(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international

(43) Date de la publication internationale
8 avril 2004 (08.04.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/029089 A2

(51) Classification internationale des brevets[7] :
C07K 14/705

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2003/002810

(22) Date de dépôt international :
24 septembre 2003 (24.09.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02/11853 25 septembre 2002 (25.09.2002) FR

(71) Déposant *(pour tous les États désignés sauf US)* : **EXONHIT THERAPEUTICS S.A.** [FR/FR]; 26, rue Brunel, F-75017 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et
(75) Inventeurs/Déposants *(pour US seulement)* : **SCHWEIGHOFFER, Fabien** [FR/FR]; 38, avenue Paul Déroulède, F-94300 Vincennes (FR). **PETIT, Silvère** [FR/FR]; 11, rue des Lyonnais, F-75005 Paris (FR). **VALENTIN, Emmanuel** [FR/FR]; 24, Quai Saint Antoine, F-69002 Lyon (FR).

(74) Mandataires : **BECKER, Philippe** etc.; Cabinet Becker et Associés, 35, rue des Mathurins, F-75008 Paris (FR).

(81) États désignés *(national)* : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés *(régional)* : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :
— *relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US seulement*

Publiée :
— *sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport*

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) **Title:** NOVEL ANGIOGENESIS TARGET AND USES THEREOF

(54) **Titre :** NOUVELLE CIBLE DE L' ANGIOGENESE ET UTILISATIONS

(57) **Abstract:** The invention relates to the biology and health field. More specifically, the invention relates to the identification and functional characterisation of a novel protein involved in the vascular permeability, cell adhesion and angiogenesis mechanisms and to the use of the aforementioned protein as a therapeutic, diagnostic or screening target. The invention also relates to the tools which can be used to perform therapeutic, diagnostic or screening methods such as, for example, probes, antibodies, vectors, recombinant cells, etc. The invention is intended, in particular, to be employed for the preparation of pharmaceutical compounds used in the field of cancers, angiogenesis, inflammatory diseases or tissue alterations.

(57) **Abrégé :** La présente demande concerne le domaine de la biologie et de la santé. Elle concerne plus particulièrement l'identification et la caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle protéine impliquée dans les mécanismes de perméabilité vasculaire, d'adhésion cellulaire et d'angiogénèse, ainsi que l'utilisation de cette protéine comme cible thérapeutique, diagnostique ou de criblage, Elle porte également sur des outils utilisables pour la mise en oeuvre de méthodes thérapeutiques, diagnostiques ou de criblage, comme notamment des sondes, anticorps, vecteurs, cellules recombinantes, etc. L'invention est particulièrement utile pour la préparation de composés pharmaceutiques dans le domaine des cancers, de l'angiogenèse, des maladies inflammatoires ou des altérations tissulaires.

WO 2004/029089 A2

NOUVELLE CIBLE DE L'ANGIOGENESE ET UTILISATIONS

La présente demande concerne le domaine de la biologie et de la santé. Elle concerne plus particulièrement l'identification et la caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle protéine impliquée dans les mécanismes de perméabilité vasculaire, d'adhésion cellulaire et d'angiogénèse, ainsi que l'utilisation de cette protéine comme cible thérapeutique, diagnostique ou de criblage. Elle porte également sur des outils utilisables pour la mise en œuvre de méthodes thérapeutiques, diagnostiques ou de criblage, comme notamment des sondes, anticorps, vecteurs, cellules recombinantes, etc. L'invention est particulièrement utile pour la préparation de composés pharmaceutiques dans le domaine des cancers, de l'angiogenèse, des maladies inflammatoires ou des altérations tissulaires.

L'adhésion cellulaire est un processus complexe particulièrement important pour maintenir l'intégrité tissulaire et la compartimentalisation au sein de l'organisme. L'adhésion d'un type cellulaire à un autre au sein d'un tissu donné entraîne la formation de jonctions intercellulaires, connues sous le nom de jonction serrées (« *tight junctions* »), jonctions adhérentes, jonctions gap et desmosomes. La formation de ces jonctions assure la cohésion des épithéliums et des endothéliums et est responsable de l'existence de barrières imperméables qui empêchent la libre diffusion de cellules et d'autres substances biologiques d'un compartiment tissulaire vers un autre. Par exemple, un composé présent dans le sang doit tout d'abord traverser la barrière constituée par les cellules endothéliales composant le vaisseau sanguin. Cette barrière rend difficile le ciblage de médicaments vers un tissu donné. Les cellules endothéliales rendent les capillaires sanguins très imperméables aux médicaments et la barrière hémato-encéphalique complique particulièrement l'administration de molécules au système nerveux central. De plus, de nombreuses tumeurs solides développent des barrières internes qui limitent la délivrance de composés anti-tumoraux ou d'anticorps aux cellules ciblées.

De nombreuses pathologies présentent des anomalies de l'adhésion cellulaire. L'adhésion cellulaire est également impliquée dans les phénomènes de rejets de greffes, et il est aussi bien établi que l'ischémie tissulaire perturbe le transport normal d'eau et de solutés

à travers la microvasculature, et que ceci résulte en différentes formes d'oedèmes tissulaires. Dans ces circonstances, la perte soudaine de la fonction de barrière de l'endothélium constitue une cause majeure de pathologie tissulaire et de perte de la fonction d'un organe donné.

Lors de pathologies à composantes prolifératives, les cellules qui se multiplient voient également une réorganisation de leurs jonctions entre elles. Ainsi, au cours du développement de vascularites et lors de la néovascularisation tumorale, une prolifération des cellules endothéliales s'accompagne d'un relâchement de l'endothélium vasculaire. Ce relâchement est lié à une modification de la nature des interactions entre cellules endothéliales. De façon analogue, lors de la prolifération tumorale, les cellules épithéliales transformées ne constituent plus d'épithéliums réguliers mais ne sont plus affectées par le phénomène d'inhibition de contact. Les cellules tumorales capables de former des métastases peuvent se détacher de leurs voisines et donc relâcher leurs interactions avec celles-ci.

Une modification des liaisons intercellulaires survient également lors de l'angiogénèse, et de nombreuses pathologies ont été décrites comme ayant une composante ou un stade lié au phénomène d'angiogenèse. On peut citer entre autres de très nombreux cancers, les rétinopathies liées au diabète, l'athérosclérose, l'arthrose, la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis, ainsi que les pathologies liées à une cicatrisation retardée.

La présente invention décrit à présent l'identification d'une nouvelle protéine impliquée dans les phénomènes d'angiogenèse, d'adhésion cellulaire et de réponse à l'hypoxie. Une approche originale a permis d'identifier un ADNc correspondant à une nouvelle protéine qui présente une homologie de structure et fonctionnelle avec la famille des claudins. Cette nouvelle protéine fournit de nouvelles bases pour des approches thérapeutiques et diagnostiques des pathologies associées aux phénomènes d'angiogenèse et, plus généralement, à des processus prolifératifs.

Plus particulièrement, une analyse qualitative différentielle a été effectuée à partir d'ARN extraits de cellules HMEC-1 (« *Human dermal Microvascular Endothelial*

Cell ») en culture, exposées ou non à l'hypoxie (par traitement avec la desferoxiamine (DFO) pendant 16 heures). Cette analyse a été effectuée par criblage différentiel qualitatif selon la technique DATAS décrite dans le brevet n° WO99/46403. Cette analyse a permis la construction, par le demandeur, d'un répertoire des altérations d'épissage dans les cellules HMEC-1 exposées à l'hypoxie. Ce répertoire qui contient plus de 1100 séquences distinctes, implique des acteurs clefs du phénomène de réponse à l'hypoxie tels que les enzymes de la glycolyse (phosphofructokinase, pyruvate kinase ou lactate deshydrogénase) ou le transporteur de glucose GLUT-1. Des séquences dérivées d'ARNs codant pour des protéines impliquées dans la réponse au stress, et notamment ORP150, qui est directement impliqué dans la réponse au stress hypoxique et dans la stabilisation du facteur VEGF, font également partie de ce répertoire, soulignant l'implication de cette réponse dans la réponse à l'hypoxie.

La réalisation de DATAS sur des ARN de cellules HMEC-1 traitées ou non par le DFO a permis d'isoler un fragment d'ADNc dérivé de l'ARNm d'un gène hypothétique. Ce gène, répertorié dans GenBank sous la référence NM_024600, est purement hypothétique. Ainsi, aucune démonstration de l'expression physiologique de cette séquence n'a été rapportée antérieurement. De même, la séquence putative codée (numéro FLJ20898) a été déduite de la séquence de l'ADNc, mais une telle protéine n'a jamais été identifiée dans des échantillons biologiques, ni isolée ou caractérisée. A cet égard, la demande WO02/24888 présente des centaines de séquences de gènes sur-exprimées dans certains tissus pathologiques, mais ne permet nullement de caractériser la fonction de ces séquences dans les pathologies concernées. De même, la demande WO02/070539 décrit près de mille séquences de gènes différentes, mais sans aucune caractérisation fonctionnelle. La demande WO01/29221 mentionne également plusieurs centaines de séquences de gènes, sans toutefois fournir la moindre caractérisation fonctionnelle. A cet égard, la seule séquence présentant une région d'homologie avec la protéine de l'invention est la séquence n° 378 de cette demande, pour laquelle aucune expression n'a été détectée dans aucun tissu (tableau 9 de la demande WO01/29221). Les demandes WO02/144499 et WO02/098898 décrivent les séquences de protéines FLJ ou claudins, mais sans relation structurale significative avec la protéine selon la présente invention. Dans ces conditions, aucune fonction biologique et aucune application

industrielle spécifique n'ont été jusqu'à présent attribuées à cette séquence putative, et l'existence même de la protéine dans des échantillons biologique n'a pas été documentée dans l'art antérieur.

La présente demande décrit pour la première fois l'identification d'ARNm et de la d'une protéine ayant une séquence correspondant à FLJ20898, dans des conditions physio-pathologiques. Cette protéine a été désignée EHTA, en raison de son Expression après Traitement en Hypoxie (« Expressed upon Hypoxia Treatment »). La présente demande démontre que cette séquence est exprimée et possède des propriétés biologiques importantes dans la régulation de l'adhésion cellulaire et de la perméabilité para-cellulaires. La présente demande fournit ainsi une nouvelle protéine caractérisée fonctionnellement et expose, pour la première fois, ses applications industrielles spécifiques.

La séquence en acides aminés de cette nouvelle protéine, désignée EHTA, est représentée ci-après (SEQ ID NO :2). La séquence codante est représentée dans la séquence SEQ ID NO :1.

Protéine EHTA (SEQ ID NO :2)

MTVQRLVAAAVLVALVSLILNNVAAFTSNWVCQTLEDGRRRSVGLWRSCWLVDRT
RGGPSPGARAGQVDAHDCEALGWGSEAAGFQESRGTVKLQFDMMRACNLVATAAL
TAGQLTFLLGLVGLPLLSPDAPCWEEAMAAAFQLASFVLVIGLVTFYRIGPYTNL
SWSCYLNIGACLLATLAAAMLIWNILHKREDCMAPRVIVISRSLTARFRRGLDND
YVESPC

Une analyse bio-informatique réalisée à l'aide d'outils connus de l'homme de l'art n'a pas révélé d'homologie significative entre la protéine EHTA de l'invention et d'autres protéines connues. Elle a toutefois permis de mettre en évidence une faible homologie entre la protéine EHTA et certains domaines des protéines de la famille des claudins.

Une seconde analyse bio-informatique, réalisée grâce au serveur Pfam, a permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle la protéine EHTA faisait partie de la famille des claudins. Ces protéines sont impliquées dans la formation de jonction intercellulaire de type serrée (« *tight junction* »). Le logiciel utilisé compare la séquence protéique à étudier avec une séquence consensus représentative d'un domaine protéique donné. Cette séquence consensus est générée à partir d'un alignement d'un grand nombre de séquences protéiques du domaine considéré.

L'analyse de séquences a permis de mettre en évidence la présence d'un site de liaison au domaine de type PDZ, très conservé dans les claudins, ainsi qu'une topologie identique à celle des claudins. Ces particularités structurales ont renforcé l'hypothèse selon laquelle cette nouvelle protéine était un nouveau membre de la famille des claudins, même s'il n'existe pas d'homologie importante dans la structure primaire de ces différentes protéines.

La distribution tissulaire de ce nouveau gène a ensuite été analysée par la technique du Northern blot, et a permis de mettre en évidence une expression marquée dans le cœur, les poumons et le rein (Figure 1). Ce profil d'expression est celui qui est classiquement observé pour des gènes fortement exprimés dans l'endothélium.

Par ailleurs, en utilisant les techniques des puces à ADN et de la PCR quantitative en temps réel, une forte sur-expression de l'ARNm de la protéine EHTA a été mise en évidence dans différentes lignées cellulaires exposées à un traitement hypoxique, confirmant l'implication de cette protéine dans la perméabilité vasculaire.

Afin de poursuivre l'analyse biologique fonctionnelle, un ADNc correspondant à la phase ouverte de lecture de la protéine EHTA a été isolé par RT-PCR. La séquence du fragment amplifié est fournie dans la séquence SEQ ID NO :1. Cette séquence a ensuite été clonée en phase avec la séquence de la protéine EGFP, et des expériences de transfection puis d'imagerie en fluorescence ont permis d'établir que la protéine EHTA était adressée à la membrane plasmique des cellules transfectées.

Plusieurs clones stables de cellules MDCK transfectées avec la protéine de fusion EHTA-EGFP ont ensuite été isolés. Les résultats obtenus montrent que le signal de fluorescence dû à l'expression de la protéine de fusion est fortement concentré à la jonction entre plusieurs cellules (Figure 2). Ceci constitue une forte indication que la protéine EHTA est bien un membre de la famille des claudins. En effet, le type d'image obtenu dans cette expérience est très similaire à celui observé avec d'autres claudins (Claudin-1, Claudin-2 et Claudin-4) (Figure 3).

Un clone MDCK transfecté de manière stable avec la protéine de fusion EHTA-EGFP a ensuite été utilisé dans un test de mesure de la perméabilité paracellulaire. Dans ce type de test, une monocouche des cellules étudiées est constituée afin de séparer deux compartiments de milieu de culture. L'un de ces compartiments contient un traceur fluorescent, du dextran couplé au FITC (« *Fluorescein IsoThioCyanate* »). Une mesure du passage de ce traceur d'un compartiment à l'autre permet de mesurer la perméabilité de la monocouche cellulaire et donc des jonctions entre les cellules qui la constituent. Les résultats obtenus montrent que le coefficient de perméabilité mesuré à partir du clone protéine de fusion EHTA-EGFP est trois fois plus élevé que celui mesuré avec un clone transfecté avec la protéine EGFP seulement (Figure 4). Ce résultat indique que la sur-expression de la protéine EHTA induit un relâchement des liaisons entre cellules, ce qui est compatible avec une interférence de la protéine EHTA avec les « *tight junctions* » entre cellules.

Un tel relâchement des liaisons intercellulaires survient entre les cellules endothéliales lors de la formation des vaisseaux sanguins et entre les cellules épithéliales lors de la prolifération tumorale. L'expression de l'ARNm de EHTA a donc été étudiée dans des échantillons de tumeurs. Des expériences de QPCR ont permis de mettre en évidence, de manière inattendue, une sur-expression de l'ARNm codant pour EHTA dans des échantillons de tumeurs de la prostate par rapport au tissu sain (Figure 5). Cette sur-expression souligne une fois encore la corrélation entre la présence de la protéine EHTA et l'intégrité tissulaire, l'adhésion cellulaire et l'angiogénèse. Ceci est également conforté par les conditions d'hypoxie dans lesquelles la protéine EHTA a été mise en

évidence, l'hypoxie étant caractérisée notamment par une augmentation significative de la perméabilité vasculaire *in vivo*.

Ces résultats démontrent donc l'identification et l'isolement d'une nouvelle protéine 1) exprimée dans l'endothélium, 2) sur-exprimée en conditions hypoxiques *in vitro* (cellules en culture) et *in vivo* (cancer de la prostate) et 3) dont l'expression augmente la perméabilité vasculaire dans un modèle de mesure de flux paracellulaire. Cette protéine constitue donc une nouvelle cible particulièrement attrayante pour la mise au point de procédés de diagnostics et/ou thérapeutiques utiles dans les domaines du cancer, des pathologies à composantes angiogéniques ou impliquant une perturbation de l'intégrité ou de l'adhésion tissulaire.

La présente demande concerne donc l'utilisation de cette protéine comme cible pour le développement de nouvelles molécules ou de méthodes de diagnostic. Elle concerne également des composés régulateurs de la protéine EHTA et leur utilisation thérapeutique. Elle concerne également des méthodes et compositions pour le criblage de composés actifs. Elle est particulièrement adaptée au diagnostic, suivi ou traitement de cancers.

Un premier objet de l'invention concerne une protéine EHTA sous forme isolée ou purifiée, ainsi que des variants et fragments de celle-ci.

Un autre objet de l'invention concerne une composition comprenant une protéine EHTA sous forme isolée ou purifiée, ou des variants ou fragments de celle-ci.

Un autre objet de l'invention concerne un vecteur comprenant un acide nucléique codant la protéine EHTA, ainsi que toute cellule recombinante exprimant une protéine EHTA. Une telle cellule recombinante comprend typiquement un vecteur tel que défini ci-avant ou un acide nucléique codant une protéine EHTA, et exprime une protéine EHTA.

Un autre objet de l'invention réside dans l'utilisation d'un inhibiteur de la protéine EHTA pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des cancers, notamment pour inhiber la formation de métastases chez les patients atteints de cancers.

Un autre objet de l'invention réside dans l'utilisation d'un inhibiteur de la protéine EHTA pour la préparation d'un médicament destiné à inhiber l'angiogénèse, à réguler la perméabilité vasculaire ou para-cellulaire ou à préserver ou restaurer l'intégrité tissulaire.

Un autre objet de l'invention concerne un composé antagoniste ou inhibiteur de la protéine EHTA, notamment un anticorps, un antisens, un ligand cytotoxique.

L'invention concerne également un procédé de détection d'une pathologie ou d'une prédisposition à une pathologie chez un sujet, ou de suivi de l'évolution ou du stade d'avancement d'une pathologie, comprenant la détermination de la présence, de la quantité (relative ou absolue) ou de la distribution, dans un échantillon dudit sujet, de la protéine EHTA, de son expression, de formes altérées de celle-ci ou du gène ou ARN messager correspondant.

Elle concerne encore des procédés de sélection, criblage, caractérisation, optimisation ou production de composés actifs, comprenant une étape de détermination de la capacité d'un composé test à interagir avec la protéine ou le gène EHTA, à moduler son expression ou à moduler son activité.

PRODUITS ET DEFINITIONS

Protéine EHTA

Dans le contexte de l'invention, le terme protéine EHTA désigne tout polypeptide comprenant la séquence SEQ ID NO : 2, un variant de la séquence SEQ ID NO : 2, ou un fragment de celles-ci.

Le terme « variant » désigne en particulier tous les variants naturels de la séquence SEQ ID NO : 2, résultant par exemple de polymorphisme(s), épissage(s), mutations(s), etc. De tels variants naturels peuvent donc comprendre une ou plusieurs mutations ou substitutions, une délétion d'un ou plusieurs résidus, etc. par rapport à la séquence SEQ ID NO : 2. Le terme variant désigne également les polypeptides EHTA ayant pour origine une autre espèce, par exemple de rongeurs, bovins, etc. Avantageusement, le terme protéine EHTA désigne un polypeptide d'origine humaine.

Le terme « variant » inclut également tout variant synthétique d'une protéine EHTA, et notamment tout polypeptide comprenant une ou plusieurs mutations, délétions, substitutions et/ou additions d'un ou plusieurs acides aminés par rapport à la séquence SEQ ID NO 2. De préférence, il s'agit de polypeptides reconnus par un anticorps polyclonal produit à partir de la protéine EHTA de séquence SEQ ID NO 2.

Des variants préférés comportent avantageusement au moins 75% d'identité avec la séquence primaire SEQ ID NO : 2, préférentiellement au moins 80%, plus préférentiellement au moins 85%. Encore plus préférentiellement, les variants préférés comportent au moins 90% d'identité avec la séquence primaire SEQ ID NO : 2, de préférence au moins 95%, 96%, 97% ou 98%. Le degré d'identité peut être déterminé par différentes méthodes et au moyen de logiciels connus de l'homme du métier, comme par exemple selon la méthode CLUSTAL.

Des variants particuliers possèdent une mutation ou une substitution affectant 5 acides aminés au plus de la séquence SEQ ID NO 2.

Typiquement, les variants selon l'invention sont des polypeptides conservant au moins une propriété immunologique, biologique ou pharmacologique de la protéine EHTA de séquence SEQ ID NO :2. Les propriétés biologiques sont notamment la modulation de l'adhésion cellulaire, de la perméabilité para-cellulaire ou de la contraction de jonctions inter-cellulaires. Les propriétés immunologiques sont par exemple la capacité de produire des anticorps reconnaissant la protéine de SEQ ID NO : 2.

Comme indiqué, le terme protéine EHTA inclut également des polypeptides comprenant des fragments de la séquence SEQ ID NO : 2 ou d'un variant de celle-ci. Il s'agit plus particulièrement des polypeptides comprenant une partie de la séquence SEQ ID NO :2.

Les polypeptides fragments de l'invention contiennent de préférence moins de 200 acides aminés, plus préférentiellement moins de 180 acides aminés, encore plus préférentiellement moins de 150 acides aminés, par exemple moins de 120 acides aminés. Ils comportent avantageusement au moins 5 résidus consécutifs de la séquence de la protéine EHTA. Avantageusement, les polypeptides fragments contiennent au moins une région ou un domaine fonctionnel de la protéine EHTA de séquence SEQ ID NO :2, comme par exemple un domaine d'adressage membranaire, un domaine trans-membranaire, un site de liaison au domaine de type PDZ, un épitope, une structure secondaire (boucle, feuillet, etc.), un site consensus, etc.

L'analyse de la protéine EHTA montre qu'elle comporte des domaines fonctionnels localisés aux positions suivantes :

- domaines trans-membranaires : résidus 14-31, 101-123, 139-162 et 169-190 ;
- site putatif de phosphorylation par PKC : résidus 210-212 ;
- site putatif de phosphorylation sur tyrosine : résidus 214-221 ;
- site d'interaction avec les protéines à domaines PDZ : résidus 217-226.

Des polypeptides préférés de l'invention comprennent moins de 200 acides aminés de la séquence SEQ ID NO 2, plus préférentiellement moins de 150, encore plus préférentiellement moins de 100, et comportent au moins les résidus 14-31, 101-123, 139-162, 169-190, 210-212, 214-221 ou 217-226 de la séquence SEQ ID NO 2.

D'autres polypeptides préférés de l'invention comprennent moins de 200 acides aminés de la séquence SEQ ID NO 2 et comportent au moins un domaine antigénique spécifique de la séquence SEQ ID NO 2.

Un autre polypeptide particulier est caractérisé en ce qu'il comprend un fragment de la séquence SEQ ID NO :2 et en ce qu'il comporte au moins un domaine immunogène de

la protéine EHTA humaine. La présente demande propose en effet la production de polypeptides fragments de EHTA comportant de préférence une portion immunogène de EHTA, qui sont utilisables pour la production d'anticorps, de tests de dosages, etc. Ces polypeptides peuvent être élaborés en utilisant des algorithmes permettant d'évaluer l'hydrophilicité ou l'antigénicité d'un polypeptide. Au sens de l'invention, le terme "fragment » ou « portion » immunogène désigne toute portion du polypeptide comprenant un épitope, de préférence un épitope T ou B. Un tel fragment comprend donc avantageusement au moins 7 acides aminés consécutifs de la séquence SEQ ID NO :2 , plus préférentiellement au moins 10 acides aminés consécutifs de la séquence SEQ ID NO :2, encore plus préférentiellement au moins 15 acides aminés consécutifs de la séquence SEQ ID NO :2.

Des fragments particuliers au sens de l'invention conservent une ou plusieurs propriétés de EHTA telles que mentionnées ci-avant. De tels variants ou fragments biologiquement actifs sont utilisables pour mimer l'action de EHTA ou pour produire des anticorps correspondants.

D'autres fragments particuliers au sens de l'invention sont des polypeptides capables d'antagoniser l'activité de EHTA. De tels fragments sont utilisables pour inhiber l'action de EHTA.

Les polypeptides ou protéines EHTA de l'invention peuvent comprendre des résidus hétérologues ajoutés à la séquence d'acides amines indiquée. Ainsi, un objet de l'invention réside dans un polypeptide comprenant tout ou partie de la séquence SEQ ID NO :2, ou d'un variant de celle-ci, et une partie hétérologue.

La partie hétérologue peut correspondre à des acides aminés, lipides, sucres, etc. Il peut également s'agir de groupe(s) chimique(s), enzymatique(s), radioactif(s), etc. La partie hétérologue peut en particulier constituer un marqueur, un agent de ciblage, un agent stabilisateur, un agent améliorant l'immunogénicité ou facilitant la production, un agent protecteur, un agent facilitant la pénétration du polypeptide dans les cellules, une toxine, ou composé actif, un anticorps, etc..

Les protéines EHTA de l'invention peuvent se présenter sous forme soluble, purifiée ou complexée avec une molécule porteuse telle que KLH ou la sérum-albumine, ou toute autre molécule inerte (par exemple synthétique), telle qu'une bille par exemple. Les polypeptides selon l'invention sont préférentiellement dépourvus de contamination par des protéines naturellement présentes dans leur environnement naturel. Dans un mode de mise en œuvre particulier, les polypeptides sont couplés à une molécule porteuse notamment pour la fabrication d'anticorps. Le couplage peut être réalisé selon des techniques conventionnelles. Les polypeptides peuvent également être conjugués ou fusionnés à toute autre molécule polypeptidique ou peptidique telle que par exemple un peptide, polypeptide ou une protéine biologiquement active.

Les protéines EHTA de l'invention peuvent être fabriquées par toute technique connue en soi de l'homme du métier, notamment par toute technique chimique, biologique, génétique, enzymatique, etc., seule ou en combinaison(s). Des méthodes préférées comprennent l'expression, dans un hôte cellulaire approprié, d'un acide nucléique correspondant ou la synthèse artificielle selon des techniques conventionnelles telles que la synthèse en phase solide.

Les protéines EHTA selon l'invention peuvent être utilisées dans des tests de sélection ou de criblage, dans des méthodes de dosage, pour réguler l'activité de EHTA in vitro ou in vivo, pour la production de médicaments ou vaccins, pour le ciblage de molécules, pour la production d'anticorps anti-EHTA, notamment d'anticorps thérapeutiques, etc.

Gène EHTA

Au sens de l'invention, on entend par « gène EHTA » tout acide nucléique codant une protéine EHTA telle que définie ci-avant. Il peut s'agir d'un ADN ou d'un ARN, d'origine naturelle ou synthétique. Il peut notamment s'agir d'ADN génomique, complémentaire, chimérique, artificiel, d'ARNm, etc. Le gène EHTA peut être sous forme simple-brin ou double-brin. Il peut être obtenu par toute technique connue de l'homme de l'art à partir de la séquence SEQ ID NO : 1 et des informations contenues

dans la présente demande. Un gène EHTA particulier comprend tout ou partie de la séquence SEQ ID NO :1 ou d'une séquence complémentaire, ou d'une séquence différente en raison de la dégénérescence du code génétique, ou d'une séquence hybridant avec celles-ci dans des conditions de stringence élevée et codant une protéine EHTA.

Le gène EHTA de l'invention peut être incorporé dans un vecteur de clonage ou d'expression, dans le génome d'une cellule, etc.

Des exemples de vecteurs utilisables pour cloner un gène EHTA de l'invention sont notamment des plasmides, cosmides, épisomes, chromosomes artificiels, virus, phages, etc. On peut citer divers plasmides commerciaux tels que pUC, pcDNA, pBR, etc. Parmi les vecteurs viraux, on peut citer les rétrovirus, adénovirus, AAV, herpès virus, etc. De tels vecteurs constituent des objets particuliers de l'invention.

Le gène ou vecteur peut être introduit dans une cellule hôte, afin de produire une protéine EHTA. Des exemples de cellules utilisables sont notamment des cellules de mammifères, de levure, de plante, d'insecte ou de bactérie. On peut citer des cellules primaires ou des lignées établies de cellules de mammifère. On peut citer comme exemple de cellules de mammifères des hépatocytes, des fibroblastes, des cellules endothéliales ou des lignées cellulaires telles que MDCK, HepG2, CHO, Véro, 293, etc. Parmi les cellules de bactérie ou de levure, on peut citer notamment E. Coli, Saccharomyces et Kluyveromyces, par exemple. De telles cellules recombinantes constituent des objets particuliers de l'invention.

Sonde Nucléique

Un objet particulier de l'invention concerne une sonde nucléique caractérisée en ce qu'elle permet la détection d'un gène EHTA ou d'un ARN correspondant, typiquement par hybridation sélective à partir d'un échantillon. Généralement, la sonde comprend la séquence d'un gène EHTA tel que défini ci-avant ou une partie de celle-ci. Une sonde de l'invention comprend typiquement de 10 à 1000 nucléotides, de préférence de 20 à 800,

plus préférentiellement de 50 à 600, et est généralement simple-brin. Un exemple particulier de sonde est représenté par un oligonucléotide spécifique et complémentaire d'une région au moins d'un gène EHTA ou de l'ARN correspondant. L'oligonucléotide est typiquement simple-brin, et comporte généralement de 10 à 100 bases. Un autre exemple de sonde nucléique de l'invention comprend la séquence SEQ ID NO :1 ou la partie codante de celle-ci. Les sondes nucléiques selon l'invention peuvent être marquées, par exemple au moyen de marqueurs radioactifs, enzymatiques, fluorescents, luminescents, etc. Les sondes peuvent être sous forme libre ou immobilisée sur un support (colonne, bille, lame, membrane, etc.).

A cet égard, un objet particulier de l'invention concerne un produit comprenant au moins un acide nucléique comprenant tout ou une partie spécifique de la séquence SEQ ID NO : 1, immobilisé sur un support. Le support peut être solide, plan ou non, régulier ou non, comme par exemple du nylon, verre, plastique, métal, fibre, céramique, silice, polymère, etc., ou tout autre matériau compatible. L'acide nucléique est préférentiellement immobilisé par une extrémité, dans des conditions laissant la molécule accessible pour une réaction d'hybridation. Des techniques d'immobilisation de matériels (tels que acides nucléiques, polypeptides, anticorps, etc.) sur des supports ont été décrites dans la littérature, et notamment dans les demandes ou brevets n° EP619 321, WO91/08307, US4,925,785 et GB2,197,720.

Amorce Spécifique

Un autre objet de l'invention concerne une amorce nucléique, permettant l'amplification (sélective) d'un gène EHTA ou d'une partie (spécifique) de celui-ci. Une amorce selon l'invention est avantageusement composée de 3 à 50 bases, de préférence de 5 à 40 et encore plus préférentiellement de 6 à 35 bases. Elle est typiquement simple-brin. Une amorce particulière est complémentaire d'une région au moins du gène EHTA ou de l'ARN correspondant.

Un mode de réalisation préféré réside dans une amorce constituée d'un acide nucléique simple-brin comprenant de 6 à 50 nucléotides complémentaires d'une partie au moins de la séquence SEQ ID NO : 1 ou de son brin complémentaire.

L'invention concerne également une paire d'amorces comprenant une séquence sens et une séquence inverse, caractérisée en ce que les amorces de ladite paire s'hybrident avec une région d'un gène EHTA et permettent l'amplification d'au moins une portion de celui-ci. Les amorces peuvent être complémentaires d'une partie de la région codante du gène EHTA, ou des régions régulatrices (promoteur, terminateur, etc.).

Acide Nucléique Inhibiteur

On entend par acide nucléique inhibiteur tout acide nucléique capable d'inhiber la transcription du gène EHTA ou la traduction du messager correspondant.

L'acide nucléique inhibiteur peut comprendre tout ou partie de la séquence du gène EHTA, d'un fragment de celle-ci, du messager de la EHTA, ou d'une séquence complémentaire à celles-ci. L'inhibiteur peut notamment comprendre une région complémentaire d'une partie de la séquence SEQ ID NO :1 et inhiber (ou réduire) sa traduction en protéine. L'inhibiteur est préférentiellement complémentaire d'une portion au moins de la région codante de la séquence SEQ ID NO :1. La complémentarité de l'acide nucléique est préférentiellement parfaite, même si certains mésappariements peuvent être tolérés. L'inhibiteur peut être de l'ADN ou de l'ARN, et il peut s'agit d'un anti-sens, d'un ribozyme (WO 99/32618), d'un ARNi (WO01/29058 ; WO01/75164), etc., ou d'un vecteur codant pour ceux-ci. Il peut être simple-brin ou double-brin. Sa longueur peut varier entre quelques bases et plusieurs centaines de bases, par exemple jusqu'à la longueur complète de la séquence SEQ ID NO :1 ou de l'ARNm de EHTA. Il peut également s'agir d'un ARN codé par un gène anti-sens. S'agissant d'un oligonucléotide anti-sens ou interférant, il comprend typiquement moins de 100 bases, par exemple de l'ordre de 10 à 50 bases. Cet oligonucléotide peut être modifié pour améliorer sa stabilité, sa résistance aux nucléases, sa pénétration cellulaire, etc.

De tels acides nucléiques inhibiteurs représentent des objets particuliers de l'invention, ainsi que des compositions pharmaceutiques les comprenant, en association avec tout véhicule ou excipient acceptable sur la plan pharmaceutique.

Anticorps

Un autre objet de l'invention concerne tout anticorps spécifique d'une protéine ou d'un polypeptide EHTA, c'est-à-dire capable de se lier, de préférence de manière sélective, à un tel polypeptide ou protéine. L'anticorps peut être polyclonal ou monoclonal. Il peut également s'agir de fragments et dérivés d'anticorps présentant substantiellement la même spécificité antigénique, en particulier des fragments d'anticorps (e.g., Fab, Fab'2, CDRs), d'anticorps humanisés, poly-fonctionnels, monocaténaires (ScFv), etc. Les anticorps peuvent être produits à l'aide de méthodes conventionnelles, comprenant l'immunisation d'un animal non-humain avec une protéine EHTA ou un fragment de celle-ci comportant un épitope, et la récupération de son sérum (polyclonal) ou de cellules spléniques (de manière à produire des hybridomes par fusion avec des lignées cellulaires appropriées).

Diverses méthodes de production d'anticorps polyclonaux à partir d'espèces variées ont été décrites dans l'art antérieur. Typiquement, l'antigène est combiné avec un adjuvant (e. g., Freund's adjuvant) et administré à un animal, par exemple par injection sous-cutanée. Des injections répétées peuvent être réalisées. Les échantillons sanguins sont collectés et l'immunoglobuline ou le sérum sont séparés.

Les méthodes classiques de production d'anticorps monoclonaux comprennent l'immunisation d'un animal non-humain avec un antigène, suivie de la récupération des cellules spléniques qui sont ensuite fusionnées avec des cellules immortalisées, telles que des cellules de myélome. Les hybridomes résultant produisent des anticorps monoclonaux et peuvent être sélectionnés par dilutions limites de manière à isoler les clones individuels.

Les fragments Fab ou F(ab')2 peuvent être produits par digestion à l'aide d'une protéase selon les techniques conventionnelles.

L'invention concerne également une méthode de production d'anticorps, comprenant l'injection d'une protéine EHTA telle que définie ci-avant (ou d'un fragment immunogène de celle-ci) à un animal non humain et la récupération des anticorps ou des cellules productrices d'anticorps.

Les anticorps préférés sont des anticorps spécifiques de la protéine EHTA, c'est-à-dire ayant une affinité supérieure pour la protéine EHTA que pour d'autres antigènes, même si une liaison non-spécifique ou moins affine ne peut être exclue.

L'invention concerne également des hybridomes produisant les anticorps monoclonaux décrits ci-dessus et leur utilisation pour produire lesdits anticorps.

Les anticorps de l'invention peuvent être couplés à des fragments hétérologues tels que des toxines, des marqueurs, des médicaments ou tout autre agent thérapeutique, de façon covalente ou non, soit directement, soit par l'intermédiaire d'agents de couplage. Les marqueurs peuvent être choisis parmi les radio-marqueurs, des enzymes, des agents fluorescents, des particules magnétiques, etc. Les toxines peuvent être choisies parmi la toxine dipthérique, botulique, la ricine, etc.

Les anticorps de l'invention peuvent également être immobilisés sur un support, tel qu'une bille, colonne, gel, puce, etc. A cet égard, un objet particulier de l'invention concerne un produit comprenant au moins un anticorps spécifique d'une protéine EHTA immobilisé sur un support. Le support peut être solide, plan ou non, régulier ou non, comme par exemple du nylon, verre, plastique, métal, fibre, céramique, silice, polymère, etc., ou tout autre matériau compatible. L'anticorps est préférentiellement immobilisé par une extrémité, dans des conditions laissant la molécule accessible pour une réaction immunologique.

METHODES DE DETECTION/DIAGNOSTIC

La présente demande décrit de nouveaux procédés de détection d'une pathologie ou d'une prédisposition à une pathologie chez un sujet, ou de suivi de l'évolution ou du stade d'avancement d'une pathologie, comprenant la détermination de la présence, de la quantité (relative ou absolue) ou de la distribution, dans un échantillon dudit sujet, de la protéine EHTA, de son expression, de formes altérées de celle-ci ou du gène ou ARN messager correspondant.

La détermination peut être réalisée par différentes techniques, telles que séquençage, hybridation et/ou amplification sélectives. Des méthodes utilisables pour déterminer la présence de protéines (ou domaines protéiques) sont basées par exemple sur des réactions immuno-enzymatiques, telles que ELISA, RIA, EIA, etc. Des techniques utilisables pour déterminer la présence ou l'expression de gènes ou d'ARN sont par exemple la PCR, la RT-PCR, la réaction de ligation en chaîne (LCR), la technique de PCE ou TMA (« Transcriptional Mediated Amplification »), la migration sur gel, l'électrophorèse, notamment la DGGE (« denaturing gel gradient electrophoresis »), etc.

Dans le cas où une étape d'amplification est réalisée, celle-ci met préférentiellement en oeuvre une amorce ou une paire d'amorces telle que définie ci-avant.

Un objet particulier de l'invention concerne l'utilisation d'acides nucléiques complémentaires et spécifiques du gène EHTA pour la détection de cancers, la caractérisation de cancers ou pour le suivi de la progression de cancers, notamment de la formation de métastases. Cette détection peut s'effectuer grâce à des puces à ADN ou par mise en œuvre d'une PCR à partir de biopsie ou de fluides biologiques tels que du sang (le sérum notamment), des urines, du fluide séminal, etc.

L'invention réside également dans la mise au point et l'utilisation de tests immunologiques contenant un ou plusieurs anticorps tels que décrits ci-dessus ou fragments de ces derniers. Ces tests permettent de détecter et/ou mesurer la présence et/ou la quantité de protéine EHTA dans un échantillon biologique, cette quantité étant corrélée à un processus pathologique.

Une méthode particulière comprend la mise en contact d'un échantillon provenant d'un sujet avec une sonde nucléique telle que définie ci-avant, et la mise en évidence d'une hybridation.

Une autre méthode particulière comprend la mise en contact d'un échantillon provenant d'un sujet avec une amorce ou une paire d'amorces telles que définies ci-avant, et la mise en évidence d'un produit d'amplification.

Une autre méthode particulière comprend la mise en contact d'un échantillon provenant d'un sujet avec un anticorps tel que défini ci-avant, et la mise en évidence d'un complexe antigène-anticorps.

Plusieurs tests peuvent réalisés en parallèle, à partir de plusieurs échantillons et/ou en utilisant plusieurs sondes, amorces et/ou anticorps.

Comme indiqué ci-avant, la protéine EHTA est impliquée dans les mécanismes d'adhésion cellulaire, de perméabilité para-cellulaire, d'interaction entre cellules et d'angiogénèse. La surexpression de cette protéine induit un relâchement des liaisons intercellulaires et est observée dans des tissus pathologiques, notamment les tissus cancéreux. La détection ou le dosage de cette protéine (ou de formes altérées) dans un échantillon d'un sujet constitue donc un indicateur de la présence de telles événements pathologiques et de la sévérité de ces pathologies.

Un autre objet de l'invention réside dans un kit utilisable pour la mise en œuvre d'un procédé tel que défini ci-avant comprenant

i. un couple d'amorces ou une sonde ou un anticorps tels que définis ci-avant, et

ii. les réactifs nécessaires à l'amplification ou à une réaction d'hybridation ou immunologique.

CRIBLAGE DE COMPOSES ACTIFS

La protéine EHTA selon l'invention représente une cible thérapeutique particulièrement intéressante pour le traitement des cancers, de l'angiogénèse, des maladies tissulaires ou pour la régulation de l'adhésion cellulaire ou de la perméabilité para-cellulaire. L'invention permet donc la mise au point de procédés de sélection, criblage, caractérisation, optimisation ou production de composés actifs, basés sur une détermination de la capacité de composés tests à interagir avec EHTA, à moduler son expression ou à moduler son activité.

A cet égard, un objet particulier de l'invention réside dans une méthode de sélection, d'identification, de caractérisation, d'optimisation ou de production de composés actifs, comprenant la mise en contact in vitro ou ex vivo d'un composé test avec une protéine EHTA telle que définie ci-avant, et la sélection ou l'identification des composés se liant à ladite protéine. Dans ce procédé, la protéine EHTA (ou tout fragment de celle-ci) peut être utilisée sous forme soluble ou immobilisée à un support (colonne, bille, plaque, etc.).

Dans un autre mode de réalisation, l'invention réside dans une méthode de sélection, d'identification, de caractérisation, d'optimisation ou de production de composés actifs, comprenant la mise en contact in vitro ou ex vivo d'un composé test avec une cellule exprimant une protéine EHTA telle que définie ci-avant, et la sélection ou l'identification de composés modulant l'expression ou l'activité de ladite protéine.

Dans un autre mode de réalisation, l'invention réside dans une méthode de sélection, d'identification, de caractérisation, d'optimisation ou de production de composés actifs, comprenant la mise en contact in vitro ou ex vivo d'un composé test avec un gène EHTA ou un ARN correspondant, et la sélection ou l'identification de composés se liant au dit gène ou ARN. Dans ce procédé, il est possible d'utiliser des portions du gène ou de l'ARN.

Dans un autre mode de réalisation, l'invention réside dans une méthode de sélection, d'identification, de caractérisation, d'optimisation ou de production de composés actifs, comprenant la mise en contact in vitro ou ex vivo d'un composé test avec un acide nucléique comprenant la séquence du promoteur du gène EHTA, et la sélection ou l'identification de composés se liant au dit promoteur. Dans une variante particulière, on utilise une construction génétique comprenant un gène rapporteur placé sous le contrôle du promoteur, et l'effet du composé est déterminé par mesure de l'expression du gène rapporteur (ou de variation dans le niveau d'expression, par rapport à une situation contrôle).

La liaison à la protéine EHTA, au gène ou à l'ARN correspondant peut être mesurée par différentes techniques, telles que le déplacement d'un ligand marqué, la migration sur gel, l'électrophorèse, etc. La modulation de l'expression peut être déterminée par dosage des ARN ou des protéines, ou au moyen d'un système rapporteur. Les cellules utilisées peuvent être toute cellule compatible, notamment des cellules eucaryotes ou procaryotes.

Ces cellules peuvent être des cellules de mammifères, des bactéries, des cellules de levure, de plante, d'insecte, etc. Il peut s'agir de cultures primaires ou de lignées établies. On peut citer comme exemple de cellules de mammifères des hépatocytes, des fibroblastes, des cellules endothéliales ou des lignées cellulaires telles que MDCK, HepG2, CHO, Véro, 293, etc. Parmi les cellules de bactérie ou de levure, on peut citer notamment E. Coli, Saccharomyces et Kluyveromyces, par exemple.

Le procédé de sélection peut être mis en œuvre dans tout support approprié, comme par exemple une plaque, un tube, une flasque, etc., typiquement dans un support multi-récipients, comme des plaques multi-puits.

Le procédé peut être mis en œuvre pour sélectionner ou identifier un activateur ou un inhibiteur de l'expression ou de l'activité de la protéine EHTA. Pour l'obtention de composés anti-cancéreux, on sélectionne des inhibiteurs de EHTA.

A cet égard, un objet particulier de l'invention concerne des méthodes de sélection, d'identification, ou de caractérisation de composés anti-cancéreux, comprenant la mise en contact d'un ou de plusieurs composés tests avec une protéine EHTA, un gène EHTA ou une cellule exprimant une protéine EHTA, et la sélection des composés inhibant l'expression ou l'activité de EHTA ou se liant à celle-ci.

APPLICATIONS THERAPEUTIQUES

La présente demande décrit l'identification d'une nouvelle protéine impliquée dans la réalisation de jonctions inter-cellulaires. Cette protéine, lorsqu'elle est surexprimée, induit un relâchement des jonctions inter-cellulaires, et peut donc réguler la perméabilité para-cellulaire. En outre, cette protéine se trouve surexprimée dans des cellules tumorales, ce qui confirme son rôle dans le relâchement de l'épithélium et son implication dans la formation de métastases. Cette protéine représente donc une cible particulièrement intéressante pour des interventions thérapeutiques visant à réguler l'adhésion ou la perméabilité cellulaire, notamment dans des pathologies liées à l'angiogénèse, la perméabilité épithéliale ou à une prolifération cellulaire incontrôlée ou pathologique.

Une application thérapeutique particulièrement bénéfique réside dans le traitement des pathologies liées à une prolifération cellulaire incontrôlée ou pathologique, notamment les cancers.

Un objet particulier de l'invention réside donc dans l'utilisation d'un inhibiteur de la protéine EHTA pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des cancers.

Un autre objet de l'invention réside dans l'utilisation d'un inhibiteur de la protéine EHTA pour la préparation d'un médicament destiné à inhiber la formation de métastases chez les patients atteints de cancers. En effet, il est établi que l'angiogenèse est non seulement essentielle à la croissance d'une tumeur mais est aussi impliquée dans la progression du stade bénin au stade du cancer invasif, et dans la progression de

métastases dormantes vers des lésions métastatiques. La possibilité de réguler négativement l'angiogénèse et de renforcer l'adhésion cellulaire permet de réduire la progression métastasique des cancers.

L'invention est utilisable notamment pour inhiber la croissance des vaisseaux sanguins dans les tumeurs ou au voisinage de tumeurs.

L'invention est utilisable pour le traitement de différents types de cancers, notamment de tumeurs solides, comme par exemple les cancers du sein, du poumon, de la prostate, du colon, de l'utérus, tête-et-cou, du cerveau (e.g., glioblastome), de la peau, du foie, de la vessie, etc. Elle est particulièrement adaptée au traitement du cancer de la prostate, du sein et du colon.

Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'un inhibiteur de la protéine EHTA pour la préparation d'un médicament destiné à inhiber l'angiogénèse.

L'angiogenèse, le développement de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de la vasculature préexistante, a lieu principalement au cours du développement embryonaire. Ce processus est également hautement régulé au stade adulte durant les processus de cicatrisation, d'ovulation et de menstruation. De nombreuses pathologies ont été décrites comme ayant une composante ou un stade lié au phénomène d'angiogenèse. On peut citer entre autres de très nombreux cancers, les rétinopathies liées au diabète, l'athérosclérose, l'arthrose, la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis, ainsi que les pathologies liées à une cicatrisation retardée. L'invention permet donc de contrôler la l'apparition, la progression ou le développement de ces pathologies chez des patients.

Un objet particulier de l'invention réside donc dans l'utilisation d'un inhibiteur de la protéine EHTA pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des rétinopathies liées au diabète, de l'athérosclérose, de l'arthrose, de la polyarthrite rhumatoïde, du psoriasis, ainsi que les pathologies liées à une cicatrisation retardée.

Un autre objet de l'invention réside dans l'utilisation d'un inhibiteur de la protéine EHTA pour la préparation d'un médicament destiné à favoriser la cicatrisation.

Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'un inhibiteur de la protéine EHTA pour la préparation d'un médicament destiné à réguler l'adhésion cellulaire. La régulation de l'adhésion cellulaire est importante dans les greffes d'organes ou de tissus et dans le contrôle de pathologies tissulaires et de la perte de fonction d'organes, notamment liées à une ischémie tissulaire, des oedèmes, etc.

Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'un inhibiteur de la protéine EHTA pour la préparation d'un médicament destiné à réguler la perméabilité vasculaire ou para-cellulaire.

Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'un inhibiteur de la protéine EHTA pour la préparation d'un médicament destiné à préserver ou restaurer l'intégrité tissulaire.

Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'un inhibiteur de la protéine EHTA pour la préparation d'un médicament destiné à diminuer l'inflammation. L'angiogenèse et l'inflammation sont deux processus étroitement liés et de nombreuses pathologies inflammatoires comportent une composante angiogénique. Un contrôle de l'angiogenèse peut donc résulter en un bénéfice dans certaines pathologies inflammatoires.

Un autre objet de l'invention concerne des méthodes de traitement des pathologies mentionnées ci-dessus, comprenant l'administration à un patient d'une quantité efficace d'un inhibiteur de la protéine EHTA.

Dans le contexte de l'invention, le terme « traitement » désigne le traitement préventif, curatif, palliatif, ainsi que la prise en charge des patients (réduction de la souffrance, amélioration de la durée de vie, ralentissement de la progression de la maladie), etc. Le traitement peut en outre être réalisé en combinaison avec d'autres agents ou traitements

(chimiothérapie, radiothérapie, thérapie génique, etc.). Les traitements et médicaments de l'invention sont tout particulièrement destinés aux humains.

Un objet particulier de l'invention réside dans l'utilisation combinée d'un inhibiteur de la protéine EHTA et d'un agent de chimiothérapie ou de radiothérapie, pour le traitement d'un cancer, notamment pour inhiber la formation de métastases, tout particulièrement chez des patients atteints de cancer de la prostate, du colon ou du sein.

L'agent de chimiothérapie peut être choisi parmi tous les composés et traitement anti-tumoraux connus, incluant notamment les cytokines, interférons, gènes ou protéines suppresseur de tumeur et les agents chimiques tels que : méthotrexate, vinblastine, adriamycine, cyclophosphamide, Cis-platine, etc.

Au sens de l'invention, le terme « inhibiteur » de la protéine EHTA désigne tout composé, traitement ou composition capable d'inhiber l'expression de la protéine EHTA ou son activité. Il peut s'agir notamment d'un composé, traitement ou composition inhibant la transcription du gène, la maturation des ARNs, la traduction de l'ARNm, la modification post-traductionnelle de la protéine, sa translocation vers la membrane, etc. Il peut également s'agir d'un composé, traitement ou composition inhibant l'activité de la protéine EHTA, par exemple en inhibant son interaction avec d'autres constituants cellulaires, notamment avec d'autres constituants des jonctions serrées. L'inhibiteur est préférentiellement sélectif, c'est-à-dire sans effet direct et spécifique sur d'autres protéines ou gènes.

Le terme « inhiber » inclut toute réduction de l'expression ou de l'activité de la protéine EHTA, même si celle-ci n'est pas totale. On préfère néanmoins des inhibiteurs capables de réduire in vitro de 20% au moins l'expression ou l'activité de la protéine EHTA, plus préférentiellement de 30% au moins. En outre, des inhibiteurs particulièrement préférés sont des inhibiteurs sélectifs, c'est-à-dire qui agissent principalement sur la protéine EHTA et, dans une moindre mesure ou de manière essentiellement indirecte, sur d'autres cibles ou mécanismes. La sélectivité peut être déterminée en testant l'effet des

inhibiteurs sur d'autres protéines cellulaires, notamment sur d'autres protéines impliquées dans la formation de jonctions serrées.

Dans un premier mode de réalisation particulier, le composé est un acide nucléique inhibiteur (e.g., anti-sens, ribozyme, RNAi, etc.) capable d'inhiber la transcription du gène EHTA ou la traduction du messager correspondant. Il s'agit tout particulièrement d'un oligonucléotide antisens ou d'un ARNi, ou d'un gène codant ceux-ci.

Dans un autre mode de réalisation, le composé est un peptide comprenant une région de la protéine EHTA et capable d'antagoniser son activité. Le peptide comprend avantageusement 5 résidus consécutifs au moins de la protéine EHTA, plus généralement entre 10 et 100. Le peptide comprend typiquement le site de liaison au domaine PDZ de la protéine EHTA, localisé au niveau des résidus 217 à 226.

Selon un autre mode de réalisation, l'inhibiteur est un anticorps spécifique de la protéine EHTA, ou un fragment ou dérivé d'un tel anticorps, tels que définis ci-avant. De tels anticorps, fragments et dérivés constituent des objets particuliers de la présente demande.

L'anticorps peut également être couplé à un fragment hétérologue, tel qu'une toxine, un médicament ou tout autre agent thérapeutique, de façon covalente ou non, soit directement, soit par l'intermédiaire d'agents de couplage. A cet égard, dans une variante particulière de mise en œuvre, le composé inhibiteur est un ligand cytotoxique spécifique de EHTA. De tels ligands cytotoxiques sont particulièrement adaptés pour le traitement de cancers. Des ligands cytotoxiques spécifiques sont typiquement des molécules comportant une région conférant la cytotoxicité et une région conférant la spécificité vis-à-vis de EHTA. La région conférant la cytotoxicité peut être toute molécule toxique pour une cellule, soit par elle-même, soit de manière conditionnelle ou indirecte (c'est-à-dire en rendant la cellule sensible à un agent chimique ou au système immunitaire du patient, par exemple). La région conférant la spécificité vis-à-vis de EHTA est typiquement un anticorps ou fragment d'anticorps tel que défini ci-avant. Il

peut cependant s'agir également de ligands spécifiques de EHTA, notamment d'une partie d'un récepteur ou partenaire cellulaire de EHTA.

Selon un autre mode de réalisation, le composé inhibiteur est un composé chimique, d'origine naturelle ou synthétique, notamment une molécule organique ou inorganique, d'origine végétale, bactérienne, virale, animale, eucaryote, synthétique ou semi-synthétique, capable de moduler l'expression ou l'activité de la protéine EHTA. Un tel inhibiteur est préférentiellement obtenu ou issu d'une méthode de sélection telle que définie ci-avant.

Pour la mise en œuvre des méthodes thérapeutiques définies ci-avant, l'inhibiteur peut être utilisé à différentes doses et selon différents protocoles. En outre, il peut être utilisé seul ou, de préférence, combiné à d'autres agents actifs. L'administration peut être réalisée par toute méthode connue de l'homme du métier, de préférence par injection, typiquement par voie intra-péritonéale, intra-tumotale, intra-dermique, intra-cérébrale, intra-veineuse, intra-artérielle ou intra-musculaire. Les doses administrées peuvent être adaptées par l'homme de l'art. Typiquement, de 0,01 mg à 100 mg / kg environ sont injectés, pour des composés inhibiteurs de nature chimique. Pour des composés nucléiques, les doses peuvent varier par exemple entre 0,01 mg et 100 mg par dose. Pour des anticorps thérapeutiques, les doses peuvent varier par exemple entre 0,01 mg et 100 mg par dose. Il est entendu que des injections répétées peuvent être réalisées, éventuellement en combinaison avec d'autres agents actifs ou tout véhicule acceptable sur le plan pharmaceutique (ex., tampons, solutions saline, isotonique, en présence d'agents stabilisants, etc.).

L'invention est utilisable chez les mammifères, notamment chez l'être humain. Les résultats présentés dans cette demande illustrent l'implication de la protéine EHTA dans les mécanismes de perméabilité para-cellulaire et sa dérégulation dans des tissus pathologiques, et démontrent l'intérêt d'approches thérapeutiques basées sur la régulation de cette protéine.

MATERIELS ET METHODES UTILISES

Toute la partie de biologie moléculaire (clonage, constructions plasmidiques, tranfections, établissement de clones stables, immunofluorescence, ...) a été réalisé en utilisant des protocoles classiques connus de l'homme de l'art.

Le test de mesure de perméabilité paracellulaire a été réalisé de la manière suivante. A J0, environ 10^5 cellules MDCK transfectées stablement ont été ensemencées à confluence dans des inserts *Becton Dickinson Transwell* 8 µm semi-perméables définissant une partie basale et une partie apicale (chambre de Boyden). A J+5, du dextran-FITC 3 kDa a été déposé à une concentration de 0.5 mg/ml dans la partie apicale. Une prélèvement dans la partie basale est effectué au cours du temps et l'intensité de fluorescence est mesurée au fluorimètre. Les différentEs cinétiques ont été tracées et un coefficient de perméabilité a été calculé. Les différents résultats sont soutenus par les tests statistiques ANOVA et Wilcoxon à 5%.

Les séquences protéiques et nucléiques sont fournies dans la liste de séquence annexée.

LEGENDE DES FIGURES ET RESULTATS OBTENUS

Figure 1 : Analyse par Northern Blot de la distribution tissulaire de l'ARN messager de la protéine EHTA. Ce messager est principalement exprimé dans le poumon, le rein et le cœur.

Figure 2 : Analyse par microscopie à fluorescence de la localisation cellulaire de la protéine EHTA. La phase ouverte de lecture de EHTA a été clonée en phase avec la protéine EGFP. Des cellules HMEC-1 ont été transfectées avec cette construction plasmidique et des clones stables ont été sélectionnés. Cette image montre une concentration du signal fluorescent à la jonction entre plusieurs cellules, ce type d'image est observé également après transfection stable avec d'autres membres de la famille des claudins.

Figure 3 : Partie gauche: analyse par microscopie à fluorescence de la localisation cellulaire de la protéine EHTA. La phase ouverte de lecture de EHTA a été clonée en phase avec la protéine EGFP. Des cellules MDCK ont été transfectées avec cette construction plasmidique et des clones stables ont été sélectionnés. Cette image montre une concentration du signal fluorescent à la jonction entre plusieurs cellules, ce type d'image est observé également après transfection stable avec la claudin 1 (partie droite de la figure).

Figure 4 : Mesure du passage d'une molécule de dextran marquée au FITC au travers d'une monocouche de cellules MDCK transfectées stablement soit avec la protéine EHTA fusionnée avec l'EGFP (EHTA-EGFP), soit avec l'EGFP seule (EGFP). On observe une plus forte perméabilité pour le clone transfecté avec la protéine de fusion EHTA-EGFP. Un coefficient de perméabilité a été calculé en normalisant les résultats par la surface occupée par la monocouche de cellules (partie droite de la figure).

Figure 5 : Analyse de l'expression de l'ARN messager de EHTA par PCR quantitative en temps réel (QPCR). Des biopsies de la partie tumorale (tumor) d'une part et de tissus péritumoraux (normal) d'autre part ont été isolées chez le même patient atteint de cancer de la prostate. Les ARN extraits à partir de ces biopsies ont été rétrotranscrits et utilisés dans des expériences de QPCR. Les résultats ont été normalisés par l'expression de la beta-tubuline. On observe une expression 3.5, 8.2 et 1.9 fois plus forte dans la partie tumorale par rapport à la partie normale chez les patients A, B et C, respectivement.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'un inhibiteur de la protéine EHTA pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des cancers.

2. Utilisation selon la revendication 1, pour la préparation d'un médicament destiné à inhiber la formation de métastases chez les patients atteints de cancers.

3. Utilisation d'un inhibiteur de la protéine EHTA pour la préparation d'un médicament destiné à inhiber l'angiogénèse dans ou au voisinage de tumeurs.

4. Utilisation d'un inhibiteur de la protéine EHTA pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des rétinopathies liées au diabète, de l'athérosclérose, de l'arthrose, de la polyarthrite rhumatoïde, du psoriasis, ainsi que les pathologies liées à une cicatrisation retardée.

5. Utilisation d'un inhibiteur de la protéine EHTA pour la préparation d'un médicament destiné à réguler la perméabilité vasculaire ou para-cellulaire.

6. Utilisation d'un inhibiteur de la protéine EHTA pour la préparation d'un médicament destiné à préserver ou restaurer l'intégrité tissulaire.

7. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que l'inhibiteur de la protéine EHTA est un acide nucléique inhibiteur capable d'inhiber de manière spécifique la transcription du gène EHTA ou la traduction de l'ARN messager correspondant.

8. Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que l'acide nucléique inhibiteur de la protéine EHTA est un ARNi, un acide nucléique anti-sens ou un ribozyme, ou un vecteur codant pour celui-ci.

9. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que l'inhibiteur de la protéine EHTA est un anticorps spécifique de la protéine EHTA.

10. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que l'inhibiteur de la protéine EHTA est un ligand cytotoxique spécifique de la protéine EHTA.

11. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que l'inhibiteur de la protéine EHTA est un antagoniste peptidique comprenant les résidus 217 à 226 de la séquence SEQ ID NO :2.

12. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3 et 7 à 11, caractérisée en ce que l'inhibiteur est utilisé en combinaison avec un agent de chimiothérapie ou de radiothérapie.

13. Ligand cytotoxique spécifique de la protéine EHTA, caractérisé en ce qu'il comprend une région conférant la cytotoxicité et une région conférant la spécificité pour la protéine EHTA.

14. Procédé de détection chez un sujet d'un cancer ou d'une pathologie liée à l'angiogénèse ou d'une prédisposition à une telle pathologie ou de suivi de l'évolution ou du stade d'avancement d'une telle pathologie ou de l'efficacité d'un traitement, comprenant la détermination de la présence, de la quantité (relative ou absolue) ou de la distribution, dans un échantillon dudit sujet, de la protéine EHTA, de son expression, de formes altérées de celle-ci ou du gène ou ARN messager correspondant.

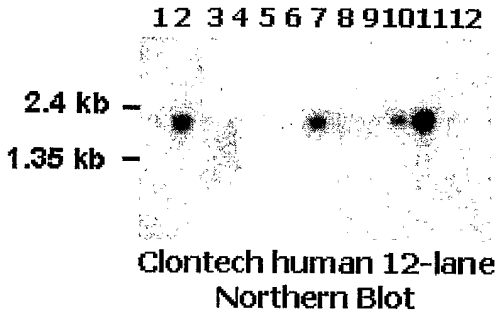
15. Procédé de sélection, criblage, caractérisation, optimisation ou production de composés anti-cancéreux, comprenant une étape de détermination de la capacité d'un composé test à interagir avec la protéine ou le gène EHTA, à moduler son expression ou à moduler son activité.

16. Vecteur de clonage ou d'expression comprenant un acide nucléique codant une protéine EHTA.

17. Cellule recombinante, caractérisée en ce qu'elle comprend un vecteur selon la revendication 16 ou un acide nucléique codant une protéine EHTA, et en ce qu'elle exprime une protéine EHTA.

18. Méthode de traitement d'une pathologie liée à l'angiogénèse chez un sujet, comprenant l'administration au sujet d'une quantité efficace d'un inhibiteur de la protéine EHTA.

19. Méthode pour inhiber la vascularisation d'une tumeur chez un patient atteint d'un cancer, comprenant l'administration au sujet d'une quantité efficace d'un inhibiteur de la protéine EHTA.



1. Cerveau
2. Cœur
3. Muscle squel.
4. Colon
5. Thymus
6. Rate
7. Rein
8. Foie
9. Petit Intestin
10. Placenta
11. Poumon
12. PBL

FIGURE 1

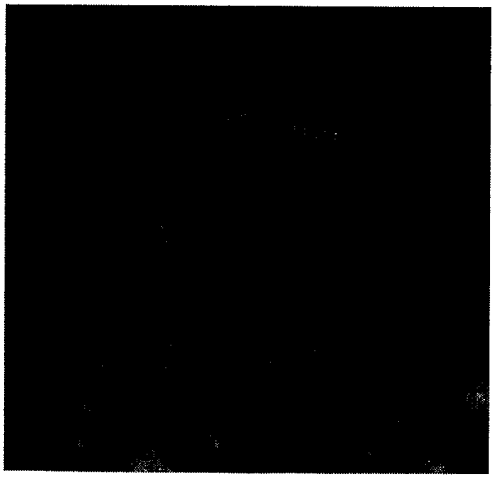


FIGURE 2

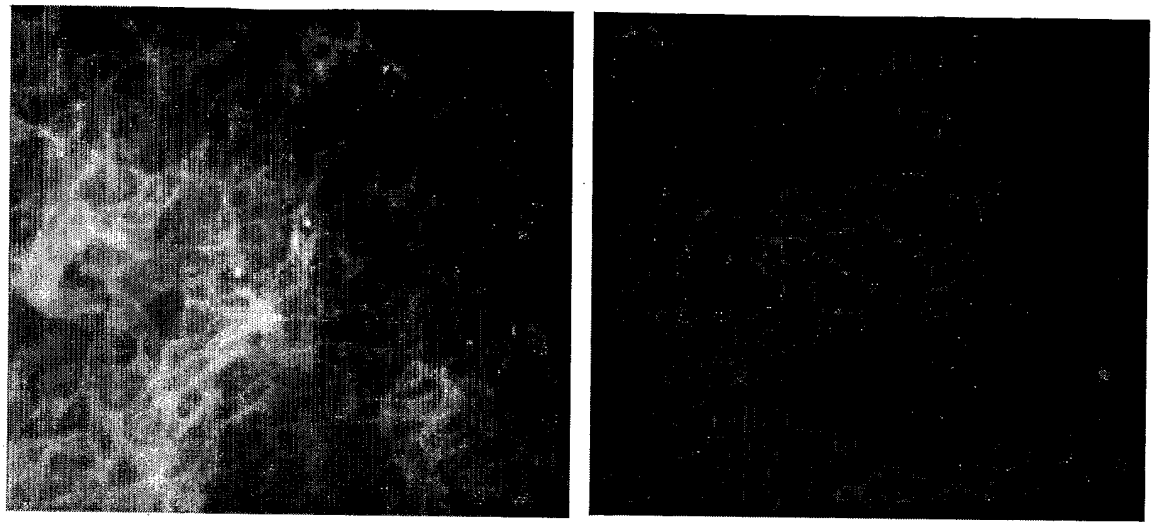


FIGURE 3

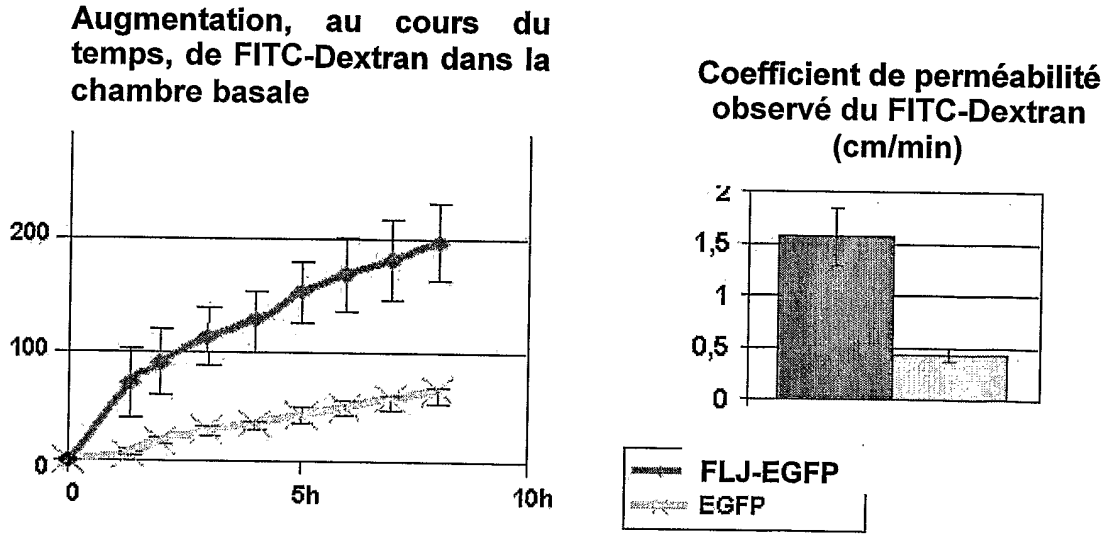


FIGURE 4

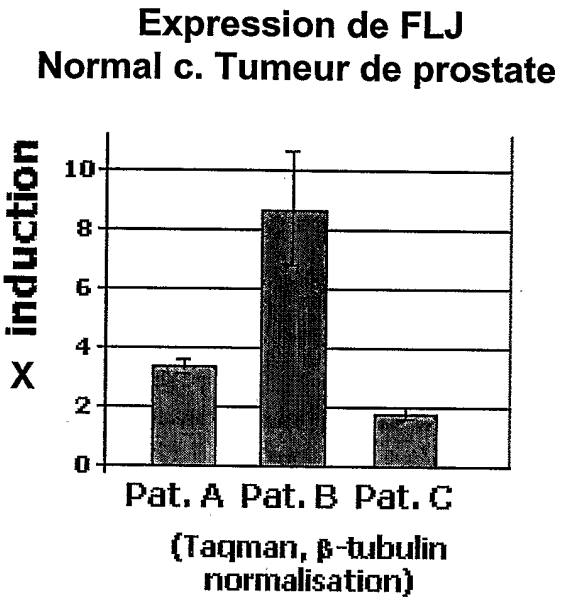

Expression de FLJ
Normal c. Tumeur de prostate
X induction
10
8
6
4
2
0
Pat. A
Pat. B
Pat. C
(Taqman, β-tubulin
normalisation)

FIGURE 5

LISTE DE SEQUENCES

<110> Exonhit Therapeutics

<120> Nouvelle cible de l'angiogenese et utilisations

<130> B0152WO

<140>
<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 1871
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (621)..(1301)

<400> 1
aaaaaacaac catttcctct ctgctgagag ccagggaagg cgagctctgc gcacacgggc 60

gtccctgcag cagccactct gctttccagg accggccaac tgccctggag gcatccacac 120

aggggcccag gcagcacaga ggagctgtga acccgctcca caccggccac cctgcccgga 180

gcctggcact cacagcaggc cggtgctaag gagtgtggcg cgggctcgac tcccactgct 240

gccggcctcc cgagtgactc tgttttccac tgctgcaggc gagaagaggc acgcgcggca 300

caggccggcc tccgcttccc gggaagacgg cgcactcctg gccctgggtt cttgctgctg 360

cccaccctct gctccctggg atgggccccg aggcgagcag cttcagcaca ggcctggccc 420

tgctccaggt gcaggaagga ggataaggcc gggccgagag gcggcacacc tggaccatcc 480

catgggcctc cgcccgcgcc gccccgagga tgagtggtga tgtcctctag ccacccctag 540

cagcgtcggc tctccctgga cgtgcggccg cggactggga cttggctttc tccggataag 600

cggcggcacc ggcgtcagcg atg acc gtg cag aga ctc gtg gcc gcg gcc gtg 653
Met Thr Val Gln Arg Leu Val Ala Ala Ala Val
1 5 10

ctg gtg gcc ctg gtc tca ctc atc ctc aac aac gtg gcg gcc ttc acc 701
Leu Val Ala Leu Val Ser Leu Ile Leu Asn Asn Val Ala Ala Phe Thr
15 20 25

tcc aac tgg gtg tgc cag acg ctg gag gat ggg cgc agg cgc agc gtg 749
Ser Asn Trp Val Cys Gln Thr Leu Glu Asp Gly Arg Arg Arg Ser Val
30 35 40

ggg ctg tgg agg tcc tgc tgg ctg gtg gac agg acc cgg gga ggg ccg 797
Gly Leu Trp Arg Ser Cys Trp Leu Val Asp Arg Thr Arg Gly Gly Pro

```
     45                  50                  55

agc cct ggg gcc aga gcc ggc cag gtg gac gca cat gac tgt gag gcg   845
Ser Pro Gly Ala Arg Ala Gly Gln Val Asp Ala His Asp Cys Glu Ala
 60                  65                  70                  75

ctg ggc tgg ggc tcc gag gca gcc ggc ttc cag gag tcc cga ggc acc   893
Leu Gly Trp Gly Ser Glu Ala Ala Gly Phe Gln Glu Ser Arg Gly Thr
                 80                  85                  90

gtc aaa ctg cag ttc gac atg atg cgc gcc tgc aac ctg gtg gcc acg   941
Val Lys Leu Gln Phe Asp Met Met Arg Ala Cys Asn Leu Val Ala Thr
             95                 100                 105

gcc gcg ctc acc gca ggc cag ctc acc ttc ctc ctg ggg ctg gtg ggc   989
Ala Ala Leu Thr Ala Gly Gln Leu Thr Phe Leu Leu Gly Leu Val Gly
        110                 115                 120

ctg ccc ctg ctg tca ccc gac gcc ccg tgc tgg gag gag gcc atg gcc   1037
Leu Pro Leu Leu Ser Pro Asp Ala Pro Cys Trp Glu Glu Ala Met Ala
    125                 130                 135

gct gca ttc caa ctg gcg agt ttt gtc ctg gtc atc ggg ctc gtg act   1085
Ala Ala Phe Gln Leu Ala Ser Phe Val Leu Val Ile Gly Leu Val Thr
140                 145                 150                 155

ttc tac aga att ggc cca tac acc aac ctg tcc tgg tcc tgc tac ctg   1133
Phe Tyr Arg Ile Gly Pro Tyr Thr Asn Leu Ser Trp Ser Cys Tyr Leu
                160                 165                 170

aac att ggc gcc tgc ctt ctg gcc acg ctg gcg gca gcc atg ctc atc   1181
Asn Ile Gly Ala Cys Leu Leu Ala Thr Leu Ala Ala Ala Met Leu Ile
            175                 180                 185

tgg aac att ctc cac aag agg gag gac tgc atg gcc ccc cgg gtg att   1229
Trp Asn Ile Leu His Lys Arg Glu Asp Cys Met Ala Pro Arg Val Ile
        190                 195                 200

gtc atc agc cgc tcc ctg aca gcg cgc ttt cgc cgt ggg ctg gac aat   1277
Val Ile Ser Arg Ser Leu Thr Ala Arg Phe Arg Arg Gly Leu Asp Asn
    205                 210                 215

gac tac gtg gag tca cca tgc tga gtcgcccttc tcagcgttcc atcgatgcac  1331
Asp Tyr Val Glu Ser Pro Cys
220                 225

acctgctatc gtggaacagc ctagaaacca agggactcca ccaccaagtc acttcccctg 1391

ctcgtgcaga ggcacgggat gagtctgggt gacctctgcg ccatgcgtgc gagacacgtg 1451

tgcgtttact gttatgtcgg tcatatgtct gtacgtgtcg tgggccaacc tcgttctgcc 1511

tccagctttc ctggttagcg caacgcggct ccacgaccac acgcacttca gggtggaagc 1571

tggaagctga gacacaggtt aggtggcgcg aggctgccct gcgctccgct ttgctttggg 1631

attaatttat tctgcatctg ctgagagggg caccccagcc atatcttaca ctttggtaaa 1691

gcagaaaacc aggaaaattt tcttaaaata tccacaatat tccttgagtg agtcagaatc 1751
```

tatagccggt tagtgatggt ttcaggcaga atcgtgttcg tgtctgtttt gctcgattcc 1811

tttcctaagt taaataaatg caagcctctg aacttctgtc tataaaaaaa aaaaaaaaaa 1871

<210> 2
<211> 226
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

```
Met Thr Val Gln Arg Leu Val Ala Ala Ala Val Leu Val Ala Leu Val
  1               5                  10                  15
Ser Leu Ile Leu Asn Asn Val Ala Ala Phe Thr Ser Asn Trp Val Cys
            20                  25                  30
Gln Thr Leu Glu Asp Gly Arg Arg Arg Ser Val Gly Leu Trp Arg Ser
        35                  40                  45
Cys Trp Leu Val Asp Arg Thr Arg Gly Gly Pro Ser Pro Gly Ala Arg
    50                  55                  60
Ala Gly Gln Val Asp Ala His Asp Cys Glu Ala Leu Gly Trp Gly Ser
65                  70                  75                  80
Glu Ala Ala Gly Phe Gln Glu Ser Arg Gly Thr Val Lys Leu Gln Phe
                85                  90                  95
Asp Met Met Arg Ala Cys Asn Leu Val Ala Thr Ala Ala Leu Thr Ala
            100                 105                 110
Gly Gln Leu Thr Phe Leu Leu Gly Leu Val Gly Leu Pro Leu Leu Ser
        115                 120                 125
Pro Asp Ala Pro Cys Trp Glu Glu Ala Met Ala Ala Ala Phe Gln Leu
    130                 135                 140
Ala Ser Phe Val Leu Val Ile Gly Leu Val Thr Phe Tyr Arg Ile Gly
145                 150                 155                 160
Pro Tyr Thr Asn Leu Ser Trp Ser Cys Tyr Leu Asn Ile Gly Ala Cys
                165                 170                 175
Leu Leu Ala Thr Leu Ala Ala Ala Met Leu Ile Trp Asn Ile Leu His
            180                 185                 190
Lys Arg Glu Asp Cys Met Ala Pro Arg Val Ile Val Ile Ser Arg Ser
        195                 200                 205
Leu Thr Ala Arg Phe Arg Arg Gly Leu Asp Asn Asp Tyr Val Glu Ser
    210                 215                 220
Pro Cys
225
```