



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA NUMERO	102006901437498
Data Deposito	31/07/2006
Data Pubblicazione	31/01/2008

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	K		

Titolo

SEQUENZA PEPTIDICA ISOLATA NEL DOMINIO II TIPO- IMMUNOGLOBULINA DEL
RECETTORE 1 DEL FATTORE DI CRESCITA DELL'ENDOTELIO VASCOLARE E LEGANTE
L'INTEGRINA A5B1 AD ATTIVITA' PROANGIOGENICA.

Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo:
 "SEQUENZA PEPTIDICA ISOLATA NEL DOMINIO II TIPO-
 IMMUNOGLOBULINA DEL RECETTORE 1 DEL FATTORE DI
 CRESCITA DELL'ENDOTELIO VASCOLARE E LEGANTE
 L'INTEGRINA $\alpha 5 \beta 1$ AD ATTIVITÀ PROANGIOGENICA"; a nome
 della PROVINCIA ITALIANA DELLA CONGREGAZIONE DEI
 FIGLI DELL'IMMACOLATA CONCEZIONE - ISTITUTO DERMOPA-
 TICO DELL'IMMACOLATA (62%), di nazionalità italiana,
 con sede a 00167 Roma, Via dei Monti di Creta 104;
 UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "LA SAPIENZA" (25%),
 di nazionalità italiana, con sede a 00185 Roma,
 Piazzale Aldo Moro 5 e CONSIGLIO NAZIONALE DELLE
 RICERCHE (13%), di nazionalità italiana, con sede a
 00185 Roma, Piazzale Aldo Moro 7.

Inventori: D'ATRI Stefania, FAILLA Cristina Maria,
 LACAL Pedro Miguel, ORECCHIA Angela, ZAMBRUNO Giovan-
 na, TRAMONTANO Anna, SORO Simonetta, MOREA Veronica.

La presente invenzione si riferisce al campo della
 biologia molecolare ed in particolare ad una sequenza
 peptidica isolata nel dominio II tipo-Ig del VEGFR-1
 e capace di legare ed attivare l'integrina $\alpha 5 \beta 1$. Più
 precisamente, la sequenza peptidica isolata, oggetto
 della presente invenzione, può essere
 vantaggiosamente impiegata per la preparazione di

agenti farmacologici ad attività proangiogenica impiegabili nel trattamento delle patologie che traggono beneficio dalla formazione di nuovi vasi.

Come noto, il VEGFR-1 è un recettore con attività di tirosina chinasi per specifici membri della famiglia di fattori di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF).

Il VEGFR-1 è strettamente correlato ai recettori tirosin chinasi-Fms/Kit/fattore di crescita derivato dalle piastrine di tipo 3, ma viene classificato, insieme a VEGFR-2 e VEGFR-3 in una classe distinta di recettori, la cui regione extra cellulare è composta da sette domini tipo-immunoglobulina (Ig). Il dominio II tipo-Ig comprende la regione implicata nel legame di VEGF e del fattore di crescita della placenta (PlGF). I domini III e IV tipo-Ig sono coinvolti nel legame dell'eparina ed il dominio III è anche responsabile dell'interazione con la neuropilina-1.

Nei vasi VEGFR-1 è espresso principalmente dalle cellule endoteliali e muscolari lisce, ma anche da altri tipi cellulari della linea emopoietica e dalle cellule del muscolo scheletrico.

Il tipo di segnale trasdotto nella cellula dal VEGFR-1, a seguito del legame con il fattore di crescita, non è ben noto. Lo studio degli animali "knockout" ha

dimostrato che il VEGFR-1 è essenziale per lo sviluppo ed il differenziamento del sistema vascolare embrionale e la sua inattivazione determina un aumento nel numero degli emangioblasti e una disorganizzazione dei vasi. Topi portatori di una delezione omozigote del dominio chinasi intracellulare del VEGFR-1 hanno mostrato uno sviluppo corretto dei vasi suggerendo che la regione extracellulare del VEGFR-1 è sufficiente per supportare l'angiogenesi embrionale.

L'attività tirosina chinasi del VEGFR-1 è essenziale per la segnalazione chemiotattica indotta da VEGF e PlGF nei monociti-macrofagi e nelle cellule staminali emopoietiche.

Studi condotti sul PlGF, un ligando specifico del VEGFR-1, hanno dimostrato che questo recettore è coinvolto nell'angiogenesi patologica nei soggetti adulti. Più recentemente è stato dimostrato che i fattori di crescita che legano il VEGFR-1 possono indurre la transfosforilazione di VEGFR-2 e che la stimolazione dell'angiogenesi può essere ottenuta mediante la formazione di eterodimeri VEGFR-1/VEGFR-2.

Oltre alla forma transmembrana di VEGFR-1, le cellule endoteliali (EC) producono una forma solubile del

recettore, dovuta a splicing alternativo. Il VEGFR-1 solubile (sVEGFR-1) comprende i primi 6 domini tipo-Ig della regione extracellulare del recettore ed una specifica sequenza di 30 aminoacidi al C-terminale. Entrambe le isoforme legano il VEGF con alta affinità ed il sVEGFR-1 può agire da potente antagonista per il segnale del VEGF sequestrando il fattore di crescita ed inibendo la sua interazione con la forma transmembrana del recettore.

Recentemente, è stato dimostrato che il sVEGFR-1 è secreto dalle EC in coltura e diventa parte della matrice extracellulare. Il sVEGFR-1 è, inoltre, capace di mediare l'adesione delle EC mediante il legame diretto con l'integrina $\alpha 5 \beta 1$.

Il ruolo chiave di suddetta integrina, nella vasculogenesi e nell'angiogenesi, è stato sottolineato dal fenotipo vascolare difettivo del topo knockout per la subunità $\alpha 5$ e dalla capacità di anticorpi anti integrina o peptidi antagonisti di bloccare l'angiogenesi sia in vitro che in vivo.

Come noto, il legame delle integrine con i loro ligandi generalmente avviene attraverso il riconoscimento di una sequenza aminoacidica corta e numerose integrine, compresa $\alpha 5 \beta 1$, legano i peptidi contenenti il motivo RGD (arginina-glicina-acido

aspartico) anche se sono stati identificati altri motivi, specificatamente riconosciuti dalle integrine.

Sulla base di quanto noto allo stato della tecnica, e partendo dal presupposto che la sequenza di sVEGFR-1 non contiene motivi RGD, gli inventori della presente invenzione hanno focalizzato la loro intenzione sulla identificazione dei determinanti molecolari responsabili della sua interazione con l'integrina $\alpha 5\beta 1$.

Gli esperimenti condotti, qui di seguito dettagliatamente descritti, hanno dapprima evidenziato che un anticorpo contro un peptide mappante sul dominio II tipo-Ig impedisce il legame del VEGFR-1 con l'integrina $\alpha 5\beta 1$. Quindi, gli sforzi sperimentali si sono focalizzati su questo dominio II che supporta sia l'adesione delle EC che il legame diretto con l'integrina $\alpha 5\beta 1$.

Successivamente, sulla base delle informazioni disponibili nelle strutture sperimentalmente determinate di questo dominio II, sono stati elaborati 12 peptidi putativamente mimanti l'intera superficie del dominio, i quali sono stati successivamente testati per l'interazione con l'integrina.

Di questi 12 peptidi uno è risultato capace sia di supportare l'adesione delle EC, che di competere con l'adesione delle EC al sVEGFR-1 e con la migrazione delle EC verso il sVEGFR-1. Inoltre, detto peptide ha dimostrato una attività proangiogenica in vitro. La sostituzione con l'aminoacido alanina ha, infine, permesso di identificare i residui del peptide responsabili della sua attività biologica, che rappresentano un motivo legante l'integrina $\alpha 5\beta 1$.

Costituisce pertanto oggetto della presente invenzione un peptide di sequenza NYLTHRQ avente esso stesso effetto proangiogenico nonché il peptide di sequenza YLXHR in cui X può essere qualsiasi aminoacido, ma preferibilmente è Thr/T.

Ulteriormente costituisce oggetto della presente invenzione l'uso dei suddetti peptidi per la preparazione di un medicamento, in particolare impiegabile nel trattamento delle condizioni cliniche che necessitano dell'induzione dell'angiogenesi, quali: ipertensione, patologie vascolari periferiche diabete-dipendenti, ferita, ischemia del muscolo, del cervello, del rene, dell'intestino, del cuore o degli arti, patologie vascolari occlusive o ostruttive gravi, patologie vascolari periferiche, ischemia pericardica, infarto del miocardio, patologie a

carico delle arterie coronariche, patologie vascolari cerebrali e patologie vascolari viscerali.

Ulteriori caratteristiche della presente invenzione risulteranno più chiare dalla descrizione dettagliata, corredata dagli esperimenti, che segue con riferimento alle figure allegate in cui:

La figura 1A mostra i risultati di un saggio di legame su fase solida dell'integrina $\alpha 5 \beta 1$ al sVEGFR-1 in presenza/assenza di anticorpi diretti contro specifiche regioni proteiche del sVEGFR-1, la proteina legata è evidenziata da misura colorimetrica (Assorbanza a 405nm).

La figura 1B mostra i risultati di un saggio di adesione di EC incubate su piastre ricoperte con sVEGFR-1, sottoforma di una proteina di fusione con il dominio Fc delle immunoglobuline umane (VEGFR-1/Fc), con il dominio II tipo-Ig ricombinante, con fibronectina (FN) o albumina serica bovina (BSA), seguito da misura colorimetrica (Assorbanza a 540nm).

La figura 1C mostra i risultati di un saggio di legame su fase solida dell'integrina $\alpha 5 \beta 1$ su piastre ricoperte con il dominio II tipo-Ig ricombinante o con VEGFR-1/Fc, seguito da misura colorimetrica (Assorbanza a 405nm).

La figura 2A mostra i risultati di un saggio di adesione di EC su piastre ricoperte con VEGFR-1/Fc o fibronectina, in presenza dei 12 peptidi, il risultato è espresso come percentuale dell'adesione delle EC sugli stessi substrati in assenza dei peptidi.

La figura 2B mostra i risultati di un saggio di adesione delle EC su piastre ricoperte con i peptidi 4, 5, 7, 12, 1 e RGD, seguito da misura colorimetrica (Assorbanza a 540nm).

La figura 3A mostra i risultati di un saggio di adesione di EC su piastre ricoperte con peptide 12 in presenza di EDTA, EGTA, un anticorpo bloccante anti- $\alpha 5\beta 1$ e anti- $\alpha 6$, seguito da misura colorimetrica (Assorbanza a 540nm).

La figura 3B mostra, nei riquadri a-e, i risultati di una immunocolorazione per l'integrina $\alpha 5\beta 1$ di EC incubate con biglie magnetiche ricoperte con il peptide RGE (a), il peptide RGD (b, d), il peptide 12 (c, e).

La figura 3C mostra i risultati di un saggio di migrazione di EC indotta da VEGFR-1/Fc o fibronectina (FN) in presenza del peptide 1 o 12, il risultato è espresso come percentuale di inibizione della migrazione osservata in assenza dei peptidi.

La figura 4 mostra i risultati mostra un saggio di formazione di tubuli endoteliali in presenza o assenza di peptide 1, peptide 12, diverse concentrazioni di VEGF (40 e 100 nM), combinazioni di VEGF con peptide 1 o 12 o VEGFR-1/Fc.

La figura 5A mostra l'effetto della sostituzione con alanina dei diversi residui aminoacidici del peptide 12 sull'adesione cellulare.

La figura 5B mostra l'effetto della sostituzione con alanina dei diversi residui aminoacidici del peptide 12 sul legame dell'integrina $\alpha 5 \beta 1$.

La figura 6 mostra la localizzazione dei peptidi 4,5,7 e 12 nella struttura del dominio II.

La figura 7 mostra l'effetto del peptide 12 o del peptide RGD sulla proliferazione delle EC indotta da bFGF e VEGF.

1. Effetto dell'anticorpo capace di riconoscere un peptide la cui sequenza è presente nel dominio II di VEGFR-1 sull'interazione sVEGFR-1/integrina.

Essendo noto che l'integrina $\alpha 5 \beta 1$ lega la proteina VEGFR-1/Fc, e avendo precedentemente dimostrato, gli stessi inventori, che un anticorpo, capace di riconoscere un peptide la cui sequenza è presente nel dominio II di VEGFR-1, compete con l'adesione delle EC al sVEGFR-1 mediata dall'integrina $\alpha 5 \beta 1$; era

analizzato l'effetto dello stesso anticorpo (capace di riconoscere un peptide la cui sequenza è presente nel dominio II di VEGFR-1) sull'interazione diretta sVEGFR-1/integrina.

In un saggio di legame su fase solida, piastre ricoperte con VEGFR-1/Fc erano trattate con diversi anticorpi anti-VEGFR-1 e incubate con l'integrina $\alpha 5\beta 1$ purificata, la quantità di integrina legata era quantificata mediante incubazione con un anticorpo anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ e identificazione colorimetrica di quest'ultimo. L'anticorpo capace di riconoscere un peptide la cui sequenza è presente nel dominio II di VEGFR-1 (dII Ab) inibiva completamente il legame dell'integrina $\alpha 5\beta 1$ con il VEGFR-1. Un anticorpo policlonale (Flt-1 H225) diretto contro un frammento proteico comprendente i residui aminoacidici da 1 a 225 del VEGFR-1, non inibiva l'interazione VEGFR-1/integrina. Come aspettato, l'inibizione non era ottenuta con un anticorpo (Flt-1 C17) diretto contro il dominio intracellulare di VEGFR-1 (Figura 1A).

2. Costruzione di una proteina ricombinante corrispondente al dominio II di VEGFR-1

Sulla base dei limiti del dominio osservati nelle strutture sperimentalmente determinate disponibili dal PDB database (www.rcsb.org), era costruita una

proteina ricombinante corrispondente al dominio II di VEGFR-1 (residui 129-229). La proteina era prodotta nella linea cellulare di insetto SF9 usando il sistema di espressione mediato da Baculovirus e purificata mediante cromatografia per affinità. La proteina ricombinante aveva il peso molecolare aspettato su SDS-PAGE ed era riconosciuta da un anticorpo policlonale anti-VEGFR-1.

Il cDNA di VEGFR-1 intero utilizzato per la produzione del dominio II ricombinante era gentilmente fornito dal Dr. Shibuya (Institute of Medical Science, University of Tokyo, Japan). Il cDNA era modificato nel laboratorio del Dr. Ballmer-Hofer (Paul-Scherrer Institut, Villigen-PSI, Switzerland) per introdurre un sito Kpn I seguito da una sequenza Kozak, un codone di inizio all'estremità 5', un sito Bsi WI seguito da una HA Tag e un codone di stop all'estremità 3'. Il polylinker del vettore pFastBac 1 di Baculovirus (Invitrogen-Life Technologies) era sostituito con un linker contenente un sito Kpn I e un sito Bsi WI insieme a una His tag. Per prima cosa il cDNA del VEGFR-1 intero era clonato nel vettore pFastBac 1 usando i siti Kpn I e Bsi WI. Per costruire il dominio II ricombinante, la sequenza di segnale del VEGFR-1 era amplificata mediante PCR usando gli oligonucleotidi: 5'-GCGCGGATCCGGTACCGC-3'

e 5'-GTGATGCGTACGTGAACCTGAACTAGATCCTGTG-3' e clonata nel vettore pFastBac modificato. Poi il dominio II era amplificato con gli oligonucleotidi 5'-GTGATGCGTACGAGTGATACAGGTAGACCTTTC-3' e 5'-GTGATGCGTACGTCCGATTGTATTGGTTTGTCGATG-3'. Il frammento da PCR era clonato nel vettore pFastBac modificato che portava la sequenza di segnale di VEGFR-1. Il Baculovirus ricombinante era ottenuto usando il sistema Bac-to-Bac (Invitrogen-Life Technologies). La linea cellulare SF9 (*Spodoptera frugiperda*) era comprata dalla Invitrogen, e mantenuta in coltura a 27°C in mezzo TC100 (Invitrogen-Life Technologies) contenente 10% di siero fetale di vitello inattivato al calore. Le cellule SF9 infettate erano coltivate in mezzo SF-900 privo di siero (Invitrogen-Life Technologies). Per l'espressione delle proteine, le cellule SF9 erano cresciute fino al 60% di confluenza e infettate con il virus ricombinante. 48 ore dopo l'infezione le cellule erano raccolte e la proteina ricombinante era purificata mediante cromatografia per affinità usando il kit di purificazione B-PER His Fusion Protein purification kit (PIERCE, Rockford, IL).

3. Abilità del dominio II di supportare l'adesione delle EC

Le cellule endoteliali umane derivate dalla vena ombelicale (HUVEC) erano usate per esaminare l'abilità del dominio II di supportare l'adesione delle EC in piastre coperte con la proteina ricombinante. Le HUVEC erano incubate su piastre ricoperte con VEGFR-1/Fc, con il dominio II (dII) ricombinante, con fibronectina (FN) o albumina serica bovina (BSA). La proteina VEGFR-1/Fc e la fibronectina erano usate come controlli positivi e la BSA come controllo negativo. Le cellule adese erano colorate ed era misurata l'assorbanza. Il dII ricombinante supportava l'adesione delle HUVEC (figura 1B) in modo analogo al VEGFR-1/Fc.

Il legame diretto della integrina $\alpha 5\beta 1$ al dominio era stato determinato anche con saggio di legame su fase solida. L'integrina $\alpha 5\beta 1$ purificata era aggiunta a piastre ricoperte con dII o con VEGFR-1/Fc come controllo positivo e l'integrina legata era misurata usando un anticorpo anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ e un saggio colorimetrico. Come mostrato in figura 1C una quantità simile di integrina interagiva con il VEGFR-1/Fc e con il dII ricombinante.

4. Scelta di peptidi sul dominio II di VEGFR-1.

Per identificare una regione del dominio II potenzialmente interagente con l'integrina $\alpha 5\beta 1$, erano impiegate le strutture del dominio determinate

con cristallografia a raggi X e disponibili nella banca dati PDB. Le strutture tridimensionali erano esaminate per identificare le sequenze aminoacidiche contigue sulla superficie della proteina che potessero mimare tutte le regione esposte del dominio II.

Dodici (12) peptidi (tabella I), erano elaborati in base ai seguenti criteri:

1. localizzazione sulla superficie della proteina, e alta accessibilità al solvente su tutta la superficie;
2. corrispondenza con diverse regioni della superficie del dominio, coprendola quasi interamente;
3. lunghezza inferiore a 15 residui;
4. presenza di una elevata percentuale di residui polari e, quando possibile, residui carichi a valori fisiologici di pH (come Asp, Glu, Lys e Arg);
5. presenza di una bassa percentuale di residui idrofobici (come Leu, Val, Ile, Met, Phe e Trp) per minimizzare i problemi di solubilità;
6. assenza di residui di Cys responsabili della formazione di peptidi dimerici;

TABELLA 1

Peptide	Sequenza	Regione di VEGFR-1
P1	GRPFVEMYSE	132-141
P2	YSEIPEIIH	139-147
P3	ETTHMTEGR	144-152
P4	TEGRELVIPARVT	149-161
P5	NITVTLKKFPL	164-174
P6	KKFPLD	170-175
P7	KFPLDTLIPDG	171-181
P8	DTLIPDGKRRI	175-185
P9	DSRKGFIISNAT	187-198
P10	TYKEIGL	198-204
P11	EATVNGHLYKT	208-218
P12	NYLTHRQ	219-225
sP12	LTONYRH	-

Per soddisfare il punto 6 il residuo Cys 158 di VEGFR-1 era sostituito con Ala nel peptide 4.

In aggiunta, per vedere se la presenza di due residui idrofobici ramificati uno vicino all'altro potesse causare problemi di solubilità, i residui adiacenti Ile 145 e 146 erano entrambi sostituiti con Thr nel peptide 3. La sequenza del peptide 5 era già stata pubblicata e riportata come inibitore angiogenico senza legare il VEGF e inibire il legame del VEGF con i suoi recettori.

5. Test sulla capacità dei 12 peptidi di inibire l'adesione mediata da $\alpha 5\beta 1$ delle EC a VEGFR-1

Per testare la capacità dei 12 peptidi scelti di inibire l'adesione delle EC a VEGFR-1 mediata

dall'integrina $\alpha 5 \beta 1$, ogni peptide era aggiunto ad una sospensione di HUVEC prima di piastrarle su piastre coperte con VEGFR-1/Fc o fibronectina (FN). I dati erano indicati come % di adesione, calcolata relativamente al numero di cellule attaccate sullo stesso substrato in assenza dei peptidi. Come mostrato in figura 2A i peptidi 4, 5, 7, e 12 effettivamente bloccavano l'adesione delle EC a VEGFR-1/Fc. Inoltre, i peptidi 4, 7 e 12 erano capaci di inibire parzialmente l'adesione delle EC alla fibronectina, suggerendo una interferenza con il sito di legame della integrina $\alpha 5 \beta 1$. La localizzazione dei peptidi 4, 7 e 12 sulla struttura del dominio II di VEGFR-1 è mostrata in figura 6 (rappresentazione a nastro della traccia del carbonio determinata mediante cristallografia a raggi X): il peptide 4 si sovrappone quasi interamente alla catena B all'interno del primo (ABED) foglietto beta; il peptide 12 è localizzato sul foglietto beta opposto all'interno della catena G al C-terminale del dominio; il peptide 7 comprende parte della catena C, della catena C' e dell'ansa C'D che connette i due foglietti beta uno all'altro.

6. Effetti dei peptidi sull'adesione delle EC

Per stabilire se i quattro peptidi in grado di inibire l'adesione delle EC al VEGFR-1 supportavano direttamente l'adesione delle EC, i peptidi erano legati covalentemente alle piastre e le HUVEC erano incubate sulle piastre per 1 ora. Il peptide 1 era usato come controllo negativo e il peptide RGD come controllo positivo. L'adesione cellulare non specifica era misurata mediante l'assorbanza nelle piastre ricoperte con BSA. In questo saggio solo il peptide 12 induceva l'adesione delle EC (Figura 2B).

7. Interferenza dei cationi divalenti sulla adesione delle EC al peptide 12.

Il legame delle proteine della matrice extracellulare alle integrine è generalmente dipendente dalla presenza di cationi divalenti, allora si era investigata l'interferenza dei cationi divalenti con l'adesione delle EC al peptide 12. Il peptide 12 o la BSA, come controllo di adesione non-specifica, erano attaccati su piastre e le HUVEC aggiunte in presenza di agenti chelanti (EDTA o EGTA). Come mostrato nella figura 3A il trattamento con EDTA o EGTA aboliva completamente l'adesione delle EC indicando che l'adesione delle EC al peptide 12 richiede cationi divalenti.

Per dimostrare che l'integrina $\alpha 5\beta 1$ era la proteina che mediava l'adesione delle EC al peptide 12, era testato l'effetto di anticorpi bloccanti l'integrina. Le HUVEC erano preincubate con un anticorpo contro l'integrina $\alpha 5\beta 1$ o contro la subunità integrinica $\alpha 6$ e lasciate aderire sulle piastre coperte con il peptide 12 o BSA. La preincubazione delle HUVEC con l'anticorpo contro l'integrina $\alpha 5\beta 1$ inibiva l'adesione delle EC al peptide 12, mentre l'anticorpo contro $\alpha 6$ era inefficace (Figura 3A).

8. Induzione dell'aggregazione dell'integrina $\alpha 5\beta 1$ dopo il legame al peptide 12.

Sapendo che le integrine non legate sono diffusamente distribuite sulla membrana cellulare, ma dopo l'occupazione e l'attivazione si aggregano in strutture distinte denominate contatti focali e contatti ECM, si era esaminato se il peptide 12 fosse in grado di indurre l'aggregazione dell'integrina $\alpha 5\beta 1$ dopo il legame. EC aderenti erano incubate con biglie magnetiche ricoperte con peptide 12, peptide RGD o peptide RGE rispettivamente come controlli positivo e negativo, e immunocolorate con un anticorpo per l'integrina $\alpha 5\beta 1$. Una distinta colorazione per l'integrina $\alpha 5\beta 1$ era osservata intorno alle biglie ricoperte con il peptide 12

(figura 3B, riquadri c, e) analoga a quella osservata per le biglie ricoperte con il peptide RGD (figure 3B, riquadri b, d). Nessuna biglia ricoperta con il peptide RGE aderiva alle HUVEC in questo saggio (figura 3B, riquadro a).

9. Effetti del peptide 12 sulla migrazione e sulla proliferazione cellulare

Per investigare la capacità del peptide 12 di influenzare la migrazione delle EC indotta da VEGFR-1/Fc, un processo mediato dall'integrina $\alpha 5 \beta 1$, le HUVEC erano preincubate con il peptide 12 e il peptide 1 e poste in camere di Boyden per analizzare la migrazione indotta da VEGFR-1/Fc o fibronectina (FN). I dati rappresentano la media di 14 campi microscopici e sono indicati come % di inibizione rispetto alla migrazione osservata in assenza dei peptidi. Come mostrato in figura 3C il peptide 12 annullava completamente la risposta migratoria indotta da VEGFR-1/Fc mentre la preincubazione delle cellule con un peptide di controllo era del tutto inefficace. L'effetto inibitorio del peptide 12 sulla migrazione cellulare era specifica per il VEGFR-1, mentre non si osservava inibizione significativa della migrazione indotta da fibronectina. Inoltre, il peptide 12 non influenzava l'effetto mitogenico

esercitato sulle HUVEC sia da bFGF che da VEGF in un saggio di proliferazione a lungo termine (Figura 7).

10. Effetti del peptide 12 sulla formazione di strutture vascolari.

Era testata la capacità del peptide 12 di indurre la formazione di tubuli di EC. Le HUVEC erano piastrate su piastre da 24 pozzetti precedentemente coperte con una miscela di gel di collagene di tipo I, in assenza o presenza di 500 µg/ml di peptide 12 o peptide 1. Un secondo strato di gel di collagene di tipo I era posto sulle cellule adese.

Dove indicato, in assenza o presenza dei peptidi, erano aggiunte, al mezzo di coltura, differenti concentrazioni di VEGF (40 o 100 nM) o 20 µg/ml di proteina VEGFR-1/Fc.

La capacità del peptide 12 di indurre la formazione di tubuli di EC su matrice di collagene I si riscontrava simile a quella del VEGF (figura 4). Inoltre, quando il VEGF era usato a bassa concentrazione (40nM) il trattamento simultaneo con il peptide 12 aumentava la formazione di tubuli indotta da VEGF. Al contrario, il peptide 1 non induceva la formazione di tubuli né aumentava l'effetto del VEGF. L'aggiunta di VEGFR-1/Fc, che regola negativamente la funzione del VEGF attraverso

il sequestro del fattore di crescita e conseguente inibizione della sua interazione con l'isoforma tirosina chinasi del recettore, era usato come controllo negativo e portava ad una forte inibizione della formazione di tubuli.

In presenza di VEGFR-1/Fc, il peptide 12 manteneva parzialmente la sua capacità di indurre la formazione di strutture vascolari suggerendo che il suo meccanismo d'azione sia indipendente da quello del VEGF (dati non mostrati).

11. Identificazione dei residui del peptide 12 coinvolti nel legame con l'integrina.

Per determinare quali residui del peptide 12 avessero un ruolo nell'adesione con l'integrina $\alpha 5 \beta 1$, erano sintetizzati 10 diversi peptidi, ciascuno avente una singola o doppia sostituzione con l'aminoacido alanina (Ala). Questi peptidi erano testati per la loro capacità di sostenere direttamente l'adesione cellulare. I 10 peptidi erano legati covalentemente a piastre, ed erano anche testati un peptide "scrambled" in cui la successione aminoacidica del peptide 12 era modificata (vedi tabella 1) (sP12) e BSA, come controlli negativi. Le HUVEC erano piastrate e lasciate aderire. I risultati erano espressi come percentuale dell'adesione cellulare

osservata sulle piastre ricoperte con il peptide 12 originale. Come mostrato nella figura 5A, la sostituzione solo di 3 residui con Ala influenzava la capacità del peptide 12 di supportare l'adesione delle EC: la sostituzione della Tyr220 con Ala aboliva completamente l'adesione cellulare al peptide, la mutazione di Leu221 a Ala risultava in una parziale riduzione della adesione cellulare, comparabile a quella osservata nel peptide mutante His223 a Ala. Questi risultati dimostravano che i residui più importanti nel mediare il legame delle cellule sono Tyr 220, Leu 221 e His223. Veniva anche valutato il legame diretto dell'integrina $\alpha 5 \beta 1$ con i peptidi mutati mediante un saggio di legame su fase solida. L'integrina $\alpha 5 \beta 1$ purificata era aggiunta alle piastre ricoperte con i diversi peptidi e l'integrina legata veniva misurata utilizzando un anticorpo anti-integrina $\alpha 5 \beta 1$ e un saggio colorimetrico. I dati erano espressi come percentuale di proteina legata osservata sulle piastre coperte col peptide 12 originale.

Come mostrato in figura 5B, la Tyr220 è il residuo più critico per il legame dell'integrina e sia Leu221 che His223 sono importanti nel supportare l'interazione proteina/proteina. Differentemente

dall'adesione cellulare, anche Arg224 gioca un ruolo nel mediare il legame dell'integrina con il peptide 12.

Il peptide 12 è localizzato sull'estremità C terminale (C-ter) della catena G del dominio II (figura 6). I suoi residui sono accessibili al solvente, ad eccezione della Tyr222 la cui catena laterale era stretta nel dominio "core", centrale. La catena laterale del Tyr220 risulta parzialmente schermata dal solvente dal gruppo carbossilato della catena laterale del Glu144. L'ultimo residuo è, comunque, altamente flessibile, come dimostrato dagli alti valori del fattore B in tutte le strutture cristalline del dominio disponibili, e dalla variabilità conformazionale osservata nelle strutture NMR. Pertanto, si assumeva che Tyr220 era disponibile per il legame con il ligando.

12. Specificità del residuo YLXHR

Per verificare la specificità del residuo YLXHR (X = qualsiasi residuo) nelle proteine extracellulari, si erano ricercate le proteine umane annotate dal consorzio UniProtKB/Swissprot per la sua ricorrenza. Il motivo si riscontrava in 20 (0.2%) delle 8,687 proteine analizzate, nessuna delle quali era extracellulare, suggerendo che questa sequenza di

legame per l'integrina $\alpha 5 \beta 1$ è peculiare del sVEGFR-1. Al contrario, il motivo RGD si ritrovava nel 7.9% di tutte le proteine umane ed era un più frequente nelle proteine extracellulari (9.7%).

Come si evince dagli esperimenti fin qui dettagliatamente descritti, le ricerche condotte hanno portato a numerosi importanti risultati, qui di seguito riassunti per completezza di descrizione:

- le due isoforme, da splicing alternativo, del recettore VEGFR-1 giocano un ruolo biologico differente durante l'angiogenesi. In particolare, l'isoforma transmembranale è recettore tirosina chinasi, mentre la forma solubile agisce sia da molecola della matrice extracellulare, coinvolta nella adesione e migrazione cellulare, che da regolatore negativo dell'attività di segnale di VEGF.
- un anticorpo contro un peptide la cui sequenza è presente nel dominio II di VEGFR-1 inibisce l'adesione cellulare su superfici coperte con sVEGFR-1 e blocca l'interazione con l'integrina $\alpha 5 \beta 1$.
- un frammento di VEGFR-1, corrispondente al dominio II, lega direttamente l'integrina $\alpha 5 \beta 1$ ed è sufficiente a supportare l'adesione delle cellule endoteliali (EC).

- Dei 12 peptidi sintetizzati, mimanti regioni selezionate della superficie del recettore, 4 (peptidi 4,5,7 e 12) inibiscono l'adesione cellulare a sVEGFR-1.
- Il peptide 12 è l'unico che supporta direttamente l'adesione delle EC, e quindi interagisce direttamente con l'integrina $\alpha 5\beta 1$. Infatti, il legame EC/peptide 12 è sensibile ai cationi divalenti e viene inibito dagli anticorpi anti-integrina $\alpha 5\beta 1$.
- L'interazione diretta tra il peptide 12 e l'integrina porta all'attivazione dell'integrina stessa.
- Il peptide 12 inibisce la migrazione cellulare indotta da VEGFR-1, processo che è mediato dalla integrina $\alpha 5\beta 1$.
- Il peptide 12 è capace di indurre in vitro la formazione di strutture vascolari (tubuli), suggerendo che sVEGFR-1, il cui dominio II contiene la sequenza del peptide 12 è implicato nella formazione dei vasi e nella adesione e migrazione delle cellule endoteliali ed è un modulatore positivo della morfogenesi dei vasi.
- Tre residui del peptide 12, Tyr220, Leu221 e His223 se mutati, riducono significativamente la capacità del peptide di sostenere l'adesione cellulare.

- Il motivo avente sequenza YLXHR rappresenta la regione, nel dominio II del recettore VEGFR-1 strettamente necessaria per l'interazione con l'integrina.

- Suddetta sequenza non interagisce con i fattori di crescita, VEGF e PlGF, quindi, sebbene i residui aminoacidici responsabili per il legame dei fattori di crescita e dell'integrina siano adiacenti, le due interazioni potrebbero essere mutuamente esclusive.

Risulta evidente, pertanto che il chiarirsi degli effetti biologici di VEGFR-1 sulle cellule endoteliali e l'identificazione di molecole capaci di interferire le differenti funzioni di questo recettore possano essere la base per lo sviluppo di prodotti terapeutici più efficaci.

Infatti la sequenza genica YLXHR potrebbe essere efficacemente impiegata come agente proangiogenico, nel trattamento delle condizioni cliniche che necessitano dell'induzione dell'angiogenesi.

Suddette condizioni cliniche sono comprese nel gruppo consistente di: ipertensione, patologie vascolari periferiche diabete-dipendenti, ferita, ischemia del muscolo, del cervello, del rene, dell'intestino, del cuore o degli arti, patologie vascolari occlusive o ostruttive gravi, patologie vascolari periferiche,

ischemia pericardica, infarto del miocardio, patologie a carico delle arterie coronariche, patologie vascolari cerebrali e patologie vascolari viscerali.

BIBLIOGRAFIA

- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. & Bourne, P. E. (2000) *Nucleic Acids Res* 28, 235-242.
- Carmeliet, P., Moons, L., Luttun, A., Vincenti, V., Compernelle, V., De Mol, M., Wu, Y., Bono, F., Devy, L., Beck, H., Scholz, D., Acker, T. & DiPalma, T. (2001) *Nat Med* 7, 575-583.
- Christinger, H. W., Fuh, G., de Vos, A. M. & Wiesmann, C. (2004) *J Biol Chem* 279, 10382-10388.
- Davis-Smyth, T., Presta, L. G. & Ferrara, N. (1998) *J Biol Chem* 273, 3216-3222.
- Dayringer, H. E., Tramontano, A., Spang, S. R. & Fletterick, R. J. (1986) *J Mol Graph* 4, 82-87.
- Folkman, J. (1995) *N Engl J Med* 333, 1757-1763.
- Fong, G., Rossant, J., Gertsenstein, M. & Breitman, M. (1995) *Nature* 376, 66-70.
- Fong, G., Zhang, L., Bryce, D. & Peng, J. (1999) *Development* 126, 3015-3025.

- Francis, S. E., Goh, K. L., Hodiwalla-Dilke, K., Bader, B. L., Stark, M., Davidson, D. & Hynes, R. O. (2002) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 927-33.
- Fuh, G., Garcia, K. C. & de Vos, A. M. (2000) *J Biol Chem* 275, 26690-26695.
- Germani, A., Di Carlo, A., Mangoni, A., Straino, S., Giacinti, C., Turrini, P., Turrini, P., Biglioli, P. & Capogrossi, M. C. (2003) *Am J Pathol* 163, 1417-28.
- Gimbrone, M. A. (1976) *Prog Hemost Thromb* 3, 1-28.
- Hiratsuka, S., Minowa, O., Kuno, J., Noda, T. & Shibuya, M. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 9349-9354.
- Humphries, M. J. (2000) *Biochem Soc Trans* 28, 311-229.
- Inoue, T., Kibata, K., Suzuki, M., Nakamura, S., Motoda, R. & Orita, K. (2000) *FEBS Lett* 469, 14-18.
- Ishida, A., Murray, J., Saito, Y., Kanthou, C., Benzakour, O., Shibuya, M. & Wijelath, E. (2001) *J Cell Physiol* 188, 359-68.

- Kearney, J. B., Kappas, N. C., Ellerstrom, C., DiPaola, F. W. & Bautch, V. L. (2004) *Blood* 103, 4527-4535.
- Kendall, R. L. & Thomas, K. A. (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 10705-10709.
- Kim, S., Bell, K., Maus, S. A. & Varner, J. A. (2000) *Am J Pathol* 156, 1345-1362.
- Koivunen, E., Gay, D. A. & Ruoslahti, E. (1993) *J Biol Chem* 268, 20205-20210.
- Koivunen, E., Wang, B. & Ruoslahti, E. (1994) *J Cell Biol* 124, 373-80.
- Korpelainen, E. & Alitalo, K. (1998) *Curr Opin Cell Biol* 10, 159-164.
- Leahy, D. J., Aukhil, I. & Erickson, H. P. (1996) *Cell* 84, 155-164.
- Leu, S., Lam, S. & Lau, L. (2002) *J Biol Chem* 277, 46248-55.
- Mould, A. P., Burrows, L. & Humphries, M. J. (1998) *J Biol Chem* 273, 25664-25672.
- O'Donovan, C., Apweiler, R. & Bairoch, A. (2001) *Trends Biotechnol* 19, 178-181.
- Orecchia, A., Lacal, P. M., Schietroma, C., Morea, V., Zambruno, G. & Failla, C. M. (2003) *J Cell Sci* 116, 3479-3489.

- Roberts, D. M., Kearney, J. B., Johnson, J. H.,
Rosenberg, M. P., Kumar, R. & Bautch, V. L. (2004)
Am J Pathol 164, 1531-1535.
- Sawano, A., Iwai, S., Sakurai, Y., Ito, M.,
Shitara, K., Nakahata, T. & Shibuya, M. (2001)
Blood 97, 785-791.
- Shibuya, M., Yamaguchi, S., Yamane, A., Ikeda,
T., Tojo, A., Matsushime, H. & Sato, M. (1990)
Oncogene 8, 519-527.
- Shimaoka, M. & Springer, T. A. (2003) *Nat Rev*
Drug Discov 2, 703-716.
- Tan, D. C. W., Manjunatha Kini, R., Jois, S. D.
S., Lim, D. K. F., Xin, L. & Ge, R. (2001) *FEBS*
Lett 494, 150-156.
- Wang, H. & Keiser, J. (1998) *Circ Res* 83, 832-
840.
- Wiesmann, C., Fuh, G., Christinger, H. W.,
Eigenbrot, C., Wells, J. A. & de Vos, A. M. (1997)
Cell 91, 695-704.
- Yamada, K. M. & Geiger, B. (1997) *Curr Opin Cell*
Biol 9, 76-85.



Maurizio SARPI
della
Struttura VERBALE

RIVENDICAZIONI

1. Peptide di sequenza YLXHR avente effetto proangiogenico caratterizzato dal fatto che x è scelto nel gruppo consistente di: Ala/A, Arg/R, Asn/N, Asp/D, Cys/C, Glu/E, Gln/Q, Gly/G, Ile/I, Leu/L, Lys/K, Met/M, Phe/F, Pro/P, Ser/S, Thr/T, Trp/W, Tyr, Y, Val/V.
2. Peptide di sequenza YLxHR avente effetto proangiogenico secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto che x è Thr/T.
3. Peptide di sequenza NYLTHRQ avente effetto proangiogenico.
4. Uso del peptide secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3 per la preparazione di un medicamento.
5. Uso del peptide secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3 per la preparazione di un medicamento impiegabile per il trattamento delle condizioni cliniche che necessitano dell'induzione dell'angiogenesi.
6. Uso secondo la rivendicazione 5 caratterizzato dal fatto che le condizioni cliniche che necessitano dell'induzione dell'angiogenesi sono scelte nel gruppo consistente di ipertensione, patologie vascolari periferiche diabete-dipendenti, ferita,

ischemia del muscolo, del cervello, del rene,
dell'intestino, del cuore o degli arti, patologie
vascolari occlusive o ostruttive gravi, patologie
vascolari periferiche, ischemia pericardica, infarto
del miocardio, patologie a carico delle arterie
coronariche, patologie vascolari cerebrali e
patologie vascolari viscerali.

Per i Richiedenti

Il Rappresentante



Maurizio SARPI
dello
Studio FERRARO

RM 2006 A 000409

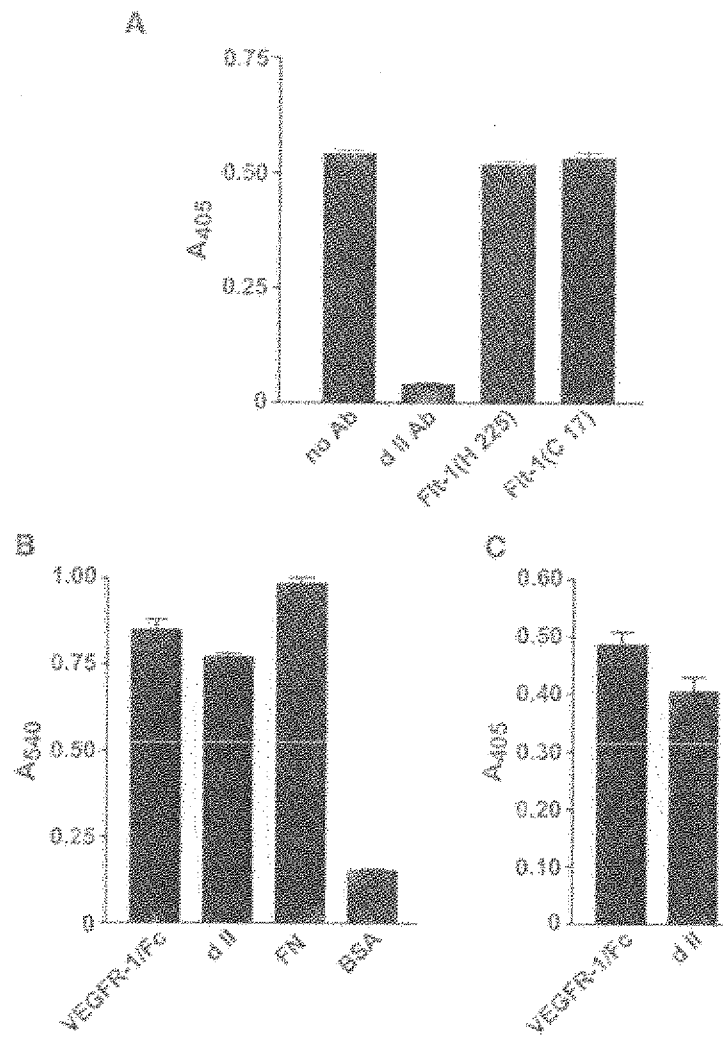


FIGURA 1



Moisés SARPI
Socio Titular

RM 2006 A 000409

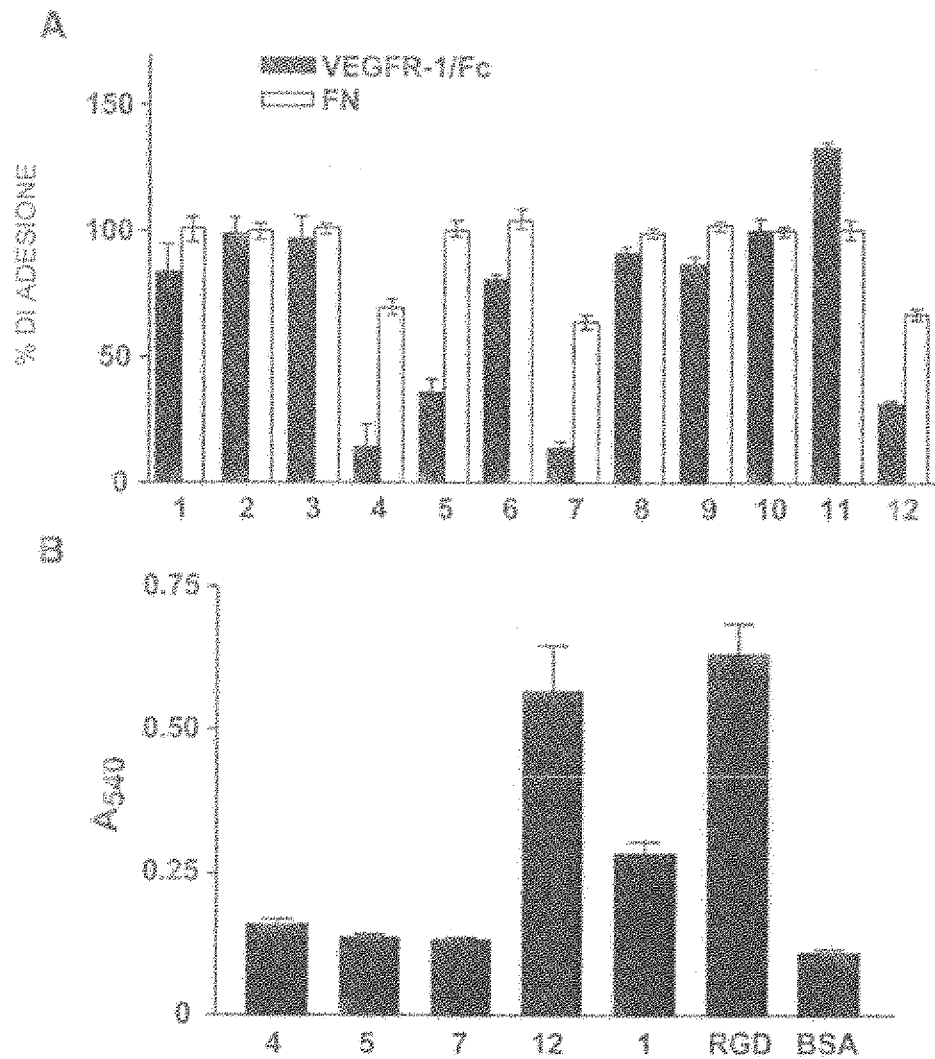
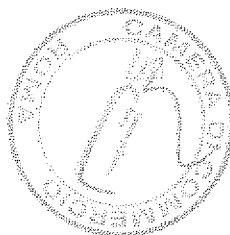


FIGURA 2



Mod. 1015 SARPI
Studio FERRARIO

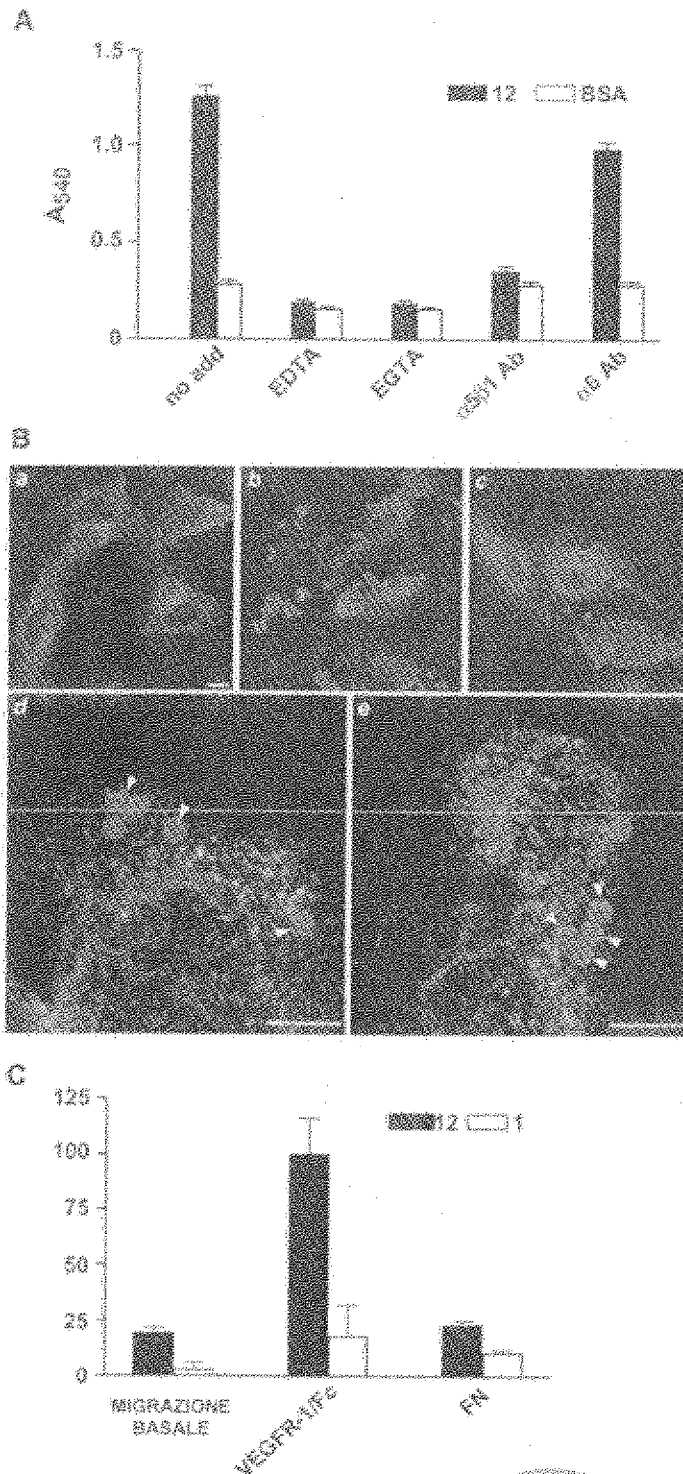


FIGURA 3



MANUSCRIPT
RECEIVED
2006-08-24
[Signature]

RM 2006 A 000409

4/6

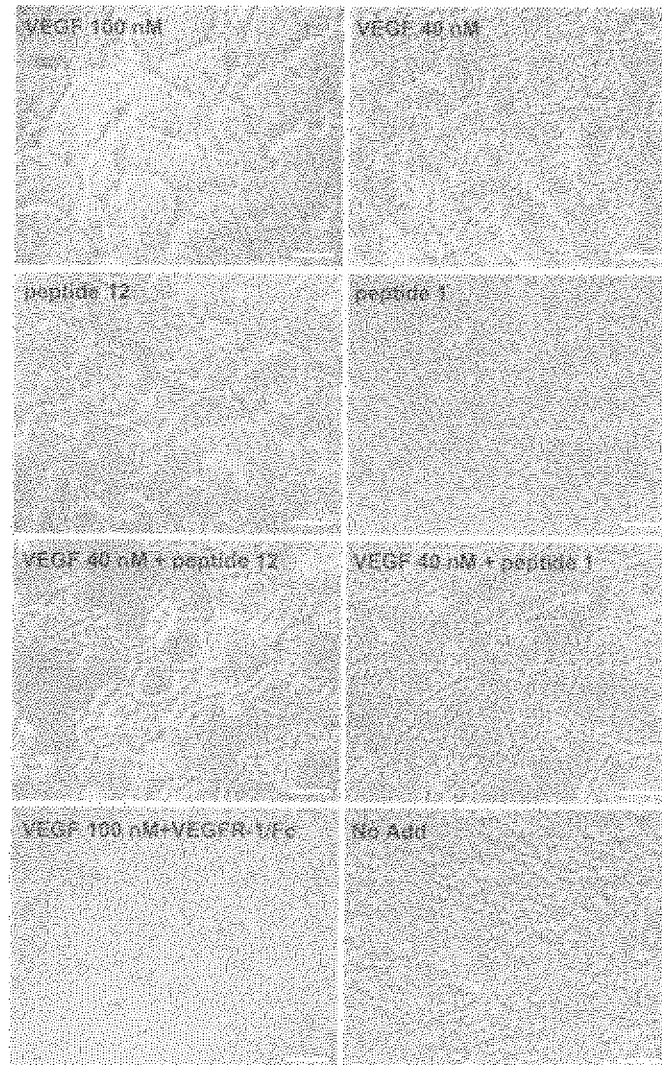
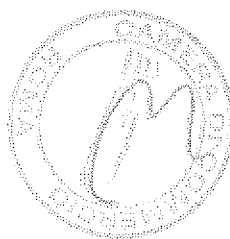


FIGURA 4



MARCO CARPI
Studio LEGALCO

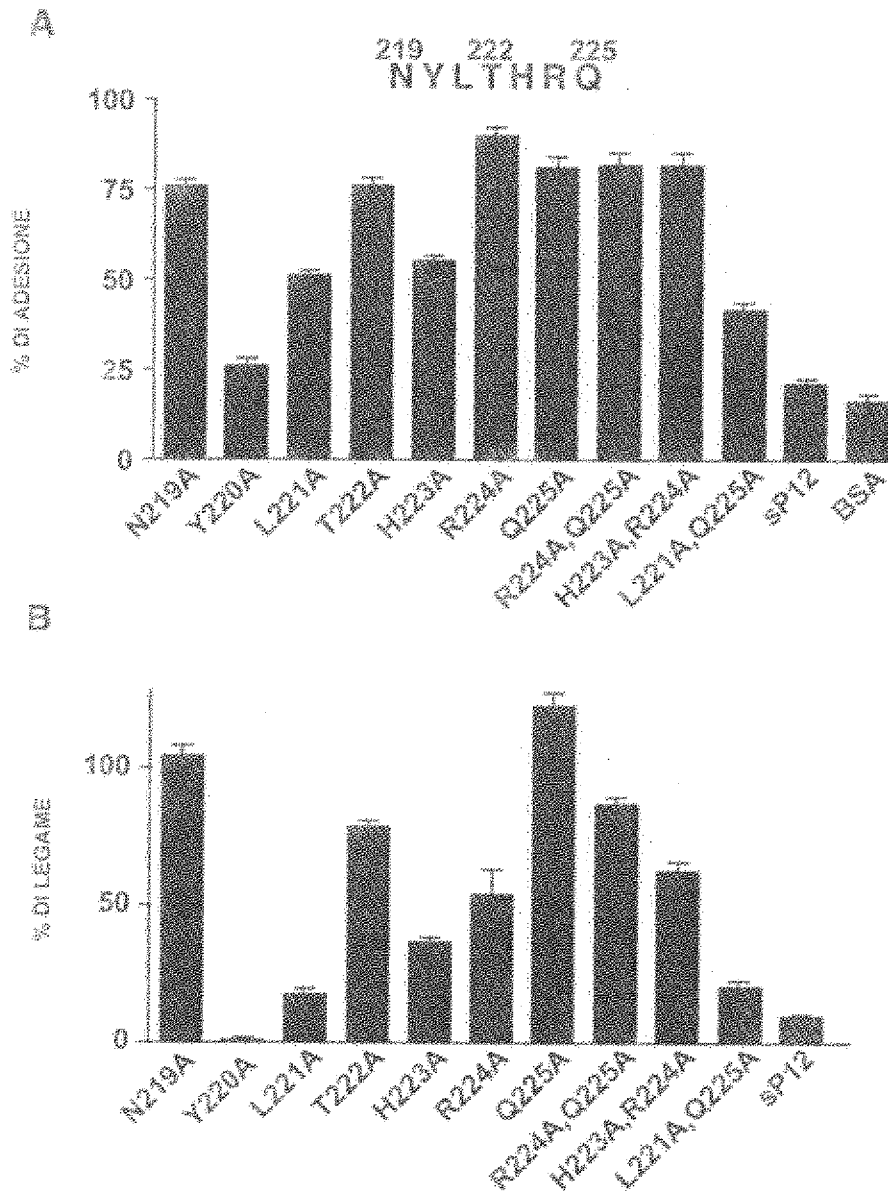
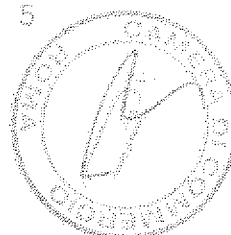


FIGURA 5



MAURIZIO SARPI
SILVIO VERMARIO

6/6

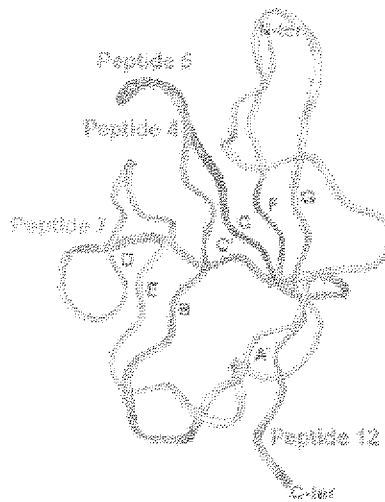


FIGURA 6

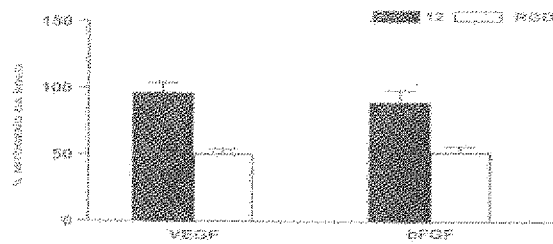
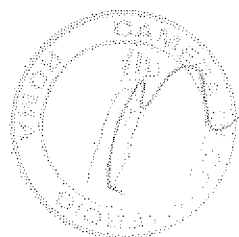


FIGURA 7



Assinatura do(a) *[Signature]*
 Nome do(a) *[Signature]*
 Data *[Signature]*