**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

ALEXANDRE RODRIGUES REDONDO

**Determinação do sítio de ligação de um
peptídeo anti-angiogênico
em seus receptores**

Versão corrigida da dissertação conforme resolução CoPGr 5890
O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
07/02/2017

ALEXANDRE RODRIGUES REDONDO

**Determinação do sítio de ligação de um
peptídeo anti-angiogênico
em seus receptores**

*Dissertação apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Mestre em Ciências (Bioquímica)*

Orientador: Prof. Dr. Ricardo José Giordano

São Paulo
2016

***Dedico este trabalho às pessoas mais importantes,
Denise, Lucas, Onilton e Paula,
pois não poderia ser diferente.***

AGRADECIMENTOS

Muitas foram as pessoas que contribuíram para este trabalho. Portanto, mesmo que de forma simples, lhes agradeço por tudo, especialmente pelo tempo e atenção que me foram dedicados:

FAPESP e CNPq, pelo apoio financeiro. Companheiros de laboratório e de dia-a-dia, Célia, Robertinho, Elis, Darlene, Julia, Deborah, Ivan e Layara. Família, amigos e namorada (linda), que sempre me incentivaram em todos os momentos, sendo por vezes até mais entusiasmados com o mestrado do que eu mesmo. E Veronica, por ser uma IC de se orgulhar; André, por nunca se negar a me tirar dúvidas; Leila, por me ensinar a sempre manter no gelo; Jussara, pelas inúmeras dicas nos ensaios; Laura, pelas caronas e pelo incrível bom humor; Maria Luiza, pelas inúmeras risadas; Carlos, pelas mais inúmeras risadas ainda; Fenny, por me ensinar praticamente tudo; E Ricardo, pela (enorme) paciência, e, mais importante ainda, por ser de fato um professor e não somente aquele orientador que assina os relatórios.

Agradeço a todos pela convivência nestes quase 4 anos de fagos, angiogênese, ureia, ureia e mais ureia. De coração.

Duas, das mais de mil:

-- Como se chama o fago que vira referência em paper?

-- Fago citado.

O fago, muito nervoso, foi apresentar seminário pro grupo, e falou tudo muito rápido e enrolado. O que o orientador falou pra ele?

-- Fago, você está precipitado.

Assunto: Vaga de iniciação científica

Ter 09/04/2013 21:25

Para: giordano@iq.usp.br

Bom dia professor!

Meu nome é Alexandre, e sou aluno de graduação aqui no instituto de química. Estou no fim da graduação e procuro por um laboratório para realizar a minha iniciação científica. Presenciei sua palestra hoje a tarde na disciplina QBQ2500 - Bioquímica e Biologia Molecular: Realizações e Perspectivas e me interessei muito por sua linha de pesquisa. A única experiência que tenho foi adquirida pelas disciplinas da própria graduação. Tive uma rápida experiência, de 1 mês mais ou menos, em um outro laboratório do instituto, mas esta não teve continuidade por problemas de "conflitos de horário".

Agradeço desde já a atenção, obrigado!

----- //

Assunto: Re: Vaga de iniciação científica

Date: Ter 09/04/2013 21:32

Para: alexandre.redondo@hotmail.com

Caro Alexandre,

Fico contente com o seu interesse. Vc gostaria de passar no laboratório para conversarmos? Estou um pouco atrapalhado no momento, mas poderíamos marcar um dia na próxima semana. Qual sua disponibilidade?

Ricardo

----- //

Assunto: Versão final

Dom 25/09/2016 21:42

Para: giordano@iq.usp.br

Oi Ricardo,

Lá vai a última!

<Dissertação versão final.pdf>

RESUMO

(Redondo, A.R.) **Determinação do sítio de ligação de um peptídeo anti-angiogênico em seus receptores.** 2016. 71p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em ciências (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A angiogênese é um processo fundamental e fisiológico de organismos vertebrados, sendo responsável pela formação de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes. Entretanto, a angiogênese pode ocorrer também em condições patológicas, como causa ou consequência de doenças. Um exemplo disso está nos tumores, que para crescer além de alguns milímetros cúbicos, necessitam de um suprimento adequado de oxigênio e nutrientes, e, portanto, dependem da angiogênese. Por isso, compostos que inibem a angiogênese já estão em uso na clínica, não só para o tratamento de tumores, mas também de outras doenças dependentes da angiogênese, as retinopatias. Neste projeto, daremos continuidade à linha de pesquisa do nosso grupo, que procura identificar e validar peptídeos com potencial translacional (pré-fármacos), por apresentarem atividade anti-angiogênica. Utilizando a metodologia do *Phage Display*, nosso grupo identificou e caracterizou um hexapeptídeo, que foi selecionado por interagir com os receptores do principal fator iniciador da angiogênese, o VEGF (fator de crescimento endotelial vascular). Os receptores de VEGF (ou VEGFR) são proteínas do tipo receptor tirosina quinase, expressos em células endoteliais e essenciais para a iniciação e progressão da neovascularização. O hexapeptídeo identificado em nosso laboratório liga-se ao VEGFRs e inibe a formação de vasos sanguíneos *in vivo* em modelos animais de angiogênese. Neste trabalho, procuramos estender os estudos com este hexapeptídeo para identificar o sítio de ligação do mesmo no VEGFR e avançar em modelos que permitam a determinação dos requisitos estruturais de interação peptídeo-receptor. Com estes conhecimentos, poderemos num futuro próximo, caminhar para o desenvolvimento racional de moléculas peptídomiméticas com propriedades anti-angiogênicas.

Palavras-chave: Angiogênese; hexapeptídeo; inibidor; VEGFR-3.

ABSTRACT

(Redondo, A.R.) **Determination of the binding site of an anti-angiogenic peptide to its receptors.** 2016. 71p. Masters Dissertation - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Angiogenesis is a fundamental and physiological process for vertebrate organisms, being responsible for the formation of new blood vessels, sprouting from the existent ones. However, angiogenesis may occur in pathological conditions, being cause or consequence of diseases. One example is tumor development. To grow beyond a few cubic millimeters, tumors need a suitable supply of oxygen and nutrients, and, therefore, they are dependent of angiogenesis. In fact, anti-angiogenic compounds are already in therapeutic use, targeting not only tumors but other angiogenesis dependent diseases, like retinopathies. In this project, we expand research from our own group to identify and develop anti-angiogenic peptides with translational potential (pre-drugs). Using *Phage Display* methodology, our group identified and characterized a hexapeptide, that was selected based on its capacity to interact with the receptors for the main initiator factor of angiogenesis, the VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). VEGF receptors (VEGFR) are tyrosine kinase proteins, expressed by endothelial cells and essential for neovascularization initiation and progress. The hexapeptide identified in our lab binds to VEGFRs and inhibit blood vessel formation *in vivo* when tested in an angiogenesis animal model. In this study, we seek to further understand the interaction of this hexapeptide with its receptor by identifying its binding domain on VEGFR and develop models that will allow the determination of the structural requirements for interaction of this receptor ligand pair. With this knowledge, we can in a near future progress to a rational development of novel peptidemimetic molecules with angiogenic properties similar to this hexapeptide.

Keywords: Angiogenesis; hexapeptide; inhibitor; VEGFR-3.

Lista de figuras e tabelas

<i>Figura 1.</i>	Angiogênese patológica e doenças associadas.....	15
<i>Figura 2.</i>	VEGF e seus receptores	16
<i>Figura 3.</i>	Representação do processo de angiogênese	21
<i>Figura 4.</i>	Representação do mecanismo de ação do Bevacizumab.....	23
<i>Figura 5.</i>	Phage Display.....	24
<i>Figura 6.</i>	Layout experimental do ensaio de screening por FLISA.....	27
<i>Figura 7.</i>	Representação estrutural da porção extracelular de VEGFR-3, dimerizado, em complexo com VEGF-C.....	35
<i>Figura 8.</i>	Representação estrutural dos domínios 1 e 2 de VEGFR-3, em complexo com VEGF-C.....	36
<i>Figura 9.</i>	Representação estrutural dos domínios 4 e 5 e sequência de DNA dos domínios 2, 3 e 4 de VEGFR-3.....	37
<i>Figura 10.</i>	Sequência de DNA (e aminoácidos) dos domínios recombinantes de VEGFR-3 construídos.....	38
<i>Figura 11.</i>	Efeito da concentração de IPTG na expressão dos domínios Ig de VEGFR-3.....	40
<i>Figura 12.</i>	Distribuição das proteínas recombinantes de VEGFR-3 nas diferentes frações celulares.....	41
<i>Figura 13.</i>	Variações na temperatura de indução não alteram a solubilidade da proteína produzida.....	42
<i>Figura 14.</i>	Expressão dos domínios de VEGFR-3 em diferentes cepas de <i>E. Coli</i>	43

<i>Figura 15.</i>	Oligomerização do domínio IgD2 ^{R3} durante o enovelamento por diálise.....	48
<i>Figura 16.</i>	As proteínas recombinantes obtidas por diluição rápida são monoméricas.....	49
<i>Figura 17.</i>	Os domínios recombinantes de VEGFR-3 são funcionais.....	50
<i>Figura 18.</i>	Ensaio de competição entre Fago PCAIWF ou VEGF-C contra peptideo sintético PCAIWF.....	51
<i>Figura 19.</i>	Sequência de DNA (e aminoácidos) do domínio recombinante de VEGFR-1 construído.....	53
<i>Figura 20.</i>	Produção do domínio funcional IgD2 ^{R1}	54
<i>Figura 21.</i>	Representação das mudanças estruturais do processo de enovelamento (folding) de uma proteína genérica.....	57
<i>Tabela 1.</i>	Diferentes cepas testadas e suas principais características.....	45

Lista de abreviaturas e siglas

Cpn10/Cpn60	Sistema de chaperoninas da família TCP-1
IgD2 ^{R1}	Domínio 2 de VEGFR-1
IgD1 ^{R3}	Domínio 1 de VEGFR-3
IgD2 ^{R3}	Domínio 2 de VEGFR-3
IgD3 ^{R3}	Domínio 3 de VEGFR-3
IgD2D3 ^{R3}	Domínios 2 e 3 “unidos” de VEGFR-3
DO ₆₀₀	Densidade ótica medida em 600nm
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Fago PCAIWF	Bacteriófago M13 expressando PCAIWF em sua pIII
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FDA	Food and Drug Administration (EUA)
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
FLISA	Fluorophor-linked immunosorbent assay
IPTG	Isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo
Kan	Kanamicina
LB	Lysogeny broth ^[1]
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NMR HSQC	Nuclear Magnetic Resonance Heteronuclear Single Quantum Coherence

^[1] Checar rodapé da página 29.

NRP	Neuropilina
PBS	Tampão fosfato-salino
PCAIWF	Peptídeo sintético PCAWIF
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDGFR	Platelet Derived Growth Factor Receptor
PEG	Polietilenoglicol
PLGF	Placental Growth Factor
RCSB PDB	Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Databank
RTK	Receptor Tyrosine Kinases
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
Sob.	Sobrenadante
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression
sVEGFR-1	Receptor 1 de VEGF em sua forma solúvel
TAE	Tampão composto por Tris, ácido acético e EDTA
TE	Tampão composto por Tris e EDTA
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Receptores de VEGF
VHD	VEGF Homology Domain

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Angiogênese.....	13
1.1.1 Principais ligantes e receptores.....	15
1.1.2 Mecanismo.....	19
1.1.3 Inibidores da angiogênese em uso clínico.....	22
1.2 PCAIWF.....	23
2 OBJETIVOS	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Produção, purificação e titulação de fagos.....	29
3.2 PCR e sequenciamento dos fagos.....	29
3.3 Amplificação da região dos domínios recombinantes de VEGFR-3 ..	30
3.4 Clonagem dos domínios recombinantes de VEGFR-3 e VEGFR-1 ..	30
3.5 Expressão e purificação.....	32
3.6 Ensaio por FLISA.....	32
3.7 Espectros de NMR HSQC.....	33
4 RESULTADOS	34
4.1 Visão geral.....	34
4.2 Análise estrutural de VEGFR-3.....	34
4.3 Clonagem & expressão em <i>E. coli</i>	39
4.4 Lise & purificação.....	40
4.5 Re-enovelamento.....	46
4.6 Ensaio de funcionalidade.....	49
4.6.1 Ligação.....	49
4.6.2 Competição.....	51
4.7 IgD2 ^{R1}	52
5 DISCUSSÃO	55
6 CONCLUSÃO	60
7 REFERÊNCIAS	61
8 SÚMULA CURRICULAR	69
9 ANEXO 1 – Artigo publicado	71

1 Introdução

1.1 Angiogênese

A formação de vasos sanguíneos, em embriões de vertebrados, ocorre por dois processos distintos, mas que compartilham alguns elementos comuns: a vasculogênese, que forma os chamados vasos sanguíneos primordiais, originados a partir de células progenitoras; e a angiogênese, no qual novos vasos se formam, por germinação ou bifurcação, a partir dos vasos já existentes¹. Esses dois processos são vitais, uma vez que os vasos sanguíneos são responsáveis por levar às células nutrientes, hormônios, fatores e outros compostos necessários ao seu crescimento, desenvolvimento e funcionamento. Outro exemplo é o transporte de oxigênio, realizado pela hemoglobina (proteína presente nas hemácias). A capacidade de difusão do oxigênio em tecidos de organismos vivos é da ordem de 100µm, ou seja, células separadas por uma distância maior que esta necessitam de um sistema de transporte de oxigênio mais complexo do que a difusão. Por este motivo, não existem, por exemplo, insetos ou baratas com 2 metros de altura, e o crescimento dos animais vertebrados só foi “permitido” graças à evolução dos vasos sanguíneos².

Em humanos adultos, o processo de formação vascular predominante é a angiogênese. Em 1996, Hanahan e Folkman propuseram que a angiogênese não é um processo que ocorre ininterruptamente, mas sim um que pode ser ativado ou desativado. Ela é fruto de um delicado equilíbrio entre fatores ativadores e inibidores, e influencia diversos outros processos no corpo, como a cicatrização de tecidos e o ciclo reprodutivo feminino³. Quando este equilíbrio é mantido, diz-se que a angiogênese ocorre de forma fisiológica. Analogamente, quando o equilíbrio não é mantido diz-se que a angiogênese ocorre de forma patológica, ou seja, associada direta ou indiretamente a uma doença, de forma prejudicial ao organismo^{4;5}.

O câncer é um exemplo no qual a angiogênese tem papel importante e direto na formação e progressão tumoral⁶. Sem uma rede vascular adequada, tumores não passariam de alguns milímetros cúbicos, pois suas células não teriam oxigênio nem nutrientes suficientes. Assim, a reestruturação, via angiogênese, da rede vascular tumoral é fundamental ao seu crescimento. Como mencionado, a angiogênese pode ter uma participação indireta na patologia e, neste caso, podemos citar a relação entre angiogênese e inflamação. Estes são processos que podem ocorrer de forma independente ou de forma associada. A angiogênese pode aumentar a demanda de nutrientes e oxigênio em tecidos com inflamação, e, conseqüente e indiretamente, agravar quadros inflamatórios. Além disso, processos inflamatórios muitas vezes levam a destruição do tecido, o que induz a angiogênese local. Quando o processo inflamatório é crônico, ele é comumente associado à angiogênese patológica⁷.

O desequilíbrio entre ativadores e inibidores que regulam o processo angiogênico pode intensificar ou reduzir a formação de vasos sanguíneos. Doenças como retinopatias, psoríase, artrite e alzheimer estão associadas ao excesso de vasos sanguíneos⁵, enquanto lesões crônicas, derrame, doenças cardíacas e neuropatias estão associadas à insuficiência vascular (FIGURA 1).

Tendo isto em vista, o desenvolvimento de terapias anti-angiogênicas pode beneficiar pacientes com doenças aparentemente não relacionadas ao sistema vascular, mas que possuem a angiogênese como componente comum⁸. Para o desenvolvimento destas terapias é necessário primeiro entender o funcionamento do processo angiogênico e quais moléculas estão envolvidas, para então identificar possíveis alvos moleculares.

1.1.1 Principais ligantes e receptores

A angiogênese é um processo complexo, composto pela ação coordenada de diversas moléculas. Dentre elas, baseado em seu papel central, destacam-se os fatores de crescimento denominados de fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês, *vascular endothelial growth factor*), e seus receptores, os VEGFRs⁹. Até a presente data, são conhecidos 5 fatores da família VEGF (FIGURA 2): os VEGF-A, B, C, D e o PlGF (*Placental Growth*

Factor), todos caracterizados por 8 resíduos de cisteína conservados, responsáveis por formar uma estrutura do tipo “cystine knot”.

VEGF-A, também denominado apenas por VEGF, foi o primeiro membro desta família a ser caracterizado^[2], e concentra o maior número de estudos científicos. Pode ser expresso em diferentes isoformas, sendo que as mais comuns são as de 121, 145, 165, 189 e 206 aminoácidos, em humanos¹⁰. O papel destas isoformas é o mesmo (aumento na dilatação e permeabilização vascular), havendo como diferença apenas a afinidade de ligação entre elas e seus receptores e suas respectivas capacidades de difusão no tecido. Existem também as

^[2] VEGF-A foi descoberto simultânea e independentemente por dois grupos de pesquisa, durante a década de 80. Em 1983, pelo grupo do pesquisador Harold F. Dvorak, sob o nome de *vascular permeability factor* (VPF)¹¹; e em 1989, pelo grupo do pesquisador Napoleone Ferrara, sob o nome de *vascular endothelial growth factor* (VEGF)¹². Também em 1989, o grupo do pesquisador Daniel T. Connolly demonstrou que VPF e VEGF eram, na verdade, a mesma molécula¹³.

isoformas b do VEGF, que assumem papel inibitório e são consideradas anti-angiogênicas¹⁴. Porém, o papel exato destas isoformas b na neovascularização ainda não é bem compreendido.

VEGF-B foi descoberto em 1996, e são conhecidas duas isoformas atualmente: com 167 e 186 aminoácidos. Sua função exata ainda não foi elucidada, mas é evidente que ambas as isoformas tem um papel significativo na regulação de vasos sanguíneos do coração e do sistema nervoso central, atuando em termos de proteção contra insuficiência cardíaca e degeneração neuronal¹⁵. Mais recentemente, sua importância na obesidade também foi proposta, sugerindo que as vias relacionadas ao VEGF-B possam modular o metabolismo do tecido adiposo em camundongos¹⁶.

Outro membro da família é o VEGF-C, que foi descoberto também em 1996, e possui uma única isoforma, de 388 aminoácidos. Entretanto, este fator sofre uma série de clivagens pós-traducionais até atingir sua forma madura. Inicialmente, é expresso na forma denominada de "*uncleaved* VEGF-C", composta por 3 domínios, o domínio homólogo de VEGF (VHD), o domínio N-terminal e o domínio C-terminal, totalizando aproximadamente 58kDa. A primeira clivagem ocorre logo após a secreção e cliva o domínio C-terminal, resultando em fragmentos de 29 e 31kDa mantidos unidos por pontes de dissulfeto. Esta forma intermediária, embora capaz de ligar em seu respectivo receptor, é considerada inativa. Por fim, uma segunda clivagem separa o N-terminal, resultando em um VEGF-C maduro, ativo, e caracterizado por 2 cadeias polipeptídicas de 21kDa. Esta forma madura é considerada ativa pois sua afinidade de ligação com os receptores aumenta significativamente. Este fator atua diretamente na linfangiogênese e na angiogênese, promovendo principalmente crescimento, sobrevivência e migração celular endotelial¹⁷.

VEGF-D é bastante semelhante a VEGF-C tanto em estrutura como em função. Sua estrutura também é composta por 3 domínios, N-terminal, VHD e C-terminal, totalizando 333 aminoácidos. Seu VHD é 61% idêntico à mesma região no VEGF-C, e, após passar por

processos pós traducionais análogos, tem tamanho semelhante. Atua nos processos de angiogênese e linfangiogênese, principalmente no crescimento celular endotelial¹⁸.

O PlGF foi o segundo fator desta família a ser descoberto, em 1991. Possui 4 isoformas, geradas por *splicing* alternativo, sendo que duas são consideradas mais importantes, PlGF₁₃₁ e PlGF₁₅₂. A função deste fator ainda é motivo de debate, mas sabe-se que o PlGF é expresso por diferentes células (endoteliais, pericitos, músculo liso, fibroblastos, astrócitos, entre outros), promovendo respostas de metabolismo, sobrevivência, migração e proliferação¹⁹. O PlGF não é essencial para a angiogênese fisiológica, uma vez que camundongo que não produz este fator são saudáveis e viáveis. Entretanto, o PlGF parece ter um papel mais importante em diversas doenças, como isquemia vascular, obesidade, crescimento tumoral e inflamação²⁰. Curiosamente, o PlGF e o VEGF-B ligam-se exclusivamente ao receptor VEGFR-1, que apesar de ser o de maior afinidade, apresenta baixa atividade quinase. Por isso, acredita-se que um possível papel para estes dois fatores seja o de modular a atividade do VEGF e sua disponibilidade para ativar os demais receptores²¹.

Também são conhecidos 3 receptores transmembranares que ligam os diferentes membros da família VEGF. Eles são denominados de VEGFR-1, 2 e 3 e pertencem à família dos RTK (*Receptor Tyrosine Kinases*)²². São caracterizados por seus 7 domínios extracelulares de imunoglobulina. Além disso, é comum a esta família que a interação com o ligante acarrete em mudanças conformacionais, dimerizando o receptor e expondo resíduos de tirosina intracelulares à autofosforilação, iniciando assim, cascatas de sinalização²³. VEGF também tem dois co-receptores, neuropilina-1 e -2 (NRP-1 e NRP-2). A ligação do VEGF às NRPs modula a atividade destes fatores nas células endoteliais²⁴.

VEGFR-1 e VEGFR-2 possuem 180 e 200kDa, respectivamente. Ambos são expressos principalmente em células endoteliais e tem alta afinidade de ligação com VEGF-A₁₆₅. Porém, seus papéis na formação vascular são, de forma geral, opostos. VEGFR-2, mediante interação

com VEGF-A₁₆₅, ativa diversas cascatas de sinalização intracelulares que consequentemente iniciam o processo de angiogênese. Esta interação é considerada a principal via de ativação dentre os processos que regulam positivamente a angiogênese. Já o VEGFR-1, que apresenta maior afinidade por VEGF-A, exerce baixíssima sinalização intracelular e, em função disso, parece atuar como regulador negativo da angiogênese. Ele captura VEGF-As disponíveis na matriz extracelular, impedindo-os de interagir com VEGFR-2. Além disso, PlGF e VEGF-B também são capazes de interagir com VEGFR-1, modulando a quantidade de VEGF-A livre. Ambos estão associados, além do processo de angiogênese, à sobrevivência destas células quando em estado quiescente²⁵.

VEGFR-3, por sua vez, possui aproximadamente 120 kDa. É expresso constitutivamente em células endoteliais linfáticas e também em células endoteliais angiogênicas, e tem como principal ligantes o VEGF-C e VEGF-D. É responsável por ativar as vias de sinalização que iniciam a linfangiogênese. Além disso, VEGFR-3 é expresso em células endoteliais migratórias (*tip cells*) e atua de modo a auxiliar a migração celular durante a angiogênese²⁶.

1.1.2 Mecanismo

O mecanismo pelo qual a angiogênese ocorre se baseia na ramificação de um vaso sanguíneo já existente. O processo tem início quando tecidos em condições de hipóxia secretam VEGF no meio extracelular, resultando num gradiente de concentração. VEGF-A e VEGF-C ativam os receptores VEGFR-2 e VEGFR-3, presentes nas células endoteliais da parede de um vaso sanguíneo próximo ao tecido em hipóxia. Isto induz a secreção de proteases, levando a degradação da membrana basal que reveste a vasculatura, à perda dos pericitos aderidos ao vaso, levando a um aumento na permeabilidade vascular²⁷. Estas primeiras células endoteliais que respondem ao estímulo de VEGF se diferenciam, então, em um tipo celular denominado

“células de ponta”, ou *tip cells*, adquirindo um fenótipo de célula migratória (FIGURA 3a). VEGFR-3, bastante expresso nas *tip cells*, atua como guia, auxiliando a migração celular em direção ao gradiente de VEGF.

Também estimuladas por VEGF, outras células endoteliais, adjacentes à *tip cell*, se diferenciam em células proliferativas, denominadas de *stalk cells* (FIGURA 3b). Ainda não há um consenso sobre como esta diferenciação ocorre²². A comunicação entre estes dois tipos celulares (*tip* e *stalk*) é essencial para a angiogênese, e depende da expressão de receptores Notch (nas células *stalk*) e de seu ligante Dll4 (nas células *tip*). A interação de Dll4 com Notch faz com que as *stalk cells* tenham a sinalização resultante de VEGFR-2 e VEGFR-3 inibida, e a expressão de VEGFR-1 aumentada. VEGFR-1 então sequestra VEGF livre, impedindo que este interaja com VEGFR-2. O resultado destas inibições e induções é a formação de uma ramificação “linear”, uma vez que as *stalk cells* “seguem” as *tip cells* (neste caso, seguir significa que as *stalk cells* se duplicam na direção do movimento das *tip cells*). Se não houvesse este tipo de comunicação, mais de uma *tip cell* seria formada e as ramificações não seriam lineares, dificultando a formação de novos vasos²⁸.

O final do processo ocorre quando uma *tip cell* encontra outra *tip cell*, provenientes de outro vaso sanguíneo, restaurando a membrana vascular e, conseqüentemente, o fluxo sanguíneo (FIGURA 3c). Em resumo, pode-se dizer que há uma resposta coordenada entre os diferentes fatores e seus receptores, mediante um estímulo (hipóxia), essencial para que o processo de angiogênese ocorra corretamente²⁷.

Figura 3. **Representação do processo de angiogênese.** Tecidos em condição de hipóxia liberam VEGFs ao meio extracelular. Estes fatores interagem com receptores presentes nas células quiescentes que revestem os vasos sanguíneos. Elas se diferenciam e adquirem fenótipos migratórios, deslocando-se em direção ao tecido em hipóxia. O Processo finaliza quando duas células migratórias encontram-se e unem-se, formando um novo vaso sanguíneo. (a) Diferenciação da célula endotelial quiescente em *tip cell*. (b) Formação das *stalk cells* e migração em direção ao tecido em hipóxia. (c) Finalização do processo, com formação de um novo vaso sanguíneo.

Figura adaptada de Carmeliet & Jain, 2011.

1.1.3 Inibidores da angiogênese em uso clínico

Atualmente, existem diversas terapias anti-angiogênicas em desenvolvimento e algumas já aprovadas para uso clínico, envolvendo diferentes alvos moleculares. Algumas foram desenhadas para inibir ligantes envolvidos no início do processo de formação dos vasos sanguíneos, algumas têm a intenção de inibir a atividade de receptores tirosina quinase de forma endógena, enquanto outras inibem indiretamente a resposta de células endoteliais²⁹.

Para tratamento, são utilizados desde pequenas moléculas até anticorpos, e o desafio está em encontrar o equilíbrio entre biodisponibilidade e especificidade. Pequenas moléculas, em função de seu tamanho, geralmente tem alta biodisponibilidade. Isto é, conseguem trespassar membranas e podem ser, por exemplo, administrados oralmente. Porém, também em função de seu tamanho, possuem baixa especificidade. Seus alvos, localizados na porção intracelular de receptores tirosina quinase, tem alto grau de semelhança e conservação de resíduos, o que possibilita a interação de pequenas moléculas com diferentes receptores (já que o mesmo sítio de interação está presente nos diferentes receptores). Isso pode ser positivo por um lado, pois o mesmo fármaco pode atuar em mais de um alvo, mas, por este mesmo motivo, pode acarretar efeitos colaterais indesejados³⁰.

Já os anticorpos são moléculas grandes, de alta especificidade e baixa biodisponibilidade, e são direcionados aos ligantes extracelulares. De uma forma geral, pode se dizer que todos os medicamentos em uso atualmente agem direta ou indiretamente no eixo VEGF-A/VEGFR-2³¹. Em 2004 o FDA (Food and Drug Administration) aprovou o primeiro fármaco para tratamento anti-angiogênico, nomeado de Bevacizumab (nome comercial Avastina). Ele ainda é, nesta área, o fármaco mais conhecido e estudado, utilizado em tratamentos de tumores metastásicos e retinopatias. Trata-se de um anticorpo monoclonal anti-VEGF-A que atua como sequestrador, diminuindo a disponibilidade do fator no meio extracelular e limitando a interação VEGF-A/VEGFR-2 (FIGURA 4). Deste modo, a ativação

da principal via de sinalização celular no processo de angiogênese é suprimida, diminuindo a velocidade de formação de novos vasos sanguíneos³²

Figura 4. **Representação do mecanismo de ação do Bevacizumab.** A avastina (Bevacizumab) é um fármaco anti-angiogênico que atua como sequestrador de VEGF-A, impedindo que este se ligue ao receptor VEGFR-2 e ative a principal via de sinalização celular no processo de angiogênese.

Figura adaptada de Mountzios et al., 2014.

A pesquisa de novos fármacos está voltada à busca do equilíbrio entre biodisponibilidade e especificidade. Uma alternativa interessante seria identificar uma pequena molécula com ação na porção extracelular dos receptores, uma vez que esta tem menor grau de conservação estrutural, quando comparada à região intracelular. Deste modo, o fármaco aliaria alta especificidade à boa biodisponibilidade³¹.

1.2 PCAIWF

Em nosso laboratório, a pesquisadora Dra. Jussara Michaloski iniciou uma linha de pesquisa com a finalidade de desenvolver fármacos de baixo peso molecular como uma alternativa ao Bevacizumab e demais fármacos anti-angiogênicos. Esta linha se faz necessária pois a maioria dos tratamentos anti-angiogênicos clinicamente disponíveis atualmente tem como alvo a porção intracelular dos receptores, que é bastante conservada dentre os mesmos, de modo que tais fármacos não fazem distinção entre diferentes receptores da família RTK (o grupo de receptores de VEGF é uma subfamília dos RTK). Além disso, o Bevacizumab inibe a

sinalização de VEGFR-2 (atuando não em sua porção intracelular mas em seu principal ligante), que está associada, além da angiogênese, à sobrevivência geral de células endoteliais quiescentes. Portanto, como alternativa, seria interessante escolher um receptor diferente e que também exercesse um papel importante na formação vascular. O alvo escolhido foi o VEGFR-3, uma vez que este tem elevado grau de expressão em células endoteliais que já se diferenciaram no fenótipo de migração e, conseqüentemente, estão envolvidas somente no processo da angiogênese.

Nosso laboratório tem muita experiência com a metodologia do *Phage Display*, que permite identificar peptídeos ligantes de moléculas biológicas. Uma característica importante desta metodologia é que os peptídeo isolados comumente apresentam atividade biológica relacionada a molécula de estudo. A tecnologia do *Phage Display* baseia-se na construção de bibliotecas de bacteriófagos filamentosos de tal forma que pequenos peptídeos aleatórios (entre 5 e 15 aminoácidos) são apresentados fusionados a uma das proteínas do capsídeo viral³³ (FIGURA 5).

Figura 5. **Phage Display**. Representação de um bacteriófago filamentosso com expressão heteróloga na região pIII de seu capsídeo viral

A metodologia de *Phage Display* é bastante versátil, permitindo ensaios de seleção de peptídeos contra diferentes alvos em diferentes situações (chamados *biopanning*). Por exemplo, a seleção de peptídeos pode ser realizada *in vitro* contra moléculas alvo aderidas em superfícies, células (que podem ou não ser estimuladas para alterar a expressão de receptores) e tecidos dissecados. *In vivo*, o *Phage Display* é comumente utilizado injetando-se os fagos na circulação do animal, retirando os órgãos de interesse e selecionando aqueles fagos que expressam peptídeos que interagem com a vasculatura de diferentes órgãos do organismo³⁴. Para se ter uma noção da diversidade deste sistema, uma biblioteca de *Phage Display* pode conter mais de 10⁹ diferentes peptídeos, o que resulta em ligantes para virtualmente qualquer alvo biológico. Esta abordagem permite identificar moléculas que potencialmente podem servir para o desenvolvimento de fármacos, vacinas, métodos diagnósticos e de outros insumos³⁵.

Utilizando a tecnologia do *Phage Display*, nosso grupo de pesquisa identificou e caracterizou um peptídeo de 6 aminoácidos, denominado PCAIWF, que foi selecionado pela sua especificidade ao receptor VEGFR-3. PCAIWF foi validado *in vitro* e *in vivo*. Demonstrou-se, por ensaio de competição *in vitro*, que o peptídeo PCAIWF inibe a ligação do VEGF-C ao seu receptor, o VEGFR-3. Demonstrou-se também que o peptídeo é na verdade um pan-inibidor de VEGF, pois inibe a interação dos 3 receptores com seus ligantes (VEGF-C com VEGFR-3 e VEGFR-2; PlGF com VEGFR-1; VEGF-A com VEGFR-2 e VEGFR-1). Quando os estudos foram estendidos a outros RTK, não pertencentes à família VEGF (FGFR e PDGFR), não houve efeito inibitório do peptídeo. Ou seja, PCAIWF é um inibidor dos 3 receptores de VEGF. Em seguida, foi realizado um ensaio *in vivo* no modelo animal de retinopatia induzida por oxigênio, demonstrando novamente o poder inibitório de PCAIWF (Anexo 1). Este modelo animal reproduz a angiogênese patológica observada em humanos. Através dele, é possível avaliar e quantificar a formação de vasos sanguíneos presentes na retina de camundongos, com a adição ou não de moléculas inibitórias/indutórias^{36,37}.

Atualmente, existem alguns peptídeos utilizados como fármacos. Este é o caso de um novo fármaco que está em fase III nos testes clínicos, e consiste em um peptídeo com 8 aminoácidos ingerido por via oral³⁸. Entretanto, de modo geral, peptídeos não são bons medicamentos e podem ser prontamente degradados no organismo através da ação de proteases, além de apresentarem sérios problemas de biodistribuição (uma vez que, geralmente, são impermeáveis e não atravessam a membrana das células). O próprio PCAIWF, por exemplo, apresenta dificuldades para adentrar à córnea, quando testado para uso tópico (na forma de colírio).

Tendo isto em vista, este projeto busca, além de estudar a interação PCAIWF/VEGFR-3, avançar em modelos de estudo que permitam o desenvolvimento racional de fármacos baseados neste peptídeo. Para tal, desenhamos um teste de FLISA que permita a quantificação da interação PCAIWF/VEGR-3. Isto é importante, para que possamos avaliar o efeito de inibidores adicionados ao ensaio, como por exemplo, compostos presentes num biblioteca de fármacos. A idéia é que consigamos uma diferença relevante de intensidade de sinal sem (FIGURA 6a) e com (FIGURA 6b) a presença de PCAIWF, para utilizarmos como controle. Uma vez otimizado o ensaio, poderemos realizar um *screening* de competição envolvendo uma variedade de compostos orgânicos, a fim de encontrar algum que mimetize a ação biológica de PCAIWF. É importante ressaltar que estes ensaios de varredura não devem ser realizados utilizando VEGFR-3 comercial ou PCAIWF comercial, pois isso acarretaria em um custo elevadíssimo. Portanto, após identificar quais os domínios de ligação de PCAIWF em VEGFR-3, se faz necessário clonar e expressar tais domínios para então utilizá-los nos ensaios.

O desenho racional de fármacos também pode ser feito por métodos tradicionais, analisando-se o sítio ativo da molécula e sintetizando compostos com as características necessárias para interagir com a molécula alvo. Ao mesmo tempo, as propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas podem ser otimizadas, de forma que estas moléculas

apresentem as propriedades necessárias de um bom medicamento. Assim, nesta dissertação, procuramos também desenvolver modelos de estudo por RMN que permitam a determinação dos requisitos estruturais da interação entre o peptídeo PCAIWF e o receptores de VEGF. Com estas informações, poderemos num futuro próximo, iniciar estudos para o desenho racional de moléculas com propriedade anti-angiogênica semelhantes ao peptídeo PCAIWF.

Figura 6. **Layout experimental do ensaio de screening por FLISA.** (a) Receptor (domínios recombinantes de VEGFR3); Ligante (bacteriófago expressando o peptídeo PCAIWF); Anticorpo primário (anti-phage); Anticorpo secundário (anti-anti-phage com fluoróforo acoplado). (b) Este ensaio de competição visa estabelecer um sinal controle para a varredura. Receptor (domínios recombinantes de VEGFR3); Competidor (Composto orgânico proveniente da biblioteca, para o screening, ou PCAIWF comercial, para estabelecer o sinal controle); Ligante (bacteriófago expressando o peptídeo PCAIWF).

2 Objetivos

O peptídeo PCAIWF, desenvolvido pela Dra. Jussara Michaloski em nosso laboratório, apresenta promissora atividade anti-angiogênica. Contudo, sabe-se que peptídeos não são comumente utilizados como drogas por terem baixa eficiência neste quesito, uma vez que, dentro do organismo, podem ser degradados pela ação de proteases. Além disso, também apresentam problemas de biodistribuição, pois tem dificuldade em atravessar a membrana celular. Tendo isto em vista, o objetivo deste trabalho é:

I. Identificar qual é o domínio de ligação entre PCAIWF e VEGF-R3. Esta etapa consiste na análise estrutural de VEGFR-3, para identificar as sequências exatas de cada domínio do receptor envolvido em sua interação com o ligante natural, VEGF-C. Em seguida, clonagem e expressão destes domínios. Por fim, ensaios de ligação utilizando PCAIWF.

II. Desenvolver métodos para o desenho racional de fármacos baseados no PCAIWF.

Para tal, padronizaremos a técnica de FLISA em um ensaio de competição envolvendo PCAIWF, a fim de utilizá-lo como controle para um *screening* de moléculas orgânicas. Vamos também iniciar estudos de RMN para auxiliar na determinação dos requisitos estruturais da interação deste peptídeo com os receptores de VEGF.

3 Materiais e Métodos

3.1 Produção, purificação e titulação de fagos

Os fagos selecionados foram purificados do sobrenadante de cultura de bactéria (*E. coli* MC1061 ou K91kan), precipitados pelo método de PEG/NaCl (Giordano et al., 2001), e re-suspensos em PBS (pH 7.4). Foram titulados por diluição seriada em meio LB (*Lysogeny broth*^[3]), com infecção em *E. coli* K91kan, e semeados em LB-agar contendo tetraciclina (20 µg/mL) e kanamicina (100 µg/mL). O número de unidades transdutoras de bactéria (TU) foi calculado contando-se as colônias obtidas.

3.2 PCR e sequenciamento dos fagos

Os fagos obtidos foram semeados em placas de LB-ágar-tetraciclina-kanamicina e colônias individuais foram selecionadas e ressuspensas em 50 µL de PBS (*Phosphate buffered saline*). Utilizou-se os oligonucleotídeos específicos (forward 5'-CATGCCCCGGG TACCTTTCTATTCT C-3' e reverse 5'-CCCTCATAGTTAGCGTAACGATCT-3'), em termociclador por 35 ciclos (desnaturação (94°C) 15 segundos; anelamento (60°C) 30 segundos, extensão (72°C) 1 minuto). Os produtos de PCR foram então sequenciados para identificação do peptídeo apresentado por cada fago selecionado. Para confirmar a eficiência da reação de PCR, o produto foi analisado por eletroforese em gel de agarose (1%) em tampão 1xTAE (*Tris, ácido acético e EDTA*), com 0,5µg/mL de brometo de etídeo, 1 ul de peso molecular 1kb (Fermentas) e 5µl das amostras de PCR, com uma voltagem de 90 Volts para a corrida.

^[3] O meio LB foi formulado em 1951, pelo pesquisador italiano Giuseppe Bertani³⁹. Com a popularização de seu uso, diversas interpretações surgiram para o significado da abreviatura LB. Dentre elas, podemos citar Luria broth, Lennox broth e Luria-Bertani. Porém, como atestado pelo próprio Giuseppe, o significado correto é *Lysogeny broth*⁴⁰.

3.3 Amplificação da região dos domínios recombinantes de VEGFR-3 e VEGFR-1

Para a amplificação, os plasmídeos pDONR223-FLT4 (*William Hahn & David Root - Addgene plasmid # 23923*) e pDONR223-FLT1 (*William Hahn & David Root - Addgene plasmid # 23912*), contendo, respectivamente, toda a região codificante do gene *FLT4* (VEGFR-3) e do gene *FLT1* (VEGFR-1) foram utilizados, juntamente com os primers (IgD2^{R3} Forward 5'-GTGAGACATATGGAGCAGCCATTC ATC-3'; IgD2^{R3} reverse 5'-GATCTCGAGGA GCTCGTTGCCTGTGAT-3'; IgD3^{R3} reverse 5'-GACCTCGAGGAAGGGATTTTCATGCAC; IgD2^{R1} Forward 5'-ATTATACATATGAGTGATACAGGTAGACCT-3'; IgD2^{R1} Reverse 5'-GACCTCGAGGATTGTATTGGTTTGTTCGATG-3') em termociclador por 35 ciclos (desnaturação (94°C) 20 segundos; anelamento (62°C) 60 segundos, extensão (72°C) 1:15 minuto). Para confirmar a eficiência da reação de PCR, o produto foi analisado por eletroforese em gel de agarose (1%) em tampão 1xTAE, com 0,5µg/mL de brometo de etídeo, 1 µl de peso molecular 1kb (*Fermentas*) e 5µl das amostras de PCR, com uma voltagem de 90 Volts para a corrida.

3.4 Clonagem dos domínios recombinantes de VEGFR-3 e VEGFR-1

Os produtos do PCR foram digeridos com *NdeI* e *XhoI* e então ligados ao vetor de expressão pET21a com o auxílio da enzima T4 DNA ligase.

Para produção de bactérias eletrocompetentes, realizamos pré inóculo de colônias da bactéria DH5α (*E. coli*) em meio LB+carbenicilina (50µg/mL), 50 mL, overnight, 37°C, 300 RPM. Em seguida, 2mL destes pré inóculos foram incubados em 200 mL de LB+ carbenicilina, 37°C, 300RPM, até densidade ótica igual a 0,36, seguidos de incubação em gelo por 10 minutos e centrifugação a 1.600g, 4°C, por 15 minutos. Cada pellet foi ressuspensionado em 40mL de H₂O e centrifugado a 1.100g, 4 graus, 10 minutos. Repetiu-se a etapa, desta vez com H₂O-glicerol 15%. Por fim, cada pellet foi ressuspensionado em 6 mL de tampão H₂O-glicerol 15%, aliquotado

e armazenado em freezer -80°C. O mesmo procedimento foi realizado para as cepas Rosetta De3, Rosetta (DE3) pLysS e Arctic Express (DE3), utilizando, respectivamente, os antibióticos cloranfenicol (25 µg/mL), cloranfenicol (25 µg/mL) e gentamicina (20 µg/mL).

Para a transformação, suspensão contendo 200µL de células competentes e 10µg de DNA proveniente da ligação foi submetida a choque elétrico de 2,5kV, seguido da adição de 1 mL de meio SOC (*Super Optimal broth with Catabolite repression*) e incubação por 1 hora a 37°C. As células foram então semeadas em LB-agar contendo antibiótico seletivo adequado e incubadas overnight à 37°C.

Após a transformação na cepa DH5α, aproximadamente 40 colônias foram coletadas. Tais colônias foram utilizadas como template para reações de PCR (detalhes na seção de *Materiais e Métodos*). Para confirmar a eficiência da reação de PCR, o produto foi analisado por eletroforese em gel de agarose (1%) em tampão 1xTAE, com 0,5µg/mL de brometo de etídeo, 1 ul de peso molecular 1kb (*Fermentas*) e 10µl das amostras de PCR, com uma voltagem de 90 Volts para a corrida.

As colônias cujo resultado foi positivo foram submetidos ao procedimento de extração plasmidial (mini-prep), que consiste em inocular colônias isoladas em 2ml de LB+carbenicilina com incubação overnight à 37°C. Os inóculos foram centrifugados por 5 minutos, 20.000g. Os pellets foram ressuspensos em 100µl de tampão TE (*Tris*, *EDTA*) e submetidos à incubação com 200µl de 1% SDS em NaOH 200mM, por 5 minutos à temperatura ambiente, seguidos da adição de 200µl de Acetato de amônio 3M e nova incubação por 5 minutos à temperatura ambiente. Após Centrifugação (10 minutos, 20.000g), 500µl de isopropanol foram adicionados aos sobrenadantes, que foram centrifugados (10 minutos, 20.000g). Os pellets, após lavagem com 500µl de etanol 70%, foram ressuspensos em 100µl de TE.

Os clones obtidos foram submetidos à digestão com NdeI e XhoI e sequenciamento para confirmação.

3.5 Expressão e purificação

A expressão foi realizada na cepa Rosetta (DE3) pLysS, com adição de IPTG em DO₆₀₀ igual à 0,8. A lise celular ocorreu pela combinação de lisozima (80 µg/mL) e sonicação. Após centrifugação (6.000g for 25 min, 4°C), os corpos de inclusão foram lavados em tampão de lavagem (50mM Tris, 0.5% [v/v] Triton X-100, 100mM NaCl, 1mM EDTA, pH 8.0). A solubilização foi realizada em tampão denaturante (20mM NaH₂PO₄, 8M urea, 100mM NaCl, 5mM β-Mercaptoetanol, pH 8.0) e os domínios recombinantes foram então concentrados utilizando coluna de agarose Ni-NTA (*Qiagen*). Em seguida, o enovelamento *in vitro* foi realizado por diluição (para concentração de 50 µg/ml) em tampão nativo (20 mM NaH₂PO₄, 50 mM NaCl, pH 7.3), sob agitação. Por fim, os domínios foram concentrados em coluna de agarose NI-NTA (*Qiagen*), eluídos com 800mM de imidazol e dialisados contra tampão nativo. As análises foram realizadas por SDS-PAGE 15%.

3.6 Ensaios por FLISA

Para os ensaios de FLISA, foram utilizados 100ng de VEGFR-3 (*R&D Systems 349-F4*) e/ou 100ng dos domínios recombinantes produzidos IgD2^{R3} e IgD2D3^{R3}, imobilizados (via incubação) em placas de 96 poços (*High Binding Plates, Costar Corning*) em 50µl de solução PBS a 8°C durante 16 horas. A solução de receptor foi removida e lavagens com 1X PBS 0,05% Tween foram feitas. Após lavagens, foi feito bloqueio com solução de bloqueio Odyssey (*LI-COR*) a 37°C por 2h. As lavagens foram repetidas. Um total de 10⁹ fagos em PBS 10% Odyssey foram incubados em cada poço por 1 hora e 30 minutos a 37°C, seguidos de 9 lavagens com 1X PBS 0,05% Tween. Anticorpo primário anti-phage (*R&D Systems*), na diluição de 1:400, em PBS 1% solução de bloqueio odyssey foi incubado por 1,5h a 37°C; as mesmas lavagens descritas acima foram repetidas. A seguir anticorpo secundário (*IRDye 680LT, da empresa Li-COR Bioscience*) 1:400 foi incubado em PBS 1% solução de bloqueio odyssey por

1h a 37°C. Após 3 lavagens, a placa foi centrifugada a 1.000g invertida por 5 minutos à temperatura ambiente. Leituras de absorbância foram realizadas no leitor de infravermelho, no comprimento de onda de 700nm (*Odyssey LI-COR Bioscience*).

3.7 Espectros de NMR HSQC

Amostras enriquecidas uniformemente com ^{15}N foram obtidas por meio da expressão de IgD2^{R1} em *E. coli* em meio mínimo (M9) contendo $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ como única fonte de nitrogênio, seguida de purificação como descrito acima (item 3.5). Os experimentos foram realizados em um espectrômetro Bruker Avance III equipado com uma sonda resfriada TCI e operando à frequência de 800MHz para o núcleo de hidrogênio. Os espectros de ^1H - ^{15}N HSQC foram adquiridos com pulsos de *flip back* aplicados sobre a água a fim de manter a sua magnetização em “z” durante todo o experimento, e *watergate* para supressão do sinal da água (*fast HSQC*)⁴¹.

4 Resultados

4.1 Visão geral

Em uma visão geral, nosso trabalho consiste em identificar os domínios de VEGFR-3 responsáveis pela interação com PCAIWF. Para isto, vamos cloná-los e expressá-los. Em seguida, realizar ensaios de funcionalidade e competição com seu ligante natural, o VEGF-C (ESQUEMA 1).

4.2 Análise estrutural de VEGFR-3

Como mencionado, os receptores da família do VEGF são compostos por domínios do tipo imunoglobulina (Ig), sendo que o segundo domínio Ig (IgD2) é o principal ponto de contato com o ligante⁴². Sendo assim, iniciamos o trabalho identificando os domínios presentes na molécula de VEGFR-3. Para isto, recorreremos ao NCBI (*National Center for Biotechnology information*) e às informações presentes em bancos de dados estruturais (*Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Databank*, RCSB PDB). Sabe-se que, no caso específico do VEGFR-3, os domínios 1, 2 e 3 são importantes para a ligação de VEGF-C e VEGF-D⁴³. Curiosamente, quando a estrutura deste receptor, complexada ao VEGF-C, foi resolvida, observou-se que não há contato entre este domínio do VEGFR-3 (IgD1^{R3}) e o ligante⁴⁴. Desta forma, a exata função deste domínio na interação com o ligante e ativação do receptor ainda precisa ser elucidada.

A análise das estruturas disponíveis nos bancos de dados, juntamente com as informações disponíveis na literatura, nos permitiu identificar a sequência proteica de cada um dos domínios de imunoglobulina do VEGFR-3. Apesar dos autores⁴⁴ mencionarem a importância do domínio 1 para a ligação com VEGF-C, não há nenhum contato claro que tenhamos detectado entre o ligante e este domínio (FIGURA 7). Portanto, decidimos focar nossos estudos nos domínios 2 e 3.

No trabalho de Leppänen, os diferentes domínios do receptor VEGFR-3 foram expressos em pares (D1-D2 e D4-D5), e cada par foi cristalizado individualmente. As estruturas obtidas foram utilizadas para criar um modelo 3D do complexo VEGFR-3/VEGF-C⁴⁴. Tendo isto em vista, utilizamos como modelo as estruturas contendo os domínios 1 e 2 em complexo

com o ligante VEGF-C (FIGURA 8), e, a partir dela, determinamos precisamente os resíduos de início e fim do domínio 2.

Não encontramos trabalhos contendo a estrutura cristalizada do domínio 3, apenas dos domínios 1, 2, 4 e 5. Deste modo, utilizamos o mesmo procedimento para determinar o início do domínio 4, e, utilizando a sequência de DNA integral do VEGFR-3 (*NCBI Reference Sequence: NM_002020.4*) e os limites já estabelecidos para o domínio 2, consideramos como domínio 3 toda a região entre o domínio 2 e domínio 4 (FIGURA 9).

Figura 9. **Representação estrutural dos domínios 4 e 5 e sequência de DNA dos domínios 2, 3 e 4 de VEGFR-3.** (a) Em amarelo, resíduos demonstrando o início do domínio 4. (b) Não há estrutura cristalizada, descrita em literatura, para o domínio 3 de VEGF-R3. Portanto, foi considerado domínio 3 (verde) toda a região entre o domínio 2 (azul) e domínio 4 (vermelho).

PDB code: 4BSJ

Portanto, as sequências das duas regiões determinadas (FIGURA 10) foram então clonadas em vetor de expressão, como detalhado no tópico seguinte.

a

IgD2^{R3}

atggagcagccattcatcaacaagcctgacacgctccttgggtcaacaggaaggacgccatg
 M E Q P F I N K P D T L L V N R K D A M
 tgggtgccctgtctggtgtccatccccggcctcaatgtcacgctgcgctcgcaaagctcg
 W V P C L V S I P G L N V T L R S Q S S
 gtgctgtggccagacggggcaggaggtggtgtgggatgaccggcggggcatgctcgtgtcc
 V L W P D G Q E V V W D D R R G M L V S
 acgccactgctgcacgatgccctgtacctgcagtgcgagaccacctggggagaccaggac
 T P L L H D A L Y L Q C E T T W G D Q D
 ttcctttccaaccccttcctggtgcacatcacaggcaacgagctcctcgagcaccaccac
 F L S N P F L V H I T G N E L L E H H H
 caccaccactga
 H H H -

Total de aminoácidos: 103

Peso Molecular Teórico: 11,9 Kda

Ponto Isoelétrico Teórico: 5,43

b

IgD2D3^{R3}

atggagcagccattcatcaacaagcctgacacgctccttgggtcaacaggaaggacgccatg
 M E Q P F I N K P D T L L V N R K D A M
 tgggtgccctgtctggtgtccatccccggcctcaatgtcacgctgcgctcgcaaagctcg
 W V P C L V S I P G L N V T L R S Q S S
 gtgctgtggccagacggggcaggaggtggtgtgggatgaccggcggggcatgctcgtgtcc
 V L W P D G Q E V V W D D R R G M L V S
 acgccactgctgcacgatgccctgtacctgcagtgcgagaccacctggggagaccaggac
 T P L L H D A L Y L Q C E T T W G D Q D
 ttcctttccaaccccttcctggtgcacatcacaggcaacgagctctatgacatccagctg
 F L S N P F L V H I T G N E L Y D I Q L
 ttgcccaggaagtcgctggagctgctggttaggggagaagctggtcctgaactgcaccgtg
 L P R K S L E L L V G E K L V L N C T V
 tgggctgagtttaactcaggtgtcacctttgactgggactaccaggggaagcaggcagag
 W A E F N S G V T F D W D Y P G K Q A E
 cggggtaagtgggtgcccagcgacgctcccagcagacccacacagaactctccagcatc
 R G K W V P E R R S Q Q T H T E L S S I
 ctgaccatccacaacgtcagccagcagacctgggctcgtatgtgtgcaaggccaacaac
 L T I H N V S Q H D L G S Y V C K A N N
 ggcattccagcgatttcgggagagcaccgaggtcattgtgcatgaaaatcccttcctcgag
 G I Q R F R E S T E V I V H E N P F L E
 caccaccaccaccaccactga
 H H H H H H -

Total de aminoácidos: 206

Peso Molecular Teórico: 23,8 Kda

Ponto Isoelétrico Teórico: 5,68

Figura 10. Sequência de DNA (e aminoácidos) dos domínios recombinantes de VEGFR-3 construídos. (a) Sequência de IgD2^{R3} (b) IgD2D3^{R3}.

4.3 Clonagem & expressão em *E. coli*

A região codificante para um dos domínios selecionados foi clonada no vetor de expressão pET21a, utilizando-se técnicas rotineiras de biologia molecular (detalhes na seção de *materiais e métodos*). A padronização do processo de expressão das proteínas recombinantes IgD2^{R3} e IgD2D3^{R3} teve início pela escolha das cepas utilizadas: Rosetta (DE3) e Rosetta (DE3) pLysS, ambas variações da BL21, uma cepa comumente utilizada para a expressão de proteínas heterólogas em bactérias. A opção por tais cepas se deu por ambas serem recomendadas para expressão com o sistema pET (via amplificação utilizando a T7 RNA Polimerase) e, principalmente, por suplementarem a expressão de tRNAs para códons raros em *E. coli*. As cepas Rosettas fornecem tRNAs para os códons raros AUA, AGG, AGA, CUA, CCC e GGA, melhorando a expressão de proteínas eucarióticas em *E. coli*.

Testamos diferentes concentrações de IPTG durante a etapa de indução. O IPTG, isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo, é um composto mimético à lactose e é utilizado para aumentar a expressão proteica através, do aumento da transcrição, em sistemas regulados pelo operon *lac*. Tem como característica o fato de não ser degradado pelo organismo, e, consequentemente, ter concentração constante durante toda a etapa de indução. Utilizamos valores numa faixa de 0,2 à 1mM, sendo que a concentração comumente utilizada na literatura é 1mM. Observamos que não houve variação significativa da produção das proteínas recombinantes quando utilizamos 0,2 e 1 mM de IPTG (Figura 11).

4.4 Lise & purificação

Uma vez determinadas as condições de expressão em *E. coli*, a próxima etapa foi determinar em qual fração celular as proteínas recombinantes se encontravam. Isto é importante para definirmos as estratégias de purificação das proteínas e determinar se elas encontram-se enoveladas corretamente. Para isto, as células de *E. coli* foram rompidas e separadas em fração solúvel e insolúvel. Observamos que ambas as proteínas recombinantes, IgD2^{R3} e IgD2D3^{R3}, encontram-se na fração insolúvel (corpos de inclusão). Não observamos quantidades significativas das proteínas nas frações solúveis (FIGURA 12).

Figura 12. **Distribuição das proteínas recombinantes de VEGFR-3 nas diferentes frações celulares.** Cepa Rosetta (DE3) PlysS, de *E. coli*, transformada com os respectivos plasmídeos codificando os domínios de VEGFR-3 foi cultivada a 18°C durante a noite na presença de 0.2 ou 1 mM de IPTG. Após indução, as células foram rompidas e separadas em fração solúvel (sobrenadante) e insolúvel (pellet) e analisadas por SDS-PAGE; a presença dos domínios IgD2^{R3} e IgD2D3^{R3} estão indicadas (setas).

É desejável que proteínas recombinantes produzidas em *E. coli* estejam em suas condições nativas, pois, numa única etapa de purificação, pode-se obter as mesmas funcionalmente ativas (solúveis e corretamente enoveladas). Por isso, testamos diferentes condições de indução, visando favorecer a expressão de proteínas na forma solúvel. A cepa utilizada, a temperatura, o tempo de indução e a concentração de IPTG podem afetar a solubilidade proteica. A taxa metabólica bacteriana é regulada indiretamente pela temperatura, uma vez que esta modula a atividade enzimática e, conseqüentemente, a velocidade das vias do metabolismo. De um modo geral, em *E. coli*, a atividade enzimática é crescente até 37°C. Acima deste valor, a atividade cai exponencialmente. Em alguns casos, um metabolismo desacelerado favorece o enovelamento proteico, aumentando a solubilidade da proteína produzida. Observamos, porém, que variações de temperatura de crescimento da bactéria durante a

expressão das proteínas recombinantes (18°C, 30°C e 37°C) não mudou a solubilidade das mesmas; elas continuam em corpo de inclusão (FIGURA 13).

Figura 13. **Variações na temperatura de indução não alteram a solubilidade da proteína produzida.** Cepa Rosetta (DE3) PlysS, de *E. coli*, transformada com os respectivos plasmídeos codificando os domínios de VEGFR-3 e induzida com IPTG. Proteínas expressas indicadas (setas). (a) IgD2D3^{R3} induzido à 30 °C; (b) IgD2^{R3} induzido à 30 °C; (c) IgD2^{R3} (esquerda) e IgD2D3^{R3} (direita) induzidos à 18 °C.

Em muitos casos, o enovelamento proteico não ocorre adequadamente e regiões hidrofóbicas interagem intermolecularmente. É importante citar que o enovelamento ocorre num ambiente celular extremamente concentrado (300-400 mg/ml de proteínas e outras macromoléculas), o que torna o maquinário molecular adequado essencial. Outra possibilidade está relacionada à velocidade de expressão: a formação da proteína pode não estar “sincronizada” com seu enovelamento, que ocorre mais lentamente. Deste modo, haverá o acúmulo de proteínas com dobramento incorreto, levando à agregação e precipitação. Além destes fatores, modificações pós-traducionais também podem influenciar a solubilidade proteica.

Tendo isto em mente, testamos diferentes cepas na tentativa de obter a proteína solúvel (TABELA 1). A ArcticExpress (DE3), por exemplo, expressa as chaperonas *Cpn10* e *Cpn60*, que mimetizam o sistema GroEL/GroES, auxiliando o enovelamento proteico. GroEL é um

heptâmero de 60KDa (cada subunidade) que assume estrutura em “U”, enquanto GroES é um também heptâmero de 10KDa (cada subunidade), com estrutura em forma de domo. Proteínas com enovelamento incorreto interagem com o interior hidrofóbico de GroEL, ocupando-o. GroES atua como “tampa”, incubando a proteína dentro do complexo GroEL/GroES. Em seguida, o interior hidrofóbico sofre uma mudança conformacional, tornando-se hidrofílico. Tal alteração induz o re-enovelamento da proteína incubada, que é posteriormente liberada. Além disso, esta cepa foi modificada para trabalhar a 12°C, favorecendo o enovelamento proteico e desfavorecendo sua expressão. Porém, apesar destas mudanças, os resultados foram semelhantes às outras cepas (FIGURA 14).

Testamos também diferentes tempos de indução com IPTG (3h, 5h e overnight - 14-16hrs). Estas condições devem ser determinadas empiricamente, uma vez que variam de acordo

com a cepa utilizada e a proteína expressa. Por exemplo, uma proteína pode ser bem expressa em uma cepa, mas em outra pode necessitar de mais tempo, ou uma temperatura diferente, ou pode até mesmo ser tóxica e matar a bactéria. Portanto, testar diferentes combinações destas condições é fundamental durante a padronização do método de expressão. Em nossos testes, obtivemos resultados semelhantes entre as combinações, com a proteína sendo expressa sempre de forma insolúvel.

Outra variável, mais difícil de ser equacionada, refere-se ao fato do ambiente intracelular ser redutor e não favorecer a formação de ligações dissulfeto. Os domínios de VEGFRs são caracterizados por possuírem, cada um, um par de resíduos de cisteína. Estes resíduos são responsáveis por formar uma ligação dissulfeto importante para a estrutura dos domínios. Possivelmente, a não formação desta ligação ou a formação de ligações intermoleculares (e não intramoleculares) esteja impedindo que IgD2^{R3} e IgD2D3^{R3} adquiram o enovelamento correto. No caso da *E. coli*, tal ambiente é redutor, fato que não favorece a formação de ligações dissulfeto (e sim a sua quebra). Em função deste fato, optamos por testar outra cepa, a Origami. Ela contém mutações em duas redutases, tioredoxina e glutatona, de modo a facilitar a formação de ligações dissulfeto. Porém, durante os testes, esta cepa apresentou crescimento demasiadamente lento e difícil, fato que nos levou a descartá-la.

Tabela 2. Diferentes cepas testadas e suas principais características.

Cepa	Características
Rosetta DE3	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Projetada para otimizar a expressão de proteínas eucarióticas que utilizam códons raros em <i>E. coli</i>, fornecendo tRNAs para os códons AUA, AGG, AGA, CUA, CCC e GGA; ❖ Cloranfenicol resistente.
Rosetta DE3 pLysS	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Projetada para otimizar a expressão de proteínas eucarióticas que utilizam códons raros em <i>E. coli</i>, fornecendo tRNAs para os códons AUA, AGG, AGA, CUA, CCC e GGA; ❖ Expressão de lisozima, responsável por suprimir a expressão basal da proteína heteróloga (via inibição da T7 RNA Polimerase). ❖ Cloranfenicol resistente.
ArcticExpress (DE3)	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Expressão das chaperoninas <i>Cpn10</i> e <i>Cpn60</i>, que auxiliam no enovelamento proteico; ❖ Resistente à temperaturas de até 10°C; ❖ Gentamicina resistente.
Origami	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Projetada para para otimizar a formação de ligações dissulfeto, através de mutação nos genes de tioredoxina redutase e glutathione redutase; ❖ Crescimento relativamente lento; ❖ Kanamicina e tetraciclina resistente.

Chegamos ao entendimento de que a ligação dissulfeto dificilmente seria formada corretamente no ambiente redutor intracelular da *E. coli*, uma vez que todas as condições testadas levaram ao mesmo cenário: a proteína presente em corpos de inclusão. Portanto, optamos pela estratégia de forçar a produção da proteína na sua forma insolúvel para então realizar o enovelamento *in vitro*.

Na realidade, a produção de proteínas recombinantes em corpos de inclusão apresenta um aspecto positivo, que se deve ao fato de proteínas obtidas de corpos de inclusão apresentam um alto grau de pureza ao final do processo. Isto porque os corpos de inclusão são formados

quase que exclusivamente pela proteína induzida. Segundo, etapas de lavagem são capazes de eliminar outras organelas, frações da parede celular, proteínas, DNA e demais detritos celulares, resultando numa proteína recombinante com purezas acima de 90-95%, numa única etapa de purificação⁴⁵.

As proteínas expressas no vetor pET21, utilizado neste estudo, apresentam uma cauda de histina (6x-His) em sua porção carboxi-terminal, o que permite a purificação utilizando-se cromatografia de afinidade em resina de Ni^{2+} complexada ao ácido nitriloacético (Ni^{2+} -NTA). As proteínas foram purificadas em condições desnaturantes (8M de ureia) e obtidas com um elevado grau de pureza (>95%).

4.5 Re-enovelamento

Em seguida, iniciamos os estudos de re-enovelamento das proteínas obtidas. Para isto, é necessário remover a ureia utilizada na solubilização dos corpos de inclusão e purificação por cromatografia de afinidade. A estrutura química da ureia é composta por dois átomos de nitrogênio e um de oxigênio, enquanto a água é composta apenas por um átomo de oxigênio, fato que confere à ureia um poder maior de solvatação. Ou seja, a capacidade da ureia em romper ligações de hidrogênio, interações iônicas e hidrofóbicas intra e intermoleculares do soluto é maior do que a da água⁴⁶. Esta capacidade pode ser medida através da constante dielétrica do solvente. Consequentemente, alguns solutos serão solúveis em ureia e insolúveis em água, como é o caso dos corpos de inclusão. Deve-se ressaltar que não necessariamente um solvente mais forte, de constante dielétrica maior, é melhor. Por exemplo, se o objetivo é ter em solução uma proteína ativa, com estrutura geométrica adequada, é ideal optar por um solvente forte o suficiente para solubilizar tal proteína mas fraco o suficiente para não romper as interações eletrônicas que caracterizam sua estrutura. Portanto, após solubilizar os corpos de

inclusão, a etapa seguinte foi a determinação de qual seria o tampão utilizado para o enovelamento proteico.

Dois protocolos são comumente utilizados nesta etapa: a diálise gradual e a diluição rápida. No primeiro caso, a ureia é removida gradualmente por diálise (de 8 para 4M, de 4M para 2M, etc), permitindo que a proteína tenha tempo para se enovelar corretamente. A proteína IgD2D3^{R3} precipitou durante a diálise e não pode ser obtida utilizando-se este protocolo. O fenômeno de precipitação ocorreu porque, durante o enovelamento, resíduos hidrofóbicos dos domínios estavam expostos ao solvente e, conseqüentemente, suscetíveis à interações intermoleculares que desencadeiam a precipitação. Portanto, pode-se afirmar que a concentração proteica está diretamente relacionada à probabilidade de interações intermoleculares indesejadas ocorrerem. Por outro lado, o protocolo funcionou para a proteína IgD2^{R3}, que pode ser obtida em forma solúvel. No entanto, observamos a presença de oligômeros da proteína (dímeros, trímeros, etc) devido à formação incorreta de ligações dissulfeto (FIGURA 15). Isto ocorreu porque a diálise gradual é realizada com concentrações relativamente altas das proteínas, favorecendo a colisão entre moléculas e a formação de ligações dissulfeto intermoleculares.

Para solucionar ambos os problemas (concentração limite e muito tempo na estrutura intermediária), optamos por utilizar o método de diluição rápida⁴⁷. Nele, a ureia é removida em uma única etapa, através de diluição num tampão nativo, evitando a permanência em estados intermediários de enovelamento, como ocorre na diálise gradual. Além disso, a concentração da proteína diminui bastante (neste caso, para aproximadamente 50 µg/ml). Deste modo, o enovelamento ocorre de forma rápida e “isolada”, evitando possíveis interações intermoleculares. Aliado à isso, optamos por incluir β-mercaptoetanol na etapa de solubilização dos corpos de inclusão, também com o intuito de minimizar possíveis interações dissulfeto. Este método se mostrou eficaz tanto para IgD2^{R3} como para IgD2D3^{R3}, pois conseguimos obter proteínas solúveis em ambos os casos, sem a presença de quantidades significativas de formas oligoméricas das proteínas (Figura 16).

Figura 16. As proteínas recombinantes obtidas por diluição rápida são monoméricas. As proteínas recombinantes IgD2^{R3} e IgD2D3^{R3} foram enoveladas pelo método de diluição rápida e analisadas por SDS-PAGE em condições não redutoras (esquerda) ou redutoras (direita).

4.6 Ensaios de funcionalidade

4.6.1 Ligação

A etapa seguinte do trabalho consistiu em verificar a funcionalidade dos domínios recombinantes produzidos. Para tal, utilizamos um ensaio de FLISA com a finalidade de determinar a capacidade de ligação entre os domínios produzidos e seus ligantes. Neste ensaio, as proteínas recombinantes re-enoveladas pelo método de diluição rápida foram imobilizadas em placas de poliestireno e incubadas com o ligante natural do VEGFR-3, o VEGF-C. Observamos que ambos os domínios IgD2^{R3} e IgD2D3^{R3} ligam VEGF-C de forma específica (FIGURA 17a). Os resultados obtidos demonstraram que o nosso protocolo de expressão, purificação e re-enovelamento foi efetivo, resultando em proteínas funcionais.

Uma vez determinada a funcionalidade das proteínas produzidas, as mesmas foram utilizadas para mapear o domínio de ligação do peptídeo PCAIWF. Após serem imobilizadas em placas de poliestireno, os domínios recombinantes foram incubados com o fago PCAIWF

ou com o fago controle Fd, que não apresenta nenhum peptídeo exógeno. As placas foram lavadas e os fagos ligados às proteínas quantificados por FLISA. Observamos ligação de fagos às duas proteínas produzidas, IgD2^{R3} e IgD2D3^{R3}, apenas quando foram incubadas com o fago PCAIWF. Não houve interação significativa do fago Fd com as proteínas recombinantes (FIGURA 17b).

4.6.2 Competição

Para confirmar a especificidade da interação, ensaios de competição foram realizados. Os ensaios de ligação do fago PCAIWF e do ligante natural VEGF-C aos domínios de VEGFR-3 produzidos foram repetidos na presença ou ausência do peptídeo sintético PCAIWF. Como controle dos ensaios, utilizamos o peptídeo sintético IFCAPW, que contém, em sequência diferente, os mesmos resíduos de aminoácidos do peptídeo PCAIWF. Nossos resultados mostraram que apenas o peptídeo PCAIWF inibe a ligação do VEGF-C (FIGURA 18a) e do fago PCAIWF (Figura 18b) aos domínios IgD2^{R3} e IgD2D3^{R3}.

4.7 IgD2^{R1}

Ao longo deste estudo, e conforme mencionado na nossa introdução, a Dr. Michaloski demonstrou que apesar do Fago PCAIWF ser um ligante seletivo do receptor VEGFR-3, o peptídeo sintético correspondente é, na realidade, um *pan*-inibidor de VEGF. Ou seja, na sua forma sintética, o peptídeo PCAIWF liga-se aos três receptores de VEGF (VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3), inibindo a ligação de seus ligantes correspondentes (VEGF-A e PlGF, no caso do VEGFR-1; VEGF-A e VEGF-C, no caso do VEGFR-2 e VEGF-C, no caso do VEGFR-3). Uma vez estabelecido que o domínio de ligação do fago PCAIWF no VEGFR-3 coincide com o principal domínio de ligação ao VEGF-C (o domínio IgD2^{R3}), decidimos ampliar os estudos para obter mais informações sobre o domínio de ligação do fago PCAIWF também nos outros receptores. Para isto, outras técnicas para estudos de biologia estrutural são necessárias, uma vez o Fago PCAIWF não interage com estas proteínas.

Observamos na literatura que o domínio IgD2^{R1}, principal responsável pela ligação do VEGF-A do VEGFR-1, foi assinalado utilizando-se a técnica de NMR HSQC (*Nuclear Magnetic Resonance Heteronuclear Single Quantum Coherence*)⁴⁸. Esta é uma excelente técnica para estudar interações proteína-proteína, ou no nosso caso, peptídeo-proteína⁴⁹. Por isso, clonamos a região codificante do domínio IgD2^{R1} humano no mesmo vetor de expressão utilizado para a produção dos domínios de VEGFR-3, e produzimos a proteína correspondente (FIGURA 19). De forma semelhante aos domínios IgD2^{R3} e IgD2D3^{R3}, a proteína recombinante IgD2^{R1} também foi produzida via corpos de inclusão em *E. coli*, sendo purificada em coluna de afinidade (Ni²⁺ NTA) e re-enovelada pelo protocolo de diluição rápida (detalhes na seção de *Materiais e Métodos*).

Uma vez otimizado o processo de produção da IgD2^{R1} utilizando o isótopo ¹⁵N, os espectros de HSQC de ¹⁵N da nossa proteína foram obtidos com a finalidade de verificarmos, por comparação com os dados obtidos da literatura, seu correto re-enovelamento. Estes estudos foram feitos com a colaboração da Dra. Layara Abiko. Para nossa satisfação, nossos dados com o domínio IgD2^{R1} reproduziram os resultados da literatura, e todas as ressonâncias do espectro foram assinaladas (FIGURA 20). Com isto, o próximo passo nesta vertente da pesquisa será a realização de ensaios de RMN na presença de concentrações crescentes do peptídeo PCAIWF, em busca de alterações no espectro que possam nos indicar os resíduos de IgD2^{R1} que interagem o peptídeo.

5 Discussão

Um dos objetivos do nosso laboratório é a pesquisa com cunho translacional, ou seja, pesquisa básica que possa ser convertida em insumos terapêuticos ou para uso diagnóstico. Um exemplo é o peptídeo identificado pela Dr. Michaloski (Anexo 1), e tema desta dissertação, que pode ser considerado um pré-fármaco. Desta forma, nosso estudo tinha dois grandes objetivos. O primeiro foi concluído: identificar o domínio de ligação do peptídeo no receptor VEGFR-3. Caminhamos também para atingir o segundo grande objetivo, que era entender os requerimentos estruturais da interação deste peptídeo com o ligante. Isto é essencial para o desenho racional de fármaco, uma vez que peptídeos não são moléculas ideais para serem utilizadas como medicamentos.

Um dos desafios deste trabalho foi produzir as proteínas recombinantes contendo os domínios Ig de interação com o VEGF. O VEGFR-3 é produzido por células de mamíferos, contém glicosilações e ligações dissulfeto importantes para o correto enovelamento de cada domínio Ig. De fato, muitos dos estudos estruturais publicados utilizaram proteínas produzidas por células eucarióticas (por exemplo, o sistema de baculovírus), que permitem a glicosilação e formação de ligações dissulfeto⁴⁴. Apenas o domínio IgD2^{R1} tem sido produzido com sucesso em *E. coli*, e nós conseguimos produzir este domínio e reproduzir dados de RMN existentes na literatura. Isto talvez explique a maior dificuldade para enovelar o domínio IgD2^{R3}.

Bactérias não possuem o maquinário molecular (isto é, enzimas, ambiente oxidante, etc.) adequado para proteínas de alta complexidade, diferentemente de células eucariotas⁵⁰. Embora os domínios IgD2^{R3} e IgD2D3^{R3} tenham um par de cisteínas interno em cada domínio Ig, optamos pela expressão em bactéria por considerarmos que a facilidade de trabalho, a rapidez e o rendimento da expressão proteica bacteriana compensariam a dificuldade de realizar o re-enovelamento *in vitro*. Provavelmente, células eucarióticas conseguiriam expressar os

domínios solúveis e com enovelamento correto. Porém, sua cultura é muito mais cara e trabalhosa que a bacteriana, demora mais e rende menos, principalmente se levarmos em conta os estudos de RMN. Para realizar a marcação isotópica de proteínas com ^{15}N e ^{13}C , o sistema bacteriano (*E. coli*) é ideal, uma vez que a bactéria é um organismo que consegue sintetizar todos os seus nutrientes a partir de elementos simples, com uma fonte de carbono (glicose marcada com ^{13}C), amônio (^{15}N), fósforo e sais minerais. Já as células eucarióticas, como células de inseto (baculovírus), precisam de meios complexos, contendo todos os aminoácidos uniformemente marcados com o isótopo desejado. Estes meios tem um custo altíssimo, limitando este tipo de pesquisa. Desta forma, nossa escolha pelo sistema bacteriano para expressão dos domínios recombinantes foi também pensando nestes estudos estruturais.

O processo de enovelamento é único para cada proteína, e a metodologia deve ser adaptada de acordo. Neste processo, a proteína passa por três conformações sucessivas: Desnaturada, intermediária e nativa (FIGURA 21). A primeira é caracterizada por ser amorfa, sem estrutura tridimensional definida. A segunda é um híbrido entre as outras duas, em que parte da proteína assume conformação nativa e parte ainda encontra-se desnaturada, enquanto a terceira define-se quando 100% da proteína está em sua forma nativa⁵¹.

A fase intermediária do processo de enovelamento é delicada e mais demorada, pois pode levar à precipitação, fato que ocorreu durante os testes de estabilidade. Os domínios recombinantes assumem conformação intermediária na presença de ~1M de ureia, o que significa que parte de suas regiões hidrofóbicas ainda estão expostas ao solvente, suscetíveis à interações intermoleculares. É mais estável termodinamicamente que uma região hidrofóbica interaja com outra região hidrofóbica e não com o solvente, que é polar. Na diálise gradual, a solução passa aproximadamente 2 horas em cada concentração, tempo que aumenta ainda mais a probabilidade de formação de ligações inter-moleculares e a consequente precipitação da

proteína. Portanto, a efetividade deste processo não era ideal, e, embora uma quantidade razoável de proteínas tenha se enovelado corretamente, uma quantidade também razoável agregou.

Durante os primeiros ensaios, notamos que quando o re-enovelamento da proteína era realizado com altas concentrações (>1 mg/ml), havia sempre a formação de precipitados (em especial com IgD2D3^{R3}, por ter estrutura mais complexa que IgD2^{R3}). Como mencionado, durante o enovelamento, é provável que a grande proximidade entre as cisteínas livres, bem como o interior hidrofóbico dos domínios, estejam expostos ao solvente e consequentemente suscetíveis à interações intermoleculares, desencadeando a precipitação. Portanto, a concentração está diretamente relacionada à probabilidade de interações intermoleculares indesejadas ocorrerem. Por isso, em todos os casos, o processo mais eficiente para re-enovelar as proteínas recombinantes produzidas foi por diluição rápida, método que minimiza o contato entre cisteínas livres encontradas em cadeias polipeptídicas distintas. Desta forma, nós conseguimos produzir em *E. coli* os dois domínios principais de ligação de VEGF, o IgD2^{R1} e o IgD2^{R3}, além também do IgD2D3^{R3}, todos em sua forma funcional.

Resta saber se a proteína será estável o bastante, em solução, para os estudos de RMN. Isto porque o tampão utilizado na obtenção dos espectros de RMN pode influenciar diretamente a estabilidade da proteína. Como a aquisição dos espectros de RMN é relativamente demorada, podendo levar dias ou mesmo semanas, neste período, a proteína não pode precipitar ou agregar, levando ao desaparecimento do sinal ou no surgimento de alterações no espectro. Desta forma, a primeira etapa antes da aquisição dos espectros é encontrar um tampão onde a proteína permaneça estável pelo tempo necessário à temperatura ambiente. Para tal, utilizamos, com sucesso, o tampão nativo utilizado no re-enovelamento de nossas proteínas recombinantes. Observamos ainda que com o aumento da força iônica (concentrações de NaCl > 100 mM), a proteína tendia a precipitar com o tempo, mas que em condições de baixo sal (50 mM ou menos

de NaCl), a proteína permaneceu estável e em solução por várias semanas. Estes são resultados promissores, mas ainda precisamos aguardar os resultados iniciais de aquisição de espectros de HSQC e a contagem do número de ressonâncias observadas nos espectros, que deve ser igual ao número de resíduos da proteína, de forma geral.

Os estudos da interação PCAIWF/ IgD2^{R1} já estão sendo realizados, auxiliados pelos dados da literatura, onde o assinalamento de todas as ressonâncias deste domínio por RMN foi realizado. O mesmo não pode ser dito sobre o receptor VEGFR-3, que ainda não possui bons estudos via RMN. Uma opção seria a utilização da técnica de cristalografia. Porém, do mesmo modo que os estudos via RMN, os dados estruturais obtidos para o complexo VEGFR-3\VEGF-C e disponíveis para consulta foram obtidos em baixa resolução (entre 3.4 - 4Å). Esta resolução mal permite um assinalamento preciso da cadeia principal da proteína, quanto mais de suas cadeias laterais. Por isso, o trabalho de mapeamento da interação PCAIWF/ IgD2^{R3} demandará mais estudos, como o assinalamento de cada ressonância, e se possível, a resolução da estrutura por RMN.

Finalmente, o ensaio de ligação que estabelecemos por FLISA poderá servir de base para o desenvolvimento de uma plataforma de varredura de novos fármacos miméticos deste peptídeo. Porém, para a otimização deste método, seria de grande valia sabermos a afinidade entre o peptídeo e o receptor (por exemplo, VEGFR-3 ou IgD2^{R3}). Realizamos alguns estudos preliminares por métodos de microcalorimetria. Entretanto, a baixa solubilidade do peptídeo PCAIWF em meio aquoso e sua dependência de pequenas concentrações de dimetilsulfóxido (DMSO) para mantê-lo nas concentrações inibitórias inviabilizaram estes estudos. Talvez os experimentos de RMN possam auxiliar na determinação do K_d entre o peptídeo e o domínio recombinantes, e, assim, possamos otimizar o ensaio de varredura de fármacos.

6 Conclusão

O processo de angiogênese está associado a diferentes doenças, direta ou indiretamente. Embora esta associação seja conhecida há relativamente bastante tempo, poucos são os fármacos anti-angiogênicos disponíveis atualmente no mercado. Esta escassez faz necessário o desenvolvimento de fármacos alternativos, validando a linha de pesquisa do nosso grupo. Aliado a essa escassez, temos o fato de que tais fármacos apresentam alguns efeitos colaterais, pois estão associados à inibição de vias de sinalização que regulam outros processos além da angiogênese.

O trabalho apresentado nesta dissertação representa uma etapa dentro da linha de pesquisa de nosso laboratório. Esta etapa consistiu no estudo da interação de PCAIWF, nosso peptídeo com ação anti-angiogênica, aos receptores de VEGF, na produção dos domínios recombinantes responsáveis por tal interação e no início da construção de uma plataforma de varredura para identificação de compostos miméticos a PCAIWF. Estes domínios, agora, poderão ser usados para expandir os estudos da interação PCAIWF/VEGFRs utilizando diferentes técnicas, como, por exemplo, RMN, e a plataforma poderá ser aperfeiçoada para que, então, a varredura de identificação possa ser realizada.

7 Referências

1. KÄSSMEYER, S; Plendl, J; Custodis, P; Bahramsoltani, M. (2009) **New insights in vascular development: vasculogenesis and endothelial progenitor cells.** *Anatomy Histology Embryology*. Feb, Vol. 38, p. 1–11.
2. NIELSEN, K.S. (1984) **Scaling: Why is animal size so important?** *Cambridge University Press*. Cambridge, 1^a edição, capítulo 9.
3. HANAHAN, D; Folkman, J. (1996) **Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis.** *Cell*. Aug, Vol. 86, p. 353–364.
4. CARMELIET, P. (2003) **Angiogenesis in health and disease.** *Nature Medicine*. Jun, Vol 9, p. 653-660.
5. FOLKMAN, J. (2007) **Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?** *Nature Reviews Drug Discovery*. Apr, Vol. 6, p. 273-286.
6. FOLKMAN, J. (1971) **Tumor angiogenesis: therapeutic implications.** *The New England Journal of Medicine*. Nov, Vol. 285, p. 1182-1186.
7. NEVE, A; Cantatore, FP; Maruotti, N; Corrado, A; Ribatti, D. (2014) **Extracellular matrix modulates angiogenesis in physiological and pathological conditions.** *BioMed Research International*. May, Vol. 2014.

8. CRISTOFANILLI, M; Charnsangavej, C; Hortobagyi, GN. (2002) **Angiogenesis modulation in cancer research: novel clinical approaches.** *Nature Reviews Drug Discovery*. Jun, Vol. 1, p. 415-426.
9. CHUNG, AS; Ferrara, N. (2011) **Developmental and pathological angiogenesis.** *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. Nov, Vol. 27, p. 563-584.
10. BISELLI-CHICOTE, PM; Oliveira, AR; Pavarino, EC; Goloni-Bertollo, EM. (2012) **VEGF gene alternative splicing: pro- and anti-angiogenic isoforms in cancer.** *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. Mar, Vol. 138 p. 363-370.
11. SENGER, DR; Galli, SJ; Dvorak, AM; Perruzzi, CA; Harvey, VS; Dvorak, HF. (1983) **Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid.** *Science*. Feb, Vol. 219, p. 983-985.
12. LEUNG, DW; Cachianes, G; Kuang, WJ; Goeddel, DV; Ferrara, N. (1989) **Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen.** *Science*. Dec, Vol. 246, p. 1306-1309.
13. KECK, PJ; Hauser, SD; Krivi, G; Sanzo, K; Warren, T; Feder, J; Connolly, DT. (1989) **Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF.** *Science*. Dec, Vol. 246, p. 1309-1312.

14. NAGY, JA; Dvorak, AM; Dvorak, HF. (2007) **VEGF-A and the induction of pathological angiogenesis.** *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. Feb, Vol. 2, p. 251-275.

15. BRY, M; Kivelä, R; Leppänen, VM; Alitalo, K. (2014) **Vascular endothelial growth factor-b in physiology and disease.** *Physiological Reviews*. Jul, Vol. 94, p. 779-794.

16. ROBCIUC, MR; Kivelä, R; Williams, IM; de Boer, JF; van Dijk, TH; Elamaa, H; Tigistu-Sahle, F; Molotkov, D; Leppänen, VM; Käkelä, R; Eklund, L; Wasserman, DH; Groen, AK; Alitalo, K. (2016) **VEGFB/VEGFR1-induced expansion of adipose vasculature counteracts obesity and related metabolic complications.** *Cell Metabolism*. Apr, Vol. 23, p. 712-724.

17. OLOFSSON, B; Jeltsch, M; Eriksson, U; Alitalo, K. (1999) **Current biology of VEGF-B and VEGF-C.** *Current Opinion in Biotechnology*. Dec, Vol. 10, p. 528–538.

18. ACHEN, MG; Jeltsch, M; Kukk, E; Mäkinen, T; Vitali, A; Wilks, AF; Alitalo, K; Stacker SA. (1998) **Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4).** *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Jan, Vol. 95, p. 548-553.

19. DEWERCHIN, M; Carmeliet, P. (2014) **Placental growth factor in cancer.** *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. Nov, Vol. 18, p. 1339-1354.

20. DEWERCHIN, M; Carmeliet, P. (2012) **PlGF: A multitasking cytokine with disease-restricted activity.** *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. Aug, Vol, 2.
21. FISCHER, C; Mazzone, M; Jonckx, B; Carmeliet, P. (2008) **FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy?** *Nature Reviews Cancer*. Dec, Vol. 8, p.942-956.
22. JELTSCH, M; Leppänen, VM; Saharinen, P; Alitalo, K. (2013) **Receptor tyrosine kinase-mediated angiogenesis.** *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. Sep, Vol. 5.
23. ROSKOSKI, R Jr. (2008) **VEGF receptor protein-tyrosine kinases: structure and regulation.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Oct, Vol. 375, p. 287–291.
24. SOKER, S; Takashima, S; Miao, HQ; Neufeld, G; Klagsbrun, M. (1998) **Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor.** *Cell*. Mar, Vol. 92, p. 735–745.
25. VIEIRA, JM; Ruhrberg, C; Schwarz, Q. (2010) **VEGF receptor signaling in vertebrate development.** *Organogenesis*. Apr-Jun, Vol. 6, p. 97-106.
26. SECKER, GA; Harvey, NL. (2015) **VEGFR signaling during lymphatic vascular development: from progenitor cells to functional vessels.** *Developmental Dynamics*. Mar, Vol. 244, p. 323–331.

27. CARMELIET, P; Jain, RK. (2011) **Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis.** *Nature*. May, Vol. 473, p. 298-307.
28. DUFRAINE, J; Funahashi, Y; Kitajewski, J. (2008) **Notch signaling regulates tumor angiogenesis by diverse mechanisms.** *Oncogene*. Sep, Vol. 27, p. 5132–5137.
29. CHUNG, AS; Lee, J; Ferrara, N. (2010) **Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis.** *Nature Reviews Cancer*. Jul, vol. 10, p. 505-514.
30. ELLIS, LM; Hicklin, DJ. (2008) **VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity.** *Nature Reviews Cancer*. Aug, Vol. 8, p. 579-591.
31. FERRARA, N; Adamis, AP. (2016) **Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy.** *Nature Reviews Drug Discovery*. Jun, Vol. 15, p. 385-403.
32. MOUNTZIOS, G; Pentheroudakis, G; Carmeliet, P. (2014) **Bevacizumab and micrometastases: revisiting the preclinical and clinical rollercoaster.** *Pharmacology & Therapeutics*. Feb, Vol. 141, p. 117–124.
33. SMITH, GP. (1985) **Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface.** *Science*. Jun, Vol. 228, p. 1315-1317.

34. GIORDANO, RJ; Cardó-Vila, M; Lahdenranta, J; Pasqualini, R; Arap, W. (2001) **Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands.** *Nature Medicine*. Nov, Vol. 7, p. 1249-1253.
35. RESENDE, RR; Gomez, MV; Guatimosim, S; Soccol, CR. (2016) **Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações.** *Editora Edgar Blucher Ltda.* São Paulo, 1ª edição, Vol. 3, capítulos 2-3.
36. SMITH, LE; Wesolowski, E; McLellan, A; Kostyk, SK; D'Amato, R; Sullivan, R; D'Amore, PA. (1994) **Oxygen-induced retinopathy in the mouse.** *Investigative Ophthalmology Visual Science*. Jan, Vol. 35, p. 101-111.
37. PIERCE, EA; Foley, ED; Smith, LE. (1996) **Regulation of vascular endothelial growth factor by oxygen in a model of retinopathy of prematurity.** *Archives of Ophthalmology*. Oct, Vol. 114, p. 1219-1228.
38. HARRISON, C. (2013) **Deal watch: Chiasma and Roche partner in oral peptide drug delivery.** *Nature Reviews Drug Discovery*. Apr, Vol. 12, p. 255.
39. BERTANI, G. (1951) **Studies on lysogenesis I. The mode of phage liberation by lysogenic escherichia coli.** *Journal of Bacteriology*. May, Vol. 62, p. 293-300.
40. BERTANI, G. (2004) **Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems.** *Journal of Bacteriology*. Feb, Vol. 186, p. 595-600.

41. MORI, S; Abeygunawardana, C; Johnson, MO; Vanzijl, PCM. (1995) **Improved sensitivity of HSQC spectra of exchanging protons at short interscan delays using a new fast HSQC (fHSQC): Detection scheme that avoids water saturation.** *Journal of Magnetic Resonance*, Jul, Vol. 108, p. 94-98.
42. JELTSCH, M; Karpanen, T; Strandin, T; Aho, K; Lankinen, H; Alitalo, K. (2006) **Vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF-C mosaic molecules reveal specificity determinants and feature novel receptor binding patterns.** *Journal of Biological Chemistry*. Apr, Vol 281, p. 12187-12195.
43. LEPPÄNEN, VM; Jeltsch, M; Anisimov, A; Tvorogov, D; Aho, K; Kalkkinen, N; Toivanen, P; Ylä-Herttuala, S; Ballmer-Hofer, K; Alitalo, K. (2011) **Structural determinants of vascular endothelial growth factor-D receptor binding and specificity.** *Blood*. Feb, Vol. 117, p.1507–1515.
44. LEPPÄNEN, VM; Tvorogov, D; Kisko, K; Prota, AE; Jeltsch, M; Anisimov, A; Markovic-Mueller, S; Stuttfeld, E; Goldie, KN; Ballmer-Hofer, K; Alitalo, K. (2013) **Structural and mechanistic insights into VEGF receptor 3 ligand binding and activation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Aug, Vol. 110, p. 12960–12965.
45. PALMER, I; Wingfield, PT. (2004) **Preparation and extraction of insoluble (inclusion-body) proteins from *Escherichia coli*.** *Current Protocols in Protein Science*. Nov, chapter unit 6.3.

46. CANCHI, DR; García AE. (2013) **Cosolvent effects on protein stability.** *Annual Review of Physical Chemistry*. Jan, Vol. 64, p. 273-293.
47. TSUMOTO, K; Ejima, D; Kumagai, I; Arakawa T. (2003) **Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies.** *Protein Expression & Purification*. Mar, Vol. 28, p. 1-8.
48. STAROVASNIK, MA; Christinger, HW; Wiesmann, C; Champe, MA; de Vos, AM; Skelton, NJ. (1999) **Solution structure of the VEGF-binding domain of Flt-1: comparison of its free and bound states.** *Journal of Molecular Biology*. Oct, Vol. 293, p. 531–544.
49. HIROAKI, H. (2013) **Recent applications of isotopic labeling for protein NMR in drug discovery.** *Expert Opinion on Drug Discovery*. May, Vol. 8, p. 523-536.
50. ROSANO, GL; Ceccarelli, EA. (2014) **Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges.** *Frontiers in Microbiology*. Apr, Vol. 5, p. 1-17.
51. RUDOLPH, R; Lilie, H. (1996) **In vitro folding of inclusion body proteins.** *FASEB Journal*. Jan, Vol. 10, p. 49-56.

8 Súmula Curricular

DADOS PESSOAIS

Nome: Alexandre Rodrigues Redondo

Local e data de nascimento: São Paulo, SP, Brasil – 09/07/1989

EDUCAÇÃO

Ensino fundamental e médio: Escola da Vila, São Paulo, SP, 1994 – 2006

Ensino superior: Bacharel em Química, Universidade de São Paulo, 2009 – 2014

Pós Graduação: Mestre em Bioquímica, Universidade de São Paulo, 2014 – 2016

“Determinação do sítio de ligação de um peptídeo anti-angiogênico em seus receptores”

Orientador: Ricardo José Giordano

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Monitorias:

PEEG – Programa de Estímulo ao Ensino de Graduação - USP (2014)

--Biologia Molecular para farmácia

PAE – Programa de Aperfeiçoamento de Ensino - USP (2015)

--Bioquímica Metabólica para nutrição

PAE – Programa de Aperfeiçoamento de Ensino - USP (2016)

--Bioquímica e Biologia Molecular para odontologia

OCUPAÇÃO

Bolsista de Mestrado: CNPq (2014 – 2016)

Professor Particular: 2005 – presente

EVENTOS ACADÊMICOS

Encontro Nacional dos Estudantes de Química (ENEQUI):

2011 – Curitiba – *“Tecnologia: agente modificador do tempo”*

2012 – Rio de Janeiro – *“Os desdobramentos do ano internacional da química”*

2013 – São Luís – *“Química: a ciência ao alcance de todos”*

2014 – Maringá – *“Democratização do conhecimento científico e catálise de avanços sociais”*

2015 – Fortaleza – *“Despertar para o valor da química e motivar-se pela busca e aperfeiçoamento de novos conhecimentos”*

2016 – Campo Grande – *“Química da vida: integração entre a tecnologia e a educação”*

PUBLICAÇÕES

“Discovery of pan-VEGF inhibitory peptides directed to the extracellular ligand-binding domains of the VEGF receptors” – *Science Advances* 2016

Jussara S. Michaloski, Alexandre R. Redondo, Leila S. Magalhães, Caio C. Cambui, Ricardo J. Giordano.

9 ANEXO 1 – Artigo publicado

*Discovery of pan-VEGF inhibitory peptides directed to the extracellular ligand-binding
domains of the VEGF receptors*

ANGIOGENESIS

Discovery of pan-VEGF inhibitory peptides directed to the extracellular ligand-binding domains of the VEGF receptors

Jussara S. Michaloski, Alexandre R. Redondo, Leila S. Magalhães, Caio C. Cambui, Ricardo J. Giordano*

2016 © The Authors,
some rights reserved;
exclusive licensee
American Association
for the Advancement
of Science. Distributed
under a Creative
Commons Attribution
NonCommercial
License 4.0 (CC BY-NC).

Receptor tyrosine kinases (RTKs) are key molecules in numerous cellular processes, the inhibitors of which play an important role in the clinic. Among them are the vascular endothelial growth factor (VEGF) family members and their receptors (VEGFR), which are essential in the formation of new blood vessels by angiogenesis. Anti-VEGF therapy has already shown promising results in oncology and ophthalmology, but one of the challenges in the field is the design of specific small-molecule inhibitors for these receptors. We show the identification and characterization of small 6-mer peptides that target the extracellular ligand-binding domain of all three VEGF receptors. These peptides specifically prevent the binding of VEGF family members to all three receptors and downstream signaling but do not affect other angiogenic RTKs and their ligands. One of the selected peptides was also very effective at preventing pathological angiogenesis in a mouse model of retinopathy, normalizing the vasculature to levels similar to those of a normal developing retina. Collectively, our results suggest that these peptides are pan-VEGF inhibitors directed at a common binding pocket shared by all three VEGFRs. These peptides and the druggable binding site they target might be important for the development of novel and selective small-molecule, extracellular ligand-binding inhibitors of RTKs (eTKIs) for angiogenic-dependent diseases.

INTRODUCTION

Angiogenesis is the formation of new blood vessels from preexisting ones, an important process in physiological and pathological conditions (1). For example, tumors cannot grow beyond a few cubic millimeters without proper supply of nutrients and oxygen, and abnormal growth of blood vessels in the retina may result in legal blindness in children and adults (2, 3). Cancer and retinopathy are examples of diseases in which patients already benefit from currently available angiogenesis inhibitors (4, 5), and a growing number of diseases, from tumor formation to other nonneoplastic dysfunctions, share pathological angiogenesis as an underlying cause or as an important component for disease progression (3). Hence, the search for novel therapeutic options, such as antiangiogenic agents, is a valuable approach to improving treatment for these diseases.

Several molecules are important for angiogenesis, but it is well accepted that the vascular endothelial growth factor (VEGF, also known as VEGF-A) and family members [VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, and placental growth factor (PlGF)], along with their corresponding receptors (VEGFR-1, VEGFR-2, and VEGFR-3), are key factors in this process (6–8). Currently available antiangiogenic therapies for cancer and retinopathy are focused on neutralizing VEGF, their receptors, or pathways activated by these growth factors (5, 7, 9).

The three VEGF receptors have been implicated in angiogenesis, and they all belong to the receptor tyrosine kinase (RTK) family. There are more than 50 different RTKs encoded in the human genome, which are organized in 20 different families (10), and because they participate in key cellular processes, RTKs have been of great interest for drug development, including angiogenesis (10–12). Currently, two kinds of RTK inhibitors (TKIs) are in use in the clinic: small molecules directed to the adenosine triphosphatase (ATPase) intracellular kinase domain and antibodies that target the extracellular ligand-binding

domain (13, 14). Although small-molecule TKIs offer significant advantages in terms of bioavailability (that is, oral administration), they often lack specificity because of the similarity of the ATPase tyrosine kinase domain shared by all family members (10, 15, 16). Although the broad-spectrum effect of TKI might be desirable in specific settings (for example, oncologic therapy, given the heterogeneous nature of cancer cells), it is also more likely to induce unwanted effects or develop drug resistance due to mutations. Thus, researchers have used different approaches to identifying new druggable sites in the kinase domain to improve selectivity and to overcome drug resistance (16). Although there have been important advances in the field, specificity is still an important challenge for the development of new TKI molecules.

Conversely, the extracellular ligand-binding portion of these receptors is the most diverse region of RTKs in terms of protein structure and, therefore, more attractive for the development of selective drugs (10, 17). In effect, several monoclonal antibodies that target the extracellular domain of an individual RTK have been approved for clinical use, including angiogenesis (5, 7). The trouble with monoclonal antibodies, albeit very specific down to a single-family member, is that they are expensive to produce, lack cell permeability, and have to be administered to patients in hospitals. Orally available molecules would be preferred, so there is a need to find novel alternatives for the development of small selective TKI molecules; targeting the ligand-binding domain of RTKs with small molecules may be an important option (17–19). These extracellular ligand-binding TKIs could offer significant advantages over current drugs by combining the bioavailability and cell permeability of small molecules with the specificity of targeting the ligand-binding domain with monoclonal antibodies (17, 18).

As an example of this strategy, we showed in previous studies that a small tripeptide targeting the extracellular ligand-binding domain of VEGFR-1 and neuropilin-1 (NRP-1) (20, 21) inhibited retinal neovascularization (17). This tripeptide, which can be applied topically to the eye, combines the selectivity of a monoclonal antibody with the advantages of a small-molecule compound, possibly

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, P.O. Box 26077, CEP 05513-970, São Paulo, Brazil.

*Corresponding author. Email: giordano@iq.usp.br

Fig. 1. Isolation of VEGFR-3 binding peptides. (A) The extracellular domain of mouse VEGFR-3 was immobilized on microtiter wells and incubated with the X6 phage display library. Bar graph shows enrichment in the number of phage recovered [in transducing units (TU)] after consecutive rounds of selection (I, II, and III). (*) Round I was not quantified to prevent the loss of phage displaying unique peptides. (B) Peptide identified by sequencing phage bound to VEGFR-3 (round III) (*n*, number of phages sequenced). (C and D) Binding of control phage Fd (white bars) and phage PCAIWF (B, black bars) and WVCSGG (C, black bars) to VEGF receptors and co-receptors immobilized on microtiter wells. (E and F) Inhibition of phage PCAIWF (E) or WVCSGG (F) binding to immobilized VEGFR-3 by synthetic peptide PCAIWF or control peptide (CARAC). The minus sign indicates that no synthetic peptide was added to the assay. (G) Dose-response assay. Phage PCAIWF was incubated with immobilized VEGFR-3 in the presence of synthetic peptides PCAIWF, PSAIWF, or CARAC (control). Percentage relative to phage binding in the absence of competing peptide. In all cases, bars represent means $\pm$ SEM from triplicate plating. Statistics, Student's *t* test (** $P \leq 0.01$ and *** $P \leq 0.001$).

as an unrecognized candidate class of TKI (17). These results have been further validated in a preclinical study that uses a nonhuman primate model of retinal disease, emphasizing the potential for targeting the extracellular domain of transmembrane receptors involved in angiogenesis (19).

Here, we expanded on these previous studies to target another receptor from the VEGF family, the VEGFR-3. We chose this receptor because it is highly expressed by the endothelial tip cells. These are specialized endothelial cells found at the tip of sprouting vessels whose function is believed to be the coordination of vessel formation and

migration toward the VEGF gradient (22, 23). Blockage of endothelial tip cells with anti-VEGFR-3 monoclonal antibody prevents retinal angiogenesis (24). Although we were successful in identifying a peptide that targeted the extracellular domain of VEGFR-3 from a phage display library, we noticed that, once the peptides were synthesized and used outside the phage context, they lost their selectivity toward VEGFR-3. The synthetic peptides also interact with VEGFR-1 and VEGFR-2, neutralize binding of VEGF family members to all three receptors, and inhibit neovascularization in vivo in the retina. Hence, it is the first pan-VEGF inhibitor directed at the extracellular domain

Fig. 2. Peptides PCAIWF and WVCSGG interact with the ligand-binding domain of VEGFR-3. (A) Binding of phage PCAIWF to immobilized VEGFR-3 in the presence or absence of VEGF-A or VEGF-C (10 ng/ml). (B) Binding of phage PCAIWF to immobilized VEGFR-3 in the presence of increasing concentrations of VEGF-C. Percentage relative to phage binding in the absence of VEGF-C. (C) Cartoon showing the three-dimensional structure of the complex VEGF-C (red) bound to VEGFR-2 IgD2-3 (shown in orange and green, respectively) (Protein Data Bank #2X1W). (D) Analysis by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified recombinant IgD2 and IgD2-3 proteins containing the ligand-binding domain of VEGFR-3. (E) Binding of phage PCAIWF to VEGFR-3 and its recombinant Ig domains immobilized on microtiter wells in the presence or absence of the synthetic peptide PCAIWF or its scramble version, IFCAPW (100 µg/ml). Phage binding was quantified by FLISA using an anti-bacteriophage sera. (F) Binding of VEGF-C to microtiter wells coated with immobilized recombinant ligand binding domains IgD2 and IgD2-3 of VEGFR-3 in the presence or absence of synthetic peptides PCAIWF and WVCSGG or the scramble control peptide (IFCAPW). For phage experiments (A and B), bars represent mean ± SEM from triplicate plating; for FLISA assays (E to G), bars represent means ± SEM from duplicate wells. Statistics, Student's *t* test [not significant (N.S.), *P* > 0.05; **P* ≤ 0.05 and ****P* ≤ 0.001].

of an RTK that we have knowledge of. In summary, our study suggests that members of the VEGF receptor family share a common original binding site, which might be important for drug development.

RESULTS

Identification of peptides that target the extracellular domain of VEGFR-3

We used phage display *in vitro* to isolate peptides that target the extracellular domain of VEGFR-3. Recombinant mouse VEGFR-3

extracellular portion (Tyr²⁵ through Asp⁷⁷⁰) was immobilized on microtiter plates and incubated with an X6 (X = any amino acids) peptide phage display library. This particular library was chosen because it encodes peptides with relatively small molecular weights (average molecular weight of 6-mer peptides is 660 g/mol) while maintaining diversity greater than 10⁷ possible peptides. The X6 phage display library that we built has an estimated ~10⁹ individual peptides, and it is likely to encode several copies of all conceivable combinations possible for 6-mer peptides (6.4 × 10⁷ unique peptide combinations), excluding

Fig. 3. PCAIWF is a pan-VEGF inhibitor. (A) Representation of the VEGF family, their receptors, and pattern of interaction. (B to F) Recombinant proteins for the human VEGFR-3 (B), VEGFR-2 (C and E), and VEGFR-1 (D and F) extracellular domains were immobilized on microtiter wells and incubated with the human ligands VEGF-C (B and C), PIGF (D), and VEGF-A (E and F) in the presence or absence of synthetic peptides PCAIWF and PSAIWF or the scramble control peptide (IFCAPW). Growth factors bound to the wells were quantified by FLISA using immunospecific antibodies and fluorescent detection. Bars represent means $\pm$ SEM from duplicate wells. Statistics, analysis of variance (ANOVA) (Tukey's multiple comparison test) (* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$ and *** $P \leq 0.001$).

peptides toxic to the bacteria or the bacteriophage. After three rounds of selection, we observed an approximately sixfold enrichment in the number of recovered phage compared to the previous round of selection (Fig. 1A), indicating that we had successfully enriched for peptides targeting our ligand. Randomly selected phage clones were analyzed by sequencing to identify their DNA inserts and coding peptides; only two peptide sequences were found encoded in all phage genomes analyzed: PCAIWF (58%) and WVCSGG (42%) (Fig. 1B).

PCAIWF and WVCSGG peptides are selective and bind to the same site in VEGFR-3

To validate the interaction of phage PCAIWF and WVCSGG and determine its specificity for VEGFR-3, we used a phage binding assay. All three VEGF receptors were individually immobilized on a plate and incubated with phage PCAIWF or WVCSGG or with a control insertless phage (Fd). We observed that phages PCAIWF and WVCSGG bind to VEGFR-3 but not to the other receptors, VEGFR-1 and VEGFR-2 (Fig. 1, C and D), including the two other non-RTKs, NRP-1 and NRP-2, which have been described as co-receptors for VEGF. Moreover, binding was independent of the receptor's species of origin because both phages bound to mouse and human VEGFR-3. No binding was observed when control phage Fd was used in the assays. Because all three receptors used in our assays are produced as recombinant proteins fused to the Fc domain of human immuno-

globulin G1 (IgG1), these results also rule out the possibility that PCAIWF and WVCSGG phages bind to the Fc fusion portion present in these receptors. Finally, to exclude the possibility that random mutations in phage are responsible for receptor interaction, we found that binding of phage PCAIWF to VEGFR-3 is mediated specifically by the peptide because phage binding was inhibited by the cognate synthetic PCAIWF peptide (Fig. 1E). A control peptide had no effect on phage binding to this receptor.

Peptides PCAIWF and WVCSGG have no obvious motif in common or sequence similarity, but they both share two residues, a tryptophan and a cysteine. To assess whether they actually bind to the same site in VEGFR-3, we performed a competition assay. When synthetic peptide PCAIWF in solution was added to our binding assay, it prevented the binding of phage WVCSGG to VEGFR-3 (Fig. 1F). These results indicate that both peptides target the same site in VEGFR-3. Inhibition by peptide PCAIWF was dose-dependent with a median inhibitory concentration (IC_{50}) below 30 μ g/ml (Fig. 1G, black circles). Because both peptides have an unpaired cysteine residue with a free sulfhydryl group, we pondered whether a disulfide bridge formed between the peptide and VEGFR-3 was actually responsible for the interaction between these two molecules. To test this, we synthesized a new version of the peptide by replacing serine with cysteine. Although the peptide PSAIWF can no longer form a disulfide bridge, it was also effective at preventing the binding of phage PCAIWF to VEGFR-3, albeit with a lower efficiency (IC_{50} of $\sim$ 200 μ g/ml).

Fig. 4. PCAIWF does not affect other angiogenic RTK or neuropilin binding. (A to D) Recombinant proteins for the human FGFR-1 (A), PDGFR-β (B), and VEGFR-1 (C and D) extracellular domains were immobilized on microtiter wells and incubated with the human ligands FGF-1 (A), PDGF-BB (B), human NRP-1 (C), and rat NRP-2 (D) in the presence or absence of synthetic peptides PCAIWF and WVCSGG or the scramble control peptide (IFCAPW). Growth factor and neuropilin bound to the wells were quantified by FLISA using immunospecific antibodies and fluorescent detection. Bars represent means $\pm$ SEM from duplicate wells. Statistics, ANOVA (Tukey's multiple comparison test) (N.S., $P > 0.05$).

(Fig. 1G, black squares). These results suggest that the cysteine residue is important for binding but does not form a covalent bond with the receptor or the ligand. In summary, we have identified two peptides that target the same binding site within the extracellular portion of VEGFR-3.

PCAIWF interacts with the ligand-binding domain of VEGFR-3

To map the binding site of peptide PCAIWF within VEGFR-3, we performed a competition assay. Phage PCAIWF was incubated with VEGFR-3 in the presence or absence of its natural ligand, VEGF-C. As control, we use VEGF-A, which does not bind to this receptor. Only VEGF-C prevents the binding of phage PCAIWF to the receptor (Fig. 2A) in a dose-dependent manner (Fig. 2B). To corroborate these findings, we observed that binding of phage WVCSGG to VEGFR-3 is also inhibited by VEGF-C but not by VEGF-A. These data suggest that phage PCAIWF binds to the ligand-binding domain of VEGFR-3. To further validate these results, we produced the ligand-binding domain of VEGFR-3 as a recombinant protein to test for PCAIWF binding. The extracellular portion of VEGFR-3 is composed of seven immunoglobulin-like (Ig) domains, and the Ig domain 2 (IgD2) has been identified as the main binding site for VEGF-C and VEGF-D, with IgD3 also contributing to the

interaction (Fig. 2C) (25). To confirm that peptide PCAIWF interacts with this domain, we produced IgD2 and IgD2-3 domains from human VEGFR-3 (Fig. 2D) and used the recombinant proteins in our phage assay. Phage PCAIWF binds to VEGFR-3 IgD2 and IgD2-3 domains with similar levels compared to the full-length extracellular VEGFR-3 protein, whereas the control phage Fd did not bind to any of the protein tested. Binding to the recombinant Ig domains could be prevented by the synthetic peptide PCAIWF but not by the control peptide (Fig. 2E). To confirm that our recombinant IgD2 and IgD2-3 domains were functional, we tested for the capacity to bind VEGF-C. VEGF-C binds to both recombinant ligand-binding domains IgD2 (Fig. 2F) and IgD2-3 (Fig. 2G). We observed that, when synthetic peptides PCAIWF and WVCSGG were added to the assay, both prevented binding of VEGF-C to IgD2 and IgD2-3 (Fig. 2, F and G). Together, these results indicate that peptide PCAIWF interacts with the ligand-binding domain of VEGFR-3 and prevents VEGF-C interaction with the receptor.

Synthetic PCAIWF is a pan-VEGF inhibitor

Having shown that phage PCAIWF binds to the ligand-binding domain of VEGFR-3 but not to other VEGF receptors and modulates the binding of VEGF-C to this receptor, we asked whether peptides PCAIWF and WVCSGG were selective for the binding of VEGF-C to VEGFR-3. To answer this question, we set up a fluorophore-linked immunosorbent assay (FLISA) to evaluate the effect of PCAIWF on the binding of the three main angiogenic ligands (VEGF-A, PlGF, and VEGF-C) to all three RTK VEGF receptors (Fig. 3A). Because peptides PCAIWF and WVCSGG target the same site in the receptor, we decide to concentrate our studies on the PCAIWF peptide. The VEGF receptors were individually immobilized on plates and incubated with their respective ligands in the presence or absence of the synthetic peptide PCAIWF or PSAIWF. As control, we used a synthetic peptide containing the same amino acid residues of PCAIWF but in a distinct sequence (scramble). To our surprise, we observed that the synthetic peptide PCAIWF inhibits the binding of all VEGF members that we tested to their respective receptors (Fig. 3, B to F). Briefly, peptide PCAIWF inhibited the binding of VEGF-C to VEGFR-3 (Fig. 3B) and VEGFR-2 (Fig. 3C), prevented the binding of PlGF to VEGFR-1 (Fig. 3D), and also blocked the binding of VEGF-A to VEGFR-2 (Fig. 3E) and VEGFR-1 (Fig. 3F). These inhibitions were specific and were not affected by the control scramble peptide. Moreover, the synthetic peptide PSAIWF containing a serine residue instead of cysteine also inhibited the binding to all VEGF factors tested (albeit with lower affinity), again indicating that the sulfhydryl residue is important, but not essential, for binding (Fig. 3, B to F). Notably, we could block 80 to 90% binding of all three VEGF family members using peptide PCAIWF (100 µg/ml) and 30 to 50% using peptide PSAIWF (100 µg/ml), except for binding of VEGF-A to VEGFR-1, which required higher concentrations of both peptides (400 µg/ml) for similar levels of inhibition. This agrees with the fact that VEGFR-1 is the high-affinity receptor for VEGF-A (26).

To assess whether the inhibitory effect of peptides PCAIWF and WVCSGG was specific for receptors of the VEGF family, we performed a similar FLISA-based binding assay using other angiogenic RTK receptors with their cognate ligands. We observed no effect of peptide PCAIWF or WVCSGG on the binding of basic human fibroblast growth factor (FGF) to its receptor (FGFR-1α) (Fig. 4A) or on the binding of platelet-derived growth factor B (PDGF-BB) to PDGFR-β (Fig. 4B). Like the VEGFR, these receptors are also important in

Fig. 5. Effect of PCAIWF on VEGF induced ERK1/2 pathway activation. (A) Immunoblot analysis of phosphorylated and total forms of ERK1/2 in LECs incubated with VEGF-A, VEGF-C, or FGF (100 ng/ml) in the presence or absence of peptide PCAIWF or scramble (IFCAPW) (30 µg/ml). (B) Ratio of fluorescent intensity for phosphorylated and total ERK1/2. Bars represent means $\pm$ SEM from three independent measurements of the immunoblot membrane. Two independent experiments were performed with similar results. Bars represent means $\pm$ SEM from triplicate readings. Statistics, ANOVA (Tukey's multiple comparison test) (* $P \leq 0.05$).

angiogenesis and have similar structural architecture compared to the VEGFR: ligand-binding moieties constituted of immunoglobulin folds. Neuropilins have also been described as ligands for the VEGF receptors (27, 28). It has been described that NRP-1 binds with high affinity to VEGFR-1 ($K_d \sim 1.8$ nM) (27). In agreement with these studies, we observed a strong interaction between NRP-1 and NRP-2 with VEGFR-1 using the FLISA binding assay. These interactions were not affected by peptide PCAIWF or WVCSGG (Fig. 4, C and D).

Binding of growth factors to RTKs triggers the activation of signaling events that are important for cell growth and survival. To assess whether peptide PCAIWF could prevent VEGFR-mediated activation of downstream signaling, lymphatic endothelial cells (LECs) were stimulated with VEGF-A, VEGF-C, or FGF-1. LECs were selected because they express high levels of VEGFR-3, VEGFR-2, and FGFR-1 and respond to these three growth factors by activating the extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 (ERK1/2) pathway (29, 30). We observed that phosphorylation of ERK1/2 increases upon stimulation of LECs with VEGF-A, VEGF-C, or FGF-1; as expected, peptide PCAIWF inhibited the phosphorylation of ERK1/2 induced by VEGF-A and VEGF-C but had no effect on the phosphorylation of ERK1/2 induced by FGF-1 (Fig. 5, A and B). In all cases, the scramble

synthetic control peptides had no effect on this downstream signaling event. Together, these results indicate that the effect of peptide PCAIWF is specific and selective for RTKs of the VEGF family.

Pan-VEGF inhibitor PCAIWF prevents retinal neovascularization in a mouse model

VEGF inhibitors have shown promising results for the treatment of ocular diseases with an angiogenic component. To assess whether synthetic peptide PCAIWF could inhibit neovascularization, we performed two angiogenesis assays: endothelial tube formation in Matrigel and the oxygen-induced retinopathy (OIR) model (in vivo). For the endothelial cell tubulogenesis assay, peptides PCAIWF and scramble were embedded in the Matrigel layer, and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were stimulated with VEGF-A or VEGF-C (31). In both cases, we observed inhibition of tube formation by peptide PCAIWF but not by the control scramble peptide or vehicle alone (Fig. 6A). Tube formation was reduced by $\sim 50\%$ in both cases (VEGF-A and VEGF-C), suggesting that other growth factors present in the Matrigel, which are not affected by peptide PCAIWF, might be stimulating the endothelial cells (Fig. 6B) and preventing the full inhibition of tubulogenesis. Next, we assessed the effect of PCAIWF in an in vivo mouse model.

Fig. 6. Effect of PCAIWF on endothelial tube formation. (A) Tube formation by HUVECs in Matrigel induced by VEGF or VEGF-C in the presence or absence of peptide PCAIWF or scramble (500 µg/ml, embedded in the Matrigel layer). (B) Number of tubes formed between endothelial cells. Bars represent means $\pm$ SEM from triplicate wells. Statistics, Student's *t* test (**P* $\leq$ 0.05). Two independent experiments were performed with similar results.

The OIR model is a well-accepted animal model for the study of human diseases, such as retinopathy of prematurity and, to a certain extent, diabetic retinopathy (32, 33). The retinal vasculature in mice develops and matures after birth, a process that is controlled by oxygen tension and, therefore, VEGF levels (34). By exposing mice at postnatal day 7 (P7) to 75% oxygen, VEGF expression is down-regulated, and its concentration in the eye is substantially reduced. This inhibits neovascularization that would otherwise be active in physiological retinas, with the formation of a central zone of vaso-oblivation. Once the mice at P12 are returned to room air (normal oxygen levels, 21%), vascularization has stopped and the retina experiences severe hypoxia; VEGF expression rises above normal, resuming vascularization, but it is now in a pathological state that exacerbates the angiogenic process, resulting in a retinopathic condition, which peaks at P17 (32–34). In mice, it eventually resolves within a few days, but in premature babies exposed to high oxygen concentrations in neonatal care units, if severe enough, the ongoing retinopathy may result in retinal detachment and blindness (retinopathy of prematurity) (35).

To assess whether our pan-VEGF peptide inhibitor PCAIWF could prevent pathological angiogenesis in the OIR model, mice at P15 (3 days after exposure to 75% oxygen) were treated with a single intravitreal injection of peptide PCAIWF. Peptide treatment could not be per-

formed as early as P12 because young mice have their eyelids shut and they are not fully open until P14 to P15 (36). Two days after treatment, the retinas were analyzed, and neovascularization was quantified (37). We observed that the retinas of animals treated with peptide PCAIWF showed a significant reduction in the amount of blood vessels (total vascular area) (Fig. 7, A and B) and vascular sprouting and ramifications (Fig. 7, C and D). No alteration in the number of vessels and their ramifications was observed when the animals were treated with the scramble control peptide or vehicle only.

One of the hallmarks of the OIR model is the formation of tufts due to the outgrowth of blood vessels protruding into the vitreous cavity. We noticed that treatment with peptide PCAIWF significantly reduced tuft formation in number and size (Fig. 8A). To further evaluate the effect of the treatment with the peptide on tuft formation, we performed confocal laser scanning microscopy to gain information on the vascular layer deep in the retina (Fig. 8B). Confocal images were obtained at 2.4-µm intervals and assembled with the aid of computer software (Fig. 8C), which allowed us to determine the thickness of the vascular layer and to visualize blood vessels migrating toward the vitreous chamber (tufts). As expected, normal C57BL/6 mice that were not subjected to the OIR model have a homogeneous vascular layer of approximately 39 ± 1.3 µm (Fig. 8D) that is positioned between the ganglion and the outer plexiform layers of the normal retina (19). When mice are treated by OIR, the vascular layer changes shape and becomes thicker (75 ± 2.7 µm) because of a series of tufts of vessels extending toward the vitreous humor (Fig. 8, D and E). These projections are almost absent in OIR mice treated with peptide PCAIWF in which the thickness of the vascular layer reduces to 44 ± 3.9 µm, similar to normally developing retinas in C57BL/6 mice (Fig. 8, D and E). Animals treated with vehicle only showed no significant reduction (67 ± 3.7 µm) in vascular layer thickness (Fig. 8D). In summary, the small-molecule pan-VEGF inhibitory peptide PCAIWF prevents pathological angiogenesis in vivo in one of the most widely used animal models for retinopathy of prematurity, suggesting that this peptide might have important uses in the development of novel antiangiogenic inhibitors for retinopathy and other human diseases.

DISCUSSION

Antiangiogenic therapy has been firmly established by numerous clinical trials using drugs aimed at the central factors involved in this process: VEGF and its receptors. Unfortunately, despite the significant benefits of these drugs, there are important questions in antiangiogenic therapy that have not been solved. For example, not all patients respond to anti-VEGF therapy, and others eventually develop resistance (38). Why do some tumors respond to antiangiogenic therapy (colorectal) and others do not (pancreatic)? The ingenious hypothesis [proposed by Folkman (39)] that tumors would starve to death if not properly nourished by blood vessels is an impeccable and compelling concept, but researchers are still puzzled as to why antiangiogenic compounds have not achieved the expected efficacy (5, 7). Although this conundrum is likely to be multifaceted, targeting molecules other than VEGF-A and VEGFR-2 might help improve efficacy. In effect, in ophthalmology, clinical studies with aflibercept have shown better efficacy compared to bevacizumab and ranibizumab (40). The latter two drugs exclusively target VEGF-A, whereas aflibercept is the only one that, in addition to VEGF-A, neutralizes two other members of the family, VEGF-B and PlGF. Drugs with a broader effect may do better in angiogenesis therapy.

Fig. 7. PCAIWF inhibits neovascularization in vivo. Neonatal C57BL/6 mice with OIR at P15 were treated or not treated ($n = 9$ retinas) with a single intravitreal injection ($1 \mu\text{l}$) of vehicle only [dimethyl sulfoxide (DMSO)] ($n = 11$ retinas), peptide PCAIWF ($30 \mu\text{g}$) ($n = 6$ retinas), or scramble peptide IFCAPW ($30 \mu\text{g}$) ($n = 7$ retinas). Whole-mount retinas were stained with isolectin-B₄ conjugated to Alexa Fluor 594 red-fluorescent dye. (A) Representative confocal microscopy images of retinas of OIR neonatal C57BL/6 mice at P17. (B) Quantification of neovascularization in the retinas of OIR neonatal C57BL/6 mice treated or not treated with peptides. (C) High-magnification images ($\times 200$) of the retinas at P17 of OIR neonatal C57BL/6 mice treated or not treated with peptides. White dots indicate vessel sprouts or bifurcations. The numbers of sprouts/bifurcations determined for each image are indicated at the bottom right corner. (D) Quantification of vessel sprout or bifurcations. Statistics, ANOVA (Tukey's multiple comparison test) (N.S., $P > 0.05$; *** $P < 0.005$). Box plots in which the boxes define the 25th and 75th percentiles, with a line at a median and error bars defining the 10th and 90th percentiles.

All VEGF family members and the three receptors are expressed in the retina and play distinct and important roles in angiogenesis. For example, studies with animal models indicate that VEGF-B is dispensable for neovascularization but is essential for retinal endothelial cell survival, and antibodies targeting VEGF-B inhibit choroid and retina neovascularization (41). PlGF has also been implicated in pathological angiogenesis (42, 43) and is said to have contributed to the development of diabetic retinopathy (44). VEGF-C and VEGF-D are expressed in the ischemic retina (45) and the subretinal vascular membrane of an age-related macular degeneration patient (46), and blockage of VEGFR-3 with monoclonal antibodies prevents neovascularization in the retina (24), suggesting that they also contribute to neovascularization in the retina. Furthermore, these growth factors have different effects in the type of newly formed blood vessels and in their stability and permeability (47).

However, targeting all members of the VEGF family is challenging. Monoclonal antibodies are selective to a single receptor. Similarly, molecules like VEGF-trap (afibercept), which is composed of the ligand-binding domain of VEGFR-1 fused to an Ig constant region, will target

multiple members of the VEGF family (VEGF-A, VEGF-B, and PlGF) but will miss others (VEGF-C and VEGF-D) (48). An alternative is to use small TKIs, such as sunitinib, which is a pan-VEGF inhibitor. Unfortunately, these molecules also affect other angiogenic RTKs, resulting in important side effects, such as cardiotoxicity, such as in the case of sunitinib and PDGFR- β (49). Therefore, drugs with similar activity to peptides PCAIWF and WVCSGG (neutralization of all VEGFRs through the extracellular domain) could have important applications in the clinic for the development of true pan-VEGF inhibitors.

In a previous study (19), we have successfully developed a small tripeptide (now denominated Vasotide) into a prodrug candidate. Nevertheless, it is not very often that peptides are suitable for drug development. They are prone to proteolysis and suffer the same limitations in terms of biodistribution as monoclonal antibodies. For instance, peptides PCAIWF and WVCSGG are not found in the vitreous humor if applied topically to the retina, which seems to preclude their use in eye drop formulations. Because they are small molecules, they probably will have short half-lives in the eye and will not be good drug candidates for repeated intravitreal injections (granting that we

Fig. 8. PCAIWF prevents neovascularization in the vitreal cavity. (A) Assembly of confocal microscopy images of P17 retinas of normal neonatal C57BL/6 mice or with OIR treated with PCAIWF ($n = 4$ retinas) or not ($n = 10$ retinas) by a single intravitreal injection ($1 \mu\text{l}$) of vehicle only (DMSO) or peptide PCAIWF ($30 \mu\text{g}$). Yellow arrowheads indicate vascular complexity (tufts). (B) Schematic representation of a mouse retina showing the location of the retinal vascular layer and the images obtained by confocal laser scanning microscopy to gain information on vascular depth. (C) Computer-assisted assembly of the laser scanning confocal images of P17 retinas (obtained at $2.4\text{-}\mu\text{m}$ intervals) of neonatal C57BL/6 mice with OIR treated or not treated with vehicle or peptide PCAIWF. (D) Quantification of the retinal vascular thickness. (E) Drawing outlining the retinal, its layers, and blood vessels protuberating or not into the humor vitreous. Statistics, ANOVA (Tukey's multiple comparison test) ($***P < 0.005$). Error bars represent means $\pm$ SEM.

have not performed pharmacokinetic studies yet). The hydrophobicity and relative small molecular weight of peptides PCAIWF and WVCSGG (736 and 608 Da, respectively) are not far from the rule of five (Lipinski's rule), which suggests that their binding site is likely a druggable region in these receptors. With better knowledge of the structural requirements for VEGFR binding, these peptides might be important leads for drug development. Small molecules, such as peptides PCAIWF and WVCSGG, might comprise a new class of drugs, the extracellular ligand-binding inhibitors of receptor tyrosine kinases (eTKIs). Despite all the difficulties associated with peptide drug development, given the strong antiangiogenic effect of PCAIWF in vivo following a single dose and without any optimization, it is possible that, if properly formulated (that is, slow-release formulations), peptide PCAIWF might be a drug candidate for the treatment of human retinopathy. Notably, peptides PCAIWF and WVCSGG are fairly soluble in Matrigel compared to aqueous media. Matrigel has a composition similar to that of the vitreous humor, rich in collagen, collagen-like proteins (vitrosin), and glycosaminoglycans, which may help solubilize the peptides in the eye. Collectively, drugs based on PCAIWF and WVCSGG might be interesting alternatives for antiangiogenic therapy because the neutralization of all VEGFRs could be achieved with a single compound.

The change of specificity of peptides PCAIWF and WVCSGG depending on the context in which they are presented to the receptors is noteworthy. These peptides are fairly specific for VEGFR-3 if fused to the bacteriophage coat protein but become more permissive in solution as synthetic-free peptide molecules. These data suggest that peptides that are identified by combinatorial approaches (such as phage display) should be carefully validated, and one should not assume the peptide's specificity without considering the contexts in which the peptide is presented (bacteriophage or in solution). It also highlights another important aspect: Distinct families of RTK might retain an original binding site shared by family members. Peptides PCAIWF and WVCSGG prevent ligand binding and inhibit angiogenesis in vivo (PCAIWF). These results suggest that, if these binding sites are present in other RTKs, original sites might be important druggable domains. Studies using the FGF receptor family corroborate this idea. A small experimental TKI molecule (SSR128129E) binds to and prevents the activation of all four FGF receptors (17). Different from peptides PCAIWF and WVCSGG, this FGF receptor inhibitor does not interact with the ligand-binding domain of the receptors and is likely to exert its effect through a putative allosteric domain. The exact binding site and mechanism by which PCAIWF and WVCSGG exert their effect and prevent ligand interaction are still unknown; whether they bind directly to the ligand domains of VEGFRs or to an allosteric adjacent binding site remains to be determined. An important difference is that peptides identified by phage display often mimic natural ligands for their target (20, 50–53). Peptide PCAIWF does not share significant primary sequence similarity to any of the VEGF family members. Thus, if peptide PCAIWF were to bind to an allosteric binding site in the VEGF receptor family, it would be interesting to identify the natural ligand for this putative domain. Further studies will be necessary to answer these questions.

In summary, and in a larger context, our work suggests that RTKs might have family-specific common binding sites that modulate ligand interaction with the receptors. Notwithstanding the great advances in drug design for better RTK inhibitors, selectivity is still an important challenge to the field (16). Identification of these original binding sites shared by members of RTK-distinct families may contribute well to this milestone and to the design of novel and better molecules with the ex-

quisite selectivity necessary to target this important superfamily of receptors that are highly relevant in many human diseases.

MATERIALS AND METHODS

Materials

All recombinant growth factors and their respective receptors were obtained commercially from R&D Systems. Antibodies and other reagents were obtained commercially: anti-human VEGF (AF-293-NA), anti-human VEGF-C (AF752), anti-human PlGF (AF-264-PB), anti-human PDGF-BB (AF-220-NA), anti-human FGF-basic (AF-233-NA), anti-mouse/rat NRP-1 (AF566), and anti-mouse/rat NRP-2 (AF567) were from R&D Systems; anti-fd Bacteriophage-Biotin Conjugate (B2661) was from Sigma-Aldrich; secondary antibodies IRDye 680LT Donkey anti-goat IgG and IRDye 680LT Streptavidin were from LI-COR. The gas admixture (75% oxygen and 25% nitrogen) used for the OIR mouse model was obtained from Air Products.

Phage library construction

The linear hexapeptide phage display (X6) library was built as previously described (54) but with modifications. Briefly, the fUSE55 vector (provided by G. Smith, University of Missouri, Columbia, MO) was prepared in large scale using the Maxiprep kit (Qiagen) followed by two consecutive CsCl equilibrium gradient purifications. Equimolar amounts of oligonucleotides 5'-CACTCGGCCGACGGGGCTNNKN-NKNNKNNKNNKNNKGGGGCCGCTGGGGCCGAA-3' and 5'-TTCGGCCCCAGCGGC-3' (where N = any nucleotide and K = T or G) were converted to double-stranded DNA with Klenow enzyme (as recommended by the manufacturer) (New England Biolabs) and purified using a P500 Maxiprep column (Qiagen). The vector (500 µg) and oligonucleotide insert (20 µg) digested with the restriction enzyme Bg II were ligated using T4 DNA ligase (New England Biolabs). The ligation product was purified using a P500 Maxiprep column and transformed into electrocompetent *Escherichia coli* MC1061 cells, resulting in 1.4×10^9 transformants, of which 1.2×10^9 contained inserts coding for peptides. Bacteria were cultured for ~20 hours, and phages were purified from culture supernatants by the polyethylene glycol/NaCl method (20).

Synthetic peptides

Peptides were synthesized and purified by high-performance liquid chromatography to a purity greater than 95% by Bachem or Chinese Peptide Company. Two control peptides were used in this study: peptide CARAC (referred to as control) (20) and the scramble version of the peptide PCAIWF, sequence IFCAPW (referred to as scramble).

Biopanning on VEGFR-3 and phage binding assays

Phage assays were performed as previously described (20, 50). To isolate peptides targeting VEGFR-3, microtiter wells were coated with recombinant mouse VEGFR-3/Fc [1 µg in 50 µl of phosphate-buffered saline (PBS)] [10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, and 2.7 mM KCl (pH 7.4)], blocked with PBS supplemented with 3% bovine serum albumin (BSA), and incubated with the X6 phage peptide library (10^9 TU) in 50 µl of PBS supplemented with 1% BSA (PBS/BSA) for 2 hours at room temperature. The wells were then washed, and bound phages were recovered by bacterial infection and amplified for the next cycle of selection. After the third round of selection, random bacterial colonies were selected for DNA sequencing to identify the phage coding peptides. Briefly, each bacterial colony was dispersed in 50 µl of PBS, and 2 µl was used to subject the pII gene

encoding the random DNA insert [5'-GCAAGCTGATAAACCGATA-CAATT-3' (forward) and 5'-CCCTCATAGTTAGCGTAACGATCT-3' (reverse)] to polymerase chain reaction (PCR) using Taq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific) in a thermal cycler (Bio-Rad) (94°C for 2 min, followed by 35 cycles at 94°C for 15 s, 60°C for 20 s, and 72°C for 45 s). DNA sequencing was performed by the Sanger method in the DNA sequencing facility at the Chemistry Institute, University of São Paulo. For the phage binding assays, the procedure was similar. Wells of microtiter plate were coated with the specified ligand (overnight at 4°C), incubated with the specified phage (10^8 TU in 50 μ l of PBS) for 2 hours at room temperature, and washed, and bound phage was quantified by either colony count or phage-FLISA. The latter was performed using an anti-Fd bacteriophage conjugated to biotin, followed by IRDye 680LT Streptavidin, and plates were scanned in the Odyssey Infrared Imaging Scanner. For the competition assays, phage incubation was performed in the presence or absence of different concentrations of the specified synthetic peptide or growth factor. In all experiments, the insertless phage Fd was used as control.

Recombinant VEGFR-3 ligand-binding domain

The complementary DNA encoding the full-length human VEGFR-3 (pDON233-FLT4) was obtained from Addgene and used to produce by PCR amplicons encoding the ligand-binding domains of human VEGFR-3 [IgD2: 5'-GTGAGACATATGGAGCAGCCATTCATC-3' (forward) and 5'-GATCTCGAGGAGCTCGTTGCCGTGTGAT-3' (reverse); IgD2-3: same forward primer used for IgD2 and 5'-GACCTCGAGGAAGGGATTTTCATGCAC-3' (reverse)]. The amplicons were cloned into pET21a and used to produce the corresponding recombinant proteins (IgD2, residues 136 to 229; IgD2-3, residues 136 to 332) using Rosetta(DE3)pLysS cells (EMD Millipore). The recombinant proteins were purified from inclusion bodies. Briefly, cells were lysed by sonication and freeze/thaw and were centrifuged (10,000g for 10 min at 4°C), and the insoluble pellets were washed twice with wash buffer [50 mM Tris, 0.5% (v/v) Triton X-100, 100 mM NaCl, and 1 mM EDTA (pH 8.0)]. They were resuspended in denaturing buffer [20 mM NaH₂PO₄, 8 M urea, 100 mM NaCl, and 5 mM β -mercaptoethanol (pH 8.0)], and the IgD2 and IgD2-3 proteins were purified using a Ni-NTA agarose column (Qiagen). To refold, the recombinant proteins were slowly diluted to a final concentration of 50 μ g/ml in refolding buffer [20 mM NaH₂PO₄ and 50 mM NaCl (pH 7.3)] (with agitation), followed by purification in a Ni-NTA agarose column under native conditions. The recombinant proteins were finally dialyzed against refolding buffer.

Growth factor binding assay

Binding of select growth factors to their corresponding receptors was performed using a FLISA-based assay. Human VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, FGFR-1, or PDGFR- β was individually immobilized on microtiter wells (200 ng in 50 μ l of PBS, overnight at 4°C), blocked with Odyssey Blocking Buffer (LI-COR), and incubated with the cognate human ligand [VEGF-A (60 ng/ml), PlGF (20 ng/ml), VEGF-C (20 ng/ml), FGF-1 (20 ng/ml), PDGF-BB (20 ng/ml), and NRP-1 or NRP-2, all in PBS supplemented with 10% (v/v) DMSO and 10% (v/v) Odyssey Blocking Buffer] in the presence or absence of the synthetic peptide PCAIWF, PSAIWF, or IFCAPW (100 μ g/ml) (and WVCSGG when indicated). Ligand binding to each receptor was assessed using specific anti-sera against the ligand [goat anti-hVEGF-A, anti-hVEGF-C, anti-PlGF, anti-NRP-1, and anti-NRP-2 (1:100 dilution); anti-PDGFR-BB and anti-FGF-basic (1:200 dilution); all from R&D Systems] followed by incubation with donkey anti-goat Ig conjugated to IRDye 680LT

(LI-COR). Plates were quantified using the Odyssey Infrared Imaging system (LI-COR). DMSO had no effect on the binding of any of the ligands analyzed in this study.

VEGF signaling

Human lymphatic microvascular dermal endothelial cells (Lonza, CC-2810) were seeded into six-well plates (10^6 cells per well), cultured overnight in endothelial basal medium-2 (EBM2) complete medium supplemented with 2% fetal bovine serum plus bullet kits (Lonza, CC-3156), and then cultured for 18 hours in EBM2 medium supplemented only with 0.2% BSA (Sigma Merck). Cells were then treated with VEGF-A, VEGF-C, or FGF-1 (100 ng/ml) in EBM2 medium containing 1% DMSO and heparin (10 U/ml; Sigma Merck, H3393) with or without peptide PCAIWF or scramble (30 μ g/ml) for 10 min at 37°C. The cells were washed with ice-cold PBS and lysed with 50 mM Tris-HCl at pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.25% sodium deoxycholate, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM NaF, 1 mM glycerophosphate, 1 mM Na₃VO₄, and the protease and phosphatase inhibitor cocktail (Sigma). The detection of phosphorylated and total forms of ERK1/2 was performed by Western blotting using specific antibodies (mouse IgG anti-p44/42 MAPK ERK1/2, 3A7, #9107; rabbit IgG anti-phospho-p44/42 MAPK ERK1/2 Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴, 197G2, #4377; Cell Signaling) according to the manufacturer's recommendations. Total ERK was detected using goat anti-mouse Ig conjugated to IRDye 680LT (LI-COR), and phospho-ERK1/2 was detected using donkey anti-rabbit Ig conjugated to IRDye 800CW (LI-COR). The immunoblots were quantified using the Odyssey Infrared Imaging system (LI-COR).

Endothelial cell tube formation assay

HUVECs (HUVEC-C, American Type Culture Collection CRL-1730) were seeded onto 96-well plates coated with 80 μ l of Matrigel (BD Biosciences, 354234) containing 1% DMSO and supplemented or not supplemented with peptide PCAIWF or scramble (500 μ g/ml). Cells (1.5×10^4 cells per well) were incubated in RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific) containing VEGF-A (30 ng/ml) or VEGF-C (100 ng/ml). Quantification of endothelial network formation was performed by counting the number of tubes formed per field (objective, 4 $\times$) using an inverted (bright-field) microscope (Nikon) (31).

Animals

The Institutional Animal Care and Use Committees at the Chemistry Institute of the University of São Paulo approved all animal experimentation (protocol number 10/2010). This study followed the Association for Research in Vision and Ophthalmology statement for the use of animals in ophthalmic and vision research. C57BL/6 mice (Taconic) maintained at the animal facility of the Chemistry Institute and Pharmacy School of the University of São Paulo were used for all experiments.

OIR neovascularization and peptide treatment

The OIR mouse model was performed as described previously (17, 32, 37). Briefly, the animals were exposed to 75% oxygen from P7 to P12, along with their nursing mothers. Four experiments were performed with similar results. The initial three experiments were performed with a homemade oxygen chamber, and the last experiment was performed on a Biospherix Hyperoxia Chamber equipped with a ProOx 110 oxygen controller (Biospherix). At P12, the animals were returned to room air (20.8% oxygen) and organized in groups, and 3 days later

(P15), they were treated with vehicle (DMSO) only or with 30 μ g of each individual peptide by intravitreal injection (peptides were solubilized in DMSO solution at 30 mg/ml; injection of 1 μ l per eyeball). Animals weighing less than 6 g were not used for the study.

Whole-mount retina preparation and neovascularization quantification

At P17 (2 days after treatment), the animals were enucleated, their eyeballs were fixed in PBS containing 4% paraformaldehyde, and the retina was dissected under a stereomicroscope. The blood vessels in the retinas were then stained with isolectin B₄ conjugated with Alexa Fluor 594 (Life Technologies), mounted with VECTA-SHIELD (Vector Laboratories), and examined in an epifluorescent microscope (Nikon). The neovascularization was quantified as previously described (32). Briefly, images from whole-mount retinas were obtained at $\times 100$ magnification using the same exposition time for all samples. Images for the same retina were merged into a single picture using Adobe Photoshop CS3. Quantification of total neovascularization (NV) was performed by selecting the fluorescent areas containing the neovessels and counting the total number of pixels. A similar procedure was used to determine the total number of pixels in the whole retina (RA). The percentage of retinal vascularization was then calculated with the formula $(NV/RA) \times 100$. Representative confocal images of retinas were performed on a Zeiss LSM510 META microscope and used to determine vessel sprouts and bifurcations by counting the number of branch points per identical 167- μ m $\times$ 167- μ m fields (two fields per quadrant and a total of eight fields per retina) for each animal retina. For the laser scanning microscopy, confocal images spanning the whole retina were obtained at 2.4- μ m intervals using the 10 $\times$ objective (final magnification, $\times 70$). The three-dimensional retina was reconstructed with the Zeiss Zen software.

Statistical analysis

Statistics were performed using GraphPad Prism software. Error bars are presented as means $\pm$ SD. Statistical significance was determined by Student's *t* test or the two-way ANOVA test set at *P* < 0.05.

REFERENCES AND NOTES

1. A. S. Chung, N. Ferrara, Developmental and pathological angiogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**, 563–584 (2011).
2. D. Hanahan, J. Folkman, Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**, 353–364 (1996).
3. J. Folkman, Angiogenesis: An organizing principle for drug discovery? *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 273–286 (2007).
4. J. W. Miller, J. Le Couter, E. C. Strauss, N. Ferrara, Vascular endothelial growth factor A in intraocular vascular disease. *Ophthalmology* **120**, 106–114 (2013).
5. N. Ferrara, A. P. Adamis, Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **15**, 385–403 (2016).
6. N. Ferrara, Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 789–791 (2009).
7. R. K. Jain, Antiangiogenesis strategies revisited: From starving tumors to alleviating hypoxia. *Cancer Cell* **26**, 605–622 (2014).
8. H. F. Dvorak, Discovery of vascular permeability factor (VPF). *Exp. Cell Res.* **312**, 522–526 (2006).
9. V. Tah, H. O. Orlans, J. Hyer, E. Casswell, N. Din, V. Sri Shanmuganathan, L. Ramskold, S. Pasu, Anti-VEGF therapy and the retina: An update. *J. Ophthalmol.* **2015**, 627674 (2015).
10. M. A. Lemmon, J. Schlessinger, Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **141**, 1117–1134 (2010).
11. T. Hunter, Tyrosine phosphorylation: Thirty years and counting. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 140–146 (2009).
12. M. Jeltsch, V.-M. Leppänen, P. Saharinen, K. Alitalo, Receptor tyrosine kinase-mediated angiogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, a009183 (2013).
13. P. Traxler, Tyrosine kinases as targets in cancer therapy—Successes and failures. *Expert Opin. Ther. Targets* **7**, 215–234 (2003).
14. D. S. Krause, R. A. Van Etten, Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N. Engl. J. Med.* **353**, 172–187 (2005).
15. M. I. Davis, J. P. Hunt, S. Herrgard, P. Ciceri, L. M. Wodicka, G. Pallares, M. Hocker, D. K. Treiber, P. P. Zarrinkar, Comprehensive analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat. Biotechnol.* **29**, 1046–1051 (2011).
16. R. A. Norman, D. Toader, A. D. Ferguson, Structural approaches to obtain kinase selectivity. *Trends Pharmacol. Sci.* **33**, 273–278 (2012).
17. R. J. Giordano, M. Cardó-Vila, A. Salameh, C. D. Anobom, B. D. Zeitlin, D. H. Hawke, A. P. Valente, F. C. Almeida, J. E. Nör, R. L. Sidman, R. Pasqualini, W. Arap, From combinatorial peptide selection to drug prototype (I): Targeting the vascular endothelial growth factor receptor pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 5112–5117 (2010).
18. F. Bono, F. De Smet, C. Herbert, K. De Bock, M. Georgiadou, P. Fons, M. Tjwa, C. Alcouffe, A. Ny, M. Bianciotto, B. Jonckx, M. Murakami, A. A. Lanahan, C. Michielsen, D. Sibrac, F. Dol-Gleizes, M. Mazzone, S. Zaccagna, J.-P. Herault, C. Fischer, P. Rigon, C. R. de Almodovar, F. Claes, I. Blanc, K. Poesen, J. Zhang, I. Segura, G. Gueguen, M.-F. Bordes, D. Lambrechts, R. Broussy, M. van de Wouwer, C. Michaux, T. Shimada, I. Jean, S. Blacher, A. Noel, P. Motte, E. Rom, J.-M. Rakic, S. Katsuma, P. Schaeffer, A. Yayon, A. Van Schepdael, H. Schwalbe, F. L. Gervasio, G. Carmeliet, J. Rozensky, M. Dewerchin, M. Simons, A. Christopoulos, J.-M. Herbert, P. Carmeliet, Inhibition of tumor angiogenesis and growth by a small-molecule multi-FGF receptor blocker with allosteric properties. *Cancer Cell* **23**, 477–488 (2013).
19. R. L. Sidman, J. Li, M. Lawrence, W. Hu, G. F. Musso, R. J. Giordano, M. Cardó-Vila, R. Pasqualini, W. Arap, The peptidomimetic Vasotide targets two retinal VEGF receptors and reduces pathological angiogenesis in murine and nonhuman primate models of retinal disease. *Sci. Transl. Med.* **7**, 309ra165 (2015).
20. R. J. Giordano, M. Cardó-Vila, J. Lahdenranta, R. Pasqualini, W. Arap, Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands. *Nat. Med.* **7**, 1249–1253 (2001).
21. R. J. Giordano, C. D. Anobom, M. Cardó-Vila, J. Kalil, A. P. Valente, R. Pasqualini, F. C. L. Almeida, W. Arap, Structural basis for the interaction of a vascular endothelial growth factor mimic peptide motif and its corresponding receptors. *Chem. Biol.* **12**, 1075–1083 (2005).
22. H. Gerhardt, M. Golding, M. Fruttiger, C. Ruhrberg, A. Lundkvist, A. Abramsson, M. Jeltsch, C. Mitchell, K. Alitalo, D. Shima, C. Betsholtz, VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J. Cell Biol.* **161**, 1163–1177 (2003).
23. S. P. Herbert, D. Y. R. Stainier, Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 551–564 (2011).
24. T. Tammela, G. Zarkada, E. Wallgard, A. Murtomäki, S. Suchting, M. Wirzenius, M. Waltari, M. Hellström, T. Schomber, R. Peltonen, C. Freitas, A. Duarte, H. Isoniemi, P. Laakkonen, G. Christofori, S. Ylä-Herttuala, M. Shibuya, B. Pytowski, A. Eichmann, C. Betsholtz, K. Alitalo, Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. *Nature* **454**, 656–660 (2008).
25. V.-M. Leppänen, D. Tvorogov, K. Kisko, A. E. Prota, M. Jeltsch, A. Anisimov, S. Markovic-Mueller, E. Stüttfeld, K. N. Goldie, K. Ballmer-Hofer, K. Alitalo, Structural and mechanistic insights into VEGF receptor 3 ligand binding and activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 12960–12965 (2013).
26. M. Shibuya, Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (VEGFR) signaling in angiogenesis: A crucial target for anti- and pro-angiogenic therapies. *Genes Cancer* **2**, 1097–1105 (2011).
27. G. Fuh, K. C. García, A. M. de Vos, The interaction of neuropilin-1 with vascular endothelial growth factor and its receptor Flt-1. *J. Biol. Chem.* **275**, 26690–26695 (2000).
28. B. Favier, A. Alam, P. Barron, J. Bonnin, P. Laboudie, P. Fons, M. Mandron, J.-P. Herault, G. Neufeld, P. Savi, J.-M. Herbert, F. Bono, Neuropilin-2 interacts with VEGFR-2 and VEGFR-3 and promotes human endothelial cell survival and migration. *Blood* **108**, 1243–1250 (2006).
29. Y. Kodera, Y. Katanasaka, Y. Kitamura, H. Tsuda, K. Nishio, T. Tamura, F. Koizumi, Sunitinib inhibits lymphatic endothelial cell functions and lymph node metastasis in a breast cancer model through inhibition of vascular endothelial growth factor receptor 3. *Breast Cancer Res.* **13**, R66 (2011).
30. R. Cao, H. Ji, N. Feng, Y. Zhang, X. Yang, P. Andersson, Y. Sun, K. Tritsaris, A. J. Hansen, S. Dissing, Y. Cao, Collaborative interplay between FGF-2 and VEGF-C promotes lymphangiogenesis and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 15894–15899 (2012).
31. I. Arnaoutova, H. K. Kleinman, In vitro angiogenesis: Endothelial cell tube formation on gelled basement membrane extract. *Nat. Protoc.* **5**, 628–635 (2010).
32. L. E. Smith, E. Wesolowski, A. McLellan, S. K. Kostyk, R. D'Amato, R. Sullivan, P. A. D'Amore, Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **35**, 101–111 (1994).
33. A. Stahl, K. M. Connor, P. Sapieha, J. Chen, R. J. Dennison, N. M. Krah, M. R. Seaward, K. L. Willett, C. M. Aderman, K. I. Guerin, J. Hua, C. Löfqvist, A. Hellström, L. E. H. Smith, The

- mouse retina as an angiogenesis model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **51**, 2813–2826 (2010).
34. E. A. Pierce, E. D. Foley, L. E. H. Smith, Regulation of vascular endothelial growth factor by oxygen in a model of retinopathy of prematurity. *Arch. Ophthalmol.* **114**, 1219–1228 (1996).
 35. A. Hellström, L. E. H. Smith, O. Dammann, Retinopathy of prematurity. *Lancet* **382**, 1445–1457 (2013).
 36. G. S. Findlater, R. D. McDougall, M. H. Kaufman, Eyelid development, fusion and subsequent reopening in the mouse. *J. Anat.* **183**, 121–129 (1993).
 37. K. M. Connor, N. M. Krah, R. J. Dennison, C. M. Aderman, J. Chen, K. I. Guerin, P. Sapieha, A. Stahl, K. L. Willett, L. E. H. Smith, Quantification of oxygen-induced retinopathy in the mouse: A model of vessel loss, vessel regrowth and pathological angiogenesis. *Nat. Protoc.* **4**, 1565–1573 (2009).
 38. G. C. Jayson, D. J. Hicklin, L. M. Ellis, Antiangiogenic therapy—Evolving view based on clinical trial results. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **9**, 297–303 (2012).
 39. J. Folkman, Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* **285**, 1182–1186 (1971).
 40. Diabetic Retinopathy Clinical Research Network, J. A. Wells, A. R. Glassman, A. R. Ayala, L. M. Jampol, L. P. Aiello, A. N. Antoszyk, B. Arnold-Bush, C. W. Baker, N. M. Bressler, D. J. Browning, M. J. Elman, F. L. Ferris, S. M. Friedman, M. Melia, D. J. Pieramici, J. K. Sun, R. W. Beck, Aflibercept, bevacizumab, or ranibizumab for diabetic macular edema. *N. Engl. J. Med.* **372**, 1193–1203 (2015).
 41. F. Zhang, Z. Tang, X. Hou, J. Lennartsson, Y. Li, A. W. Koch, P. Scotney, C. Lee, P. Arjunan, L. Dong, A. Kumar, T. T. Rissanen, B. Wang, N. Nagai, P. Fons, R. Fariss, Y. Zhang, E. Wawrousek, G. Tansey, J. Raber, G. H. Fong, H. Ding, D. A. Greenberg, K. G. Becker, J.-M. Herbert, A. Nash, S. Yla-Herttuala, Y. Cao, R. J. Watts, X. Li, VEGF-B is dispensable for blood vessel growth but critical for their survival, and VEGF-B targeting inhibits pathological angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 6152–6157 (2009).
 42. A. Luttmun, M. Tjwa, P. Carmeliet, Placental growth factor (PlGF) and its receptor Flt-1 (VEGFR-1): Novel therapeutic targets for angiogenic disorders. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **979**, 80–93 (2002).
 43. C. Fischer, M. Mazzone, B. Jonckx, P. Carmeliet, FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: Drug targets for anti-angiogenic therapy? *Nat. Rev. Cancer* **8**, 942–956 (2008).
 44. H. Huang, J. He, D. Johnson, Y. Wei, Y. Liu, S. Wang, G. A. Lutty, E. J. Duh, P. Carmeliet, R. D. Semba, Deletion of placental growth factor prevents diabetic retinopathy and is associated with Akt activation and HIF1 α -VEGF pathway inhibition. *Diabetes* **64**, 200–212 (2015).
 45. D. A. C. Simpson, G. M. Murphy, T. Bhaduri, T. A. Gardiner, D. B. Archer, A. W. Stitt, Expression of the VEGF gene family during retinal vaso-obliteration and hypoxia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **262**, 333–340 (1999).
 46. Y. Ikeda, Y. Yonemitsu, M. Onimaru, T. Nakano, M. Miyazaki, R.-i. Kohno, K. Nakagawa, A. Ueno, K. Sueishi, T. Ishibashi, The regulation of vascular endothelial growth factors (VEGF-A, -C, and -D) expression in the retinal pigment epithelium. *Exp. Eye Res.* **83**, 1031–1040 (2006).
 47. J. A. Nagy, A. M. Dvorak, H. F. Dvorak, VEGF-A^{164/165} and PlGF: Roles in angiogenesis and arteriogenesis. *Trends. Cardiovasc. Med.* **13**, 169–175 (2003).
 48. J. Holash, S. Davis, N. Papadopoulos, S. D. Croll, L. Ho, M. Russell, P. Boland, R. Leidich, D. Hylton, E. Burova, E. Ioffe, T. Huang, C. Radziejewski, K. Bailey, J. P. Fandl, T. Daly, S. J. Wiegand, G. D. Yancopoulos, J. S. Rudge, VEGF-Trap: A VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 11393–11398 (2002).
 49. V. Chintalgattu, M. L. Rees, J. C. Culver, A. Goel, T. Jiffar, J. Zhang, K. Dunner Jr., S. Pati, J. A. Bankson, R. Pasqualini, W. Arap, N. S. Bryan, H. Taegtmeier, R. R. Langley, H. Yao, M. E. Kupferman, M. L. Entman, M. E. Dickinson, A. Y. Khakoo, Coronary microvascular pericytes are the cellular target of sunitinib malate-induced cardiotoxicity. *Sci. Transl. Med.* **5**, 187ra69 (2013).
 50. W. Arap, M. G. Kolonin, M. Trepel, J. Lahdenranta, M. Cardó-Vila, R. J. Giordano, P. J. Mintz, P. U. Ardel, V. J. Yao, C. L. Vidal, L. Chen, A. Flamm, H. Valtanen, L. M. Weaving, M. E. Hicks, R. E. Pollock, G. H. Botz, C. D. Bucana, E. Koivunen, D. Cahill, P. Troncoso, K. A. Baggerly, R. D. Pentz, K. A. Do, C. J. Logothetis, R. Pasqualini, Steps toward mapping the human vasculature by phage display. *Nat. Med.* **8**, 121–127 (2002).
 51. M. Cardó-Vila, A. J. Zurita, R. J. Giordano, J. Sun, R. Rangel, L. Guzman-Rojas, C. D. Anobom, A. P. Valente, F. C. L. Almeida, J. Lahdenranta, M. G. Kolonin, W. Arap, R. Pasqualini, A ligand peptide motif selected from a cancer patient is a receptor-interacting site within human interleukin-11. *PLOS ONE* **3**, e3452 (2008).
 52. A. Sergeeva, M. G. Kolonin, J. J. Mollidrem, R. Pasqualini, W. Arap, Display technologies: Application for the discovery of drug and gene delivery agents. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **58**, 1622–1654 (2006).
 53. F. I. Staquicini, M. G. Ozawa, C. A. Moya, W. H. P. Driessen, E. M. Barbu, H. Nishimori, S. Soghomonyan, L. G. Flores II, X. Liang, V. Paolillo, M. M. Alauddin, J. P. Basilion, F. B. Furnari, O. Bogler, F. F. Lang, K. D. Aldape, G. N. Fuller, M. Höök, J. G. Gelovani, R. L. Sidman, W. K. Cavenee, R. Pasqualini, W. Arap, Systemic combinatorial peptide selection yields a non-canonical iron-mimicry mechanism for targeting tumors in a mouse model of human glioblastoma. *J. Clin. Invest.* **121**, 161–173 (2011).
 54. G. P. Smith, J. K. Scott, Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Methods Enzymol.* **217**, 228–257 (1993).

Acknowledgments: We thank M.L. Baldini for assistance with the experiments and phage library construction and C.A.L. Braga for technical assistance. **Funding:** This work was supported by research grants from São Paulo Research Foundation (FAPESP) (grant 2009/54.806-8 to R.J.G. and grant 2009/54844-0 to J.S.M.) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (to R.J.G.). **Author contributions:** J.S.M. and R.J.G. designed the research. J.S.M. performed most of the experiments, with the assistance of A.R.R., L.S.M., and C.C.C. J.S.M. and R.J.G. analyzed the data and wrote the manuscript. All authors approved the final manuscript. **Competing interests:** The authors declare that they have no competing interests. University of São Paulo has filed a patent application in Brazil. R.J.G., J.S.M., and C.C.C. are entitled to standard royalties if licensing or commercialization occurs. **Data and materials availability:** All data needed to evaluate the conclusions in the paper are present in the paper. Additional data related to this paper may be requested from R.J.G. (giordano@iq.usp.br).

Submitted 22 March 2016
Accepted 27 September 2016
Published 28 October 2016
10.1126/sciadv.1600611

Citation: J. S. Michaloski, A. R. Redondo, L. S. Magalhães, C. C. Cambui, R. J. Giordano, Discovery of pan-VEGF inhibitory peptides directed to the extracellular ligand-binding domains of the VEGF receptors. *Sci. Adv.* **2**, e1600611 (2016).

This article is published under a Creative Commons license. The specific license under which this article is published is noted on the first page.

For articles published under [CC BY](#) licenses, you may freely distribute, adapt, or reuse the article, including for commercial purposes, provided you give proper attribution.

For articles published under [CC BY-NC](#) licenses, you may distribute, adapt, or reuse the article for non-commercial purposes. Commercial use requires prior permission from the American Association for the Advancement of Science (AAAS). You may request permission by clicking [here](#).

The following resources related to this article are available online at <http://advances.sciencemag.org>. (This information is current as of February 7, 2017):

Updated information and services, including high-resolution figures, can be found in the online version of this article at:

<http://advances.sciencemag.org/content/2/10/e1600611.full>

This article **cites 54 articles**, 15 of which you can access for free at:

<http://advances.sciencemag.org/content/2/10/e1600611#BIBL>

Science Advances (ISSN 2375-2548) publishes new articles weekly. The journal is published by the American Association for the Advancement of Science (AAAS), 1200 New York Avenue NW, Washington, DC 20005. Copyright is held by the Authors unless stated otherwise. AAAS is the exclusive licensee. The title *Science Advances* is a registered trademark of AAAS