiogenico fisiologico e patologico.

Partendo da queste osservazioni il gruppo di ricerca presso il quale ho svolto il lavoro di ricerca ha cominciato ad interessarsi di tratti specifici dei fattori VEGF e PlGF; in particolare l'attenzione è stata rivolta alla sequenza 79-93 sia del VEGF che del PlGF, in quanto da studi strutturali e di mutagenesi è stato evidenziato che la maggior parte dei residui importanti per l'interazione tra il VEGF e il recettore *flk-KDR* sono contenuti in questa sequenza (Figura 6).



**Figura 6** Sequenze del VEGF e PIGF-1

I residui chiave per l'interazione con il suddetto recettore, localizzati nella sequenza 79-93 formante una  $\beta$ -hairpin, sono l'Arg<sup>82</sup>, la Lys<sup>84</sup> e l'His<sup>86</sup>. Su questa sequenza è stato progettato e sintetizzato un peptide ciclico di diciassette residui, chiamato cyclo-VEGI, in cui i suddetti residui chiave si trovano all'estremità del dominio elicoidale. Le catene laterali di tali residui in questo peptide non assumono un'orientazione ben definita, in quanto hanno elevata flessibilità, che permette di esplorare l'orientazione richiesta per il legame ai recettori del VEGF e impedire il legame con il ligando endogeno VEGF.

Essendo sperimentalmente provata un'elevata omologia strutturale tra i fattori VEGF e PIGF e, dato che all'interno della sequenza 79-93 del PIGF esistono già la Lys in posizione 82 e l'Arg in posizione 84, si è pensato di introdurre in

posizione 86 al posto della glicina endogena, che è semplicemente un linker, un residuo di istidina che come detto in precedenza è fondamentale per l'interazione del VEGF con il recettore, per verificare l'eventuale aumento dell'effetto angiogenico. Le sequenze sintetizzate sono le seguenti:

<b>H-Gln-Leu-Leu-Lys-Ile-Arg-Ser-Gly<sup>86</sup>-Asp-Arg-Pro-Ser-Tyr-Val-Glu-OH PIGF</b>
<b>H-Gln-Leu-Leu-Lys-Ile-Arg-Ser-His<sup>86</sup>-Asp-Arg-Pro-Ser-Tyr-Val-Glu-OH [His<sup>86</sup>]PIGF</b>

**Figura 7 Peptidi considerati nello studio**

La prima sequenza ricalca pedissequamente la sequenza endogena ed è stata usata come controllo; la seconda invece, è quella in cui è stata effettuata la modifica precedentemente discussa. Entrambe le sequenze sono state poi testate sulle cornee di conigli, in modo da poter notare l'eventuale effetto di induzione dell'angiogenesi.

## PARTE SPERIMENTALE

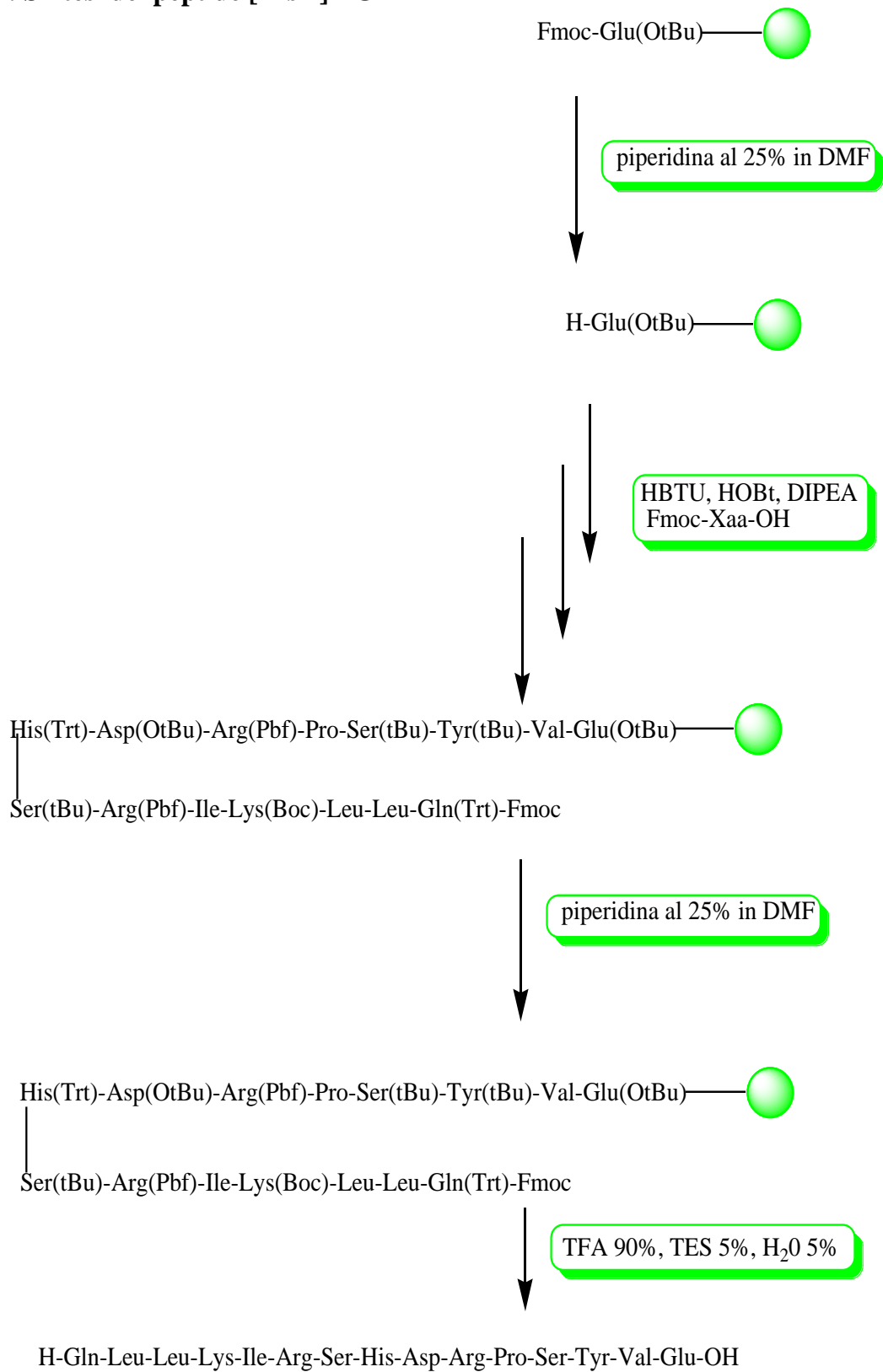
### Sintesi peptidica in fase solida

I peptidi presentati, sono stati sintetizzati in fase solida utilizzando una strategia sintetica *via Fmoc* (9-fluorenil metossicarbonile). Come supporto solido, sono stati impiegati 300 mg. di resina Wang con grado di sostituzione 0,75mmol/g.. Prima di iniziare la sintesi, la resina è stata rigonfiata in 30 ml di DMF (N,N-dimetilformammide) per circa due ore. L'intera sintesi è stata condotta sotto atmosfera di argon e come solvente è stata usata la DMF. Il primo aminoacido è stato accoppiato mediante l'attivazione in situ, adoperando 3 equivalenti di ognuno di questi reagenti: AA N<sup>α</sup>-Fmoc protetto, HBTU, HOBT e 6 equivalenti di DIPEA contemporaneamente è stata aggiunta in quantità catalitica la DMAP per facilitare la formazione del legame estereo tra l'OH benzilico presente sul linker della resina e il gruppo α-carbossilico del primo aminoacido. Gli accoppiamenti successivi sono stati fatti usando i medesimi reattivi e nelle stesse quantità, ad eccezione della DMAP. La deprotezione dal gruppo Fmoc dell'α-NH<sub>2</sub> di ciascun aminoacido è stata effettuata usando pochi millilitri di una soluzione di piperidina al 25% in DMF. Le sequenze peptidiche sono state così assemblate, alternando accoppiamento e deprotezione. Il Kaiser test è stato effettuato dopo ogni accoppiamento per determinarne la completezza e dopo ogni deprotezione per

verificare la totale rimozione del gruppo Fmoc. Dopo l'accoppiamento dell'amminoacido N-terminale, il gruppo Fmoc è stato rimosso con la stessa procedura prima esposta ed il peptide-resina è stato abbondantemente lavato con DCM e poi seccato sotto vuoto.

Per il distacco del peptide dalla resina e la contemporanea rimozione degli altri gruppi protettori presenti in catena laterale di ogni singolo amminoacido, è stata usata una miscela di sblocco costituita dal 90% di TFA, 5% di TES e 5% di acqua. Circa 5 ml di questa soluzione sono stati aggiunti alla resina con il peptide legato ed il tutto è stato lasciato in centrifuga per 3 ore circa; trascorso tale tempo, la resina è stata rimossa mediante filtrazione sotto vuoto ed il peptide grezzo è stato ottenuto per precipitazione a freddo in etere dietilico e successiva centrifugazione; l'essiccazione all'aria poi, ha permesso l'ottenimento del peptide desiderato come polvere bianca (Schema 1).

**Schema1: Sintesi del peptide [His<sup>86</sup>]PIGF**



## **Purificazione e Caratterizzazione**

I peptidi grezzi sono stati purificati usando un HPLC preparativo a fase inversa con una colonna Vydac C18 (218 TP1520, 15  $\mu\text{m}$ ), utilizzando come eluente una miscela di acqua ed acetonitrile con un gradiente da 5 a 90% di acetonitrile, contenente una concentrazione costante di TFA (0.1% v/v), con un flusso di 15 ml/min. Le separazioni sono state monitorate con un rivelatore UV-Vis ad una lunghezza d'onda di 230 nm. Le frazioni corrispondenti al picco di maggiore intensità sono state poi raccolte, unite e liofilizzate. I peptidi così ottenuti, sono stati caratterizzati mediante HPLC analitico e MALDI/TOF. Tutti i peptidi sono stati ottenuti in buone rese e con un grado di purezza di circa il 95%.

## **Saggi farmacologici**

L'attività angiogenica è stata testata in vivo, usando un saggio condotto sulla cornea dei conigli. I conigli bianchi della Nuova Zelanda sono stati anestetizzati con pentotal sodico (30 mg/Kg). Nella parte bassa dell'occhio è stata prodotta, mediante un'incisione chirurgica, una microtasca ed i pellets a rilascio ritardato, in cui è stato messo il fattore angiogenico, sono stati impiantati nelle microtasche dello stroma corneale avascolare trasparente. Successivamente, le osservazioni degli impianti sono state fatte in cieco da due operatori indipendenti con una lampada stereomicroscopica. L'attività



angiogenica è stata espressa come numero di impianti che provocano neovascolarizzazione sul numero totale di impianti; la potenza dell'attività angiogenica è determinata dal numero e dalla percentuale di crescita di nuovi capillari formati e calcolata (densità dei per distanza dal limbo) come numero di impianti positivi sul totale preformato.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Una dose di 50 ng/pellet sia del peptide di riferimento che di quello modificato in posizione 86 con il residuo di istidina, sono stati testati mediante il saggio sulla cornea dei conigli, facendo un'approssimativa proporzione tra dosaggio e peso molecolare (vicino all'equimolarità comparata alla proteina del PlGF ad una dose di 100 ng/pellet). Il tempo di neovascolarizzazione relativo a tale esperimento è riportato in figura 8.

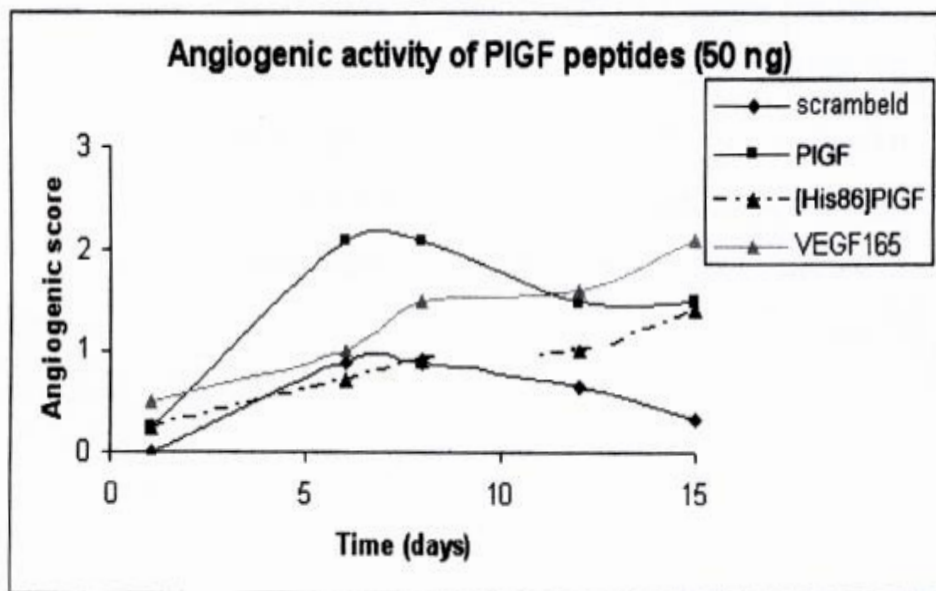


Figura 8 Grafico relativo ai risultati dell'esperimento

Come si può notare, c'è una transiente attività angiogenica del composto [His<sup>86</sup>] PlGF anche se paragonabile a quella del VEGF<sub>165</sub>.

Ora rimane da chiarire se l'attività transiente che si è verificata durante l'esecuzione dell'esperimento dipenda dalla suscettibilità del peptide all'idrolisi o se dipenda dalla natura stessa del peptide sintetizzato. Al momento prevale l'ipotesi di un problema legato all'idrolisi del peptide usato, in quanto le osservazioni sono state condotte sugli stessi animali per diversi giorni e purtroppo, si sa benissimo che un grosso limite per l'utilizzo in clinica di farmaci di natura peptidica è proprio la facilità di idrolisi enzimatica dei legami peptidici. Potrebbe accadere, quindi, che, a distanza di alcuni giorni dall'instillazione dei pellets nelle cornee dei conigli, si abbia l'idrolisi del composto, il quale, non trovandosi più nella forma originaria, non riesca ad indurre più l'effetto angiogenico. Al momento, avendo a disposizione solo dei dati preliminari, si è in grado solo di formulare delle ipotesi che dovranno poi essere suffragate sperimentalmente.

È chiaro che è necessario procedere con la sintesi di nuovi composti, in cui il legame peptidico, suscettibile all'idrolisi, sarà sostituito con dei suoi surrogati. Si potranno sintetizzare anche dei peptidi ciclici, conformazionalmente ristretti, sui quali condurre degli studi allo scopo di progettare e sintetizzare dei peptidomimetici meno suscettibili all'idrolisi.

## CONCLUSIONI

L'angiogenesi è un processo indispensabile per la crescita del tumore e la formazione di metastasi<sup>133</sup>. Recentemente, si è notato che il PlGF è un fattore cruciale per lo switch angiogenico in condizioni patologiche<sup>134</sup>, infatti i suoi livelli sono significativamente più alti nei tessuti tumorali. È stata avanzata l'ipotesi, non ancora del tutto provata, che il PlGF stimoli l'angiogenesi tramite lo spiazzamento del VEGF dal recettore *flt-1*, incrementando così la frazione di VEGF disponibile per l'attivazione di *flk-1/KDR*<sup>135</sup>. Alternativamente il PlGF può modulare le funzioni del VEGF regolando qualche fattore, non ancora noto, che costituisce l'anello di congiunzione tra *flt-1* e *flk-1/KDR*<sup>136</sup>. Inoltre può essere che il PlGF da solo, indipendentemente dal *pathway* VEGF/*flk-1*, attivando il recettore *flt-1* funziona, provocando proliferazione, apoptosi ed angiogenesi<sup>136</sup>.

Wei e collaboratori hanno dimostrato che i livelli di PlGF e VEGF nei tessuti tumorali sono più alti che nei tessuti normali anche negli stessi pazienti affetti da tumore colon-rettale<sup>137</sup>. Questo dimostra che sia il PlGF che il VEGF hanno un ruolo cruciale nella formazione e progressione di alcuni tumori solidi in accordo con l'ipotesi, formulata da Carmeliet e collaboratori, che il PlGF eserciti un effetto sinergico con il VEGF durante l'angiogenesi in condizioni patologiche<sup>134</sup>. Il fattore VEGF stimola la crescita di nuovi vasi che però sono fragili, tortuosi e pronti alla regressione, mentre, il PlGF recluta

le cellule muscolari stimolando, così, la maturazione e la stabilizzazione dei vasi<sup>138</sup>. Perciò, PlGF e VEGF dovrebbero essere *upregolati* parallelamente durante il processo di angiogenesi per stimolare la formazione di vasi maturi.

Inoltre da studi recenti è emerso che l'espressione del PlGF è correlata alla sopravvivenza delle cellule tumorali, cosa che non accade con il VEGF; ciò lascia pensare che il PlGF, oltre agli effetti sinergici con il VEGF, ne ha dei propri indipendenti. L'implicazione clinica è che il fattore PlGF può essere un utile indicatore prognostico in molti tumori.

Il bevacizumab, l'anticorpo specifico del VEGF, approvato recentemente per la cura del cancro colon-rettale, ha un rapido e diretto effetto antivascolare<sup>139</sup>; tuttavia, il VEGF e il recettore *flk-1/KDR* non sono coinvolti solo nell'angiogenesi patologica ma sono indispensabili anche per la crescita ed il mantenimento dei vasi in condizioni fisiologiche<sup>140</sup>. In più il VEGF ha effetti diretti sulla maturazione polmonare<sup>141</sup>, sulla rigenerazione delle cellule epatiche<sup>142</sup>, sul controllo della pressione<sup>143</sup> del sangue e sullo sviluppo glomerulare<sup>144</sup>. È chiaro che l'inibizione a lungo termine del VEGF può provocare danni a questi processi<sup>145</sup>. Il PlGF, invece, influenza la formazione dei vasi sanguigni solo in condizioni patologiche<sup>134</sup>, eccetto nel caso di angiogenesi fisiologica nella placenta<sup>146</sup>. Per questo motivo il PlGF rappresenta un target terapeutico più sicuro nelle terapie contro il cancro<sup>147</sup>.

I risultati ottenuti, anche se preliminari, circa il transiente effetto angiogenico, del composto [His<sup>86</sup>]PIGF lasciano ben sperare di individuare in futuro, mediante appropriate modifiche razionali al backbone amminoacidico, un composto di natura peptidica che inibisca l'angiogenesi, senza dimenticare che, qualora ci si dovesse imbattere in un composto con proprietà pro-angiogeniche, questo può essere testato per la cura di malattie dovute a mancanza o a deficienza di vascolarizzazione.

## BIBLIOGRAFIA

- <sup>68</sup> Houck, K. A. et al. "The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA". *Mol. Endocrinol.* (1991), **5**, 1806-1814.
- <sup>69</sup> Tischer, E. et al. "The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing". *J. Biol. Chem.* (1991), **266**, 11947-11954.
- <sup>70</sup> Ferrara, N., Henzel, W. J. "Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1989), **161**, 851-858.
- <sup>71</sup> Houck, K. A., Leung, D. W., Rowland, A. M., Winer, J., Ferrara, N. "Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms". *J. Biol. Chem.* (1992), **267**, 26031-26037.
- <sup>72</sup> Park, J. E., Keller, H. A., Ferrara, N. "The vascular endothelial growth factor isoforms (VEGF): differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF". *Mol. Biol. Cell* (1993), **4**, 1317-1326.
- <sup>73</sup> Keyt, B. A. et al. "The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency". *J. Biol. Chem.* (1996), **271**, 7788-7795.
- <sup>74</sup> Dor, Y., Porat, R., Keshet, E. "Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis". *Am. J. Physiol.* (2001), **280**, C1367-C1374.
- <sup>75</sup> Semenza, G. "Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1". *Biochem. Pharmacol.* (2002), **64**, 993-998.
- <sup>76</sup> Ferrara, N., Davis-Smyth, T. "The biology of vascular endothelial growth factor". *Endocr. Rev.* (1997), **18**, 4-25.
- <sup>77</sup> Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., Poltorak, Z. "Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors". *FASEB J.* (1999), **13**, 9-22.
- <sup>78</sup> Grugel, S., Finkenzeller, G., Weindel, K., Barleon, B., Marme, D. "Both v-Ha-Ras and v-Raf stimulate expression of the vascular endothelial growth factor in NIH 3T3 cells". *J. Biol. Chem.* (1995), **270**, 25915-25919.
- <sup>79</sup> Mole, D. R., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J. "Regulation of HIF by the von Hippel-Lindau tumour suppressor: implications for cellular oxygen sensing". *IUBMB Life* (2001), **52**, 43-47.
- <sup>80</sup> Shibuya, M. et al. "Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase (flt) closely related to the fms family". *Oncogene* (1990), **8**, 519-527.
- <sup>81</sup> Karkkainen, M. J., Makinen, T., Alitalo, K. "Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasi research". *Nat. Cell Biol.* (2002), **4**, E2-E5.
- <sup>82</sup> Waltenberger, J., Claesson Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M., Heldin, C. H. "Different signal transduction properties of KDR and Flt-1, two receptors for vascular endothelial growth factor". *J. Biol. Chem.* (1994), **269**, 26988-26995.
- <sup>83</sup> Gerber, H. P., Condorelli, F., Park, J., Ferrara, N. "Differential transcriptional regulation of the two VEGF receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia". *J. Biol. Chem.* (1997), **272**, 23659-23667.

- 
- <sup>84</sup> Park, J. E., Chen, H. H., Winer, J., Houck, K. A., Ferrara, N. "Placental growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR". *J. Biol. Chem.* (1994), **269**, 25646-25654.
- <sup>85</sup> Maru, Y., Yamaguchi, S., Shibuya, M. "Flt-1, a receptor for vascular endothelial growth factor, has transforming and morphogenic potentials". *Oncogene* (1998), **16**, 2585-2595.
- <sup>86</sup> Bergers, G., Benjamin, L. E. "Tumorigenesis and the angiogenic switch". *Nat. Rev. Cancer* (2003), **3**, 401-410.
- <sup>87</sup> Ferrara, N. "VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors". *Nat. Rev. Cancer* (2002), **2**, 795-803.
- <sup>88</sup> Ferrara, N., Hillan, K. J., Gerber, H. P., Novotny, W. "Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer". *Nat. Rev. Drug Discov.* (2004), **3**, 391-400.
- <sup>89</sup> Hanrahan, V., Curie, M. J., Gunningham, S. P. "The angiogenic switch for vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, VEGF-B, VEGF-C, and VEGF-D in the adenoma-carcinoma sequence during colorectal cancer progression". *J. Pathol.* (2003), **200**, 183-194.
- <sup>90</sup> Jain, R. K. "Tumour angiogenesis and accessibility: role of vascular endothelial growth factor". *Semin. Oncol.* (2002), **29**, 3-9.
- <sup>91</sup> Ferrara, N., Gerber, H. P., LeCouter, J. "The biology of VEGF and its receptors". *Nat. Med.* (2003), **9**, 669-676.
- <sup>92</sup> Jain, R. K. "Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy". *Nat. Med.* (2001), **7**, 987-989.
- <sup>93</sup> Nagy J. A., Vasile, E., Feng, D. et al. "Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis". *J. Exp. Med.* (2002), **196**, 1497-1506.
- <sup>94</sup> Poon, RT. P., Fan, S. T., Wong, J. "Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients". *J. Clin. Oncol.* (2001), **19**, 1207-1225.
- <sup>95</sup> Olofsson, B., Pajusola, K., Kaipainen, A., von Euler, G., Joukov, V., Saksela, O., Orpana, A., Petersson, R. F., Alitalo, K., Eriksson, U. "Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1996), **93**, 2576-2581.
- <sup>96</sup> Joukov, V., Pajusola, K., Kaipainen, A., Chilov, D., Lahtinen, I., Kukk, E., Saksela, O., Kalkkinen, N., Alitalo, K. "A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the flt-4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases". *EMBO J.* (1996), **15**, 290-298.
- <sup>97</sup> Achen, M. G., Jeltsch, M., Kukk, E., Makinen, M., Vitali, A., Wilks, A. F., Alitalo, K., Stacker, S. A. "Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (flk-1) and VEGF receptor 3 (flt-4)". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1998), **95**, 548-553.
- <sup>98</sup> Meyer, M., Clauss, M., Lepple-Wienhues, A., Waltenberger, J., Augustin, H. G., Zinche, M., Lanz, C., Buttner, M., Rziha, H. J., Dehio, C. "A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (flt-1) receptor tyrosine kinases". *EMBO J.* (1999), **18**, 363-374.
- <sup>99</sup> Orlandini, M., Marconcini, L., Ferruzzi, R., Oliviero, S. "Identification of a c-fos-induced gene that is related to the platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor family". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1996), **93**, 11675-11680.



- 
- <sup>100</sup> Di Salvo, J., Bayne, M. L., Conn, G., Kwok, P. W., Trivedi, P. G., Soderman, D. D., Palisi, T. M., Sullivan, K. A., Thomas, K. A. "Purification and characterization of a naturally occurring vascular endothelial growth factor/placenta growth factor heterodimer". *J. Biol. Chem.* (1995), **270**, 7717-7723.
- <sup>101</sup> Cao, Y. H., Chen, H., Zhou, L., Chiang, M. K., Anand-Apte, B., Weatherbee, J. A., Wang, Y. D., Fang, F. Y., Flanagan, J. G., Tsang, M. L. S. "Heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. Endothelial activity, tumor cell expression, and high affinity binding to flk-1/KDR". *J. Biol. Chem.* (1996), **271**, 3154-3162.
- <sup>102</sup> Ziche, M., Maglione, D., Ribatti, D., Morbidelli, L., Lago, C. T., Battisti, M., Paletti, I., Barra, A., Tucci, M., Parise, G., Vincenti, V., Granger, H. J., Viglietto, G., Persico, M. G. "Placenta growth factor-1 is chemotactic, mitogenic and angiogenic". *Lab. Invest.* (1997), **76**, 517-531.
- <sup>103</sup> Olofsson, B., Korpelainen, E., Pepper, M. S., Mandriota, S. J., Aase, K., Kumar, V., Gunji, Y., Jeltsch, M. M., Shibuya, M., Alitalo, K., Eriksson, U. "Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1998), **95**, 11709-11714.
- <sup>104</sup> Davis-Smyth, T., Chen, H., Park, J., Presta, L. G., Ferrara, N. "The second immunoglobuline-like domain of the VEGF tyrosine kinase receptor flt-1 determines ligand binding and may initiate a signal transduction cascade". *EMBO J.* (1996), **15**, 4919-4927.
- <sup>105</sup> Gluzman-Poltorak, Z., Cohen, T., Herzog, Y., Neufeld, G. "Neuropilin-2 is a receptor for the vascular endothelial growth factor (VEGF) forms VEGF-145 and VEGF-165". *J. Biol. Chem.* (2000), **275**, 18040-18045.
- <sup>106</sup> Park, J. E., Chen, H. H., Winer, J., Houck, K. A., Ferrara, N. "Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to flt-1 but not flk-1/KDR". *J. Biol. Chem.* (1994), **269**, 25646-25654.
- <sup>107</sup> Clauss, M., Weich, H., Breier, G., Knies, U., Rockl, W., Waltenberger, J., Risau, W. "The vascular endothelial growth factor receptor flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis". *J. Biol. Chem.* (1996), **271**, 17629-17634.
- <sup>108</sup> Yonekura, H., Sakurai, S., Liu, X., Migita, H., Wang, H., Yamagishi, S., Nomura, M., Abedin, M. J., Unoki, H., Yamamoto, Y., Yamamoto, H. "Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor B and C expression in microvascular endothelial cells and pericytes. Implication in autocrine and paracrine regulation of angiogenesis". *J. Biol. Chem.* (1999), **274**, 35172-35178.
- <sup>109</sup> Muller, Y. A., Li, B., Christinger, H. W., Wells, J. A., Cunningham, B. C., de Vos, A. M. "Vascular endothelial growth factor : crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1997), **94**, 7192-7197.
- <sup>110</sup> Muller, Y. A., Christinger, H. W., Keyt, B.A., de Vos, A.M. "The crystal structure of vasculae endothelial growth factor (VEGF) refined to 1.93 A resolution: multiple copy flexibility and receptor binding" *Structure*,(1997), **5** 1325-1338
- <sup>111</sup> Wiesmann, C., Christinger, H. W., Cochran, A. G., Cunningham, B. C., Fairbrother, W. J., Keenan, C. J., Meng, G., de Vos, A. M. "Crystal structure of the complex between VEGF and a receptor-blocking peptide" *Biochemistry* (1998), **37**, 17765-17772.
- <sup>112</sup> Muller, Y. A., Chen, Y., Christinger, H. W., Li, B., Cunningham, B. C., Lowman, H. B., de Vos, A. M. "VEGF and the Fab fragment of a humanized neutralizing antibody: crystal structure of the complex at 2.4 A resolution and mutational analysis of the interface" *Structure* (1998), **6**, 1153-1167.

- 
- <sup>113</sup> Wiesmann, C., Fuh, G., Christinger, H. W., Eigenbrot, C., Wells, J. A., de Vos, A. M., "Crystal structure at 1.7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor" *Cell* (1997), **91**, 695-704.
- <sup>114</sup> Keyt, B. A., Nguyen, H. V., Berleau, L. T., Duarte, C. M., Park, J., Chen, H., Ferrara, N. "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* (1996), **271**, 5638-5646.
- <sup>115</sup> Iyer, S., Leonidas, D. D., Swaminathan, G. J., Maglione, D., Battisti, M., Tucci, M., Persico, M. G., Acharya, K. R. "The crystal structure of human placenta growth factor-1 (PlGF-1), an angiogenic protein, at 2.0 Å resolution". *J. Biol. Chem.* (2001), **276**, 12153-12161.
- <sup>116</sup> Cooke, S. P., Boxer, G. M., Lawrence, L., Pedley, R. B., Spencer, D. I., Begent, R. H., Chester, K. A. "A strategy for antitumor vascular therapy by targeting the vascular endothelial growth factor: receptor complex". *Cancer* (2001), **61**, 3653-3659.
- <sup>117</sup> Underiner, T. L., Ruggeri, B., Gingrich, D. E. "Development of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) kinase inhibitors as anti-angiogenic agents in cancer therapy". *Curr. Med. Chem.* (2004), **11**, 731-745.
- <sup>118</sup> 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. "Antivascular endothelial growth factor receptor (fetal liver kinase 1) monoclonal antibody inhibits tumor angiogenesis and growth of several mouse and human tumors". *Cancer* (1999), **59**, 5209-5218.
- <sup>119</sup> Ferrara, N., Hillan, K. J., Gerber, H.P., Novotny, W. "Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer". *Nat Rev Drug discovery* (2004), **3**, 391-400.
- <sup>120</sup> Sun, J., Wang, D.A., Jain, R.K., Carie, A., Paquette, S., Ennis, e., Blaskovich, M.A., Baldini, L., Coppola, D., Hamilton, A.D., Sebt, S. M. "Inhibiting angiogenesis and tumorigenesis by synthetic molecule that blocks binding of both VEGF and PDGF to their receptors". *Oncogene*, **24**, 4701-4709.
- <sup>121</sup> Kim, E.S., Serur, A., Huang, J., Manley, C.A., McCrudden, K.W., Fischer, J.S., Soffer, S.Z., Ring, L., New, T., Zabski, S., Rudge, J.S., Holash, J., Yancopoulos, G.D., Kandel, J.J., Yamashiro, D.J. "Potent VEGF blockade causes regression of coopted vessels in a model of neuroblastoma". *Proc Natl Acad Sci U S A* (2002), **99**, 11399-11404.
- <sup>122</sup> Fairbrother, W.J., Christinger, H.W., Cochran, A.G., Fuh, G., Keenan, C.J., Quan, C., Shriver, S.K., Tom, J.Y., Wells, J.A., Cunningham, B.C. "Novel peptides selected to bind vascular endothelial growth factor target the receptor-binding site". *Biochemistry* (1998), **37**, 17754-17764.
- <sup>123</sup> Binetruy-Tournaire, R., Demangel, C., Malavaud, B., Vassy, R., Rouyre, S., Kraemer, M., Plouet, J., Derbin, C., Perret, G., Mazie, J.C. "Identification of a peptide blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis". *EMBOJ* (2000), **19**, 1525-1533.
- <sup>124</sup> El-Mousawi, M., Tchistiakova, L., Yurchenko, L., Pietrzynski, G., Moreno, M., Stanimirovic, D., Ahmad, D., Alakhov, V. "A vascular endothelial growth factor high affinity receptor 1-specific peptide with antiangiogenic activity identified using a phage display peptide library". *J Biol Chem* (2003), **278**, 46681-46691.
- <sup>125</sup> Hetian, L., Ping, A., Shumei, S., Xiaoying, L., Luowen, H., Jian, W., Lin, M., Meisheng, L., Junshan, Y., Chengchao, S. "A novel peptide isolated from a phage display library inhibits tumor growth and metastasis by blocking the binding of vascular endothelial growth factor to its kinase domain receptor". *J Biol Chem* (2002), **277**, 43137-43142.

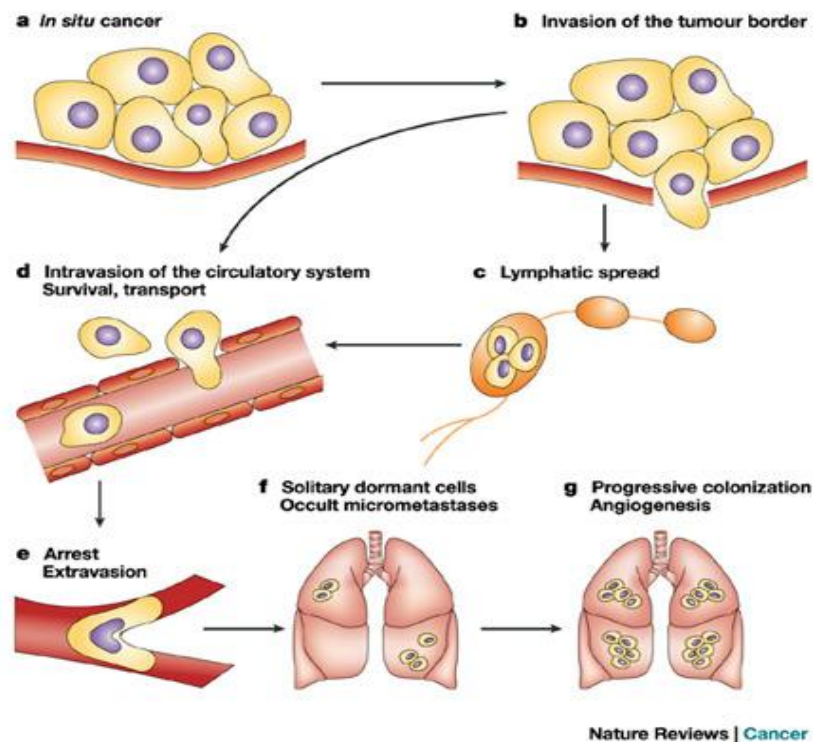
- 
- <sup>126</sup> An , P., Lei , H., Zhang , J., Song ,S., He , L., Jin , G., Liu , X., Wu , J., Meng , L., Liu , M., Shou , C.. “Suppression of tumor growth and metastasis by a VEGFR-1 antagonizing peptide identified from a phage display library”. *Cancer* (2004), **111** , 165-173.
- <sup>127</sup> 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. “Structure and inhibitory effects on angiogenesis and tumor development of a new vascular endothelial growth inhibitor”. *J Biol Chem* (2003) , **278** , 35564-35573.
- <sup>128</sup> Bae , D.G., Gho , Y.S., Yoon , W.H., Chae , C.B. “Arginine-rich anti-vascular endothelial growth factor peptides inhibit tumor growth and metastasis by blocking angiogenesis”. *J Biol Chem* (2000) , **275**, 13588-13596.
- <sup>129</sup> Jia , H., Jezequel , S., Lohr , M., Shaikh , S., Davis , D., Soker , S., Selwood , D., Zachary , I. “Peptides encoded by exon 6 of VEGF inhibit endothelial cell biological responses and angiogenesis induced by VEGF”. *Biochem Biophys Res Commun* (2001) , **283** , 164 – 173.
- <sup>130</sup> Piossek , C., Schneider-Mergener , J., Schirner , M., Vakalopoulou , E., Germeroth , L., Thierauch , K.H. “Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor II-derived peptides inhibit VEGF”. *J Biol Chem* (1999) , 274 , 5612-5619.
- <sup>131</sup> Albini , A., Soldi , R., Giunciuglio , D., Girando , E., Benelli , R., Primo , L., Noonan , D., Salio ,M., Carmussi , G., Rockl , W., Bussolino , F. “The angiogenesis induced by HIV-1 tat protein is mediated by the Flk-1/KDR receptor on vascular endothelia cells”. *Nat Med* (1996) , **2**, 1371-1375.
- <sup>132</sup> D’Andrea , L.D., Iaccarino , G., Fattorusso , R., Sorriento , D., Carannante , C., Papasso , D., Trimarco , B., Pedone , C. “ Targeting angiogenesis : structural characterization and biological properties of a de novo engineered VEGF mimicking peptide”*Proc Natl Acad Sci U S A* (2005) , **102** , 14215-14220.
- <sup>133</sup> Carmeliet , P., Jain , RK. “Angiogenesis in cancer and other diseases”. *Nature* (2000) , **407** , 249-57.
- <sup>134</sup> Carmeliet , p., Moons , L., Luttun , A., et al. “Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions”. *Nat Med* (2001) , **7** , 575-583.
- <sup>135</sup> Park , JE , Chen , HH , Winer , J , et al. “ Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity , in vitro and in vivo , and high affinity binding to Flt 1 but not to Flk-1/KDR”. *J Biol Chem* (1994) , **269** , 25646-54 .
- <sup>136</sup> Autiero , M., Waltenberger , J., Communi , D., et al. “ Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1”. *Nat Med* (2003), **9** , 936-43.
- <sup>137</sup> Wei , S. C., Tsao , P. N., Yu , S. C., Shun , C. T., Tsai-Wu , J. J., Wu , C. H. H., Su , Y. N., Hsieh , F. J., Wong , J. M. “Placenta growth factor expression is correlated with survival of patients with colorectal cancer”. *Gut* (2005), **54**, 666-672.
- <sup>138</sup> Autiero , M., Luttan , A., Tjwa , M., et al. “ Placental growth factor and its receptor, vascular endothelial growth factor receptor-1: novel targets for stimulation of ischemic tissue revascularization and inhibition of angiogenic and inflammatory disorders”. *J Thromb Haemost* (2003) , **1** , 1356-1370.
- <sup>139</sup> Kabbavar , F., Hurwitz , HI., Fehrenbacher , L., et al. “ Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer”. *J Clin Oncol* (2003), **21** , 60-65.
- <sup>140</sup> Ferrara , N., Gerber , HP.; LeCouter , J. “The biology of VEGF and its receptors”. *Nat Med* (2003), **9** , 669-76.

- 
- <sup>141</sup> Compennalle , V., Brusselmans , K., Acker , T., et al. “Loss of HIF-2alpha and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation , whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice”. *Nat Med* (2002) , **8**, 702-10.
- <sup>142</sup> LeCouter , J., Maritz , DR., Li B., et al. “Angiogenesis –independent endothelial protection of liver : role of VEGFR-1”. *Scienze* (2003) , **299** , 890-3.
- <sup>143</sup> Li B, Ogasawara , AK., Yang , R., et al. “ KDR (VEGF receptor 2 ) is the major mediator for the hypotensive effect of VEGF”. *Hypertension* (2002) , **39** , 1095-100.
- <sup>144</sup> Kitamoto , Y., Tokunaga , H., Tomita , K. “Vascular endothelial growth factor is an essential molecule for mouse kidney development : glomerulogenesis and nephrogenesis”. *J Clin Invest* (1997) , **99** , 2351-7.
- <sup>145</sup> Luttun , A., Autiero , M., Tjwa , M , et al. “ Genetic dissection of tumor angiogenesis : are PlGF and VEGFR-1 novel anti-cancer targets?”. *Biochim Biophys Acta* (2004) , **1654** , 79-94.
- <sup>146</sup> Ahmed , A., Dunk , C., Ahmad , S., et al. “Regulation of placental vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PlGF) and soluble Flt1 by oxygen-a review”. *Placenta* (2000) , **21** (suppl A) , S 16-24.
- <sup>147</sup> Khaliq , A., Li XF , Shams , M., et al. “Localisation of placenta growth factor (PlGF) in human term placenta”. *Growth Factors* (1996) , **13** , 243-50.

## ***CAPITOLO 3***

## PROGRESSIONE TUMORALE

Le circa  $3 \times 10^{12}$  cellule di un organismo sano, in condizioni normali, vivono in una comunità complessa e interdipendente, all'interno della quale controllano vicendevolmente la tendenza alla proliferazione. Questa cooperazione permette ad ogni tessuto di mantenere le dimensioni e la struttura appropriate ai bisogni dell'organismo. Le cellule tumorali mancano di questa regolazione e diventano insensibili ai meccanismi di controllo della proliferazione, seguendo un programma di riproduzione indipendente. La perdita di adesione cellulare induce apoptosi in cellule non trasformate: questo fenomeno detto "*anoikis*"<sup>148</sup> assicura l'integrità dei tessuti poiché le cellule che si staccano dalla sede originaria vanno incontro ad apoptosi, a meno che non abbiano acquisito caratteristiche che consentono loro di sopravvivere anche in assenza di ancoraggio alla matrice (cellule trasformate). La cellula tumorale può staccarsi dalla sede del tumore primario, attraversare la membrana basale e rimanere in loco, oppure migrare attraverso lo stroma interstiziale e le giunzioni intercellulari<sup>149</sup>. A questo punto può penetrare nei vasi sanguigni e/o linfatici, il cui flusso le consente di colonizzare nuovi distretti, dando luogo alle metastasi (Figura 1).



**Figura 1** Processo di metastasi

In molti casi queste metastasi portano alla morte del paziente. La maggior parte delle morti dovute al cancro, infatti, non sono causate dalla crescita di tumori primari, bensì sono il risultato della sua invasione in siti secondari. La metastasi è un complesso processo biologico<sup>150</sup> che richiede:

- degradazione del reticolo proteico a cui le cellule tumorali sono ancorate (matrice extracellulare) mediante la regolazione dell'espressione di enzimi degradanti la matrice<sup>2</sup> al fine di facilitare la migrazione cellulare e l'invasione.
- molecole di adesione cellula-cellula, cellula-matrice per facilitare la diffusione di cellule metastatiche in siti distanti.

- fattori di crescita e ormoni per indurre la proliferazione di metastasi tumorali.

Le cellule normali sono tenute insieme nei tessuti attraverso un complesso reticolo costituito dalle proteine della matrice extracellulare quali collagene, elastina, fibronectina, laminina, vitronectina, eparansolfati e proteoglicani.

Queste proteine della matrice sono degradate durante il rimodellamento tissutale, lo sviluppo embrionale e la cicatrizzazione delle ferite. Le cellule tumorali devono degradare dette proteine così da poter migrare dalla sede del tumore primario ed invadere gli altri tessuti. Fondamentali per questo processo sono gli enzimi degradanti la matrice quali: urochinasi, che è un attivatore del sistema del plasminogeno, cisteina proteasi (catepsine B ed L), metalloproteasi della matrice (collagenasi).



## MIGRAZIONE CELLULARE

La migrazione cellulare, fondamentale per i processi d'invasione e metastatizzazione, è un fenomeno che svolge un ruolo primario anche in processi fisiologici, quali lo sviluppo embrionale, la cicatrizzazione delle ferite e la risposta immune. Essa presuppone un'interazione tra le cellule e tra queste e la matrice extracellulare; questo processo si realizza attraverso un'alternanza di fasi di distacco e di adesione, in altre parole un'alternanza di meccanismi proteolitici e pro-adesivi<sup>151</sup> (Figura 2).

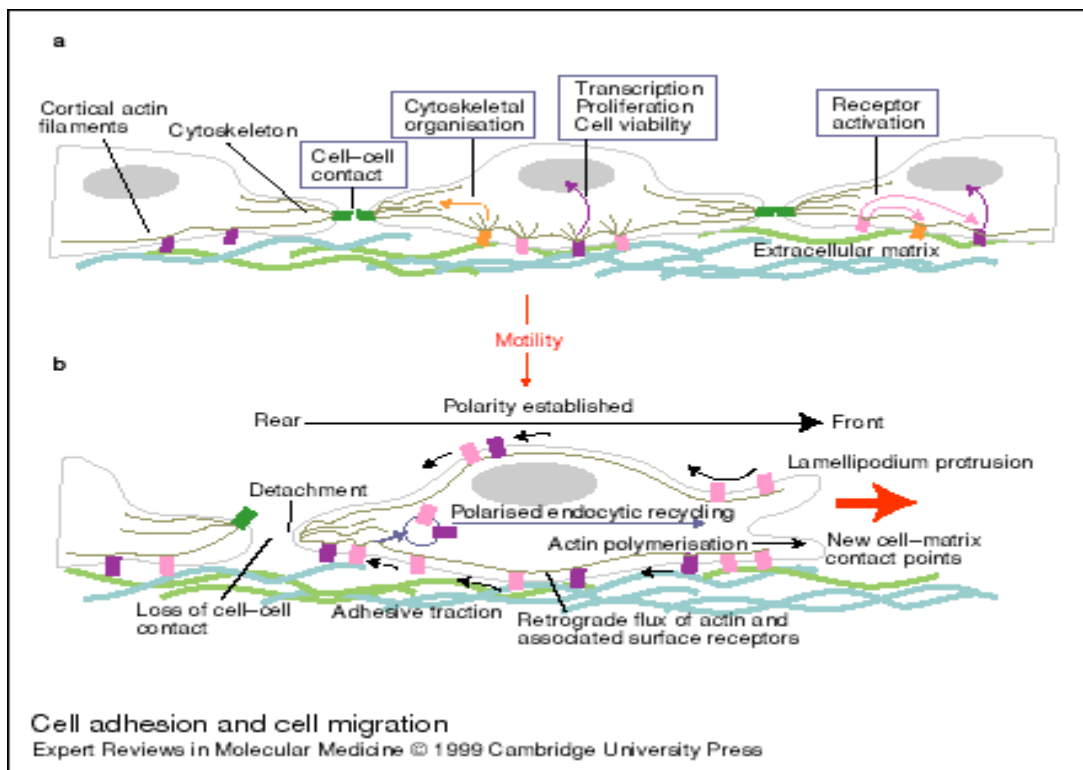


Figura 2 Adesione cellulare e migrazione cellulare

L'adesione di una cellula alle proteine insolubili della matrice extracellulare si basa sull'interazione tra tali componenti (collagene, fibronectina, laminina, vitronectina, eparansolfati e proteoglicani) ed i loro specifici recettori presenti sulla membrana cellulare, le integrine<sup>152</sup>. Spesso in cellule fortemente aderenti, le integrine ed i componenti del citoscheletro si associano, costituendo un punto di contatto tra le proteine della matrice e l'interno della cellula. Grazie all'interazione con altri partners superficiali e/o intracellulari, avviene la traduzione di segnali essenziali per la sopravvivenza e la crescita cellulare<sup>153</sup>. La migrazione cellulare è un processo determinato da interazioni dinamiche tra le molecole di adesione presenti sulla superficie della cellula, il substrato e l'apparato contrattile del citoscheletro. Per migrare, la cellula acquista un'asimmetria spaziale, che si manifesta con una morfologia polarizzata; si stabilisce così, una netta distinzione tra la porzione anteriore che costituisce il fronte cellulare e quella posteriore, retrocellulare. In seguito alla polarizzazione, la membrana della cellula emette delle estroflessioni: lamellipodi e filipodi. I lamellipodi sono delle ampie strutture laminari; i filipodi, invece, sono delle proiezioni sottili, cilindriche ed appuntite. Entrambe sono protusioni cellulari contenenti filamenti di actina e proteine simili che si estendono in maniera reversibile nelle tre dimensioni intorno alla cellula<sup>4,154,155</sup>. Lo stimolo migratorio, proveniente dall'ambiente extracellulare e mediato da recettori di membrana, produce una serie di reazioni a cascata in

cui sono coinvolte diverse proteine intracellulari, determinando, come effetto finale, la polimerizzazione dell'actina globulare in actina filamentosa. La forza adesiva presente al fronte cellulare, a livello del lamellipodio, deve essere sufficiente a generare la trazione anteriore. A livello posteriore, invece, l'adesione al substrato deve essere più debole, per consentire il distacco<sup>7,8</sup>. Il movimento cellulare è determinato dalla sequenza di eventi spazialmente e temporalmente coordinati, che culminano in un'alternanza di fasi di adesione al substrato e di distacco da questo<sup>6</sup>. Diversi fattori mediano il movimento direzionato delle cellule e fra questi: il PDGF (fattore di derivazione piastrinico), l'FGF<sup>156</sup> (fattore di crescita dei fibroblasti), l'EGF (fattore di crescita epidermico). Oltre a queste proteine, rivestono un ruolo particolarmente interessante anche le chinasi appartenenti alla famiglia delle MEK, di cui fanno parte le ERK<sup>157</sup> (extra cellular signal-regulated kinase). Si tratta di proteine intracellulari direttamente responsabili della traduzione del segnale ed in grado di modulare l'espressione di oncogeni. Esiste, infatti, una correlazione tra le MAP/ERK chinasi ed un'altra proteina ad attività chinasi nota come p38<sup>MAP</sup>, la cui principale azione è consentire il mantenimento del corretto equilibrio tra apoptosi e crescita cellulare<sup>157</sup>. La cosa interessante è che questi eventi sono regolati proprio dal recettore dell'urochinasi. Questa azione dell'uPAR richiede l'attivazione dell'integrina  $\alpha_5\beta_1$  che facilita la formazione di fibrille insolubili di fibronectina<sup>157</sup>. In vivo l'attivazione

dell'integrina da parte dell'uPAR determina a sua volta un aumento dei livelli di attivazione di ERK responsabili della crescita tumorale. È stato dimostrato che l'attivazione delle ERK si verifica, essenzialmente, attraverso due tipi di segnale<sup>157</sup>. Il primo è un segnale positivo che coinvolge l'uPAR, il quale mediante l'attivazione dell'integrina  $\alpha_5\beta_1$ , attiva ERK. Il secondo segnale è generato dalla presenza di filamenti insolubili di fibronectina che sopprimono l'attività di p38<sup>MAP</sup> e ciò determina un aumento di attività di ERK; l'uPAR è sovraespresso e la sua interazione con l'integrina si conclude con un aumento degli eventi tumorogenici<sup>157</sup>.

## SISTEMA uPA

Il sistema uPA è un sistema proteasico costituito da:

1. Attivatore del plasminogeno, chiamato anche urochinasi o uPA
2. I suoi inibitori fisiologici PAI-1 e PAI-2 e proteasi nexina<sup>158</sup>
3. Recettore dell'uPA (uPAR) che è espresso sulla superficie delle cellule tumorali ed in particolare superespresso in caso di tumori aggressivi (Figura 3).

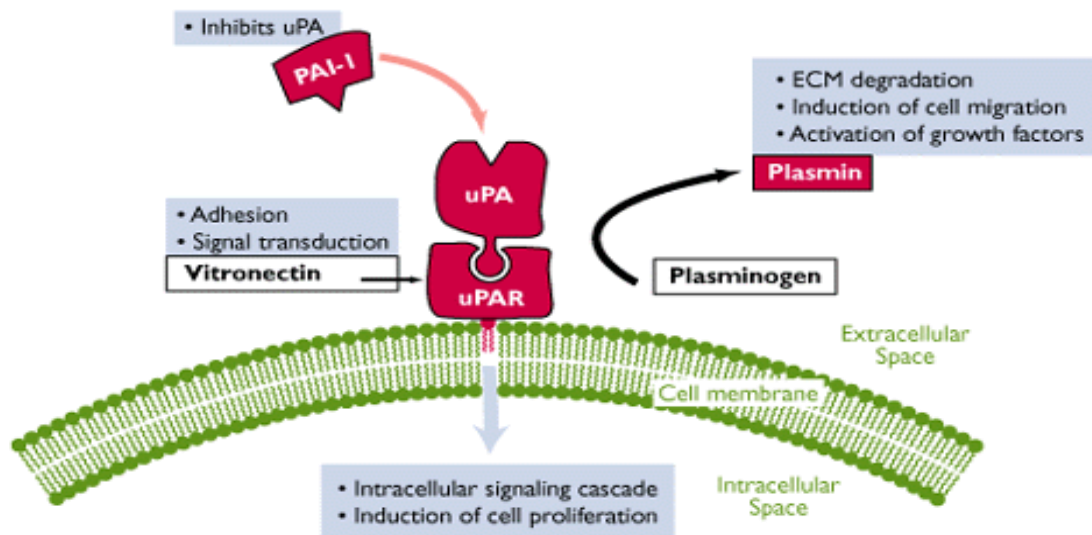


Figura 3 Sistema uPa/uPAR

Nella crescita tumorale il sistema uPA ha due funzioni:

1. Il legame dell'uPA al suo recettore può attivare altre proteasi che giocano un ruolo importante nella degradazione della matrice extracellulare.
2. Attraverso il legame all'uPAR, l'uPA dà l'avvio alla traduzione del segnale intracellulare che induce proliferazione cellulare, migrazione e un'ulteriore crescita tumorale.

L'attivazione enzimatica dell' uPA è controllata da un determinato numero di inibitori; uno di questi, il PAI-1, inibisce l'uPA quando essa è legata al suo recettore presente sulla superficie cellulare. In seguito al legame di PAI-1 al complesso uPA/uPAR, la cellula internalizza le tre molecole. L'uPA e PAI-1 vengono degradati e l'uPAR è riciclato e trasportato sulla superficie cellulare pronto a legare un'altra molecola di uPA. Quindi c'è una correlazione positiva tra elevata espressione di PAI-1 e metastasi tumorale.

### **L'urochinasi**

L'urochinasi è una proteasi serinica capace di attivare con un solo taglio proteolitico il plasminogeno, una glicoproteina presente nel plasma in forma enzimaticamente inattiva. Questo processo porta alla formazione di plasmino, una proteasi ad ampia specificità, coinvolta nei processi di degradazione della fibrina e di idrolisi di diversi componenti della matrice extracellulare e delle

membrane basali. Diversamente dalla plasmina, l'uPA agisce su un ristretto numero di substrati; può infatti attivare il precursore del fattore di crescita HGF, una proteina caratterizzata da un'estesa omologia con il plasminogeno, e la proteina stimolatrice dei macrofagi (MSP), controllando così in maniera indiretta proliferazione, invasione cellulare ed apoptosi<sup>158</sup>.

L'urochinasasi è sintetizzata dalla cellula come un polipeptide di 431 amminoacidi e secreta, come glicoproteina di 50 kDa in seguito alla rimozione di un peptide segnale di 20 amminoacidi. Il peptide precursore di 411 amminoacidi (pro-uPA) subisce varie modifiche post-trasduzionali.

La pro-uPA è attivata a seguito di un taglio proteolitico che genera l'enzima maturo, costituito da due catene polipeptidiche tenute insieme da un ponte disolfuro: la catena A, di circa 17 kDa, contenente la porzione ammino-terminale e la catena B, di circa 33 kDa, che contiene la porzione carbossi-terminale e il sito catalitico<sup>158</sup>. Diversamente da altri enzimi proteolitici, l'urochinasasi umana è una glicoproteina costituita da una serie di "domini" strutturali e funzionali. Essa, infatti, presenta estese regioni non dotate di attività catalitica, ma contenenti domini che svolgono funzioni diverse ed indipendenti. La porzione ammino-terminale (ATF, 1-135 aa), è costituita da una breve sequenza di 8 amminoacidi, dal dominio omologo al fattore di crescita epidermico EGF (9-49 aa), responsabile del legame al suo specifico recettore, e dal dominio denominato "Kringel" (50-135 aa), importante per la

stabilità terziaria dell'intera proteina. Mediante NMR, è stato possibile dimostrare che il dominio EGF presenta significative differenze con la struttura tridimensionale di proteine omologhe, il che spiega l'incapacità di altri fattori di crescita di legarsi al recettore dell'urochinasi. L'ATF è connesso mediante un breve peptide di 22 residui amminoacidici alla regione carbossi-terminale, contenente l'attività catalitica dell'enzima (159-411 aa)<sup>159</sup>. Oggi l'attenzione è focalizzata proprio sullo studio delle funzioni non catalitiche, in quanto è sempre più evidente che, al di là dell'importante ruolo svolto come enzima proteolitico in condizioni fisiologiche così come in quelle patologiche, l'uPA, svolge *in vivo* funzioni molte diverse. Sempre più spesso, infatti, si riferisce di ruoli non proteolitici di diverse proteasi e indagare in questo campo si sta rivelando molto interessante.

### **Struttura e funzione del recettore dell'urochinasi**

Il recettore per l'urochinasi (uPAR) è stato per la prima volta descritto sulla superficie di una linea di cellule leucemiche umane di tipo linfo-monocitario U937<sup>160</sup>; successivamente è stata dimostrata la sua presenza in fibroblasti, cellule endoteliali, polimorfonucleati, e linee cellulari tumorali di diversa origine<sup>161</sup>. Elevati livelli di urochinasi e del suo recettore sono stati descritti in diversi tipi di tumore umano quali il carcinoma della mammella<sup>162</sup>, del



polmone<sup>163</sup> e del colon retto<sup>164</sup>. Con metodiche di immunoistochimica e di ibridazione *in situ*, è stato dimostrato che le cellule tumorali maligne esprimono elevati livelli del recettore dell'urochinasi saturo del ligando il quale, a sua volta, può essere sintetizzato in modo paracrino anche dalle cellule stromali.

La funzione principale del recettore dell'urochinasi è di localizzare sulla superficie cellulare l'urochinasi, in forma di pro-enzima (pro-uPA); questo legame determina l'attivazione delle prime molecole di plasminogeno e quindi la formazione di plasmina. L'attività dell'urochinasi legata al recettore è 20-50 volte superiore rispetto a quella dell'enzima libero<sup>165</sup>. Il recettore dell'urochinasi è costituito da una singola catena polipeptidica di 313 aminoacidi altamente glicosilata, ancorata alla componente fosfolipidica della membrana cellulare mediante una regione glicosil-fosfatidil-inositolica o "GPI"<sup>166</sup>. Questa "ancora" fosfolipidica consente al recettore di scorrere nella membrana cellulare localizzandosi lì dove si rende necessaria l'attività proteolitica urochinasi-dipendente, per esempio nei contatti focali<sup>167</sup>. Il recettore per l'urochinasi umana ha un peso molecolare di 50-55 kDa a seconda del suo stato di glicosilazione; è sintetizzato come precursore di 40 kDa, successivamente glicosilato e trasportato sulla superficie cellulare. La glicosilazione è necessaria per la corretta esposizione e per il riconoscimento del ligando. Sono stati descritti tre domini strutturali: D1, D2 e D3.

Il dominio N-terminale D1 contiene il sito di legame ad alta affinità (Kd: 0.1 nM) per l'urochinasi<sup>168</sup>. I domini D2 e D3 aumentano l'affinità per il ligando specifico e, sebbene la loro specifica funzione non sia ancora del tutto chiara, sembrano essere coinvolti nel legame con la vitronectina, una proteina della matrice extracellulare, che media l'adesione cellulare<sup>169</sup>. Tra i domini D1 e D2 è stata descritta una breve sequenza di cinque amminoacidi **Serina-Arginina-Serina-Arginina-Tirosina (SRSRY)**, che ha mostrato avere forte attività chemiotattica<sup>170</sup>. Tale sequenza risulta esposta nel recettore quando l'uPAR, in seguito al legame con l'uPA, è soggetto ad un cambio conformazionale, cambio che può essere mimato *in vitro* dal trattamento del recettore solubile con chimiotripsina<sup>171</sup>. È stato dimostrato che la sequenza SRSRY dell'uPAR è l'unica regione del recettore sensibile all'attività enzimatica di diverse proteasi, anche a quella dell'uPA stessa, che può, a concentrazioni fisiologiche, tagliarla.

## **IMPOSTAZIONE DELLA RICERCA**

### **Il sistema uPA come target di nuove terapie per il cancro**

Il sistema uPA è un target promettente per la terapia dei tumori solidi metastatizzati come il cancro alla mammella, alle ovaie, allo stomaco, al pancreas e al polmone. Inoltre il sistema uPA è un eccellente target di terapie contro il cancro, in particolare per specifici trattamenti antimetastasi di quei gruppi di pazienti esprimenti elevati livelli di uPA e PAI-1 nei loro tumori, e che sono ad elevato rischio di sviluppo di metastasi. Per tale ragione, il gruppo di ricerca presso il quale ho svolto il mio lavoro di tesi, ha preso in considerazione lo studio della sequenza pentapeptidica prima citata in quanto, bloccare la chemiotassi di cellule tumorali, significa impedire il processo di metastasi e quindi dare maggiori possibilità di sopravvivenza al paziente.

L'obiettivo dei nostri studi è stato quello di individuare il ruolo svolto da ciascun aminoacido della sequenza SRSRY nell'attività chemiotattica. A tal fine si è proceduto effettuando un "Ala Scan". Con tale procedura è possibile confrontare le eventuali differenze di attività chemiotattica tra ciascuna delle sequenze peptidiche e la sequenza SRSRY originaria.

Sono state sintetizzate, quindi, quattro diverse sequenze peptidiche, ciascuna delle quali presenta la sostituzione di uno dei primi quattro aminoacidi con L-alanina. È stata sintetizzata poi, una quinta sequenza in cui è stata effettuata

una doppia modifica, i due residui di serina sono stati sostituiti con residui di alanina. Inoltre sono stati sintetizzati anche altri due pentapeptidi in cui uno solo dei residui di arginina è stato sostituito con l'acido glutammico, lasciando inalterata l'altro. I pentapeptidi ottenuti sono quelli riportati in Tabella 1.

***Tabella 1: Sequenze peptidiche sintetizzate***

---

1	H- <b>Ala</b> -Arg-Ser-Arg-Tyr-OH
2	H-Ser- <b>Ala</b> -Ser-Arg-Tyr-OH
3	H-Ser-Arg- <b>Ala</b> -Arg-Tyr-OH
4	H-Ser-Arg-Ser- <b>Ala</b> -Tyr-OH
5	H- <b>Ala</b> -Arg- <b>Ala</b> -Arg-Tyr-OH
6	H-Ser- <b>Glu</b> -Ser-Arg-Tyr-OH
7	H-Ser-Arg-Ser- <b>Glu</b> -Tyr-OH

---

Gli analoghi peptidici sintetizzati, sono stati poi testati in due diverse linee cellulari, HEK-293 e HEK-293/uPAR, per verificare la loro eventuale capacità di promuovere migrazione cellulare e polimerizzazione di actina. In

ciascuno degli esperimenti, la sequenza chemiotattica è stata utilizzata come controllo positivo.

## PARTE SPERIMENTALE

### Sintesi peptidica in fase solida

I peptidi riportati in tabella 1, sono stati sintetizzati in fase solida utilizzando una strategia sintetica via Fmoc. Come supporto solido, sono stati impiegati 500 mg circa di resina Wang con grado di sostituzione 0,75 mmol/g. Prima di iniziare la sintesi, la resina è stata rigonfiata in 30 ml di DMF (N,N-dimetilformammide) per circa due ore. L'intera sintesi è stata condotta sotto atmosfera di argon e come solvente è stata usata la DMF. Il primo amminoacido è stato accoppiato mediante l'attivazione in situ, adoperando 3 equivalenti di ognuno di questi reagenti: AA N<sup>α</sup>-Fmoc protetto, HBTU (O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio esafluoro fosfato), HOBt (idrossibenzotriazolo) e 6 equivalenti di DIPEA (diisopropiletilammina), contemporaneamente è stata aggiunta in quantità catalitica la DMAP (dimetilamminopiridina) per facilitare la formazione del legame estereo tra l'OH benzilico presente sul linker della resina e il gruppo α-carbossilico del primo amminoacido. Gli accoppiamenti degli amminoacidi successivi sono stati effettuati usando i medesimi reattivi e nelle stesse quantità, ad eccezione della DMAP. La deprotezione dal gruppo Fmoc dell'α-NH<sub>2</sub> di ciascun amminoacido è stata effettuata usando pochi ml di una soluzione di piperidina al 25% in DMF.

Le sequenze amminoacidiche sono state così assemblate, alternando accoppiamento e deprotezione. La procedura accoppiamento-deprotezione è stata ripetuta fino a quando non sono stati introdotti tutti i residui. Il Kaiser test è stato effettuato dopo ogni accoppiamento per determinarne la completezza e dopo ogni deprotezione per verificare la totale deprotezione dal gruppo Fmoc. Dopo l'accoppiamento dell'ultimo amminoacido N-terminale, il gruppo Fmoc è stato rimosso con la stessa procedura prima esposta e il peptide-resina è stato abbondantemente lavato con DCM e poi seccato sotto atmosfera di argon.

### **Distacco del peptide dalla resina**

Il distacco del peptide dalla resina e la contemporanea rimozione degli altri gruppi protettori presenti in catena laterale dei singoli amminoacidi, sono stati effettuati utilizzando una miscela di sblocco costituita da 9 ml di acido trifluoroacetico, 0,5 ml di acqua e 0,5 ml di trietilsilano. La resina è stata rimossa dalla soluzione mediante filtrazione sotto vuoto ed il peptide grezzo è stato ottenuto per precipitazione a freddo in etere dietilico e successiva centrifugazione; l'essiccazione all'aria poi, ha portato alla formazione di una polvere bianca.

## **Purificazione mediante HPLC**

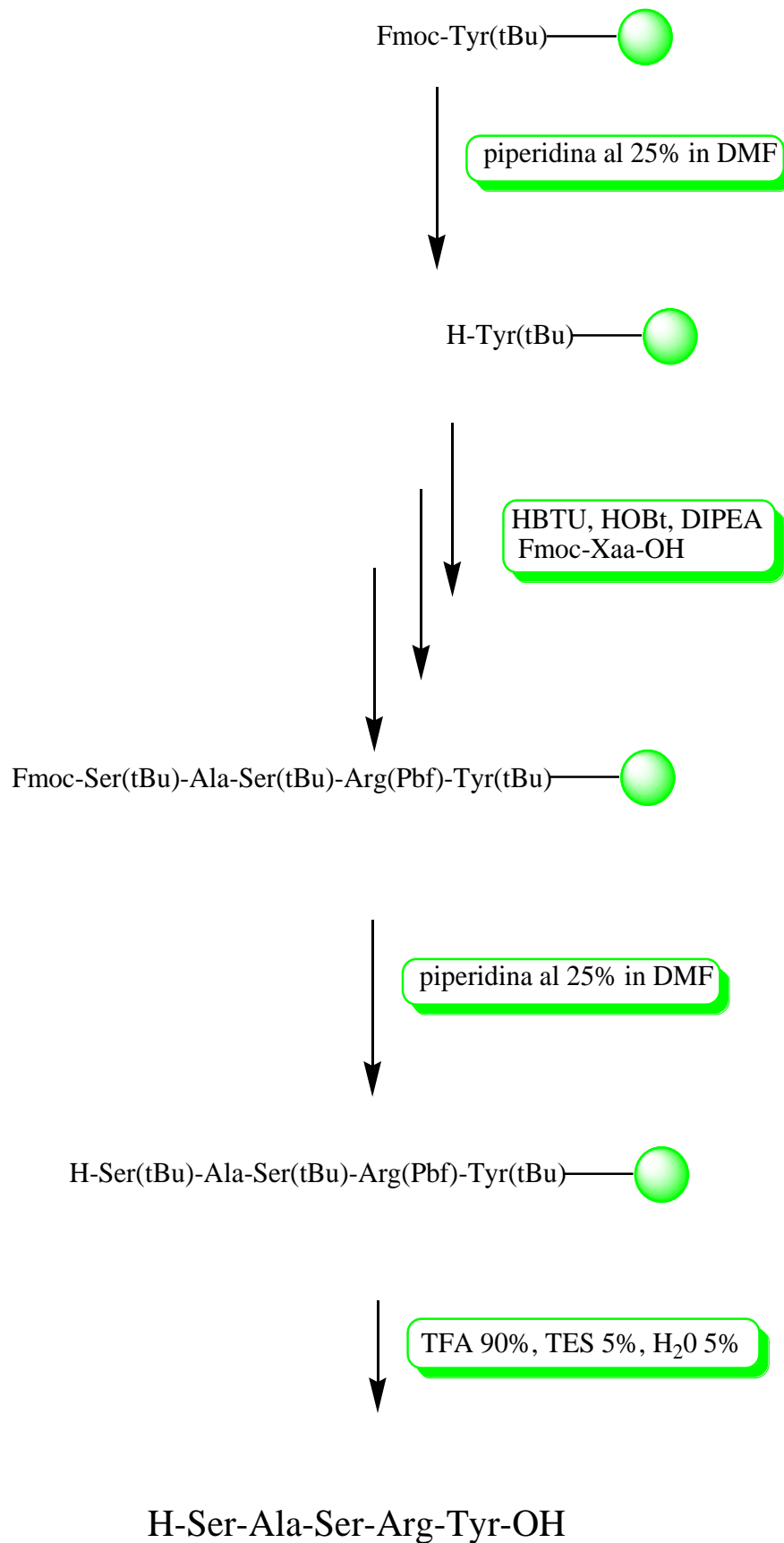
I peptidi finali sono stati purificati usando RP-HPLC preparativo con colonna Vydac C18 (218 TP1520, 15  $\mu\text{m}$ ) utilizzando come eluente un gradiente di  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CH}_3\text{CN}$  (da 0 a 55%) contenente una concentrazione costante di TFA (0.1% v/v), con un flusso di 15 ml/min. Le separazioni sono state monitorate con un rivelatore UV-Vis ad una lunghezza d'onda di 230 nm.

Le frazioni corrispondenti al picco di maggiore intensità sono state poi raccolte, unite e liofilizzate. Alla fine, i peptidi sono stati ottenuti come solidi bianchi con un grado di purezza maggiore del 95%.

La caratterizzazione è stata effettuata mediante spettrometria di massa ESI.



## Schema sintetico della sequenza SASRY



## PARTE FARMACOLOGICA

### Chemiotassi

Per i saggi di chemiotassi sono state utilizzate camerette di Boyden. Esse sono costituite da due comparti separati da un filtro di policarbonato, il quale è provvisto di pori del diametro di 8  $\mu\text{m}$ . I filtri vengono ricoperti con vitronectina (5  $\mu\text{g/ml}$ ), una proteina della matrice extracellulare, utilizzata come matrice pro-adesiva. Nel comparto inferiore viene depositato il chemioattrattante alle opportune concentrazioni, in modo da determinare la formazione di un gradiente chemiotattico. Nel comparto superiore vengono depositate le cellule da testare per la loro capacità di muoversi nel gradiente e dunque attraversare i pori del filtro interposto. Con questo saggio abbiamo analizzato la capacità delle cellule HEK-293 ed HEK-293/uPAR di migrare in risposta ai diversi domini funzionali del recettore dell'uPa ed ai peptidi.  $2 \times 10^5$  cellule/campione, sospese in DMEM-0.1% BSA sono depositate nel comparto superiore della camera di Boyden, e lasciate migrare per 4 ore a  $37^\circ\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$ . Al termine del saggio, le camere sono state disassemblate, le cellule sulla superficie superiore del filtro sono state rimosse meccanicamente e i filtri sono stati fissati in etanolo, colorati con ematossilina ed osservati con un microscopio ottico. Per ogni filtro vengono contate almeno 10 campi a 200 X ingrandimenti. Gli esperimenti vengono eseguiti in triplicato ed eseguiti

almeno tre volte. Le cellule che migrano in assenza di chemiotattico sono considerate 100%. I risultati sono espressi come percentuale delle cellule che sono migrate in assenza del chemiotattico (random cell migration).

### **Colorazione del citoscheletro.**

Cellule HEK-293 ed HEK-293/uPAR sono state raccolte e messe in coltura. Le cellule (almeno  $1 \times 10^6$  cellula/campione), vengono stimulate a 23°C con diversi effettori, alle concentrazioni e per i tempi specificati in ciascun esperimento. In alcuni casi, prima del trattamento sono incubate con 5 µg/ml di anticorpi monoclonali anti-recettore della vitronectina di tipo  $\alpha_v\beta_5$  (clone P1F6) ed  $\alpha_v\beta_3$  (clone LM609) o con 100 µg/ml del peptide RGD. In altri esperimenti le cellule sono state pre-incubate per 1 h a 23°C con 500 nM calphostin C, uno specifico inibitore della proteina Kinasi C, o con 25 µM PD98059, uno specifico inibitore delle MEK chinasi. Dopo il trattamento, le cellule vengono fissate e permeabilizzate con una soluzione di PBS contenente 3.5% formaldeide-0,1% Triton X 100, per 10 minuti a 4°C. Dopo ripetuti lavaggi con PBS, le cellule vengono incubate con 20 ng/ml di falloidina coniugata con rodamina per 45 min a temperatura ambiente, lavate con PBS, e depositate su un vetrino porta-oggetti ben pulito. La falloidina lega in modo covalente l'actina polimerizzata: risulta quindi essere colorante elettivo dell'actina filamentosa e quindi del citoscheletro. Infine, dopo ripetuti

lavaggi con PBS, le cellule sono state depositate su un vetrino ed osservata con un microscopio a fluorescenza, a 1000 X ingrandimenti, utilizzando i filtri utili per l'osservazione delle due emissioni di fluorescenza (rodamina,  $\lambda$ :580). Le immagini sono state analizzate mediante camera digitale. La valutazione dei risultati è stata ottenuta mediante conta delle cellule che presentavano polarizzazioni evidenti di actina polimerizzata ed il loro numero è stato espresso come percentuale di almeno 200 cellule osservate. Le percentuali di polarizzazioni di actina polimerizzata indotte da ciascun effetto, vengono sottratte alle percentuali di polarizzazioni contate in cellule non trattate. Ciascun esperimento è stato ripetuto almeno due volte e le percentuali contate da due osservatori indipendenti.

### **Marcatura del peptide SRSRY con Na<sup>125</sup>I**

500 ng del peptide SRSRY sono stati incubati con la reazione di iodinazione contenente 500  $\mu$ Ci di Ioduro di Sodio radiomarcato (Na<sup>125</sup>I), in 0.1M Tris-HCl, pH 7.6. La reazione avviene in un volume di 200  $\mu$ l a 23°C, in un tubo di vetro sul quale era stato stratificato lo Iodio-Gen per trattenere lo ioduro di sodio, altrimenti volatile. Dopo 10 min, la reazione è bloccata dall'aggiunta di 2.5 mg/ml di N-acetiltirosina. Il prodotto marcato viene separato dal radioattivo mediante cromatografia di gel-filtrazione utilizzando una colonna pre-impaccata Sephadex G-10<sup>26</sup>. La radioattività delle frazioni raccolte è

valutata da un contatore per radiazioni  $\gamma$ . Si selezionano le frazioni corrispondenti al primo picco di massima radioattività e si scartano le frazioni relative al secondo picco, perché sono da riferire a  $\text{Na}^{125}\text{I}$  libero. L'attività specifica viene determinata su di 1/100 del volume di reazione dopo aver precipitato le proteine con TCA (acido tricloro-acetico). L'attività ottenuta è stata: 30  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$  di peptide.

### **Saggi di “Binding” con $\text{I}^{125}$ -SRSRY**

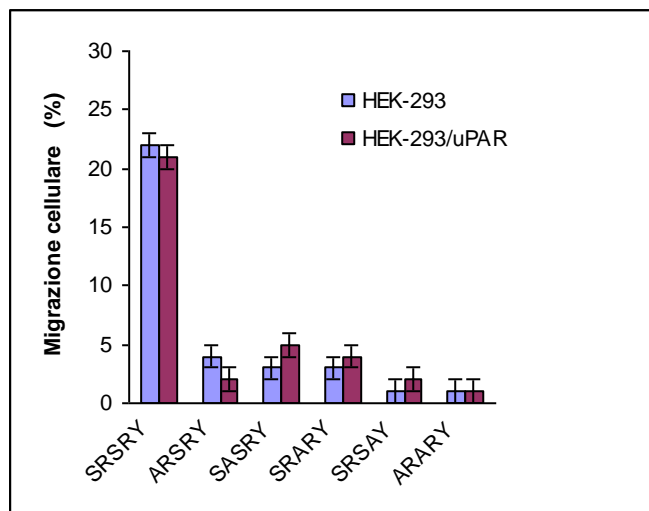
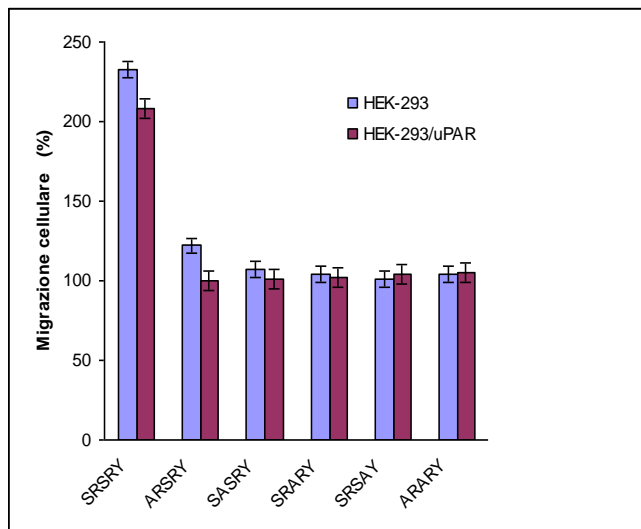
Le cellule HEK-293 vengono staccate come sopra descritte e contate.  $1 \times 10^6$  cellule/campione sono incubate a  $4^\circ\text{C}$  o  $23^\circ\text{C}$ , in DMEM 0.1% BSA contenente  $1 \times 10^5$  cpm di  $\text{I}^{125}$ SRSRY, in presenza od assenza del peptide freddo. Dopo 60 min, la reazione viene bloccata mediante l'aggiunta di 1 ml di DMEM 0.1% BSA freddo. Dopo ripetuti lavaggi con PBS freddo, le cellule vengono recuperate mediante centrifugazione a 1300 rpm, per 3 minuti e contate al  $\gamma$ -counter. Ogni saggio è stato seguito in duplicato. I dati relativi alla capacità delle cellule di legare specificatamente il peptide SRSRY radiomarcato (Legame specifico) sono stati calcolati, per ciascun punto, sottraendo ai valori in cpm, ottenuti dall'incubazione delle cellule con il solo ligando marcato (Legame totale), i valori in cpm, ottenuti dall'incubazione

delle cellule con il ligando marcato ed 1 mM SRSRY freddo (Legame aspecifico).

## RISULTATI E DISCUSSIONE

I dati biologici relativi ai peptidi 5 e 6, riportati in Tabella 2, non sono ancora disponibili; da qui in poi si discuterà sempre riguardo gli altri cinque peptidi, frutto dello studio Ala-scan.

Come mostrato in figura 4, nessuna delle sequenze mono o di-sostituite, da noi sintetizzate, si è mostrata capace di indurre gli effetti prodotti dalla sequenza di controllo, e ciò in entrambe le linee cellulari testate.



**Figura 4** Grafici relativi ai risultati ottenuti sperimentalmente

I dati riportati in tabella 2 confermano che l'intera sequenza SRSRY induce migrazione cellulare e polarizzazione dei filamenti di actina.

**Tabella 2: Effetti specifici del peptide *SRSRY* e dei suoi analoghi sintetici sulla migrazione cellulare e sull'organizzazione del citoscheletro**

Effettori (0,1 nM)	Migrazione cellulare (%)		Polarizzazione di F-actina (%)	
	HEK-293	HEK-293/uPAR	HEK-293	HEK-293/uPAR
<b>SRSRY</b>	233±7	208±6	22±1	21±2
<b>ARSR</b>	122±5	100±5	4±3	2±1
<b>SASRY</b>	107±1	101±4	3±3	5±4
<b>SRARY</b>	104±1	102±5	3±2	4±3
<b>SRSAY</b>	101±6	104±2	1±0	2±2
<b>ARARY</b>	104±5	105±12	1±1	1±1

E' stato possibile ipotizzare, quindi, che l'effetto chemiotattico di tale sequenza si realizzi in seguito all'esposizione del peptide SRSRY. Tale esposizione avviene o in seguito ad un cambio conformazionale dell'uPAR, indotto dal legame con l'urochinasasi, o perché quest' ultima opera un taglio proteolitico del dominio D1 dell'uPAR. Il fatto che sia l'uPA, sia il suo frammento ammino-terminale ATF, esercitino in misura paragonabile i loro effetti uPAR-mediati sulla motilità cellulare e sull'organizzazione del citoscheletro, induce ad assegnare un ruolo prevalente al cambio



conformazionale, piuttosto che al taglio proteolitico. Alla luce di queste osservazioni, è stato ipotizzato che l'esposizione della sequenza chemiotattica SRSRY dell'uPAR attivato, induca polimerizzazione di actina e motilità cellulare a seguito dell'interazione con una molecola "adattatrice", avente il ruolo di trasdurre il segnale uPA-indotto ed uPAR-mediato. In letteratura sono descritte diverse molecole capaci di interagire con il recettore dell'urochinasasi. Molto probabilmente il peptide chemiotattico esercita i suoi effetti attraverso l'interazione con le molecole adattatrici dell'uPAR. Se ciò sarà comprovato da evidenze sperimentali, il peptide chemiotattico potrebbe evocare in cellule del tutto mancanti di uPAR, gli stessi effetti che si osservano in cellule che esprimono uPAR e che sono stimulate con urochinasasi. I dati presentati dimostrano chiaramente che le cellule HEK-293, mancanti di uPAR ma in cui è presente la specifica sequenza presa in esame, sono capaci di migrare. Lo stesso peptide, è capace di promuovere nelle stesse cellule, polimerizzazione di actina ad un polo cellulare, così come è stato osservato in cellule che esprimono uPAR quando stimulate con urochinasasi. Dunque, il solo peptide chemiotattico mima gli effetti uPA-indotti ed uPAR-mediati anche in assenza di uPAR. Ulteriore conferma deriva dal fatto che molecole mediatrici del segnale quali le proteine G, la proteina chinasi C, la PI3 chinasi, che sono direttamente coinvolte nella migrazione cellulare e nell'organizzazione del citoscheletro indotta dall'urochinasasi, sono

chiaramente coinvolte anche nei segnali indotti dal peptide SRSRY. L'effetto è evidentemente specifico, dato che, una singola sostituzione amminoacidica in uno qualunque dei primi quattro amminoacidi del peptide, non produce migrazione cellulare e polimerizzazione di actina, sia in cellule HEK-293, sia in cellule HEK-293/uPAR.

## CONCLUSIONI

L'evento metastasi richiede la deregolazione di una serie di processi fisiologici e biochimici che presiedono alla migrazione cellulare, la quale è determinata dalla sequenza di eventi spazialmente e temporalmente coordinati.

Dallo studio presentato in questa tesi, si può dedurre che, un ruolo fondamentale nel processo di formazione di metastasi è giocato dal complesso uPA-uPAR. Alla luce delle attuali conoscenze, è noto che l'urochinasi, oltre ad avere un ruolo determinante nella proteolisi pericellulare, è capace di stimolare, indipendentemente dalla sua attività catalitica, la motilità in diverse linee cellulari che esprimono il recettore dell'urochinasi. In particolare, la sequenza SRSRY presente tra i domini D1 e D2 del recettore dell'urochinasi, svolge un ruolo cruciale nel processo di migrazione cellulare, la quale determina la delocalizzazione delle cellule tumorali in siti lontani dalla sede del tumore primario. Tuttavia rimangono ancora da chiarire quali siano i meccanismi biologici coinvolti in tale processo.

Le attuali strategie terapeutiche quali la chirurgia, la radioterapia e la chemioterapia, sono efficaci nel controllare ed arginare lo sviluppo di neoplasie solide in situ. Tuttavia, quando all'atto della diagnosi, il tumore ha dato già luogo a metastasi, in sedi diverse e lontane dalla sede primaria, l'approccio terapeutico diventa più problematico e suscettibile di insuccesso.

Capire, allora, quali siano i meccanismi biologici coinvolti nel processo di migrazione cellulare determinata dalla sequenza SRSRY, significa identificare dei nuovi target farmacologici.

Il nostro più immediato obiettivo è, quindi, quello di progettare delle nuove sequenze peptidiche che siano capaci di inibire in maniera specifica la motilità cellulare uPA-dipendente ed uPAR-mediata e che, pertanto, siano di grande interesse per una loro possibile sperimentazione di tipo pre-clinico e clinico.

# BIBLIOGRAFIA

- 
- <sup>148</sup> Giancotti , F.G., and Rouslahti , E. “Integrin signalling”. *Scienze* (1999), **285**,1028-1032.
- <sup>149</sup> Liotta , L.A., and Stetler-Stevenson , W.G. “Tumor invasion and metastasis : an imbalance of positive and negative regulation”. *Cancer Res* (1991), **51** , 5054-5059.
- <sup>150</sup> Pontieri , G.M. “Le metastasi. In “Patologia generale”. *Ed. Piccin* (1987), 705-716.
- <sup>151</sup> Huttenlocher , A., Sandborg , R.R., and Horwitz , A.F. “Adhesion in cell migration”. *Curr.Opin. Cell Biol.*(1995), **7** , 697-706.
- <sup>152</sup> Juliano , R.L. , and Haskill , S. “ Signal transduction from the extracellular matrix”. *J.Cell Biol.* (1993), **120** , 577-585.
- <sup>153</sup> Palecek , S.P., Horwitz , A.F., Lauffenburger , D.A. “Kinetic model for Integrin-mediated adhesion release during cell migration”. *Annals of Biomedical Engineering* (1999), **27** , 219-235.
- <sup>154</sup> Di Milla , P.A., Barbee , K., and Lauffenburger , D.A. “Mathematical model for the effect of adhesion in the migration on cell migration speed”. *Biophys.J.* (1991), **60** , 15-37.
- <sup>155</sup> Lauffenburger , D.A. , and Horwitz , A.F. “Cell migration : a physically integrated molecular process”. *Cell* (1996) , **84** , 359-369.
- <sup>156</sup> Eatock , M.M, Schatzlein , A., Kaye , S.B. “ Tumor vasculature as a target for anticancer therapy”. *Cancer Treat . Rev.*(2000) , **26** , 191-204.
- <sup>157</sup> J.A. Aguirre-Ghiso, Liu , D., Mignatti, A., Kovalski , K., and Liliana Ossowski . “ Urokinase receptor and fibronectin regulate the ERK<sup>MAPK</sup> to p38<sup>MAPK</sup> activity ratios determine carcinoma cell proliferation or dormancy in vivo”. *Mol. Biol. Cell.* (2001) , **12** , 863-879.
- <sup>158</sup> Stoppelli, M.P. “The plasminogen activation system in cell invasion”. In “Cell invasion”. *In press: Ed Lambdes Bioscience* (2002).
- <sup>159</sup> Alfano, D., Franco, P., Vocca, I., Gambi, N., Pisa, V., Mancini, A., Caputi, M., Carriero, M. V., Iaccarino, I., Stoppelli, M. P. “The urokinase plasminogen activator and its receptor”. *Thromb. Haemost.* (2005), **93**, 205-211.
- <sup>160</sup> Stoppelli, M.P., Corti , A., Soffientini , A., Cassani , G., Blasi , F., and Assoian , R.K. “ Differentiation-enhanced binding of the amino-terminal fragment of human urokinase plasminogen activator to a specific receptor on U937 monocytes”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1985), **82** , 4939-4943.
- <sup>161</sup> Vassalli , J.D. “The urokinase receptor ”.*Fibrinolysis* **8, suppl.**(1994), **1** , 172-181.
- <sup>162</sup> Carriero , M.V., Franco , P., Del Vecchio , S., Massa , O., Botti , G., D’Aiuto , G., Stoppelli , M.P., and Salvatore , M. “Tissue distribution of soluble and receptor-bound urokinase in human breast cancer using a panel of monoclonal antibodies”. *Cancer Res* (1994) , **54** , 5445-5454.
- <sup>163</sup> Pedersen , H., Brumer , N., Francid , D., Ostrerlind , K., Ronne , E., Hansen, H.H., Dano , K., and Grondahl-Hansen , J. “Prognostic impact of urokinase, urokinase receptor and type-1 plasminogen activator inhibitor in squamous and large cell lung cancer tissue”. *Cancer Res.* (1994) , **54**, 4671-4675.
- <sup>164</sup> Grondahl-Hansen , J., Ralfkiaer , E., Kirkeby , L.T., Kristensen , P., Lund, L.R. and Dano K. “Localization of urokinase-type plasminogen activator in stromal cell in adenocarcinoma of the colon in humans”. *Am. J. Pathol.* (1991), **138**, 111-117.

- 
- <sup>165</sup> Ellis, V. , Behrendt, N. and Dano, K. “Plasminogen activation by receptor-bonnd urokinase”. *J. Biol. Chem.* (1991), **266**, 12752-12758.
- <sup>166</sup> Blasi, F. “ Urokinase and urokinase receptor: a paracrine/autocrine system regulating cell migration and invasiveness” . *Bioassays.* (1993), **15**, 105-111.
- <sup>167</sup> Myohanen , H.T. , Stephens, R.W. , Hedman , K. , Tapiovaara , H. , Ronne , E., Hoyer-Hansen ,G., Dano ,K. and Vaheri ,A. “ Distribution and lateral motility of the urokinase-receptor complex at the cell surface” . *J. Histochem. Cytochem.* (1993), **41**, 1291-1301.
- <sup>168</sup> Hansen, A.P., Petros ,A.M., Meadows , R.P., Nettesheim ,D.G., Maza r,A.P., Olejniczak ,E.T., Xu, R.X., Pederson ,T.M., Henkin ,J., Fesik ,S.W., Vassalli ,J.D., Sappino ,A.P. and Belin ,D. “ Plasminogen activator/plasmin Solution structure of the Amino-Terminal Fragment of Urokinase-Type Plasminogen Activator” . *Biochemistry.* (1994), **33**, 487-4864.
- <sup>169</sup> Wei,Y., Walyz , D.A., Rao,N. , Drummond,R.J. , Rosemberg, S., and Chapmann ,H.A. “ Identification of the urokinase receptor as an adhesion receptor for vitronectin” . *J.Biol. Chem.* (1994), **269**, 32380-32388
- <sup>170</sup> Fazioli, F., Resnati , M., Sidenius , N., Higashimoto , Y., Appella , E., Blasi , F. “ A urokinase-sensitive region of the human urokinase receptor is responsable for its chemiotactic activity”.*Embo J.*, (1997) , **16(24)**, 7279-7286.
- <sup>171</sup> Resnati , M., Gutinger , M., Valcaniarica , S., Sidenius , N., Blasi , F., Fazioli , F. “ Proteolytic cleavage of the urokinase receptor subbstituities for the agonist-induced chetactic effect ” .*Embo J.*,(1996), **15 (7)** , 1572-1582.

## CONCLUSIONI

Molti antagonisti, ma solo pochi agonisti sono stati sviluppati come ligandi per il sistema VEGF soprattutto mediante l'uso delle librerie fagiche. Questa discrepanza può essere in parte spiegata dal fatto che gli antagonisti sono inibitori delle interazioni proteina-proteine e le librerie fagiche sono capaci di selezionare le sequenze peptidiche che riconoscono gli *hot spots* proteici, sebbene i requisiti strutturali per l'inibizione non sono state ancora del tutto chiariti. Questo, infatti, potrebbe precludere la possibilità di ottimizzare queste molecole per il possibile uso terapeutico.

Lo sviluppo di antagonisti delle integrine sono, invece, un esempio di come è utile l'approccio di *design peptidico* mediante le relazioni struttura-attività<sup>186</sup>. Le integrine, un'enorme famiglia di recettori proteici, non sono coinvolte solo nel cancro e da questo deriva l'importanza di ottenere elevata selettività. Lo studio degli antagonisti naturali potrebbe essere un modo per progettare degli inibitori più selettivi. Queste molecole potrebbero diventare dei validi agenti terapeutici, anche se c'è ancora molto scetticismo da parte delle aziende farmaceutiche riguardo l'uso dei peptidi come farmaci. Inoltre, i peptidi presentano caratteristiche e procedure sintetiche note da tempo ormai, possibilità di modulare facilmente le loro proprietà e le conformazioni mediante la sostituzione dei residui amminoacidici e di studiare con molta facilità le relazioni struttura-attività. Tutto ciò fa sì che l'uso dei peptidi nella

“*drug discovery*” sia molto molto utile. Se c’è bisogno di un farmaco che abbia come bersaglio le interazioni proteina-proteina, le molecole di natura peptidica sono ancora di prima scelta. L’uso dei peptidi consente di capire le interazioni con il target a livello molecolare, portando al raggiungimento di un *lead compound*, che può essere poi ottimizzato e diventare un farmaco somministrabile oralmente. Questa è una valida alternativa all’approccio completamente random<sup>187</sup>.

L’angiogenesi ha un ruolo rilevante in molte patologie di grosso impatto sociale; infatti c’è grosso interesse nel ricercare qualcosa in grado di modulare questo fenomeno farmacologicamente. Stando alle statistiche dell’ultimo biennio, almeno 184 milioni di pazienti dei Paesi sviluppati (Europa e Nord America) potrebbero trarre beneficio dalle terapie anti-angiogeniche e 310 milioni di persone da quelle pro-angiogeniche. Ad oggi, più di 200 aziende biotecnologiche e la maggior parte delle compagnie farmaceutiche, hanno l’obiettivo di sviluppare nuovi farmaci che agiscono sul processo di angiogenesi ed è stato messo in evidenza che le ricerche in questo campo sono anche ben finanziate a livello economico. Moltissime proteine sono coinvolte nella regolazione dell’angiogenesi ed in particolare il VEGF e le integrine sono implicate nei momenti cruciali. In modo interessante è stato riportato che le integrine sono legate a diversi fattori di crescita come EGF, PDGF e FGF<sup>188</sup> ed è stata osservata anche un’interazione con MMP-2<sup>189</sup>.



Recentemente poi, è stata notata una correlazione tra VEGF e  $\alpha_v\beta_3$ <sup>190</sup>; l'attivazione di questo recettore regola la produzione di VEGF nelle cellule tumorali esprimenti l'integrina. Questi dati suggeriscono che la combinazione di molecole che hanno come target più di un sistema può essere efficace nel bloccare la neoangiogenesi. Molto recentemente Mizukami e collaboratori<sup>191</sup> hanno mostrato come sia importante che il target farmacologico sia più di un sistema (strategia di combinazione), dimostrando che le cellule cancerose nel cancro del colon-retto possono compensare il blocco di un solo fattore. Un grande punto di forza è oggi indirizzare le ricerche verso antagonisti angiogenici. La maggior applicazione è come farmaci anti-tumorali, ma possono trovare applicazione anche in molte altre patologie. È universalmente riconosciuto che non ci sono stati grossi passi avanti nella ricerca di attivatori dell'angiogenesi. Le ricerche si sono focalizzate sull'uso clinico di fattori di crescita ricombinanti come il VEGF. In questi trials clinici, il fattore VEGF ha mostrato molti effetti collaterali, come ad esempio un'incontrollata neovascolarizzazione e edema linfatico, precludendo il suo uso nelle ischemie di diverso tipo<sup>192</sup>. Una valida alternativa potrebbe essere l'uso di attivatori a più basso peso molecolare, come piccoli peptidi con un ben noto meccanismo d'azione. A causa della ridotta complessità molecolare potrebbero essere dei buoni candidati come *lead compound* per farmaci pro-angiogenici più sicuri.

Un'altra applicazione dei peptidi bioattivi consiste nel loro uso come *tools* biochimici; sono molto più stabili e meno costosi rispetto a proteine intere o anticorpi. Inoltre, grazie alla loro facilità di derivatizzazione e il loro specifico riconoscimento, possono essere sfruttati per individuare la risposta biologica, per capire i *pathway* molecolari, per visualizzare gli specifici target.

I peptidi possono anche essere impiegati a scopo diagnostico grazie alle loro proprietà chimico-fisiche<sup>193</sup>. Il VEGF radiomarcato può essere usato per vedere tumori del tratto gastro-intestinale e le metastasi, in cui sono espressi i recettori per tale fattore<sup>194</sup>. Avere degli esami per immagine dell'angiogenesi tumorale potrebbe essere utilissimo per vedere anche tutta la rete vascolare tumorale, ma, sfortunatamente, le cellule endoteliali vascolari sono numericamente molte di meno rispetto a quelle cancerose<sup>195</sup>. Gli agenti molecolari necessari per ottenere immagini dell'angiogenesi devono perciò legare i target con alta affinità e specificità ed essere rilevabili a basse concentrazioni<sup>196</sup>. La capacità di vedere attraverso le immagini la formazione di nuovi vasi, basata sull'overespressione dei recettori per il VEGF è fondamentale negli individui colpiti da ischemia, in quanto si possono sviluppare degli appropriati interventi terapeutici per aiutarli.

A conclusione di quanto sviscerato lungo tutto il discorso, si può affermare che i peptidi possono essere ampiamente usati come regolatori dell'angiogenesi. La progettazione di nuove entità chimiche basate su un

design razionale potrebbe in un prossimo futuro aiutare a capire i meccanismi responsabili degli effetti biologici, della selettività e della loro potenza nello stimolare od inibire l'angiogenesi. Lo sviluppo di molecole commerciabili, anche se non peptidiche, in grado di mimare i gruppi farmacoforici individuati attraverso l'uso dei peptidi, sarà oggetto di intense ricerche nel prossimo futuro e ciò potrebbe riservarci dei ragguardevoli risultati.

# BIBLIOGRAFIA

---

- <sup>1</sup> Carmeliet, P. "Angiogenesis in health and disease". *Nat. Med.* (2003), **9**, 653-660.
- <sup>2</sup> Hanahan, D., Folkman, J. "Patterns and emergine mechanisms of the angiogenic switch durino tumorigenesis". *Cell* (1996), **86**, 353-364.
- <sup>3</sup> Carmeliet, P., Jain, R. K. "Angiogenesis in cancer and other diseases". *Nature* (2000), **407**, 249-257.
- <sup>4</sup> Yancopoulos, G. D., Davis, S., Gale, N. W., Rudge, J. S., Wiegand, S. J., Holash, J. "Vascular-specific growth factors and blood vessel formation". *Nature* (2000), **407**, 242-248.
- <sup>5</sup> Bussolino, F., Mantovani, A., Persico, G. "Molecular mechanisms of blood vessels formation". *TIBS* (1998), **22**, 251-256.
- <sup>6</sup> Fidler, I. J. "Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. Clowes memorial award lecture". *Cancer Res.* (1990), **50**, 6130-6138.
- <sup>7</sup> Fidler, I. J., Kripke, M. L. "Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor". *Science* (1997), **197**, 893-895.
- <sup>8</sup> Poste, G., Fidler, I. J. "The pathogenesis of cancer metastasis". *Nature* (1980), **283**, 139-146.
- <sup>9</sup> Gimbrone, M. A. jr, Cotran, R. S., Leapman, S. B., Folkman, J. "tumor growth and neovascularization: an experimental model using rabbit cornea". *J. Natl. Cancer Inst.* (1974), **452**, 413-427.
- <sup>10</sup> Folkman, J. "Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease". *Nat. Med.* (1995), **1**, 27-31.
- <sup>11</sup> Bergers, G., Benjamin, L. E. "Tumorigenesis and the angiogenic switch". *Nat. Rev. Cancer* (2003), **3**, 401-410.
- <sup>12</sup> Ruoslahti, E. "Specialization of tumour vasculature". *Nat. Rev. Cancer* (2002), **2**, 83-90.
- <sup>13</sup> Featherstone, J., Griffiths, S. "From the analyst's couch. Drugs that target angiogenesis". *Nat. Rev. Drug Discov.* (2002), **1**, 413-414.
- <sup>14</sup> Jain, R. K., Carmeliet, P. F. "Vessels of death or life". *Sci. Am.* (2001), **285**, 38-45.
- <sup>186</sup> D'Andrea, L. D., Del Gatto, A., Pedone, C., Benedetti, E. "Peptide-based molecules in angiogenesis". *Chem. Biol. Drug Des.* (2006), **67**, 115-126.
- <sup>187</sup> Zartler, E. R., Shapiro, M. J. "Fragonomics: fragment-based drug discovery". *Curr. Opin. Chem. Biol.* (2005), **9**, 366-370.
- <sup>188</sup> Yamada, K. M., Even-Ram, S. "Integrin regulation of growth factor receptors". *Nat. Cell Biol.* (2002), **4**, E75-E76.
- <sup>189</sup> 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. "Localization of matrix metallo-proteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin  $\alpha_v\beta_3$ ". *Cell* (1996), **85**, 683-693.

- 
- <sup>190</sup> De, S., Razorenova, O., McCabe, N. P., O'Toole, T., Qin, J., Byzova, T. V. "VEGF-integrin interplay controls tumor growth and vascularization". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2005), **102**, 7589-7594.
- <sup>191</sup> Mizukami, Y., Jo, W. S., Duerr, E. M., Gala, M., Li, J., Zhang, X., Zimmer, M. A., Ilipoulos, O., Zukerberg, L. R., Kohgo, Y., Lynch, M. P., Rueda, B. R., Chung, D. C. "Induction of interleukin-8 preserves the angiogenic response in HIF-1 alpha-deficient colon cancer cells". *Nat. Med.* (2005), **11**, 992-997.
- <sup>192</sup> Weis, S. M., Cheresh, D. A. "Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability". *Nature* (2005), **437**, 497-504.
- <sup>193</sup> Liu, S., Edwards, D. S. "99m Tc-labeled small peptides as diagnostic radiopharmaceuticals". *Chem. Rev.* (1999), **99**, 2235-2268.
- <sup>194</sup> Li, S., Peck-Radosavljevic, M., Kienast, O., Preitfellner, J., Hamilton, G., Kurtaran, A., Pirich, C., Angelberger, P., Dudczak, R. "Imaging gastrointestinal tumours using vascular endothelial growth factor-165 (VEGF-165) receptor scintigraphy". *Ann. Oncol.* (2003), **14**, 1274-1277.
- <sup>195</sup> Haubner, R., Wester, H. J. "Radiolabeled tracers for imaging of tumor angiogenesis and evaluation of anti-angiogenic therapies". *Curr. Pharm. Des.* (2004), **10**, 1439-1455.
- <sup>196</sup> Miller, J. C., Pien, H. H., Sahani, D., Sorensen, a. G., Thrall, J. H. "Imaging angiogenesis: applications and potential for drug development". *J. Natl. Cancer Inst.* (2005), **97**, 172-187.

# INDICE

<b>Angiogenesi</b>	pag. 1
<b>Angiogenesi tumorale</b>	pag. 4
<b>Capitolo 1</b>	pag. 9
Le integrine	pag. 10
1. Studi strutturali	pag. 15
2. Impostazione della ricerca	pag. 20
3. Parte sperimentale	pag. 36
4. Risultati e discussione	pag. 53
5. Conclusioni	pag. 59
6. Bibliografia	pag. 61
<b>Capitolo 2</b>	pag. 66
1. La biologia del VEGF e i suoi recettori	pag. 67
2. Funzione del VEGF nei tumori	pag. 74
3. La biologia del PlGF	pag. 78
4. Studi strutturali	pag. 82
5. Impostazione della ricerca	pag. 86
6. Parte sperimentale	pag. 93
7. Risultati e discussione	pag. 98
8. Conclusioni	pag. 100
9. Bibliografia	pag. 103
<b>Capitolo 3</b>	pag. 109
1. Progressione tumorale	pag. 110
2. Migrazione cellulare	pag. 113
3. Sistema uPA	pag. 117
4. Impostazione della ricerca	pag. 123
5. Parte sperimentale	pag. 126

6. Parte farmacologia	pag. 130
7. Risultati e discussione	pag. 135
8. Conclusioni	pag. 139
9. Bibliografia	pag. 141
<b>Conclusioni</b>	pag. 143
<b>Bibliografia</b>	pag. 148
<b>Indice</b>	pag. 150