

LIST OF TABLES

CHAPTER 2

Table I: Members of the integrin supergene family categorized according to their ECM ligands, amino acid recognition sites, and function.....	2
Table II: Integrins in cancer progression.....	10
Table III: Integrin antagonists tested in clinical trials for cancer therapy.....	14
Table IV: Synopsis of integrin antagonists.....	15

CHAPTER 4

Table V: Adherent cell lines used.....	30
Table VI: Primary antibodies.....	33
Table VII: Secondary antibodies.....	33

CHAPTER 5

Table VIII: Flow cytometry results.....	35
Table IX: Results of solid-phase receptor-binding assays performed on Compounds 31, 13 and 15...38	
Table X: Effect of Compound 31 on EPC and HUVEC cells adhesion to vitronectin or fibronectin.....	39
Table XI: Cell line and substrate specific IC ₂₀ of Compound 31.....	41
Table XII: Effect of Compound 31 on human cancer cells adhesion to vitronectin or fibronectin.....	43

LIST OF FIGURES

CHAPTER 2

Figure 1: How a universal integrin receptor heterocomplex looks like.....	1
Figure 2: Signaling pathways initiated by integrins ad focal contacts.....	3
Figure 3: General mechanisms of angiogenesis and lymphangiogenesis.....	5
Figure 4: Development of the mammalian lymphatic vasculature.....	6
Figure 5: Integrin-mediated survival versus apoptotic pathways.....	9
Figure 6: Integrin-growth factor and integrin-cytokine receptor crosstalk.....	12
Figure 7: Examples of integrin antagonists.....	18
Figure 8: Schematic of changes in tumor vasculature during the course of anti-angiogenic therapy.....	19
Figure 9: Doxorubicin-peptide conjugate with formaldehyde space linker.....	20
Figure 10: Cyclic RGD pseudopentapeptides.....	23
Figure 11: CAM assay and murine assay with ST1646.....	24
Figure 12: Anti-tumor and anti-angiogenic activity of ST1646.....	25
Figure 13: Compound 31.....	25
Figure 14: Chemical structure of Compound 13 and 15.....	26

CHAPTER 5

Figure 15: FACS analysis performed on the panel of human cell lines.....	36
Figure 16: Immunofluorescence performed on the panel of human cell lines.....	37
Figure 17: Graphical analysis of adhesion assays performed with Compound 31 on EPCs and HUVECs plated on vitronectin or fibronectin.....	40
Figure 18: Wound healing assay on EPCs.....	41
Figure 19: Graphical analysis of adhesion assays performed with Compound 31 on the cancer cell panel.....	44
Figure 20: Wound healing assay on T98G cells.....	45
Figure 21: Actin remodelling test: fluorescence microscopy analysis.....	47
Figure 22: Actin remodelling test: confocal microscopy analysis.....	48
Figure 23: Biological activity of Compounds 15 or 13 on the cell panel.....	50
Figure 24: Biological activity of functionalized gold nanoparticles on PC-3 and MDA-MB-231 cells.....	52

GLOSSARY OF ABBREVIATIONS

ATCC	American type culture collection
bFGF	basic fibroblast growth factor
BSA	Bovine serum albumine
CAM	Chorioallantoic membrane
CD	Cluster of differentiation
CXCR4	CXC Chemokine receptor 4
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
ECGF	Endothelial cell growth factor
ECM	Extracellular matrix
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMT	Epithelial-to-mesenchymal transition
ERBB2	Erythroblastosis oncogene B2
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FAK	Focal adhesion kinase
FBS	Fetal bovine serum
FGF	Fibroblast growth factor
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
GTP	Guanosine-5'-triphosphate
HGF	Hepatocyte growth factor
IC	Inhibitory concentration
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IF	Immunofluorescence
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
ILK	Integrin-linked kinase
IMD	Integrin-mediated death
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
LAP	Latency-associated peptide
LFA	Leucocyte function-associated antigen
LYVE-1	CD44 homologue lymphatic vessel hyaluronan receptor 1
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MET	N-Methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine HOS transforming gene

MFI	Mean fluorescence Intensity
MGMT	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
MMP	Matrix metalloprotein
Net-1	Neuroepithelioma transforming gene 1
NF-κB	Nuclear factor-kappaB
NIR	Near infrared
NO	Nitric oxide
O/N	Overnight
PAF	Paraformaldehyde
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Platelet derived growth factor
PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule
PEG	Polyethylene glycol
PET	Positron emission tomography
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKA	Protein kinase A
PKC	Protein Kinase C
PML	Progressive multifocal leukoencephalopathy
PROX	Prospero homeobox protein
rcf	Relative centrifugal force
RGD	Arginine-Glycine-Aspartate
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Revolutions per minute
RT	Room temperature
SD	Standard deviation
SDF	Stromal cell-derived factor
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SFK	Src family kinase
siRNA	Small interfering RNA
SPION	Superparamagnetic iron oxide nanoparticle
SPR	Surface plasmon resonance
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TAM	Tumor associated macrophage
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor necrosis factor
tTF	Truncated tissue Factor
U/ml	Units per ml
uPAR	Uroplasinogen activator receptor
v/v	Volume for volume
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1

VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
w/v	Weight for volume

1. SOMMARIO

Le integrine sono proteine eterodimeriche di membrana che appartengono ad una famiglia di recettori di adesione cellulare evolutivamente antica e con un ruolo molto importante in processi fisiologici e patologici, come la neo-angiogenesi e la disseminazione tumorale. Le integrine sono costituite da un dominio extracellulare, da una regione transmembrana e da una corta coda citoplasmatica. In particolare, il dominio citoplasmatico regola in modo cruciale l'attività e la funzione delle integrine. Esso controlla lo stato di affinità delle integrine e la loro attività di ponte con la matrice extracellulare, ma promuove anche le risposte cellulari sollecitate dal legame con ligandi extracellulari. Le integrine sono infatti attivate tramite il legame con i loro ligandi extracellulari (via di segnalazione *inside-out*) e possono assumere diverse conformazioni a seconda delle risposte individuali. Questo porta alla cosiddetta via di segnalazione *outside-in*, che attiva eventi intracellulari complessi e cellula-specifici, a seconda degli altri *partner* molecolari coinvolti. Dal momento che le integrine mancano di attività kinasica intrinseca, le integrine attivate formano dei complessi con altre proteine di segnalazione ed adattatrici del citoplasma, compresi recettori dei fattori di crescita, recettori per le citochine e molecole di trasporto. La formazione di questi complessi dà origine a strutture macromolecolari dinamiche in generale chiamate complessi di adesione. L'attivazione delle integrine promuove infine eventi di segnalazione che causano la disseminazione, la migrazione, la sopravvivenza e la proliferazione cellulare. Il contemporaneo reclutamento di integrine e fattori di crescita ottimizza la resa globale di attivazione tramite l'integrazione tra diversi *pathway* di segnalazione. Ancora, questa interazione cooperativa gioca un ruolo fondamentale nella regolazione di adesione, migrazione, invasione e sopravvivenza delle cellule tumorali, così come nell'omeostasi dell'angiogenesi endoteliale. Il dialogo fra integrine e recettori dei fattori di crescita o delle citochine ha una funzione importante anche nella biologia di diversi tipi cellulari, con particolare riferimento a migrazione, proliferazione e sopravvivenza endoteliale.

Pertanto, le integrine agiscono da ponti molecolari fra la matrice extracellulare ed il citoscheletro, esplicando funzioni meccaniche ed influenzando la biologia della cellula tramite complessi *pathway* di segnalazione intracellulari. Le integrine sono in grado di mediare l'adesione alle cellule del sistema immunitario, a seconda delle corte sequenze peptidiche riconosciute dalle integrine sui loro ligandi. A questo proposito, è interessante notare che lo stesso ligando può essere legato da diverse integrine a causa della loro ridondanza. Come precedentemente sottolineato, le integrine giocano un ruolo importante nella motilità e nell'invasione cellulare, nel rimodellamento della matrice extracellulare tramite la ri-localizzazione delle proteasi, nella crescita cellulare tramite un controllo proliferativo adesione-dipendente, nella segnalazione cellulare grazie al *cross-talk* con i recettori dei fattori di crescita e delle citochine.

Numerosi dati confermano che alcune integrine endoteliali, come le integrine $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ e $\alpha 5\beta 1$ (che riconoscono la sequenza RGD), sono molto importanti nella regolazione di crescita, sopravvivenza e migrazione cellulare durante l'angiogenesi e la linfangiogenesi. In particolare, le integrine αv giocano ruoli chiave nello sviluppo embrionale dei vasi sanguigni della placenta e del cervello, mentre le integrine che legano la fibronectina sono essenziali per l'angiogenesi durante lo sviluppo. Inoltre, è stato dimostrato che un certo numero di integrine è altamente espresso in tumori umani metastatici. Le integrine sono in grado di promuovere migrazione, sopravvivenza ed invasione cellulare grazie alla loro capacità di degradare la

membrana basale tramite l'interazione con enzimi proteolitici (ad esempio le metalloproteasi). Le integrine possono anche aumentare la sopravvivenza cellulare o promuovere l'apoptosi a seconda dei diversi stimoli prodotti dal microambiente circostante. L'integrina $\alpha v\beta 3$ promuove l'invasione, la proliferazione e la sopravvivenza della cellula tumorale, unitamente alla transizione epitelio-mesenchimale. L'integrina $\alpha v\beta 3$ interagisce con il VEGFR nel melanoma, nel glioblastoma e sulle cellule endoteliali angiogeniche. Inoltre, essa media l'adesione delle cellule maligne alle piastrine o alle cellule endoteliali vascolari. L'integrina $\alpha v\beta 3$, assieme all'integrina $\alpha 5\beta 1$, è fortemente iper-espressa in alcuni tumori, ma è espressa in più basse quantità sugli epitelii adulti. Le integrine $\alpha v\beta 3$ ed $\alpha v\beta 5$ giocano anche ruoli importanti nel mantenimento delle cellule tumorali. L'integrina $\alpha 5\beta 1$ che lega la fibronectina, può accrescere l'invasività dei tumori solidi. L'integrina $\alpha v\beta 5$ è normalmente espressa dalle cellule epiteliali ma può contribuire a migrazione, proliferazione e sopravvivenza tumorale. L'integrina $\alpha v\beta 5$ è generalmente iper-espressa nelle cellule tumorali maligne, nelle cellule endoteliali angiogeniche all'interno del tumore e nelle cellule tumorali metastatiche di seno e pancreas. Le integrine espresse dalle cellule tumorali sono in grado di promuovere la metastatizzazione, l'invasione ed i movimenti delle cellule tumorali all'interno dei vasi sanguigni.

Come precedentemente anticipato, le integrine sono espresse da svariati tipi cellulari. Assieme con la potenzialità di interagire con i recettori di fattori di crescita e citochine, questa caratteristica sottolinea il fatto che le integrine sono potenzialmente degli interessanti bersagli terapeutici. Le molecole dirette contro le integrine potrebbero quindi essere in grado di inibire sia le cellule tumorali che le cellule ad esse associate, e parecchi metodi volti ad inibire le integrine sono stati attentamente studiati nell'ottica di trattare le patologie in cui le integrine sono attivamente coinvolte.

A parte gli anticorpi bloccanti, gli antagonisti delle integrine comprendono peptidi sintetici e peptidomimetici. I peptidi sintetici mimano la struttura dei ligandi naturali delle integrine. La più grande classe di peptidi sintetici sinora prodotta comprende i peptidi RGD, dal momento che la sequenza RGD è comunemente presente in numerose glicoproteine di membrana extracellulare. Le sequenze peptidiche con una conformazione rigida e le loro modificazioni chimiche sono in grado di aumentare l'affinità di legame e la biodisponibilità dei peptidi. D'altro lato, i peptidomimetici sono strutture sintetizzate chimicamente che mimano le funzioni e le strutture degli antagonisti 'biologici' delle integrine. I composti peptidomimetici in genere mostrano una più alta biodisponibilità e sono in grado di evitare la degradazione enzimatica.

Nel 2000 Belvisi e colleghi hanno studiato la struttura secondaria dei peptidomimetici e ha riportato la sintesi e l'analisi conformazionale di una serie di aminoacidi 1-aza-2-oxobicycloalcani. Questi *scaffold* azabicycloalcani, date le loro svariate proprietà mimetiche *reverse-turn*, possono restringere la sequenza RGD in diverse conformazioni in grado di fornire l'attività e la selettività richieste per bloccare le integrine e, inoltre, di aumentare la potenzialità di legame col ligando. Una piccola libreria di peptidomimetici ciclici RGD è stata quindi sintetizzata. Ancora, nel 2009 Manzoni e colleghi hanno pubblicato la funzionalizzazione dei precedentemente citati azabicycloalcani con catene laterali eteroalchiliche terminanti in un gruppo idrossile. Esso può essere facilmente convertito in altri più adatti gruppi funzionali o utilizzato direttamente per la coniugazione di diverse entità chimiche (applicazioni in diagnostica e terapia). Quindi, la funzionalizzazione ha permesso di generare ligandi ad alta affinità, potenzialmente attivi *per se* ma anche capaci di comportarsi come vettori intelligenti. Infine, sono state recentemente sintetizzate nanoparticelle d'oro coniugate in

superficie con il ligando ciclico RGD. Le nanoparticelle d'oro sono infatti il candidato ideale per l'*imaging* ottico, poiché non sono suscettibili al *photobleaching* e possono essere funzionalizzate in svariati modi.

Durante questo studio è stata testata la piccola libreria di peptidomimetici ciclici RGD da soli o coniugati con sonde per l'*imaging* o sulle nanoparticelle. È stato dimostrato che il principale target di queste molecole è l'integrina $\alpha v \beta 3$ tramite saggi su recettore isolato. L'espressione dell'integrina $\alpha v \beta 3$ è stata ulteriormente valutata in un pannello di cellule umane endoteliali e cancerose (da tumori solidi), al fine di scegliere i modelli cellulari più adatti per approfondire il ruolo biologico dei peptidomimetici. In particolare, è stata selezionata una molecola (il Composto 31) a causa della sua alta affinità per l'integrina $\alpha v \beta 3$. Questa molecola ha dimostrato di avere una forte attività anti-adesiva sia in cellule endoteliali vascolari sia in cellule tumorali, rendendo ipotizzabile un suo impiego in futuri studi *in vivo*. Dall'altro lato, il sostituito eteroalchilico del Composto 31 ha permesso la sua coniugazione con la fluoresceina, col fine di produrre molecole utili per l'*imaging* (Composti 13 e 15). È stato dimostrato che entrambi questi composti sono in grado di marcare le cellule endoteliali e le cellule tumorali esprimenti l'integrina $\alpha v \beta 3$ sulla loro superficie, senza provocare effetti citotossici. Questo risultato suggerisce fortemente il possibile ruolo dei composti ciclici RGD associati a fluorocromi nella diagnostica tumorale.

Infine, è stata messa a punto la funzionalizzazione delle nanoparticelle d'oro con lo *scaffold* ciclico RGD e la fluoresceina. È stato dimostrato che queste nanoparticelle d'oro colorano positivamente ed in modo molto specifico le cellule tumorali esprimenti l'integrina $\alpha v \beta 3$. Infatti, l'analisi in microscopia confocale delle cellule marcate con le nanoparticelle d'oro ha rivelato che il segnale prodotto dalla fluoresceina e quello prodotto dalla riflessione dell'oro combaciavano perfettamente ed erano localizzati vicino alle zone di adesione cellulare. Questi dati, in ultima analisi, hanno suggerito che l'internalizzazione delle nanoparticelle avviene nelle zone di membrana dove l'integrina $\alpha v \beta 3$ è principalmente espressa, e cioè nei punti di adesione focale. In conclusione, i risultati ottenuti durante questo studio tramite tipici test di biologia cellulare possono preparare la strada per una più profonda valutazione dei peptidomimetici ciclici RGD e dei loro derivati in biologia vascolare, nel trattamento del cancro (in associazione con chemioterapici noti) ed in diagnostica.

1. SUMMARY

Integrins are heterodimeric transmembrane proteins belonging to a family of cell adhesion receptors evolutionary old and that play pivotal roles in physiological and pathological processes, such as neo-angiogenesis and cancer spreading. Integrins are composed by an extracellular domain, a single transmembrane region and a short cytoplasmic tail. In particular, the cytoplasmic domain is crucial for the regulation of integrin activity and function. It controls the integrin affinity state and its ECM ligand-binding activity, but it also promotes cellular responses upon extracellular ligand binding. Integrins are in fact activated upon binding with their extracellular ligands (inside-out signalling) and may change different conformations according to individual variations. This leads to the so-called outside-in signalling, which activates complex and cell-specific signalling events depending on the other molecular partners involved. Given that integrins lack of intrinsic kinase activity, ligated integrins cluster with few signalling and adaptor proteins from the cytoplasm, including growth factor receptors, cytokine receptors and trafficking molecules. This clustering gives rise to dynamic macromolecular protein structures globally termed adhesion complexes. Integrin ligation finally promotes signalling events leading to cell spreading, migration, survival and proliferation. The concomitant engagement of integrins and growth factor receptors optimizes the global yield of the activation through the integration of different signalling pathways. Again, this cooperative signalling plays a pivotal role in the regulation of tumor cell adhesion, migration, invasion, survival and in the homeostasis of the angiogenic endothelium. The cross-talk between integrins and growth factors or cytokines receptors plays an important role also in the biology of several host cell types, with a particular focus on endothelial cell migration, proliferation and survival.

Therefore, integrins act as molecular bridges between the extracellular matrix and the cytoskeleton, displaying mechanical functions and affecting cell biology by means of complex intracellular signalling pathways. Integrins are able to mediate cell adhesion to immune cells, depending upon specific short peptide sequences recognized by integrins on their ligands. To this regard, it is noteworthy that the same ligand may be bound by different integrins because of their redundancy. As previously underlined, integrins play pivotal roles in traction for cell motility and invasion, in remodelling of the ECM by means of localization of proteases, in cell growth through adhesion-dependent control of proliferation, in cell signalling thanks to the cross-talk with growth factors and cytokine receptors.

Few data confirm that some endothelial integrins, such as the RGD sequence recognizing integrins $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ and $\alpha 5\beta 1$, are very important in the regulation of cell growth, survival and migration during angiogenesis and lymphangiogenesis. In particular, the αv integrins have key roles in embryonic development of blood vessels in placenta and brain, whereas fibronectin-binding integrins are essential for developmental angiogenesis. In addition, it has been demonstrated that a number of integrins is highly

expressed in human metastatic cancers. Integrins are able to promote migration, survival and invasion because of their ability to degrade basement membrane by interacting with proteolytic enzymes (e.g. metalloproteases). Integrins may either enhance cell survival or initiate apoptosis depending on environmental cues. Integrin $\alpha v\beta 3$ drive cancer cell invasion, proliferation, survival and also the EMT. Integrin $\alpha v\beta 3$ cross-talks with VEGFR in melanoma, glioblastoma and angiogenic endothelial cells. Moreover, it mediates the adhesion of malignant cells to platelets or to vascular endothelial cells. Integrin $\alpha v\beta 3$, together with integrin $\alpha 5\beta 1$, is highly up-regulated in some tumors but is expressed in low amounts in adult epithelia. Integrins $\alpha v\beta 3$ and $\alpha v\beta 5$ play important roles in promoting cancer cell biology as well. Moreover, the fibronectin-binding integrin $\alpha 5\beta 1$ may promote solid tumor invasiveness. Integrin $\alpha v\beta 5$ is normally expressed by epithelial cells but may contribute to tumor migration, proliferation and survival. Integrin $\alpha v\beta 5$ is generally over-expressed in malignant tumor cells, angiogenic endothelial cells within the tumor and metastatic breast or pancreatic cancer cells. Integrins on tumor cells are able to enhance metastasis, facilitate invasion and movements across blood vessels.

As previously seen integrins are widely expressed in various cell types. Together with their ability to cross-talk with growth factors, cytokines and their receptors, this points out that integrins are appealing therapeutic targets. Integrin targeting agents might then be able to inhibit both tumor cells and tumor-associated host cells, and several integrin targeting methods have been extensively studied in order to treat integrins-related diseases.

Apart from function blocking antibodies, integrin antagonists comprise synthetic peptides and peptidomimetics. Synthetic peptides mimic the structure of natural integrin binding ligands. The largest class of synthetic peptides so far developed comprises RGD peptides, given that the RGD sequence is commonly found in several glycoproteins of the extracellular matrix. Conformational constrained sequences and their chemical modifications are able to enhance the binding affinity and the bioavailability of the peptides. On the other hand, peptidomimetics are chemically synthesized products mimicking the functions and structures of the biological integrin antagonists. The peptidomimetic compounds generally display higher bioavailability and are able to avoid enzymatic degradation.

In 2000 Belvisi et al. studied peptide secondary structure mimics and reported the synthesis and conformational analysis of a series of 1-aza-2-oxobicycloalkane amino acids. Such azabicycloalkane scaffolds showing different reverse-turn mimetic properties may constrain the RGD sequence into different conformations, possibly providing the required activity and selectivity for integrin antagonism and enhancing ligand binding. A small library of cyclic RGD peptidomimetics was then synthesized. In addition, in 2009 Manzoni et al. reported the functionalization of the previously cited azabicycloalkanes with heteroalkyl side chains ending with a hydroxyl group. The hydroxyl group can easily be converted into other suitable functional groups or directly used for the conjugation of various chemical entities (applications in medical diagnosis and therapy). Thus, the functionalization allowed to generate high affinity ligands potentially active *per se* but able to behave as intelligent vectors as well. Finally, gold nanoparticles conjugated on their surface with the cyclic-RGD integrin ligand were recently generated. Gold nanoparticles are in fact the ideal candidate for optical imaging because they are not susceptible to photobleaching and may be functionalized in several ways.

During this work the small library of cyclic RGD peptidomimetics alone or conjugated with imaging probes or nanoparticles was screened. It was determined that the main target of such compounds was integrin $\alpha\beta3$, by means of receptor binding assays. The expression of integrin $\alpha\beta3$ was further evaluated in a panel of human vascular endothelial and epithelial cancer cells, in order to choose the most suitable cell models to deepen the biological role of the peptidomimetics. In particular, one compound, namely Compound 31, was selected because of its high affinity for integrin $\alpha\beta3$ receptor. Compound 31 displayed a strong anti-adhesive activity in both vascular endothelial and cancer cells, thus pointing to its putative employment in further *in vivo* studies. On the other hand, the heteroalkyl substituent of Compound 31 allowed its conjugation with fluorescein in order to give rise to imaging agents (namely Compound 13 and 15). Both of them were able to positively stain endothelial and cancer cells expressing the integrin $\alpha\beta3$ receptor on their surface, without displaying cytotoxicity. This evidence strongly suggested the possible role of fluorochrome-conjugated cyclic RGD compounds in cancer diagnosis.

Finally, the functionalization of gold nanoparticles with the cyclic RGD scaffold and fluorescein was performed. These gold nanoparticles were demonstrated to positively stain in a very specific way cancer cells expressing integrin $\alpha\beta3$. In fact, the confocal analysis of cells stained with gold nanoparticles revealed that the signal given by fluorescein and the reflection spectrum given by gold were perfectly merged and were localized near the cell adhesive contacts. This ultimately suggested that the internalization took place in the membrane zone where integrin $\alpha\beta3$ is mainly expressed, that is focal contacts.

In conclusion, the results obtained in this work by means of basically cell biology tests could pave the way for a further evaluation of cyclic RGD peptidomimetics and their functional derivatives in vascular biology, cancer treatment (in association with known chemotherapeutic drugs) and diagnosis.