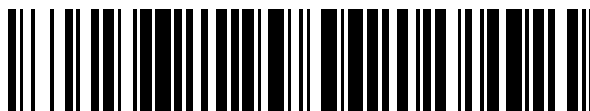


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 932**

51 Int. Cl.:
A61K 38/18 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04786012 .7**
96 Fecha de presentación: **30.07.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1648494**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.04.2006**

54 Título: **Agente anti-angiogénico y su utilización en el marco del tratamiento de los cánceres**

30 Prioridad:
01.08.2003 FR 0309506

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.07.2012

73 Titular/es:
**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS)
3, rue Michel-Ange
75794 Paris Cedex 16, FR y
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (INSERM)**

72 Inventor/es:
**PLOUET, Jean;
LAURENT-BEUBRY, Maryvonne y
MARTINERIE-KRYCEVE, Cécile**

74 Agente/Representante:
Curell Aguilá, Mireia

ES 2 384 932 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

Agente anti-angiogénico y su utilización en el marco del tratamiento de los cánceres.

- 5 La presente invención tiene por objeto un nuevo agente anti-angiogénico, así como su utilización, en particular en el marco del tratamiento de los cánceres.

10 La angiogénesis es un proceso de crecimiento de nuevos capilares sanguíneos a partir de vasos preexistentes. Tres fenómenos particulares son en particular la base de este proceso: la proliferación, la migración y la diferenciación (la tubulogénesis) de las células endoteliales. La angiogénesis se activa por ciertos factores de crecimiento, denominados factores angiogénicos, tales como el VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*, factor de crecimiento endotelial vascular), el FGF-1 (*Fibroblast Growth Factor 1*, factor de crecimiento de los fibroblastos 1) o el FGF-2 (*Fibroblast Growth Factor 2*, factor de crecimiento de los fibroblastos 2).

15 En tiempo normal, la angiogénesis está esencialmente restringida al sistema reproductor femenino y a la cicatrización de heridas. Sin embargo, la angiogénesis está asimismo implicada en numerosos casos patológicos, tales como la retinopatía diabética, la psoriasis, la poliartritis reumatoide, la degenerescencia macular relacionada con la edad, y los cánceres. En efecto, en este último caso, se ha demostrado que el crecimiento tumoral estaba altamente favorecido por la aparición, en el seno de estos tumores, de una neo-vascularización que resulta, en particular, de la secreción por los tumores de factores angiogénicos.

20 Están en curso numerosas tentativas de tratamiento terapéuticos basados en la utilización de proteínas anti-angiogénicas. Entre estos compuestos, uno de los más prometedores es la endostatina (O'Reilly *et al.*, 1997), que está actualmente en ensayos clínicos de fase I (Herbst *et al.*, 2002). La endostatina es una proteína de 20 kDa que corresponde a un fragmento del colágeno XVIII. El mecanismo de acción de la endostatina sigue siendo desconocido.

25 Ciertas tentativas terapéuticas se basan en la elucidación de mecanismos de acción conocidos. Así, las células endoteliales en proliferación expresan la integrina avb3, mientras que las células endoteliales quiescentes no la expresan (Nrooks, 1994). Esta observación ha permitido desarrollar unos inhibidores de esta molécula actualmente en curso de ensayos clínicos.

30 Entre todos los actores moleculares implicados en la activación de la angiogénesis, sólo el VEGF ha demostrado su eficacia en prácticamente todos los modelos experimentales de medición de actividad de la angiogénesis (Ortége, 1999). Además, en la primavera de 2003, se hizo público por la compañía Genentech que unos anticuerpos anti-VEGF ejercían una actividad antitumoral en los enfermos que padecen cáncer de colon. Así, es de suma importancia buscar unas moléculas que puedan unirse al VEGF y, por lo tanto, ejercer una actividad anti-tumoral comparable a la de los anticuerpos anti-VEGF.

35 El gen *nov*, en primer lugar identificado en unos nefroblastomas aviares (Joliot *et al.*, 1992; Martinerie y Perbal, 1991), se ha clonado en el ser humano (*novH*) (Marterinie *et al.*, 1994), el ratón (*novM*) (Snaithe *et al.*, 1996) y *Xenopus laevis* (Ying y Ling, 1996). La proteína NOV, codificada por el gen *nov*, cuya función es hoy en día desconocida, pertenece a la familia CCN (Bork, 1993) que comprende las proteínas siguientes: CYR61 (Lau y Nathans, 1985), CTGF (Bradham *et al.*, 1991), ELM-1 o WISP-1 (Pennica *et al.*, 1998; Hashimoto *et al.*, 1998), R-COP o WISP-2 (Pennica *et al.*, 1998; Kumar *et al.*, 1999; Brigstock, 1999) y WISP-3 (Pennica *et al.*, 1998). Estas proteínas están todas constituidas de cuatro dominios distintos: una proteína que se une a un factor de crecimiento análogo a la insulina (IGFBP), un dominio de repetición del factor Willebrand de tipo C, un dominio de repetición de trombospondina de tipo I y un dominio COOH-terminal. Las proteínas de la familia CCN regulan diferentes procedimientos celulares normales que comprenden la proliferación, la adhesión, la apoptosis y la quimiotaxia. Están asimismo implicadas en la implantación, la formación esquelética, el desarrollo embrionario y en diferentes enfermedades tales como la fibrosis, la cicatrización y los cánceres (Chevalier *et al.*, 1998).

40 La proteína NOV humana (NOVH) se puede detectar en los tejidos normales (riñones, músculos, cartílago, cerebro, pulmones, ovarios, corazón y corticosrenal) a diferentes niveles (Joliot *et al.*, 1992; Martinerie *et al.*, 2001; Kocalkowski *et al.*, 2001; Perbal *et al.*, 1999) y su expresión varía durante el desarrollo.

45 A día de hoy, las funciones ejercidas por la proteína NOV no están claramente establecidas. Se ha propuesto recientemente que la NOV podría ejercer una acción proangiogénica (Lin, 2003) permitiendo que se unan ciertas integrinas (avb3, a6b1 y a5b1). Además, estos autores muestran que la NOV ejerce una actividad proangiogénica en el modelo de córnea de conejo. Sin embargo, se ha demostrado que este ensayo puede conducir a resultados falsamente positivos por liberación de factores angiogénicos sintetizados y almacenados en la córnea (Plouët, 1997).

50 Así, la presente invención resulta de la puesta en evidencia de la actividad anti-angiogénica de NOV debido a su unión a VEGF.

55 La presente invención tiene por objetivo proporcionar un nuevo agente anti-angiogénico que tiene un nuevo

mecanismo de acción.

La presente invención se basa en la constatación hecha por los inventores de se puede prever la utilización:

- 5 - de una proteína caracterizada porque comprende o está constituida por:
- * la proteína NOV, representada por la secuencia SEC ID nº 2, o
 - * un fragmento de esta proteína, siempre que este fragmento presente una actividad de inhibición de la angiogénesis, comprendiendo dicho fragmento en particular de aproximadamente 40 a aproximadamente 180 aminoácidos, y estando representado en particular por una de las secuencias siguientes SEC ID nº 4, SEC ID nº 6, SEC ID nº 8, SEC ID nº 10 o SEC ID nº 12, o
 - * cualquier secuencia derivada de la secuencia SEC ID nº 2 o de un fragmento tal como se ha definido anteriormente, en particular por sustitución, supresión o adición de uno o varios aminoácidos, siempre que esta secuencia derivada presente una actividad de inhibición de la angiogénesis, o
 - * cualquier secuencia homóloga de la secuencia SEC ID nº 2 o de un fragmento tal como se ha definido anteriormente, que tiene como referencia una homología de por lo menos aproximadamente 80%, y en particular 85%, con la región comprendida entre los aminoácidos en la posición (33) y (338) de la secuencia SEC ID nº 2, siempre que esta secuencia homóloga presente una actividad de inhibición de la angiogénesis,
- 10
- 15
- 20
- 25 - de una secuencia nucleotídica, caracterizada porque comprende o está constituida por una secuencia nucleotídica que codifica:
- * o bien para la proteína NOV, tal como se ha definido anteriormente,
 - * o bien para un fragmento de la proteína NOV, tal como se ha definido anteriormente,
 - * o bien para una secuencia derivada de la proteína NOV, tal como se ha definido anteriormente,
 - * o bien para una secuencia homóloga de la proteína NOV, tal como se ha definido anteriormente,
- 30
- correspondiendo dicha secuencia nucleotídica en particular a la secuencia nucleotídica SEC ID nº 1, que codifica para la SEC ID nº 2, o a la secuencia SEC ID nº 3 que codifica para la SEC ID nº 4, o a la secuencia SEC ID nº 5 que codifica para la SEC ID nº 6, o a la secuencia SEC ID nº 7 que codifica para la SEC ID nº 8, o a la secuencia SEC ID nº 9 que codifica para la SEC ID nº 10, o a la secuencia SEC ID nº 11 que codifica para la SEC ID nº 12,
- 35
- de un anticuerpo anti-idiotípico de la proteína NOV,
- para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento:
- 40 - de patologías que necesitan la inhibición de la proliferación endotelial, en particular en el marco de las patologías siguientes: la degenerescencia macular relacionada con la edad; las retinopatías diabéticas, la poliartritis reumatoide, los angiomas, los angiosarcomas, en particular la enfermedad de Castelman y el sarcoma de Kaposi, o
- 45 - de patologías que necesitan la inhibición de la activación endotelial, en particular en el marco de las patologías siguientes: el rechazo de aloinjerto y de xenoinjerto, las acrocianosis, las esclerodermias, o en el marco de la preparación de injertos entre la extracción y el trasplante.

Asimismo, la invención se refiere a la utilización:

- 50 - de una proteína caracterizada porque está constituida por:
- * la proteína NOV, representada por la secuencia SEC ID nº 2, o
 - * un fragmento de esta proteína, representada por la secuencia SEC ID nº 12
- 55
- de una secuencia nucleotídica, caracterizada porque comprende o está constituida por una secuencia nucleotídica que codifica:
- * o bien para la proteína NOV, tal como se ha definido anteriormente,
 - * o bien para un fragmento de la proteína NOV, tal como se ha definido anteriormente,
- 60
- correspondiendo dicha secuencia nucleotídica a la secuencia nucleotídica SEC ID nº 1 que codifica para la SEC ID nº 2, o a la secuencia SEC ID nº 11 que codifica para la SEC ID nº 12,
- 65 - de un anticuerpo anti-idiotípico de la proteína NOV representada por la secuencia SEC ID nº 2, imitando dicho anticuerpo las funciones de la proteína NOV reconociendo el VEGF,

para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento:

5 * de patologías que necesitan la inhibición de la proliferación endotelial, en el marco de las patologías siguientes: la degenerescencia macular relacionada con la edad, las retinopatías diabéticas, la poliartritis reumatoide, los angiomas, los angiosarcomas, en particular la enfermedad de Castelman y el sarcoma de Kaposi, o

10 * de patologías que necesitan la inhibición de la activación endotelial, en el marco de las patologías siguientes: el rechazo de aloinjerto y de xenoinjerto, las acrocianosis, las esclerodermias, o en el marco de la preparación de injertos entre la extracción y el trasplante.

Por otra parte, la presente invención se basa en la constatación anterior de que la utilización de una proteína caracterizada porque comprende o está constituida por:

15 * la proteína NOV, representada por la secuencia SEC ID nº 2, o

* un fragmento de esta proteína, siempre que este fragmento presente una actividad de inhibición de la angiogénesis, comprendiendo dicho fragmento en particular de aproximadamente 40 a aproximadamente 180 aminoácidos, y preferentemente de aproximadamente 40 a aproximadamente 80 aminoácidos, y estando en particular representado por una de las secuencias siguientes: SEC ID nº 4, SEC ID nº 6, SEC ID nº 8, SEC ID nº 10 o SEC ID nº 12, o

20 * cualquier secuencia derivada de la secuencia SEC ID nº 2 o de un fragmento tal como se ha definido anteriormente, en particular por sustitución, supresión o adición de uno o varios aminoácidos, siempre que esta secuencia derivada presente una actividad de inhibición de la angiogénesis, o

25 * cualquier secuencia homóloga de la secuencia SEC ID nº 2 o de un fragmento tal como se ha definido anteriormente, que tiene preferentemente una homología de por lo menos aproximadamente el 80%, y en particular el 85%, con la región comprendida entre los aminoácidos en la posición (33) y (338) de la secuencia SEC ID nº 2, siempre que esta secuencia homóloga presente una actividad de inhibición de la angiogénesis,

30 puede ser considerada para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento:

35 - de patologías que necesitan la inhibición de la proliferación endotelial, en particular en el marco de las patologías siguientes: la degenerescencia macular relacionada con la edad; las retinopatías diabéticas, la poliartritis reumatoide, los angiomas, los angiosarcomas, en particular la enfermedad de Castelman y el sarcoma de Kaposi, o

40 - de patologías que necesitan la inhibición de la activación endotelial, en particular en el marco de las patologías siguientes: el rechazo de aloinjerto y de xenoinjerto, las acrocianosis, las esclerodermias, o en el marco de la preparación de injertos entre la extracción y el trasplante.

45 La secuencia SEC ID nº 2 corresponde a la proteína humana NOV codificada por la secuencia nucleotídica SEC ID nº 1.

50 La secuencia SEC ID nº 4 corresponde al fragmento IGFBP (proteína que se une a un factor de crecimiento análogo a la insulina) de la proteína humana NOV, estando dicho fragmento codificado por la secuencia nucleotídica SEC ID nº 3. Este fragmento comprende 72 aminoácidos y corresponde al fragmento de la proteína NOV que va del resto 33 al resto 104 de la secuencia SEC ID nº 2.

55 La secuencia SEC ID nº 6 corresponde al fragmento VWC (dominio de repetición del factor Willebrand de tipo C) de la proteína humana NOV, estando dicho fragmento codificado por la secuencia nucleotídica SEC ID nº 5. Este fragmento comprende 67 aminoácidos y corresponde al fragmento de la proteína NOV que va del resto 108 al resto 174 de la secuencia SEC ID nº 2.

60 La secuencia SEC ID nº 8 corresponde al fragmento TSP-1 (dominio de repetición de trombospondina de tipo I) de la proteína humana NOV, estando dicho fragmento codificado por la secuencia nucleotídica SEC ID nº 7. Este fragmento comprende 45 aminoácidos y corresponde al fragmento de la proteína NOV que va del resto 206 al resto 250 de la secuencia SEC ID nº 2.

65 La secuencia SEC ID nº 10 corresponde al fragmento CT (dominio COOH-terminal) de la proteína humana NOV, estando dicho fragmento codificado por la secuencia nucleotídica SEC ID nº 9. Este fragmento comprende 75 aminoácidos y corresponde al fragmento de la proteína NOV que va del resto 264 al resto 338 de la secuencia SEC ID nº 2.

La secuencia SEC ID nº 12 corresponde al fragmento C-terminal de la proteína humana NOV, estando dicho

fragmento codificado por la secuencia nucleotídica SEC ID nº 11. Este fragmento comprende 170 aminoácidos y corresponde al fragmento de la proteína NOV que va del resto 188 al resto 357 de la secuencia SEC ID nº 2.

5 La actividad de inhibición de la angiogénesis se designa también anti-angiogénica. Esta actividad puede ser, por ejemplo puesta en evidencia *in vitro* demostrando la inhibición al mismo tiempo de la multiplicación, de la migración y de la diferenciación, de células endoteliales por las secuencias peptídicas de la invención. La medición de la inhibición de la multiplicación de las células endoteliales se puede realizar cultivando unas células endoteliales en presencia de la secuencia peptídica cuya actividad se desea evaluar. La medición de la inhibición de la migración de las células endoteliales se puede realizar efectuando una "herida" en un tapiz de células endoteliales e incubando después las células en presencia de la secuencia peptídica a ensayar. Se mide entonces el número de células que han migrado sobre la herida. La medición de la inhibición de la diferenciación (tubulogénesis) de las células endoteliales se puede realizar midiendo la longitud de los túbulos formados por unas células endoteliales cultivadas sobre gel en presencia de la secuencia peptídica a ensayar.

15 Entre los modelos clásicos de medición de angiogénesis, se pueden citar los modelos por suministro local tal como:

- la inyección subcutánea de Matrigel (Becton Dickinson) impregnada del compuesto de la invención (Inoki *et al.*, 2002), o
- 20 - el depósito sobre la membrana corio-alantoidea de pollo de un implante que contiene un compuesto de la invención (Celerier *et al.*, 2002).

El compuesto de la invención se puede inyectar por vía sistémica (intravenosa, intraperitoneal, subcutánea) a animales en los que se ha creado una enfermedad angiogénica experimental. El compuesto de la invención se puede inyectar también directamente en un tumor. Alternativamente, la proteína NOV o los fragmentos o los anticuerpos anti-idiotípicos según la invención (descritos a continuación) pueden ser suministrados mediante un método de terapia génica por vía local o sistémica mediante cualquier método que permita la expresión de la proteína o de los fragmentos o de los anticuerpos anti-idiotípicos según la invención (virus o plásmido que contiene la secuencia de NOV). Alternativamente, la secuencia de NOV o de los fragmentos o de los anticuerpos anti-idiotípicos según la invención se puede insertar en un plásmido que está transfectado en las células cancerígenas (en este caso la medición consiste en medir la evolución de tumores desarrollados a partir de células cancerígenas transfectadas por un plásmido que contiene o no la secuencia de NOV o de un fragmento). Todos estos procedimientos de medición están descritos en particular en el artículo de Jain *et al.*, (1997).

35 Se designa por actividad anti-tumoral, una actividad que permite inhibir el crecimiento tumoral y/o inducir la regresión, incluso la desaparición, de tumores. Esta actividad se puede poner en evidencia, por ejemplo, *in vivo* midiendo la masa de los tumores, de los cuales se ha inducido el desarrollo en el ratón mediante inyección de células tumorales, en presencia y ausencia de administración de secuencias peptídicas de la invención y/o de ácidos nucleicos que expresan las secuencias peptídicas de la invención.

40 La expresión "inhibición de la proliferación endotelial" designa cualquier sustancia capaz de frenar la proliferación de células endoteliales según el ensayo descrito más adelante (parte experimental).

45 La expresión "activación endotelial" corresponde a cualquier patología que implica unas células endoteliales sometidas a una concentración incrementada en VEGF con respecto al estado no patológico.

Según un modo de realización ventajoso, la presente invención se refiere a la utilización, tal como se ha definido anteriormente, de una proteína caracterizada porque comprende o está constituida por la proteína NOV, representada por la secuencia SEC ID nº 2.

50 Una utilización ventajosa según la presente invención consiste en la utilización, tal como se ha definido anteriormente, de una proteína caracterizada porque comprende o está constituida por la proteína NOV, representada por la secuencia SEC ID nº 2, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de patologías que necesitan la inhibición de la proliferación endotelial, en particular en el marco de las patologías siguientes: la degenerescencia macular relacionada con la edad, las retinopatías diabéticas, la poliartritis reumatoide, los angiomas, los angiosarcomas, en particular la enfermedad de Castelman y el sarcoma de Kaposi.

60 Una utilización ventajosa según la presente invención consiste en la utilización, tal como se ha definido anteriormente, de una proteína caracterizada porque comprende o está constituida por la proteína NOV, representada por la secuencia SEC ID nº 2, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de patologías que necesitan la inhibición de la activación endotelial, en particular en el marco de las patologías siguientes: el rechazo de aloinjerto y xenoinjerto, las acrocianosis, las esclerodermias, o en el marco de la preparación de injertos entre la extracción y el trasplante.

65 La presente invención se basa asimismo en la constatación hecha por lo inventores en lo que se refiere a que se puede utilizar tal como se ha definido anteriormente una proteína caracterizada porque comprende o está constituida

por:

- 5 * un fragmento de la proteína NOV, representada por la secuencia SEC ID nº 2, siempre que este fragmento presente una actividad de inhibición de la angiogénesis, comprendiendo dicho fragmento en particular de aproximadamente 40 a aproximadamente 180 aminoácidos, y estando en particular representado por una de las secuencias siguientes: SEC ID nº 4, SEC ID nº 6, SEC ID nº 8, SEC ID nº 10 o SEC ID nº 12, o
- 10 * cualquier secuencia derivada de la secuencia SEC ID nº 2 o de un fragmento tal como se ha definido anteriormente, en particular por sustitución, supresión o adición de uno o varios aminoácidos, siempre que esta secuencia derivada presente una actividad de inhibición de la angiogénesis, o
- 15 * cualquier secuencia homóloga de la secuencia SEC ID nº 2 o de un fragmento tal como se ha definido anteriormente, que tiene preferentemente una homología de por lo menos aproximadamente el 80%, y en particular el 85%, con la región comprendida entre los aminoácidos en la posición (33) y (338) de la secuencia SEC ID nº 2, siempre que esta secuencia homóloga presente una actividad de inhibición de la angiogénesis.

La presente invención se basa asimismo en la constatación hecha por los inventores en lo que se refiere a que se puede utilizar tal como se ha definido anteriormente una proteína caracterizada porque comprende o está constituida por:

- 20 * un fragmento de la proteína NOV, representada por la secuencia SEC ID nº 2, siempre que este fragmento presente una actividad de inhibición de la angiogénesis, comprendiendo dicho fragmento en particular de aproximadamente 40 a aproximadamente 180 aminoácidos, y estando en particular representado por una de las secuencias siguientes: SEC ID nº 4, SEC ID nº 6, SEC ID nº 8, SEC ID nº 10 o SEC ID nº 12, o
- 25 * cualquier secuencia derivada de la secuencia SEC ID nº 2 o de un fragmento tal como se ha definido anteriormente, en particular por sustitución, supresión o adición de uno o varios aminoácidos, siempre que esta secuencia derivada presente una actividad de inhibición de la angiogénesis, o
- 30 * cualquier secuencia homóloga de la secuencia SEC ID nº 2 o de un fragmento tal como se ha definido anteriormente, que tiene preferentemente una homología de por lo menos aproximadamente el 80%, y en particular el 85%, con la región comprendida entre los aminoácidos en la posición (33) y (338) de la secuencia SEC ID nº 2, siempre que esta secuencia homóloga presente una actividad de inhibición de la angiogénesis,

35 para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de patologías que necesitan la inhibición de la proliferación endotelial, en particular en el marco de las patologías siguientes: la degenerescencia macular relacionada con la edad, las retinopatías diabéticas, la poliartritis reumatoide, los angiomas, los angiosarcomas, en particular la enfermedad de Castelman y el sarcoma de Kaposi.

40 La presente invención se basa asimismo en la constatación hecha por los inventores en lo que se refiere a que se puede utilizar una proteína caracterizada porque comprende o está constituida por:

- 45 * un fragmento de la proteína NOV, representada por la secuencia SEC ID nº 2, siempre que este fragmento presente una actividad de inhibición de la angiogénesis, comprendiendo dicho fragmento en particular de aproximadamente 40 a aproximadamente 180 aminoácidos, y estando en particular representado por una de las secuencias siguientes: SEC ID nº 4, SEC ID nº 6, SEC ID nº 8, SEC ID nº 10 o SEC ID nº 12, o
- 50 * cualquier secuencia derivada de la secuencia SEC ID nº 2 o de un fragmento tal como se ha definido anteriormente, en particular por sustitución, supresión o adición de uno o varios aminoácidos, siempre que esta secuencia derivada presente una actividad de inhibición de la angiogénesis, o
- 55 * cualquier secuencia homóloga de la secuencia SEC ID nº 2 o de un fragmento tal como se ha definido anteriormente, que tiene preferentemente una homología de por lo menos aproximadamente el 80%, y en particular el 85%, con la región comprendida entre los aminoácidos en la posición (33) y (338) de la secuencia SEC ID nº 2, siempre que esta secuencia homóloga presente una actividad de inhibición de la angiogénesis,

60 para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de patologías que necesitan la inhibición de la activación endotelial, en particular en el marco de las patologías siguientes: rechazo de aloinjerto y xenoinjerto, las acrocianosis, las esclerodermias, o en el marco de la preparación de injertos entre la extracción y el trasplante.

La presente invención se basa asimismo en la observación hecha por los inventores, en lo que se refiere a que se puede utilizar una proteína caracterizada porque comprende o está constituida por:

- 65 * un fragmento de la proteína NOV, representada por la secuencia SEC ID nº 2, siempre que este fragmento presente una actividad de inhibición de la angiogénesis, comprendiendo dicho fragmento en particular de aproximadamente 40 a aproximadamente 180 aminoácidos, y estando en particular representado por una de las

secuencias siguientes: SEC ID nº 4, SEC ID nº 6, SEC ID nº 8, SEC ID nº 10 o SEC ID nº 12, o

* cualquier secuencia derivada de la secuencia SEC ID nº 2 o de un fragmento, tal como se ha definido anteriormente, en particular por sustitución, supresión o adición de uno o varios aminoácidos, siempre que esta secuencia derivada presente una actividad de inhibición de la angiogénesis, o

* cualquier secuencia homóloga de la secuencia SEC ID nº 2 o de un fragmento, tal como se ha definido anteriormente, que tiene preferentemente una homología de por lo menos aproximadamente el 80%, y en particular el 85%, con la región comprendida entre los aminoácidos en la posición (33) y (338) de la secuencia SEC ID nº 2, siempre que esta secuencia homóloga presente una actividad de inhibición de la angiogénesis,

para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de los cánceres.

Asimismo, la invención se refiere a la utilización de una proteína, caracterizada porque está constituida por un fragmento de la proteína NOV, estando dicho fragmento representado por la secuencia SEC ID nº 12, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de los cánceres.

Asimismo la utilización:

- de una proteína, caracterizada porque comprende o está constituida por:

* la proteína NOV, representada por la secuencia SEC ID nº 2, o

* un fragmento de esta proteína, siempre que este fragmento presente una actividad de inhibición de la angiogénesis, comprendiendo dicho fragmento en particular de aproximadamente 40 a aproximadamente 80 aminoácidos, y estando en particular representado por una de las secuencias siguientes: SEC ID nº 4, SEC ID nº 6, SEC ID nº 8, SEC ID nº 10, o

* cualquier secuencia derivada de la secuencia SEC ID nº 2 o de un fragmento, tal como se ha definido anteriormente, en particular por sustitución, supresión o adición de uno o varios aminoácidos, siempre que esta secuencia derivada presente una actividad de inhibición de la angiogénesis, o

* cualquier secuencia homóloga de la secuencia SEC ID nº 2 o de un fragmento, tal como se ha definido anteriormente, que tiene preferentemente una homología de por lo menos aproximadamente el 80%, y en particular el 85%, con la región comprendida entre los aminoácidos en la posición (33) y (338) de la secuencia SEC ID nº 2, siempre que esta secuencia homóloga presente una actividad de inhibición de la angiogénesis,

- una secuencia nucleotídica, caracterizada porque comprende o está constituida por una secuencia nucleotídica que codifica:

* o bien para la proteína NOV, tal como se ha definido anteriormente,

* o bien para un fragmento de la proteína NOV, tal como se ha definido anteriormente,

* o bien para una secuencia derivada de la proteína NOV tal como se ha definido anteriormente,

* o bien para una secuencia homóloga de la proteína NOV tal como se ha definido anteriormente,

correspondiendo dicha secuencia nucleotídica en particular a la secuencia nucleotídica SEC ID nº 1 que codifica para la SEC ID nº 2, o a la secuencia SEC ID nº 3 que codifica para la SEC ID nº 4, o a la secuencia SEC ID nº 5 que codifica para la SEC ID nº 6, o a la secuencia SEC ID nº 7 que codifica para la SEC ID nº 8, o a la secuencia SEC ID nº 9 que codifica para la SEC ID nº 10,

- de un anticuerpo anti-idiotípico de la proteína NOV,

se puede utilizar para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de patologías que necesitan la inhibición de la proliferación endotelial, en particular en el marco de las patologías siguientes: la degenerescencia macular relacionada con la edad; las retinopatías diabéticas, la poliartritis reumatoide, los angiomas, los angiosarcomas, en particular la enfermedad de Castelman y el sarcoma de Kaposi.

De la misma manera:

- una proteína, caracterizada porque comprende o está constituida por:

* la proteína NOV, representada por la secuencia SEC ID nº 2, o

* un fragmento de esta proteína, siempre que este fragmento presente una actividad de inhibición de la angiogénesis, comprendiendo dicho fragmento en particular de aproximadamente 40 a aproximadamente 80

aminoácidos, y estando en particular representado por una de las secuencias siguientes: SEC ID nº 4, SEC ID nº 6, SEC ID nº 8, SEC ID nº 10, o

5 * cualquier secuencia derivada de la secuencia SEC ID nº 2 o de un fragmento tal como se ha definido anteriormente, en particular por sustitución, supresión o adición de uno o varios aminoácidos, siempre que esta secuencia derivada presente una actividad de inhibición de la angiogénesis, o

10 * cualquier secuencia homóloga de la secuencia SEC ID nº 2 o de un fragmento tal como se ha definido anteriormente, que tiene preferentemente una homología de por lo menos aproximadamente el 80%, y en particular el 85%, con la región comprendida entre los aminoácidos en la posición (33) y (338) de la secuencia SEC ID nº 2, siempre que esta secuencia homóloga presente una actividad de inhibición de la angiogénesis,

15 - una secuencia nucleotídica, caracterizada porque comprende o está constituida por una secuencia nucleotídica que codifica:

- * o bien para la proteína NOV tal como se ha definido anteriormente,
- * o bien para un fragmento de la proteína NOV tal como se ha definido anteriormente,
- 20 * o bien para una secuencia derivada de la proteína NOV tal como se ha definido anteriormente,
- * o bien para una secuencia homóloga de la proteína NOV tal como se ha definido anteriormente,

25 correspondiendo dicha secuencia nucleotídica en particular a la secuencia nucleotídica SEC ID nº 1 que codifica para la SEC ID nº 2, o a la secuencia SEC ID nº 3 que codifica para la SEC ID nº 4, o a la secuencia SEC ID nº 5 que codifica para la SEC ID nº 6, o a la secuencia SEC ID nº 7 que codifica para la SEC ID nº 8, o a la secuencia SEC ID nº 9 que codifica para la SEC ID nº 10,

- un anticuerpo anti-idiotípico de la proteína NOV,

30 se pueden utilizar para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de patologías que necesitan la inhibición de la activación endotelial, en particular en el marco de las patologías siguientes: rechazo de aloinjerto y xenoinjerto, las acrocianosis, las esclerodermias, o en el marco de la preparación de injertos entre la extracción y el trasplante.

35 Los inventores han constatado asimismo que era posible preparar una composición farmacéutica, caracterizada porque contiene como sustancia activa:

- una proteína, caracterizada porque comprende o está constituida por:

- 40 * la proteína NOV, representada por la secuencia SEC ID nº 2, o
- * un fragmento de esta proteína, siempre que este fragmento presente una actividad de inhibición de la angiogénesis, comprendiendo dicho fragmento en particular de aproximadamente 40 a aproximadamente 180 aminoácidos, preferentemente de aproximadamente 40 a aproximadamente 80 aminoácidos, y estando en particular representado por una de las secuencias siguientes: SEC ID nº 4, SEC ID nº 6, SEC ID nº 8, SEC ID nº 10 o SEC ID nº 12, o
- 45 * cualquier secuencia derivada de la secuencia SEC ID nº 2 o de un fragmento, tal como se ha definido anteriormente, en particular por sustitución, supresión o adición de uno o varios aminoácidos, siempre que esta secuencia derivada presente una actividad de inhibición de la angiogénesis, o

50 * cualquier secuencia homóloga de la secuencia SEC ID nº 2 o de un fragmento tal como se ha definido anteriormente, que tiene preferentemente una homología de por lo menos aproximadamente el 80%, y en particular el 85%, con la región comprendida entre los aminoácidos en la posición (33) y (338) de la secuencia SEC ID nº 2, siempre que esta secuencia homóloga presente una actividad de inhibición de la angiogénesis,

55

- una secuencia nucleotídica, caracterizada porque comprende o está constituida por una secuencia nucleotídica que codifica:

- 60 * o bien para la proteína NOV, tal como se ha definido anteriormente,
- * o bien para un fragmento de la proteína NOV, tal como se ha definido anteriormente,
- * o bien para una secuencia derivada de la proteína NOV, tal como se ha definido anteriormente,
- * o bien para una secuencia homóloga de la proteína NOV tal como se ha definido anteriormente,

65 correspondiendo dicha secuencia nucleotídica en particular a la secuencia nucleotídica SEC ID nº 1 que codifica para la SEC ID nº 2, o a la secuencia SEC ID nº 3 que codifica para la SEC ID nº 4, o a la secuencia SEC ID nº 5

que codifica para la SEC ID nº 6, o a la secuencia SEC ID nº 7 que codifica para la SEC ID nº 8, o a la secuencia SEC ID nº 9 que codifica para la SEC ID nº 10, o a la secuencia SEC ID nº 11 que codifica para la SEC ID nº 12,

5 - un anticuerpo anti-idiotípico de la proteína NOV,

en asociación con un vector farmacéuticamente aceptable.

Asimismo, es posible preparar una composición farmacéutica, caracterizada porque contiene como sustancia activa una proteína caracterizada porque comprende o está constituida por:

10 * un fragmento de la proteína NOV, representada por la secuencia SEC ID nº 2, siempre que este fragmento presente una actividad de inhibición de la angiogénesis, comprendiendo dicho fragmento en particular de aproximadamente 40 a aproximadamente 180 aminoácidos, y estando en particular representado por una de las secuencias siguientes: SEC ID nº 4, SEC ID nº 6, SEC ID nº 8, SEC ID nº 10 o SEC ID nº 12, o

15 * cualquier secuencia derivada de la secuencia SEC ID nº 2 o de un fragmento tal como se ha definido anteriormente, en particular por sustitución, supresión o adición de uno o varios aminoácidos, siempre que esta secuencia derivada presente una actividad de inhibición de la angiogénesis, o

20 * cualquier secuencia homóloga de la secuencia SEC ID nº 2 o de un fragmento tal como se ha definido anteriormente, que tiene preferentemente una homología de por lo menos aproximadamente el 80%, y en particular el 85%, con la región comprendida entre los aminoácidos en la posición (33) y (338) de la secuencia SEC ID nº 2, siempre que esta secuencia homóloga presente una actividad de inhibición de la angiogénesis,

25 en asociación con un vector farmacéuticamente aceptable.

La invención se refiere así a una composición farmacéutica, caracterizada porque contiene como sustancia activa:

30 - una proteína caracterizada porque está constituida por un fragmento de la proteína NOV, representada por la secuencia SEC ID nº 2, estando dicho fragmento representado por la secuencia SEC ID nº 12.

- una secuencia nucleotídica caracterizada porque comprende o está constituida por una secuencia nucleotídica que codifica:

35 * o bien para la proteína NOV tal como se ha definido anteriormente,

* o bien para un fragmento de la proteína NOV tal como se ha definido anteriormente,

correspondiendo dicha secuencia nucleotídica a la secuencia nucleotídica SEC ID nº 1 que codifica para la SEC ID nº 2, o a la secuencia SEC ID nº 11 que codifica para la SEC ID nº 12.

40 - un anticuerpo anti-idiotípico de la proteína NOV representada por la secuencia SEC ID nº 2, imitando dicho anticuerpo las funciones de la proteína NOV reconociendo el VEGF,

45 en asociación con un vector farmacéuticamente aceptable.

En un modo de realización ventajoso, la invención se refiere a una composición farmacéutica definida anteriormente, caracterizada porque contiene como sustancia activa una proteína caracterizada porque está constituida por un fragmento de la proteína NOV, representada por la secuencia SEC ID nº 2, estando dicho fragmento representado por la secuencia SEC ID nº 12, en asociación con un vector farmacéuticamente aceptable.

50 Asimismo, se puede preparar una composición farmacéutica ventajosa que contiene, como sustancia activa, el fragmento TSP-1 mencionado anteriormente (SEC ID nº 8).

55 Una composición ventajosa según la invención se caracteriza porque la actividad de inhibición de la angiogénesis se mide según el ensayo de proliferación, de migración o de diferenciación, y porque esta actividad de inhibición corresponde a un porcentaje de inhibición comprendido entre el 20% y el 100% de la angiogénesis obtenida en presencia del vehículo solo.

60 Los ensayos de proliferación, de migración y de diferenciación (angiogénesis *in vitro*) se describen más adelante en la parte experimental.

La presente invención se refiere asimismo a una composición tal como se ha definido anteriormente, caracterizada porque contiene como sustancia activa la proteína NOV, representada por la secuencia SEC ID nº 2.

65 Según un modo de realización ventajoso de la presente invención, la composición tal como se ha definido anteriormente está caracterizada porque es susceptible de ser administrada a razón de aproximadamente 0,1 a

aproximadamente 20 mg/kg/día.

La presente invención se refiere asimismo a la utilización, tal como se ha definido anteriormente, para la preparación de una composición tal como se ha definido anteriormente, destinada a ser administrada a razón de

Es también posible preparar una composición tal como se ha definido anteriormente, caracterizada porque se administra en forma de un gen, de una proteína o de un péptido que contiene la secuencia de tipo TSP-1 (SEC ID nº 8).

Una composición ventajosa de la invención se administra en particular preferentemente en forma inyectable.

Descripción de las figuras

La figura 1 corresponde al enlace de la forma yodada de VEGF₁₆₅ sobre la proteína NOV.

La proteína NOV (4 µg/ml) se inmoviliza sobre un plástico según las condiciones descritas en la parte experimental, y después se incuba con VEGF₁₆₅ yodado (1 ng/pocillo) en ausencia (columna PBS) o en presencia de 2 µg/ml de VEGF₁₆₅ (columna 0) o de NOV (columna NOV). Los resultados están expresados en cpm de VEGF₁₆₅ yodado fijado por pocillo, después del lavado.

La figura 2 corresponde al enlace de la forma yodada de VEGF₁₈₉ sobre la proteína NOV.

La proteína NOV (4 µg/ml) se inmoviliza sobre un plástico según las condiciones descritas en la parte experimental, y después se incuba con VEGF₁₈₉ yodado (1 ng/pocillo) en ausencia (columna PBS) o en presencia de 2 µg/ml de VEGF₁₈₉ (columna 0) o de NOV (columna NOV). Los resultados están expresados en cpm de VEGF₁₈₉ yodado fijado por pocillo, después del lavado.

La figura 3 corresponde al ensayo de migración de las células. Las células son contadas en 8 campos y la media se representa en el eje de las ordenadas. El eje de las abscisas corresponde a la concentración de la proteína NOV en µg/ml. Los puntos representados por unos rombos corresponden a las células no incubadas con VEGF y los puntos representados por unos cuadrados corresponden a las células tratadas previamente con VEGF.

La figura 4 corresponde al ensayo de proliferación de las células. El eje de las abscisas corresponde a la concentración de la proteína NOV en µg/ml y el eje de las ordenadas a la densidad óptica medida a 595 nm. Los puntos representados por unos rombos corresponden a las células que no han sido estimuladas por el VEGF y los puntos representados por unos cuadrados corresponden a las células que han sido estimuladas por el VEGF.

La figura 5 corresponde al ensayo de adhesión de las células FBAE. El eje de las abscisas corresponde a la concentración de la proteína NOV en µg/ml y el eje de las ordenadas a la densidad óptica medida a 595 nm. Los puntos representados por unos rombos corresponden a las células no incubadas con VEGF y los puntos representados por unos cuadrados corresponden a las células tratadas previamente con VEGF.

Las figuras 6A y 6B representan el efecto de NOV y de sus fragmentos sobre la migración de las células HUAEC estimuladas con VEGF₁₆₅. La figura 6A corresponde a los ensayos control con unas células no estimuladas con VEGF₁₆₅ y la figura 6B corresponde a los ensayos con unas células estimuladas con VEGF₁₆₅. Las columnas representan el número de células/campos. Las columnas blancas corresponden a las células control (sin adición de NOV o de uno de sus fragmentos); las columnas negras corresponden a las células estimuladas en presencia de NOV; las columnas rayadas verticalmente corresponden a las células estimuladas en presencia del fragmento N-terminal de NOV (aminoácidos 1 a 187 de NOV) y las columnas rayadas horizontalmente corresponden a las células estimuladas en presencia del fragmento C-terminal de NOV.

La figura 7A representa el efecto de la proteína NOV o de su fragmento C-terminal sobre la proliferación de las HUAEC (células endoteliales arteriales umbilicales humanas) estimuladas con VEGF₁₆₅. El eje de las abscisas corresponde a la concentración de la proteína NOV o del fragmento C-terminal (SEC ID nº 12) en µg/ml y el eje de las ordenadas a la densidad óptica medida a 595 nm. La curva en trazo continuo con los cuadrados blancos corresponde a la proteína NOV y la curva en trazo punteado con los cuadrados negros corresponde al fragmento SEC ID nº 12.

La figura 7B representa el efecto de la proteína NOV o de su fragmento C-terminal sobre la proliferación de las HUAEC estimuladas con bFGF. El eje de las abscisas corresponde a la concentración de la proteína NOV o del fragmento C-terminal (SEC ID nº 12) en µg/ml y el eje de las ordenadas a la densidad óptica medida a 595 nm. La curva en trazo continuo con los cuadrados blancos corresponde a la proteína NOV y la curva en trazo punteado con los cuadrados negros corresponde al fragmento SEC ID nº 12.

Las figuras 8A y 8B representan el efecto del fragmento C-terminal de la proteína NOV (SEC ID nº 12) sobre la

angiogénesis corneana. La figura 8A corresponde a la inyección de LPS solo y la figura 8B a la inyección de LPS y de dicho fragmento C-terminal.

Parte experimental

Materiales:

La molécula NOV está producida mediante infección de células de insecto SF9 por un baculovirus recombinante que contiene el ADNc correspondiente (SEC ID nº 1) (Thibout *et al.*, 2003).

Las isoformas de 165 y 189 aminoácidos de VEGF se producen mediante infección de células de insecto SF9 por un baculovirus recombinante que contiene el ADNc correspondiente (Plouët *et al.*, 1997).

Unas células endoteliales arteriales umbilicales humanas (HUAEC) se han aislado a partir de arterias umbilicales perfusionadas con colágeno (Sigma) para digerir la membrana basal. Las células HUAEC se han mantenido en SFM (Life Sciences) adicionado con 20% de suero de ternera fetal (SVF) inactivado por el calor. Los cultivos cepas han recibido 1 ng/ml de VEGF cada día.

Unas células endoteliales de aorta fetal bovina (FBAE) se han aislado a partir de aortas fetales obtenidas de un matadero local. Las células se han mantenido en DMEM glutamax (Life Sciences) adicionado con 10% de suero de ternera recién nacida (NBCS) inactivado por el calor, 100 µg/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina a 37°C en 10% de CO₂ y 1 ng/ml de VEGF cada 2 días.

Interacción directa entre VEGF y NOV

Para el enlace con la proteína NOV inmovilizada, se han recubierto unas placas ELISA de 96 pocillos con 4 µg/ml de proteína NOV en un tampón carbonato 0,05 M a pH 9,6 durante la noche a 4°C. Los sitios de unión no específicos se han bloqueado con 5 mg/ml de BSA en tampón carbonato. Después de lavar dos veces los pocillos con PBS a pH 7,4, se añadió 1 ng de VEGF yodado a cada pocillo en presencia o no de 2 µg/ml de VEGF₁₆₅ o de NOV, diluidos en PBS que contiene 0,05% de Tween 20, 0,5% de BSA, 1 mM de MgCl₂ y 1 mM de CaCl₂.

Los pocillos se lavaron 3 veces con una mezcla de PBS-Tween 20 al 0,1%, BSA al 0,5% y las proteínas unidas se solubilizaron en NaOH al 0,2M.

Los resultados de estos experimentos están representados en las figuras 1 y 2.

La figura 1 muestra que el VEGF₁₆₅ yodado se asocia específicamente a NOV puesto que la adición de VEGF no radiomarcado (VEGF) inhibe esta unión. Asimismo, la adición de NOV inhibe la unión de VEGF₁₆₅ radiomarcado con NOV.

Ensayos de migración

Se inoculan unas células FBAE en unos pocillos de 4 cm³ a alta densidad (50.000 células/pocillo). Cuando la monocapa es confluyente, la proliferación se detiene mediante la incubación, durante una noche, en presencia de DMEM sin suero. Se practica entonces una herida en la monocapa con la ayuda de un raspador de espuma, que permite delimitar una superficie libre de cualquier célula. Las monocapas se lavan a continuación 3 veces mediante DMEM para quitar las células no adherentes. Se toma entonces una fotografía para delimitar la superficie antes de cualquier migración celular. Los pocillos se incuban a continuación en DMEM solo o en presencia de 50 ng/ml de VEGF en presencia de concentraciones variables de NOV. Después de 24 horas, los pocillos se lavan 3 veces y se colorean con May-Grunwald-Giemsa, y se fotografían. Las fotografías tomadas antes y después del experimento se superponen entonces para permitir el recuento de las células que han migrado.

Los resultados de estos ensayos se indican en la figura 3.

La adición de NOV en ausencia de VEGF no tiene ningún efecto sobre la migración basal de las células. Por el contrario, NOV inhibe la actividad de VEGF y el 50% del efecto máximo se obtiene con una concentración de 50-100 ng/ml de NOV.

Ensayos de proliferación

Unas placas de cultivo de 96 pocillos se insemnaron con 1.000 células FBAE por pocillo en DMEM adicionado con 5% de NBCS. Las células se estimularon o no con 2 ng/ml de VEGF₁₆₅ y diferentes concentraciones de NOV. Tras 5 días, se aclaran los pocillos lentamente con DMEM y se fijan las células en 1% de glutaldehído durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células fijadas se cuantifican mediante incorporación de violeta cristalizado (Kuang *et al.*, 1989); las células se incubaron en 0,1% de violeta cristalizado (Sigma) diluido en 0,2 M de tampón borato a pH 9,5 durante 20 minutos a temperatura ambiente, el colorante no incorporado se eliminó lavando completamente los

pocillos con grandes cantidades de agua y el colorante violeta cristalizado incorporado se solubilizó después mediante 100 µl de 10% de ácido acético por pocillo. Las lecturas de densidad óptica se efectuaron a 595 nm. Unos resultados similares se obtuvieron en tres experimentos separados (véase la figura 4). Los valores indicados son unas densidades ópticas medias de 6 pocillos ± SD.

5 La proteína NOV utilizada sola no tiene efecto significativo sobre la proliferación basal (debida al suero solo). Sin embargo, la proteína NOV inhibe la proliferación inducida por el VEGF sobre un modo dependiente de la dosis. Se obtiene el 50% del efecto máximo con una concentración de 100-200 ng/ml de NOV.

10 Ensayos de adhesión celular

Unas placas ELISA de 96 pocillos (Nunc) se han recubierto de proteína VEGF₁₆₅ según el protocolo descrito en el artículo de Hutchings *et al.* (2003), diluida en tampón carbonato 0,05 M a pH 0,6 durante la noche a 4°C. Los sitios de unión no específicos se han bloqueado durante 1 hora a 37°C con 5 mg/ml de BSA en un tampón carbonato y lavados dos veces con DMEM antes de los experimentos. Las células han sido tripsinadas, lavadas y resuspendidas en 5 ml de DMEM con 10% de SVF en un tubo de plástico no tratado durante 1 hora a 37°C con 10% de CO₂. Las células han sido concentradas después mediante centrifugación y resuspendidas en una mezcla DMEM + 0,2% BSA sin suero, y la suspensión celular se ha tratado durante 20 minutos (37°C, 10% de CO₂) con la proteína NOV utilizada para modular la adhesión. Se han distribuido 40.000 células por pocillo en los pocillos en un volumen de 100 µl de DMEM + 0,2 de BSA. Las células se han dejado adherir a 37°C con 10% de CO₂ durante el tiempo deseado. Los pocillos se han lavado lentamente tres veces con DMEM para retirar las células no adherentes y las células adherentes se han fijado con 1% de glutaraldehído durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células fijadas se han cuantificado mediante incorporación de cristal violeta (Kueng *et al.*, 1989); las células se han incubado con 0,1% de violeta cristalizado (Sigma) diluido en 0,2 M de tampón borato a pH 9,5 durante 20 minutos a temperatura ambiente, el colorante no incorporado se ha eliminado lavando completamente los pocillos con grandes cantidades de agua y el colorante cristal violeta incorporado se ha solubilizado después mediante 100 µl de 10% de ácido acético por pocillo (véase la figura 5).

30 Angiogénesis *in vitro*

Cuatro colas de rata se han despellejado y disecado para recuperar los haces blancos que están constituidos en su mayor parte por colágeno de tipo I. El colágeno se extrae de estas fibras en 50 ml de ácido acético 0,5 M frío y se agitan durante una noche. El líquido se centrifuga después a 5.000 g durante 40 minutos y se recupera el sobrenadante. La extracción se rehace una vez con 20 ml de ácido acético, los sobrenadantes se mezclan y después se dializan contra 1 l de ácido acético 0,2 M. La concentración en colágeno se ajusta a 3 mg/ml por pesaje. La preparación de los geles para la angiogénesis *in vitro* se efectúa sobre hielo para conservar la disolución de colágeno en forma líquida. Un ml de colágeno (5 mg/ml) se mezcla con 0,5 ml de DMEM 10X (que contiene una concentración 10X en antibióticos y en glutamina), 0,9 ml de H₂O estéril y 0,1 ml de bicarbonato de sodio 1M. Una vez ajustado el pH a 7,4, éste se ajusta a un volumen igual de matrigel (Becton Dickinson). El gel se vierte en unos pocillos de cultivo (2 mm de grosor) y se incuba a 37°C para solidificarlo. Las células se añaden después de 15 minutos (100.000 células/cm²) sobre la superficie del gel. Después de 2 horas, se añaden los diferentes factores solubles y se observan y fotografían las células después de 24 horas.

45 Producción de anticuerpos anti-idiotípicos

En un primer momento, se prepara un anticuerpo neutralizante de NOV inyectando a un animal, en particular un ratón, de la proteína NOV mezclada con el adyuvante completo de Freund (1 volumen por volumen de proteína NOV). Se seleccionará una cantidad de NOV comprendida entre 1 y 200 µg/kg de peso corporal para inmunizar al animal. La misma operación se efectúa con 15 y 30 días de intervalo, salvo que el adyuvante completo es sustituido por adyuvante incompleto. En el día 40, se practica una sangría, el suero se separa y las inmunoglobulinas se purifican mediante cualquier método de fraccionamiento habitual, en particular precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de afinidad para la proteína A o G. Se mide la actividad neutralizante de las inmunoglobulinas mediante cualquier ensayo descrito (unión del VEGF yodado, proliferación, migración, adhesión celular). Un lote de inmunoglobulinas se denominará neutralizante cuando tenga la capacidad de inhibir la interacción de NOV con el VEGF.

En un segundo momento, se preparan unos anticuerpos anti-idiotípicos de NOV inyectando a ratones por vía subcutánea 1-100 µg de la preparación de las inmunoglobulinas que neutralizan la actividad de NOV descritas anteriormente en asociación con 100 µl de adyuvante, en particular adyuvante completo de Freund (Sigma). La inyección se repite 15, 30 y 45 días después. Cincuenta y cinco días después de la primera inyección, se inyectan a unos ratones 10 µg del mismo anticuerpo por vía intraperitoneal. Cincuenta y ocho días después de la primera inyección, los ratones son sacrificados y sus bazo son extraídos y dilacerados en un medio ISCOVE para liberar los esplenocitos. Los esplenocitos son fusionados con unas células de mieloma de ratón, en particular unas células AG8X 63 (Kearney *et al.*, 1979), e incubados a razón de 100.000 células/pocillo. La fusión se efectúa mediante adición de 20 veces 50 µl de polietilenglicol (PEG) con 30 segundos de intervalo. Cuatro ml de medio ISCOVE precalentado a 37°C se añaden entonces gota a gota sobre la suspensión celular, y después, tras un periodo de

incubación de 4 minutos a 37°C, se añaden 4 ml. La suspensión se centrifuga y después el residuo celular se recoge en 100 ml de medio ISCOVE complementado con 20% de suero de ternera fetal y de HAT 1X (50X: Hipoxantina 5 mM, aminopterina 20 µM y Timidina 0,8 mM) y se distribuye a razón de 100 µl por pocillo sobre los macrófagos. Después de 5 días, se añaden 100 µl de medio HAT, y entre 8 y 14 días el medio acondicionado de cada hibridoma se recoge para medir mediante ELISA los anticuerpos dirigidos contra los anticuerpos que han servido de agente inmunógeno, es decir los anticuerpos anti-NOV. Se mide entonces la actividad de los anticuerpos anti-idiotípicos mediante un ensayo ELISA.

Los fragmentos Fab de las inmunoglobulinas anti-NOV, preparados mediante cualquier técnica convencional, en particular una digestión con papaína, se inmovilizan sobre unas placas de microtitulación (0,1-20 µg/ml en un tampón carbonato 50 mM pH 9,6). Después de la saturación de los sitios no específicos mediante una disolución de suero-albúmina diluida a 5 mg/ml en el mismo tampón, se añaden los sobrenadantes de cultivos de hibridomas, diluidos a la mitad en un tampón PBS que contiene 0,05% de Tween 20. Después del aclarado, se revelan los anticuerpos anti-idiotípicos mediante la adición de una concentración apropiada de anticuerpos anti-Fc de ratón acoplado con peroxidasa. La cantidad de anticuerpos anti-idiotípicos fijada se mide entonces mediante revelación de la peroxidasa y es proporcional a la intensidad de la reacción colorimétrica.

Los hibridomas seleccionados por su capacidad para segregar unos anticuerpos dirigidos contra unos anticuerpos anti-NOV son entonces clonados, es decir que las células son inseminadas en condición de dilución límite (5 células/ml) bajo un volumen de 0,1 ml por pocillo. El medio se cambia después de 10 días. Después de 15 días, algunos pocillos contienen unos focos de células que se han multiplicado a partir de la célula inseminada al principio, por lo tanto todas estas células son idénticas y proceden del mismo clon. Cuando la superficie ocupada por las células representa por lo menos la mitad de la superficie total del pocillo, el medio se extrae y se analiza como anteriormente mediante ELISA sobre Fab anti-NOV. En esta etapa, se pueden seleccionar los clones productores de anticuerpos y conocer su especificidad.

Una vez identificados los clones, su naturaleza monoclonal se afirma mediante la operación clásica que consiste en inseminar una placa de 96 pocillos con unas células procedentes del mismo clon diluidas en condiciones límite, como anteriormente. Los clones segregantes deben por lo tanto segregar todos un anticuerpo de la misma especificidad para que se declare este anticuerpo monoclonal. Se efectúa entonces una tercera clonación exactamente en las mismas condiciones para asegurar que los clones son efectivamente monoclonales.

Los anticuerpos anti-idiotípicos se criban mediante una batería de ensayos, en particular un ensayo ELISA sobre VEGF inmovilizado. El VEGF se inmoviliza (0,1-10 µg/ml) en un tampón carbonato como anteriormente, y todas las etapas de este ELISA son idénticas a las descritas en ELISA sobre Fab anti-NOV. Este ensayo permite cribar entre todos los anticuerpos anti-idiotípicos los que imitan las funciones de la proteína NOV (SEC ID nº 2) o unos fragmentos de tipo TSP-1 (SEC ID nº 8), es decir unos anticuerpos que reconocen el VEGF.

Construcción de mutantes de NOV

Se han construido unos mutantes de delección de la proteína NOV según la referencia (Perbal *et al.*, 1999) y producidos en un sistema de expresión de baculovirus:

- N-ter (corresponde a una secuencia que comprende los aminoácidos 1-187 de NOV), y
- C-ter, que contiene los aminoácidos 188 a 357 (esta secuencia contiene el dominio de tipo trombospondina (SEC ID nº 8) y el dominio C-terminal rico en cisteínas (SEC ID nº 10).

Ensayos de migración (figura 6)

Se inoculan unas células HUAEC en unos pocillos de 4 cm² con alta densidad (50.000 células/pocillo). Cuando la monocapa es confluyente, la proliferación se detiene mediante la incubación, durante una noche, en presencia de SFM con 1% de NBCS. Se practica entonces una herida en la monocapa con la ayuda de un raspador de espuma, que permite delimitar una superficie libre de cualquier célula. Las monocapas se lavan a continuación 3 veces mediante SFM para quitar las células no adherentes. Se toma entonces una fotografía para delimitar la superficie antes de cualquier migración celular. Los pocillos se incuban después en SFM solo o en presencia de 50 ng/ml de VEGF en presencia de concentraciones variables de NOV o de sus fragmentos N-ter o C-ter. Después de 24h, los pocillos se lavan 3 veces y se colorean con May-Grunwald-Giemsa, y se fotografían. Las fotografías tomadas antes y después del experimento se superponen entonces para permitir el recuento de las células que han migrado.

Los resultados de este ensayo se indican en la figura 6.

La adición de NOV o del fragmento N-ter en ausencia de VEGF no tiene ningún efecto sobre la migración basal de las células. NOV inhibe la actividad de VEGF y el 50% del efecto máximo se obtiene con una concentración de 50-100 ng/ml de NOV. El fragmento N-ter no ejerce ninguna actividad inhibidora. Por el contrario, el fragmento C-ter inhibe la migración de las células HUAEC.

Estos experimentos demuestran que la secuencia de NOV que comprende los aminoácidos 188 a 357 es responsable de la actividad de inhibición de la angiogénesis debida al VEGF y que induce una actividad que inhibe la migración incluso en ausencia de VEGF.

5 Ensayos de proliferación (figura 7)

10 Unas placas de cultivo de 96 pocillos se han insemñado con 2.000 células HUAEC por pocillo en un medio SFM adicionado con 10% de NBCS. Las células se han estimulado o no con 2 ng/ml de VEGF₁₆₅ y diferentes concentraciones de NOV o del fragmento C-ter. Al cabo de 5 días, los pocillos se han aclarado lentamente con un medio SFM y las células se han fijado en 1% de glutaldehído durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células fijadas se han cuantificado mediante incorporación de violeta cristalizado: las células se han incubado en 0,1% de violeta cristalizado (Sigma) diluido en 0,2 M de tampón borato a pH 9,5 durante 20 minutos a temperatura ambiente, el colorante no incorporado se ha eliminado lavando completamente los pocillos con grandes cantidades de agua y el colorante violeta cristalizado incorporado se solubilizó después mediante 100 µl de 10% de ácido acético por pocillo. Los lectores de densidad óptica se han efectuado a 595 nm. Unos resultados similares se han obtenido en tres experimentos separados (véase la figura 7). Los valores indicados son unas densidades ópticas medias de 6 pocillos ± SD.

20 La proteína NOV inhibe la proliferación inducida por VEGF y FGF sobre un modo dependiente de la dosis. Se obtiene el 50% del efecto máximo con una concentración inhibitora de 50% de 200 ng/ml de NOV frente a VEGF y FGF. Asimismo, el fragmento C-ter inhibe la proliferación inducida por el VEGF o el FGF con una concentración de 200 ng/ml.

25 Estos experimentos demuestran que la secuencia de NOV que comprende los aminoácidos 188 a 357 es responsable de la actividad de inhibición de la angiogénesis. La observación según la cual la actividad mitógena de FGF está inhibida asimismo por el fragmento NOV 188-357 demuestra que la actividad inhibitora no está restringida al único factor VEGF.

30 Angiogénesis de córnea

35 Se anestesian unas ratas Wistar. Las corneas son seccionadas y se obtiene una bolsa de córnea dilacerando el grosor del estroma con la ayuda de una espátula de espuma. En el fondo de la bolsa se inserta un implante de Elvax (DuPont) que contiene lipopolisacárido, un agente inflamatorio que inicia una reacción angiogénica dependiente de varios factores angiogénicos. Después de 8 días, una reacción angiogénica es visible con respecto al limbo. Cuando el fragmento C-ter se inyecta en la bolsa de córnea (5 µg cada 2 días entre D4 y D8), la reacción angiogénica está totalmente inhibida (figura 8).

40 Estos experimentos demuestran que el fragmento C-ter de NOV ejerce una actividad anti-angiogénica principal debido a que depende de la activación de varios factores angiogénicos.

Referencias

- 45 - Bork P (1993) The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor. *FEBS Lett.* 327: 125-130,
- Bradham DM, Igarashi A, Potter RL, Grotendorst GR (1991) Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *J Cell Biol.* 114:1285-1294,
- 50 - Brigstock DR (1999) The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family. *Endocrine Rev.* 20:189-206,
- Brooks PC, Clark RA, Cheresch DA (1994) Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science*, 264, 569-71,
- 55 - Celerier J, Cruz A, Lamande N, Gasc JM, Corvol P (2002) Angiotensinogen and its cleaved derivatives inhibit angiogenesis. *Hypertension.* 39(2):224-8,
- 60 - Chevalier G, Yeger H, Martinerie C, *et al.* (1998) *nov* H: Differential expression in developing kidney and in Wilms' tumors. *Am J Pathol.* 152:1563-1575,
- Hashimoto Y, Shindo-Okada N, Tani M, *et al.* (1998) Expression of the Elm-1 gene, a novel gene of the CCN (CTGF, Cyr61/Cef10 and *nov*) family, suppress in vivo growth and metastasis of K-1735 murine melanoma cells. *J Exp Med.* 187:289-296,
- 65

- Herbst *et al.* (2002) *J. Clin. Oncol.* 20:3804-3814,
- Hutchings H, Ortéga N, Plouët J (2003) Extracellular matrix bound vascular endothelial growth factor promotes endothelial cell adhesion, migration and survival through integrin ligation. *FASEB J.* 22 de abril (Epub ahead of print)
- Inoki I, Shiomi T, Hashimoto G, Enomoto H, Nakamura H, Makino K, Ikeda E, Takata S, Kobayashi K, Okada Y (2002) Connective tissue growth factor binds vascular endothelial growth factor (VEGF) and inhibits VEGF-induced angiogenesis. *FASEB J.* 16(2):219-21,
- Jain RK, Schlenger K, Hockel M, Yuan F (1997) Quantitative angiogenesis assays: progress and problems. *Nat Med.* 3(11):1203-8,
- Joliot V, Martinerie C, Dambrine G, *et al.* (1992) Proviral rearrangements and overexpression of a new cellular gene (*nov*) in myeloblastosis-associated virus type 1-induced nephroblastomas. *Mol Cell Biol.* 12:10-21,
- Keamey JF, Radbruch A, Liesegang B, Rajewsky K (1979) A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin Expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J. Immunol.* 123, 1548-50,
- Kocialkowski SY, H. Kingdom, J. Perbal, B. Schofield, PN (2001) Expression of the human NOV gene in first trimester fetal tissues. *Anat Embryol*, 203:417-427,
- Kumar S, Hand AT, Connor JR, *et al.* (1999) Identification and cloning of a Connective tissue growth factor-like cDNA from human osteoblasts encoding a novel regulator of osteoblast functions. *J Biol Chem.* 274:17123-17131,
- Lau L, Nathans D (1985) Expression of a set of growth-regulated immediate early genes in BALB/c 3T3 cells: coordinate regulation with *c-fos* or *c-myc*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84: 1182-1186,
- Lin CJ, Leu S-J, Chen N, Tebeau CM, Lin S-X, Yeung C-H, Lau LJ, (2003) CCN3 (NOV) is a novel angiogenic regulator of the CCN protein family. *J. Biol. Chem.*, 278, 24200-24208,
- Martinerie C, Gicquel C, Louvel A, Laurent M, Schofield P, LeBouc Y (2001) Altered expression of NovH is associated with human adrenocortical tumorigenesis. *JCEM.* 86:3929-3940,
- Martinerie C, Huff V, Joubert I, *et al.* (1994) Structural analysis of the human *nov* proto-oncogene and expression in Wilms tumor. *Oncogene* 9: 2729-2732,
- Martinerie C, Perbal B (1991) Expression of a gene encoding a novel IGF binding protein in human tissues *C R Acad Sci Paris.* 313: 345-351,
- O'Reilly *et al.* (1997) *Cell* 88:277-285,
- Ortéga N, Hutchings H, Plouët J (1999) Signal relays in the VEGF system. *Front. Biosc.*, 4, D141-D152,
- Pennica D, Swanson TA, Welsh JW, *et al.* (1998) WISP genes are members of the connective tissue growth factor family that are up-regulated in human colon tumors. *Proc Natl Acad Sci.* 95:14717-14722,
- Perbal B, Martinerie C, Sainson R, Werner M, He B, Roizman B (1999) The C-terminal domain of the regulatory protein NOVH is sufficient to promote interaction with fibulin 1C: a clue for a role of NOVH in cell-adhesion signaling. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96: 869-874,
- Plouët J, Moro F, Coldeboeuf N, Bertagnolli S, Clamens S, Bayard F (1997) Extracellular cleavage of the vascular endothelial growth factor 189 aa form by urokinase is required for its mitogenic activity. *J. Biol. Chem.*, 272, 13390-13396,
- Snaith M, Natarajan D, Taylor L, *et al.* (1996) Genomic structure and chromosomal mapping of the mouse *nov* gene. *Genomics.* 38: 425-428,
- Thibout H, Martinerie C, Creminon C, Godeau F, Boudou P, Le Bouc Y, Laurent M (2003) Characterization of NOVH in biological fluids: an enzyme immuno assay for the quantification of NOVH in sera from patients with diseases of the adrenal gland and of the nervous system. *J Clin Endocrinol Metab.* 88(1):327-336,
- Ying Z, Ling ML (1996) Isolation and characterization of *xnov*, a *Xenopus laevis* ortholog of the chicken *nov* gene. *Gene.* 17 1:243-248.

Listado de secuencias

5 <110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
 5 <120> NUEVO AGENTE ANTI-ANGIOGÉNICO Y SU UTILIZACIÓN, EN PARTICULAR EN EL MARCO DEL TRATAMIENTO DE LOS CÁNCERES
 10 <130> WOB 03 AW CNR GIOG
 10 <150> FR 03/09506
 <151> 01-08-2004
 15 <160> 12
 <170> PatentIn versión 3.1
 <210> 1
 <211>2389
 20 <212> ADN
 <213> homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 25 <222> (73)..(1143)
 <223>
 <400> 1

```

gggaaggcga gcagtgccaa tctacagcga agaaagtctc gtttggtaaa agcgagaggg      60
gaaagcctga gc atg cag agt gtg cag agc acg agc ttt tgt ctc cga aag      111
      Met Gln Ser Val Gln Ser Thr Ser Phe Cys Leu Arg Lys
      1          5          10
cag tgc ctt tgc ctg acc ttc ctg ctt ctc cat ctc ctg gga cag gtc      159
Gln Cys Leu Cys Leu Thr Phe Leu Leu Leu His Leu Leu Gly Gln Val
      15          20          25
gct gcg act cag cgc tgc cct ccc cag tgc ccg ggc cgg tgc cct gcg      207
Ala Ala Thr Gln Arg Cys Pro Pro Gln Cys Pro Gly Arg Cys Pro Ala
      30          35          40          45
acg ccg ccg acc tgc gcc ccc ggg gtg cgc gcg gtg ctg gac ggc tgc      255
Thr Pro Pro Thr Cys Ala Pro Gly Val Arg Ala Val Leu Asp Gly Cys
      50          55          60
tca tgc tgt ctg gtg tgt gcc cgc cag cgt ggc gag agc tgc tca gat      303
Ser Cys Cys Leu Val Cys Ala Arg Gln Arg Gly Glu Ser Cys Ser Asp
      65          70          75
ctg gag cca tgc gac gag agc agt ggc ctc tac tgt gat cgc agc gcg      351
Leu Glu Pro Cys Asp Glu Ser Ser Gly Leu Tyr Cys Asp Arg Ser Ala
      80          85          90
gac ccc agc aac cag act ggc atc tgc acg gcg gta gag gga gat aac      399
Asp Pro Ser Asn Gln Thr Gly Ile Cys Thr Ala Val Glu Gly Asp Asn
      95          100          105
tgt gtg ttc gat ggg gtc atc tac cgc agt gga gag aaa ttt cag cca      447
Cys Val Phe Asp Gly Val Ile Tyr Arg Ser Gly Glu Lys Phe Gln Pro
      110          115          120          125
    
```

30

ES 2 384 932 T3

agc tgc aaa ttc cag tgc acc tgc aga gat ggg cag att ggc tgt gtg Ser Cys Lys Phe Gln Cys Thr Cys Arg Asp Gly Gln Ile Gly Cys Val 130 135 140	495
ccc cgc tgt cag ctg gat gtg cta ctg cct gag cct aac tgc cca gct Pro Arg Cys Gln Leu Asp Val Leu Leu Pro Glu Pro Asn Cys Pro Ala 145 150 155	543
cca aga aaa gtt gag gtg cct gga gag tgc tgt gaa aag tgg atc tgt Pro Arg Lys Val Glu Val Pro Gly Glu Cys Cys Glu Lys Trp Ile Cys 160 165 170	591
ggc cca gat gag gag gat tca ctg gga ggc ctt acc ctt gca gct tac Gly Pro Asp Glu Glu Asp Ser Leu Gly Gly Leu Thr Leu Ala Ala Tyr 175 180 185	639
agg cca gaa gcc acc cta gga gta gaa gtc tct gac tca agt gtc aac Arg Pro Glu Ala Thr Thr Glu Val Glu Val Ser Ser Ser Val Asn 190 195 200 205	687
tgc att gaa cag acc aca gag tgg aca gca tgc tcc aag agc tgt ggt Cys Ile Glu Gln Thr Glu Trp Thr Ala Cys Ser Lys Ser Cys Gly 210 215 220	735
atg ggg ttc tcc acc cgg gtc acc aat agg aac cgt caa tgt gag atg Met Gly Phe Ser Thr Arg Val Thr Asn Arg Asn Arg Gln Cys Glu Met 225 230 235	783
ctg aaa cag act cgg ctc tgc atg gtg cgg ccc tgt gaa caa gag cca Leu Lys Gln Thr Arg Leu Cys Met Val Arg Pro Cys Glu Gln Glu Pro 240 245 250	831
gag cag cca aca gat aag aaa gga aaa aag tgt ctc cgc acc aag aag Glu Gln Pro Thr Asp Lys Lys Gly Lys Lys Cys Leu Arg Thr Lys Lys 255 260 265	879
tca ctc aaa gcc atc cac ctg cag ttc aag aac tgc acc agc ctg cac Ser Leu Lys Ala Ile His Leu Gln Phe Lys Asn Cys Thr Ser Leu His 270 275 280 285	927
acc tac aag ccc agg ttc tgt ggg gtc tgc agt gat ggc cgc tgc tgc Thr Tyr Lys Pro Arg Phe Cys Gly Val Cys Ser Asp Gly Arg Cys Cys 290 295 300	975
act ccc cac aat acc aaa acc atc cag gca gag ttt cag tgc tcc cca Thr Pro His Asn Thr Lys Thr Ile Gln Ala Glu Phe Gln Cys Ser Pro 305 310 315	1023
ggg caa ata gtc aag aag cca gtg atg gtc att ggg acc tgc acc tgt Gly Gln Ile Val Lys Lys Pro Val Met Val Ile Gly Thr Cys Thr Cys 320 325 330	1071
cac acc aac tgt cct aag aac aat gag gcc ttc ctc cag gag ctg gag His Thr Asn Cys Pro Lys Asn Asn Glu Ala Phe Leu Gln Glu Leu Glu 335 340 345	1119
ctg aag act acc aga ggg aaa atg taacctatca ctcaagaagc acacctacag Leu Lys Thr Thr Arg Gly Lys Met 350 355	1173

ES 2 384 932 T3

```

agcacctgta gctgctgccc caccaccat caaaggaata taagaaaagt aatgaagaat 1233
cacgatttca tccttgaatc ctatgtatct tcctaagtgt atcatatgag gacctttcat 1293
atctgtcttt tttttaacaa aaaatgtaat taactgtaaa cttggaatca aggtaagctc 1353
aggatatggc ttaggaatga cttactttcc tgtggtttta ttacaaatgc aaatttctat 1413
aaatttaaga aaacaagtat ataatttact ttgtagactg tttcacattg cactcatcat 1473
atthttgtgt gcactagtgc aattccaaga aaatatcact gtaatgagtc agtgaagtct 1533
agaatcatac ttaacatttc attgtacaag tattacaacc atatattgag gttcattggg 1593
aagattctct attggctccc tttttgggta aaccagctct gaacttccaa gctccaaatc 1653
caaggaaca tgcagtctct caacatgaca tccagagatg actattactt ttctgtttag 1713
ttttactacta ggaacgtgtg tgtatctaca gtaatgaaat gtttactaag tggactgggt 1773
tcataaactt tctccattta agacacattg actcctttcc aatagaaaga aactaaacag 1833
aaaactccca atacaagat gactggtccc tcatagccct cagacattta tatattggaa 1893
gctgctgagg cccccaagt ttttaattaa gcagaaacag catattagca gggattctct 1953
catctaaactg atgagtaaac tgaggcccaa agcactgtct tacatctct gatagctgtt 2013
tcaaatgtgc atthttgtgga atthttgagaa aaatagagca aaatcaacat gactggtggt 2073
gagagaccac acattttatg agagtttggg attattgtag acatgcccac aacttatcct 2133
tgggccataa ttatgaaac tcatgatcaa gatatatgtg tatacataca tgtatctggt 2193
ttgtcaggct acaaggtagg ctgcaaaatt aaatctagac attcttttaa tgccaccaca 2253
cgtgttccgc tctctcttt taaagtatct aaaaaatat aaattgtaca ttttgtaaaa 2313
tattatgttt gatttctcta ctgtcatat cactaaataa acacgatttt attgctgaaa 2373
aaaaaaaaa aaaaaa 2389

```

<210>2

<211>357

5

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 2

```

Met Gln Ser Val Gln Ser Thr Ser Phe Cys Leu Arg Lys Gln Cys Leu
1          5          10          15

Cys Leu Thr Phe Leu Leu Leu His Leu Leu Gly Gln Val Ala Ala Thr
20          25          30

Gln Arg Cys Pro Pro Gln Cys Pro Gly Arg Cys Pro Ala Thr Pro Pro
35          40          45

Thr Cys Ala Pro Gly Val Arg Ala Val Leu Asp Gly Cys Ser Cys Cys
50          55          60

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

Cys Asp Glu Ser Ser Gly Leu Tyr Cys Asp Arg Ser Ala Asp Pro Ser
85          90          95

Asn Gln Thr Gly Ile Cys Thr Ala Val Glu Gly Asp Asn Cys Val Phe
100         105         110

Asp Gly Val Ile Tyr Arg Ser Gly Glu Lys Phe Gln Pro Ser Cys Lys
115         120         125

Phe Gln Cys Thr Cys Arg Asp Gly Gln Ile Gly Cys Val Pro Arg Cys
130         135         140

Gln Leu Asp Val Leu Leu Pro Glu Pro Asn Cys Pro Ala Pro Arg Lys
145         150         155         160

Val Glu Val Pro Gly Glu Cys Cys Glu Lys Trp Ile Cys Gly Pro Asp
165         170         175

```

10

ES 2 384 932 T3

Glu Glu Asp Ser Leu Gly Gly Leu Thr Leu Ala Ala Tyr Arg Pro Glu
 180 185 190
 Ala Thr Leu Gly Val Glu Val Ser Asp Ser Ser Val Asn Cys Ile Glu
 195 200 205
 Gln Thr Thr Glu Trp Thr Ala Cys Ser Lys Ser Cys Gly Met Gly Phe
 210 215 220
 Ser Thr Arg Val Thr Asn Arg Asn Arg Gln Cys Glu Met Leu Lys Gln
 225 230 235 240
 Thr Arg Leu Cys Met Val Arg Pro Cys Glu Gln Glu Pro Glu Gln Pro
 245 250 255
 Thr Asp Lys Lys Gly Lys Lys Cys Leu Arg Thr Lys Lys Ser Leu Lys
 260 265 270
 Ala Ile His Leu Gln Phe Lys Asn Cys Thr Ser Leu His Thr Tyr Lys
 275 280 285
 Pro Arg Phe Cys Gly Val Cys Ser Asp Gly Arg Cys Cys Thr Pro His
 290 295 300
 Asn Thr Lys Thr Ile Gln Ala Glu Phe Gln Cys Ser Pro Gly Gln Ile
 305 310 315 320
 Val Lys Lys Pro Val Met Val Ile Gly Thr Cys Thr Cys His Thr Asn
 325 330 335
 Cys Pro Lys Asn Asn Glu Ala Phe Leu Gln Glu Leu Glu Leu Lys Thr
 340 345 350
 Thr Arg Gly Lys Met
 355

<210>3

<211> 216

5 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> fragmento de la proteína NOV

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(216)

<223>

15

<400> 3

cag cgc tgc cct ecc cag tgc ccg ggc cgg tgc cct gcg acg ccg ccg 48
 Gln Arg Cys Pro Pro Gln Cys Pro Gly Arg Cys Pro Ala Thr Pro Pro
 1 5 10 15

acc tgc gcc ccc ggg gtg cgc gcg gtg ctg gac ggc tgc tca tgc tgt 96
 Thr Cys Ala Pro Gly Val Arg Ala Val Leu Asp Gly Cys Ser Cys Cys
 20 25 30

ctg gtg tgt gcc cgc cag cgt ggc gag agc tgc tca gat ctg gag cca 144
 Leu Val Cys Ala Arg Gln Arg Gly Glu Ser Cys Ser Asp Leu Glu Pro
 35 40 45

tgc gac gag agc agt ggc ctc tac tgt gat cgc agc gcg gac ccc agc 192
 Cys Asp Glu Ser Ser Gly Leu Tyr Cys Asp Arg Ser Ala Asp Pro Ser
 50 55 60

aac cag act ggc atc tgc acg gcg 216
 Asn Gln Thr Gly Ile Cys Thr Ala
 65 70

20

<210>4

ES 2 384 932 T3

<211> 72
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

5 <220>
 <223> fragmento de la proteína NOV

<400> 4

```
Gln Arg Cys Pro Pro Gln Cys Pro Gly Arg Cys Pro Ala Thr Pro Pro
 1          5          10          15
Thr Cys Ala Pro Gly Val Arg Ala Val Leu Asp Gly Cys Ser Cys Cys
 20          25          30
Leu Val Cys Ala Arg Gln Arg Gly Glu Ser Cys Ser Asp Leu Glu Pro
 35          40          45
Cys Asp Glu Ser Ser Gly Leu Tyr Cys Asp Arg Ser Ala Asp Pro Ser
 50          55          60
Asn Gln Thr Gly Ile Cys Thr Ala
 65          70
```

10 <210>5
 <211> 201
 <212> ADN

15 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> fragmento de la proteína NOV

20 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(201)
 <223>

25 <400>5

```
gat aac tgt gtg ttc gat ggg gtc atc tac cgc agt gga gag aaa ttt      48
Asp Asn Cys Val Phe Asp Gly Val Ile Tyr Arg Ser Gly Glu Lys Phe
 1          5          10          15
cag cca agc tgc aaa ttc cag tgc acc tgc aga gat ggg cag att ggc      96
Gln Pro Ser Cys Lys Phe Gln Cys Thr Cys Arg Asp Gly Gln Ile Gly
 20          25          30
tgt gtg ccc cgc tgt cag ctg gat gtg cta ctg cct gag cct aac tgc      144
Cys Val Pro Arg Cys Gln Leu Asp Val Leu Leu Pro Glu Pro Asn Cys
 35          40          45
cca gct cca aga aaa gtt gag gtg cct gga gag tgc tgt gaa aag tgg      192
Pro Ala Pro Arg Lys Val Glu Val Pro Gly Glu Cys Glu Lys Trp
 50          55          60
atc tgt ggc
Ile Cys Gly
 65
```

30 <210>6
 <211> 67
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

35 <220>
 <223> fragmento de la proteína NOV

ES 2 384 932 T3

<400> 6

```

Asp Asn Cys Val Phe Asp Gly Val Ile Tyr Arg Ser Gly Glu Lys Phe
1          5          10          15
Gln Pro Ser Cys Lys Phe Gln Cys Thr Cys Arg Asp Gly Gln Ile Gly
20          25          30
Cys Val Pro Arg Cys Gln Leu Asp Val Leu Leu Pro Glu Pro Asn Cys
35          40          45
Pro Ala Pro Arg Lys Val Glu Val Pro Gly Glu Cys Cys Glu Lys Trp
50          55          60
Ile Cys Gly
65

```

5 <210>7
 <211> 135
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> fragmento de la proteína NOV

<220>
 <221> CDS
 15 <222> (1)..(135)
 <223>

<400> 7

```

tgc att gaa cag acc aca gag tgg aca gca tgc tcc aag agc tgt ggt      48
Cys Ile Glu Gln Thr Thr Glu Trp Thr Ala Cys Ser Lys Ser Cys Gly
1          5          10          15
atg ggg ttc tcc acc cgg gtc acc aat agg aac cgt caa tgt gag atg      96
Met Gly Phe Ser Thr Arg Val Thr Asn Arg Asn Arg Gln Cys Glu Met
20          25          30
ctg aaa cag act cgg ctc tgc atg gtg cgg ccc tgt gaa      135
Leu Lys Gln Thr Arg Leu Cys Met Val Arg Pro Cys Glu
35          40          45

```

20 <210>8
 <211> 45
 <212> PRT
 25 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> fragmento de la proteína NOV

30 <400> 8

```

Cys Ile Glu Gln Thr Thr Glu Trp Thr Ala Cys Ser Lys Ser Cys Gly
1          5          10          15
Met Gly Phe Ser Thr Arg Val Thr Asn Arg Asn Arg Gln Cys Glu Met
20          25          30
Leu Lys Gln Thr Arg Leu Cys Met Val Arg Pro Cys Glu
35          40          45

```

35 <210>9
 <211>225
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

ES 2 384 932 T3

<220>
<223> fragmento de la proteína NOV

5 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(225)
<223>

10 <400> 9

tgt ctc cgc acc aag aag tca ctc aaa gcc atc cac ctg cag ttc aag	48
Cys Leu Arg Thr Lys Lys Ser Leu Lys Ala Ile His Leu Gln Phe Lys	
1 5 10 15	
aac tgc acc agc ctg cac acc tac aag ccc agg ttc tgt ggg gtc tgc	96
Asn Cys Thr Ser Leu His Thr Tyr Lys Pro Arg Phe Cys Gly Val Cys	
20 25 30	
agt gat ggc cgc tgc tgc act ccc cac aat acc aaa acc atc cag gca	144
Ser Asp Gly Arg Cys Cys Thr Pro His Asn Thr Lys Thr Ile Gln Ala	
35 40 45	
gag ttt cag tgc tcc cca ggg caa ata gtc aag aag cca gtg atg gtc	192
Glu Phe Gln Cys Ser Pro Gly Gln Ile Val Lys Lys Pro Val Met Val	
50 55 60	
att ggg acc tgc acc tgt cac acc aac tgt cct	225
Ile Gly Thr Cys Thr Cys His Thr Asn Cys Pro	
65 70 75	

15 <210> 10
<211> 75
<212> PRT
<213> secuencia artificial

20 <220>
<223> fragmento de la proteína NOV

<400> 10

Cys Leu Arg Thr Lys Lys Ser Leu Lys Ala Ile His Leu Gln Phe Lys	
1 5 10 15	
Asn Cys Thr Ser Leu His Thr Tyr Lys Pro Arg Phe Cys Gly Val Cys	
20 25 30	
Ser Asp Gly Arg Cys Cys Thr Pro His Asn Thr Lys Thr Ile Gln Ala	
35 40 45	
Glu Phe Gln Cys Ser Pro Gly Gln Ile Val Lys Lys Pro Val Met Val	
50 55 60	
Ile Gly Thr Cys Thr Cys His Thr Asn Cys Pro	
65 70 75	

25 <210> 11
<211> 510
<212> ADN
<213> Homo sapiens

30 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(510)
<223>

35 <400> 11

ES 2 384 932 T3

gct tac agg cca gaa gcc acc cta gga gta gaa gtc tct gac tca agt	48
Ala Tyr Arg Pro Glu Ala Thr Leu Gly Val Glu Val Ser Asp Ser Ser	
1 5 10 15	
gtc aac tgc att gaa cag acc aca gag tgg aca gca tgc tcc aag agc	96
Val Asn Cys Ile Glu Gln Thr Thr Glu Trp Thr Ala Cys Ser Lys Ser	
20 25 30	
tgt ggt atg ggg ttc tcc acc cgg gtc acc aat agg aac cgt caa tgt	144
Cys Gly Met Gly Phe Ser Thr Arg Val Thr Asn Arg Asn Arg Gln Cys	
35 40 45	
gag atg ctg aaa cag act cgg ctc tgc atg gtg cgg ccc tgt gaa caa	192
Glu Met Leu Lys Gln Thr Arg Leu Cys Met Val Arg Pro Cys Glu Gln	
50 55 60	
gag cca gag cag cca aca gat aag aaa gga aaa aag tgt ctc cgc acc	240
Glu Pro Glu Gln Pro Thr Asp Lys Lys Gly Lys Lys Cys Leu Arg Thr	
65 70 75 80	
aag aag tca ctc aaa gcc atc cac ctg cag ttc aag aac tgc acc agc	288
Lys Lys Ser Leu Lys Ala Ile His Leu Gln Phe Lys Asn Cys Thr Ser	
85 90 95	
ctg cac acc tac aag ccc agg ttc tgt ggg gtc tgc agt gat ggc cgc	336
Leu His Thr Tyr Lys Pro Arg Phe Cys Gly Val Cys Ser Asp Gly Arg	
100 105 110	
tgc tgc act ccc cac aat acc aaa acc atc cag gca gag ttt cag tgc	384
Cys Cys Thr Pro His Asn Thr Lys Thr Ile Gln Ala Glu Phe Gln Cys	
115 120 125	
tcc cca ggg caa ata gtc aag aag cca gtg atg gtc att ggg acc tgc	432
Ser Pro Gly Gln Ile Val Lys Lys Pro Val Met Val Ile Gly Thr Cys	
130 135 140	
acc tgt cac acc aac tgt cct aag aac aat gag gcc ttc ctc cag gag	480
Thr Cys His Thr Asn Cys Pro Lys Asn Asn Glu Ala Phe Leu Gln Glu	
145 150 155 160	
ctg gag ctg aag act acc aga ggg aaa atg	510
Leu Glu Leu Lys Thr Thr Arg Gly Lys Met	
165 170	

- 5 <210> 12
- <211> 170
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 12

ES 2 384 932 T3

Ala Tyr Arg Pro Glu Ala Thr Leu Gly Val Glu Val Ser Asp Ser Ser
 1 5 10 15
 Val Asn Cys Ile Glu Gln Thr Thr Glu Trp Thr Ala Cys Ser Lys Ser
 20 25 30
 Cys Gly Met Gly Phe Ser Thr Arg Val Thr Asn Arg Asn Arg Gln Cys
 35 40 45
 Glu Met Leu Lys Gln Thr Arg Leu Cys Met Val Arg Pro Cys Glu Gln
 50 55 60
 Glu Pro Glu Gln Pro Thr Asp Lys Lys Gly Lys Lys Cys Leu Arg Thr
 65 70 75 80
 Lys Lys Ser Leu Lys Ala Ile His Leu Gln Phe Lys Asn Cys Thr Ser
 85 90 95
 Leu His Thr Tyr Lys Pro Arg Phe Cys Gly Val Cys Ser Asp Gly Arg
 100 105 110
 Cys Cys Thr Pro His Asn Thr Lys Thr Ile Gln Ala Glu Phe Gln Cys
 115 120 125
 Ser Pro Gly Gln Ile Val Lys Lys Pro Val Met Val Ile Gly Thr Cys
 130 135 140
 Thr Cys His Thr Asn Cys Pro Lys Asn Asn Glu Ala Phe Leu Gln Glu
 145 150 155 160
 Leu Glu Leu Lys Thr Thr Arg Gly Lys Met
 165 170

REIVINDICACIONES

1. Utilización:

5 - de una proteína, caracterizada porque está constituida por:

- * la proteína NOV, representada por la secuencia SEC ID nº 2, o
- * un fragmento de esta proteína, representado por la secuencia SEC ID nº 12,

10 - de una secuencia nucleotídica caracterizada porque comprende, o está constituida por, una secuencia nucleotídica que codifica:

- * o bien para la proteína NOV, tal como se ha definido anteriormente,
- * o bien para un fragmento de la proteína NOV, tal como se ha definido anteriormente,

15 correspondiendo dicha secuencia nucleotídica a la secuencia nucleotídica SEC ID nº 1 que codifica para la SEC ID nº 2, o a la secuencia SEC ID nº 11 que codifica para la SEC ID nº 12,

20 - de un anticuerpo anti-idiotípico de la proteína NOV representada por la secuencia SEC ID nº 2, imitando dicho anticuerpo las funciones de la proteína NOV reconociendo el VEGF,

para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento:

25 - de patologías que necesitan la inhibición de la proliferación endotelial, en el marco de las patologías siguientes: la degenerescencia macular relacionada con la edad; las retinopatías diabéticas, la poliartritis reumatoide, los angiomas, los angiosarcomas, en particular la enfermedad de Castelman y el sarcoma de Kaposi, o

30 - las patologías que necesitan la inhibición de la activación endotelial, en el marco de las patologías siguientes: el rechazo de aloinjerto y de xenoinjerto, las acrocianosis, las esclerodermias, o en el marco de la preparación de injertos entre la extracción y el trasplante.

2. Utilización según la reivindicación 1, de una proteína caracterizada porque está constituida por:

- 35
- * la proteína NOV, representada por la secuencia SEC ID nº 2, o
 - * un fragmento de esta proteína, representada por la secuencia SEC ID nº 12

para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento:

40

- * de patologías que necesitan la inhibición de la proliferación endotelial, en el marco de las patologías siguientes: la degenerescencia macular relacionada con la edad, las retinopatías diabéticas, la poliartritis reumatoide, los angiomas, los angiosarcomas, en particular la enfermedad de Castelman y el sarcoma de Kaposi, o

45

- * de patologías que necesitan la inhibición de la activación endotelial, en el marco de las patologías siguientes: el rechazo de aloinjerto y de xenoinjerto, las acrocianosis, las esclerodermias, o en el marco de la preparación de injertos entre la extracción y el trasplante.

3. Utilización según la reivindicación 2, de una proteína caracterizada porque está constituida por la proteína NOV, representada por la secuencia SEC ID nº 2.

50

4. Utilización según la reivindicación 2, de una proteína caracterizada porque está constituida por un fragmento de la proteína NOV, representada por la secuencia SEC ID nº 2, estando dicho fragmento representado por la secuencia SEC ID nº 12.

55

5. Utilización de una proteína caracterizada porque está constituida por un fragmento de la proteína NOV, estando dicho fragmento representado por la secuencia SEC ID nº 12, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de los cánceres.

6. Composición farmacéutica, caracterizada porque contiene a título de sustancia activa:

60

- una proteína caracterizada porque está constituida por un fragmento de la proteína NOV, representada por la secuencia SEC ID nº 2, estando dicho fragmento representado por la secuencia SEC ID nº 12,

- una secuencia nucleotídica, caracterizada porque comprende, o está constituida por, una secuencia nucleotídica que codifica:

65

- * o bien para la proteína NOV tal como se ha definido anteriormente,
- * o bien para un fragmento de la proteína NOV tal como se ha definido anteriormente,

5 correspondiendo dicha secuencia nucleotídica a la secuencia nucleotídica SEC ID nº 1 que codifica para la SEC ID nº 2, o a la secuencia SEC ID nº 11 que codifica para la SEC ID nº 12,

- un anticuerpo anti-idiotípico de la proteína NOV, representada por la secuencia SEC ID nº 2, imitando dicho anticuerpo las funciones de la proteína NOV reconociendo el VEGF,

10 en asociación con un vector farmacéuticamente aceptable.

15 7. Composición farmacéutica según la reivindicación 6, caracterizada porque contiene, a título de sustancia activa, una proteína caracterizada porque está constituida por un fragmento de la proteína NOV, representada por la secuencia SEC ID nº 2, estando dicho fragmento representado por la secuencia SEC ID nº 12, en asociación con un vector farmacéuticamente aceptable.

20 8. Utilización según las reivindicaciones 1 a 5, para la preparación de una composición según una de las reivindicaciones 6 a 7, destinada a ser administrada a razón de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 mg/kg/día.

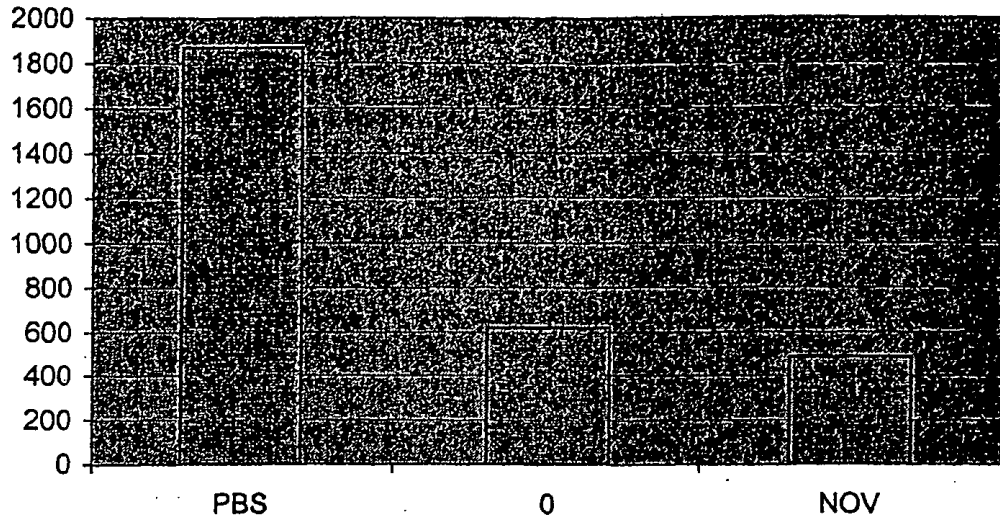


Figura 1

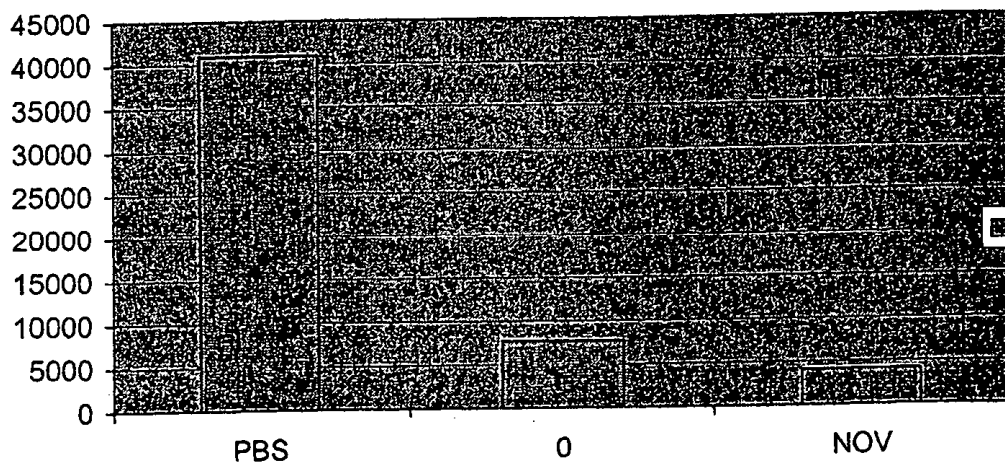


Figura 2

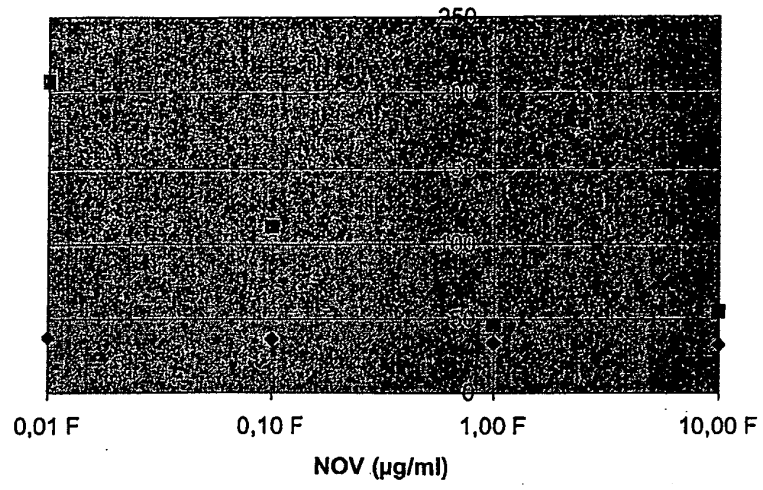


Figura 3

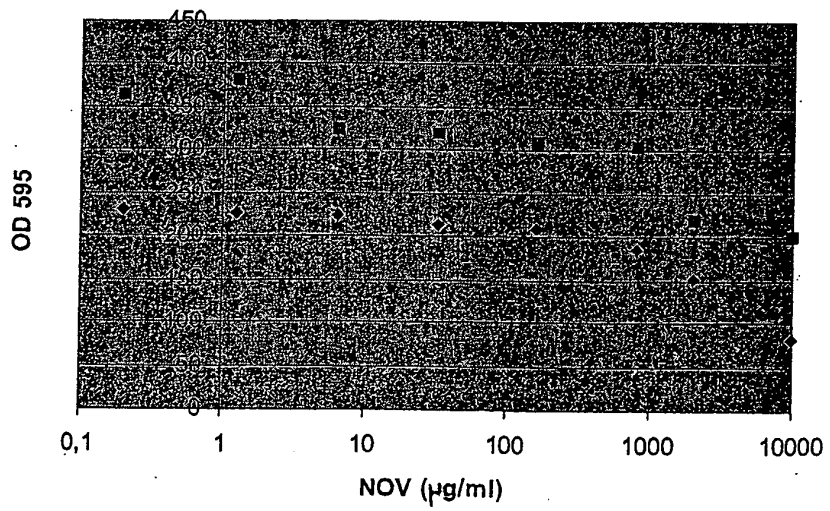
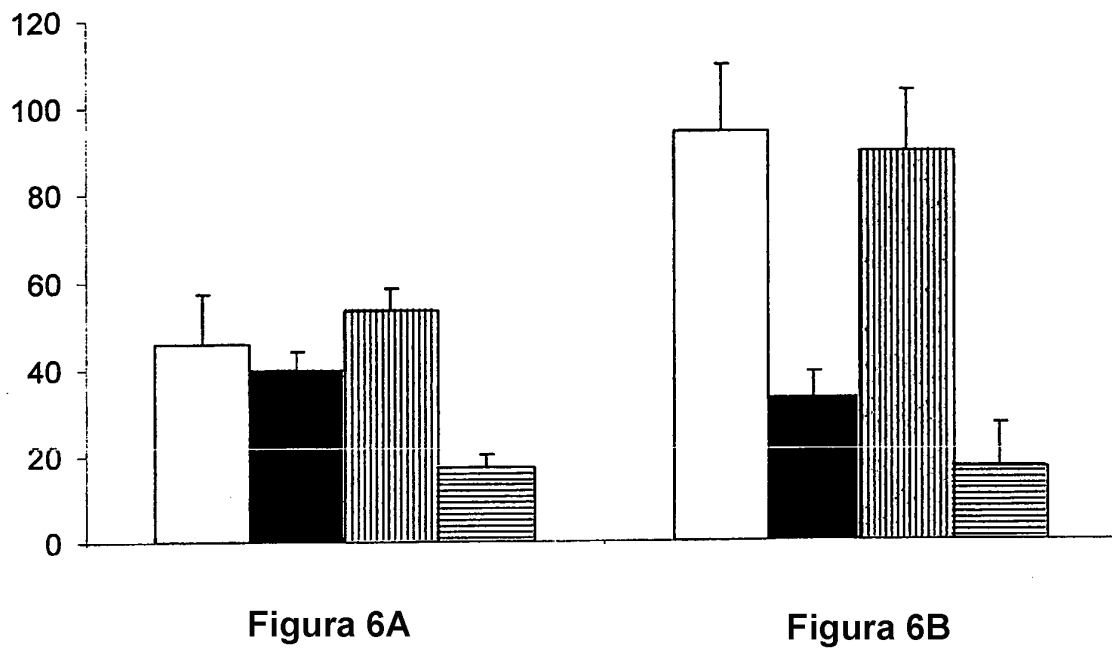


Figura 4



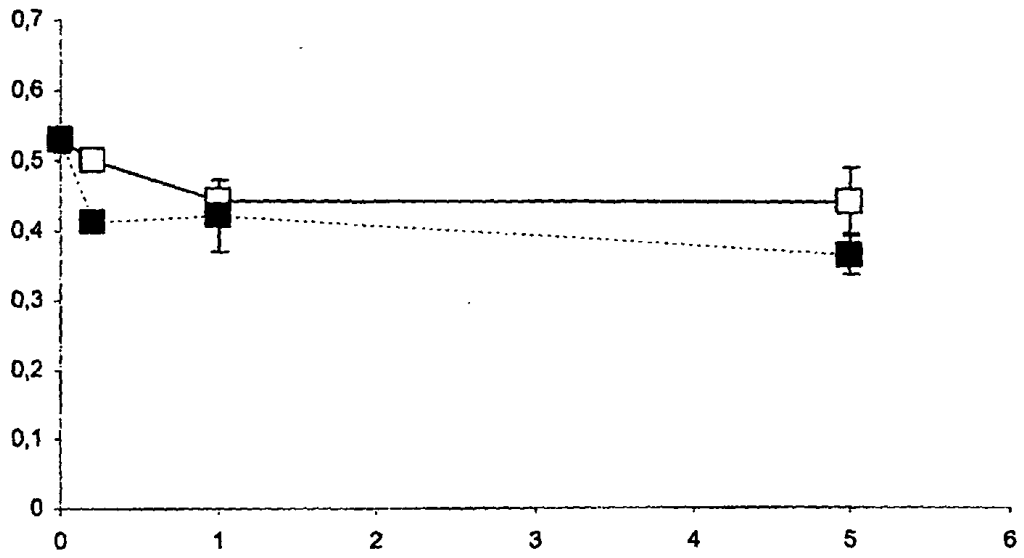


Figura 7A

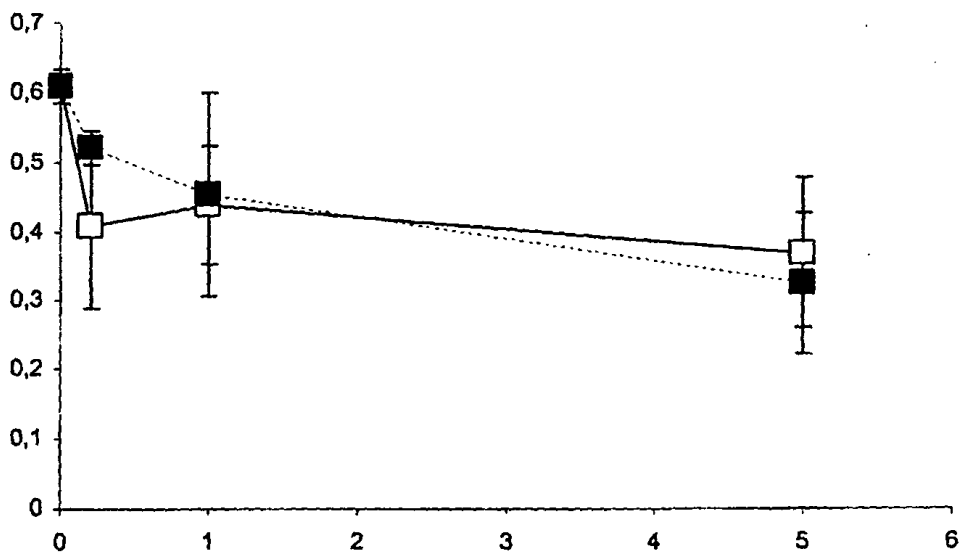


Figura 7B

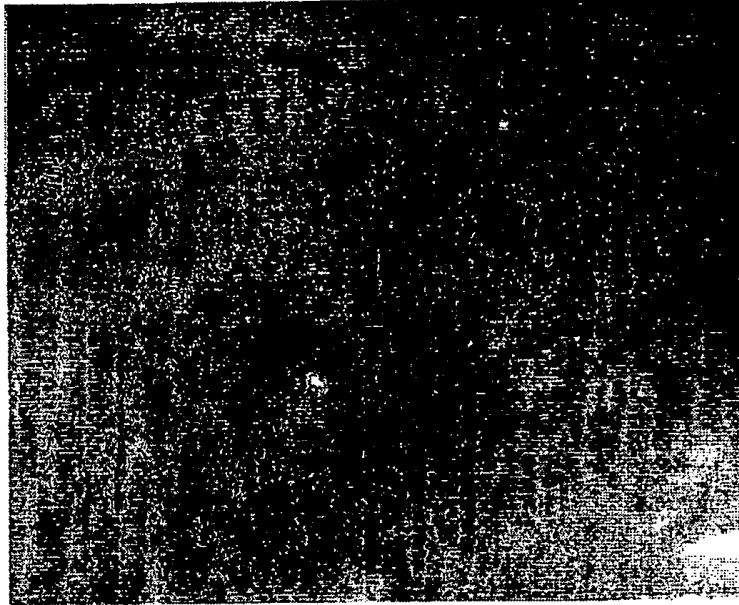


Figura 8A

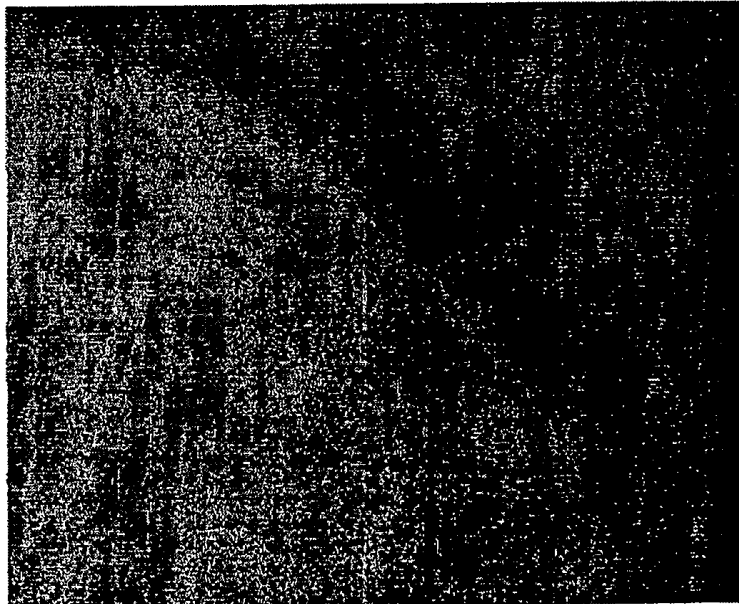


Figura 8B