

Camera di Commercio Industria, Artigianato e Agricoltura di COSENZA

Verbale di Deposito Domanda di Brevetto per INVENZIONE INDUSTRIALE

Numero domanda: **CS2014A000016**

CCIAA di deposito: **COSENZA**

Data di deposito: **28/04/2014**

In data 28/04/2014 il richiedente ha presentato a me sottoscritto la seguente domanda di brevetto per Invenzione Industriale.

COSENZA, 28/04/2014

L'Ufficiale Rogante

**Diritti di Segreteria
Bollo Virtuale**

**15,00 EURO
20,00 EURO**

RIASSUNTO

Molecola sintetica antagonista della leptina caratterizzata dal fatto che è costituita da un tetrapeptide e che nella sequenza di amminoacidi presenti in detto tetrapeptide gli amminoacidi centrali sono Acido Aspartico e Fenilalanina. Detto tetrapeptide risulta antagonista della leptina sia *in vitro* che *in vivo* nel trattamento di tumori in cui la leptina promuove la crescita e la progressione tumorale.

Campo tecnico dell'invenzione

La presente invenzione riguarda una molecola sintetica antagonista della leptina costituita da un tetrapeptide in cui la sequenza dei quattro amminoacidi è caratterizzata dal fatto che gli amminoacidi centrali sono D ed F.

La presente invenzione riguarda altresì l'uso farmaceutico di tali molecole come antitumorali in cellule in cui la leptina promuove la crescita e la progressione tumorale e l'uso dei peptidi pegilati come antitumorali *in vivo*.

I tetrapeptidi della presente invenzione agiscono come antagonisti della leptina sia *in vitro* che *in vivo*.

I peptidi proposti costituiranno, a seguito di ulteriori sperimentazioni e valutazioni biologiche e mediche, farmaci utili per la cura del carcinoma mammario e di altre forme tumorali.

Stato dell'Arte

- La leptina è un ormone peptidico pleiotropico prodotto dal gene ob e secreto principalmente dagli adipociti. Essa, agendo sull'ipotalamo, gioca un ruolo cruciale nella regolazione del peso corporeo e dell'appetito. La leptina sembra inoltre essere implicata nella patogenesi di diverse malattie autoimmuni, come l'artrite reumatoide, l'encefalomielite (EAE) e la colite immuno-mediata.
- La leptina agisce come fattore di crescita nelle cellule di diverse forme di cancro e la sua implicazione nella cancerogenesi è stata ampiamente studiata attraverso prove *in vitro* e *in vivo*.

- La leptina è costituita da quattro α -eliche: l'elica A, che comprende i residui 2-26; l'elica B, costituita dai residui 51-67; l'elica C, costituita dai residui 71-94 e l'elica D, dal residuo 120 al residuo 143. Le quattro eliche sono connesse attraverso due lunghi loop (AB e CD) e uno più corto (BC) e mostrano una disposizione "up-up-down-down", così che le eliche A e D siano antiparallele alle eliche B e C (Zhang F. et al. *Nature*, **1997**, 387, 206-209).
- La leptina esplica la sua azione attraverso il recettore (ObR) espresso sia nel sistema nervoso centrale che nei tessuti periferici e, legandosi ad esso, favorisce la sua attivazione.
- La leptina lega il suo recettore attraverso tre siti di legame (I, II e III). Benché la struttura tridimensionale della leptina sia stata delucidata pochi anni dopo la sua scoperta (Zhang Y. et al. *Nature* **1994**, 372, 425-432), non è stata ancora riportata la struttura cristallografica del complesso leptina-recettore. Ad oggi, tutti i dati disponibili sono basati su modelli teorici (Peelman F. et al. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 41038-41046; Peelman F. et al. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 15496-15504). Il sito di legame I è costituito dal loop di connessione delle eliche A e B e la sua importanza sembra essere connessa al legame con il recettore e alla conseguente formazione del complesso di attivazione recettoriale. Il sito di legame II, che è il principale sito legante, si trova sulla superficie delle eliche A e C e si lega al dominio CHR2 del recettore. Il sito di legame III, costituito dai residui dell'elica D della leptina, presumibilmente lega il dominio IgD-like del recettore ed è necessario per la sua attivazione.

- Nei tumori ormono-dipendenti, come quello mammario o il coloretale, la leptina e ObR sono overespressi e sono stati quindi proposti come marker di prognosi. Appare evidente che la leptina rappresenta un nuovo target terapeutico e che i suoi antagonisti possono costituire una nuova classe di farmaci antitumorali.
- Altri antagonisti peptidici basati su frammenti costituiti da almeno 10 unità amminoacidiche della sequenza della leptina sono stati sviluppati. La maggior parte di questi, tuttavia, mostra attività agonista in assenza di leptina.
- Sono conosciute diverse muteine antagoniste della leptina. Queste sono basate su mutazioni a livello di sottosequenze amminoacidiche implicate nel legame con il recettore e nella sua attivazione. In particolare, la leptina variamente mutata a livello della sottosequenza 39-42 mostra una maggiore affinità per ObR ma non lo attiva, risultando così in una serie di potenti antagonisti.
- EP-B1-1814986 descrive alcune muteine della leptina in cui almeno due amminoacidi della sequenza LDFI nelle posizioni 39-42 della leptina sono sostituiti con differenti residui amminoacidici. Queste muteine agiscono da antagonisti della leptina.

Sommario dell'invenzione

Uno scopo principale dell'invenzione è di realizzare molecole capaci di funzionare da antagonisti della leptina senza essere agonisti del recettore LepR.

I peptidi sperimentati, sono semplici e piccole molecole che inibiscono il recettore della leptina. Dette molecole, inoltre, non agendo da agonisti recettoriali in assenza di leptina superano il limite terapeutico di altri peptidi antagonisti conosciuti.

- La presente invenzione riguarda un piccolo peptide derivante dalle sequenza wild type del sito di legame I della leptina , sequenza n°1: LDFI (Leucina-Acido Aspartico-Fenilalanina-Isoleucina), indicato come tetrapeptide, che agisce come antagonista della leptina.
- Il tetrapeptide progettato mima la sequenza del sito di legame I della leptina, deputato all'interazione con il CRH2 dell'ObR e implicato, quindi, nella sua attivazione.
- Il tetrapeptide è stato sintetizzato con le tecniche della sintesi peptidica in fase solida, utilizzando la Fmoc-chemistry. A tale scopo è stato utilizzato un sintetizzatore peptidico CEM-Liberty.
- Abbiamo valutato la capacità del tetrapeptide di antagonizzare l'azione della leptina in cellule tumorali mammarie. A tale scopo, utilizzando come modello sperimentale linee cellulari di carcinoma mammario recettore estrogenico (ER) α -positive MCF-7 e ER α -negative SKBR3, entrambe esprimenti il recettore per la leptina, sono stati effettuati diversi saggi biologici “in vitro”.
- In primo luogo, mediante saggi di proliferazione (MTT assay) è stata valutata l'attività biologica del peptide sulla crescita cellulare. Il trattamento con il peptide a differenti concentrazioni, da 10 nM a 10 μ M per 96 ore, non ha mostrato alcun effetto significativo sull'attività proliferativa in entrambe le linee cellulari, MCF-7 e SKBR3. Questa è una caratteristica importante, che distingue questo peptide da altri potenziali inibitori del recettore della leptina (ObR) che agendo da agonisti in assenza della leptina non sono utili per un possibile sviluppo farmaceutico (Figura 1).

- Successivamente, per valutare se il peptide fosse in grado di antagonizzare le vie di trasduzione del segnale indotte dalla leptina, abbiamo effettuato studi di time-course per esaminare i livelli di fosforilazione di JAK2, STAT3, AKT e MAPK, i principali effettori del segnale mediato dalla leptina. La leptina induce un aumento dei livelli di fosforilazione di tali pathways nelle cellule MCF-7 e SKBR3, ed il pretrattamento con il tetrapeptide è in grado di ridurre notevolmente la fosforilazione di tali proteine (Figura 2).
- Per valutare se l'effetto inibitorio del tetrapeptide sui pathways di segnale indotti dalla leptina fosse correlato anche ad una modulazione della crescita cellulare sono stati effettuati saggi di proliferazione ancoraggio-dipendenti (MTT Assay). I risultati ottenuti mostrano un significativo incremento della vitalità cellulare dopo trattamento con leptina, e il peptide diminuisce significativamente questo effetto in maniera dose-dipendente. Al contrario, il pretrattamento con un peptide "scrambled", usato come controllo negativo, e costituito da una sequenza casuale di aminoacidi, non ha evidenziato alcuna proprietà antagonista (Figura 3). Gli stessi effetti inibitori esercitati dal tetrapeptide sulla crescita cellulare leptina-indotta sono stati confermati anche attraverso saggi di proliferazione ancoraggio-indipendente (soft agar assay), un saggio che riflette meglio la crescita tridimensionale "in vivo" (Figura 4). Tali dati ben si correlano con una riduzione dell'espressione della ciclina D1, un'importante proteina di controllo della progressione del ciclo cellulare, nelle cellule trattate con leptina ed il tetrapeptide rispetto alle cellule trattate solo con la leptina (Figura 5).
- Successivamente, abbiamo valutato l'abilità del tetrapeptide di inibire la motilità cellulare indotta dalla leptina tramite scratch assay. Entrambe le linee cellulari,

in seguito al trattamento con leptina, aumentano la loro motilità. Il pretrattamento con il tetrapeptide reversa totalmente tale effetto, mentre il pretrattamento con il peptide “scrambled” non è in grado di influenzare l’azione stimolatoria della leptina sulla migrazione delle cellule MCF-7 e SKBR3 (Figura 6).

- Poichè la leptina up-regola l’espressione del suo stesso gene in diverse linee cellulari tumorali mammarie, abbiamo effettuato esperimenti di RT-PCR per valutare se il peptide fosse in grado di antagonizzare anche questa azione della leptina. Il pretrattamento con il tetrapeptide abolisce l’up-regolazione indotta dalla leptina sul proprio gene nelle linee cellulari da noi utilizzate (Figura 7).
- Infine, per verificare la specificità del tetrapeptide nell’inibire il segnale mediato dalla leptina, sono stati effettuati differenti saggi biologici in cellule trattate con EGF (Epidermal Growth Factor), un fattore di crescita che stimola la proliferazione e la motilità cellulare tramite l’interazione con un recettore che è strutturalmente e funzionalmente diverso dal recettore per la leptina. Il tetrapeptide non è in grado di ridurre i livelli di fosforilazione delle proteine MAPK e AKT, indotti dall’EGF, né di influenzare l’aumento della proliferazione e della motilità cellulare mediate dall’EGF in entrambe le linee cellulari, evidenziando la specificità del peptide nell’inibire gli effetti della leptina (Figura 8, Figura 9 e Figura 10).
- In un altro aspetto, sono stati sintetizzati altri tetrapeptidi modificati in cui un residuo di alanina sostituisce almeno un amminoacido della sequenza n°1, denominati tetrapeptidi modificati. In un caso è stato sintetizzato un tetrapeptide modificato in cui l’acido aspartico è stato sostituito con l’alanina, denominato

tetrapeptide D/A, sequenza n°2: LAFI (Leu-Ala-Phe-Ile). Un altro tetrapeptide è stato sintetizzato con la sostituzione della fenilalanina con l'alanina, tetrapeptide F/A, sequenza n°3: LDAI (Leu-Asp-Ala-Ile).

- Un altro tetrapeptide modificato è stato sintetizzato sostituendo sia l'acido aspartico che la fenilalanina con l'alanina, tetrapeptide D/A-F/A, sequenza n°4: LAAI (Leu-Ala-Ala-Ile).
- Altri due tetrapeptidi sono stati sintetizzati sostituendo in un caso la isoleucina con una alanina, tetrapeptide I/A e nell'altro caso sia la leucina che l'isoleucina, tetrapeptide L/A-I/A, sequenza n° 5: LDFA (Leu-Asp-Phe-Ala) e n°6: ADFA (Ala-Asp-Phe-Ala).
- Dalle analisi Soft Agar Growth Assay è possibile notare l'attività dei diversi peptidi modificati in presenza di leptina sulle cellule MCF-7 e SKBR3. I peptidi D/A e F/A non mostrano attività antagonista, così come il peptide D/A-F/A. Questi dati indicano l'influenza degli amminoacidi D ed F nell'attività del tetrapeptide. Il peptide I/A e il peptide L/A-I/A, invece, conservano l'attività antagonista del tetrapeptide, indicando l'ininfluenza di questi residui nel meccanismo antagonista del tetrapeptide (Figura 11).
- In un altro aspetto, il tetrapeptide è stato sintetizzato nella forma Pegilata . A questo scopo il polietilenglicole (PEG) è stato introdotto mediante legame ammidico sull'amminoacido C-terminale, utilizzando un PEG che espone un linker amminico. Il tetrapeptide-PEG ha mostrato, mediante Soft Agar Assay e scratch assay, le stesse proprietà biologiche del tetrapeptide (Figura 12 e Figura 13). La pegilazione del tetrapeptide antagonista oggetto di questa invenzione è

un aspetto importante, in quanto il legame con il PEG aumenta la sua stabilità, la sua emivita e la farmacocinetica.

- Il tetrapeptide-PEG è stato utilizzato per effettuare studi *in vivo*. In particolare, le cellule tumorali mammarie sono state inoculate nella regione intrascapolare di topi nudi atimici e i topi sono stati successivamente randomizzati in 2 gruppi di trattamento: placebo (n=5) o tetrapeptide-PEG (n=5). Le dimensioni della massa tumorale sono state valutate per 1 mese e i topi sono stati sacrificati. I risultati hanno evidenziato un significativo decremento delle dimensioni e del peso della massa tumorale nei topi trattati con tetrapeptide-PEG, senza registrare alcuna variazione, tra i 2 gruppi, nell'assunzione di cibo ed acqua, e nel peso corporeo. Analisi di immunoblotting effettuata su estratti proteici ottenuti dalle masse tumorali hanno evidenziato una notevole riduzione nei livelli di fosforilazione dei pathways attivati dalla leptina nei tumori trattati con il tetrapeptide-PEG dimostrando la sua abilità nell'antagonizzare il segnale della leptina anche *in vivo* (Figura 14).

La presente invenzione può essere utilizzata dall'Industria Farmaceutica per lo sviluppo di farmaci antitumorali.

Descrizione delle Figure

Figura 1. MTT Assay in cellule MCF-7 e SKBR3 dopo trattamento con il solvente (-) o con diverse concentrazioni di tetrapeptide (10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M) per 96 ore;

Figura 2. Immunoblotting su estratti proteici di cellule MCF-7 e SKBR3 per valutare l'azione del peptide sull'attivazione dei pathways di trasduzione del segnale della leptina. Le cellule sono state pretrattate con il tetrapeptide (1 μ M) per 1 ora e poi trattate con leptina (500 ng/ml) per 5, 15 e 30 minuti prima di effettuare la lisi citosolica. La stessa quantità di estratti cellulari è stata analizzata per valutare la fosforilazione (p) di JAK2 (Tyr1008), STAT3 (Tyr705), AKT (Ser473), MAPK (Thr202/Thr204) e l'espressione delle proteine totali mediante analisi immunoblotting. GAPDH è stato utilizzato come controllo del corretto caricamento e trasferimento;

Figura 3. MTT Assay in cellule MCF-7 e SKBR3 dopo trattamento con leptina (500 ng/ml) e diverse concentrazioni del tetrapeptide (10 nM, 100 nM, 1 μ M) o con il peptide “scrambled”(S, 1 μ M). (*, $p<0.05$; **, $p<0.01$; n.s.=non significativo);

Figura 4. Soft Agar Assay in cellule MCF-7 e SKBR3 trattate con leptina (500 ng/ml), con il tetrapeptide (1 μ M) o con il peptide “scrambled” (S, 1 μ M). (*, $p<0.05$; **, $p<0.01$; n.s.=non significativo);

Figura 5. Immunoblotting su estratti proteici di cellule MCF-7 e SKBR3 per valutare l'azione del peptide sull'espressione della Ciclina D1. Le cellule sono state pretrattate con il peptide LDFI (1 μ M) per 1 ora e poi trattate con leptina (500 ng/ml) per 24 ore. La stessa quantità di estratti cellulari è stata analizzata per valutare l'espressione della

Ciclina D1 mediante analisi immunoblotting. GAPDH è stato utilizzato come controllo del corretto caricamento e trasferimento.

Figura 6. Scratch Assay in cellule MCF-7 e SKBR3 trattate con leptina (500 ng/ml), in presenza o in assenza del tetrapeptide (1 μ M) o del peptide "scrambled" (S, 1 μ M);

Figura 7. RT-PCR in cellule MCF-7 e SKBR3 per valutare l'effetto del tetrapeptide sull'up-regolazione del gene Ob indotta dalla leptina. Le cellule sono state pretrattate con il tetrapeptide (1 μ M) per 1 ora e poi trattate con leptina (500 ng/ml) per 24 ore, prima dell'estrazione dell'RNA cellulare. I livelli di mRNA della leptina (ob) sono stati confrontati mediante RT-PCR semiquantitativa e standardizzati sulla base dei livelli di mRNA di un gene di controllo, il 36B4;

Figura 8. Immunoblotting su estratti proteici di cellule MCF-7 e SKBR3 per valutare l'azione del peptide sull'attivazione dei pathways di trasduzione del segnale mediata dall'EGF. Le cellule sono state trattate con EGF in assenza e in presenza del peptide prima di effettuare lisi citosolica. La stessa quantità di estratti cellulari è stata analizzata per valutare la fosforilazione (p) di AKT (Ser473), MAPK (Thr202/Thr204) e l'espressione delle proteine totali mediante analisi immunoblotting. GAPDH è stato utilizzato come controllo del corretto caricamento e trasferimento;

Figura 9. MTT Assay in cellule MCF-7 e SKBR3 dopo trattamento con EGF (100 ng/ml) e/o con il tetrapeptide (1 μ M). (*, $p < 0.05$; n.s.=non significativo);

Figura 10. Scratch Assay in cellule MCF-7 e SKBR3 trattate con EGF (100 ng/ml) e/o con il tetrapeptide (1 μ M);

Figura 11. Soft Agar Assay in cellule MCF-7 e SKBR3 trattate con leptina (500 ng/ml), con il tetrapeptide (1 μ M) e con i tetrapeptidi sostituiti D/A-F/A (LAAI) e L/A-I/A (ADFA);

Figura 12. Soft Agar Assay in cellule MCF-7 e SKBR3 trattate con leptina (500 ng/ml), con il tetrapeptide (1 μ M) o con il peptide “pegilato” tetrapeptide-PEG (1 μ M). (*, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$);

Figura 13. Scratch Assay in cellule MCF-7 e SKBR3 trattate con leptina (500 ng/ml), con il tetrapeptide (1 μ M) o con il peptide “pegilato” tetrapeptide-PEG (1 μ M).

Figura 14. (A) Le cellule SKBR3 sono state inoculate nella regione interscapolare di topi femmina atimici (10 topi) e successivamente i topi sono stati trattati, per 28 giorni, con il solo veicolo (-) o con il peptide LDFI-PEG (10mg/kg/giorno) mediante iniezione intraperitoneale (5 topi/gruppo). Il volume del tumore (RTV, Relative Tumor Volume) è stato calcolato secondo la seguente formula: $RTV = (V_x/V_1)$, dove V_x è il volume del tumore il giorno X e V_1 è il volume del tumore all’inizio del trattamento (giorno 1). *** $P < 0.0001$. (B) Immunoblotting delle forme fosforilate (p) di STAT3, AKT, MAPK e delle rispettive proteine totali estratte da tumori provenienti da topi trattati con veicolo (-) e LDFI-PEG. La b-actina è stata utilizzata come controllo di corretto caricamento e trasferimento. I numeri rappresentano il valore medio del rapporto tra proteine fosforilate/proteine totali/ b-actina relative ai campioni provenienti dai topi trattati con peptide rispetto a quelli trattati con il solo veicolo.

Technical field of the invention

This invention concerns a synthetic molecule which is a leptin antagonist tetrapeptide in which the sequence of the four amino acids is characterized by the fact that the central amino acids are D and F.

This invention concerns also the pharmaceutical use of these molecules as anti-cancer drugs in cells where leptin promotes tumor growth and progression and the use of the pegylated peptides as anti-cancer drugs *in vivo*.

The tetrapeptides of this invention act as antagonists of leptin both *in vitro* and *in vivo*.

The proposed peptides, after further experiments and biological and medical assessments, will provide drugs useful for the treatment of breast cancer and other leptin-related cancers.

State of Work

- Leptin is a pleiotropic peptidic hormone produced by the *ob* gene and mainly secreted by the adipocytes. By acting on the hypothalamus it has a crucial role in regulating body weight and appetite. Furthermore leptin seems to be involved in the pathogenesis of several autoimmune diseases, such as rheumatoid arthritis, encephalomyelitis and immune-mediated colitis.
- Leptin acts as a growth factor in several cancer cell lines and its involvement in the cancerogenesis has been widely studied through *in vitro* and *in vivo* assays.

- Leptin consists of 4 α helices: helix A, which includes the residues 2-26; helix B, constituted of residues 51-67; helix C, constituted of the residues 71-91 and helix D, residues 120-143. The four helices are linked through two long loops (AB and CD) and a shorter one (BC) and they show an up-up-down-down topology, so that helices A and D are not parallel to helices B and C (Zhang F. et al. *Nature*, 1997, 387,206-209).
- Leptin acts through its own receptor (ObR) expressed both in the central nervous system and in the peripheral tissues and after binding to ObR, it allows its activation.
- Leptin binds its receptor through three binding sites (I,II and III). Even though the three-dimensional structure of leptin was elucidated a few years after its discovery (Zhang F. et al. *Nature*, 1994, 372, 425-432), the crystallographic structure of leptin- leptin receptor complex has not been reported yet. Until today, all data available are based on theoretical models (Peelman F.et al. *J. Biol. Chem.* 2004. 279, 41038-41046; Peelman F. et al.. *J Biol Chem.* 2006, 281, 15496-15504).

Binding site I is formed by the connection loop between helices A and B and its importance seems to be related to the ObR binding and to the consequent formation of the receptor complex activation.

- In hormone dependent cancers, such as breast and colon cancer, leptin and ObR are overexpressed and therefore were proposed as prognostic markers. It seems evident that leptin represents a novel therapeutic target and that its antagonists may constitute a new class of anticancer drugs.

- Other peptide antagonists consisting of at least 10 units of amino acids of the leptin sequence were developed. However most of these show agonist activity in absence of leptin.
- Many leptin muteins antagonists are known. These are based on mutations of amino acid subsequence involved in the receptor binding and in its activation. In particular, the leptin variously mutated at the sequence 39-42 shows a major affinity with ObR but it does not activate it, thus resulting in a series of strong antagonists.
- EP-B1-1814986 describes some leptin muteins in which at least two amino acids of the sequence LDFI in positions 39-42 of leptin are substituted with different amino acid residues. These muteins act as leptin antagonists.

Summary of the invention

The main aim of the invention is to develop molecules which are able to act as leptin antagonists without being agonists of the receptor ObR.

The peptides tested, are simple and small molecules which inhibit the leptin receptor. Furthermore since these molecules do not act as receptor agonists in the absence of leptin they overcame the therapeutic limit of other known peptide antagonists.

- This invention concerns a small peptide derived from the wild type sequence of leptin binding site I, sequence n. 1: LDFI (Leucine-Acid-Aspartic-Phenylalanine-Isoleucine), indicated as tetrapeptide, which acts as leptin antagonist.

- The tetrapeptide designed mimics the sequence leptin binding site I, involved in the interaction with CRH2 from the ObR and therefore its activation.
- The tetrapeptide was synthesized by solid phase peptide synthesis, using Fmoc-chemistry. For this purpose a CEM-Liberty peptide synthesizer was used.
- The capability of the tetrapeptide in antagonizing leptin activity in breast cancer cells was evaluated. To this aim, using as experimental model estrogen receptor (ER) α - positive MCF-7 and ER α -negative SKBR3 breast cancer cell lines, both expressing the leptin receptor, many biological “in vitro” assays were performed.
- First, by using proliferation assays (MTT assay) the biological activity of the peptide on cell growth was evaluated. Treatment with the peptide at different concentrations, from 10nM to 10 μ M for 96 hours, did not show any significant effect on the proliferative activity in both MCF-7 and SKBR3 cell lines. This is an important characteristic which distinguishes this peptide from other potential leptin receptor inhibitors which acting as agonist in absence of leptin are not useful for a potential pharmaceutical development (Figure 1).
- Next, to evaluate if the peptide is able to antagonize the leptin signaling pathways, we performed a time-course study in order to examine the levels of phosphorylation of JAK2, STAT3, AKT, and MAPK, which are the main effectors of the leptin-mediated signaling. Leptin induces an increase in the phosphorylation levels of these pathways in MCF-7 and SKBR3 cells, and the pretreatment with the tetrapeptide is able to reduce the phosphorylation of these proteins (Figure 2).

- In order to evaluate if the inhibitory effect of the tetrapeptide on the pathways induced by leptin was associated also with a modulation of cell growth, anchorage-dependent proliferation assays (MTT Assay) were carried out. The results obtained show a significant increase in cell viability after treatment with leptin, and the peptide decreases significantly this effect in a dose dependent manner. On the contrary, the pretreatment with a scrambled peptide, used as negative control, and consisting of a casual sequence of amino acids, did not reveal any leptin antagonist property (Figure 3). The same inhibitory effects exerted by the tetrapeptide on leptin-induced cell growth were confirmed also by anchorage-independent proliferation assays (soft agar assay), an assay which better reflects the three-dimensional growth “in vivo” (Figure 4). These data are associated to a decrease in the expression of cyclin D1, that is an important protein involved in the controls of cell cycle progression, in cells treated with leptin and tetrapeptide respect to the cells treated only with leptin (Figure 5).
- The capability of tetrapeptide in inhibiting cell motility induced by leptin was evaluated by using scratch assay. Both cell lines, after treatment with leptin increase their motility. The pretreatment with the tetrapeptide reverses totally this effect, while the pretreatment with the scrambled peptide is not able to influence the stimulatory activity of leptin on the migration of MCF-7 and SKBR3 cells (Figure 6).
- Since leptin up-regulates the expression of its own gene in many mammary cancer cell lines, we carried out RT-PCR experiments in order to evaluate if the

peptide was able to antagonize also this leptin action. The pretreatment with the tetrapeptide abolishes the up-regulation induced by leptin on its own gene in cell lines used (Figure 7).

- Finally, in order to verify the specificity of tetrapeptide in inhibiting the leptin-mediated signaling, different biological assays were performed on cells treated with EGF (Epidermal Growth Factor), a growth factor which stimulates cell proliferation and motility through interaction with a receptor which is different both in structure and in function from leptin receptor. The tetrapeptide is neither able to reduce MAPK and AKT proliferation levels, induced by EGF, or to influence the increase in cell proliferation and motility mediated by EGF, highlighting the specificity of this peptide in inhibiting leptin effects (Figure 8, Figure 9 and Figure 10).
- In another aspect, other modified tetrapeptides were synthesized, in which a residue of alanine substitutes at least one amino acid in sequence n.1, called modified tetrapeptides. In one case aspartic acid had been substituted with alanine in the synthesized modified tetrapeptide, this was called tetrapeptide D/A, sequence n.2: LAFI (Leu-Ala-Phe-Ile). Another tetrapeptide was synthesized by substituting phenylalanine with alanine, which was tetrapeptide F/A, sequence n. 3: LDAI (Leu-Asp-Ala-Ile).
- Another modified tetrapeptide was synthesized by substituting both the aspartic acid and the phenylalanine with alanine, which is called tetrapeptide D/A-F/A, sequence n.4: LAAI (Leu-Ala-Ala-Ile).

- Other two tetrapeptides were synthesized by substituting in one case the isoleucine with alanine, the tetrapeptide I/A, and in the other case both the leucine and isoleucine were substituted and this was the tetrapeptide L/A-I/A, sequence n.5: LDFA (Leu-Asp-Phe-Ala) and n.6: ADFA (Ala-Asp-Phe-Ala).
- Data from the Soft agar growth assays, show the activity of the different modified peptides in presence of leptin on MCF-7 and SKBR3 cells. Peptides D/A and F/A do not show any antagonistic activity, similarly to the peptide D/A-F/A. These data indicate the influence of amino acids D and F in the activity of the tetrapeptide. In contrast, the peptide I/A and the peptide L/A-I/A keep unchanged the antagonist activity of the tetrapeptide, indicating the influence of these residues in the antagonist mechanism of the tetrapeptide (Figure 11).
- In another aspect, the tetrapeptide was synthesized in the Pegilated form. For this purpose the polyethylene glycol (PEG) was introduced through an amidic bond on the C- terminal amino acid, by using a PEG with an amine linker. The tetrapeptide-PEG showed, by Soft Agar Assay and scratch assay, the same biological properties of the tetrapeptide (Figure 12 and Figure 13). The pegilation of the tetrapeptide antagonist object of this invention is an important aspect because the conjugation with the PEG increases its stability, its biological half-life and its pharmacokinetics.
- The tetrapeptide-PEG was used to perform in vivo studies. In particular, the breast cancer cells were inoculated into the intrascapular region of female nude mice and the mice were then randomized into 2 treatment groups: placebo (n = 5) or tetrapeptide-PEG (n = 5). The tumor volume was evaluated

for 1 month and the rats were sacrificed. The results showed a significant reduction in the size and weight of the tumor in mice treated with tetrapeptide-PEG, without recording any variation, between the 2 groups, in water and food intake and body weight. Immunoblotting analysis performed on tumor protein extracts showed a marked decrease in the phosphorylation levels of leptin activated pathways in tumors treated with tetrapeptide-PEG demonstrating its efficacy in antagonizing the signal of leptin in vivo (Figure 14)

This invention may be used by the Pharmaceutical Industry for the development of antitumor drugs.

Description of figures

Figure 1 MTT Assay in MCF-7 and SKBR3 cells after treatment with vehicle (-) or with different concentrations of the tetrapeptide (10nM, 100nM, 1 μ M, 10 μ M) for 96 hours;

Figure 2. Immuno blotting on protein extracts from MCF-7 and SKBR3 cells to evaluate the peptide activity in leptin-mediated pathway. The cells were pretreated with tetrapeptide (1 μ M) for 1 hour and then treated with leptin (500ng/ml) for 5, 15 and 30 minutes before carrying out cytosolic lysis. The same amount of cell extracts was analyzed to evaluate phosphorylation (p) of JAK2 (Tyr1008), STAT3 (Tyr705), AKT (Ser473), MAPK (Thr202/Thr204) and the expression of the total proteins through Immuno blotting analysis. GAPDH was used as loading and transfert control.

Figure 3. MTT Assay in MCF-7 and SKBR3 cells after treatment with leptin (500ng/ml) and different concentrations of the tetrapeptide (10nM, 100nM, 1μM) or with the scrambled peptide (S, 1μM). (*,p<0.05;**p<0.01; n.s.=non-significant);

Figure 4. Soft Agar assay in MCF-7 and SKBR3 cells treated with leptin (500ng/ml), with the tetrapeptide (1μM) or with the scrambled peptide (S, 1μM). (*,p<0.05;**p<0.01; n.s.=non-significant);

Figure 5. Immuno blotting from protein extracts of MCF-7 and SKBR3 cells to evaluate the peptide activity on cyclin D1 expression. The cells were pretreated with the peptide LDFI (1 μM) for an hour and then treated with leptin (500 ng/ml) for 24 hours. The same amount of cell extracts was analyzed to evaluate the cyclin D1 expression by immuno blotting analysis. GAPDH was used as loading and transfert control.

Figure 6 Scratch Assay in MCF-7 and SKBR3 cells treated with leptin (500 ng/ml), in presence and absence of the tetrapeptide (1μM) or the scrambled peptide (S, 1μM);

Figure 7 RT-PCR in MCF-7 and SKBR3 cells to evaluate the effect of the tetrapeptide on up regulation of the gene Ob. The cells were pretreated with the tetrapeptide (1μM) for an hour and then treated with letina (500 ng/ml) for 24 hours, before RNA extraction. Leptin mRNA levels (ob) were analyzed by semi-quantitative RT-PCR and normalized on mRNA levels of the control gene 36B4;

Figure 8 Immuno blotting on protein extracts from MCF-7 and SKBR3 cells to evaluate the peptide activity on EGF-mediated signaling. The cells were treated with EGF in the absence or presence of the peptide before cytosolic lysis. The same amount of cell extracts was tested in order to evaluate phosphorylation (p) of AKT (Ser473), MAPK (Thr202/Thr204) and the expression of the total proteins by immuno blotting analysis. GAPDH was used as loading and transferr control.

Figure 9. MTT Assay in MCF-7 and SKBR3 cells after treatment with EGF (100 ng/ml) and/or with the tetrapeptide (1 μ M). (*, $p < 0.05$; n.s.=non- significant);

Figure 10. Scratch Assay in MCF-7 and SKBR3 cells treated with EGF (100 ng/ml) and/or with the tetrapeptide (1 μ M);

Figure 11. Soft Agar assay in MCF-7 and SKBR3 cells treated with leptin (500 ng/ml), with the tetrapeptide (1 μ M) and with the modified tetrapeptides (D/A-F/A and L/A-IA);

Figure 12. Soft Agar assay in MCF-7 and SKBR3 cells treated with leptin (500 ng/ml), with the tetrapeptide (1 μ M) or with the tetrapeptide-PEG (1 μ M). (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$);

Figure 13. Scratch Assay in MCF-7 and SKBR3 cells treated with leptin (500 ng/ml), with the tetrapeptide (1 μ M) or with the tetrapeptide-PEG (1 μ M).

Figure 14. (A) SKBR3 cells were inoculated into the intrascapular region of female nude mice (10 mice) and then treated daily with vehicle (-) or peptide LDFI-PEG (10mg/kg/day) by intraperitoneal injection for 28 days (5 mice each group). Relative tumor volume (RTV) was calculated from the following

formula: $RTV=(V_x/V_1)$, where V_x is the tumor volume on day X and V_1 is the tumor volume at initiation of the treatment (day 1). *** $P<0.0001$ (**B**)

Immunoblotting of phosphorylated (p) STAT3, AKT, MAPK and total proteins from tumors excised from vehicle (-) and LDFI-PEG treated mice. β -actin was used as control of equal loading and transfer. Numbers below the blots represent the average fold change in phospho-proteins/total-proteins/GAPDH ratio relative to vehicle-treated xenografts.

RIVENDICAZIONI

1. Molecola sintetica antagonista della leptina costituita da un tetrapeptide in cui gli amminoacidi centrali sono Acido Aspartico e Fenilalanina caratterizzata dal fatto che nella sequenza degli amminoacidi del tetrapeptide almeno uno degli amminoacidi terminali è leucina o isoleucina.
2. Molecola sintetica antagonista della leptina secondo la rivendicazione 1 caratterizzata dal fatto che nella sequenza degli amminoacidi del tetrapeptide gli amminoacidi terminali sono Leucina e Isoleucina.
3. Molecola sintetica antagonista della leptina secondo la rivendicazione 1 caratterizzata dal fatto che nella sequenza degli amminoacidi del tetrapeptide gli amminoacidi terminali sono uno Isoleucina o leucina e l'altro Alanina.
4. Molecola sintetica antagonista della leptina secondo la rivendicazione 1 caratterizzata dal fatto che nella sequenza degli amminoacidi del tetrapeptide gli amminoacidi terminali sono entrambi leucina o isoleucina.
5. Molecola sintetica antagonista della leptina secondo le rivendicazioni 1, 2, 3 o 4 caratterizzata dal fatto che l'amminoacido C-terminale del tetrapeptide è legato al polietilenglicole (PEG).
6. Uso farmaceutico di un tetrapeptide secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1, 2, 3, 4 e 5 caratterizzato dal fatto che il tetrapeptide antagonizza la leptina in cellule tumorali in cui la leptina promuove la crescita e la progressione tumorale.

7. Uso farmaceutico di un tetrapeptide secondo la rivendicazione 6 caratterizzato dal fatto che le cellule tumorali sono cellule mammarie.
8. Molecola sintetica antagonista della leptina secondo la rivendicazione 5 efficace nell'antagonizzare il segnale della leptina anche in vivo.

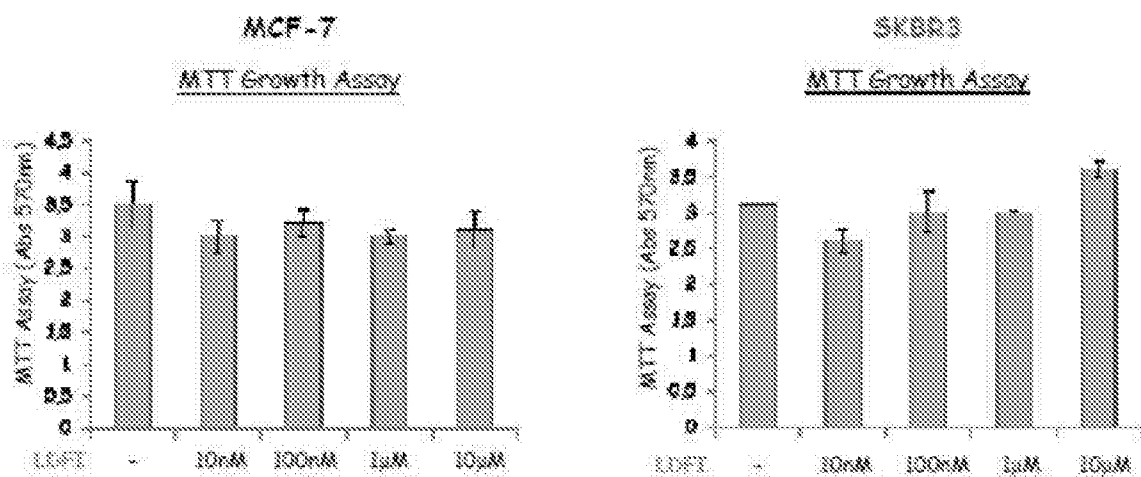


Fig. 1

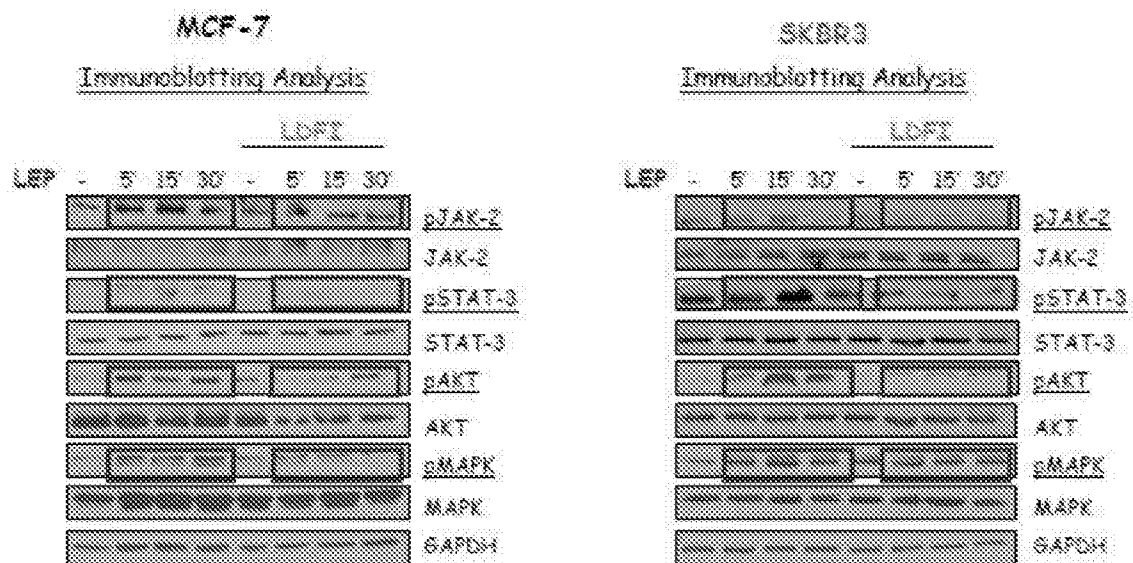


Fig. 2

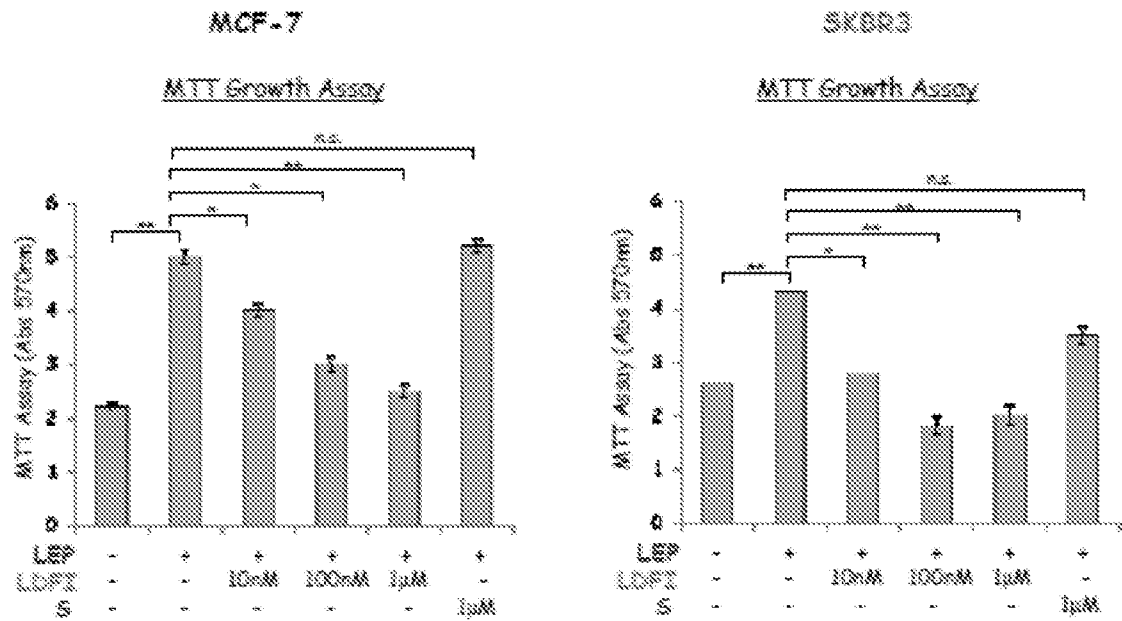


Fig. 3

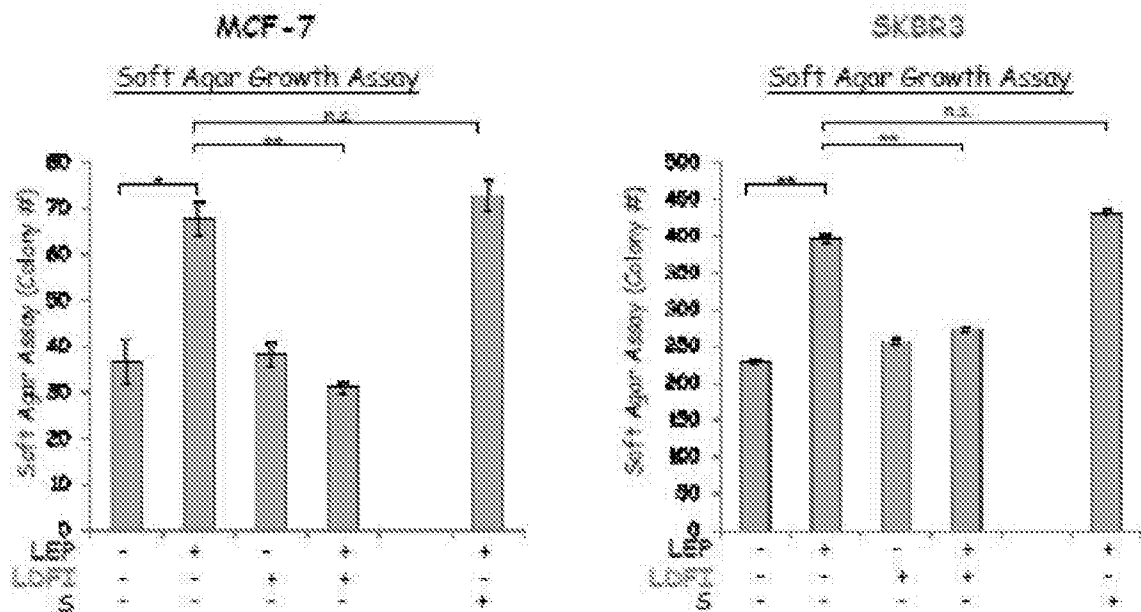


Fig. 4

Immunoblotting Analysis



Fig. 5

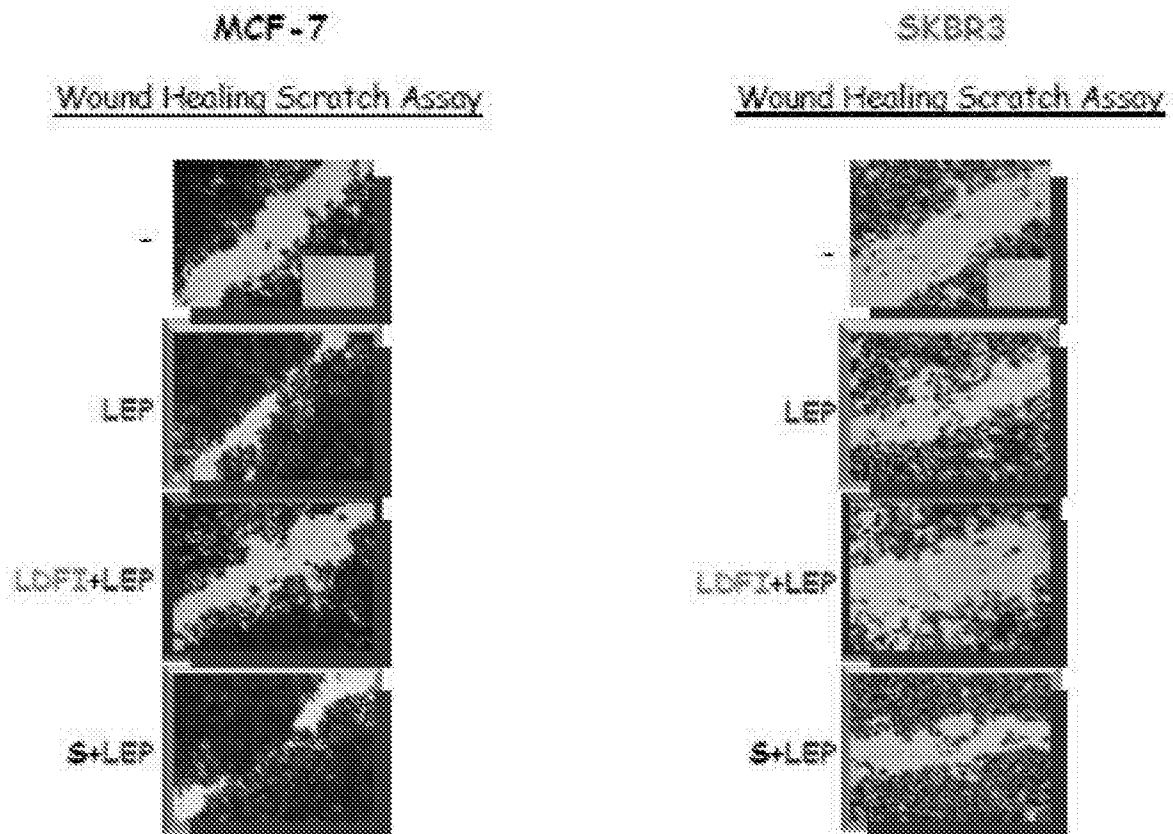


Fig. 6

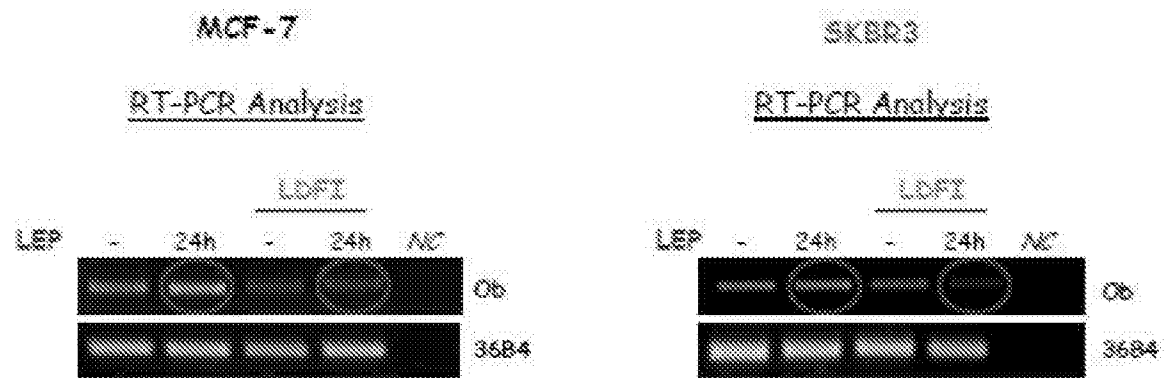


Fig. 7

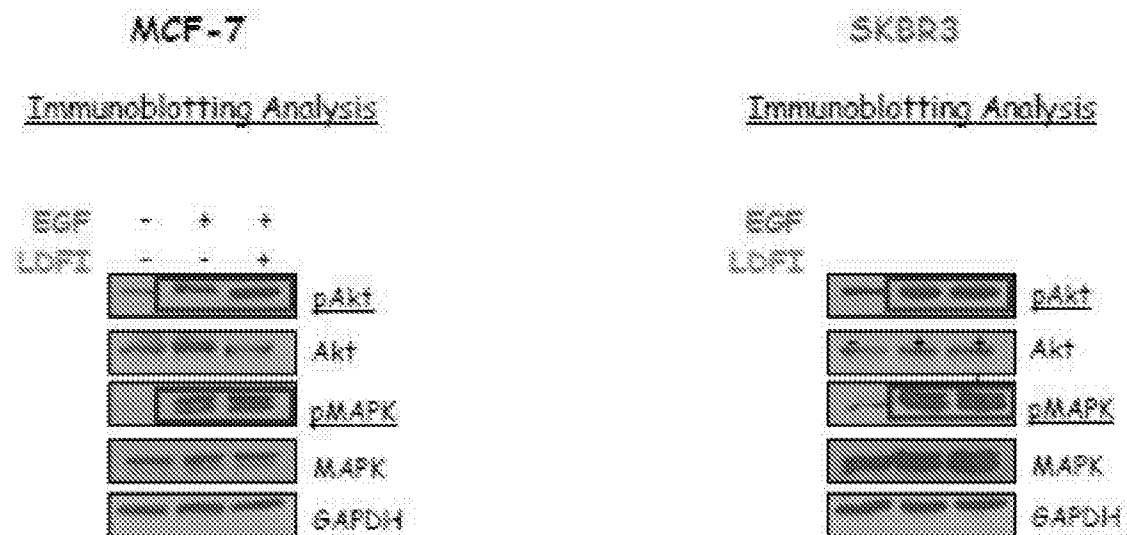


Fig. 8

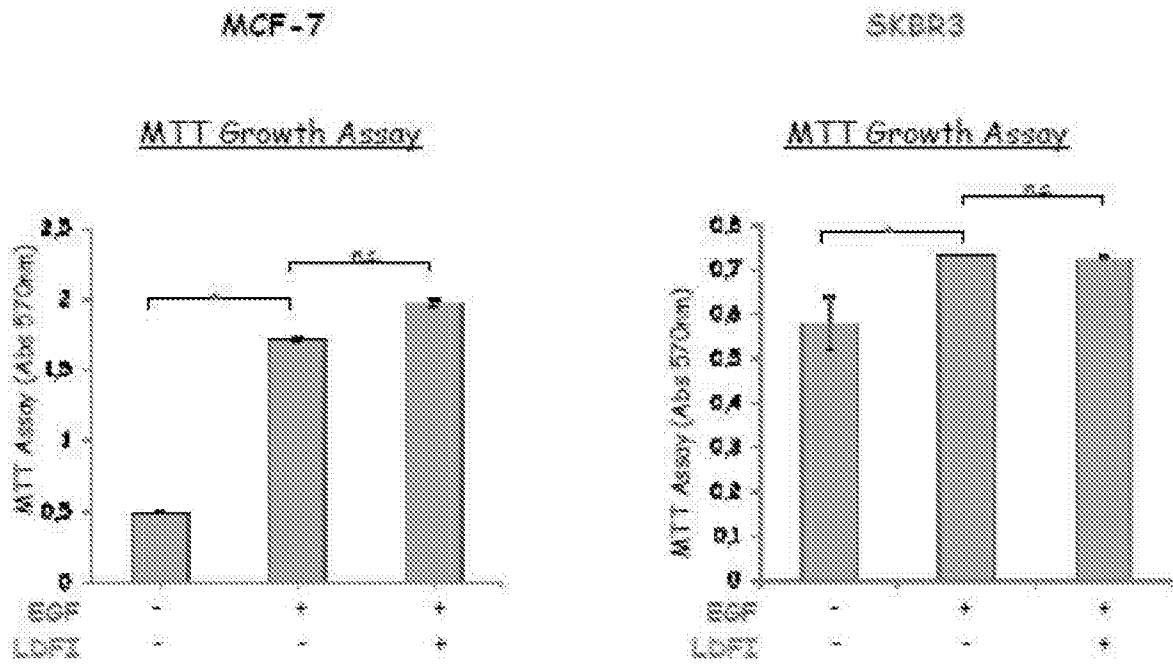


Fig. 9

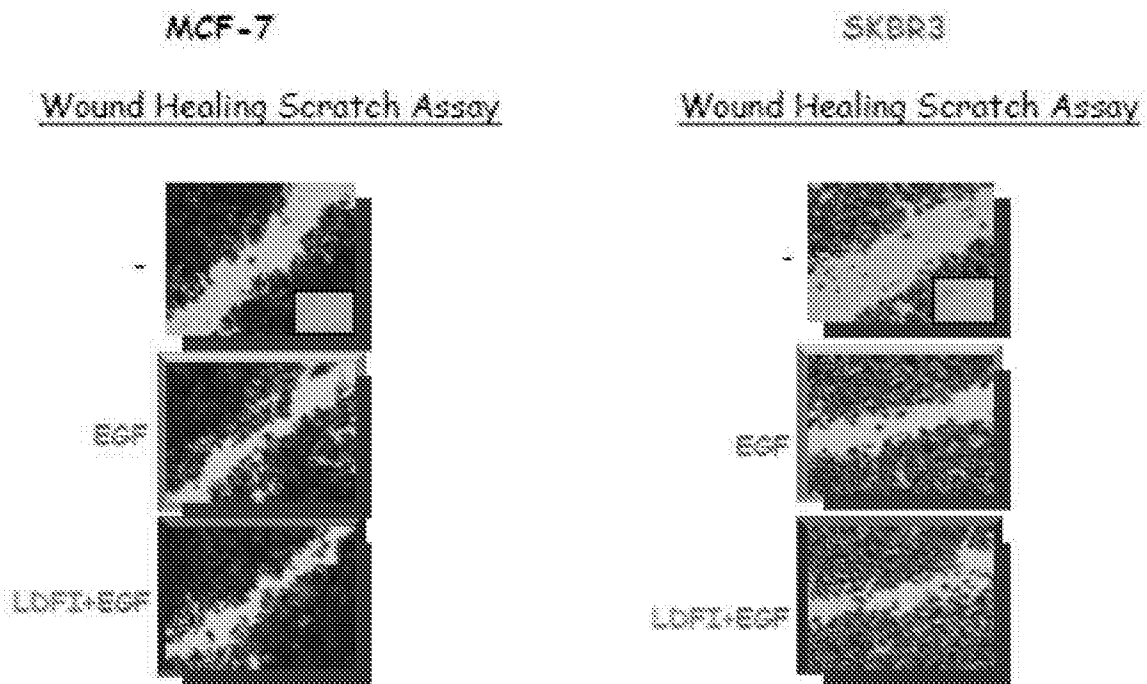


Fig. 10

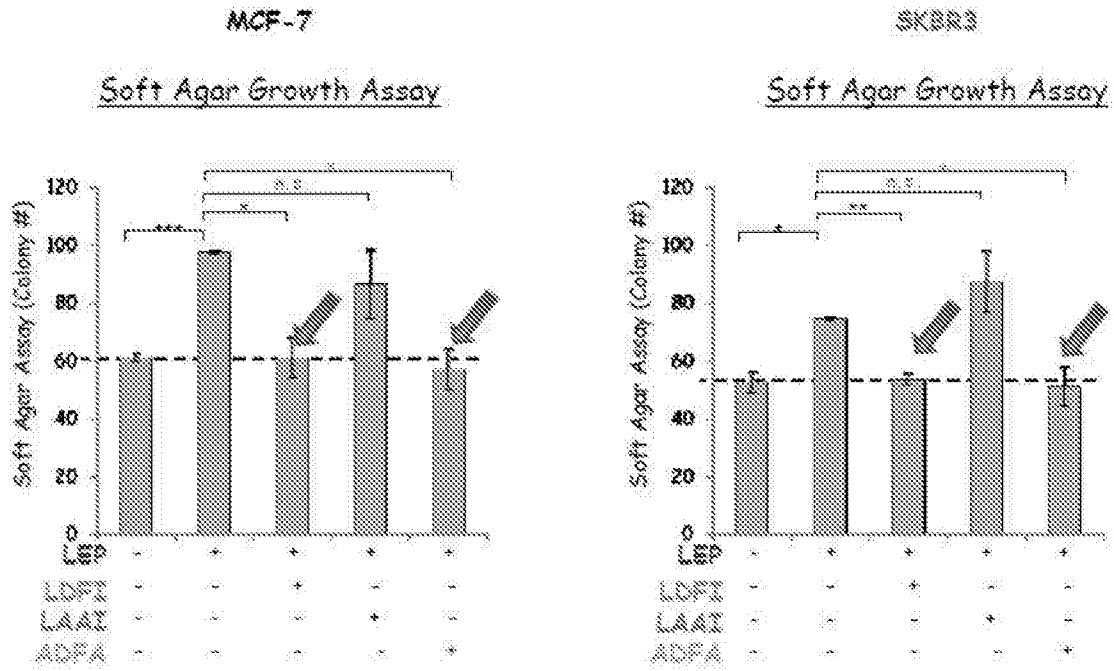


Fig. 11

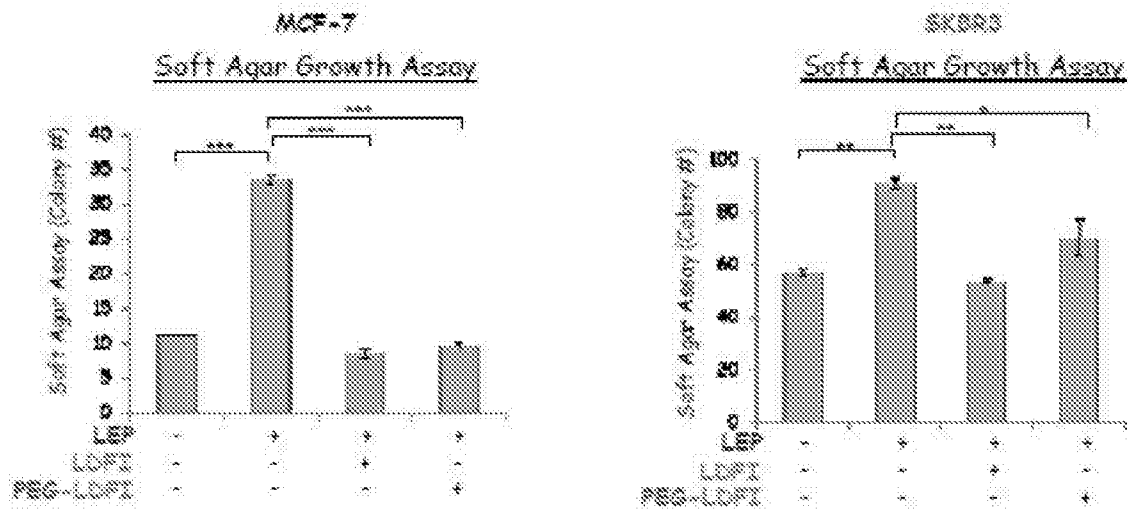


Fig. 12

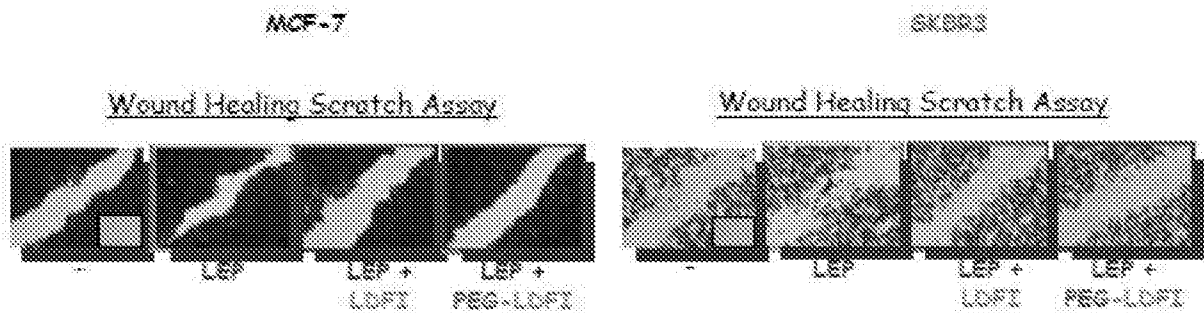


Fig. 13

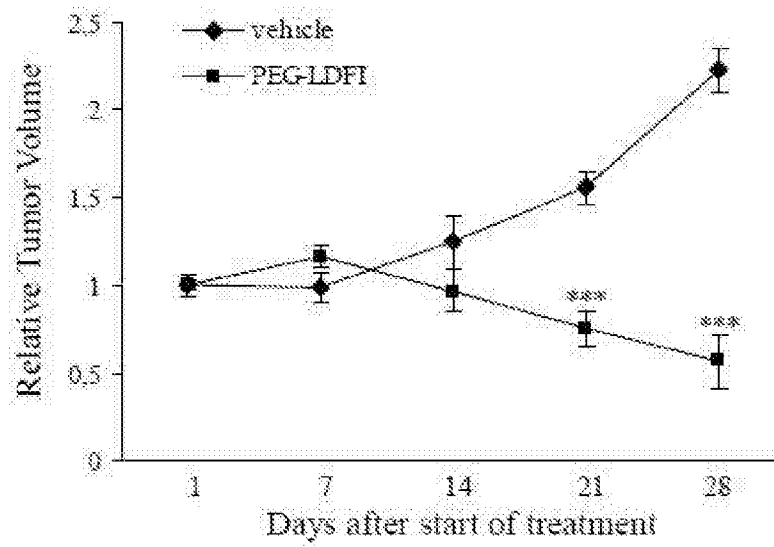
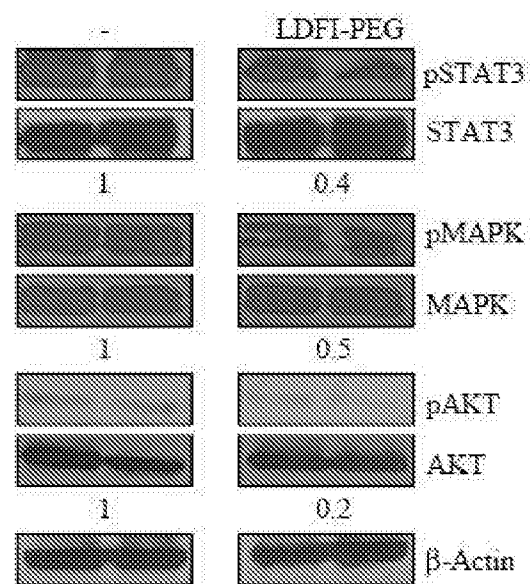
A**B**

Fig. 14