



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 394**

51 Int. Cl.:

A61K 38/48 (2006.01)	A61K 38/17 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)	A61P 35/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)	A61P 17/06 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)	A61P 27/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02774845 .8**

96 Fecha de presentación : **26.07.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1409008**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.04.2004**

54

Título: **Utilización de una molécula de ácido nucleico que codifica el dominio desintegrina de una adamalislina como agente anti-angiogénico, anti-invasivo y anti-metastásico.**

30

Prioridad: **26.07.2001 FR 01 10015**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.05.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.05.2011

73

Titular/es: **Institut National de la Santé et de la
Recherche Médicale (INSERM)
101, rue de Tolbiac
75854 Paris Cédex 13, FR**

72

Inventor/es: **Trochon, Véronique;
Lu, He y
Soria, Claudine**

74

Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 359 394 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Utilización de una molécula de ácido nucleico que codifica el dominio desintegrina de una adamalislina como agente anti-angiogénico, anti-invasivo y anti-metastásico.

5 La presente invención se refiere al campo de la inhibición de los eventos que concurren en el proceso angiogénico, invasivo y metastásico, el cual está implicado en numerosas patologías, tales como el cáncer, las enfermedades inflamatorias, la aterosclerosis, y la angiogénesis patológica de la retina.

10 La invención se basa en la demostración de las funciones anti-angiogénicas, anti-invasivas y anti-metastásicas de un fragmento de una molécula presente en las células endoteliales humanas. La invención se refiere a la utilización de una molécula de ácido nucleico que comprende o que está constituida por una secuencia polinucleotídica que codifica el dominio desintegrina de la metargidina (Krätzschar *et al.*, 1996) designado asimismo a continuación "AMEP" por "anti-angiogenic metargidin peptide".

15 Este fragmento presenta la originalidad, con respecto a las demás sustancias anti-angiogénicas que han sido descritas en la bibliografía:

- 20 - de inhibir simultáneamente todas las etapas de la angiogénesis: la migración y la proliferación de las células endoteliales, su adhesión a diferentes sustratos de la matriz, la formación de estructuras de tipo capilar, y
- de inducir una apoptosis de las células endoteliales.

25 Además, de manera inesperada, este fragmento presenta la capacidad por un lado de inhibir la invasión de células cancerígenas y por otro lado de impedir la formación de metástasis, en particular de células que expresan en su superficie la integrina alfa v beta 3.

30 La angiogénesis designa un procedimiento morfogénico por el cual se forman nuevos capilares sanguíneos mediante el brote de vasos existentes en respuesta a una estimulación. Durante la angiogénesis *in vivo*, los neocapilares nacen a partir de los capilares o de las venillas post-capilares, jamás de las arterias, arteriolas o de las venas. Así, un factor angiogénico es una molécula que permite la iniciación y/o el mantenimiento de la angiogénesis, tal como, por ejemplo, el FGF2. Un factor anti-angiogénico es por lo tanto una molécula que inhibe la angiogénesis previniendo una o varias etapas clave de la angiogénesis.

35 La adhesión consiste en la capacidad de las células para fijarse a una matriz extracelular. Este fenómeno utiliza numerosas moléculas de adhesión presentes en la superficie de las células.

40 La migración de las células utiliza unas enzimas que permiten que las células degraden los compuestos de la matriz, así como unas moléculas de adhesión que aseguran el anclaje de las células a la matriz. Además, la arquitectura dinámica del citoesqueleto permite que las células alternen los periodos de adhesión y de desprendimiento indispensables para la motilidad.

La proliferación es un fenómeno que se refiere a la división de las células a lo largo del tiempo.

45 La apoptosis consiste en la capacidad intrínseca de las células normales para iniciar su propio suicidio según un programa complejo denominado muerte celular. La anoikis es una forma de la apoptosis inducida en las células normales que resultan de una pérdida de su adhesión al sustrato.

50 La invasión es una multiplicación exagerada de una clase de elementos anatómicos que provoca la sustitución por éstos de los elementos adyacentes.

55 La metástasis es un foco de células cancerígenas, en relación con un cáncer pre-existente, denominado "primitivo", pero desarrollado a distancia de este último y sin continuidad con el mismo. La diseminación de estos focos secundarios se realiza por vía linfática o sanguínea.

60 El desarrollo de un tumor y su diseminación en diversos órganos dependen de la vascularización intra y perivascular denominada asimismo angiogénesis (Folkman, 1984). La diana del proceso angiogénico es un enfoque terapéutico nuevo y representa una revolución en el tratamiento de los cánceres. Así, numerosas moléculas anti-angiogénicas están actualmente en curso de ensayos clínicos.

65 La vitaxina es un anticuerpo anti-integrina alfa v beta 3 humanizado que induce una inhibición de la proliferación de las células endoteliales así como un efecto proapoptótico (Brooks *et al.*, 1994; Hammes *et al.*, 1996), pero no modifica su migración. La integrina alfa v beta 3 es una molécula de adhesión expresada preferentemente por las células endoteliales de los neovasos y ciertas células cancerígenas. Interactúa con ciertos compuestos de la matriz extracelular, en particular la vitronectina, la fibronectina, la laminina, el colágeno IV y la fibrina, induciendo la adhesión y la migración de las células endoteliales. Se ha descrito ampliamente el papel principal de la integrina alfa

v beta 3 en la angiogénesis (para revisión, Eliceiri y Cheresh, 2000).

El marimastato bloquea la actividad proteolítica de las metaloproteinasas y por consiguiente inhibe la migración de las células endoteliales, pero no tiene ningún efecto sobre la proliferación de estas últimas. Las metaloproteinasas (MMP) pertenecen en efecto a la gran familia de las enzimas que permiten degradar el conjunto de los compuestos de la matriz extracelular, indispensables para la migración de las células endoteliales. Otras enzimas, que pertenecen a las serinas proteasas, participan asimismo en la migración celular, tal como el activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA) cuando está enlazado a su receptor anclado en la superficie membranaria (u-PAR) y la plasmina.

El conjunto de estos medicamentos tiene como objetivo bloquear la angiogénesis, pero su acción se limita a una o dos etapas de este proceso al contrario del AMEP que es pluripotente. Así, el AMEP bloquea no sólo el conjunto de las funciones angiogénicas de la integrina alfa v beta 3, contra la cual está dirigido inicialmente, a saber la proliferación y la adhesión de las células endoteliales, sino que, de manera sorprendente, induce asimismo una inhibición completa de la migración de estas células así como una inhibición de la formación de estructura de tipo capilar. Su efecto proapoptótico sobre estas células, independiente de una modificación de su ciclo celular, constituye asimismo su originalidad.

Además, de manera inesperada, el AMEP posee al mismo tiempo unas capacidades anti-invasivas y anti-metastásicas importantes.

Las adamalinas, denominadas asimismo ADAM, por "a disintegrin and metalloprotein" o MDC por "metalloprotein-rich, disintegrin-rich and cystein-rich protein" son una familia de proteínas ancladas en la membrana plásmica de las células. La estructura común al conjunto de las 29 adamalinas descritas se compone:

- de un dominio metaloproteinasas cuya actividad catalítica proteásica depende del zinc,
- un dominio desintegrina, y
- un dominio rico en cisteína y en repetición de tipo EGF (Wolfsberg *et al.*, 1995).

Conviene sin embargo observar que sobre el conjunto de las adamalinas, sólo una decena tienen un dominio metaloproteinasas que posee una actividad catalítica. El papel fisiológico de las diferentes adamalinas es extremadamente variado: regulación de la adherencia celular, liberación de un ligando, activación de un receptor, fusión de células (para revisión, Primakoff y Myles, 2000). Sin embargo, no se conoce el modo de acción de estas moléculas.

El AMEP se debe diferenciar de las desintegrinas de serpiente que han sido descritas en la bibliografía bajo dos aspectos:

- Las desintegrinas de serpiente ejercen una acción limitada sobre las diferentes etapas de la angiogénesis. La acutina (Yeh *et al.*, 1998) por ejemplo inhibe la adhesión de las células endoteliales a diferentes compuestos de la matriz e induce su apoptosis mientras que la Salmosina (Kang *et al.*, 1999) induce una inhibición de la adhesión de las células endoteliales y de su proliferación inducida por el FGF2.
- El AMEP presenta asimismo la ventaja de ser de origen humano y por consiguiente, no tiene el carácter antigénico de las desintegrinas de serpiente que presentan un carácter inmunógeno que les impide ser utilizadas como medicamentos en un tratamiento a largo plazo requerido en terapia anticancerígena.

La invención tiene por lo tanto por objeto una molécula de ácido nucleico que comprende o que está constituida por una secuencia polinucleotídica que codifica el dominio desintegrina de la Metargidina o un derivado de éste como agente anti-angiogénico, anti-invasivo o anti-metastásico. La invención se interesa por lo tanto en la utilización de una sustancia proteica que comprende o que está constituida por el dominio desintegrina de la metargidina cuya secuencia en aminoácidos está representada en el listado de secuencias adjunto con el número SEC ID nº 2, o un derivado de éste.

El fragmento AMEP se destaca porque es capaz de inhibir la invasión tumoral, la formación de metástasis y todas las etapas de la angiogénesis, es decir al mismo tiempo la migración y la proliferación de las células endoteliales al contrario de lo que se había supuesto por algunos autores (Zhang *et al.*, 1998) que consideraban que este dominio desintegrina, uniéndose a la integrina alfa v beta 3, podría estar únicamente implicado en la agregación homotípica de las células endoteliales durante la angiogénesis. Además, la acción inhibitoria del AMEP sobre la angiogénesis se observa en ausencia de cualquier adición de factores angiogénicos.

La necesidad de utilizar unos factores angiogénicos exógenos se observa por el contrario para demostrar el efecto anti-angiogénico de los anticuerpos anti-alfa v beta 3. Inhiben la angiogénesis únicamente después de la inducción por el FGF2, un factor angiogénico indispensable para el mantenimiento de la angiogénesis (Klein *et al.*, 1993). El interés terapéutico del AMEP con respecto a otros péptidos que poseen la secuencia RGD que son descritos como simples inhibidores de la adhesión de las células endoteliales (Kostetsky y Artemjev, 2000), reside asimismo en su

espectro de acción.

5 La invención se refiere a unas secuencias polinucleotídicas que codifican el dominio desintegrina de la metargidina y a los derivados de éste. Dichos derivados constituyen unos equivalentes funcionales que presentan unas propiedades anti-angiogénicas, anti-invasivas y anti-metastásicas, que el experto en la materia puede determinar a partir de las enseñanzas de la presente invención y más particularmente de los modelos y de los ensayos indicados en la parte experimental a continuación. Se trata de secuencias modificadas por delección, adición, supresión o sustitución de un aminoácido y de sus derivados.

10 La invención se interesa por lo tanto asimismo muy especialmente en una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica el dominio desintegrina de la metargidina cuya secuencia está representada en el listado de secuencias adjunto con el número SEC ID nº 1 o un derivado de éste. La secuencia que codifica este dominio está constituida por 276 nucleótidos (Met-420 a Glu-511).

15 Dicha secuencia está ventajosamente dispuesta bajo el control de secuencias de regulación de su expresión. Dicha molécula de ácido nucleico es por ejemplo un vector, tal como:

- 20 - un plásmido de expresión que codifica para el fragmento anti-angiogénico AMEP o un derivado sea cual sea la técnica de transferencia,
- un plásmido de expresión, que codifica para una proteína de fusión entre dicho fragmento o un derivado y un dominio proteico que facilita la purificación (plásmido de tipo pGEX) o que facilita la diana tisular,
- 25 - un plásmido u otro tipo de vector de expresión que codifica para dicho fragmento AMEP o un derivado, específico de un organismo hospedante diferente de una bacteria, por ejemplo un baculovirus en una célula de insecto o un plásmido en una célula eucariota.

30 Dicha molécula de ácido nucleico puede ser utilizada en unos protocolos de terapia génica o de terapia celular que consisten en administrar dicha molécula o unas células transformadas por dicha molécula a un individuo de manera que exprese la totalidad o parte del dominio desintegrina a nivel de un sitio a tratar.

35 Dicha molécula de ácido nucleico es asimismo útil para preparar la sustancia proteica de la invención. Así, el AMEP humano ha sido sintetizado a partir de bacterias y de células eucariotas transformadas con un plásmido que codifica para el AMEP. Más precisamente, *Escherichia coli* (clon DH5 alfa) ha sido utilizado como sistema de producción bacteriano y el músculo *tibia cranial* como sistema de producción eucariota, pero se podría utilizar la levadura o cualquier otro sistema de producción.

40 La demostración de la acción inhibitoria de AMEP sobre todas las etapas de la angiogénesis (migración, proliferación, adhesión, apoptosis de las células endoteliales y la formación de estructuras de tipo capilar) y sobre la invasión tumoral y la formación de metástasis, permite ofrecer un nuevo medicamento antitumoral en el tratamiento de los cánceres. En efecto, al contrario de los demás inhibidores de la angiogénesis descritos en la bibliografía hasta la actualidad, el AMEP ejerce una actividad anti-invasiva, anti-metastásica y anti-angiogénica intrínseca, pluripotente y excepcional. Inhibe al mismo tiempo la migración y la proliferación de las células endoteliales de diferentes orígenes (macrovascular o microvascular, transformadas o no) así como la adhesión de las células (sobre fibrinógeno, vitronectina y fibronectina) y la formación de estructuras de tipo capilar en unos modelos tridimensionales *in vitro*. Está demostrado asimismo un efecto proapoptótico del AMEP. *In vivo*, AMEP bloquea el crecimiento tumoral inhibiendo la formación de vasos sanguíneos y la diseminación metastásica, en particular de células que expresan la integrina alfa v beta 3.

50 La presente invención tiene por lo tanto como objetivo ofrecer un nuevo agente para el tratamiento y/o la prevención de las patologías cancerígenas en general, así como de las enfermedades en las que la angiogénesis contribuye a la patología de las afecciones tales como las enfermedades inflamatorias, la soriasis, la aterosclerosis, la degenerescencia macular, etc.

55 El agente activo está asociado en los medicamentos según la invención con cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable conocido por el experto en la materia adaptado al modo de administración utilizado. Así, los medicamentos según la invención pueden ser administrados:

- 60 - solos, por vía sistémica, local, oral o en implante
- por terapia celular o génica
- en asociación con otros principios activos
- en cualquier forma galénica, tal como una forma de nanopartículas por ejemplo

65 Otras ventajas y características de la invención se pondrán más claramente de manifiesto a partir de la descripción siguiente que se refiere a la preparación de AMEP y a su actividad anti-angiogénica, anti-invasiva y anti-metastásica *in vitro* e *in vivo*, y en la que se hará referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

- 5 - La figura 1 representa: en a, la visualización de la proteína de fusión (glutati6n-S transferasa-AMEP) en SDS-PAGE despu6s de la purificaci6n. Una sola banda visible despu6s de la coloraci6n con azul de Coomassie a 36 Kda. En b, una transferencia Western de AMEP purificado. Visualizaci6n de una sola banda a 10 Kda por un antisuero anti-desintegrina en el conejo.
- 10 - La figura 2 muestra el efecto del AMEP sobre la adhesi6n de CPAE con fibrin6geno (30 $\mu\text{g/ml}$), con vitronectina (10 $\mu\text{g/ml}$) y con fibronectina (40 $\mu\text{g/ml}$). Las c6lulas han sido pretratadas durante 24h con AMEP o el fragmento de 14 amino6cidos antes del ensayo de adhesi6n (descripci6n en Materiales y m6todos). Los experimentos se realizan por triplicado y se repiten tres veces. Los resultados se expresan en porcentaje con respecto al control (media \pm SEM).
- 15 - La figura 3 muestra el efecto de AMEP sobre la morfolog6a y la migraci6n de las c6lulas endoteliales. El frente de migraci6n se representa sobre las fotograf6as B, D, E respectivamente, condiciones de control AMEP a 5 $\mu\text{g/ml}$ y 10 $\mu\text{g/ml}$ (microscop6a con contraste de fase).
- 20 - La figura 4 representa la inhibici6n dependiente de la dosis de la migraci6n de las CPAE por el AMEP. La posici6n del frente de migraci6n de las c6lulas se mide todos los d6as durante un periodo de 3 d6as. Los resultados son la media de cinco experimentos y se expresan en porcentaje con respecto al control: media \pm SEM).
- 25 - La figura 5 representa la inhibici6n dependiente de la dosis de la proliferaci6n de las CPAE por el AMEP. Las c6lulas son cultivadas durante 48h en presencia de AMEP o de un fragmento de este dominio, que contiene la secuencia RGDC, e incubadas con 1 μCi de timidina tritiada durante 18h. Se mide entonces la radioactividad incorporada. Los resultados son la media de cinco experimentos y se expresan en porcentaje con respecto al control: media \pm SEM.
- 30 - La figura 6 muestra el efecto del AMEP sobre la formaci6n de estructuras de tipo capilares utilizando las HMEC-1. Unas bolas de citodex recubiertas de c6lulas endoteliales son incorporadas en un gel de fibrina en ausencia (fotograf6as A, B) o en presencia de AMEP (5 $\mu\text{g/ml}$) (fotograf6as C, D).
- 35 - La figura 7 muestra el efecto del AMEP sobre la formaci6n de capilares en gel de fibrina utilizando unas CPAE en presencia de 5 $\mu\text{g/ml}$ (B) o 10 $\mu\text{g/ml}$ (C, E) de AMEP con respecto al control (A, D).
- 40 - La figura 8 muestra la inhibici6n del crecimiento tumoral por AMEP. Cada punto de una curva representa el volumen del tumor medido sobre un rat6n nude. El experimento presentado implica cinco animales para el grupo de control as6 como para el grupo AMEP, tratados durante 14 d6as. Los histogramas representan el volumen tumoral medio de 5 ratones para cada grupo. Esta figura es representativa de 3 experimentos distintos.
- 45 - La figura 9 muestra la inhibici6n del n6mero de met6stasis pulmonares por AMEP utilizando unas c6lulas de melanoma. Cada punto representa el n6mero de met6stasis contadas en el pulm6n de un rat6n C57B1/6. El experimento presentado implica 12 animales para cada grupo. El histograma muestra la media del n6mero de met6stasis en el grupo de control y tratado. Este experimento es representativo de dos experimentos distintos.
- 50 - La figura 10 muestra una representaci6n fotogr6fica de la inhibici6n del n6mero de met6stasis pulmonares (manchas negras) de un pulm6n de rat6n C57B1/6 tratadas por AMEP en comparaci6n con un pulm6n de rat6n de control.

50 La descripci6n siguiente utiliza unas t6cnicas de biolog6a molecular convencionales descritas en la bibliograf6a, tales como por ejemplo: Sambrook, Fritsch y Maniatis, Molecular Cloning; a laboratory Manual, Segunda edici6n (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (Sambrook *et al.*, 1989); DNA Cloning: A Practical Approach, Volumen I y II (D.N. Glover ed. 1985); B. Perdal, A Practical Guide to molecular Cloning (1984); F.M. Ausubel *et al.* (eds.) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc. (1994).

55 As6, se entiende por 6cido nucleico, un compuesto poliquim6rico que comprende unas sub-unidades unidas de forma covalente denominadas nucle6tidos. Los 6cidos nucleicos incluyen el 6cido polirribonucleico (ARN) y el 6cido polidesoxirribonucleico (ADN), pudiendo ser cada uno de ellos monocatenario o bicatenario. Los ADN incluyen el ADNc (complementario), el ADN gen6mico, el ADN sint6tico y el ADN semisint6tico. La secuencia de nucle6tidos o de 6cidos nucleicos que codifica para una prote6na se denomina secuencia sentido. Se entiende por mol6cula ADN recombinante, una mol6cula de ADN que ha sufrido una manipulaci6n mediante unas t6cnicas de biolog6a molecular.

65 Se entiende por secuencia codificante de ADN, una secuencia de ADN bicatenario que est6 transcrita y traducida en polip6ptido en una c6lula *in vitro* o *in vivo* cuando est6 bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. La iniciaci6n de la secuencia codificante se determina mediante un cod6n iniciador en 5' aminoterminal y el final de la traducci6n por un cod6n stop en 3' carboxiterminal. Una se6al de poliadenilaci6n (terminaci6n de la transcripci6n) estar6 localizada generalmente en 3' de la secuencia codificante. Las secuencias que controlan la transcripci6n y la

traducción son unas secuencias ADN reguladoras, tales como los promotores, los estimuladores y de hecho permiten la expresión de una secuencia codificante en una célula hospedante.

5 Una secuencia promotora es una región de ADN capaz de unir el ARN polimerasa en la célula y de iniciar la transcripción de la secuencia codificante.

Una secuencia codificante está bajo el control de secuencias transcripcionales y traduccionales en la célula cuando el ARN polimerasa transcribe la secuencia codificante en ARNm (mensajero), que después se traduce en proteína.

10 Un plásmido de expresión es una molécula de ADN bicatenario circular extracromosómico que comprende unas secuencias reguladoras entre las cuales se inserta un gen de estructura (segmento de ADN que corresponde a la proteína deseada). Éste se replica de manera independiente en las bacterias.

15 Un vector de expresión es una molécula de ácido nucleico que comprende como mínimo un origen de replicación independiente y un promotor inducible, y que puede ser introducido específicamente en unas células hospedantes tales como en unas bacterias o unas células eucariotas. En este vector, se puede insertar una secuencia codificante denominada inserto que corresponde a la proteína o al péptido deseado.

20 I - Método.

1) Cultivo celular.

25 Las células CPAE (células endoteliales de arteria pulmonar de ternera) han sido donadas por el Dr J. Badet (laboratorio de Biotecnología de las células eucariotas, Universidad de Créteil, Francia). Estas células son cultivadas en un medio MEM adicionado con 20% de suero de ternera fetal (SVF), 2 mM de L-glutamina, 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin (Gibco, Paisley, UK). Todos los medios citados a continuación ("medio completo") contienen las mismas concentraciones de penicilina/estreptomycin y de L-glutamina que el utilizado para las células CPAE. Se utilizan en los pasos 12-20. Las células HMEC-1 (células endoteliales de la microvasculatura humana) han sido donadas por el Dr Ades (Center of disease control and prevention, Atlanta, GA) que ha establecido esta línea celular transfectando unas células endoteliales de la dermis humana con el gen SV40 y el antígeno grand T. Las células HMEC-1 son cultivadas en un medio MCDB 131 completo (Sigma, St Louis, MO) adicionadas con 10% de SVF, 10 ng/ml de EGF (collaborative Biomédical Products) y 1 µg/ml de hidrocortisona (Sigma). Las células HUVEC (células endoteliales de vena de los cordones umbilicales humanos) han sido extraídas en laboratorio de cordón umbilical según el método descrito por Jaffe *et al.* Los cordones son sometidos a una digestión controlada por colagenasa A al 0,2% (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemania). Las células primarias son cultivadas en medio completo M199 suplementado con 20% de SVF, 75 mM de HEPES, 3,7 mM de bicarbonato de sodio pH 7,5 y 5 µg/ml de fungizona (Life technologies, Francia). Las células HMVEC-d (células endoteliales de la microvasculatura de la dermis, Biowhittaker Europe, Bélgica) son cultivadas del paso 4 a 6 en un medio completo suministrado por el fabricante (EGM-2MV) suplementado con 10% de SVF. Las células C51 (cáncer del colon murino) son cultivadas en medio completo RPMI + 10% de SVF. Las células 3T3 (fibroblastos tumorales murinos) son cultivadas en medio completo DMEM + 10%, las células MDA MB 231 (células de cáncer de mama humanas) utilizan medio completo DMEM adicionado con 10% de SVF así como las células fibroblásticas cancerígenas 3T3. Las células B16F10 (células de melanoma murino) son cultivadas en medio DMEM + 10% SVF y 1,5 g/l de bicarbonato de sodio.

45 Los anticuerpos anti-desintegrina se obtienen después de la inoculación en el conejo de un fragmento de AMEP, según el método descrito por Herren *et al.* (Néosystème, Francia). Este fragmento está constituido por 12 aminoácidos y contiene la secuencia RGDC; su peso molecular es de 1,4 Kda.

50 2) Construcción y síntesis del AMEP humano en un sistema bacteriano.

Se ha preparado una proteína de fusión del AMEP con la glutatión S-transferasa (GST). Para ello, el fragmento de ADNc de 276 nucleótidos de SEC ID nº 1 que codifica para el AMEP (Met-420 a Glu-511) ha sido amplificado mediante PCR (*polymerase chain reaction*). Este ADNc ha sido sub-clonado en el plásmido pGEX-6P a nivel del sitio BamH1 (Amersham Pharmacia Biotech). La síntesis de la proteína de fusión GST-AMEP ha sido inducida en unas bacterias *Escherichia coli* DH5 o mediante isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosido (1 mM) tal como se ha descrito por Smith y Johnson, 1988. Brevemente, después de la lisis de las bacterias con 1% de Triton X100 seguido de una sonicación, la GST-desintegrina ha sido purificada sobre cromatografía de afinidad utilizando glutatión-agarosa y eluida con glutatión reducido (5 mM de Tris, HCL (pH 8,0) que contiene 5 mM de glutatión reducido (Sigma) (pH final de 7,5, preparado extemporáneamente). Una sola banda que corresponde al peso molecular de esta proteína de fusión (36 Kda) ha sido detectada en SDS-PAGE (figura 1a).

65 Con el fin de ensayar la actividad del péptido que corresponde al AMEP sobre diferentes modelos de angiogénesis *in vitro*, se ha escindido el AMEP de la GST mediante una proteasa específica: la "PreScisionTM protease" que es a su vez una proteína acoplada a una GST (Amersham, Buckinghamshire), según las instrucciones de Amersham.

El AMEP se purifica a continuación mediante cromatografía de afinidad utilizando glutatión-agarosa sobre columna según las instrucciones de Sigma. El AMEP está constituido por 91 aminoácidos y su masa molecular estimada es de 9,7 Kda.

- 5 La pureza del AMEP ha sido analizada por transferencia Western (figura 1b) y mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). La concentración proteica se determina mediante ensayo BCA (Pierce, Perbio, Science, Francia).

3) Transferencia Western

10 Cien microgramos de AMEP purificado han sido depositados sobre un gel de electroforesis constituido por poliacrilamida-SDS al 12% y transferidos sobre una membrana de nitrocelulosa (Schleicher y Schuell). La membrana se satura durante 1h con un tampón TBS (tris buffer solution: Tris 10 mM pH 7,5; NaCl 200 mM)/Tween (0,05%) que contiene 10% de leche, y después se incuba con un suero policlonal de conejo a la dilución 1:1.000 dirigido contra el
 15 AMEP (Néosystem, Francia) o con un anticuerpo anti-GST (Amersham). Después de cinco lavados en TBS/Tween, la membrana se incuba durante 1h con un anticuerpo secundario apropiado acoplado a la peroxidasa a la dilución de 1:2.000 según las instrucciones del fabricante (DAKO). La membrana se lava cinco veces en el mismo tampón de aclarado y la detección de la señal se realiza según el procedimiento de quimioluminiscencia ECL (Amersham).

20 4) Adhesión al fibrinógeno, a la vitronectina y a la fibronectina

- Primera técnica: Incubación puntual de las células endoteliales con el AMEP durante el ensayo.

25 Las CPAE son despegadas de las cajas de cultivo mediante incubación con EDTA 1,5 mM y resuspendidas a razón de 5×10^5 células/ml en tampón de adhesión (NaCl 140 mM, Hepes 10 mM, Glucosa 5 mM, KCl 5,4 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, MnCl₂ 1 mM, pH 7,4). Después, 100 µl de suspensión celular son puestos en presencia de AMEP (5 µg/ml) a temperatura ambiente y después son introducidos en unos pocillos de una placa de 96 pocillos (Greiner, D. Dutcher) previamente incubados durante una noche a 4°C con 50 µl de fibrinógeno purificado (40 µg/ml en PBS; Kabi), 10 µg/ml de vitronectina (Sigma); 30 µg/ml de fibronectina (Sigma) o 1% de BSA (albúmina de suero bovino) como control negativo. Después de 20 minutos de incubación de las células
 30 CPAE a 37°C, la placa se lava dos veces con 200 µl de tampón de adhesión y los sitios no específicos son saturados con PBS adicionado con 1% de BSA durante 1 hora a 37°C. A continuación, se lava de nuevo la placa dos veces con tampón de adhesión que contiene 1% de BSA. Las células no adherentes son eliminadas mediante lavado de los pocillos tres veces con 200 µl de tampón de adhesión más 1% de BSA. La medición de la actividad fosfatasa de las células permite cuantificar las células adherentes. Brevemente, se añaden a los pocillos 100 µl de paranitrofenolfosfato (Sigma) a 3 mg/ml en un tampón de acetato pH 5,5 que contiene 0,1% de triton X100 y se incuban durante 2h a 37°C. La reacción se detiene mediante la adición de NaOH 1N. La liberación de paranitrofenol, que indica el número de células adherentes, se mide después de la lectura de la absorbancia a 405 nm por un lector ELISA (Titertek Twinreader). Cada experimento se realiza tres veces.

- Segunda técnica: Las células CPAE son cultivadas durante 24h en presencia del AMEP a la concentración final de 5 µg/ml antes de ser despegadas. La continuación del protocolo es idéntica a la descrita anteriormente con la diferencia de que no tiene lugar a continuación ninguna otra incubación de las células con el AMEP.

45 5) Modelo de migración de las células endoteliales.

El modelo de migración se lleva a cabo en unas placas de 24 pocillos. Se disuelve 1,5% de agarosa en medio de cultivo con el fin de formar un gel en los pocillos. La mitad de un cilindro de agarosa se inserta entonces en un pocillo. Las células CPAE son añadidas en el espacio dejado libre del pocillo y se cultivan hasta su confluencia. El
 50 trozo de agarosa se retira con el fin de permitir que las células migren, y se añade el AMEP, a las concentraciones deseadas, en el medio de cultivo. Después, se coloca un papel milimetrado transparente bajo la caja con el fin de determinar la velocidad de migración de las células con la ayuda de un micrómetro ocular bajo microscopio invertido. Los experimentos por duplicado se repiten tres veces. Los resultados se expresan en porcentaje con respecto al control.

55 6) Modelo de proliferación celular.

Las células son cultivadas a razón de 20.000 células por pocillo (placa de 96 pocillos: Greiner) en medio completo. Después de 24h, las células son cultivadas en medio que contiene una concentración la mitad menor que la que
 60 corresponde al medio completo con el fin de inducir las células en fase G₀/G₁ de proliferación durante 24h suplementarias. Después, las células son cultivadas durante 30h con un medio completo en presencia o no del AMEP. Se añade entonces timidina tritiada (1 µCi por pocillo) a las células y se incuba durante 18h. La incorporación de timidina tritiada por las células se cuantifica gracias a un papel filtro según el protocolo descrito para la utilización de un Skatron (Skatron, Lier, Noruega), y la radioactividad se determina entonces mediante un recuento después de la adición de líquido de centelleo. Los resultados se expresan en porcentaje con respecto al control.

7) Análisis de la apoptosis y del ciclo celular (utilización de Hoechst 33342), y cuantificación de la apoptosis precoz (utilización de la anexina V).

- Técnica de coloración vital específica del ADN con el Hoechst 33342 (Sigma).

Las células endoteliales (CPAE) son tripsinadas y la suspensión celular se ajusta a $1 \cdot 10^6$ células/ml. El colorante Hoechst 33342 se añade a 20 $\mu\text{g/ml}$ y las células se incuban durante tres minutos a temperatura ambiente bajo agitación. El porcentaje de células apoptóticas se analiza mediante un citómetro de flujo (FACS). Las células son incubadas después durante 30 minutos en la oscuridad (37°C) y se efectúa el análisis del ciclo celular.

- Técnica que utiliza la anexina V (R y D system): Un residuo de $1 \cdot 10^6$ células endoteliales (CPAE) se resuspende en 1 ml de tampón de reacción (100 μl de tampón de unión $10 \times$ (100 mM HEPES/NaOH pH 7,4, 1,5 M de NaCl, 50 mM de KCl, 10 mM de MgCl_2 , 18 mM de CaCl_2), 100 μl de yoduro de propidio (concentración inicial 50 $\mu\text{g/ml}$), 10 μl de anexina V-FITC y 790 μl de agua desionizada. La suspensión se incuba durante 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. El porcentaje de células apoptóticas se analiza mediante citometría de flujo.

8) Formación de estructuras de tipo capilar en dos modelos de angiogénesis en gel de fibrina.

Uno de los modelos utiliza unos agregados de células CPAE y se utiliza según el método descrito por Pepper *et al.*, 1991. Brevemente, se agregan 10.000 CPAE durante 24h sobre agarosa 2% en placa de 96 pocillos. Se extraen tres agregados y se incorporan en un gel de fibrina: se dializa fibrinógeno purificado (3 mg/ml; Kabi) contra medio MEM y después se mezcla con 20% de SVF, 1% de L-glutamina, 1% de penicilina/estreptomicina, 2 μM de aprotinina y AMEP a la concentración deseada. Se añade entonces trombina humana (1 UI/ml; Sigma) con el fin de obtener un gel de fibrina en cuya superficie se añade medio completo adicionado con aprotinina (2 μM), este medio se cambia cada tres días. La formación de estructuras de tipo capilares se puede observar a partir de 24h de cultivo. Estos capilares son fotografiados bajo microscopio invertido y el tamaño de estas estructuras se mide en las fotos. El análisis estadístico (método Mann-Whitney) permite determinar si el tamaño de estas estructuras es diferente.

El segundo modelo utiliza unas bolas del orden de 150 μm según la técnica descrita en Nehl *et al.* Las células utilizadas son las HMEC-1 en la medida en la que las CPAE no se pueden utilizar en este modelo. Las HMEC-1 no pueden, por otro lado, ser utilizadas en el modelo descrito anteriormente. Las células HMEC-1 se adhieren a las bolas Cytodex 3 (Sigma) cuando las células son incubadas con las bolas, en medio completo durante 4h a 37°C. Las bolas son entonces resuspendidas en un amplio volumen de medio completo de manera que se obtengan 30 células/bola, y se agitan durante 5 minutos cada 30 minutos a 30 rpm/min. durante 12 h, seguida de un cultivo en continuo a la misma velocidad durante 4 días. Cuando toda la superficie de las bolas está recubierta de células, las bolas son centrifugadas a 800 g durante 5 minutos para concentrarlas e incorporarlas en un gel de fibrina idéntico al descrito para el procedimiento modelo anterior, así como para los métodos de cuantificación y de análisis de resultados. Al contrario del modelo que utiliza las CPAE, las estructuras de tipo capilares aparecen sólo después 3 días de cultivo a 37°C.

9) Preparación de los plásmidos para la electrotransferencia.

El ADNc del AMEP se sub-clona en el sitio Eco RV del vector pBi (Clonetech, Palo Alto, CA USA). La expresión del gen de interés en este vector está bajo la dependencia de un promotor que responde a la tetraciclina en un sistema de expresión que implica el gen eucariota Tet-On. El vector Tet-On expresa el transactivador rtTA (activador transcripcional tetraciclina inversa) y el vector TettTS expresa el "silencer" tTS (Silenciador transcripcional tetraciclina). Las purificaciones de los plásmidos se efectúan de tal manera que no esté presente ninguna endotoxina (Maxi endo free kit, Quiagen). El ADN plasmídico purificado se solubiliza en NaCl 0,9% estéril, desprovisto de endotoxina a la concentración deseada.

10) Electrotransferencia del gen que codifica para el AMEP humano en el músculo de ratón nude y C57B1/6.

Se solubilizan 20 μg de plásmido pBi-AMEP, 10 μg de plásmido Tet-off y 20 μg de plásmido tet-on en 30 μl de NaCl 0,9% estéril, y se inyectan en el músculo *tibia cranial* de ratones nude o C57B1/6 de 8 semanas de edad y previamente anestesiados mediante inoculación intraperitoneal de pentobarbital tal como se ha descrito por Mir *et al.* (Mir *et al.*, 1999). Brevemente, se aplican 8 choques eléctricos de 200 V/cm durante 20 minutos a una frecuencia de 1 Hz, gracias a un electrodo adaptado a la pata del ratón y que contiene dos placas de acero. El electrodo se conecta a un electropulsador PS-15 (Jouan, St Herblain, Francia). Los mismos plásmidos que no contienen el gen del AMEP constituyen el control negativo.

11) Modelo murino atímico de crecimiento tumoral (células MDA MB 231).

Las células MDA-MB-231 previamente cultivadas hasta 80% de confluencia son despegadas, lavadas y resuspendidas en PBS a razón de $20 \cdot 10^6$ células/ml. Doscientos microlitros de suspensión celular son inyectados por vía sub-cutánea en la espalda de ratones nude de 8 semanas previamente tratados tal como se ha descrito

anteriormente. Las mediciones de dos diámetros de un tumor permiten calcular su volumen según la fórmula matemática (suma de los dos diámetros dividida por 2)³/0,52. Cuando los tumores alcanzan un volumen de 18 mm³, se añade doxiciclina (análogo estable de la tetraciclina) (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, Francia) a 200 µg/ml en el agua de beber de los ratones y adicionada con 5% de sacarosa, con el fin de inducir la expresión del AMEP en los músculos del ratón. El tamaño de los tumores se controla durante 14 días después de la inducción.

12 Cuantificación de la angiogénesis tumoral (inmunohistoquímica y análisis de imagen de los tumores sólidos subcutáneos).

Los tejidos tumorales son fijados en etanol. Unos cortes de 5 µm son preparados en parafina. La peroxidasa endógena se apaga mediante 3% de H₂O₂ durante 10 minutos, con el fin de poder utilizar estos cortes en inmunohistoquímica. Después del lavado de los cortes con agua destilada y saturación con suero Optimax 1:10 (BioGenex, San Ramon, CA) durante 10 minutos, las láminas son incubadas durante una hora con un anticuerpo de rata anti-CD31 (molécula de adhesión de las células endoteliales) al 1:50. Después de dos lavados con Optimax durante 4 minutos, las láminas son incubadas con un anticuerpo policlonal de cabra anti-rata acoplado a la biotina (1/50), seguido de dos lavados de 4 minutos con Optimax. Las láminas son tratadas después con un sustrato cromogénico DAB durante 10 minutos, lavadas con agua destilada, contra-coloreadas con hematoxilina de Mayer y montadas en Pertex. Todas las láminas son inmunomarcadas y contra-coloreadas el mismo día, lo cual garantiza una intensidad de marcado estandarizada.

Para cada animal, se somete una muestra histológica representativa de los cortes marcados con CD31 al análisis de imagen utilizando un microscopio AxiophotZeiss (Alemania), una cámara Sony 3CCD (resolución 768x576 píxeles). La elección de una ampliación x100 permite la digitalización de la totalidad de la muestra. Estos últimos toman en cuenta sólo el tejido tumoral, excluyendo las zonas necróticas y fibrinosas. Para cada muestra, se digitaliza la totalidad de la superficie, u 8 campos contiguos si el tamaño de la muestra es demasiado grande. Las imágenes son analizadas mediante un programa específico basado en Linux, que produce un índice cuantitativo de 0 a 255. Las imágenes en color digitalizadas son transformadas en diferentes niveles de grises. Una imagen teórica compuesta únicamente por vasos marrón-rojos correspondería a un índice 255, mientras que una imagen desprovista de vasos (marcado azul totalmente) estaría asociada a un índice 0. Para cada píxel de la imagen se asocia un valor comprendido entre 0 y 255 y se obtiene la media de estas cifras para cada imagen. El índice final para cada animal resulta del cálculo del valor medio de 8 campos contiguos.

13) Modelo tumoral metastásico singénico (metástasis pulmonares, células B16F10).

Se añade doxiciclina (Sigma-Aldrich) a 200 µg/ml en el agua de bebida de los ratones C57B1/6 con el fin de inducir la expresión del AMEP en los músculos del ratón tres días antes de la inyección de células de melanoma de ratón B16F10. Estas células se cultivaron previamente hasta 50% de confluencia, se despegaron, se lavaron y se resuspendieron en PBS a razón de 4·10⁶ células/ml. Cien microlitros de suspensión celular han sido inyectados por vía intravenosa en el seno retro-orbital de los ratones. Los ratones son sacrificados 7 días después del injerto de las células, los pulmones extraídos y se efectúa bajo lupa binocular un recuento de las metástasis pulmonares de color negro.

II - Resultados.

1) Inhibición de la adhesión de las células endoteliales por el AMEP sobre la fibronectina, la vitronectina y el fibrinógeno.

Las dos técnicas de adhesión descritas en los métodos han sido realizadas en presencia del AMEP o de un fragmento del AMEP de 1,4 Kda constituido por 12 aminoácidos entre los cuales está la secuencia RGDC (Néosystem, Francia). Este péptido ("péptido de 1,4 Kda ") ha sido utilizado con el fin de determinar si el modo de acción del AMEP difiere de un péptido RGD de control.

Cuando las células endoteliales son incubadas puntualmente 30 minutos con el péptido de 1,4 Kda (1 µg/ml) antes de realizar el ensayo de adhesión, se observa una fuerte reducción de la adhesión de las células sobre la vitronectina (49 ± 1,2% de inhibición) y sobre el fibrinógeno (50 ± 2,4% de inhibición). Este resultado no es sorprendente en la medida en la que este fragmento bloquea la interacción de las integrinas alfa v beta 3 presentes en la superficie de las células endoteliales en sus sustratos privilegiados. En estas mismas condiciones, no se ha detectado ningún efecto significativo del AMEP sobre la adhesión de las células endoteliales a estos sustratos a una concentración molar comparable (10 µg/ml, no mostrado).

Por el contrario, cuando las células son preincubadas durante 24h con el AMEP o con el péptido de 1,4 Kda a la misma concentración molar que anteriormente, los resultados obtenidos se invierten: el AMEP inhibe la adhesión de las células endoteliales sobre la vitronectina, la fibronectina y el fibrinógeno en 30% para los tres sustratos mientras que el péptido de 1,4 Kda no ejerce ningún efecto significativo (figura 2).

2) Inhibición de la migración de las células endoteliales por el AMEP.

La figura 3 muestra el aspecto de las células endoteliales (CPAE) después de la adición de AMEP a 5 µg/ml (C, D) y 10 µg/ml (E, F) comparado con el control (ausencia del dominio: A, B) en el presente modelo de migración. Un cambio morfológico muy claro de las células se observa en presencia del AMEP: las células endoteliales forman largos pseudópodos y la cohesión de las células entre sí está alterada, y numerosas células se despegan (10 µg/ml). Este fenómeno es aún más visible en el frente de migración de las células (D, F). El efecto del AMEP sobre la velocidad de desplazamiento de estas células depende de la dosis (2-10 µg/ml) con una inhibición completa de la migración de las células a 10 µg/ml (figura 4) al contrario del péptido de 1,4 Kda (1 µg/ml) que no induce ningún efecto inhibitor.

3) Efecto del AMEP sobre la proliferación celular.

Al contrario del fragmento de 12 aminoácidos (péptido de 1,4 Kda que no tiene ningún efecto sobre la proliferación de las células endoteliales sea cual sea la concentración utilizada (1-100 µg/ml, no mostrado), el AMEP inhibe en gran medida la proliferación (reducción de 40%) a partir de 2 µg/ml (figura 5). Este efecto es máximo a 5 µg/ml con 60% de inhibición de la proliferación (porcentaje idéntico a 10 µg/ml). Se debe observar que el suero policlonal de conejo, previamente utilizado en transferencia western (Néosystem, Francia), dirigido contra el AMEP inhibe de manera comparable la proliferación de estas células ($65 \pm 0,1\%$).

Con el fin de analizar la especificidad de acción del AMEP, se ha estudiado su efecto sobre la proliferación de células endoteliales primarias de la macro o microvasculatura así como sobre unas células cancerígenas conocidas por poseer o no la integrina alfa v beta 3 en su superficie, una de las dianas conocidas por el AMEP. Los resultados presentados en la tabla 1 siguiente muestran que el AMEP inhibe de manera comparable los diferentes tipos de células endoteliales mientras que no existe ningún efecto sobre la proliferación de células cancerígenas de diversos orígenes (fibroblásticas, mamarias, colon) que poseen poco o nada de integrina alfa v beta 3 en su superficie (respectivamente MDA MB 231, C51, 3T3). Ventajosamente, se observa un efecto inhibitor importante del AMEP sobre la proliferación de células que expresan la integrina alfa v beta 3.

Tabla 1

Tipo celular	Células endoteliales			Células cancerígenas			
	CPAE bovinas	HMVEC-d humanas	HUVEC humanas	3T3 murinas	C51 murinas	MDA-MB 231 humanas	B16F10
% de inhibición de la proliferación celular por el AMEP (5 µg/ml)	60,4 ± 3,2	54,2 ± 2,1	52,6 ± 3,1	9,1 ± 2,2	0,5 ± 1,1	17,5 ± 0,5	74,3 ± 7,0

La tabla 1 muestra el efecto del AMEP sobre la proliferación de células endoteliales y cancerígenas. Los experimentos han sido repetidos cinco veces (media ± SEM). Las cifras indicadas representan el porcentaje de inhibición de la proliferación de las células citadas por el AMEP utilizado a 5 µg/ml con respecto al control (ausencia de AMEP) realizado en las mismas condiciones.

4) Demostración de la actividad proapoptótica del AMEP sobre las células endoteliales.

Se han utilizado dos técnicas que permiten determinar el porcentaje de las células apoptóticas. Una de ellas utiliza el Hoechst 33342 que permite guardar las células vivas y por consiguiente seguir las diferentes fases del ciclo celular. La técnica que utiliza la Anexina-V permite por su parte determinar la apoptosis precoz de las células endoteliales (visualización de los fosfatidilos serinas en su superficie). Los resultados obtenidos son comparables, a saber un porcentaje de células apoptóticas multiplicado por 3 en presencia de AMEP (tabla 2 siguiente). Por el contrario, contrariamente a la mayoría de las moléculas que inducen la apoptosis, no se ha podido demostrar ninguna modificación del ciclo celular, con el Hoechst 33342, en presencia del AMEP (no mostrado).

Tabla 2

		Método Hoechst 33342	Método Anexina-V
% de células apoptóticas	Control	3,9 ± 1,1	4,6 ± 0,9
	AMEP 5 µg/ml	12,6 ± 3,7	12,8 ± 2,5

La tabla 2 muestra el porcentaje de células en apoptosis. Los análisis en citometría de flujo se realizan según los dos métodos descritos en Materiales y métodos. Los experimentos han sido realizados tres veces. Media ± SEM.

5) El AMEP inhibe la formación de estructura de tipos capilares en dos modelos de angiogénesis en gel de fibrina.

Las células endoteliales de la microvasculatura están más adaptadas para el estudio de la angiogénesis, por lo cual se han utilizado las HMEC-1 (Nehls y Herrmann, 1995). Estas células son cultivadas sobre unas bolas y después incorporadas en un gel de fibrina (figura 6, control: A, B). El efecto inhibitor del AMEP (5 µg/ml) sobre la formación de estructuras de tipo capilar se observa después de tres días de cultivo (C) y se vuelve espectacular después de 10 días con una reducción de 90% del tamaño de los tubos (D). Los estudios anteriores que tienen como objetivo determinar los efectos del AMEP sobre las diferentes etapas de la angiogénesis utilizaban las CPAE como células endoteliales, por lo tanto se ha querido verificar el efecto de este dominio sobre otro modelo de angiogénesis. En efecto, estas células no se pueden utilizar en el modelo que utiliza unas bolas puesto que su morfología no está adaptada; la agregación de las CPAE fue el único medio para estudiar el efecto del AMEP sobre la angiogénesis *in vitro*. Las estructuras de tipo capilar aparecen 24h después de la incorporación de los agregados en el gel de fibrina. La figura 7 reúne unas fotografías tomadas después de 3 días de incubación. La adición del AMEP a 5 µg/ml (B) o 10 µg/ml (C, E) induce una desorganización de las estructuras de tipos capilares con respecto al control (A, D) conduciendo a una muerte de las células endoteliales (no mostrado). En las condiciones de control, se observa un aumento de la longitud de las estructuras hasta 6 días de incubación (no mostrado).

6) Inhibición del crecimiento tumoral y de la angiogénesis tumoral por el AMEP sobre unos ratones nude.

La producción de AMEP en unos ratones nude se obtiene después de la electrotransferencia del gen que codifica para el AMEP en el músculo de los ratones, seguida de una inducción de su expresión por doxiciclina.

Tal como se muestra en la figura 8, el volumen tumoral del grupo AMEP es claramente inferior al del grupo de control con una inhibición constatada que alcanza 78% después de 14 días de tratamiento. Se observa un porcentaje de inhibición similar después de sólo 7 días de tratamiento. Una cuantificación de la angiogénesis intratumoral ha sido efectuada sobre los cortes de estos mismos tumores. Los resultados presentados en la tabla 3 (a continuación) muestran que el efecto inhibitor potente del AMEP sobre el crecimiento tumoral está correlacionado con una inhibición significativa del número de vasos en el interior de los tumores tratados por el AMEP, de 53,4%.

Estos resultados muestran que el AMEP actúa de manera potente en unos modelos *in vivo* de tumores que no expresan la integrina alfa v beta 3.

La tabla 3 siguiente indica el índice estadístico de la vascularización tumoral, obtenido después de la digitalización y del análisis de imagen por ordenador de una muestra representativa de cortes de tumores que proceden de ratones que expresan o no el AMEP.

Tabla 3

	Grupo de control	Grupo tratado mediante el AMEP
Media	2,96	1,38
Varianza	0,28	0,14

7) Inhibición de la formación de metástasis pulmonares por el AMEP sobre unos ratones singénicos.

La producción del AMEP en el músculo de los ratones C57B1/6 está inducida por la doxiciclina. Una inhibición excepcional del número de metástasis pulmonares de 74,2%, después de 7 días de tratamiento se observa en el grupo de ratones tratados por el AMEP, en comparación con el grupo de control (figuras 9, 10).

III - Discusión.

Durante el proceso angiogénico, las células endoteliales están activadas, y adquieren un fenotipo angiogénico. Poseen entonces en su superficie la integrina alfa v beta 3 y la metargidina (moléculas indetectables sobre unas células endoteliales procedentes de vasos maduros) (Herren *et al.*, 1997).

El conjunto de los resultados obtenidos muestran que el AMEP posee una actividad anti-angiogénica más amplia que la ejercida por el péptido de 1,4 Kda. Puesto que el AMEP, pero también el péptido de 1,4 Kda, poseen una secuencia RGD implicada en la unión de las células endoteliales a las integrinas alfa v beta 3, se sugiere que la acción del AMEP no se limita a un bloqueo de las funciones de la integrina alfa v beta 3. El AMEP parece poseer una actividad propia que podría estar relacionada con unas modificaciones de la señalización a nivel celular (mensaje que podría transitar por la integrina alfa v beta 3 y/o por la metargidina).

La adhesión de las células es un fenómeno que interviene en la migración celular; sin embargo, se cree que la inhibición de la adhesión no es el único mecanismo responsable de la inhibición de la migración de las células endoteliales: así, 10 µg/ml de AMEP son suficientes para bloquear totalmente la migración de las células endoteliales mientras que, a esta misma concentración, el efecto inhibitor del AMEP sobre la adhesión es sólo parcial.

Esta actividad inhibidora excepcional del AMEP sobre las etapas claves de la angiogénesis está reforzada por su efecto antiproliferativo (hasta 60% de inhibición de la proliferación de las células endoteliales). De manera interesante, la inhibición de proliferación de las células endoteliales inducida por el AMEP no está asociada a una modificación detectable del ciclo celular.

Durante la última etapa de la angiogénesis, las células se organizan en tubos que se anastomosan para permitir la formación de una luz vascular. Se ha recreado *in vitro* este fenómeno con unas células endoteliales de la microvasculatura (HMEC-1) y de la microvasculatura (CPAE) según dos técnicas descritas en Materiales. De manera notable, una inhibición total de la formación de estructuras de tipos capilares se observa en el modelo que utiliza HMEC-1 en presencia de AMEP. Al contrario de lo que se ha podido observar hasta ahora con otros inhibidores de la angiogénesis, el AMEP induce una desorganización letal de los tubos de CPAE que se han formado previamente de manera precoz (12h). Las CPAE tienen en efecto una velocidad de proliferación y de migración muy superior a las HMEC-1 (no mostrado), lo cual permite explicar la dualidad de efecto del AMEP sobre los dos modelos de angiogénesis.

Estos trabajos muestran por otra parte que la inhibición de la angiogénesis tumoral *in vivo* por el AMEP conduce a una inhibición excepcional del crecimiento tumoral, incluso sobre unos tumores conocidos por no expresar la integrina alfa v beta 3. Además, se demuestra un efecto anti-metastásico marcado del AMEP en un modelo de metástasis pulmonar.

Por último, el tratamiento de las células endoteliales con 10 µg/ml de AMEP induce un aumento del número de células endoteliales muertas (flotantes en el medio de cultivo) observables con microscopio de contraste de fase (figura 3). Sin embargo, el efecto de este producto sobre la apoptosis (fenómeno cuantificable sobre una células todavía vivas) es modesto (aumento en un factor 3). El AMEP tiene por lo tanto la particularidad de asociar un efecto anti-angiogénico potente a una inducción de la muerte celular por un fenómeno descrito recientemente con el nombre de anoikis (Frisch, 2000; Zhu *et al.*, 2001).

El aspecto innovador del AMEP reside por lo tanto en su capacidad para inhibir todas las etapas de la angiogénesis, incluyendo la migración y la proliferación de las células endoteliales, lo cual difiere de las demás moléculas descubiertas hasta la actualidad (por ejemplo la angiostatina que inhibe la proliferación de las células endoteliales O'Reilly *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1997; Sim *et al.*, 1997), o la endostatina que inhibe asimismo su proliferación así como su migración pero únicamente cuando esta última está inducida por un factor angiogénico tal como el VEGF o el bFGF (O'Reilly *et al.*, 1997, Sim *et al.*, 2000; Yamaguchi *et al.*, 1999). Además, los efectos respectivos del AMEP sobre la migración y la angiogénesis *in vitro* son espectaculares: parada total de la movilidad de las células endoteliales y ausencia de formación de estructuras de tipo capilar.

De manera inesperada, los efectos inhibidores potentes del AMEP, sintetizado en forma de proteína recombinante en la bacteria, sobre el conjunto de los experimentos descritos *in vitro* son confirmados por los resultados obtenidos *in vivo*, realizados con el AMEP sintetizado *de novo* en el mamífero. Ventajosamente, el efecto inhibitor del AMEP sobre el crecimiento tumoral en el modelo atómico se puede relacionar con una disminución del número de vasos intra-tumorales, consecuencia directa de la inhibición por el AMEP, de todas las etapas de la angiogénesis *in vitro*. Además, el efecto anti-invasivo del AMEP sobre la formación de metástasis pulmonares que utilizan unas células de melanoma se correlaciona con el efecto anti-proliferativo particular de AMEP sobre estas mismas células *in vitro*.

Referencias bibliográficas

Brooks, P.C., Clark, R.A. y Cheresh, D.A. (1994). Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science* 264, 569-571.

Eliceiri, B.P., Klemke, R., Stromblad, S. *et al.* (1998). Integrin alpha v beta3 requirement for sustained mitogen activated protein kinase activity during angiogenesis. 140, 1255-1263.

Eliceiri, P.B. y Cheiresch, A. (2000) Role of alpha v integrins during angiogenesis. *Cancer J.* 6 (supl: 3), S245-S249.

Folkman, J. (1984). What is the role of endothelial cells in angiogenesis? *Lab. Invest.* 51, 601-604.

Hammes, H.P., Brownlee, M., Jonczyk, A. *et al.*, (1996). Subcutaneous injection of a cyclic peptide antagonist of vitronectin receptor-type integrins inhibits retinal neovascularization. *Nat Med* 2, 529-533.

Frisch SM. (2000) Anoikis. *Methods Enzymol.* 322, 472-479.

Herren, B., Raines, E. y Ross, R. (1997). Expression of a disintegrin-like protein in cultured human vascular cells and *in vivo*. *FASEB J.*, 11, 173-180.

- Howard, L., Nelson, K.K., Maciewicz, R.A. y Blobel, C. (1999). Interaction of the metalloprotease disintegrins MDC9 and MDC15 with two SH3 domain-containing proteins, endophilin I and SH3PX1. *J. Biol. Chem.* 274, 31693-31699.
- 5 Jaffer, E.A., Noyer, L.W. y Nachman, R.L. (1973). Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 52 2757-2764.
- Kang, I-C., Lee, Y-D y Kim, D-S. (1999). A novel disintegrin salmosin inhibits tumor angiogenesis. *Cancer research*, 59, 3754-3760.
- 10 Kostetsky, P.V. y Artemjev, I.V. (2000) Conformational analysis of the biologically active RGD-containing antiadhesive peptide cyclo(ArgGlyAspPhe-D-val). *Biochemistry*, 65, 1041-1048.
- Klein, S., Glancotti, F., Presta, M., Albelda, S., Buck, C.A. y Rifkin, D.B. (1993). Basic fibroblast growth factor modulates integrin expression in microvascular endothelial cells. *Mol. Biol. Cell.* 4, 973-982.
- 15 Krátschmar, J., Lum, L. y Blobel, C. (1996). Metargidin, a membrane-anchored metalloprotease-disintegrin protein with an RGD integrin binding sequence. *J. Biol. Chem.* 271, 4593-4596.
- 20 Mir, L.M., Bureau, MF., Gehl, J., Rangara, R., Rouy, D., Caillaud, JM., Delaere, P., Branellec, D., Schwartz, B. y Scherman, D. (1999). High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 4262-4267.
- Nehls, V. y Herrmann, R. (1995) The configuration of fibrin clots determines capillary morphogenesis and endothelial cell migration. *Microvasc. Res.* 50, 311-322.
- 25 O'Reilly, M.S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R.A., Moses, M., Lane, W.S., Cao, Y., Sage, E.H. y Folkman, J. (1994). Angiostatin, a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastasis by Lewis lung carcinoma. *Cell* 79, 315-328.
- 30 O'Reilly, M.S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane W.S., Flynn, E., Birkhead, J.R., Olsen, B.R. y Folkman, J. (1997). Endostatin: endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88, 277-285.
- Pepper, M.S., Montesano, R., Vassalli, J.D. y Orli, L. (1991). Chondrocytes inhibit endothelial sprout formation in vitro: evidence for involvement of a transforming growth factor-beta. *J. Cell. Physiol.* 146, 170-179.
- 35 Primakoff, P. y Myles, D.G. (2000). The ADAM gene family surface proteins with adhesion and protease activity. *TIG* 16, 83-87.
- 40 Sim, B.K., O'Reilly, M.S., Liang, H., Fortier, A.H., He, W., Madsen, J.W., Lapceovich, R. y Nacy, C.A. (1997). A recombinant human angiostatin protein inhibits experimental primary and metastatic cancer. *Cancer Res.* 57, 1329-1334.
- Smith, D.B. y Johnson K.S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathion S-transferase. *Gene* 67, 31-40.
- 45 Sim, B.K., MacDonald, N.J. y Gubish, E.R. (2000). Angiostatin and endostatin: endogenous inhibitors of tumor growth. *Cancer Metastasis Rev.* 19, 181-190.
- 50 Wolfsberg, T., Primakoff, P., Myles, D.G. y White J. M. ADAM, (1995), a novel family of membrane proteins containing a disintegrin and metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. *J. Cell. Biol.* 131, 275-278.
- Wu, Z., O'Reilly, M.S., Folkman, J. y Shing, Y. (1997). Suppression of tumor growth with recombinant murine angiostatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 651-654.
- 55 Yamaguchi, N., Anand-Apte, B., Lee, M., Sasaki, T., Fukai, N., Shapiro, R. Que, I., Lowik, C., Timpl, R. y Olsen, B.R. (1999). Endostatin inhibits VEGF-induced endothelial cell migration and tumor growth independently of zinc binding. *EMBO J.* 18, 4414-4423.
- 60 Yeh, CH., Peng, H-C., Huang, T-F. (1998). Accutin, a new disintegrin, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo by acting as integrin alpha v beta 3 antagonist and inducing apoptosis. *Blood*, 92, 3268-3276.
- Zhang, X-P, Kamata, T., Yokoyama, K., McLaughlin, W., Takada, Y.(1998). Specific interaction of the recombinant disintegrin-like domain of MDC-15 (metargidin, ADAM-15) with integrin alpha v beta 3. *J. Biol. Chem.* 273, 7345-7350.
- 65

Zhu Z, Sanchez-Sweatman O, Huang X, Wiltout R, Khokha R, Zhao Q, Gorelik E.(2001). Anoikis and metastatic potential of cloudman S91 melanoma cells. Cancer Res. 61, 1707-1716.

5 **Listado de secuencias**

<110> Insitut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)

10 <120> UTILIZACIÓN EN UNA COMPOSICIÓN ANTI-ANGIOGÉNICA DEL DOMINIO DESINTEGRINA DE ADAMALISINA

<130> 13723PCT julio de 2002

15 <140> PCT/FR01/xxxxx

<141> 26/07/2002

<150> FR01/10015

20 <151> 26/07/2001

<160> 2

25 <170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 276

<212> ADN

30 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(276)

35 <223> Secuencia que codifica para el dominio desintegrina de la metargidina

<400> 1

```

atg gct gct ttc tgc gga aat atg ttt gtg gag ccg ggc gag cag tgt      48
Met Ala Ala Phe Cys Gly Asn Met Phe Val Glu Pro Gly Glu Gln Cys
1           5           10           15

```

```

gac tgt ggc ttc ctg gat gac tgc gtc gat ccc tgc tgt gat tct ttg      96
Asp Cys Gly Phe Leu Asp Asp Cys Val Asp Pro Cys Cys Asp Ser Leu
20           25           30

```

```

acc tgc cag ctg agg cca ggt gca cag tgt gca tct gac gga ccc tgt      144
Thr Cys Gln Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Ala Ser Asp Gly Pro Cys
35           40           45

```

```

tgt caa aat tgc cag ctg cgc ccg tct ggc tgg cag tgt cgt cct acc      192
Cys Gln Asn Cys Gln Leu Arg Pro Ser Gly Trp Gln Cys Arg Pro Thr
50           55           60

```

```

aga ggg gat tgt gac ttg cct gaa ttc tgc cca gga gac agc tcc cag      240
Arg Gly Asp Cys Asp Leu Pro Glu Phe Cys Pro Gly Asp Ser Ser Gln
65           70           75           80

```

```

tgt ccc cct gat gtc agc cta ggg gat ggc gag taa      276
Cys Pro Pro Asp Val Ser Leu Gly Asp Gly Glu
85           90

```

40 <210> 2

<211> 91

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Ala Phe Cys Gly Asn Met Phe Val Glu Pro Gly Glu Gln Cys
 1 5 10 15

Asp Cys Gly Phe Leu Asp Asp Cys Val Asp Pro Cys Cys Asp Ser Leu
 20 25 30

Thr Cys Gln Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Ala Ser Asp Gly Pro Cys
 35 40 45

Cys Gln Asn Cys Gln Leu Arg Pro Ser Gly Trp Gln Cys Arg Pro Thr
 50 55 60

Arg Gly Asp Cys Asp Leu Pro Glu Phe Cys Pro Gly Asp Ser Ser Gln
 65 70 75 80

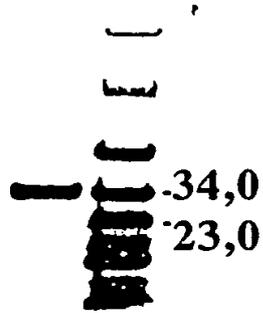
Cys Pro Pro Asp Val Ser Leu Gly Asp Gly Glu
 85 90

REIVINDICACIONES

- 5 1. Molécula de ácido nucleico que comprende o que está constituida por una secuencia polinucleotídica que codifica el dominio desintegrina de la metargidina o un derivado de éste para una utilización como agente anti-angiogénico, anti-invasivo o anti-metastásico, en la que dicho derivado del dominio desintegrina de la metargidina:
- presenta unas propiedades anti-angiogénicas, anti-invasivas y antimetastásicas; y
 - está constituido por una secuencia modificada por delección, adición o sustitución de un aminoácido del dominio desintegrina de la metargidina.
- 10 2. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1, caracterizada porque el dominio desintegrina de la metargidina corresponde a la secuencia SEC ID nº 1.
- 15 3. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1 ó 2, caracterizada porque se une a un vector plasmídico de expresión.
4. Célula transformada por la molécula de ácido nucleico tal como la definida en una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque expresa el dominio desintegrina de la metargidina o un derivado de éste.
- 20 5. Molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su utilización para el tratamiento y/o la prevención de patologías seleccionadas de entre los cánceres, los procesos metastásicos, las enfermedades inflamatorias, la soriasis, la aterosclerosis y la degenerescencia macular.

Figura 1

A



B



Figura 2

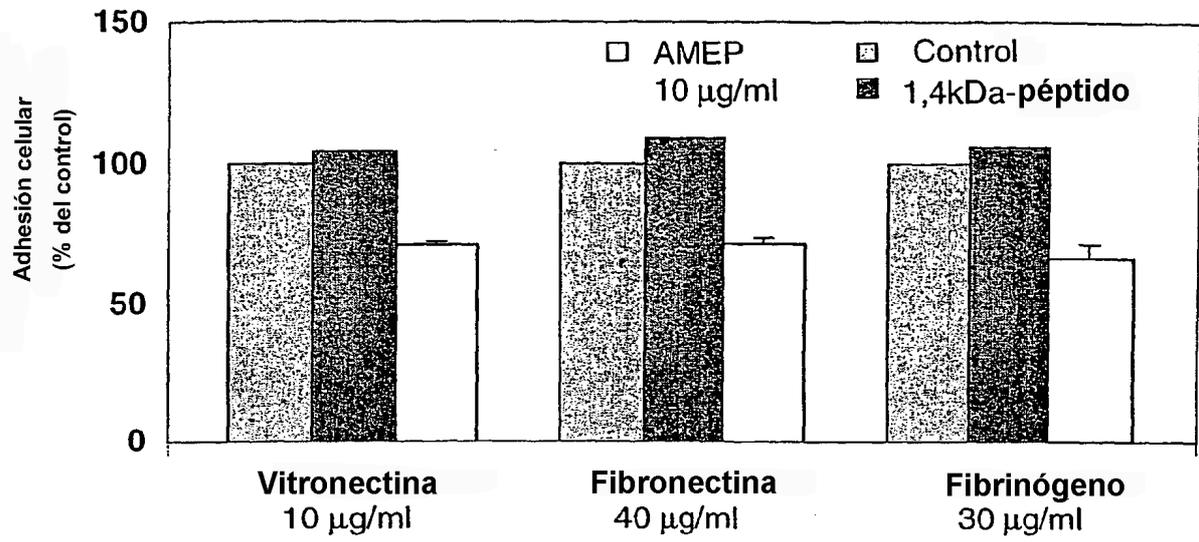


Figura 3

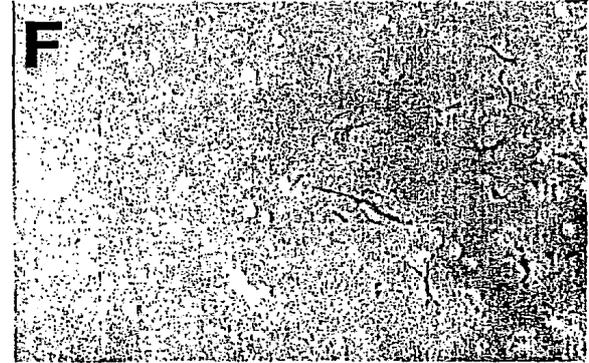
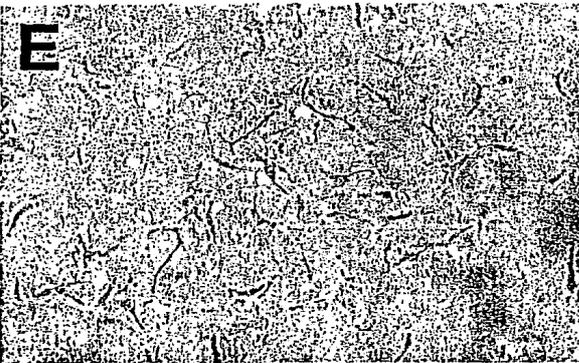
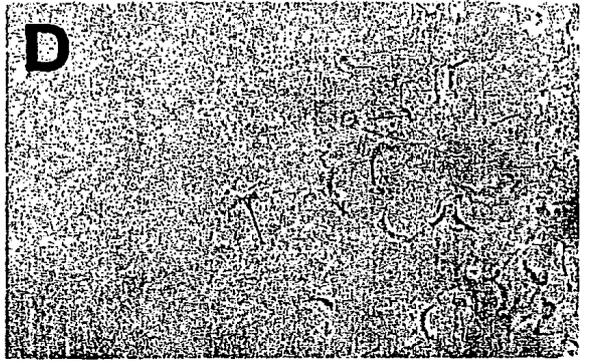
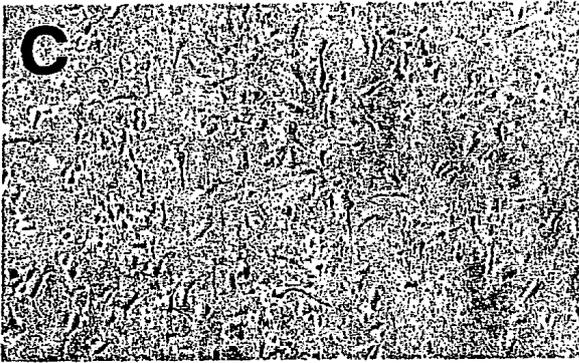
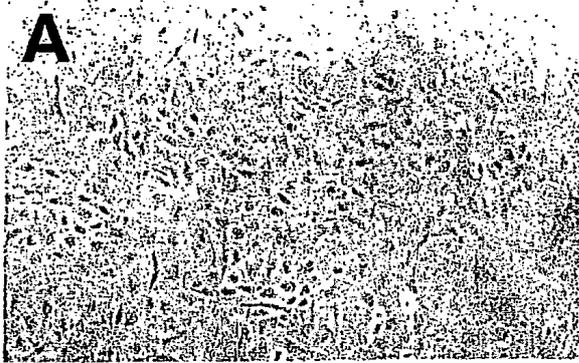


Figura 4

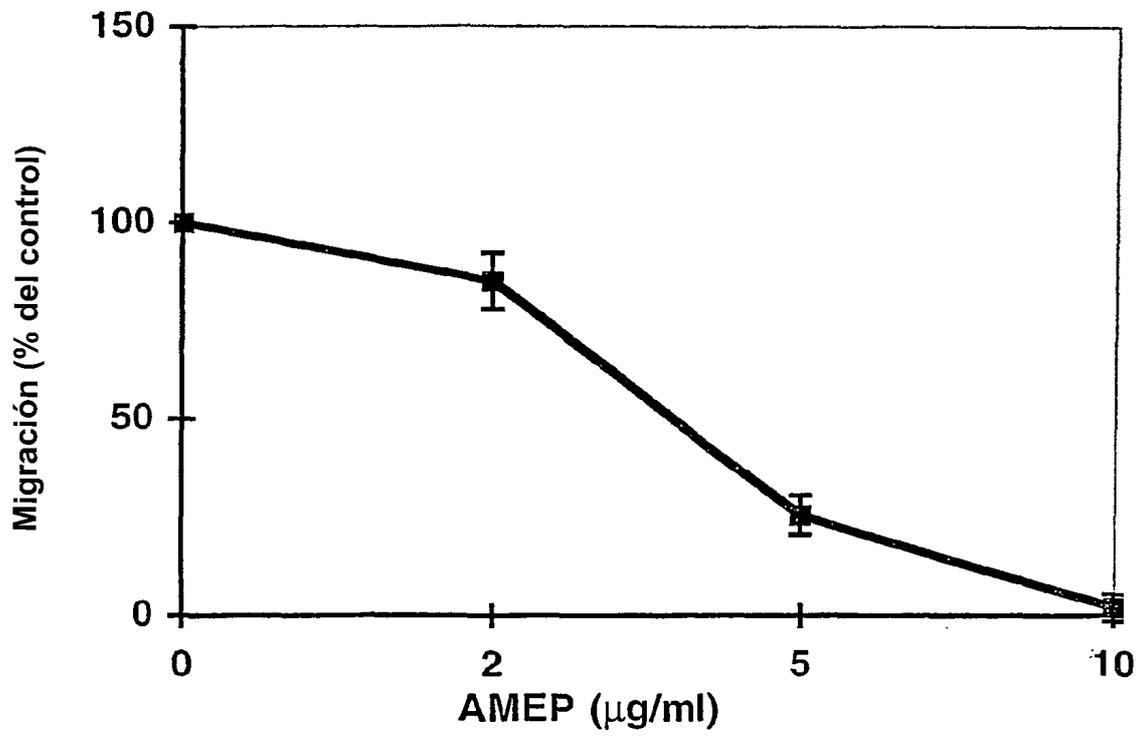
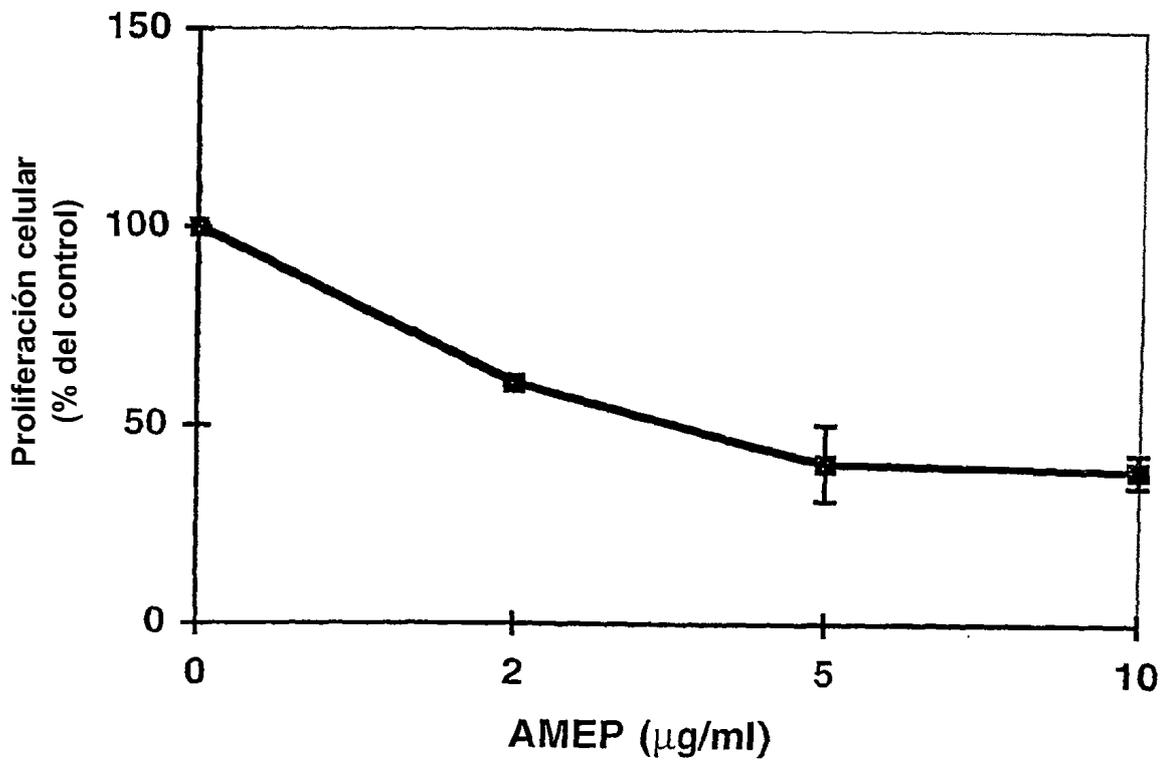


Figura 5



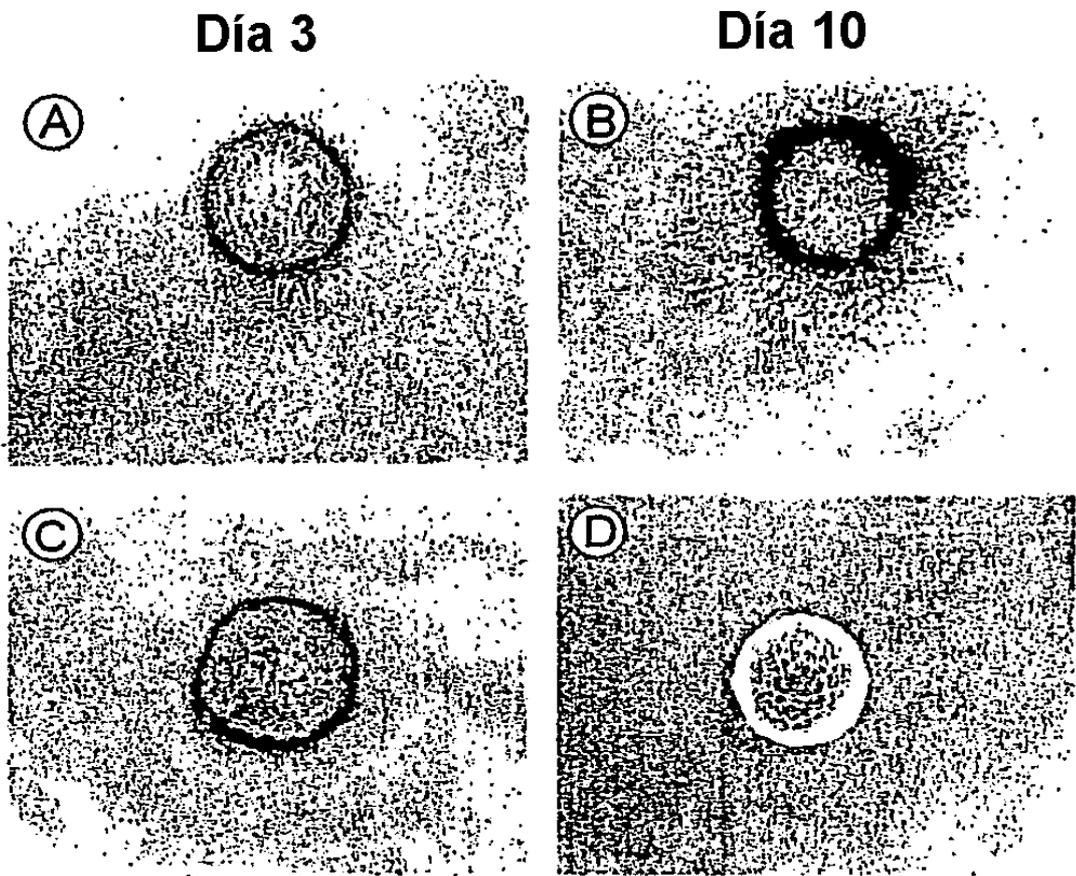


Figura 6

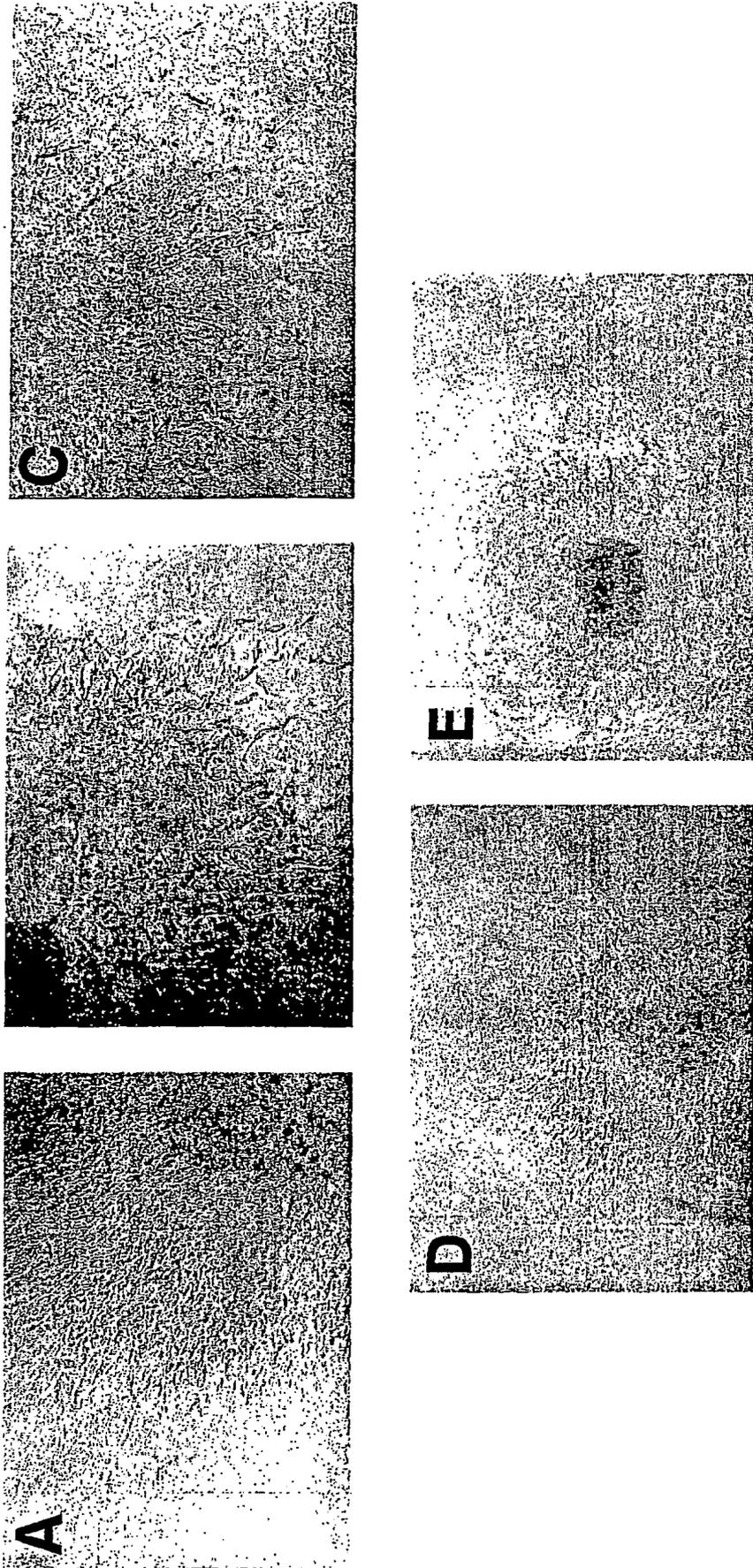


Figura 7

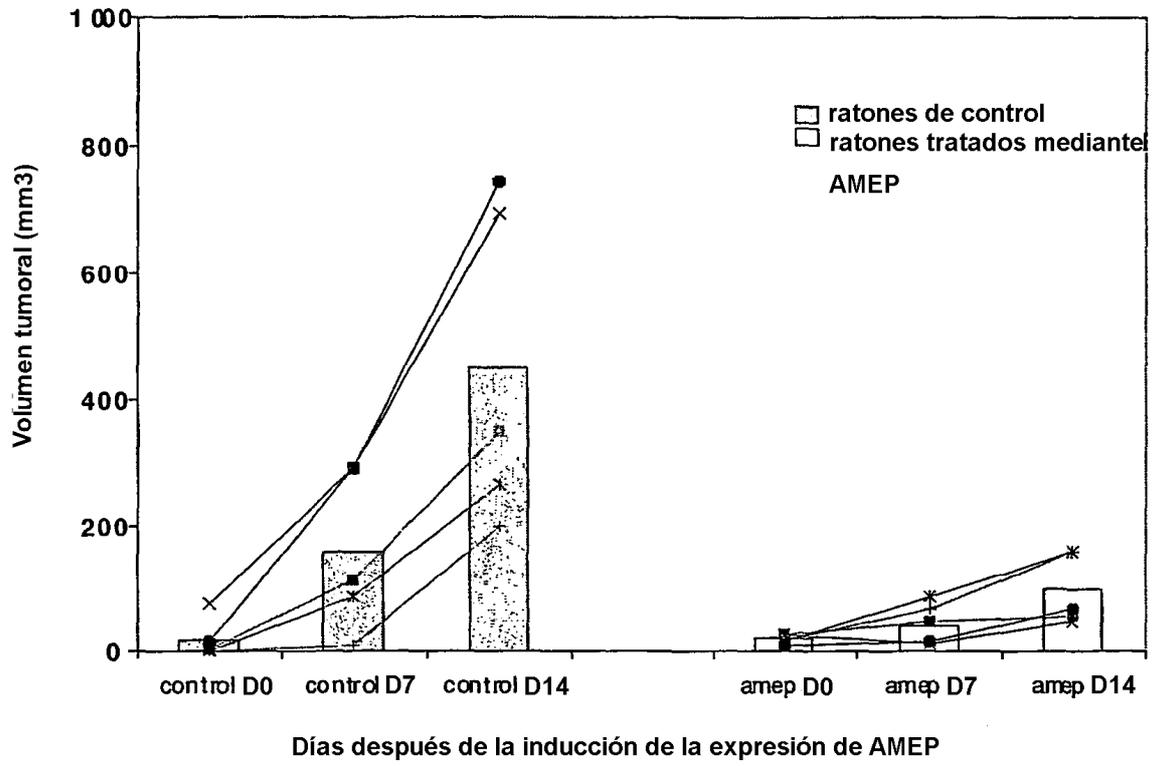


Figura 8

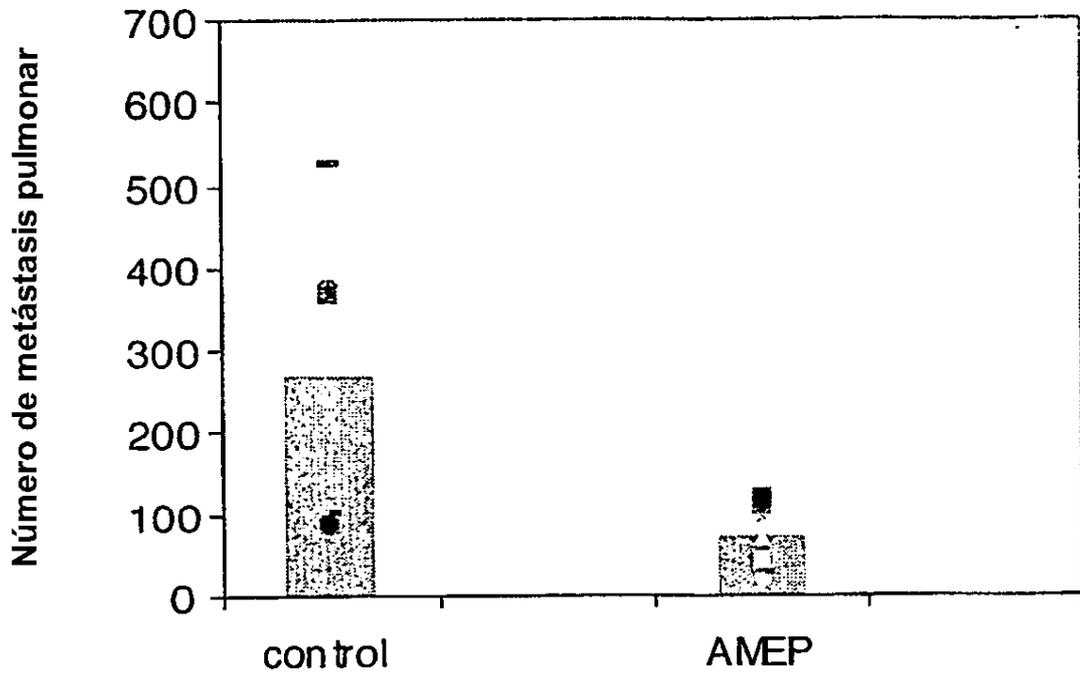


Figura 9

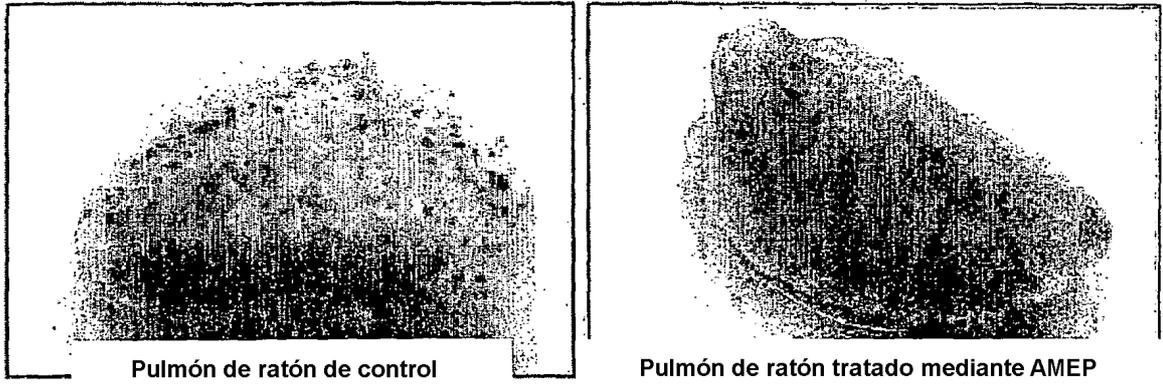


Figura 10