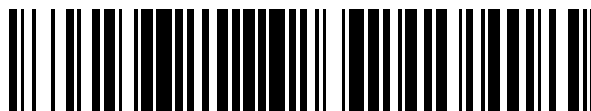


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 763**

51 Int. Cl.:
C07K 14/475 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03767862 .0**
96 Fecha de presentación: **29.10.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1556410**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.07.2005**

54 Título: **Fragmentos peptídicos del factor HARP que inhiben la angiogénesis**

30 Prioridad:
30.10.2002 FR 0213621

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2012

73 Titular/es:
**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS) (100.0%)
3, RUE MICHEL ANGE
75016 PARIS, FR**

72 Inventor/es:
**COURTY, JOSÉ;
BARRITAU, DENIS;
PIERROT, ISABELLE;
DELBE, JEAN y
MILHIET, PIERRE**

74 Agente/Representante:
CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 390 763 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

Fragmentos peptídicos del factor HARP que inhiben la angiogénesis.

5 La presente invención se refiere a unos fragmentos peptídicos de la proteína HARP que inhiben la angiogénesis.

La terapia actual del cáncer se basa en la radioterapia, la cirugía, a veces muy incapacitante y/o la utilización de fármacos anticancerosos que bloquean las mitosis y que pueden ser muy agresivos, limitando a veces sus usos. No existe actualmente ninguna terapia universal contra esta patología. El papel de la angiogénesis en el crecimiento tumoral ha constituido el objeto de intensas investigaciones y se admite ahora por toda la comunidad científica que el crecimiento tumoral no se puede realizar sin angiogénesis. Este mecanismo se define como un proceso dinámico inducido por un cierto número de factores angiogénicos de los cuales los principales son: el "vascular endothelial growth factor" (VEGF), el "fibroblast growth factor" (FGF) o el "heparin affin regulatory peptide" (HARP) que están en varios casos sobreexpresados por los tumores en sí. Puesto que un tumor no se puede desarrollar sin neovascularización, la supresión o la inhibición de los factores angiogénicos debe conducir a una regresión del crecimiento tumoral, sea cual sea el tipo de tumor. Hoy en día, varias compañías desarrollan en el tratamiento del cáncer o de las enfermedades proliferativas, una estrategia anti-angiogénesis basada por ejemplo o bien sobre unos inhibidores de factores angiogénicos (o de sus receptores cuando estos están identificados), o bien induciendo unas micro-trombosis vasculares utilizando la célula endotelial como anclaje de catalizadores de la trombosis, o también utilizando unos agentes peptídicos que inhiben la angiogénesis mediante unos mecanismos no siempre identificados. Estos enfoques no han desembocado todavía en resultados claros y parece que los inhibidores basados en el bloqueo de una sola vía de la angiogénesis inducen unos efectos rebotes agravantes. Estos resultados conducen actualmente a estas compañías a proponer unos cócteles de inhibidores que permiten esperar una destrucción radical y simultánea de los vasos y de las células tumorales.

El papel angiogénico del factor HARP se ha demostrado a través de un conjunto de experimentos realizados *in vivo* e *in vitro* (Papadimitriou *et al.* 2001; Papadimitriou *et al.*, 2000). Así, en un modelo *in vitro* en el que se inoculan unas células endoteliales sobre un gel de colágeno, se ha demostrado que la HARP es capaz de inducir a la formación de pseudo-capilares que imitan así las primeras etapas de la angiogénesis, es decir la activación de las células endoteliales y su migración a través de una matriz extracelular parcialmente destruida. Reforzando esta observación, un péptido sintético de 43 aminoácidos que corresponde a una parte del dominio C-terminal de la HARP es capaz de estimular la secreción del activador del plasminógeno por unas células endoteliales de aorta de buey (ABAE) y de inhibir la secreción de su inhibidor PAI-1 (Kojima *et al.*, 1995a; Kojima *et al.*, 1995b). Este activador induce a la división del plasminógeno en plasmina, una proteasa que desempeña un papel clave en la degradación de la matriz extracelular. La HARP comparte esta propiedad con otra proteína que se une a la heparina (Matsubara *et al.*, 1990): la proteína Midkina (MK) que presenta el 50% de homología de secuencia en aminoácidos con la que constituye una nueva familia de HBGF (Tsutsui *et al.*, 1991).

El papel desempeñado por la HARP en la angiogénesis tumoral se ha subrayado también por el equipo de Roy Bicknell. Así, la sobreexpresión de HARP en unas células de carcinoma mamario MCF7 inyectadas a unos ratones "atímicos" conlleva un aumento del tamaño del tumor con respecto a los obtenidos sin sobreexpresión. El aumento del tamaño del tumor está relacionado con la densidad vascular y con una multiplicación de las células endoteliales (Choudhuri *et al.*, 1997). La proliferación de las células endoteliales es otra etapa clave de la angiogénesis en la que la HARP podría desempeñar un papel crucial. En efecto, a partir de 1991, se ha demostrado que la HARP estimulaba la proliferación de las células endoteliales *in vitro* (Courty *et al.*, 1991). Esta actividad mitógena ha podido ser puesta en evidencia en otros modelos: HARP estimula *in vitro* la formación en agar blando de colonias de células epiteliales SW13 no tumorígenas (Fang *et al.*, 1992) y la sobreexpresión de su ADNc en las células NIH 3T3 (Chauhan *et al.*, 1993) o SW-13 (Fang *et al.*, 1992) induce a la formación de un tumor en el ratón "atímico". Este papel mitogénico está reforzado por la expresión de la molécula en numerosos cánceres. Utilizando unos ensayos de protección con ARNasa y/o la técnica de transferencia Northern, los ARNm de la HARP se han detectado en las líneas celulares procedentes de cánceres de pecho (T47 Dco, MDA-MB231, MDA-MB361, Hs-578T) (Fang *et al.*, 1992), de ovario (A1827, PA-1) (Riegel *et al.*, 1994), de próstata (PC-3) (Vacherot *et al.*, 1999a) y de pulmón (Jager *et al.*, 1997).

In vivo, en diferentes modelos tisulares, la localización de la HARP está asociada en particular a las células endoteliales de los capilares sanguíneos. Un ARNm de la proteína HARP se ha puesto en evidencia al nivel de las células endoteliales que pertenecen a los capilares sanguíneos de próstata y de glándulas mamarias humanas (Vacherot *et al.*, 1999a; Ledoux *et al.*, 1997). En el modelo uterino de rata, se ha puesto en evidencia asimismo un aumento del porcentaje de ARNm y de la proteína HARP asociada a la fase progestativa del ciclo. Este resultado se ha confirmado mediante la inyección de progesterona en unas ratas ovariectomizadas. La sobreexpresión inducida por la progesterona es detectable en las células endoteliales capilares del endometrio (Milhiet *et al.*, 1998). La presencia de la proteína HARP en la superficie de las células endoteliales se ha demostrado asimismo indirectamente durante inyecciones intravenosas de heparina en el ser humano (Novotny *et al.*, 1993). Recientemente, el grupo de Deuel ha puesto en evidencia un aumento de la expresión del ARNm de la HARP en los microvasos en desarrollo después de una isquemia cerebral en la rata (Yeh *et al.*, 1998). Los factores de crecimiento HARP y Midkina (MK) son unas moléculas que presentan el 50% de homología y que poseen unas propiedades

mitógenas sobre unas células epiteliales, fibroblásticas y endoteliales. La expresión de cada uno de éstos factores de crecimiento (ARNm, proteína) se ha puesto en evidencia en unos tumores humanos de origen variado (seno, pulmón, ovario, neuroblastoma, estómago, colon), lo cual sugiere su papel potencial durante la progresión tumoral. Pocos estudios clínicos han evaluado la coexpresión de HARP y de MK, y en particular el porcentaje sanguíneo de estas moléculas angiogénicas en unos pacientes portadores de tumores. Recientemente, se ha desarrollado una dosificación inmunológica para estas dos moléculas, basada en su afinidad con la heparina. La sensibilidad del método es de 80 pg/ml para la HARP y de 40 pg/ml para la MK (Stoica *et al.*, 2001).

La patente US nº 5.641.743 y la patente US nº 6.103.880 describen de manera general la proteína HARP y la utilización de esta proteína para estimular la angiogénesis.

La solicitud de patente FR 2 799 465 da a conocer un fragmento de HARP con actividad angiogénica.

Se ha demostrado en efecto que la actividad angiogénica de HARP se encontraba a través de un péptido más pequeño. Una secuencia consensual de 18 aminoácidos resultante de la secuencia peptídica de HARP pero que también se encuentra sobre un gran número de factores angiogénicos, posee así por sí misma una actividad angiogénica.

Como la mayoría de los factores de crecimiento, el mecanismo de acción de HARP pasa por una interacción con un receptor membranario con actividad tirosina-quinasa de alta afinidad ($K_D = 50 \text{ pM}$) denominado "anaplastic lymphoma kinase" o ALK (Stoica *et al.*, 2001).

Además, la actividad biológica de HARP, como la mayoría de los HBGF, depende también de su interacción con unos glicoaminoglicanos o GAG, de tipo heparanos o condroitina sulfatos (Vacherot *et al.*, 1999b).

Así, la actividad mitógena de la HARP está potencializada en presencia de heparina, de heparano sulfato y de condroitina sulfato de tipo A y B. Un tratamiento celular con heparinasa invalida la actividad mitógena de la HARP. Esta actividad puede entonces ser restaurada en presencia de heparina. Un estudio que se basa en las relaciones entre la estructura y la función de HARP sugirió que la parte C-terminal de HARP que corresponde a los residuos de aminoácidos 111-136 (numeración que hace referencia a la forma HARP₁₃₆) está directamente implicada en la inducción de la actividad mitógena (Bernard-Pierrot *et al.*, 2001) y en su interacción con el receptor ALK. Por otra parte, se ha establecido que el péptido 111-136 no es ni mitógeno, ni angiogénico y que la molécula HARP cuyos aminoácidos 111-136 han sido eliminados inhibe específicamente la actividad biológica de HARP presentando unos efectos dominantes negativos con respecto a HARP (Bernard-Pierrot *et al.*, 2002).

Los inventores han descubierto ahora de manera sorprendente que el factor angiogénico HARP contiene unos fragmentos peptídicos capaces de inhibir la angiogénesis, así como el crecimiento tumoral.

Se trata de la totalidad o parte de las secuencias de aminoácidos 13-39 y 65-97 localizados en los dominios en hoja beta de HARP.

Estos fragmentos son por lo tanto particularmente interesantes para inhibir la angiogénesis y el crecimiento tumoral y pueden, por consiguiente, ser utilizados en el tratamiento de los desórdenes proliferativos tales como el cáncer, o unas patologías para las cuales se observa una angiogénesis excesiva, a saber por ejemplo la retinopatía diabética.

Según un modo de realización preferido de la invención, se propone asociar uno y/o otro de estos péptidos a un péptido que corresponde en su totalidad o en parte a la secuencia 111-136 de HARP. Esta asociación ofrece la ventaja de evitar el efecto "rebote" observado en las demás técnicas de inhibición de ciertos factores angiogénicos. En efecto, parece que la inhibición *in vivo* de un factor angiogénico es compensada por la activación de otro factor angiogénico.

En la presente invención, los péptidos 13-39 o 65-97 actúan sobre los receptores GAG, que son unos receptores de baja afinidad que inhiben la actividad angiogénica de HARP, mientras que el péptido 111-136 actúa sobre el receptor ALK, de alta afinidad.

El bloqueo de los sitios de altas afinidades de HARP, así como los de bajas afinidades comunes a otros factores angiogénicos permite una terapéutica particularmente eficaz en el tratamiento de las patologías asociadas a un fenómeno de angiogénesis.

El enfoque terapéutico propuesto consiste en una administración de péptidos o una administración de ácidos nucleicos que codifican para estos péptidos.

La invención está definida por las reivindicaciones.

El factor HARP y sus fragmentos

La presente invención se refiere a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre:

- 5 - la secuencia 13-39 del factor HARP (residuos 13 a 39 de SEC ID nº 1); y
 - la secuencia 65-97 del factor HARP (SEC ID nº 3).

10 La "heparine affin regulatory peptide" o HARP (Courty *et al.*, 1991) también denominada "pleiotrophin" (Wellstein *et al.*, 1992) o "heparin binding-growth associated molecule" o HB-GAM (Rauvala *et al.*, 1989) pertenece a la familia de los "heparin binding growth factors" (HBGF). La secuencia peptídica humana y el gen humano correspondiente son accesibles en la base de datos (Genbank nº X52946).

15 La proteína HARP se sintetiza en forma de un precursor de 168 aminoácidos que posee dos sitios de división por la señal peptidasa que termina en una proteína madura de 136 o 139 aminoácidos (HARP₁₃₆ o HARP₁₃₉). Las formas maduras HARP₁₃₆ o HARP₁₃₉ poseen las mismas actividades biológicas *in vitro*, sin embargo la actividad específica de inducción de la proliferación celular de la forma HARP₁₃₉ es mejor que la observada para la forma HARP₁₃₆ (Bernard Pierrot *et al.*, 2001).

20 La numeración de los aminoácidos se proporciona en función de la proteína HARP de 136 aminoácidos.

La secuencia peptídica humana de HARP₁₃₆ está asimismo presentada en la secuencia SEC ID nº 1.

25 En el contexto de la presente invención, la proteína HARP o sus fragmentos hace referencia a la proteína humana o sus fragmentos, pero también a cualquier variante de la proteína en otras especies, en particular en unos mamíferos de tipo bovinos, roedores, etc. Así, están disponibles las secuencias de ratones (Genbank nº AK017768 o NM 008973), rata (Genbank nº NM017066), buey (Genbank nº X52945). Son conocidas asimismo unas variantes en Zebrafish (Genbank nº NM131070) y en la drosófila (proteína miple Genbank nº NM 138178).

30 Se ha puesto en evidencia que unas unidades de homología con la trombospondina de tipo TSR-1 (thrombospondin repeat type 1), presentes en los dominios en hoja beta de HARP, en particular al nivel de los aminoácidos contenidos en los dos péptidos 13-39 y 65-97, están implicadas en la fijación de la HARP a la heparina (Kilpelainen *et al.*, 2000). Estos péptidos se unen realmente a los receptores de baja afinidad de tipo GAG.

35 De manera preferida, los fragmentos 13-39 y 65-97 o 111-136 son los fragmentos tales como los numerados en la secuencia SEC ID nº 1, a saber las secuencias:

- 40 13-39: residuos 13 a 39 de SEC ID nº1
 65-97: AECKYQFQAWGECDLNTALKTRTGSLKRALHNA (SEC ID nº 3)
 111-136: KLTKPKPOAESK KKKKEGKKCEKMLD (SEC ID nº 4).

Cualquier péptido "variante", "homólogo" o "derivado" de estos péptidos, que presenta la misma actividad biológica que estos péptidos, forma parte asimismo de la invención.

45 Por "actividad biológica" se entiende en la presente memoria en particular una actividad inhibidora de la angiogénesis. La actividad antiangiogénica de un compuesto puede fácilmente ser evaluada *in vitro* o *in vivo*, por el experto en la materia, en particular por medio de los ensayos siguientes:

- 50 - *in vitro*, mediante la puesta en contacto de los péptidos con unas células endoteliales sobre el colágeno, y observación de la inhibición de la formación de capilares;
 - *in vivo*, mediante inyección de matriz de tipo Matrigel[®], y observación de la inhibición de la formación de capilares dentro de la matriz;
 - o también depositando el péptido sobre una membrana corioalantoidiana de un huevo (de gallina por ejemplo), y observando el efecto de este péptido sobre la vascularización de esta membrana.

55 La observación de las células endoteliales (y por lo tanto de los capilares) se puede realizar marcando específicamente estas células, por ejemplo mediante CD131 o lectina.

60 La actividad biológica de los péptidos 13-39 y 65-97 hace asimismo referencia a la capacidad de éstos para fijarse a los GAG de tipo heparanos o condroitina sulfatos. La actividad biológica del péptido 111-136 hace por otra parte referencia a la capacidad de éste para fijarse al receptor ALK.

65 Los péptidos "variantes", "homólogos" o "derivados" están definidos como que comprenden las secuencias por lo menos el 80% idénticas, preferentemente por lo menos el 90% idénticas, incluso por lo menos el 95% idénticas, de la secuencia de referencia.

Estos péptidos se pueden definir asimismo como que comprenden las secuencias codificadas por una secuencia de ácido nucleico que se hibrida con la secuencia de referencia o su secuencia complementaria, en unas condiciones rigurosas de hibridación.

5 El término "similares" se refiere al parecido perfecto o identidad entre los aminoácidos comparados, pero también al parecido no perfecto que se califica de similitud. Esta búsqueda de similitudes en una secuencia polipeptídica tiene en cuenta las sustituciones conservativas que son unas sustituciones de aminoácidos de misma clase, tales como unas sustituciones de aminoácidos en las cadenas laterales no cargadas (tales como la asparagina, la glutamina, la serina la treonina y la tirosina), de aminoácidos en las cadenas laterales básicas (tales como la lisina, la arginina y la histidina), de aminoácidos en las cadenas laterales ácidas (tales como el ácido aspártico y el ácido glutámico); de aminoácidos en cadenas laterales apolares (tales como la glicina, la alanina, la valina, la leucina, la isoleucina, la prolina, la fenilalanina, la metionina, el triptófano y la cisteína).

15 Más generalmente, por "secuencia de aminoácidos variante, homóloga o derivada" se entiende por lo tanto cualquier secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de referencia por sustitución, eliminación y/o inserción de un aminoácido o de varios aminoácidos, preferentemente de un número reducido de aminoácidos, en particular por sustitución de aminoácidos naturales por unos aminoácidos no naturales o pseudo-aminoácidos en unas posiciones tales que estas modificaciones no afectan significativamente a la actividad biológica de los péptidos.

20 La homología se determina generalmente utilizando un programa de análisis de secuencia (por ejemplo, Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705). Unas secuencias de aminoácidos similares están alineadas para obtener el máximo grado de homología (es decir identidad o similitud, como se ha definido anteriormente). Para ello, puede ser necesario introducir de manera artificial unos espacios ("gaps") en la secuencia. Una vez realizada la alineación óptima, el grado de homología se establece mediante grabación de todas las posiciones para las cuales los aminoácidos de las dos secuencias comparadas son idénticos, con respecto al número total de posiciones.

30 Preferentemente, los péptidos "variantes", "homólogos" o "derivados" son de la misma longitud que las secuencias de referencia.

El fragmento que consiste en los residuos 13 a 39 de SEC ID nº 1 y el fragmento SEC ID nº 3 que contiene respectivamente la unidad 18-23 WQWSVC o la unidad 71-77 FQAWGEC son particularmente interesantes.

35 De acuerdo con la invención, los péptidos pueden ser por otra parte modificados químicamente o enzimáticamente para mejorar su estabilidad o su biodisponibilidad.

De manera no limitativa, se puede por ejemplo modificar uno o varios de los aminoácidos lisina (K) de los péptidos, en particular mediante:

- 40
- amidación: esta modificación es simple de realizar, siendo la carga positiva de la lisina sustituida por unos grupos hidrófobos (por ejemplo acetilo o fenilacetilo);
 - 45 - aminación: mediante formación de amidas secundarias a partir de la amina primaria $R = (CH_2)_4-NH_3^+$, por ejemplo formando unos grupos N-metilo, N-alilo o N-bencilo;
 - o también mediante formación de los grupos N-óxido, N-nitroso, N-dialquilfosforilo, N-sulfenilo o N-glicósido.

50 Se puede, por otra parte o alternativamente, modificar asimismo uno o varios aminoácidos treonina (T) y/o serina (S) de los péptidos, en particular introduciendo al nivel del grupo OH de la cadena lateral de la treonina y/o de la serina, un grupo éster o éter. La esterificación, operación simple, puede ser realizada con la ayuda de un ácido carboxílico, de un anhídrido, mediante puentes, etc., para formar por ejemplo unos acetatos o unos benzoatos. La eterificación, que da unos compuestos más estables, puede ser efectuada con la ayuda de un alcohol, de un halogenuro, etc., para formar, por ejemplo, un metiléter o un O-glicósido.

55 Se puede asimismo, por otra parte o alternativamente, modificar uno o varios aminoácidos glutamina (Q), por ejemplo por amidación, formando unas aminas secundarias o terciarias, en particular con unos grupos de tipo metilo, etilo, funcionalizados o no.

60 Se puede asimismo, por otra parte o alternativamente, modificar uno o varios aminoácidos glutamato (E) y/o aspartato (D), por ejemplo:

- 65
- mediante esterificación, para formar unos metilésteres sustituidos o no, unos etilésteres, bencilésteres, unos tioles (ésteres activados), etc.,
 - mediante amidación, en particular para formar unos grupos N,N-dimetilo, nitroanilidas, pirrolidinilos, etc.

Por el contrario, es preferible no modificar los aminoácidos prolina, que participan en la estructura secundaria de los péptidos, sabiendo además que los aminoácidos G, A y M no ofrecen generalmente ninguna posibilidad de modificaciones que serían manifiestamente interesantes.

5

Producción de los péptidos

Los polipéptidos útiles en la presente invención pueden ser sintetizados mediante cualquier método bien conocido por el experto en la materia. El péptido de la invención se puede sintetizar por ejemplo mediante las técnicas de química de síntesis, tales como la síntesis de tipo Merrifield que es ventajosa por razones de pureza, de especificidad antigénica, de ausencia de productos secundarios no deseados y por su facilidad de producción.

10

Un péptido recombinante puede asimismo ser producido mediante un procedimiento en el que un vector que contiene un ácido nucleico que codifica para el péptido es transferido a una célula hospedante que se cultiva en unas condiciones que permiten la expresión del péptido correspondiente.

15

A continuación, el péptido producido puede ser recuperado y purificado.

Los procedimientos de purificación utilizados son conocidos por el experto en la materia. El péptido recombinante obtenido puede ser purificado a partir de lisados y extractos celulares, del sobrenadante del medio de cultivo, mediante unos métodos utilizados individualmente o en combinación, tales como el fraccionamiento, los métodos de cromatografía, las técnicas de inmunoafinidad con la ayuda de anticuerpos mono- o policlonales específicos, etc.

20

El ácido nucleico útil para la producción de péptido recombinante puede presentar en particular las secuencias siguientes:

25

- secuencia que codifica para el péptido 13-39 (SEC ID nº 5)
- secuencia que codifica para el péptido 65-97 (SEC ID nº 6)
- secuencia que codifica para el péptido 111-136 (SEC ID nº 7)

30

Los ácidos nucleicos que codifican para unos péptidos "variantes", "homólogos" o "derivados" de los péptidos de HARP descritos anteriormente, forman parte asimismo de la invención.

Estos ácidos nucleicos pueden ser definidos como que comprenden:

35

- i) unas secuencias similares a por lo menos el 70%, preferentemente por lo menos el 80%, preferentemente por lo menos el 90%, incluso por lo menos el 95% de la secuencia SEC ID nº 5, nº 6 o nº 7; o
- ii) unas secuencias que se hibridan con la secuencia SEC ID nº 5, nº 6 o nº 7, o su secuencia complementaria, en unas condiciones rigurosas de hibridación, o
- iii) unas secuencias que codifican para el péptido de referencia tal como se ha definido anteriormente.

40

De manera preferida, dicha secuencia nucleotídica homóloga se hibrida específicamente a las secuencias complementarias de la secuencia SEC ID nº 5, nº 6 o nº 7, en unas condiciones rigurosas. Los parámetros que definen las condiciones de rigurosidad dependen de la temperatura a la que el 50% de las hebras emparejadas se separan (T_m).

45

Para las secuencias que comprenden más de 30 bases, T_m se define mediante la relación: $T_m = 81,5 + 0,41(\%G+C) + 16,6 \log(\text{concentración en cationes}) - 0,63(\% \text{ de formamida}) - (600/\text{número de bases})$ (Sambrook *et al.*, 1989).

50

Para las secuencias de longitud inferior a 30 bases, T_m se define mediante la relación: $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$.

En unas condiciones de rigurosidad apropiadas, a las que las secuencias específicas no se hibridan, la temperatura de hibridación puede ser preferentemente de 5 a 10°C por debajo de T_m, y los tampones de hibridación utilizados son preferentemente unas disoluciones de fuerza iónica elevada, tal como una disolución 6xSSC por ejemplo.

55

El término "secuencias similares" utilizado anteriormente se refiere al parecido perfecto o identidad entre los nucleótidos comparados pero también al parecido no perfecto que se califica de similitud. Esta búsqueda de similitudes en las secuencias nucleicas distingue por ejemplo las purinas y las pirimidinas.

60

Una secuencia nucleotídica homóloga incluye por lo tanto cualquier secuencia nucleotídica que difiere de la secuencia SEC ID nº 5, nº 6 o nº 7, por mutación, inserción, eliminación o sustitución de una o varias bases, o mediante la degeneración del código genético, siempre y cuando codifique para un péptido que presenta la actividad biológica de los fragmentos de HARP a los que se refieren.

65

La secuencia de ácido nucleico de interés puede ser insertada en un vector de expresión, en el que se une de manera operativa a uno o unos elementos que permiten su expresión o la regulación de su expresión, tales como en particular unos promotores, activadores y/o terminadores de transcripción.

5 Las señales que controlan la expresión de las secuencias nucleotídicas (promotores, activadores, secuencias de terminación, etc.) se seleccionan en función del hospedante celular utilizado. Para ello, las secuencias nucleotídicas según la invención se pueden insertar en unos vectores de replicación autónoma dentro del hospedante seleccionado, o de los vectores integradores del hospedante seleccionado. Dichos vectores se prepararán según los métodos utilizados habitualmente por el experto en la materia, y los clones resultantes pueden ser introducidos en un hospedante apropiado mediante unos métodos estándares, tales como, por ejemplo, la electroporación o la precipitación con fosfato de calcio.

10 Los vectores de clonación y/o de expresión tales como se han descrito anteriormente, que contienen una secuencia nucleotídica definida según la invención se dan a conocer mediante la presente invención.

15 La invención tiene además como objeto las células hospedantes transfectadas, de manera transitoria o estable, por estos vectores de expresión. Estas células se pueden obtener mediante la introducción en unas células hospedantes, procariotas o eucariotas, de una secuencia nucleotídica insertada en un vector tal como se ha definido anteriormente, y después el cultivo de dichas células en unas condiciones que permiten la replicación y/o la expresión de la secuencia nucleotídica transfectada.

20 Unos ejemplos de células hospedantes incluyen en particular unas células de mamíferos, tales como las células COS-7, 293, MDCK, unas células de insectos tales como las células SF9, unas bacterias tales como *E. coli* y unas cepas de levaduras tales como L40 e Y90.

25 Terapia génica

La presente invención da a conocer la aplicación de una terapia génica. Se trata de administrar a un paciente un ácido nucleico que codifica para el o los péptidos de interés, en unas condiciones tales que el o los péptidos están expresados *in vivo* por las células del paciente en las que se ha transferido el ácido nucleico.

30 El ácido nucleico administrado comprende una secuencia nucleotídica tal como se ha definido anteriormente, en la parte "producción de los péptidos".

35 Dicho ácido nucleico puede estar en particular en forma de un vector de ADN, por ejemplo un vector plasmídico. Se puede administrar uno o varios vectores, pudiendo cada vector contener una o varias secuencias que codifican para por lo menos uno de los péptidos de interés, a saber el péptido 13-39, 65-97 o 111-136.

40 Según un modo de realización preferido, se utiliza un vector que contiene una secuencia que codifica para el péptido 13-39, otro vector que contiene una secuencia que codifica para el péptido 65-97 y por último, eventualmente, otro vector que comprende una secuencia que codifica para el péptido 111-136.

45 El o los vectores de ADN pueden ser introducidos *in vivo* mediante cualquier técnica conocida por el experto en la materia. En particular, es posible introducir el vector de ADN *in vivo* en una forma desnuda, es decir sin la ayuda de ningún vehículo o sistema que facilitaría la transfección del vector en las células (documento EP 465 529).

50 Se puede utilizar asimismo un cañón de genes, por ejemplo depositando el ADN en la superficie de partículas "de oro" y proyectando ésta de manera que el ADN penetre a través de la piel de un paciente (Tang *et al.*, 1992). Son posibles asimismo unas inyecciones por medio de un gel líquido para transfectar al mismo tiempo la piel, el músculo, los tejidos grasos y el tejido mamario (Furth *et al.*, 1992; Robinson *et al.*, 1997).

Unas técnicas de microinyección, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, formulaciones con la ayuda de nanocápsulas o de liposomas son otras técnicas disponibles.

55 Unas nanopartículas de polialquilcianoalcrilato biodegradables son particularmente ventajosas. En el caso de liposomas, la utilización de lípidos catiónicos favorece la encapsulación de los ácidos nucleicos que están cargados negativamente, y facilita la fusión con las membranas celulares cargadas negativamente.

60 De manera alternativa, el vector puede estar en forma de un virus recombinante que comprende, insertada en su genoma, una secuencia de ácido nucleico que codifica para el o los péptidos.

El vector viral se puede seleccionar preferentemente de entre un adenovirus, un retrovirus, en particular un lentivirus, así como un virus adeno-asociado (AAV), un virus del herpes, un citomegalovirus (CMV), un virus de la viruela, etc.

65 Unos vectores lentivirus se han descrito por ejemplo por Firat *et al.*, (2002).

De manera ventajosa, el virus recombinante es un virus defectivo. El término "virus defectivo" designa un virus incapaz de replicarse en una célula diana. Generalmente, el genoma de los virus defectivos está desprovisto de por lo menos las secuencias necesarias para la replicación de dicho virus en la célula infectada. Estas regiones pueden ser o bien eliminadas, o bien convertidas en funcionales o también sustituidas por otras secuencias y en particular por el ácido nucleico que codifica para el péptido de interés. Sin embargo, preferentemente, el virus defectivo conserva a pesar de todo las secuencias de su genoma que son necesarias para la encapsulación de las partículas virales.

Una administración diana de genes está por ejemplo descrita en la solicitud WO 95/28494.

Patologías contempladas

Los péptidos de la invención presentan unas propiedades de inhibición de la angiogénesis.

Para ello, estos péptidos o los ácidos nucleicos que expresan estos péptidos son particularmente útiles para el tratamiento de diversas patologías asociadas a una angiogénesis o que hacen intervenir unos factores angiogénicos.

Por "tratamiento" se entiende un tratamiento a título curativo (que pretende por lo menos aliviar o detener el desarrollo de la patología) o profiláctico (que pretende reducir el riesgo de aparición de la patología).

Las patologías contempladas incluyen, pero no se limitan a:

- los desórdenes proliferativos. Se entiende en este caso cualquier proliferación anormal de células, ya sea benigna o maligna. Estos tumores incluyen los melanomas, los carcinomas, los sarcomas, el rhabdomyosarcoma, el retinoblastoma, el neuroblastoma, el osteosarcoma. Entre los tumores sólidos, se pueden citar en particular los tumores (primitivos o no) mamarios, ováricos, pulmonares, del cuello uterino, del tracto digestivo, en particular del colon, del sistema urológico, del hígado, el páncreas, de los huesos. Los tumores no sólidos están también contemplados, a saber en particular las leucemias o los linfomas.

Los desórdenes proliferativos pueden ser tratados en cualquier etapa de la proliferación. Los péptidos o los ácidos nucleicos de la invención son en particular útiles para luchar contra el desarrollo de metástasis tumorales. Entre los tumores benignos, se pueden citar por último en particular los hemangiomas y los adenomas hepatocelulares.

El efecto terapéutico anti-angiogénico de los péptidos de la invención se materializa en estas aplicaciones en particular por un efecto de inhibición del crecimiento tumoral.

- las lesiones oculares, que incluyen en particular unas patologías de la retina, tales como la retinopatía diabética, la degeneración macular, la oclusión de la vena o de la arteria renal, el glaucoma, etc. Los péptidos o ácidos nucleicos de la invención también pueden ser útiles para tratar unas lesiones oculares que pueden ser la consecuencia de un acto de cirugía reparadora, como el injerto de córnea.
- la poliartritis reumatoide, que es una enfermedad inflamatoria asociada a una intensa angiogénesis (Jackson *et al.*, 1988).
- y las enfermedades de la piel como la psoriasis.

Los péptidos de la invención pueden ser útiles asimismo como compuestos abortivos, para el control de los nacimientos, bloqueando la angiogénesis uterina y por lo tanto la implantación del embrión.

Composiciones farmacéuticas

Un objeto de la invención es por lo tanto una composición farmacéutica que comprende, como principio activo, por lo menos un péptido 13-39 o 65-97 de HARP, o un péptido derivado de uno de éstos con uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables.

Otro objeto de la invención es una composición farmacéutica que comprende, como principio activo, un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica para por lo menos un péptido 13-39 o 65-97 de HARP, o un péptido derivado de uno de éstos, unida de manera operativa a uno o más elementos que permiten la expresión del péptido o la regulación de su expresión, con uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables.

Se entiende que la secuencia está eventualmente unida de manera operativa a uno o más elementos que permiten la expresión del péptido o la regulación de su expresión.

Por "excipiente" o "vehículo farmacéuticamente aceptable" se entiende cualquier disolvente, medio de dispersión, agentes que retrasan la absorción, etc., que no producen ninguna reacción secundaria, por ejemplo alérgica, en el

ser humano o en el animal.

Según un modo de realización preferido de la invención, por lo menos unos de los péptidos 13-39 o 65-97, o de sus péptidos derivados, está asociado al péptido 111-136 de HARP o a un péptido derivado.

La invención proporciona por lo tanto también una composición farmacéutica que comprende por lo menos un péptido 13-39 o 65-97 de HARP, o un péptido derivado de uno de éstos, en asociación con un péptido 111-136 de HARP o un péptido derivado, en presencia de uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables.

Una composición farmacéutica preferida comprende:

- el péptido que consiste en los residuos 13-39 de SEC ID nº 1;
- el péptido 65-97 de secuencia SEC ID nº 3; y
- el péptido 111-136 de secuencia SEC ID nº 4.

De manera alternativa o combinada, la invención proporciona asimismo una composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica para un péptido 13-39 o 65-97 de HARP o un péptido derivado de uno de éstos, estando la secuencia unida de manera operativa a uno o varios elemento(s) que permiten su expresión, en asociación con un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica para un péptido 111-136 de HARP o un péptido derivado, en presencia de uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables.

Se entiende que la o las secuencia(s) está(n) eventualmente unida(s) de manera operativa a uno o varios elemento(s) que permite(n) la expresión del o de los péptido(s) o la regulación de su o sus expresión(es).

Una composición preferida comprende:

- un ácido nucleico que codifica para el péptido que consiste en los residuos 13-97 de SEC ID nº 1;
- un ácido nucleico que codifica para el péptido 65-97 de SEC ID nº 3;
- un ácido nucleico que codifica para el péptido 111-136 de SEC ID nº 4.

Los ácidos nucleicos pueden ser llevados por un vector único o estar en forma de vectores separados.

Otro modo de realización de la invención incluye la administración esencialmente simultánea de composiciones separadas que comprenden por un lado por lo menos un péptido 13-39 o 65-97 de HARP, o un péptido derivado de uno de éstos, o un ácido nucleico que codifica para uno de éstos péptidos y, por otro lado, un péptido 111-136 de HARP o un péptido derivado o un ácido nucleico que codifica para estos péptidos.

La administración se puede realizar asimismo de manera secuencial, por medio de composiciones separadas que comprenden por un lado por lo menos un péptido 13-39 o 65-97 de HARP, o un péptido derivado de uno de éstos, o también un ácido nucleico que codifica para uno de éstos péptidos y, por otro lado un péptido 111-136 de HARP o un péptido derivado o un ácido nucleico que codifica para estos péptidos.

Por lo menos un péptido 13-39 o 65-97 de HARP, o un péptido derivado de uno de éstos o también un ácido nucleico que codifica para uno de éstos péptidos, y un péptido 111-136 de HARP o un péptido o un ácido nucleico que codifica para estos péptidos, pueden por lo tanto ser individualmente administrados en forma farmacéuticamente aceptable.

La posología depende naturalmente del activo considerado, del modo de administración, de la indicación terapéutica, de la edad del paciente y de su estado.

La dosis de péptido es preferentemente de 0,1 a 250 mg/kg por día, preferentemente de 1 a 100 mg/kg por día.

La dosis unitaria del compuesto de fórmula (I) comprende preferentemente de 12,5 a 200 mg de este compuesto.

Cuando las composiciones farmacéuticas comprenden unos ácidos nucleicos, se adaptan asimismo las dosis de ácido nucleico (secuencia o vector) a administrar, en particular en función del modo de administración, de la patología diana así como de la duración del tratamiento. Generalmente, cuando se utilizan unos virus recombinantes, éstos se formulan y se administran en forma de dosis de aproximadamente 10^4 a 10^{14} pfu/ml, preferentemente de 10^6 a 10^{10} pfu/ml. El término "pfu" (unidad formadora de placa) corresponde a la infectividad de una disolución viral, y se puede determinar infectando un cultivo celular apropiado y midiendo, generalmente después de 48 horas, el número de placas de células infectadas. Las técnicas para determinar el contenido pfu de una disolución viral están bien descritas por la bibliografía.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser formuladas con el fin de ser administradas al paciente por una única vía o por vías diferentes.

- 5 Cuando se considera la administración por vía parenteral, más particularmente por inyección, las composiciones de la invención que comprenden el o los principios activos se encuentran en forma de solutos y suspensiones inyectables acondicionados en ampollas o frascos para perfusión lenta. La inyección se puede realizar en particular por vía subcutánea, intramuscular o intravenosa.
- De manera preferida, en particular en el caso de un tumor sólido, la composición farmacéutica se puede inyectar en el mismo sitio de la angiogénesis.
- 10 En el caso de una administración por vía oral, las composiciones de la invención se encuentran en forma de cápsulas duras, comprimidos efervescentes, comprimidos sin recubrir o revestidos, bolsitas, grageas, ampollas o solutos bebibles, microgránulos o formas de liberación prolongada.
- 15 Las formas para la administración parenteral se obtienen de manera convencional mezclando el o los principios activos con unos tampones, unos agentes estabilizantes, unos conservantes, unos agentes solubilizantes, unos agentes isotónicos y unos agentes de puesta en suspensión. De acuerdo con las técnicas conocidas, estas mezclas se esterilizan a continuación y después se acondicionan en forma de inyecciones intravenosas.
- 20 Como tampón, el experto en la materia podrá utilizar unos tampones a base de sales de fosfato orgánico.
- Unos ejemplos de agentes de puesta en suspensión engloban la metilcelulosa, la hidroxietilcelulosa, la hidroxipropilcelulosa, la acacia y la carboximetilcelulosa sódica.
- 25 Además, unos estabilizantes útiles según la invención son el sulfito de sodio y el metasulfito de sodio, mientras que se puede citar el p-hidroxibenzoato de sodio, el ácido sórbico, el cresol y el clorocresol como conservantes. Para la preparación de disolución o de suspensión oral, los principios activos se disuelven o se ponen en suspensión en un vehículo apropiado con un agente dispersante, un agente humectante, un agente de puesta en suspensión (por ejemplo la polivinilpirrolidona), un conservante (tal como el metilparabeno o el propilparabeno), un agente corrector de sabor o un colorante.
- 30 Para la preparación de microcápsulas, se combinan los principios activos con unos diluyentes apropiados, unos estabilizantes apropiados, unos agentes que favorecen la liberación prolongada de las sustancias activas o cualquier otro tipo de aditivo para la formación de un núcleo central que después se reviste con un polímero apropiado (por ejemplo una resina hidrosoluble o una resina insoluble en agua). Para ello, se utilizarán las técnicas conocidas por el experto en la materia.
- 35 Las microcápsulas así obtenidas se formulan a continuación eventualmente en unas unidades de dosificación apropiadas.
- 40 Se puede considerar asimismo una administración por vía ocular, en particular en el caso de un tratamiento de una lesión ocular.
- 45 La composición farmacéutica de la invención se presenta entonces en forma de una composición oftálmica para administración local en el ojo, por ejemplo como un colirio o una crema oftálmica.
- 50 La composición oftálmica puede ser una disolución acuosa que comprende agua destilada, una disolución salina fisiológica, en la que están disueltos los péptidos de la invención. Se puede incorporar un cierto número de aditivos en la composición oftálmica si es necesario, por ejemplo unos agentes tampón, unos agentes que aseguran la isotonicidad con las lágrimas, unos conservantes, unos espesantes, unos estabilizantes, unos antioxidantes, unos agentes que ajustan el pH, unos agentes quelantes, etc.
- Las gotas para los ojos se preparan mediante manipulación aséptica, o la esterilización se realiza en una etapa apropiada de la preparación.
- 55 Las cremas oftálmicas se pueden preparar de manera aséptica o mezclando el principio activo con una base habitual. Las bases para las cremas oftálmicas son, por ejemplo, la vaselina, la jelena 50 o la plastibase, el macrogol, etc. Se pueden añadir surfactantes para aumentar la hidrofilia. Se pueden añadir unos aditivos tales como los descritos anteriormente, por ejemplo los conservantes, si es necesario.
- 60 En general, para una aplicación oftálmica local, se obtiene un efecto satisfactorio en el adulto mediante la administración de una gotita en el ojo de una preparación que contiene del 0,001 al 10%, preferentemente del 0,01 al 1% en peso/volumen del compuesto de la invención o de una sal farmacéuticamente aceptable de éste varias veces, preferentemente de una a seis veces por día, y cada vez con una preferencia de una a cuatro gotitas por ojo, y en el caso de utilización de una crema oftálmica, de una preparación que contiene del 0,001 al 10%, preferentemente del 0,01 al 1% en peso/volumen del compuesto de la invención o de una sal farmacéuticamente aceptable de éste, con una aplicación preferentemente de una a seis veces por día en el ojo.
- 65

Los péptidos de la invención pueden ser formulados asimismo en forma de liposomas. Los liposomas se forman a partir de fosfolípidos dispersos en un medio acuoso y forman espontáneamente unas vesículas bicapas concéntricas multilaminares. Estas vesículas tienen generalmente un diámetro de 25 nm a 4 µm, y pueden ser sonicadas, conduciendo a la formación de vesículas más pequeñas unilamelares, de diámetro de 200 a 500 Å, que contienen una disolución acuosa en su interior.

Los liposomas pueden ser particularmente ventajosos para administrar el medicamento a una diana celular o tisular precisa. Para ello, los lípidos pueden ser acoplados químicamente a unas moléculas diana, tales como unos péptidos dianas (por ejemplo hormonas) o unos anticuerpos.

La presente invención tiene asimismo por objeto por lo menos un péptido 13-39 o 65-97 de HARP, o un péptido derivado de uno de éstos, eventualmente en asociación con un péptido 111-136 de HARP o un péptido derivado, para su utilización en el tratamiento de una patología asociada a una angiogénesis.

Las patologías contempladas son tales como las mencionadas anteriormente.

La invención tiene además por objeto un método para tratar una patología asociada a una angiogénesis, en un mamífero, más particularmente un ser humano, que comprende la administración en este mamífero de una cantidad terapéuticamente eficaz de por lo menos un péptido 13-39 o 65-97 de HARP, o un péptido derivado de uno de éstos, eventualmente en asociación con un péptido 111-136 de HARP o un péptido derivado de éste.

Por supuesto, los péptidos de la invención o los ácidos nucleicos pueden ser utilizados solos o en asociación con cualquier otro principio activo. Se pueden citar en particular el péptido 150-183 de la anfoterina, que inhibe la formación de las metástasis (Taguchi *et al.*, 2000; Huttunen *et al.*, 2002) y presenta de hecho unas homologías con el péptido de HARP.

Se puede asimismo elegir utilizar una terapia génica expresando asimismo un ácido nucleico que codifica para el péptido 150-183 de la anfoterina.

La presente invención tiene asimismo por objeto la utilización de un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica para un péptido 13-39 o 65-97 de HARP, o un péptido derivado de uno de éstos, eventualmente en asociación con un péptido 111-136 de HARP o un péptido derivado, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de una patología asociada a una angiogénesis.

La invención da a conocer además un método para inhibir la angiogénesis o para tratar una patología asociada a una angiogénesis, en un mamífero, más particularmente el ser humano, que comprende la administración en este mamífero de una cantidad terapéuticamente eficaz de un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica para un péptido 13-39 o 65-97 de HARP, o un péptido derivado de uno de éstos, eventualmente en asociación con un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica para un péptido 111-136 de HARP o un péptido derivado de éste.

Figuras

La figura 1 es un gráfico que representa la inhibición de la proliferación celular inducida por HARP. Unas células NIH 3T3 se estimulan o no mediante 4 nM de HARP en presencia o no de péptido 13-39 o 65-97 utilizado a una concentración comprendida entre 0,1 µm y 10 µm. Después de 24 horas de incubación, la proliferación celular se estima mediante medición de la timidina tritiada incorporada por las células.

La figura 2 es un gráfico que representa la inhibición del crecimiento tumoral en un modelo de ratón atímico que ha recibido una inyección de células PC3 (línea procedente de cáncer de próstata).

Dos millones de células PC3 son inyectadas en lotes de 5 ratones atímicos tratados o no mediante inyección diaria a nivel del tumor por PBS (control) o por el péptido HARP 111-136 a una concentración de 5 mg/kg. El crecimiento tumoral para cada lote de animales se evalúa mediante la medición del tamaño del tumor en los días 9, 13, 16, 20, 23 y 27.

La figura 3 es un gráfico que representa la inhibición de la angiogénesis tumoral en un modelo de ratón atímico que ha recibido una inyección de células PC3 (línea procedente del cáncer de la próstata). Se inyectan dos millones de células PC3 en lotes de ratones tratados o no mediante inyección diaria al nivel del tumor por PBS (control) o por el péptido P111-136 a una concentración de 5 mg/kg. Los ratones son sacrificados el día 27. La cuantificación de la angiogénesis se efectúa sobre un corte después del análisis inmunohistológico utilizando la isolectina *Bandeiraea Simplicifolia* como marcador específico de las células endoteliales y análisis de imágenes. Los valores presentados en el histograma representan el valor medio obtenido analizando tres cortes independientes procedentes de cada uno de los seis tumores obtenidos en cada condición.

La figura 4 es un gráfico que representa la inhibición del crecimiento de las células tumorales MDA-MB-231 inducida por el péptido HARP 13-39. Las células MDA-MB-231 son inoculadas en una caja de cultivo de 12 pocillos que contienen 1 ml de agar al 0,6% en presencia o no de péptido HARP 13-39. Después de 13 días de cultivo, se recuentan las colonias que tienen un diámetro igual o superior a 50 µm. Los resultados del gráfico representan los valores de un experimento repetido 2 veces con unos valores similares, y cada medición se hace por triplicado. Las rayas representan los estándares de errores (*, p < 0,05; **, p < 0,01).

La figura 5 es un gráfico que representa la inhibición del crecimiento de las células tumorales MDA-MB-231 inducida por el péptido HARP 65-97. Las células MDA-MB-231 son inoculadas en una capa de cultivo de 12 pocillos que contiene 1 ml de agar al 0,6% en presencia o no de péptido HARP 65-97. Después de 13 días de cultivo, se recuentan las colonias que tienen un diámetro igual o superior a 50 µm. Los resultados del gráfico representan los valores de un experimento repetido 2 veces con unos valores similares, y cada medición se hace por triplicado. Las rayas representan los estándares de errores (*, p < 0,05; **, p < 0,01).

La figura 6 representa la inhibición por los péptidos HARP 13-39 y 65-97 de la angiogénesis inducida por HARP en un modelo *in vivo*. Se inyectan trescientos microlitros de Matrigel[®], incubados con 5 nM de HARP en presencia o no de los péptidos HARP 13-39 y 65-97 utilizados a una concentración de 1 µM, subcutáneamente en unos ratones. El control del experimento se realiza utilizando FGF-2. Siete días más tarde, los ratones son sacrificados y se extrae el Matrigel[®]. Se realizan unos cortes de unos 8 µM de grosor. Los cortes se colorean a continuación con tricromo de Gomori. El número de células que han invadido el Matrigel[®] se cuantifica mediante análisis de imagen con el programa NIH. Los resultados representan el valor medio de un análisis de 7 cortes por ratón (n = 4 ratones/grupo). Las rayas representan los estándares de errores (**, p < 0,01).

Ejemplos

Ejemplo 1: Efecto de los péptidos HARP 13-39 y 65-97 sobre la inhibición de la proliferación de las células NIH 3T3 estimuladas por HARP

Unas células fibroblásticas de tipo NIH 3T3 son inoculadas a una densidad de 3×10^4 células por cm^2 en un medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero de ternera fetal. Después de 24 horas de incubación a 37°C en una atmósfera que contiene 7% de CO_2 , el medio de cultivo se sustituye por DMEM que no contiene suero de ternera fetal. Veinticuatro horas después, se añade durante 18 horas la molécula HARP (4 nM) en presencia o no de los péptidos HARP 16-48 o 65-97 de las secuencias respectivas SEC ID nº 2 y nº 3, a una concentración comprendida entre 0,1 y 10 µM. Después de este periodo de incubación, se añaden 0,5 µCi de [metil-³H]timidina, y 6 horas después, las células son fijadas por una disolución de 10% de ácido tricloroacético. La radioactividad incorporada por las células se recuenta entonces por centelleo líquido después de haber efectuado una lisis celular con una disolución de sosa a una concentración de 0,1 N.

Los resultados se presentan en la figura 1 y muestran que los péptidos que corresponden a la secuencia 13-39 y 65-97 son capaces de inhibir de manera dosis-dependiente la actividad de inducción de la proliferación celular de HARP. A una dosis de 10 µM, el péptido 65-97 inhibe más del 90% de la actividad de HARP, mientras que se observa el 60% de inhibición para el péptido 13-39.

Ejemplo 2: Efecto del péptido HARP 111-136 sobre la inhibición de la angiogénesis tumoral y del crecimiento tumoral

La capacidad del péptido P111-136 (SEC ID nº 4) para inhibir la angiogénesis tumoral se ha ensayado induciendo un crecimiento tumoral mediante inyección de células PC3 a unos ratones atímicos en presencia o no de péptido P111-136. Se inyectan 2×10^6 células PC3 a unos lotes de 5 ratones atímicos (nude/nude, Laboratorio IFFA CREDO) tratados o no mediante inyección a nivel del tumor de 100 µl por día de una disolución de PBS (Lote control) o mediante una disolución de péptido P111-136 diluida en PBS a una concentración de 5 mg/kg. En los días 9, 13, 16, 20, 23 y 27, se mide el tamaño del tumor con la ayuda de un calibrador. Los resultados están presentados en la figura 3 e indican que el péptido HARP 111-136 utilizado a una dosis de 5 mg por kg induce una inhibición del crecimiento de los tumores.

El análisis de los datos indica que la velocidad de crecimiento tumoral es 4 veces menor para los ratones tratados con 5 mg/kg de péptido HARP 111-136 que los no tratados. Al día 27, se observa que para el grupo de ratones tratados, el tamaño medio de los tumores es 80% menor que los que no hayan recibido el tratamiento.

En el día 27, los tumores son extraídos y se han realizado unos cortes en congelación de 5 µm. Después de la fijación de los tejidos con acetona (4°C, 15 minutos) y rehidratación de éstos, la presencia de las células endoteliales se revela con la ayuda de la lectina *Bandeiraea Simplicifolia* isolectina B4 (10 µg/ml) que se fija específicamente en la superficie de las células endoteliales. Esta lectina se pone entonces en evidencia mediante inmunomarcado con la ayuda de una intercalación de anticuerpos específicos, marcados con fosfatasa alcalina. Después de la incubación con un sustrato de la fosfatasa alcalina (Sustrato de vector rojo), las células endoteliales están coloreadas de rojo. La cuantificación del número de células endoteliales en el tumor se realiza mediante análisis de imagen (NIH image)

analizando los 6 tumores sobre 3 cortes independientes de un mismo tumor.

Se observa un número de células endoteliales menos importante para los tumores tratados por el péptido que para los tumores no tratados. La cuantificación de este efecto se muestra en la figura 3. El análisis del histograma indica que la inyección del péptido P111-136 induce una disminución de los vasos intra-tumorales del 55%, lo cual demuestra que el péptido P111-136 es capaz de inhibir la angiogénesis tumoral.

Ejemplo 3: Efecto de los péptidos HARP 13-39 y 65-97 sobre la inhibición del crecimiento sobre agar blando de las células tumorales

Unas células MDA-MB-231 procedentes de carcinoma mamario humano, son inoculadas a una densidad de 3×10^3 células por cm^2 en un medio de cultivo DMEM que contiene el 10% de suero de ternera fetal, el 0,35% de agar y que contiene o no unas concentraciones de péptidos HARP 13-39 y 65-97 (residuos 13 a 39 de SEC ID nº 1 y nº 3). Las células son inoculadas en una caja de cultivo de 12 pocillos (35 mm de diámetro/pocillo) previamente cubierta por 1 ml de agar al 0,6%. Los péptidos son añadidos en el medio de cultivo cada 2 días. Después de 13 días de incubación en una atmósfera húmeda a 37°C y 7% de CO₂, se cuentan las colonias que tengan un diámetro igual o superior a 50 μm . Cada punto de experimento se realiza tres veces y cada experimento se repite tres veces.

Los resultados representados en las figuras 4 y 5 muestran que los péptidos HARP 13-39 y 65-97 inhiben el crecimiento de las células tumorales de manera dosis-dependiente. Así, se observa una inhibición del crecimiento de las células tumorales MSA-MB-231 del 53% en presencia de 1 μm de péptido HARP 13-39 (figura 4) y del 41% en presencia de HARP 65-97 utilizado a la misma concentración (figura 5).

Ejemplo 4: Inhibición mediante los péptidos 13-39 y 65-97 de la angiogénesis inducida por HARP

Siendo HARP un factor de crecimiento implicado en la proliferación y la diferenciación de las células endoteliales, los inventores han estudiado, en el experimento presentado a continuación, el efecto de los péptidos HARP 13-39 y 65-97 (residuos 13 a 39 de SEC ID nº 1 y SEC ID nº 3) sobre la actividad angiogénica inducida por HARP.

Este experimento se ha realizado utilizando un modelo de angiogénesis *in vivo* en el ratón. Este modelo experimental consiste en inyectar Matrigel[®] que contiene una sustancia a analizar por sus propiedades estimulantes o inhibitoras de la angiogénesis. Cuatro ratones Swiss (Janvier, Le Genest St Isle, Francia) por grupo son inyectados con 300 μl de Matrigel[®] previamente incubado con 5 nM de HARP, 1 μm de péptido HARP 13-39 o HARP 65-97, o bien con una mezcla de HARP (5 nM) y el péptido HARP 13-39 o HARP 65-97 (1 μm). El control de la especificidad de la inhibición se realiza utilizando otro factor angiogénico, el FGF-2, ensayado solo a una concentración de 10 nM o suplementado con los péptidos HARP 13-39 o HARP 65-97 utilizados a una concentración de 1 μm .

Los ratones son sacrificados siete días después de la inyección del Matrigel[®]. Éste se extrae y se congela en nitrógeno líquido. Se efectúan entonces unos cortes de 8 μm de grosor con un criostato. Los cortes son coloreados después con tricromo de Gomori. El número de células endoteliales que hayan invadido el Matrigel[®] se cuantifica mediante análisis de imágenes utilizando el programa NIH image.

Los resultados presentados en la figura 6 indican que HARP así como FGF-2 inducen una estimulación de la angiogénesis. En comparación con Matrigel[®] utilizado solo, se observa un aumento del número de células endoteliales en un factor 3 para HARP y de 5,8 veces para el FGF-2. Utilizados a una concentración de 1 μm , los péptidos HARP 13-39 o HARP 65-97 inhiben totalmente la angiogénesis inducida por HARP, mientras que no tienen ningún efecto sobre la angiogénesis inducida por el FGF-2. No se observa ningún efecto significativo cuando los péptidos HARP 13-39 o HARP 65-97 se utilizan solos.

Estos resultados muestran que los péptidos HARP 13-39 o HARP 65-97 son unos inhibidores específicos de la actividad angiogénica inducida por HARP.

Referencias

- Bernard-Pierrot *et al.* (2001) J Biol Chem 276, 12228-12234
- Bernard-Pierrot *et al.* (2002) J Biol Chem 277(35):32071-7
- Chauhan *et al.* (1993) Proc Natl Acad Sci U S A 90, 679-682
- Choudhuri *et al.* (1997) Cancer Res 57, 1814-1819
- Courty *et al.* (1991) Biochem Biophys Res Commun 180, 145-151
- Fang *et al.* (1992) J Biol Chem 267, 25889-25897
- Firat *et al.*, (2002), J. Gen. Ther. 4:38-45
- Folkman, J. (1971) N Engl J Med 285, 1182-1186
- Furth *et al.*, (1992) analytical Biochemistry, 205:365-368
- Jackson *et al.*, (1988) Ann. Rheum. Dis. 57(3) 158-161
- Jager *et al.* (1997) Int J Cancer 73, 537-543

- Huttunen *et al.* (2002), Cancer Research 62:4805-4811
- Kojima *et al.* (1995a) Biochem Biophys Res Commun 216, 574-581
- Kojima *et al.* (1995b) Biochem Biophys Res Commun 206, 468-473
- Ledoux *et al.* (1997) J Histochem Cytochem 45, 1239-1245
- 5 - Matsubara *et al.* (1990) J Biol Chem 265, 9441-9443
- Milhiet *et al.* (1998) J Endocrinol 158, 389-399
- Novotny *et al.* (1993) Arterioscler Thromb 13, 1798-1805
- Papadimitriou *et al.* (2000) Biochem Biophys Res Commun 274, 242-248
- Papadimitriou *et al.* (2001) Biochem Biophys Res Commun 282, 306-313
- 10 - Rauvala, H. (1989) Embo J 8, 2933-2941
- Riegel *et al.* (1994) Breast Cancer Res Treat 31, 309-314
- Robinson *et al.*, (1997) Immunology 9:271-83
- Sambrook (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York
- Stoica *et al.* (2001) J Biol Chem 276, 16772-16779
- 15 - Taguchi *et al.* (2000) Nature 405 :354-360
- Tang *et al.*, (1992) Nature 356, 152-154
- Tsutsui *et al.* (1991) Biochem Biophys Res Commun 176, 792-797
- Vacherot *et al.* (1999a) Prostate 38, 126-136
- Vacherot *et al.* (1999b) J Biol Chem 274, 7741-7747
- 20 - Wellstein *et al.* (1992) J Biol Chem 267, 2582-2587
- Yeh *et al.* (1998) J Neurosci 18, 3699-3707

Listado de secuencias

- 25 <110> CNRS
- <120> Fragmentos peptídicos del factor HARP que inhiben la angiogénesis
- <130> BET 03P0917
- 30 <140>
- <141>
- <160>7
- 35 <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
- <211> 136
- 40 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

```

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

45

ES 2 390 763 T3

<210> 2
 <211> 28
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 2
 Ser Asp Cys Gly Glu Trp Gln Trp Ser Val Cys Val Pro Thr Ser Gly
 1 5 10 15
 Asp Cys Gly Leu Gly Thr Arg Glu Gly Thr Arg Thr
 20 25

 10 <210> 3
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 15 <400> 3
 Ala Glu Cys Lys Tyr Gln Phe Gln Ala Trp Gly Glu Cys Asp Leu Asn
 1 5 10 15
 Thr Ala Leu Lys Thr Arg Thr Gly Ser Leu Lys Arg Ala Leu His Asn
 20 25 30

 Ala

 <210> 4
 <211> 26
 20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 4
 Lys Leu Thr Lys Pro Lys Pro Gln Ala Glu Ser Lys Lys Lys Lys Lys
 1 5 10 15
 Glu Gly Lys Lys Gln Glu Lys Met Leu Asp
 20 25

 25 <210> 5
 <211> 84
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 30 <400> 5
 tctgactgtg gagaatggca gtggagtgtg tgtgtgccca ccagtggaga ctgtgggctg 60
 ggcacacggg agggcactcg gact 84

 <210> 6
 <211> 93
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 6
 tgcaaatacc agttccaggc ctggggagaa tgtgacctga acacagccct gaagaccaga 60
 40 actggaagtc tgaagcgagc cctgcacaat gcc 93

 <210> 7
 <211> 75
 <212> ADN
 45 <213> Homo sapiens

 <400> 7
 ctgaccaagc ccaaacctca agcagaatct aagaagaaga aaaaggaagg caagaacag 60
 gagaagatgc tggat 75

 50

REIVINDICACIONES

1. Péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada de entre:
 - 5 - la secuencia 13-39 del factor HARP (residuos 13 a 39 de SEC ID nº 1); y
 - la secuencia 65-97 del factor HARP (SEC ID nº 3).
2. Péptido según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho péptido consiste en los residuos 13 a 39 de la secuencia SEC ID nº 1.
- 10 3. Péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos por lo menos 80% idéntica a la secuencia SEC ID nº 2 o nº 3, y que presenta una actividad de inhibición de la angiogénesis, y una capacidad para fijarse a los glicoaminoglicanos (GAG).
- 15 4. Péptido según la reivindicación 3, cuya secuencia difiere de la secuencia SEC ID nº 2 o nº 3 por la sustitución conservativa de por lo menos un aminoácido.
5. Ácido nucleico que consiste en una secuencia que codifica para un péptido tal como el definido en una de las reivindicaciones 1 a 4.
- 20 6. Ácido nucleico según la reivindicación 5, que consiste en la secuencia SEC ID nº 5 o SEC ID nº 6.
7. Procedimiento de producción de un péptido tal como el definido en una de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende la síntesis de dicho péptido por vía química.
- 25 8. Procedimiento de producción de un péptido tal como el definido en una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que un vector que contiene un ácido tal como el definido en una de las reivindicaciones 5 o 6, se transfiere a una célula hospedante que se cultiva en unas condiciones que permiten la expresión del péptido correspondiente.
- 30 9. Composición farmacéutica que comprende un péptido tal como el definido en una de las reivindicaciones 1 a 4, y uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables.
10. Composición según la reivindicación 9, que comprende además un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos 111-136 del factor HARP o un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos por lo menos 80% idéntica a la secuencia SEC ID nº 4, y que presenta una actividad de inhibición de la angiogénesis, y una capacidad para fijarse al receptor ALK.
- 35 11. Composición según la reivindicación 10, que comprende:
 - 40 - el péptido que consiste en los residuos 13 a 39 de la secuencia SEC ID nº 1;
 - el péptido 65-97 de secuencia SEC ID nº 3; y
 - el péptido 111-136 de secuencia SEC ID nº 4.
12. Composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico que consiste en una secuencia que codifica para un péptido tal como el definido en unas de las reivindicaciones 1 a 4.
- 45 13. Composición según la reivindicación 12, que comprende además un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica para un péptido tal como el definido en la reivindicación 10.
- 50 14. Composición según la reivindicación 13, que comprende:
 - un ácido nucleico que codifica para el péptido que consiste en los residuos 13-39 de la secuencia SEC ID nº 10;
 - 55 - un ácido nucleico que codifica para el péptido 65-97 de secuencia SEC ID nº 3;
 - un ácido nucleico que codifica para el péptido 111-136 de secuencia SEC ID nº 4.
- 60 15. Composición según la reivindicación 13 o 14, en la que dichos ácidos nucleicos son llevados por un único vector.
16. Péptido tal como el definido en una de las reivindicaciones 1 a 4, para su utilización en el tratamiento de una patología asociada a una angiogénesis seleccionada de entre un tumor, una lesión ocular, la poliartritis reumatoide y una enfermedad de piel.
- 65 17. Péptido según la reivindicación 16, en el que el péptido tal como el definido en una de las reivindicaciones 1 a 4, está asociado a un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos 111-136 del factor HARP o a un péptido que

consiste en una secuencia de aminoácidos por lo menos 80% idéntica a la secuencia SEC ID nº 4, y que presenta una actividad de inhibición de la angiogénesis, y una capacidad para fijarse al receptor ALK.

5 18. Ácido nucleico tal como el definido en una de las reivindicaciones 5 o 6, para su utilización en el tratamiento de una patología asociada a una angiogénesis seleccionada de entre un tumor, una lesión ocular, la poliartritis reumatoide y una enfermedad de la piel.

10 19. Ácido nucleico según la reivindicación 18, en el que el ácido nucleico tal como el definido en una de las reivindicaciones 5 o 6, está asociado a un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica para un péptido tal como el definido en la reivindicación 10.

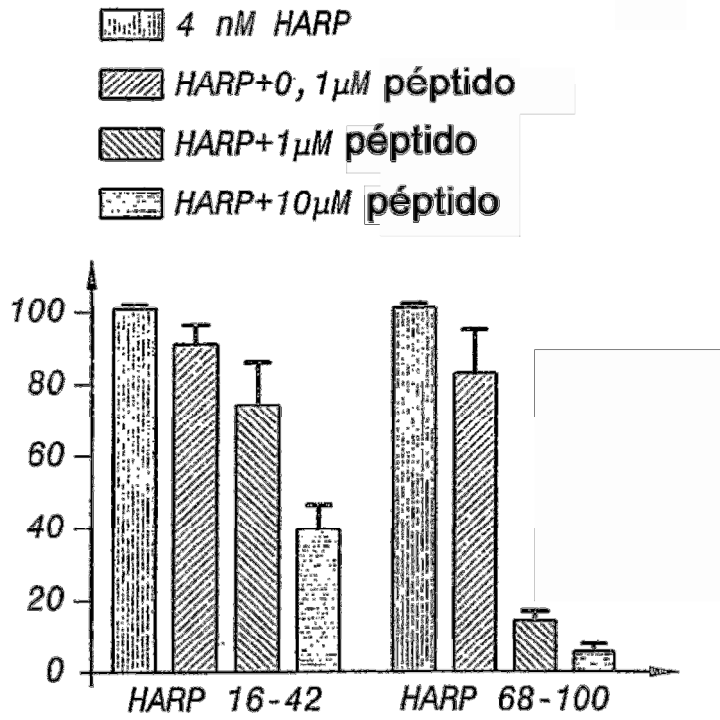


FIG.1

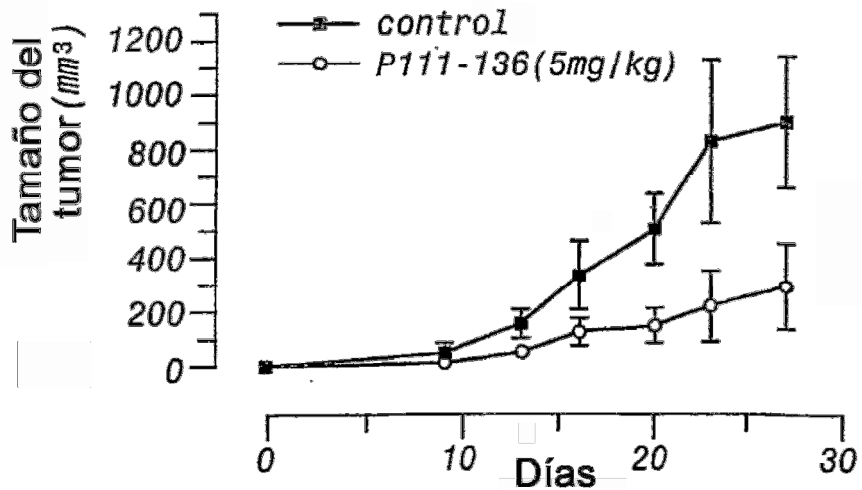


FIG.2

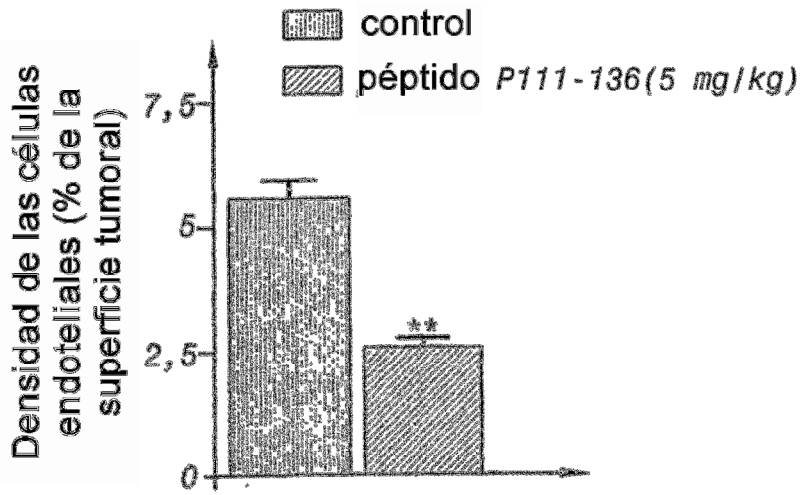


FIG.3

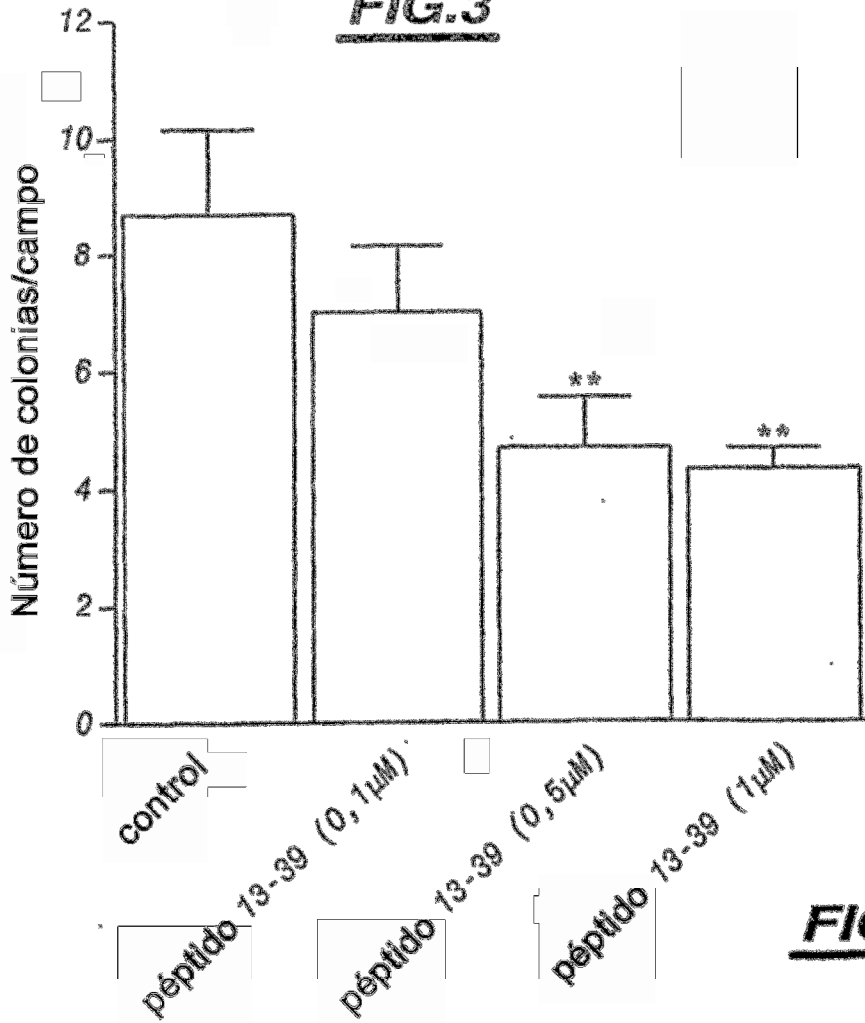


FIG.4

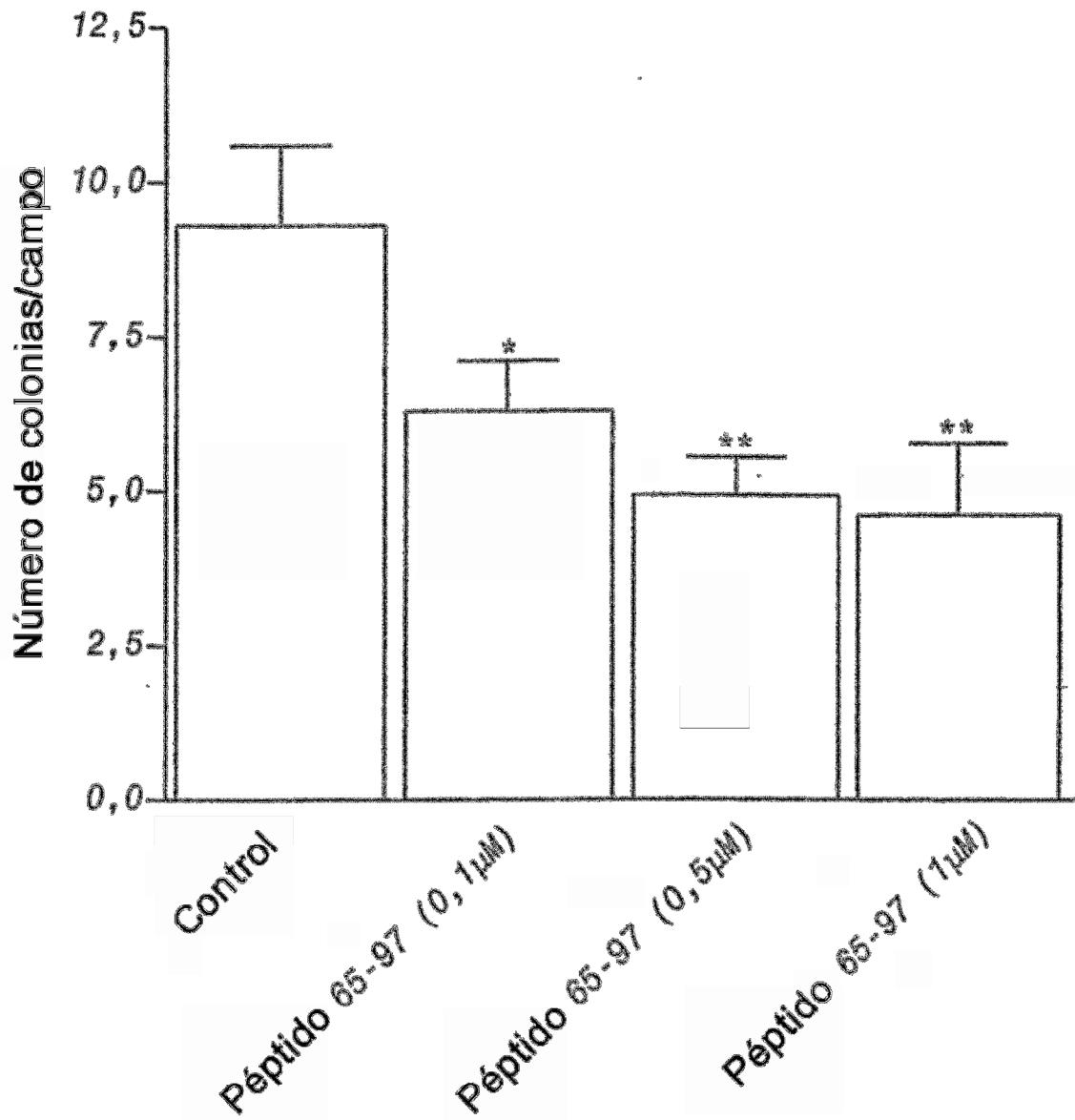


FIG.5

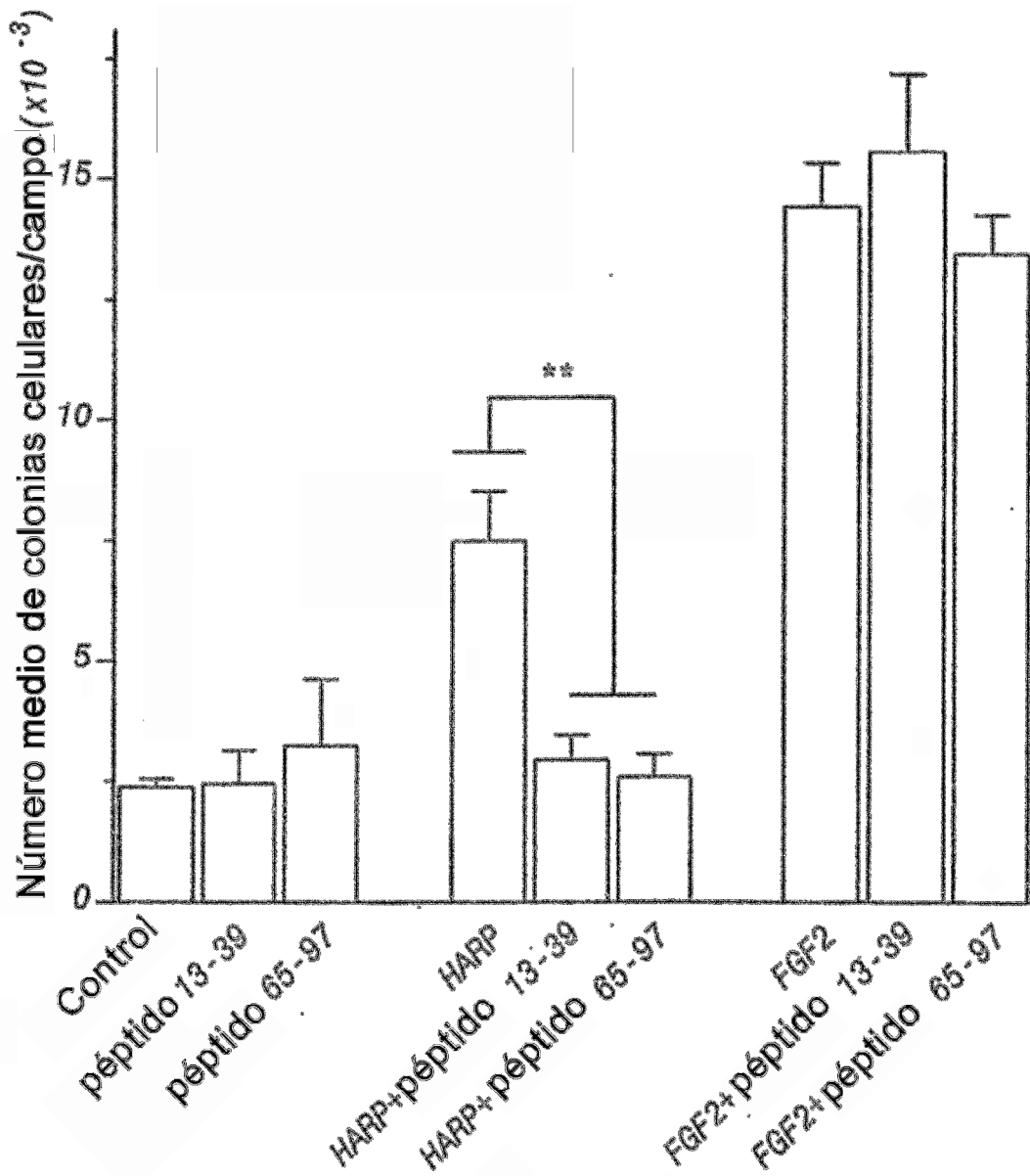


FIG.6