

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 444 492**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/65** (2006.01)

**C07K 14/655** (2006.01)

**A61K 38/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.03.2010 E 10716555 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2013 EP 2408809**

54 Título: **Péptidos que modulan la actividad del IGF y sus aplicaciones**

30 Prioridad:

**19.03.2009 FR 0951754**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**25.02.2014**

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE (100.0%)  
4, Place Jussieu  
75005 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**CARELLI, CLAUDE;  
LARON, ZVI y  
MAOR, GILA**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 444 492 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Péptidos que modulan la actividad del IGF y sus aplicaciones

La invención se refiere a los péptidos moduladores del IGF-1

**Antecedentes de la técnica**

- 5 El proceso canceroso, que se traduce en una proliferación celular descontrolada, es a menudo la expresión de una sobreexpresión de factores de crecimiento y/o de sus receptores en una misma célula (Moyses et al. 1985, Cassoni et al. 2006, Hanahan et al. 2000).

10 Numerosos factores, que actúan en red, son responsables de la progresión del ciclo celular y de la proliferación celular. En particular, un grupo de estos factores, denominados de «crecimiento», están representados por péptidos capaces de estimular la entrada en fase S y, al final, la división celular. Es el caso de los IGF (factores de crecimiento insulínicos) (Pardee 1989, Cross et al. 1991).

15 El IGF-1, en particular, que se sintetiza después de una estimulación de la hormona de crecimiento (GH, por *growth hormone*), actúa como una hormona endocrina e, igualmente, se puede considerar la verdadera hormona de crecimiento (Laron, 2001). Al actuar tanto de acuerdo con un mecanismo tanto paracrino como autocrino, esta hormona tiene una función importante en los niños, en los que estimula el crecimiento, mientras que en los adultos hace aumentar el anabolismo.

20 El receptor específico de esta hormona (IGF-1R) se expresa en numerosos tipos celulares diferentes y, por consiguiente, muchos tejidos del organismo dependen de la acción del IGF-1: se pueden citar el hígado, los riñones, el pulmón, los músculos, el tejido óseo y el cartílago, pero también el tejido nervioso. Por otra parte, el IGF-1 tiene efectos cercanos a los de la insulina porque se puede fijar —con una actividad débil— al del receptor de la insulina, regula el desarrollo de las células nerviosas y regula la síntesis del ADN.

25 La fijación del IGF-1 al receptor induce una señal intracelular que estimula el crecimiento y la proliferación celular (Perona, 2006). Esta actividad hace del IGF-1 a la vez un potente inhibidor de la apoptosis (muerte celular programada) y un activador de la síntesis proteica (Yanochko et al. 2006, Colón et al. 2007, Inoue et al. 2005). Finalmente, en algunas condiciones, el IGF-1 puede tener la doble función de inductor de la apoptosis y de estimulador de la proliferación celular (Fu et al. 2007, Rabinovsky, 2004a).

30 La red de señalización del IGF desempeña una función crucial en la progresión tumoral, incluso en el fenómeno metastásico (Hofmann et al. 2005) y en numerosos trabajos tanto experimentales como epidemiológicos se tiende a establecer una correlación significativa entre una tasa importante de IGF-1 y/o de su receptor y el aumento del riesgo, es decir, el establecimiento de una proliferación cancerosa (Vella et al. 2001, Talapatra et al. 2001, Kucab et al. 2003, Kambhampati et al. 2005, Bjorndahl et al. 2005, Gennigens et al. 2006, Velcheti et al. 2006, Yanochko et al. 2006, Sisci et al. 2007, Samani et al. 2007). De una manera general, está bien establecida la función del eje GH/IGF-1 en la oncogénesis y sobre todo en la estimulación de la progresión tumoral, como demuestran numerosos trabajos epidemiológicos y un estudio muy reciente que muestra que una deficiencia congénita del IGF-1 parece proteger frente al desarrollo de un cáncer (Sheva et al. 2007).

35 Los estudios clínicos con moléculas inhibitoras de la actividad de IGF demuestran el gran interés que puede tener su utilización en los diferentes tipos de cáncer, su efecto terapéutico cuando actúa en sinergia con la quimioterapia y la irradiación (Min et al. 2005, Carmiraud et al. 2005, Chinnavian et al. 2006, Wu et al. 2006, Deutsh et al. 2005, Warshamana-Greene et al. 2005). El IGF-1, al ser un mediador de la hormona de crecimiento, su producción puede ser retrasada o inhibida por la somatostatina antes de producir la hormona de crecimiento (GH).

40 La somatostatina (hormona inhibidora de la liberación la somatotropina, o SRIF por su nombre en inglés), secretada desde el hipotálamo, es un antagonista natural de la GHRH (neuropéptido que estimula la síntesis de la GH). En particular, al inhibir la GH, la SRIF inhibe la síntesis del IGF-1. Pero la SRIF tiene también una acción periférica, especialmente al actuar como una hormona digestiva que inhibe, por ejemplo, la secreción de las hormonas gastrointestinales y pancreáticas.

45 La capacidad que tienen la SRIF y sus análogos sintéticos para inhibir la proliferación celular y para desencadenar la muerte celular mediante mecanismos indirectos o directos se aprovecha en numerosos protocolos terapéuticos dirigidos contra diferentes tipos de cánceres en la medicina clínica humana. Además, la SRIF es capaz de inhibir la angiogénesis, lo que representa un interés potencial en la medicina clínica para el control indirecto del crecimiento de los tumores (Ferjoux et al. 2000). En efecto, los tumores se alimentan por la neovascularización (angiogénesis), o los análogos de la SRIF, que inhiben la proliferación celular, tienen de igual forma un efecto indirecto sobre la secreción de los factores de crecimiento, tal como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, por *vascular endothelial growth factor*), a la vez que reduce la quimiotaxis de los monocitos (Dasgupta 2004, Garcia de

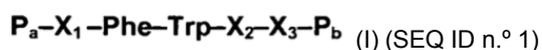
la Torre et al. 2002).

Sin embargo, la utilización de los análogos de la SRIF sólo es posible en los cánceres que expresan los receptores de la SRIF. De esta forma, la eficacia de los análogos de la SRIF utilizados en la medicina clínica sólo se ha demostrado explícitamente en el tratamiento de los tumores neuroendocrinos, gastroenteropancreáticos, del cerebro, de la mama, de la próstata y del pulmón (Ferjoux et al. 2000). Por otra parte, no hay que olvidar que la tasa y el perfil de expresión de los receptores de la SRIF varía enormemente entre los diferentes carcinomas.

Se han propuesto moléculas análogas de la somatostatina, inhibidoras del «sistema IGF» (Pawlikoski M. et al. 2004). Se trata especialmente del BIM 23A387, de la octreotida y de la lanreotida (dos péptidos octaméricos). Estas moléculas modulan la expresión del receptor o de su ligando, y son candidatos interesantes para el tratamiento de los diferentes tipos de cáncer y de la acromegalia. Otro ejemplo, el ligando biespecífico y sintético BIM-23244 (Rani C. 2004, Rani C. 2006, Pandit A. 2008) es capaz de inhibir la secreción de la hormona de crecimiento en los adenomas somatotropos.

### Compendio de la invención

Los inventores proponen ahora nuevos péptidos capaces de modular los efectos del IGF-1. Estos péptidos comprenden la secuencia de 20 a 24 aminoácidos (I) que viene a continuación:



en la que:

- P<sub>a</sub> representa una secuencia que comprende de 10 a 12 aminoácidos elegida entre las secuencias:

Phe-Gly-Ser-Arg-Lys-Phe-Ser-Tyr-Lys-Ala (SEQ ID NO: 3)

Asn-Phe-Gly-Ser-Arg-Lys-Phe-Ser-Tyr-Lys-Ala (SEQ ID NO: 4)

Ser-Asn-Phe-Gly-Ser-Arg-Lys-Phe-Ser-Tyr-Lys-Ala (SEQ ID NO: 5)

- X<sub>1</sub> es un resto de lisina, arginina o histidina;

- X<sub>2</sub> es un resto de treonina o lisina;

- X<sub>3</sub> es un resto de aspartato o glutamato; y

- P<sub>b</sub> representa una secuencia que comprende de 5 a 7 aminoácidos elegida entre las secuencias:

Val-Thr-Thr-Ser-Glu (SEQ ID NO: 6)

Val-Thr-Thr-Ser-Glu-Leu (SEQ ID NO: 7)

Val-Thr-Thr-Ser-Glu-Leu-Gly (SEQ ID NO: 8)

Asimismo se incluye en la invención un péptido resistente a la proteólisis derivado de la secuencia (I) por modificación del extremo amino en forma de acetilo, y/o del extremo carboxilo en forma de un grupo amida y/o de al menos un enlace peptídico modificado y reemplazado por un enlace (CH<sub>2</sub>-NH), un enlace (NH-CO), un enlace (CH<sub>2</sub>-O), un enlace (CH<sub>2</sub>-S), un enlace (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), un enlace (CO-CH<sub>2</sub>), un enlace (CHOH-CH<sub>2</sub>), un enlace (N-N), un enlace alqueno-E o incluso un enlace (CH=CH), o un péptido homólogo definido por derivarse de la secuencia (I) mediante una o varias sustituciones conservativas y que presentan más del 80% de los aminoácidos idénticos a los de la secuencia (I).

Estos péptidos son útiles para modular, preferiblemente para estimular, una proliferación celular *in vitro*.

La invención tiene asimismo por objeto una composición farmacéutica que comprende al menos tal péptido como principio activo, asociado a uno o varios excipientes fisiológicamente aceptables.

La presente invención también tiene por objeto un péptido, tal como el definido aquí, para una utilización como medicamento.

### Descripción detallada de la invención

Definiciones

La terminología «modulación» se refiere a una actividad inhibidora y/o activadora de los péptidos de la invención sobre las funciones del IGF-1.

5 Por «inhibición» se entiende todo efecto inhibidor de la síntesis del IGF-1 y/o la expresión del IGF-1R que incluye una inhibición y/o una regulación negativa que reduce la actividad, la activación, las funciones y/o la expresión del IGF-1. Por «activación» se entiende cualquier efecto potenciador, estimulador o activador de la síntesis del IGF-1 y/o de la expresión del IGF-1R que incluye una activación y/o una regulación positiva de la actividad, funciones y/o expresión del IGF-1. Un efecto inhibidor y/o activador de un péptido se estudia mediante la medición de la expresión del IGF-1 y/o del IGF-1R. También se puede estudiar la inhibición y/o la activación inducida por un péptido de la invención por medio del cultivo celular que expresa el IGF-1 y/o el IGF-1R.

10 La terminología «paciente» se refiere a cualquier animal humano o no humano, preferiblemente un mamífero, que incluye varón, mujer, adulto y/o niño que necesita un tratamiento que modula la síntesis del IGF-1 y/o la expresión del receptor del IGF-1.

15 La terminología «tratamiento» o «terapia» comprende tanto un tratamiento curativo como un tratamiento preventivo de una enfermedad. Un tratamiento curativo se define como cualquier tratamiento que conduce a la curación o cualquier tratamiento que alivia, mejora y/o elimina, reduce y/o estabiliza los síntomas de una enfermedad o el sufrimiento que provoca. Un tratamiento preventivo comprende tanto un tratamiento que conduce a la prevención de una enfermedad como un tratamiento que reduce y/o retrasa la incidencia de una enfermedad o el riesgo de que aparezca.

20 La expresión «sustitución conservativa» expresa todo reemplazo de un resto de aminoácido por otro, sin la alteración de la conformación general ni de la función del péptido. La sustitución conservativa incluye, sin limitación, el reemplazo por un aminoácido que tiene propiedades similares (como, por ejemplo, la forma, la polaridad, la capacidad para formar puentes de hidrógeno, la acidez, la basicidad, la hidrofobia y otras). Los aminoácidos que tienen propiedades similares se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, la arginina, la histidina y la lisina son aminoácidos hidrófilos básicos y pueden intercambiarse. De la misma manera, la isoleucina, un aminoácido hidrófobo, se puede reemplazar por leucina, metionina o valina. Los aminoácidos hidrófilos neutros que pueden sustituir los unos por los otros incluyen asparragina, glutamina, serina y treonina. Por «sustituido» y «modificado», la invención comprende los aminoácidos que se han alterado o modificado en relación con un aminoácido que se encuentra en la naturaleza. La expresión «secuencia sustancialmente homóloga» comprende cualquier secuencia que ha sufrido una o varias sustituciones conservativas.

30 Así pues, en el contexto de la presente invención, una sustitución conservativa se conoce en la técnica como una sustitución de un aminoácido por otro que tiene propiedades similares. Ejemplos de sustituciones conservativas se dan en la tabla 1 que viene a continuación:

Tabla 1. Sustituciones conservativas I

Característica de la cadena lateral	Aminoácido
Apolar	G A P I L V
Polar sin carga	C S T M N Q
Polar con carga	D E K R
Aromático	H F W Y
Otro	N Q D E

35 Según Lehninger, 1975, los aminoácidos conservativos pueden también agruparse como se ilustra en la tabla 2 que viene a continuación:

Tabla 2. Sustituciones conservativas II

## ES 2 444 492 T3

Característica de la cadena lateral	Aminoácido
Apolar (hidrófobo)	
A. Alifático:	A L I V P
B. Aromático:	F W
C. Que contiene un sulfurilo:	M
D. Otro	G
Polar sin carga	
A. Hidroxilo:	S T Y
B. Amidas:	N Q
C. Sulfhidrilo:	C
D. Otro	G
Cargado positivamente (básico)	K R H
Cargado negativamente (ácido)	D E

Aún otra alternativa de sustitución conservativa se presenta en la tabla 3 que viene a continuación:

Tabla 3. Sustituciones conservativas III

Resto original	Ejemplo de sustitución
Ala (A)	Val (V), Leu (L), Ile (I)
Arg (R)	Lys (K), Gln (Q), Asn (N)
Asn (N)	Gln (Q), His (H), Lys (K), Arg (R)
Asp (D)	Glu (E)
Cys (C)	Ser (S)
Gln (Q)	Asn (N)
Glu (E)	Asp (D)
His (H)	Asn (N), Gln (Q), Lys (K), Arg (R)
Ile (I)	Leu (L), Val (V), Met (M), Ala (A), Phe (F)

Resto original	Ejemplo de sustitución
Leu (L)	Ile (I), Val (V), Met (M), Ala (A), Phe (F)
Lys (K)	Arg (R), Gln (Q), Asn (N)
Met (M)	Leu (L), Phe (F), Ile (I)
Phe (F)	Leu (L), Val (V), Ile (I), Ala (A)
Pro (P)	Gly (G)
Ser (S)	Thr (T)
Thr (T)	Ser (S)
Trp (W)	Tyr (Y)
Tyr (Y)	Trp (W), Phe (F), Thr (T), Ser (S)
Val (V)	Ile (I), Leu (L), Met (M), Phe (F), Ala (A)

#### Preparación de los péptidos:

5 Los péptidos de acuerdo con la invención se pueden preparar mediante todas las técnicas clásicas de síntesis peptídica, a saber en especial mediante síntesis química o recombinación génica. En un modo de realización preferido, los péptidos se obtienen mediante síntesis química. Más preferiblemente, los péptidos se obtienen bien mediante condensación sucesiva de los restos de aminoácidos en el orden requerido, bien mediante condensación de los restos sobre un fragmento previamente formado y que contiene ya varios aminoácidos en el orden apropiado, o aún más mediante condensación de varios fragmentos previamente preparados, procurando proteger, 10 previamente, todas las funciones reactivas que llevan los restos de los aminoácidos, excepto las funciones amino y carboxilo implicadas en el enlace peptídico durante la condensación, y en particular mediante la técnica de síntesis en fase sólida de Merrifield.

#### Propiedades de los péptidos

Los péptidos de la invención son capaces de modular los efectos del IGF-1. Estos péptidos comprenden, o están formados por, la secuencia de 20 a 24 aminoácidos (I) que viene a continuación:

15  $P_a-X_1-Phe-Trp-X_2-X_3-P_b$  (I) (SEQ ID n.º 1)

en la que:

-  $P_a$  representa una secuencia que comprende de 10 a 12 aminoácidos elegida entre las secuencias:

**Phe-Gly-Ser-Arg-Lys-Phe-Ser-Tyr-Lys-Ala (SEQ ID NO: 3)**

**Asn-Phe-Gly-Ser-Arg-Lys-Phe-Ser-Tyr-Lys-Ala (SEQ ID NO: 4)**

**Ser-Asn-Phe-Gly-Ser-Arg-Lys-Phe-Ser-Tyr-Lys-Ala (SEQ ID NO: 5)**

-  $X_1$  es un resto de lisina, arginina o histidina;

20 -  $X_2$  es un resto de treonina o lisina;

-  $X_3$  es un resto de aspartato o glutamato; y

-  $P_b$  representa una secuencia que comprende de 5 a 7 aminoácidos elegida entre las secuencias:

Val-Thr-Thr-Ser-Glu (SEQ ID NO: 6)

Val-Thr-Thr-Ser-Glu-Leu (SEQ ID NO: 7)

Val-Thr-Thr-Ser-Glu-Leu-Gly (SEQ ID NO: 8)

5 También se incluye en la invención un péptido resistente a la proteólisis derivado de la secuencia (I) mediante una o varias modificaciones químicas, o un péptido sustancialmente homólogo derivado de la secuencia (I) mediante una o varias sustituciones conservativas.

Preferiblemente,  $X_1$  es un resto de lisina,  $X_2$  es un resto de treonina y  $X_3$  es un resto de aspartato.

En un modo de realización preferido, el péptido comprende la secuencia de los aminoácidos siguiente:

**SNFGSRKFSYKAKFWTDVTTSELG (SEQ ID NO : 2)**

10 Preferiblemente, los extremos amino y/o carboxilo están protegidos de la proteólisis. Por ejemplo, el extremo amino puede estar en forma de un acetilo, y/o el extremo carboxilo puede estar en forma de un grupo amida. Se contempla cualquier modificación dirigida a hacer resistentes los péptidos de la invención, por ejemplo, los péptidos en los que se modifica al menos un enlace peptídico y se reemplaza por un enlace ( $\text{CH}_2\text{NH}$ ), por un enlace ( $\text{NHCO}$ ), por un enlace ( $\text{CH}_2\text{-O}$ ), por un enlace ( $\text{CH}_2\text{-S}$ ), por un enlace ( $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), por un enlace ( $\text{CO-CH}_2$ ), por un enlace ( $\text{CHOH-CH}_2$ ), por un enlace ( $\text{N-N}$ ), por un enlace alqueno-E o incluso por un enlace  $\text{-CH=CH}$ .

15 En la presente invención están comprendidos todos los péptidos modificados químicamente para que resistan la proteólisis.

Por ejemplo, el péptido que viene a continuación, denominado P70, puede estar en forma de

Acetil- **SNFGSRKFSYKAKFWTDVTTSELG** -Amida

20 La invención prevé igualmente péptidos sustancialmente homólogos derivados de la secuencia (I) mediante una o varias sustituciones conservativas. Dos secuencias de aminoácidos se dice que son «sustancialmente homólogas» o «sustancialmente similares» cuando uno o varios restos de aminoácido están reemplazados por uno o varios restos similares desde un punto de vista biológico, o cuando más del 80% de los aminoácidos son idénticos, o preferiblemente cuando más del 90% de los restos son idénticos (funcionalmente idénticos). Las secuencias similares u homólogas se identifican preferiblemente mediante alineamiento con, por ejemplo, el programa «Pileup»  
25 del GCG (Genetics Computer Group, manual de programa para el paquete GCG, versión 7, Madison, Wisconsin), o con cualquier otro programa conocido por el experto en la técnica (BLAST, FASTA, etc).

30 De acuerdo con la invención, todos los restos aminoacídicos de los péptidos pueden pertenecer a la serie L (levogiro). Sin embargo, también es posible, cualquiera que sea el aminoácido de la secuencia (I), sustituir con la forma D (dextrogiro) la forma L. En particular, se contempla que algunos aminoácidos —que se sitúan en las posiciones 11 a 18 de la secuencia (I) y en particular el triptófano en la posición 15— pertenecen a la serie D, para conferir a los péptidos una mayor resistencia en la acción de las peptidasas.

35 Ventajosamente, los péptidos de acuerdo con la invención se unen de forma covalente, a nivel de su extremo carboxilo o de un resto de lisina, a una o varias moléculas de polietilenglicol (PEG) y en particular a un PEG de masa molecular 1500 o 4000, para aumentar la semivida plasmática y para disminuir la dosis terapéutica a administrar. Este enlace se puede realizar como se describe en Abuchowski et al (*J. Biol. Chem.* 1977, 252: 3582-3586). Según otro modo de realización, los péptidos de la invención se introducen en polímeros o en copolímeros biodegradables que forman microesferas, por ejemplo el poli(D,L-lactida-co-glucólido) [patente de los EE.UU. US2007/0184015, SoonKap Hahn et al.].

40 Los péptidos de la invención, muy diferentes de la somatostatina endógena (nativa), o los péptidos anteriormente descritos presentan una conformación molecular en «horquilla» (u horquilla  $\beta$ ) muy estable tanto en el medio fisiológico como en el medio hidrófobo. Ventajosamente, ninguna condición del medio podrá inducir una transición de la conformación peptídica a hélice  $\alpha$ .

45 Además, esta conformación de «horquilla» permite exponer bien, justo en el centro del acodamiento formado por el plegamiento de la secuencia peptídica, dos aminoácidos (Phe-Trp) sobre los cuatro aminoácidos contiguos (Phe-Trp-Lys-Thr) que en la SRIF se consideran importantes para la fijación a los receptores. Sin desear comprometerse con una hipótesis, los inventores piensan que en la secuencia de los péptidos de la invención, una atracción de tipo electrostático entre el aminoácido de la posición 13 y el aminoácido de la posición 17 permite reproducir una especie de «acodamiento» que hace adoptar a todo el péptido una conformación de tipo  $\beta$  (conformación  $\beta$  de tipo

VIII).

Los péptidos de la invención presentan un efecto bifásico. También son capaces, según la concentración utilizada, de estimular o inhibir la producción de IGF-1 así como la expresión de su receptor (IGF-1R). *In vitro*, estos efectos tienen como consecuencia bien la estimulación o bien la inhibición de la proliferación celular.

5 Este efecto bifásico, o «efecto en campana» de una molécula biológica, que en función de la dosis utilizada se traduce en un efecto agonista o antagonista, se conoce bien para otras moléculas y en sistemas biológicos diferentes (enzimas [Gamage et al. 2003, He et al. 2003], canales iónicos y cotransportadores [Arias et al. 1996, Lombardi et al. 2001, Borst et al. 2002, Incerpi et al. 2003], transportadores [Henry et al. 2002], receptores con tirosina cinasa [Leiser et al. 1986, Schlessinger 1988], receptores acoplados a proteínas G (los GPCR por su nombre  
10 en inglés), neurotransmisores, hormonas y quimiocinas [Winding et al. 1993, Chidiac et al. 1996, Bronnikov et al. 1999, Cuthbert 2003, Hormigold et al. 2003, Griffin et al. 2003, Fuh et al. 1992, Talmadge 1998] y en particular en lo que se refiere a la GnRH y a sus análogos [Browning J. Y. et al. 1983, Ho M. N. et al. 1997, Barbarino A. et al. 1982, Imai, A et al. 1993, Kang, Sung K. et al. 2000 y 2001, Gründker C. et al. 2003, Leung P. C. K et al. 2003, Bhasin S. et al. 2008].

15 Los péptidos de la invención también son útiles para estimular *in vitro* la proliferación celular, por ejemplo, en el ámbito de los cultivos de condrocitos, queratocitos o hepatocitos, o para la preparación de tejidos de interés médico.

Teniendo en cuenta sus notables propiedades, los péptidos de acuerdo con la invención tienen numerosas aplicaciones, *in vitro* e *in vivo*, en especial en la medicina humana o en la medicina veterinaria.

Los péptidos de la invención se puede utilizar con una dosis adaptada

20 bien para estimular la síntesis de IGF-1 y/o la expresión del receptor de IGF-1;

bien para inhibir la síntesis de IGF-1 y/o la expresión del receptor de IGF-1.

La estimulación de la síntesis del IGF-1 y/o de la expresión de su receptor es lo que se busca especialmente en los casos siguientes:

25 Cuando los péptidos se utilizan como sustitutos de la hormona del crecimiento. Los péptidos son, en efecto, particularmente útiles en todas las indicaciones terapéuticas relacionadas con un déficit completo o parcial, congénito o adquirido, de la hormona de crecimiento endógena o del IGF-1, y en especial en el tratamiento de los retrasos estructurales del niño o del adulto. Otras aplicaciones terapéuticas comprenden, por ejemplo, el síndrome de Turner, el síndrome de Prader-Willi, la insuficiencia renal crónica. Los péptidos de la invención son, en particular, útiles contra las afecciones en las que un aumento de la masa muscular se puede buscar como los estados  
30 caquéticos relacionados con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida) o en el cáncer. Los péptidos son también útiles en el ámbito veterinario, en especial en la crianza bovina, porcina, de corderos, de caballos, etc.

35 Para el tratamiento terapéutico del síndrome metabólico, tal como la obesidad o la diabetes de tipo II (en especial al bajar la concentración de los lípidos en sangre y al mejorar el metabolismo de la glucosa), así como para estimular o restaurar las defensas inmunitarias, en particular en los sujetos ancianos o inmunodeprimidos, o para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias (tales como la diabetes de tipo I) y/o neurodegenerativas (tales como la esclerosis múltiple).

40 Para estimular la supervivencia de las células neuronales (efecto antiapoptótico), la diferenciación o el desarrollo neuronal, la regeneración de los nervios motores o sensitivos, la sinaptogénesis y la remielinización. Al estimular la producción del IGF-1, los péptidos de la invención se utilizan, por lo tanto, como agentes neurotróficos para estimular la neurogénesis y/o como agentes neuroprotectores (en particular en caso de episodio isquémico).

La inhibición de la síntesis del IGF-1 y/o de la expresión de su receptor se busca especialmente en los casos siguientes:

45 Cuando los péptidos se utilizan como sustituto de la somatostatina, como por ejemplo en las enfermedades para las cuales se prescriben la octreotida y la lanreotida. Entonces, el efecto biológico buscado puede, entre otras cosas, ser: una inhibición de la secreción hipofisaria de la GH, una inhibición de la secreción biliar, secreciones endocrinas y exocrinas pancreáticas y gastrointestinales. Los péptidos pueden, por ejemplo, utilizarse como sustituto de la somatostatina para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

50 Para el tratamiento de la acromegalia, en particular en los pacientes para los cuales no resultan convenientes ni la cirugía ni el tratamiento con radiación. El tratamiento con los péptidos de la invención tiene entonces por objetivo normalizar la concentración de IGF-1 en el suero.

Para el tratamiento del cáncer, en particular y sin limitarse a ellos, para el tratamiento del cáncer de mama, de

páncreas o de próstata o para el tratamiento de un adenoma hipofisario, o de un tumor endocrino digestivo. Los péptidos de la invención pueden también tratar las metástasis (en particular, las metástasis digestivas). Asimismo, también se contempla la utilización de los péptidos de la invención con una dosis inhibidora para tratar los síntomas (diarrea, sofocos) asociados a los tumores endocrinos digestivos.

5 Composiciones farmacéuticas:

Los péptidos de la invención se pueden administrar por cualquier vía de administración conocida, que incluye las vías: sistémica (parenteral, intravenosa...), oral, rectal, tópica, subcutánea, intrapulmonar (véase Agu et al. 2001) e intranasal. Según un modo de realización preferido, los péptidos de la invención se administran por vía intranasal.

10 *In vitro*, un ejemplo de dosis adaptada para estimular la síntesis del IGF-1 y/o la expresión del receptor del IGF-1 es una dosis con una concentración del orden de  $10^{-7}$  M, y un ejemplo de dosis adaptada para inhibir la síntesis del IGF-1 y/o la expresión del receptor de IGF-1 es una dosis a una concentración de al menos  $10^{-6}$  M.

Las dosis correspondientes *in vivo* se ajustan de manera clásica en función del efecto deseado y de la enfermedad a la que están destinadas:

15 Una dosis eficaz para estimular *in vivo* la síntesis del IGF-1 y/o la expresión de su receptor incluye una concentración de menos de 100 µg al día, preferiblemente de 10 µg a 100 µg al día. Preferiblemente, la dosis diaria eficaz está comprendida entre 10 µg y 50 µg. Una dosis eficaz para inhibir *in vivo* la síntesis del IGF-1 y/o la expresión de su receptor incluye una concentración de al menos 300 µg al día, preferiblemente de 300 µg a 3 mg al día. Preferiblemente, la dosis diaria eficaz está comprendida entre 1 mg y 3 mg, aún más preferiblemente la dosis diaria eficaz está comprendida entre 2 mg y 3 mg. Para una administración intranasal o intrapulmonar, o incluso para  
20 las formulaciones de liberación prolongada, las dosis estimuladoras y/o inhibidoras a prever pueden ser de 10 a 100 veces inferiores. Estas administraciones se pueden repetir durante largos periodos, preferiblemente durante un periodo que va de 3 a 6 meses.

La presente invención se conocerá mejor con la ayuda del complemento de descripción que sigue y que se refiere a los ejemplos que dan a conocer la actividad biológica de un péptido de acuerdo con la invención.

25 La secuencia del péptido de la invención utilizado en los ejemplos y en las figuras de la presente solicitud —denominado P70— consiste en la secuencia de aminoácidos siguiente:

Acetil- SNFGSRKFSYKAKFWTDVTTSELG -amida (SEQ ID n.º 2)

No obstante, se debe entender que estos ejemplos se ofrecen únicamente a modo de ilustración del objeto de la invención y que no constituyen de ninguna manera una limitación.

30 Legenda de las figuras

La figura 1 es un gráfico que muestra el efecto de P70 sobre la incorporación de [ $H^3$ ]-timidina en el ADN.

La figura 2 es un gráfico que muestra el efecto de P70 sobre la expresión del IGF-1R evaluada mediante la medición de la densidad óptica.

35 La figura 3 muestra el efecto de P70 sobre la expresión del IGF-1R en un cultivo primario de condrocitos de mandíbula de ratón recién nacido, mediante inmunohistoquímica.

La figura 4 muestra el efecto de P70 sobre la síntesis del IGF-1 en un cultivo primario de condrocitos de mandíbula de ratón recién nacido, mediante inmunohistoquímica.

La figura 5 muestra el efecto de P70 sobre la producción de colágeno de tipo II en un cultivo primario de condrocitos de mandíbula de ratón recién nacido, mediante inmunohistoquímica.

40 La figura 6 muestra el efecto de P70 sobre el proceso de condrogénesis en un cultivo primario de condrocitos de mandíbula de ratón recién nacido. Las flechas muestran los nódulos de formación del cartílago.

**Ejemplos**

Ejemplo 1: efecto de un péptido de la invención sobre la proliferación celular

45 Los efectos biológicos de los péptidos de la invención se han demostrado en un modelo de cultivo primario de condrocitos de mandíbula de ratón recién nacido.

Para evaluar la capacidad del péptido a la hora de hacer proliferar las células, los inventores han realizado una

prueba capaz de mostrar la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina en el transcurso de la duplicación del ADN según el método de Kurz et al., 1997. Esta prueba se ha adaptado al modelo utilizado por los inventores, a saber, un cultivo primario de condrocitos embrionarios de ratón.

5 Los condrocitos, obtenidos mediante disociación de los cóndilos de la mandíbula de ratón (MDCD) se han incubado en un medio de cultivo que permite la condrogénesis, en particular, se han incubado  $5 \times 10^5$  células/ml con 1  $\mu$ Ci de [<sup>3</sup>H]-timidina/ml del medio (Amersham, código TRA120, solución madre a 1 mCi/ml, actividad específica de 5 Ci/mmol) durante 3 horas a 37 °C en medio DMEM (medio de Eagle modificado de Dulbecco) que no contiene suero de ternera fetal (FCS, por su nombre en inglés) y complementado con 100  $\mu$ g/ml de ácido ascórbico, 1 mmol/l de cloruro de calcio, 10 mmol/l de  $\beta$ -glicerofosfato y antibióticos. El mismo medio, en el cual se han añadido 5  $\mu$ l de [<sup>3</sup>H]-timidina durante 2 minutos, se utiliza como control negativo. Después de haber retirado el sobrenadante y de lavar 2 veces las células con una solución fisiológica tamponada a pH 7,0 (PBS), se han lavado las células dos veces (durante 5 minutos) con metanol. A continuación se han lavado las células tres veces con una solución fría al 10% de ácido tricloroacético (TCA). Después de haber lavado dos veces más las células con agua bidestilada, se ponen las células en 200  $\mu$ l de NaHO a 0,3 M durante 15 minutos. A continuación, las células se transfieren a 3 ml de un líquido de centelleo neutralizado con 200  $\mu$ l de HCl a 0,3 M. Finalmente, después de haber sido agitadas vorticialmente con fuerza, las muestras que contienen las células se han colocado en un contador  $\beta$  durante 1 minuto.

20 Los resultados obtenidos demuestran (figura 1) que el péptido P70 tiene un efecto estimulador de la proliferación de los condrocitos un 53% superior al control que no está tratado (condrocitos que no han sido incubados con ningún péptido ni ningún otro factor de crecimiento), a la concentración más elevada ( $10^{-6}$  M), mientras que este efecto estimulador no se ha observado a una concentración más baja ( $10^{-7}$  M).

Ejemplo 2: efecto de un péptido de la invención sobre la síntesis del IGF-1 y sobre la expresión del receptor del IGF-1

25 Los inventores han estudiado el efecto de P70 sobre la síntesis del IGF-1 y sobre la expresión de su receptor (IGF-1R) por medio de condrocitos en cultivo. Los inventores han podido demostrar que el péptido tiene un efecto importante de estimulación de la producción de IGF-1 y de la expresión de su receptor (IGF-1R) cuando los condrocitos se incuban con una concentración baja de péptido ( $10^{-7}$  M) (figura 2).

En cambio, a una concentración más elevada ( $10^{-6}$  M), el péptido inhibe sensiblemente la producción del IGF-1 y de su receptor.

30 Mediante inmunohistoquímica (IHC) sobre un cultivo primario de condrocitos de 5 días (figura 3), los inventores demuestran también que el péptido P70 inhibe la expresión del receptor del IGF-1 a  $10^{-6}$  M (inhibición del 36,8% a una concentración elevada del péptido), mientras que estimula la expresión de este mismo receptor a  $10^{-7}$  M (aumento del 23,8% con una concentración baja del péptido). Asimismo (figura 4), el P70 inhibe la síntesis de IGF-1 a  $10^{-6}$  M (inhibición del 30% con una concentración alta del péptido) y la estimula a  $10^{-7}$  M (aumento del 90% con una concentración baja del péptido).

Ejemplo 3: efecto de un péptido de la invención sobre la diferenciación celular

40 Los condrocitos de embriones de ratón obtenidos siguiendo el mismo protocolo que los ejemplos anteriores, se han puesto en cultivo y se han incubado con el péptido P70 a una concentración de  $10^{-7}$  M. Al 5.º día de cultivo, los inventores muestran mediante inmunohistoquímica (marcación mediante anticuerpos específicos contra el colágeno de tipo II) que el péptido estimula significativamente la producción de colágeno de tipo II, que es el componente principal de la matriz extracelular y que sirve para la producción del cartílago articular (figura 5). En efecto, se observa un aumento del 150% respecto al testigo (control) sin tratar.

45 En la figura 6, el efecto del péptido P70, a la concentración de  $10^{-7}$  M, se ha comparado con los condrocitos sin tratar (control). Aparece con claridad que al 7.º día de incubación, en presencia del péptido, se observa una aceleración de la formación de los nódulos de cartílago. El desarrollo de los nódulos de cartílago (volumen/cultivo) se acelera del orden del 85%.

## Conclusión

El péptido P70 presenta un perfil bifásico:

- a una concentración baja ( $10^{-7}$  M):

50 estimula la diferenciación celular, especialmente porque acelera las primeras fases de la condrogénesis (véase la figura 5 —expresión del colágeno de tipo II— y la figura 6 —condrogénesis—)

estimula la producción del IGF-1 y la expresión del receptor del IGF-1 (véase la figura 2 —densidad óptica— y la

figura 3 —inmunohistoquímica—) y la síntesis del IGF-1 (véase la figura 4 —inmunohistoquímica—).

- a una concentración alta ( $10^{-6}$  M):

estimula la proliferación celular (véase la figura 1 —incorporación de timidina tritiada—)

5 inhibe la producción del IGF-1 (véase la figura 4 —inmunohistoquímica—) y la expresión del receptor de IGF-1 (véase la figura 2 —densidad óptica— y la figura 3 —inmunohistoquímica—)

Referencias bibliográficas

- **Arias HR:** (1996) Agonist self-inhibitory binding site of the nicotinic acetylcholine receptor. *J Neurosci Res*, 44:97-105.
- **Agu RU, Ugwoke MI, Armand M, Kinget R, Verbeke N.** The lung as a route for systemic delivery of therapeutic proteins and peptides. *Respir Res.* 2001;2(4):198-209. Epub 2001 Apr 12
- **Barbarino A,** De Marinis L., Mancini A., Giustacchini M., Alcini A.E. (1982) Biphasic effect of estradiol on luteinizing hormone response to gonadotropin-releasing hormone in castrated men, *Metabolism* 31(8):755-8
- **Bhasin S,** Heber D, Steiner B, Peterson M, Blaisch B, Campfield L A, Swerdloff R.S. (2008) Hormonal effects of GnRH agonist in the human male : II. Testosterone enhances gonadotrophin suppression induced by GnRH agonist. *Clinical Endocrinology* 20: 119-128
- **Bjorndahl M.** et al. (2005). "Insulin-like growth factor 1 and 2 induce lymphangiogenesis in vivo. *PNAS USA* 102, 15593-15598.
- **Borst P,** Elferink RO: Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* 2002, 71:537-592.
- **Bronnikov GE,** Zhang SJ, Cannon B, Nedergaard J (1999) A dual component analysis explains the distinctive kinetics of cAMP accumulation in brown adipocytes. *J Biol Chem*, 274:37770-37780.
- **Browning J.Y.,** R. D'Agata, A. Steinberger, H.E. Grotjan Jr and E. Steinberger (1983) Biphasic effect of gonadotropin-releasing hormone and its agonist analog (HOE766) on in vitro testosterone production by purified rat Leydig cells, *Endocrinology*, Vol 113, 985-991
- **Camiraud A. et al.** (2005). "Inhibition of insulin-like growth factor-1 receptor signalling enhances growth-inhibitory and proapoptotic effects of gefitinib (Iressa) in human breast cancer cells". *Breast Cancer Res.* 7, R570-579.
- **Cassoni P. et al.** (2006). "Grelin and cortistatin in lung cancer: expression of peptides and related receptors in human primary tumors in vitro effect on the H345 small cell carcinoma cell line". *J. Endocrinol. Invest.* 29, 781-790.
- **Chidiac P,** Nouet S, Bouvier M (1996) Agonist-induced modulation of inverse agonist efficacy at the beta 2-adrenergic receptor. *Mol Pharmacol*, 50:662-669.
- **Chinnavian P.** et al. (2006). "Radiation and new molecular agents, part II: targeting HDAC, HSP $\alpha$ , IGF-1R, PI3K, and Ras". *Semin. Radiat. Oncol.* 16, 59-64.

- **Colòn E.** et al. (2007). Insulin-like growth factor-I is an important antiapoptotic factor for rat Leydig cells during postnatal development. *Endocrinology* 148, 128-139.
- **Cross M., T.M. Dexter** (1991). "Growth factors in development, transformation, and tumorigenesis". *Cell* 64, 271-280
- **Cuthbert AW:** (2003) Benzoquinolines and chloride secretion in murine colonic epithelium. *Br J Pharmacol* , 138:1528-1534.
- **Dasgupta 2004,** (2004) « Somatostatin analogues : multiple roles in cellular proliferation, neoplasia, and angiogenesis » *Pharmacol Ther* 102 (1): 61-85
- **Deutsch E.** et al. (2005). "New strategies to interfere with radiation response : "biomodulation" of radiation therapy". *Cancer Radiother.* 9, 69-76.
- **Ferjoux G., C. Bousquet, P. Cordelier et al.** (2000). "Signal transduction of somatostatin receptors negatively controlling cell proliferation". *J. Physiol. (Paris)* 94, 205-210.
- **Fu P.** et al. (2007). "Insulin-like growth factor induces apoptosis as well as proliferation in LIM1215 colon cancer cells". *J. Cell. Biochem.* 100, 56-68.
- **Fuh G,** Cunningham BC, Fukunaga R, Nagata S, Goeddel DV, Wells JA (1992) Rational design of potent antagonists to the human growth hormone receptor. *Science*, 256:1677-80.
- **Gamage NU,** Duggleby RG, Barnett AC, Tresillian M, Latham CF, Liyou NE, McManus ME, Martin JL (2003) Structure of a human carcinogen-converting enzyme, SULT1A1. Structural and kinetic implications of substrate inhibition. *J Biol Chem*, 278:7655-7662
- **Garcia de la Torre N, Wass JA, Turner HE,** (2002) « Antiangiogenic effects of somatostatin analogues" *Clin Endocrinol* 2002 57(4): 425-441 Review
- **Gennigens C., C. Menetrier-Caux, J.P. Droz** (2006). "Insulin-like growth factor (IGF) family and prostate cancer". *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 58,124-145
- **Griffin MT,** Hsu JC, Shehnaz D, Ehlert FJ: Comparison of the pharmacological antagonism of M2 and M3 muscarinic receptors expressed in isolation and in combination. *Biochem Pharmacol* 2003, 65:1227-1241.
- **Gründker C.** and G. Emons (2003) Role of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in ovarian cancer. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1:65
- **Hanahan D. , R.A. Weinberg** (2000). "The hallmarks of cancer". *Cell* 100, 57-70.
- **He YA,** Roussel F, Halpert JR (2003) Analysis of homotropic and heterotropic cooperativity of diazepam oxidation by CYP3A4 using site-directed mutagenesis and kinetic modeling. *Arch Biochem Biophys*, 409:92-101.

- **Henry ER**, Bettati S, Hofrichter J, Eaton WA (2002) A tertiary two-state allosteric model for hemoglobin. *Biophys Chem*, 98:149-164.
- **Ho M.N.**, Delgado C.H., Owens G.A., Steller M.A. (1997) Insulin-like growth factor-II participates in the biphasic effect of a gonadotropin-releasing hormone agonist on ovarian cancer cell growth, *Fertility and Sterility* Volume 67, Number 5, May 1997 , pp. 870-876(7)
- **Hofmann F., C.** Garcia-Echeverria (2005). "Blocking insulin-like growth factor-I receptor as a strategy for targeting cancer". *DDT* 10, 1041-1047.
- **Hornigold DC**, Mistry R, Raymond PD, Blank JL, Challiss RA (2003) Evidence for cross-talk between M2 and M3 muscarinic acetylcholine receptors in the regulation of second messenger and extracellular signal-regulated kinase signalling pathways in Chinese hamster ovary cells. *Br J Pharmacol*, 138:1340-1350.
- **Imai, A**, Iida, K, Tamaya, T (1993) Gonadotropin-releasing hormone has a biphasic action on aromatase activity through protein kinase C in granulosa cells. *Int-J-Fertil-Menopausal-Stud.* 38(1): 50-56
- **Incerpi S**, D'Arezzo S, Marino M, Musanti R, Pallottini V, Pascolini A, Trentalance A (2003) Short-term activation by low 17beta-estradiol concentrations of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in rat aortic smooth muscle cells: physiopathological implications. *Endocrinology*, 144:4315-4324.
- **Inoue A. et al.** (2005). "Insulin-growth factor-I stimulated DNA replication in mouse endometrial stromal cells". *J. Reprod. Dev.* 51, 305-313.
- **Kambhampati S.** et al. (2005). "Growth factors involved in prostate carcinogenesis". *Front. Biosci.* 10, 1355-1367.
- **Kang, Sung K.**; Cheng, Kwai W.; Nathwani, Parimal S.; Choi, Kyung-Chul; Leung, Peter C. K.(2000) Autocrine Role of Gonadotropin-Releasing Hormone and Its Receptor in Ovarian Cancer Cell Growth. *Endocrine.* 13(3):297-304
- **Kang S.K.**, C-J Tai, P S. Nathwani and P.C. K. Leung (2001) Differential regulation of two forms of Gonadotrophin-related hormone messenger ribonucleic acid in human granulosa-luteal cells. *Endocrinology* 142: 1182-1192
- **Kucab J.E.**, S.E. Dunn (2003). "Role of IGF-1R in mediating breast cancer invasion and metastasis". *Breast Dis.* 17, 41-47
- **Kurz B, Schünke M**, (1997) « Articular chondrocytes and synoviocytes in culture : influence of antioxidants on lipid peroxidation and proliferation." *Ann. Anat.* 1997, 179: 439-446
- **Laron Z.** (2001). "Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) : a growth hormone". *J. Clin. Pathol. Mol. Pathol.* 54, 311-316.

- **Lehninger**, (1975) *Biochemistry*, Second Edition, Worth Publishers, Inc. New-York: NY., pp. 71-77.
- **Leiser J**, Conn PM, Blum JJ: (1986) Interpretation of dose-response curves for luteinizing hormone release by gonadotropin-releasing hormone, related peptides, and leukotriene C4 according to a hormone/receptor/effector model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83:5963-7.
- **Leung P.C.K.**, C.K.Cheng and Z. Xiao-Ming (2003) Multi-factorial role of GnRH-I and GnRH-II in the human ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology* 202: 145-153
- **Lombardi G**, Dianzani C, Miglio G, Canonico PL, Fantozzi R: Characterization of ionotropic glutamate receptors in human lymphocytes. *Br J Pharmacol* 2001, 133:936-944.
- **Min Y.** et al. (2005). "Insulin-like growth factor I receptor blockade enhances chemotherapy and radiation responses and inhibits tumor growth in human gastric cancer xenografts". *Gut* 54, 591-60.
- **Moyses E.** et al. (1985). "Somatostatin receptors in human growth hormone and prolactin-secreting pituitary adenomas". *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 61, 98-103.
- **Pandit A.**, fay N., Border L., Valéry C., Cherif-Cheikh R., Robert B., Artzner F., Paternoster M. J. (2008) *Pept. Sci.*, 14, 66-75.
- **Pardee A.B.** (1989). "G1 events and regulation of cell proliferation". *Science* 246, 603-608
- **Pawlikowski M.** et Malen-Mucha G. *Current Opinion in Pharmacology* (2004), 4, 608-613.
- **Perona R.** (2006). "Cell signaling: growth factors and tyrosine kinase receptors". *Clin. Transl. Oncol.* 8, 77-82l.
- **Rabinovsky E.D.** (2004). "The multifunctional role of IGF-I in peripheral nerve regeneration". *Neurol. Res.* 26, 204-210.
- **Rani C.**, Durrer L., Koerber S.C., Erchegyi J., Reubi J.C., Rivier J., Riek R. *J. Med. Chem.* (2004), 48, 523-533
- **Rani C.**, Durrer L., Koerber S.C., Erchegyi J., Reubi J.C., Rivier J., Riek R. *J. Med. Chem.* (2006), 49, 4487-4496
- **Samani A.A.** et al. (2007). "The Role of the IGF System in Cancer Growth and Metastasis: Overview and Recent Insights". *Endocrine Reviews* 28, 20-47.
- **Schlessinger J** (1998) Signal transduction by allosteric receptor oligomerization. *Trends Biochem Sci*, 13:443-447.

- **Shevah O., Z. Laron** (2007). "Patients with congenital deficiency of IGF-I seem protected from the development of malignancies: A preliminary report". *Growth Horm IGF Res.* 17, 54-57.
- **Sisci D., E. Surmacz** (2007). "Crosstalk between IGF Signaling and Steroid Hormone Receptors in Breast". *Cancer Curr. Pharm. Des.*13, 705-717.
- **Talapatra S., C. B. Thompson** (2001). "Growth factor Signaling in Cell Survival: Implications for Cancer". *Treatment JPET*, 298, 873-878.
- **Talmadge JE** (1998) Pharmacodynamic aspects of peptide administration biological response modifiers. *Adv Drug Deliv Rev*, 241-252
- **Velcheti V, Govindan R** (2006). "Insulin-like growth factor and lung cancer". *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 1 (7): 607–10.
- **Vella V. et al.** (2001). "The IGF system in thyroid cancer: new concepts". *J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol.* 54, 121-125
- **Warshamana-Greene G.S.** et al. (2005). "The insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor, NVP-ADW742, sensitized small cell lung cancer cell lines to the effects of chemotherapy". *Clin. Cancer. Res.* 11, 1563-1571.
- **Winding B, Bindslev N** (1993) Desensitization and reactivation of ACh-regulated exocrine secretion in hen tracheal epithelium. *Am J Physiol*, 264:C342-C351.
- **Wu X. Z., D. Chen, G. R. Xie** (2007). "Bone marrow-derived cells: roles in solid tumor". *Neoplasma* 54, 1-6.
- **Yanochko G.M., W. Eckhart** (2006). "Type I insulin-like growth factor receptor overexpression induces proliferation and anti-apoptotic signaling in a three-dimensional culture model of breast epithelial cells". *Breast Cancer Res.* 8, R18.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Universidad Pierre y Marie Curie
- 5 <120> Péptidos que modulan la actividad del IGF-1 y sus aplicaciones
- <130> B855
- <160> 8
- 10 <170> Patent In versión 3.3
- <210> 1
- <211> 7
- 15 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 20 <223> SEQ ID n.º: 1\_ fórmula (I)
- <220>
- <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
- <222> (1)..(1)
- <223> Xaa\_ es una \_secuencia que comprende de 10 a 12 aminoácidos elegida entre:
- 25 **Phe-Gly-Ser-Arg-Lys-Phe-Ser-Tyr-Lys-Ala** (a), Asn + (a), Ser-Asn + (a), o una secuencia sustancialmente homóloga
- <220>
- <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
- 30 <222> (2)..(2)
- <223> Xaa es un resto de lisina, arginina o histidina
- <220>
- <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
- 35 <222> (5)..(5)
- <223> Xaa es un resto de treonina o lisina
- <220>
- <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
- 40 <222> (6)..(6)
- <223> Xaa es un resto de aspartato o glutamato
- <220>
- <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
- 45 <222> (7)..(7)
- <223> Xaa es una secuencia que comprende de 5 a 7 aminoácidos elegida entre: **Val-Thr-Thr-Ser-Glu**, **Val-Thr-Thr-Ser-Glu-Leu**, **Val-Thr-Thr-Ser-Glu-Leu-Gly**, o una secuencia sustancialmente homóloga
- 50 <400> 1
- Xaa Xaa Phe Trp Xaa Xaa Xaa**
- 1 5**
- <210> 2
- <221> 24
- <212> PRT
- 55 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> SEQ ID n.º : 2\_ fórmula (II) \_ P70

<400> 2

**Ser Asn Phe Gly Ser Arg Lys Phe Ser Tyr Lys Ala Lys Phe Trp Thr**  
**1 5 10 15**

**Asp Val Thr Thr Ser Glu Leu Gly**  
**20**

5 <210> 3  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> SEQ ID n.º 3

<400> 3

**Phe Gly Ser Arg Lys Phe Ser Tyr Lys Ala**  
**1 5 10**

15 <210> 4  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> SEQ ID n.º 4

<400> 4

**Asn Phe Gly Ser Arg Lys Phe Ser Tyr Lys Ala**  
**1 5 10**

25 <210> 5  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> SEQ ID n.º 5

<400> 5

**Ser Asn Phe Gly Ser Arg Lys Phe Ser Tyr Lys Ala**  
**1 5 10**

35 <210> 6  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> SEQ ID n.º 6

45 <400> 6

**Val Thr Thr Ser Glu**  
**1 5**

50 <210> 7  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> SEQ ID n.º 7

<400> 7

**Val Thr Thr Ser Glu Leu**

5 **1** **5**

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> SEQ ID n.º 8

15 <400> 8

**Val Thr Thr Ser Glu Leu Gly**

**1** **5**

## REIVINDICACIONES

1. Péptido que comprende la secuencia de 20 a 24 aminoácidos (I) siguiente:

**P<sub>a</sub>-X<sub>1</sub>-Phe-Trp-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-P<sub>b</sub>** (I) (SEQ ID n.º 1)

en la que:

5 - P<sub>a</sub> representa una secuencia que comprende de 10 a 12 aminoácidos elegida entre las secuencias:

**Phe-Gly-Ser-Arg-Lys-Phe-Ser-Tyr-Lys-Ala** (SEQ ID NO: 3)

**Asn-Phe-Gly-Ser-Arg-Lys-Phe-Ser-Tyr-Lys-Ala** (SEQ ID NO: 4)

**Ser-Asn-Phe-Gly-Ser-Arg-Lys-Phe-Ser-Tyr-Lys-Ala** (SEQ ID NO: 5)

- X<sub>1</sub> es un resto de lisina, arginina o histidina;

- X<sub>2</sub> es un resto de treonina o lisina;

- X<sub>3</sub> es un resto de aspartato o glutamato; y

10 - P<sub>b</sub> representa una secuencia que comprende de 5 a 7 aminoácidos elegida entre las secuencias:

**Val-Thr-Thr-Ser-Glu** (SEQ ID NO: 6)

**Val-Thr-Thr-Ser-Glu-Leu** (SEQ ID NO: 7)

**Val-Thr-Thr-Ser-Glu-Leu-Gly** (SEQ ID NO: 8), o

15 un péptido resistente a la proteólisis definido por que deriva de la secuencia (I) mediante modificaciones del extremo amino en forma de un acetilo, y/o del extremo carboxilo en forma de un grupo amida y/o de al menos un enlace peptídico modificado y reemplazado por un enlace (CH<sub>2</sub>NH), un enlace (NHCO), un enlace (CH<sub>2</sub>-O), un enlace (CH<sub>2</sub>-S), un enlace (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), un enlace (CO-CH<sub>2</sub>), un enlace (CHOH-CH<sub>2</sub>), un enlace (N-N), un enlace alqueno-E o incluso un enlace -CH=CH, o un péptido homólogo definido por que se deriva de la secuencia (I) mediante una o varias sustituciones conservativas y que presenta más del 80% de los aminoácidos idénticos a la secuencia (I).

2. Péptido según la reivindicación 1, en el que X<sub>1</sub> es un resto de lisina, X<sub>2</sub> es un resto de treonina y X<sub>3</sub> es un resto de aspartato.

20 3. Péptido según la reivindicación 2, que consiste en la secuencia **SNFGSRKFSYKAKFWTDVTTSELG** (SEQ ID n.º 2).

4. Composición farmacéutica que comprende un péptido según una de las reivindicaciones 1 a 3 como principio activo, en asociación con uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables.

5. Utilización del péptido según una de las reivindicaciones 1 a 3, para modular una proliferación celular *in vitro*.

25 6. Péptido según una de las reivindicaciones 1 a 3, a modo de medicamento.

7. Péptido según una de las reivindicaciones 1 a 3, para una utilización con una dosis adaptada para estimular la síntesis de IGF-1 y/o la expresión del receptor de IGF-1.

8. Péptido según la reivindicación 7, utilizado *in vivo* con una dosis diaria eficaz de menos del 100 µg, preferiblemente de 10 µg a 100 µg, más preferiblemente de 10 µg y 50 µg.

30 9. Péptido según una de las reivindicaciones 1 a 3, para una utilización como sustituto de la hormona de crecimiento.

10. Péptido según una de las reivindicaciones 1 a 3, para una utilización en el tratamiento de la insuficiencia renal crónica, del síndrome de Turner o del síndrome de Prader-Willi, o

en el tratamiento terapéutico del síndrome metabólico, de enfermedades autoinmunitarias y/o neurodegenerativas.

35 11. Péptido según una de las reivindicaciones 1 a 3, para una utilización como agente neurótrofo y/o neuroprotector.

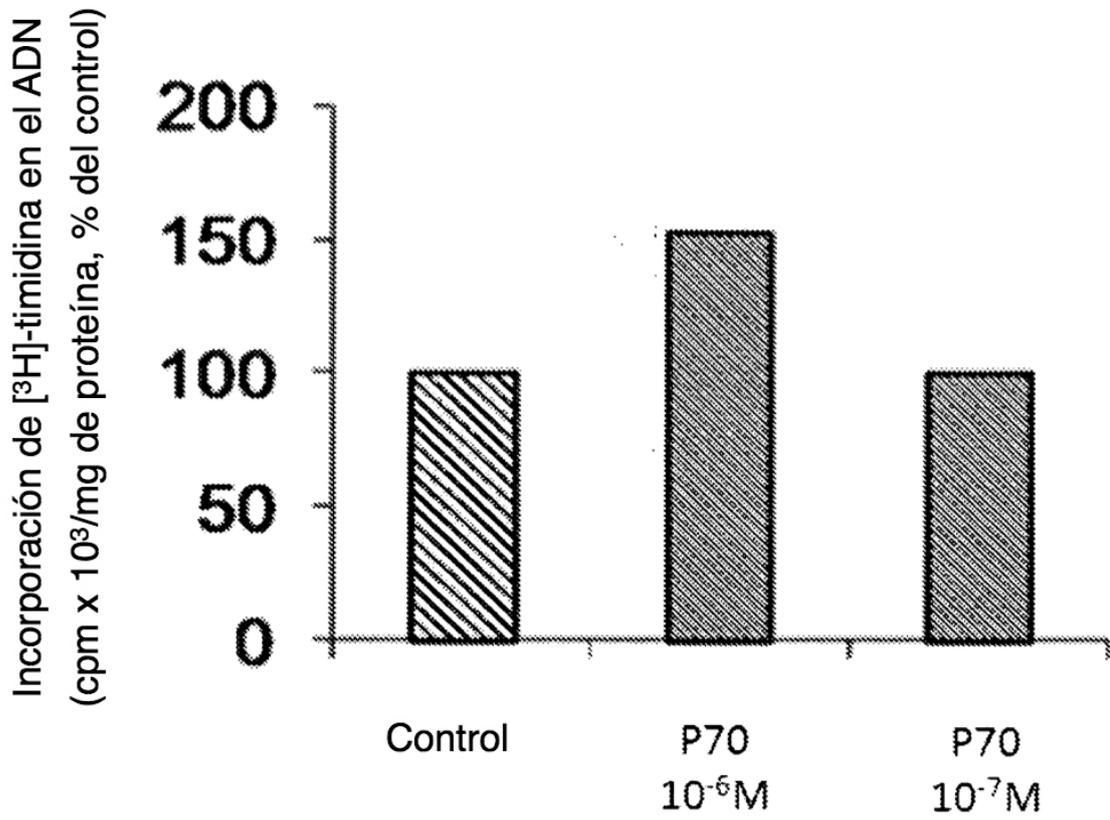
12. Péptido según una de las reivindicaciones 1 a 3, para una utilización a una dosis adaptada para inhibir la síntesis de IGF-1 y/o la expresión del receptor de IGF-1.

5 13. Péptido según la reivindicación 12, para una utilización *in vivo* con una dosis diaria eficaz de al menos 300 µg al día, preferiblemente de 300 µg a 3 mg al día, más preferiblemente de 1 mg a 3 mg, mucho más preferiblemente de 2 mg a 3 mg.

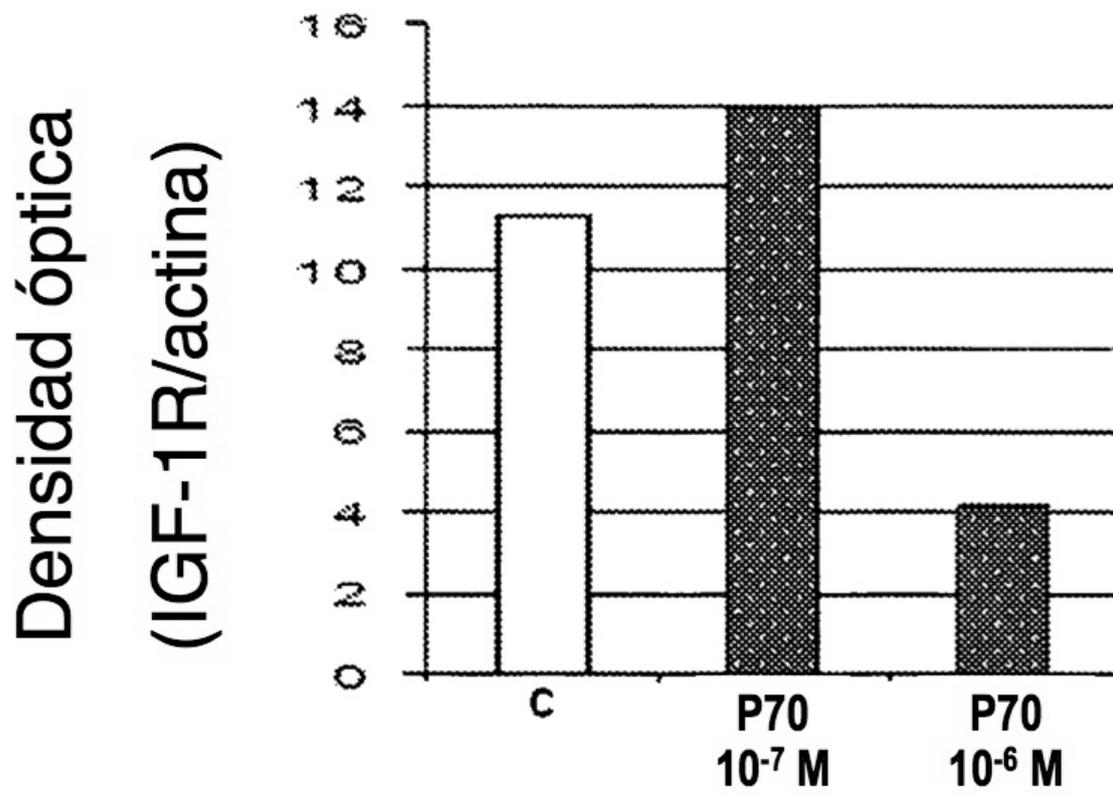
14. Péptido según una de las reivindicaciones 1 a 3, para una utilización como sustituto de la somatostatina.

15. Péptido según una de las reivindicaciones 1 a 3, para una utilización en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, o para una utilización en el tratamiento de la acromegalia o del cáncer, en particular en el tratamiento de metástasis.

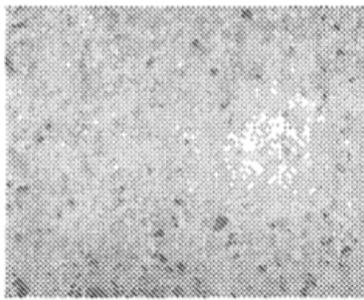
10



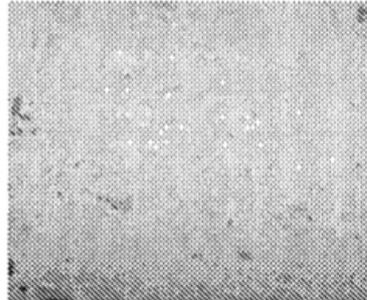
**Figura 1**



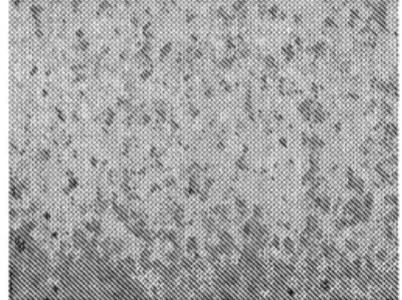
**Figura 2**



**Control**

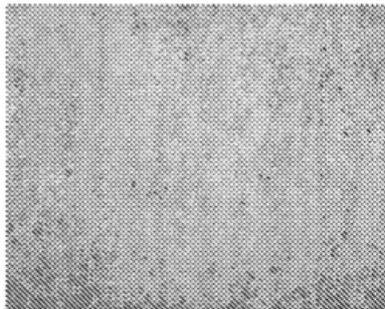


**P70  
10<sup>-6</sup>**



**P70  
10<sup>-7</sup>**

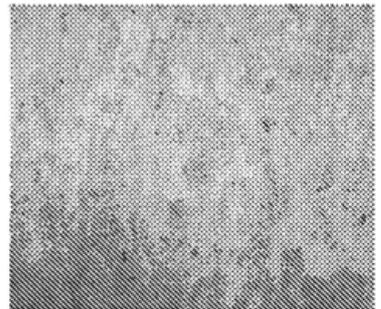
**Figura 3**



**Control**

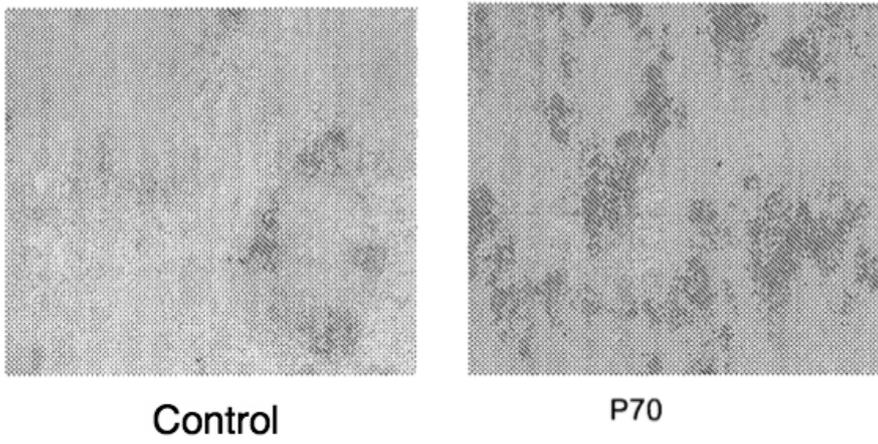


**P70  
10<sup>-6</sup>**

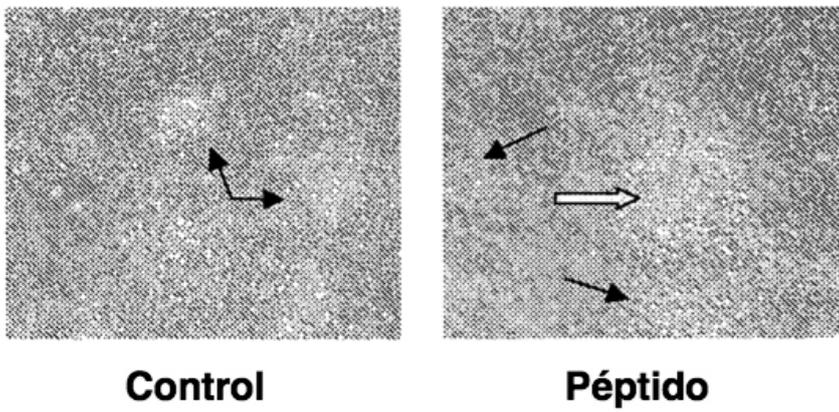


**P70  
10<sup>-7</sup>**

**Figura 4**



**Figura 5**



**Figura 6**