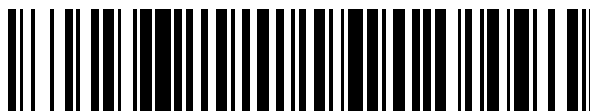


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 429 221**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 41/00 (2006.01)

C07K 14/655 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2003 E 03712617 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2013 EP 1494694**

54 Título: **Análogos de somatostatina fotoactiva ciclada de la columna vertebral para la terapia fotodinámica y la formación de imágenes**

30 Prioridad:

26.03.2002 IL 14892102

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

13.11.2013

73 Titular/es:

**DEVELOGEN ISRAEL LTD (100.0%)
KIRYAT WEIZMANN
76326 REHOVOT, IL**

72 Inventor/es:

**BONASERA, THOMAS A.;
LIVNAH, NURIT;
SALITRA, YOSEPH y
YECHZKEL, TAMAR**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 429 221 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

Análogos de somatostatina fotoactiva ciclada de la columna vertebral para la terapia fotodinámica y la formación de imágenes

5

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La presente invención se refiere a análogos de somatostatina fotoactiva que son péptidos de esqueleto-Na ciclados restringidos conformacionalmente, así como a los compuestos farmacéuticos que los contienen, los reactivos para sintetizarlos, y los métodos para utilizar estos elementos en la obtención de imágenes ópticas y en la terapia fotodinámica.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] La somatostatina (SST) es un tetradecapéptido cíclico que se encuentra en el sistema nervioso central y en tejidos periféricos. Se aisló por primera vez de una muestra del hipotálamo de un mamífero y fue identificado como un importante inhibidor de la secreción hormonal de la hipófisis anterior. Entre sus múltiples actividades biológicas se incluye la secreción de glucagón e insulina por parte del páncreas, la regulación de la mayor parte de hormonas intestinales y la regulación de la segregación de otros neurotransmisores relacionados con la actividad motriz y procesos cognitivos dentro del sistema nervioso central (para más detalle, véase Lambert, Endocrine Rev., 9:427, 1988). Además, la SST y sus análogos de somatostatina de esqueleto ciclados fotoactivos podrían ser de utilidad como agentes antiproliferativos en el tratamiento de diferentes tipos de tumores. En su estado natural, la SST tiene un potencial limitado como agente terapéutico, ya que muestra dos propiedades poco convenientes: su baja biodisponibilidad y su corta duración de acción. Por estos motivos, se han desempeñado grandes esfuerzos en encontrar análogos de SST de mayor potencia, bioestabilidad, duración de acción y selectividad.

15

20

25

[0003] Los diversos efectos fisiológicos de la SST son inducidos por su vinculación selectiva y de alta afinidad con cinco receptores (SST-R1 designada, SST-R5) que forman parte de la superfamilia de los siete segmentos receptores transmembrana (véase Reisine T., Bell Gl., Endocrinology Rev., 16:427-442, 1995).

30

La somatostatina en el cáncer y análogos de la SST radiomarcados

[0004] Debido a que los receptores SST están presentes en una alta densidad en muchos tumores endocrinos y no endocrinos, se ha tratado de llevar a cabo el diagnóstico y tratamiento por medio de análogos radiomarcados de SST en pacientes con cáncer. La mayor parte de tumores muestran varios subtipos de receptores SST, aunque el subtipo SST-R2 es el predominante. Los componentes radiomarcados específicamente orientados a receptores pueden detectar sitios primarios, revelar lesiones metastásicas ocultas, servir de guía en intervenciones quirúrgicas, detectar la etapa de desarrollo de un tumor, predecir la eficacia de ciertos agentes terapéuticos o actuar como agentes radioterapéuticos de utilidad, esto último siempre y cuando estén marcados con radionúclidos apropiados. La abundancia de receptores SST de alta afinidad en diferentes tipos de tumores permite el uso de análogos radiomarcados de somatostatina en la identificación, visualización y localización in-vivo de dichos tumores (Lamberts et al. N. Engl. J. Med., 334:246 1996).

35

40

[0005] La técnica de la escintigrafía por medio del uso de trazadores de análogos de SST radiomarcados sirve para localizar tumores y evaluar el potencial curativo del tratamiento crónico en pacientes con tumores inoperables con presencia de receptores SST.

45

[0006] Recientemente se ha probado la eficacia de una serie de péptidos bioactivos marcados con ^{99m}Tc como agentes en la creación de imágenes diagnósticas. Okarvi S.M. (Nuc. Med. Comm., 20:1093, 1999), habla sobre los últimos avances en radiofármacos basados en péptidos marcados con ^{99m}Tc.

50

[0007] Otra aplicación de los análogos de SST radiomarcados es en el campo de la cirugía radioguiada. Esta técnica se ha puesto en práctica con éxito en cirugías de cáncer medular de tiroides, tumores carcinoides y tumores de las células de los islotes pancreáticos.

55

[0008] Recientemente, la radioimagen con receptores SST se ha utilizado con éxito en la detección de rechazos del aloinjerto cardíaco (Aparici et al. Eur. J. Nuc. Med. 27:1754, 2000). Linfocitos activados infiltrados muestran que los receptores SST y, por tanto, la obtención de imágenes con receptores SST, podrían utilizarse para detectar y encontrar dicho rechazo.

60

Creación de imágenes ópticas

[0009] El interés por la obtención de imágenes ópticas de tumores por medio de péptidos marcados con colorante fluorescente ha aumentado recientemente gracias al éxito clínico del uso de radiopéptidos como agentes diagnósticos y terapéuticos. Además, la obtención de imágenes ópticas in-vivo se utiliza para evaluar objetivos moleculares específicos en terapia génica y molecular (Allport et al. Exp. Hematol. 29, 1237-1246, 2001). En la obtención de imágenes ópticas

65

(también conocida como diagnóstico por terapia fotodinámica o PDD), el paciente nunca está expuesto a radiación ionizante externa (por ejemplo, TC) ni se le inyecta nunca componentes radioactivos (por ejemplo, radiofármacos de medicina nuclear). De este modo se evita la radiación y la radiactividad, de manera que dicha técnica es más aceptable para la opinión pública general. El uso de conjugados de péptidos en la creación de imágenes se ha demostrado in-vivo con experimentos enfocados al receptor de somatostatina en ratas con tumores con presencia de receptores de somatostatina, de acuerdo con estudios de Licha et al. (Bioconjugate Chem. 12, 44-50, 2001) y Achilefu et al. (Investigative Radiology 35, 479-485, 2000). WO 00/61194 revela conjugados de péptidos de somatostatina utilizados como agentes de contraste para el diagnóstico por imagen. WO 03/003806 revela compuestos de azidas marcadas, incluyendo ligandos de somatostatina, para fototerapia dual de tumores y otras lesiones. Por su parte, WO 03/004466 revela derivados de sulfenatos colorantes y sus bioconjugados con igual propósito.

[0010] U.S. 5,211,938 expone un método para la detección de lesiones malignas y no malignas por fotoquimioterapia con precursores de protoporfirina IX. JP 2000-342297 presenta un método de diagnóstico de células cancerosas por hibridación genómica comparada con sondas marcadas con colorante fluorescente.

[0011] La mayor parte de métodos actuales en cuanto a la detección de cáncer por medio de sistemas de detección por fluorescencia requiere el uso de dispositivos de intervención, como endoscopios con capacidad para producir determinadas frecuencias luminosas en la zona deseada del paciente. Dichos endoscopios iluminan la zona objetivo donde se sospecha la ocurrencia de cáncer. La luz producida a una frecuencia concreta ilumina una zona que previamente se ha sometido a algún tipo de marcador fluorescente, como la porfirina, que hace que las células malignas se iluminen o se tiñan de fluorescente bajo una luz de determinada frecuencia. En estos casos, la introducción de un endoscopio en el cuerpo del paciente hace necesario el uso de algún tipo de sedación o anestesia local o general. Una vez que se ha localizado un tumor mediante el uso de un dispositivo de intervención, se podrá utilizar fotoquimioterapia u otro tipo de terapia, dependiendo del tipo de tumor. Sin embargo, antes de llevar a cabo el tratamiento en sí, es necesario realizar un estudio que confirme el cáncer. Así, es necesario hacer una prueba del tumor por medio de la correspondiente biopsia. Dicho procedimiento también requiere algún tipo de sedación o anestesia. Esto significa que los métodos tradicionales para confirmar la malignidad de un tumor pueden requerir al menos dos procedimientos quirúrgicos. U.S. 6,316,215 demuestra métodos para la detección de cáncer mediante el uso de técnicas de detección con colorantes fluorescentes y períodos de integración de carga de la imagen seleccionables. Según su autor, dichos métodos permiten un diagnóstico seguro, fiable, poco costoso y mínimamente invasivo.

Terapia Fotodinámica

[0012] Una aplicación adicional de los conjugados de péptidos ópticamente activos con el receptor como objetivo específico es la terapia fotodinámica (PDT). LA PDT es una técnica médica que se usa principalmente en la extirpación quirúrgica del cáncer. En la PDT, al paciente se le administra un fármaco PDT, después, una vez que el fármaco se ha acumulado en el tumor, este es irradiado con una luz de una longitud de onda específica por medio de un sistema de iluminación especial. Ciertas moléculas fotoactivas (la mayor parte de la familia de las porfirinas), al recibir irradiación con una luz de una determinada longitud de onda en presencia de oxígeno, producen especies de oxígeno reactivas (ROS en sus siglas en inglés) dentro de las células cancerosas. Las ROS matan a la célula, por lo que constituyen una ayuda terapéutica en el tratamiento del cáncer. En el tratamiento del cáncer, la PDT combina la luz y el oxígeno endógeno con un fotosensibilizante localizado dentro o alrededor del tumor. Al irradiar el sensibilizante, se produce una cascada de reacciones bioquímicas que inactivan las células cancerosas bien por medio de ataque directo a los sitios celulares, bien de forma indirecta induciendo daño vascular a los vasos sanguíneos que irrigan el tumor.

[0013] Debido a que muchos fármacos PDT se vuelven fluorescentes al ser iluminados con otra longitud de onda específica, se puede usar los mismos componentes para la creación de imágenes de un cáncer usando un dispositivo especial de imágenes espectrales. Las imágenes espectrales se pueden usar para localizar un tumor en la resección quirúrgica, para localizar un tumor residual para su resección de control y para guiar las consiguientes PDT. La eficacia terapéutica de la PDT puede medirse en tiempo real mediante imágenes con marcadores fluorescentes durante la PDT. Todos los procedimientos mociónados anteriormente podrían ser factibles en quirófano, en endoscopias y en procedimientos externos.

[0014] Cada vez se incorporan a los procedimientos clínicos de rutina un mayor número de procedimientos PDT aprobados. La PDT está aprobada en los Estados Unidos de América, Canadá, Países Bajos, Alemania y Japón para cánceres de pulmón, del tracto digestivo, y del tracto genitourinario. También se está evaluando el uso de Photofrin® como protocolo para el tratamiento de cáncer de cabeza, del área del cuello y para el tratamiento del cáncer de páncreas, también como posible terapia para el sarcoma de Kaposi, para cánceres de cerebro, de mama (tanto primarios como metastáticos), de piel y de abdomen. A pesar de que la eficacia de Photofrin® contra una serie de tumores malignos se ha podido demostrar, no es el fotosensibilizante «perfecto». Recientemente, se ha sugerido la utilización de nuevas porfirinas solubles en agua con propiedades mejoradas (Hilmey et al J. Med. Chem. 45, 449-461, 2002).

[0015] Hasta la fecha, las aplicaciones de la PDT han empleado moléculas no enfocadas a los receptores. Los mecanismos por los cuales las células cancerosas absorben fármacos PDT que no tienen estas células por objetivo

todavía no se han podido explicar bien. Se han obtenido proporciones de concentración de fármaco en células objetivo y no objetivo de tan sólo 2-5. Existe una serie de apuntes en la literatura de fármacos receptores de PDT con conjugados biomoleculares objetivo que demuestran su eficacia in-vitro. De Luca et al. (J. Pep. Sci. 7, 386-394, 2001), describen igualmente la síntesis y caracterización del conjugado de porfirina CCK8 en el que la porfirina se utiliza como quelante del Indio, pero no se hace mención a la PDT. Del Governatore et al. (Cancer Res. 60, 4200-4205, 2000), demostraron in-vivo el uso de un construido de cloro-anticuerpo para PDT específica para cáncer colorrectal, pero ninguna de las publicaciones del campo mencionadas incluye la demostración in-vivo del uso de péptidos orientados a receptores en la PDT.

[0016] U.S. 5,308,608 y 5,149,708 versan sobre tipos específicos de componentes de porfirina que se podrían usar en la detección, fotosensibilización o destrucción de material biológico objetivo cuando el tejido objetivo entra en contacto con dicha porfirina, y se irradia con una luz que excita el componente. WO 01/15694 y WO 00/41727 exponen métodos y compuestos para PDT con un tejido objetivo mediante el uso de una fuente luminosa que transmita la luz al área de tratamiento de forma transcutánea, preferiblemente. U.S. 6,054,449 trata componentes y métodos para PDT de hiperplasia intimal y otras enfermedades. US 6,333,319 propone el uso de derivados de la bacterioclorofila en métodos PDT, y, por su parte, US 6,147,195, US 5,726,169, US 5,955,585 y US 5,650,292 hablan de conjugados de la clorofila y la bacterioclorofila con péptidos utilizados como fotosensibilizantes y la terapia fotodinámica en el diagnóstico de tumores. La US 6,217,848 versa sobre péptidos con colorantes de cianina e indocianina, conjugados para el diagnóstico y terapia por imágenes, y habla, en concreto, de análogos de la somatostatina en su uso para la cirugía guiada para la detección de tumores de micrometástasis por laparoscopia.

Análogos de péptidos mejorados

[0017] Como resultado de importantes avances en química orgánica y biología molecular, en la actualidad se puede preparar muchos péptidos bioactivos en cantidades suficientes para su uso farmacéutico y clínico. Así, en los últimos años, una serie de métodos se han impuesto para el tratamiento y el diagnóstico de enfermedades en las que los péptidos están implicados. Sin embargo, el uso de péptidos como agentes terapéuticos y de diagnóstico se ha visto limitado a causa de los siguientes factores: a) penetración en el tejido; b) poca estabilidad metabólica en la proteólisis en el tracto gastrointestinal y en sérum; c) baja absorción tras ingestión oral, debido, sobre todo, a que tienen una masa molecular relativamente elevada y a la falta de un sistema específico de transporte, o a una combinación de ambos; d) rápida excreción a través del hígado y los riñones; y e) efectos secundarios indeseados en sistemas orgánicos no objetivo, dado que los receptores de péptidos pueden encontrarse distribuidos por todo el organismo.

[0018] Sería conveniente conseguir péptidos análogos con una mayor especificidad para poder conseguir una mejor selectividad clínica. Lo más beneficioso sería producir péptidos análogos conformacionalmente restringidos, para poder superar los obstáculos que presentan las moléculas de los péptidos nativos, y así poder proporcionar propiedades terapéuticas mejoradas.

[0019] Un nuevo enfoque conceptual respecto a las limitaciones de forma de los péptidos fue introducido por Gilon et al. (Biopolymers 31:745, 1991), quien propuso la ciclación de péptidos esqueleto-esqueleto. Las ventajas de esta estrategia comprenden la capacidad de tener un efecto de ciclación por medio de carbonos o nitrógenos del esqueleto del péptido sin por ello interferir con cadenas laterales que podrían ser cruciales en la interacción con receptores específicos de un péptido en concreto. Otras obras de Gilon y sus compañeros (WO 95/33765, WO 97/09344, US 5,723,575, US 5,811,392, US 5,883,293 y US 6,265,375), aportaron métodos para producir unidades estructurales para su formación requeridas en la síntesis de análogos de péptidos de esqueleto ciclado. También se expuso gran éxito obtenido en la puesta en práctica de estos métodos para producir análogos de esqueleto ciclado de bradiquinina (US 5,874,529), y somatostatina (WO 98/04583, WO 99/65508, WO 99/65508, US 5,770,687, US 6,051,554, y US 6,355,613). WO 02/062819 propone análogos de SST de esqueleto ciclado radiomarcados para la obtención de imágenes ópticas y con fines terapéuticos. Todos estos métodos están íntegramente incluidos en el presente documento, por referencia.

[0020] Sigue existiendo la necesidad de producir análogos sintéticos de SST con una mayor estabilidad in-vivo, para su uso diagnóstico y terapéutico, como agentes marcados con fracción fotoactiva, para la obtención de imágenes ópticas in-vivo, in-vitro y ex-vivo, y como agentes terapéuticos usados en la terapia fotodinámica. Sería también deseable conseguir generar análogos de péptidos con una mayor especificidad en relación a los subtipos de receptores para poder mejorar la selectividad diagnóstica y así dilucidar el perfil específico del receptor de SST para cada paciente a la hora de planificar la terapia y/o cirugía. Los análogos SST de esqueleto ciclado que cumplen específicamente con estos criterios son los que se presentan en esta invención. Ninguno de los estudios anteriores nos enseña o sugiere los análogos de somatostatina de esqueleto ciclado con marcador fotoactivo que presenta esta invención, con una mejora en su actividad y selectividad diagnósticas y terapéuticas.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0021] La presente invención presenta un conjugado de péptidos de esqueleto ciclado orientados específicamente a los receptores de somatostatina con fracciones fotoactivas para la obtención intraoperativa de imágenes ópticas, para el

cribado, la terapia fotodinámica y el control en tiempo real de la eficacia de la PDT. El alcance de la invención está descrito en las reivindicaciones.

5 **[0022]** Según un aspecto de la presente invención, este novedoso análogo fotoactiva de la somatostatina es un análogo de péptido cíclico con objetivo específico de receptores subtipo de la SST y puede ser utilizado para individualizar el diagnóstico y el tratamiento de tumores por medio de la aplicación de reactivos específicos para el receptor.

10 **[0023]** Los péptidos cíclicos de la presente invención se diferencian de la SST nativa en que son análogos de la SST de esqueleto ciclado que poseen propiedades únicas y superiores, como estabilidad química y metabólica, selectividad, mayor biodisponibilidad y una mejor farmacocinética. Estos análogos están, además, marcados con fracciones fotoactivas, siempre que los procesos de marcado y los conjugados mantengan o superen las propiedades favorables de dichos análogos de la SST de esqueleto ciclado en lo que se refiere a unirse a los receptores específicos de la somatostatina.

15 **[0024]** De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, estos nuevos péptidos análogos con propiedades fotoactivas se caracterizan por la incorporación de unidades estructurales con grupos «puente» unidos a los nitrógenos alfa y los aminoácidos alfa. Más en concreto, estos componentes son análogos de la SST de esqueleto ciclado fotoactivos que cuentan con una secuencia de péptidos de tres a veinticuatro aminoácidos, cada somatostatina fotoactiva de esqueleto ciclado incorpora al menos una unidad estructural, que a su vez contiene un átomo de nitrógeno del esqueleto del péptido, que está conectado a un grupo puente que se compone de una amida, un tioéter, un tioéster, disulfuro, urea, carbamato, o sulfonamida, en el que al menos una unidad estructural está conectada mediante dicho grupo puente para formar una estructura cíclica con una fracción del grupo que consiste en una segunda unidad estructural, la cadena lateral de un residuo de aminoácido de la secuencia o un residuo terminal de aminoácido. Preferiblemente, la secuencia del péptido incorporará entre 3 y 14 residuos, más preferiblemente de 4 a 12 aminoácidos, y aún más preferiblemente, de 5 a 9 aminoácidos.

20 **[0025]** Otro aspecto de la invención es que los componentes de la presente invención son péptidos de esqueleto ciclado conjugados con fracciones fotoactivas bajo la estimulación necesaria, con una longitud de onda de luz fluorescente determinada, a una o más de una longitud de onda. Además, tienen la capacidad de volverse fluorescentes bajo una o más de una longitud de onda, y generar especies de oxígeno reactivas a otra (u otras) longitud de onda, para la obtención de imágenes y la terapia de neoplasmas u otras enfermedades.

30 **[0026]** El principal inconveniente de la PDT es que, tal y como se aplica hoy en día, los componentes que se utilizan presentan una baja selectividad respecto al tejido del tumor, lo que puede causar daños a tejido sano durante la irradiación y también durante los largos período tiempo en los que el paciente que está sometiendo a PDT debe evitar la exposición a la luz del sol. Los componentes de la presente invención poseen una selectividad tumoral mucho mayor que la de los fármacos a la venta en la actualidad. La proporción entre tejido tumoral y tejido sano obtenida con fármacos no específicos para PDT es de 2-4, mientras que los componentes de la presente invención podrían conseguir proporciones de 10-50 o más. De hecho, los análogos de somatostatina de esqueleto ciclado fotoactivos (descrita en WO 02/062819), han demostrado conseguir proporciones de alcance de los receptores de somatostatina objetivo de 47:1 (páncreas y músculo).

35 **[0027]** Si adquieren una forma, los análogos de somatostatina de esqueleto ciclado de la presente invención están unidos por enlace covalente a la fracción fotoactiva gracias a uno de los grupos funcionales libres disponibles en el péptido. Preferiblemente, la fracción fotoactiva del análogo estará unida por enlace covalente al nitrógeno terminal del péptido padre. Otra opción preferente es que la fracción fotoactiva del análogo esté unida por enlace covalente a la amina alfa de un residuo de lisina C-terminal.

40 **[0028]** Según otra posible formación de la presente invención, los análogos de somatostatina de esqueleto ciclado fotoactivos con objetivo SSTR poseen características apropiadas para la guía quirúrgica intraoperativa en la resección de tumores neuroendocrinos y otros tumores con presencia de SSTR, así como en PDT guiada por imágenes cuyo objetivo son receptores en tumores neuroendocrinos y otros tumores con presencia de SSTR.

45 **[0029]** La presente invención hace posible, por primera vez, la obtención de un panel de análogos de somatostatina de esqueleto ciclado fotoactivos con la selectividad del receptor de somatostatina deseada o con combinaciones de selectividad del receptor. Esto abre las puertas a su uso terapéutico y diagnóstico en diferentes tipos de cáncer y otras enfermedades que se caracterizan por la presencia de receptores de somatostatina, de acuerdo con las necesidades específicas de cada paciente y cada enfermedad.

50 **[0030]** Con otra formación posible de la presente invención, los análogos de somatostatina de esqueleto ciclados con marcador fotoactivo tienen una mayor afinidad y selectividad hacia subtipos específicos de somatostatina. Ciertas conformaciones específicas proporcionan nuevos análogos de somatostatina de esqueleto ciclado que presentan una selectividad de receptor a los subtipos SST-R 2, 5 o a los subtipos SST-R 2 y 5. Otras formaciones proporcionan análogos de somatostatina de esqueleto ciclado que vinculan más de dos receptores SST. Otra formación proporciona análogos que podrían tener la ventaja de incluir estructuras bicíclicas con al menos una estructura cíclica que conecte

65

dos unidades estructurales, y una segunda estructura cíclica que sea seleccionada de entre el grupo cadena lateral-cadena lateral; esqueleto-esqueleto; y esqueleto-terminal.

5 **[0031]** La presente invención proporciona componentes que, utilizados por separado, se pueden formular para formar compuestos farmacológicos que se administran al sujeto o se aplican a un objetivo in-vitro por medio de técnicas ya conocidas, y son útiles para la diagnosis y el tratamiento de enfermedades cancerosas y otro tipo de enfermedades.

10 **[0032]** Los compuestos farmacológicos que contienen análogos de somatostatina de esqueleto ciclado con marcador foto activo y un portador o diluyente aceptables representan otra formación posible de la invención, al igual que los métodos para el tratamiento de cáncer en terapia fotodinámica con objetivo específico que utilice dichos compuestos. Los compuestos farmacológicos en relación con la presente invención tienen la ventaja de contener como mínimo un péptido de esqueleto ciclado que sea selectivo para uno o más receptores del subtipo SST. Estos compuestos pueden administrarse por medio de cualquier vía de administración conveniente, ya sea oral, tópica o sistémica. Dentro de las vías de administración se incluye, sin que eso suponga una limitación, vías parenterales como las inyecciones intravenosas, intracisternales, intraarteriales o intramusculares, así como por vía intranasal o por administración oral.

15 **[0033]** En la invención también se describe un método para el tratamiento y el diagnóstico de enfermedades relacionadas con la somatostatina en animales, preferiblemente en humanos, que consiste en administrar una cantidad eficaz desde el punto de vista terapéutico de los análogos de SST de esqueleto cíclico de la invención.

20 **[0034]** Sigue una lista no restrictiva de enfermedades y síntomas susceptibles de detección y tratamiento con los componentes de la presente invención: destrucción de tejido tumoral en tumores sólidos; tratamiento de enfermedades tóxicas; tratamiento sistémico de tumores y neoplasias del aparato respiratorio, las cervicales, de esófago, cáncer de colon, y diagnóstico de estas; cáncer de esófago y de vejiga; tratamiento de cáncer de pulmón endobronquial superficial de células no pequeñas (carcinoma in situ o tumores micro invasivos) en pacientes para los que la cirugía y la radioterapia no están indicadas; reducción de obstrucción y paliativos para síntomas en pacientes con cáncer de pulmón endobronquial obstructivo de células no pequeñas; estadios avanzados de esófago de Barrett (una enfermedad pre-cancerosa que tiene ligar cuyo el revestimiento del esófago se convierte en tejido de tipo estomacal en respuesta a un reflujo ácido crónico, o acidez); cáncer de pulmón micro invasivo (estadio temprano); cáncer de pulmón endobronquial micro invasivo de células no pequeñas, sobre todo en pacientes para los que la cirugía o la radioterapia no están indicadas; cáncer de pulmón avanzado; cáncer de esófago obstructivo o parcialmente obstructivo (paliativo para facilitar tragar alimentos o bebida); lesiones cutáneas pre-cancerosas del rostro o el cuero cabelludo llamadas queratosis actínicas; hiperplasia intimal; cánceres de cabeza la región del cuello; cáncer de páncreas; sarcoma de Kaposi; cánceres cerebrales, de mama (tanto primarios como metastáticos), de piel y de abdomen.

25 **[0035]** Los componentes de la presente invención se pueden utilizar sólo o ser marcados con un radioisótopo u otro medio terapéutico o de detección para el diagnóstico y tratamiento de dichas enfermedades.

30 **[0036]** Además, la presente invención propone análogos de somatostatina de esqueleto ciclados fotoactivos que pueden utilizarse como compuestos diagnósticos en métodos de diagnosis de cáncer y en la obtención de imágenes de tumores existentes o de sus metástasis, y en la detección de rechazos de aloinjertos, incluyendo el cardíaco, aunque no limitados a este. Los métodos para el diagnóstico de cáncer y de rechazos de aloinjerto incluyen la administración de análogos de somatostatina de esqueleto ciclado marcados con una fracción fotoactiva detectable a un mamífero, que puede ser un paciente humano. Los métodos para el diagnóstico o la obtención de imágenes de cáncer y rechazo de aloinjertos utilizan estos compuestos representa otra posible aplicación de esta invención.

35 **[0037]** Teniendo en cuenta otro aspecto de la invención, los compuestos se utilizan para obtener imágenes de un cáncer usando un dispositivo especial de imagen espectral. La imagen espectral puede usarse para localizar un tumor para resección quirúrgica, para localizar tumores residuales para su resección de control y para guiar la consiguiente PDT. La eficacia terapéutica de la PDT se puede monitorizar a tiempo real por medio del uso de marcadores fluorescentes en la obtención de imágenes durante la PDT. Todos los procedimientos mociónados anteriormente podrían ser factibles en quirófano, en endoscopias y en procedimientos externos.

40 **[0038]** Otra posible formación de la presente invención proporciona compuestos y composiciones farmacológicas que pueden ser de utilidad en técnicas de hibridación genómica y tener aplicaciones en la terapia génica de células que no presentan de forma natural o de forma adecuada receptores de somatostatina, usando un vector que puede llevar a cabo sólo la SST-R o la SST-R junto con otros productos génicos o terapéuticos. Otra posible aplicación proporciona compuestos que podrían utilizarse para terapia celular de células genéticamente modificadas, mediante la aplicación a dichas células para que presenten SST-R (para obtención de imágenes/terapia) únicamente o junto con otros productos génicos.

45 **[0039]** También se presentan métodos para administrar al sujeto una cantidad eficiente desde el punto de vista terapéutico de un agente fotosensibilizante determinado. La intensidad de la luz es relativamente baja, pero se emplea una fluorescencia total alta para garantizar la activación del agente fotosensibilizante. Esta sustancia se une al tejido

objetivo preferiblemente, en concreto, a las células que presentan receptores de somatostatina. A continuación se aplica una luz con una longitud de onda y una banda de frecuencias que se corresponden con las que absorbe la sustancia objetivo.

5 **[0040]** Algunos de los análogos de somatostatina en relación con esta invención podrían contener uno o más isómeros. La presente invención incluye dichos isómeros bien en combinación, bien aislados individualmente.

[0041] Una formación específica de la presente invención supone que las fracciones fotoactivas preferibles se sometan a excitación fluorescente y puedan volverse fluorescentes a una longitud de onda mayor de 630nm.

10 **[0042]** Otra formación de la presente invención supone que las fracciones fotoactivas preferibles para PDT y para monitorizar en tiempo real la eficacia de la PDT sean fracciones que además de poder volverse fluorescentes a una longitud de onda concreta, puedan generar especies de oxígeno reactivas a una longitud de onda diferente. Las longitudes de onda para producir excitación fluorescente, emisión fluorescente o excitación fotodinámica serán preferiblemente mayores o iguales a 630nm, permitiendo así que la luz penetre en el tejido. La invención también propone la combinación de formaciones, en los casos en los que un complejo en particular sea de utilidad tanto en la obtención de imágenes ópticas y en terapia fotodinámica. Así mismo, la invención establece los métodos para sintetizar y usar dichos péptidos de esqueleto cíclico, reactivos de esqueleto cíclico y composiciones con marcador fotoactivo.

20 **[0043]** Sigue una lista de los análogos somatostatina de esqueleto ciclado con marcador fotoactivo preferidos por la invención en la actualidad:

[0044] En los análogos de somatostatina de esqueleto ciclado preferidos en relación con la invención, el péptido está unido a la fracción fotoactiva por medio de un elemento de enlace para formar una estructura que responda a la Fórmula general Número 1:

Z-Q-PTR

Formula N° 1

30 en la que Z es una fracción fotosensible; Q es el enlace directo, o una fracción de unión que puede conectarse a un grupo libre funcional del péptido; y PTR es la somatostatina de esqueleto ciclado, descrita a continuación.

[0045] Preferiblemente, la unión Q se conecta al N-terminal del péptido por enlace peptídico.

35 **[0046]** En concreto, Q es seleccionada de un grupo consistente en un enlace directo, ácido aminohexanoico, ácido aminopentanoico, βAla, GABA y Gly; la fracción fotoactiva Z se selecciona de un grupo consistente en 5-(4-((oxocarbonilo)metil)fenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina; 5-(4-carboxifenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina; 5-(4-((aminocarbonyl) metil)fenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina; 5-(4-((oxocarbonilo)metil)fenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-de cloro (isómeros mixtos); 5-(aminotionilo)fluoresceína; 4-sulfonilo-2-sulfo-Lisamina™ rodamina B; 2-sulfonilo-4-sulfo-Lisamina™ rodamina B (isómeros mixtos); y 5- y 6-carboxifluoresceína (isómeros mixtos); y PTR se selecciona de un grupo de:

40 PTR 3207 con la estructura DPhe-Cys*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2*-NH₂;
PTR 3213 con la estructura GlyS2*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2*-NH₂;
PTR 3219 con la estructura DPhe-GlyS2*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2*-NH₂;
DesGABA-PTR 3173 con la estructura Phe-Trp-DTrp- Lys-Thr-Phe-GlyC3*-NH₂;
45 Los asteriscos señalan los puntos de ciclado.

[0047] Otros compuestos preferidos de la presente invención contienen análogos de somatostatina de esqueleto ciclado fotoactivos que responden a la Fórmula Número 2:

Z-Lys(GABA-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyC3)-NH₂ Fórmula N° 2

55 en la que Z es una fracción fotosensible conectada al nitrógeno alfa de la lisina C-terminal, y en la que el péptido entre paréntesis está conectado a Lys Epsilon amina y ciclido por medio de un enlace peptídico formado entre el nitrógeno terminal GABA y la unidad estructural de carboxilato Gly-C3.

[0048] Preferentemente, la fracción fotoactiva Z será un derivativo fluorescente conectado al nitrógeno alfa de la lisina C-terminal por medio de un elemento de unión seleccionado de la tiourea o un enlace peptídico.

60 **[0049]** En la actualidad, los somatostatina fotoactiva de esqueleto ciclados preferidos para la presente invención son los compuestos descritos en la Tabla 1.

Tabla 1. Estos somatostatina fotoactiva de esqueleto ciclados demostraron gran afinidad a la SST-R2 humana (en una escala nanomolar 1-10)	
Péptido	Secuencia
1007A-01	5- y 6- carboxifluoresceína-Dab*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe- GlyC3*-NH2
1017A-01	5- y 6- carboxifluoresceína-Lys(GABA*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyC3*)-NH2
YS-1-86	5-(aminotiol(fluoresceína-GABA-DPhe-Cys*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2*-NH2
YS-1-70	5-(aminotiol(fluoresceína-aminopentano-DPhe-GlyS2*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2*-NH2
YS- 1-62	5-(aminotiol(fluoresceína-β Ala-DPhe-GlyS2*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2*-NH2
YS-1-64	5- y 6- carboxifluoresceína-β Ala-DPhe-GlyS2*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-he-GlyS2*-NH2
YS-1-48	5- y 6- carboxifluoresceína-GABA-GlyS2*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2*-NH2
YS-1-68	5- y 6- carboxifluoresceína-GABA-DPhe-GlyS2*-Phe-Trp-DTrp Lys-Thr-Phe-GlyS2*-NH2

Los asteriscos señalan los puntos de ciclado. El grupo puente está conectado entre el derivativo N α - ω -funcionalizado del residuo marcado con un asterisco y el grupo libre funcional del segundo residuo marcado o el segundo derivativo N α - ω -funcionalizado.

5 [0050] Estos análogos de somatostatina de esqueleto ciclado fotoactivos se preparan incorporando al menos un derivativo N α - ω -funcionalizado de un aminoácido a una secuencia de péptido y a continuación ciclando selectivamente el grupo funcional con uno de la cadena lateral de los aminoácidos en la secuencia de péptido, con uno de los terminales del péptido, o con otro aminoácido derivativo ω -funcionalizado.

10 [0051] Otro aspecto de la presente invención presenta métodos para preparar análogos de somatostatina de esqueleto ciclado fotoactivos. Cada reactivo contiene análogos de somatostatina de esqueleto ciclado fotoactivos con un enlace covalente unido a la fracción fotoactiva.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS GRÁFICOS

15 [0052]

La **Figura 1** describe el porcentaje de inhibición de SRIF-14 vinculado a hSST-R2 por medio de somatostatina de esqueleto ciclado, como se describe en el ejemplo 4.

La **Figura 2** describe la biodistribución en diferentes tejidos de ratones portadores de cáncer humano H69 implantado subcutáneamente por medio de espectrofluorimetría con fibra óptica.

20 La **Figura 3** muestra los resultados de imágenes espectrales ex-vivo de componentes fluorescentes n° 62 con objetivo específico SSTR 24 horas después de la inyección intravenosa a ratones portadores de cáncer humano H69 implantado subcutáneamente. 1 = pulmón, 2 = riñón, 3 = dermis, 4 = tumor.

25 La **Figura 4** muestra los resultados ex-vivo de componentes fluorescentes n° 86 con objetivo específico SSTR 24 horas después de la inyección intravenosa a ratones portadores de cáncer humano H69 implantado subcutáneamente. 1 = pulmón, 2 = riñón, 3 = dermis, 4 = hígado, 5 = páncreas, 6 = bazo, 7 = tumor.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

30 [0053] Según la presente invención, los análogos peptídicos son ciclados por medio de grupos "puente" unidos al nitrógeno alfa de los aminoácidos, lo que posibilita nuevos enlaces no peptídicos. En general, los procedimientos utilizados para formar dichos análogos peptídicos a partir de unidades estructurales dependen de los principios ya conocidos de síntesis de péptidos. Lo más conveniente es que los procedimientos utilizados se desarrollen según los principios ya conocidos de síntesis de péptidos en fase sólida.

35 [0054] Los métodos para el diseño y la síntesis de análogos de esqueleto ciclado según la presente invención se pueden encontrar detallados en las patentes US 5,811,392; 5,874,529; 5,883,293; 6,051,554; 6,117,974; 6,265,375; 6,355,613, y en las solicitudes internacionales WO 95/33765; WO 97/09344; WO 98/04583; WO 99/31121; WO 99/65508; WO 00/02898; y WO 00/65467.

40 [0055] Las ventajas más destacables del proceso de ciclado de esqueleto son: 1) el ciclado de la secuencia del péptido se obtiene sin poner en riesgo ninguna de las cadenas laterales de los péptidos, de forma que se disminuyen las probabilidades de tener que renunciar a grupos funcionales cuyo reconocimiento biológico (por ejemplo, los vínculos con

determinados receptores) y función son esenciales; 2) la optimización del péptido se obtiene permitiendo una permutación de la longitud del puente, y del tipo de elemento de enlace (por ejemplo, amida, disulfuro, tíoeter, tíoéster, urea, carbamato, o sulfonamida, etc.), la dirección del enlace, y la posición del enlace dentro del anillo; 3) el puente se puede diseñar de manera que se minimice la interacción con la región activa del péptido y su receptor específico, en los casos de ciclado de péptidos lineales de actividad ya conocida. Esto rebaja las posibilidades de que el brazo de ciclado interfiera en el reconocimiento y la función, y crea además un sitio adecuado para la unión de elementos como marcadores radioactivos, fármacos citotóxicos, sustancias fotoactivas, u otros marcadores que se desee usar.

[0056] A diferencia de la SST nativa y de los análogos de SST conocidos y mencionados en estudios anteriores, los péptidos cíclicos de la presente invención son análogos de SST de esqueleto ciclado que poseen propiedades únicas y superiores, como estabilidad metabólica, selectividad, una mayor biodisponibilidad y una mejor farmacocinética. Además, estos análogos estarán marcados con fracciones fotoactivas, siempre y cuando los métodos para marcarlos y los conjugados mantengan o aumenten las propiedades favorables de estos análogos de SST de esqueleto ciclado.

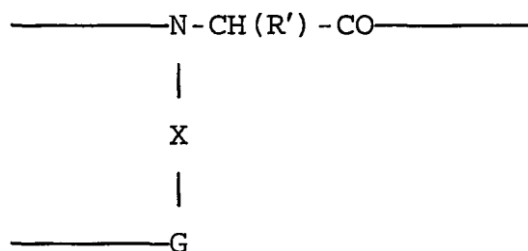
15 Terminología y definiciones

[0057] E término "análogo de la somatostatina" se refiere preferiblemente a que las moléculas son capaces de imitar al menos una de las acciones de la somatostatina. El término "análogo" indica, además, que la molécula posee la secuencia de aminoácidos según la invención a excepción de uno o más cambios de aminoácidos. El diseño de "análogos" apropiados puede hacerse con ayuda del ordenador. Un análogo peptídico según la presente invención puede, opcionalmente, comprender al menos un elemento de enlace que reemplace a una amida, por ejemplo, un enlace de urea, de carbamato, de sulfonamida, de hidracina, u otro enlace covalente.

[0058] En este documento, "péptido" indica una secuencia de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Siempre que se mencione los términos "péptido de la invención" o "análogos de la invención" en las presentes especificaciones y reivindicaciones, se incluye también las sales y derivados funcionales resultantes, siempre y cuando la actividad biológica del péptido con respecto a la SST se mantenga. Los derivados funcionales de los péptidos de la invención abarcan derivados que se puedan preparar a partir de los grupos funcionales que se forman como cadenas laterales de los residuos de los grupos terminales N- y C-, por medio de técnicas ya conocidas, y se incluyen en la invención siempre que sigan siendo aceptables desde el punto de vista farmacéutico, esto es, por ejemplo, si no destruyen la actividad de dicho péptido. Estos derivados pueden, entre otros, incluir ésteres alifáticos de los grupos carboxilo, amidas de los grupos carboxilo producidas por reacción con amonio o con aminos primarias o secundarias, derivados N-acilo de grupos amino libres de los aminoácidos residuales formados por reacción con fracciones de acilo (por ejemplo, grupos de alcanos o de aroil carbocíclico) o derivados de O-acilo de grupos hidroxilo libres (por ejemplo, los de residuos de seril o treonil) formados por reacción con fracciones de acilo. Las sales de los péptidos de la invención que esta comprende son aquellas sales orgánicas e inorgánicas fisiológicamente aceptables.

[0059] El uso del término "péptido de esqueleto ciclado" o "análogo de esqueleto cíclico" se refiere en el presente documento a un análogo de un péptido lineal que contenga una secuencia peptídica de entre 3 y 24 aminoácidos, preferiblemente, y que incorpore al menos una unidad estructural o unidad, que a su vez contenga un átomo de nitrógeno del esqueleto del péptido conectado a un grupo "puente" que esté formado por una amida, tíoeter, tíoéster, disulfuro, urea, carbamato, o sulfonamida, en el que al menos una unidad estructural esté conectado por medio de dicho puente para formar una estructura cíclica con una fracción seleccionada del grupo consistente en una segunda unidad o bloque, la cadena lateral de un residuo de aminoácido de la secuencia o un residuo terminal de aminoácido. Los asteriscos que aparecen en la fórmula de un péptido de esqueleto cíclico señalan los puntos de ciclado. El grupo Puente está conectado por el derivativo de N α - ω -funcionalizado del residuo marcado y el grupo funcional libre de ese residuo o del segundo residuo derivativo de N α - ω -funcionalizado. La opción más preferible es que la secuencia peptídica incorpore entre 3 y 14 aminoácidos, y aún más preferible es que incorpore entre 4 y 12 aminoácidos, y aún más preferible es entre 5 y 9 aminoácidos.

[0060] Una "unidad estructural" indica un aminoácido N α -derivatizado α de la Fórmula general Número 3:



Formula No. 3

en la que X es un grupo espaciador seleccionado del grupo consistente en alquileo, alquileo sustituido, arileno,

5 acicloalquileo y cicloalquileo sustituido; R' es una cadena lateral de aminoácidos, que opcionalmente puede estar enlazada a un grupo protector específico; y G es un grupo funcional seleccionado del grupo consistente en aminas, tioles, alcoholes, ácidos carboxílicos, sulfonatos, ésteres y haluros de alquilo, que se incorpora a la secuencia peptídica y después se cicla selectivamente por medio del grupo funcional G con una de las cadenas laterales de aminoácidos de dicha secuencia peptídica, con uno de los péptidos terminales o con otro derivativo ω -funcionalizado del aminoácido.

[0061] La metodología para producir las unidades estructurales se encuentra detallada en solicitudes de patentes internacionales publicadas, como WO 95/33765 y WO 98/04583 y en las patentes US número 5,770,687 y 5,883,293.

10 [0062] Las unidades estructurales se abrevian con un código de tres letras que corresponde al aminoácido modificado seguido por el tipo de grupo reactivo (N para amina, C para carboxilo), y una indicación al número de grupos espaciadores de metileno. Por ejemplo, GlyC2 describe un residuo de glicina modificado por un grupo reactivo carboxilo y dos carbonos como espaciadores de metileno; y PheN3 describe un grupo modificado de fenilalanina con un grupo reactivo amino y tres carbonos como espaciadores de metileno. En las fórmulas generales, las unidades estructurales se abrevian con la letra R, que se corresponde con su posición en la secuencia, seguida de la letra N, que indica que el nitrógeno del esqueleto en esa posición es el punto de unión para el grupo puente especificado en dichas fórmulas.

15 [0063] Los componentes descritos en esta invención podrían tener centros asimétricos. Todas las formas quirales, diastereoméricas y racémicas están incluidas en la presente invención. Entre los componentes descritos en la invención también puede haber varios isómeros geométricos de doble enlace, y similares; estos isómeros estables también están contemplados en la invención.

20 [0064] En este documento, "compuesto estable" o "estructura estable" hace referencia a un compuesto que es lo suficientemente resistente para sobrevivir aislado de un medio con un grado de pureza útil de una mezcla reactiva, así como a la formulación dentro de un agente diagnóstico o terapéutico eficaz.

25 [0065] Cuando una variable dada (por ejemplo, R, X, Z, etc.) tenga lugar más de una vez dentro de cualquier componente o de cualquier fórmula de la presente invención, su definición en cada ocasión será independiente del resto de veces que tenga lugar. Asimismo, las combinaciones de sustitutos y/o variables están permitidas sólo si dichas combinaciones tienen como resultado compuestos estables.

30 [0066] El término "elemento de unión" se refiere a una fracción química cuyo propósito es el de unir, por enlace covalente, una fracción fotoactiva y un péptido de esqueleto cíclico. El elemento de unión también podrá usarse como espaciador con la función de establecer una distancia entre la fracción fotoactiva y el péptido de esqueleto cíclico.

35 [0067] El término "fracción fotoactiva" utilizado en este documento y en las reivindicaciones hace referencia a una fracción que, al ser estimulada con una longitud de onda predeterminada de una luz, emite una luz fluorescente, o, además de su capacidad de emitir una luz fluorescente, genera especies de oxígeno reactivas.

40 [0068] Una fracción fotoactiva que emite una luz fluorescente cuando recibe el estímulo de una luz con determinada longitud de onda. Dicha longitud de onda puede ser absorbida por el tejido objetivo y excitar los fluoróforos del compuesto, lo que hace que emita luz fluorescente a determinada longitud de onda y con cierta intensidad para su detección, o excita a la fracción fotoactiva del compuesto y esto hace que genere (en presencia de oxígeno) especies de oxígeno reactivas (ROS en sus siglas en inglés) para terapia.

45 [0069] El término "agente para la obtención de imágenes ópticas" se refiere en este documento a un agente fotoactivo marcado que puede ser detectado por medio de ciertas técnicas de detección (entre las que se incluye, pero no se limita a, la cámara CCD enfriada) o un dispositivo para el uso intraoperativo o en la detección de tumores, otra patología tisular o en tejido sano. El término "PDD" o diagnóstico por terapia fotodinámica se utiliza en este documento como equivalente al término obtención de imágenes ópticas.

50 [0070] El término "PDT", o "terapia fotodinámica", se utiliza en este documento para abarcar los métodos de tratamiento de patologías tisulares por medio de la administración de agentes con marcador fotoactivo y la irradiación de dicho tejido con una luz para conseguir la destrucción de dicho tejido por medio de especies de oxígeno reactivas.

55 [0071] Tal y como se utiliza en esta patente y en sus reivindicaciones, la frase "una cantidad eficaz desde el punto de vista terapéutico" significa la cantidad de este nuevo análogo péptido de esqueleto ciclado o una composición que contenga dicho análogo para su administración a un receptor para conseguir los resultados deseados cuando esté indicado, según detalla el presente documento, esto es, en enfermedades como el cáncer, desórdenes endocrinos, enfermedades inflamatorias, y enfermedades gastrointestinales, entre otras.

60 [0072] En este documento se utilizan algunas abreviaturas para describir la invención y los métodos para sintetizarla y utilizarla. Por ejemplo, Alloc se refiere al aliloxicarbonilo, Boc al t-butiloxicarbonilo, Dab al ácido diaminobutírico, DCM al diclorometano, DIEA a la diisopropil-etil amina, DFM a la dimetil formamida, EDT al etanoeditiol, FOS al sistema de espectroscopia por fibra óptica, Fmoc al fluorenilmetoxicarbonilo, HOBT al 1-hidroxibenzotriazol, HPLC a la

5 cromatografía líquida de alta presión, GAMA al ácido gamma aminobutírico, MPS a la síntesis múltiple en paralelo, MS a espectrometría de masas, NMM a la N-metilmorfolina, NMP a la 1-metil-2-pirolidonona, PDD al diagnóstico fotodinámico, PDT a la terapia fotodinámica, PEG al polietilenglicol, PyBOP al hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tris-pirrolidina-fosfonio, PyBrOP al hexafluorofosfato de bromo-tris-pirrolidina-fosfonio, ROS a las especies de oxígeno reactivas, SRIF al Factor Inhibidor de la Secreción de Somatotropina, SST a somatostatina, SST-R al receptor de somatostatina, tBu al butil terciario, TFA a ácido trifluoroacético, TIS a triisopropilsilano.

10 **[0073]** Los aminoácidos utilizados en esta invención son los que se encuentran a la venta actualmente o se pueden obtener poniendo en práctica métodos de síntesis habituales. Algunos residuos podrían necesitar métodos especiales para la incorporación en el péptido, también son útiles para aplicar a esta invención métodos de síntesis secuenciales, divergentes y convergentes. Los aminoácidos con códigos nativos y sus derivados están representados con códigos de tres letras, de acuerdo con las convenciones IUPAC. En los casos en los que no se indique nada, se ha utilizado isómero L. Los isómeros D están señalados con la letra "D" antes de la abreviatura del residuo.

15 **[0074]** La sustitución conservadora de aminoácidos incluye el reemplazo de un aminoácido por otro que tenga el mismo tipo de grupo funcional o cadena lateral, por ejemplo, alifático, aromático, con carga positiva, con carga negativa. Estas sustituciones podría mejorar la biodisponibilidad oral, la penetración en el sistema nervioso central, enfocadas a un tipo específico de poblaciones celulares y similar. Los expertos en la materia se darán cuenta de que las sustituciones individuales, la supresión y la adición de elementos del péptido, el polipéptido, o la secuencia proteica que altera, añade o suprime un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es "una variante del método convencional" en la que la alteración resulta en la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente semejante. Las tablas de sustitución conservadora que proporcionan aminoácidos funcionalmente semejantes son muy conocidas y mencionadas en obras anteriores.

25 **[0075]** Cada uno de los siguientes seis grupos contiene aminoácidos que son un sustituto conservador de otro aminoácido:

- 30 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T);
2) Ácido aspártico (D), Ácido glutamático (E);
3) Asparagina(N), Glutamina (Q);
4) Arginina (R), Lisina (K);
5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y
6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptofán (W).

35 **Farmacología:**

40 **[0076]** Además de otras consideraciones, el hecho de que los nuevos ingredientes activos de la invención sean péptidos o análogos de péptidos, dictan que la formulación tenga que ser apropiada para poder producir este tipo de compuestos. Está claro que los péptidos son menos apropiados para la administración oral, al ser susceptibles a ser digeridos por los ácidos gástricos o enzimas intestinales. Las vías preferidas para la administración de péptidos por vía intraarticular, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, o intratecal. La vía más preferida es por inyección directa en la zona o cerca de la zona de la enfermedad o patología. Una vía aún más preferida es por inyección directa en el sitio o cerca del sitio de la enfermedad o patología.

45 **[0077]** Los compuestos farmacológicos de la presente invención pueden ser manufacturados por medio de procesos ampliamente conocidos en la literatura del campo, por ejemplo, mediante procesos de mezcla convencional, disolución, granulado, molido, pulverizado, elaboración de grageas, levigación, emulsión, encapsulado, oclusión y liofilizado.

50 **[0078]** Los compuestos farmacológicos que deben usarse para la presente invención pueden, de esta forma, formularse de la manera convencional utilizando uno o más portadores fisiológicamente aceptables que contengan excipientes y auxiliares que faciliten el procesamiento de los componentes activos de los preparados que se puedan utilizar en farmacia.

55 **[0079]** Para ser inyectados, los compuestos de la invención pueden formularse en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles como la solución de Hank, la solución de Ringer, o tampón de suero fisiológico. Para la administración por vía transmucosa, los agentes penetrantes apropiados para que permeen por la barrera objetivo se utilizan en la formulación. Dichos elementos penetrantes son, por ejemplo, el glicol polietileno son bien conocidos por los expertos en la materia.

60 **[0080]** Los núcleos de las grageas se presentarán con el recubrimiento apropiado. Para tal propósito, se pueden utilizar soluciones de azúcar concentrada, que podrían contener, opcionalmente, goma arábiga, talco, pirrolidona polivinilo, gel Carbocol, glicol polietileno, dióxido de titanio, soluciones de lacado y disolventes orgánicos y mezclas de disolventes apropiados.

65 **[0081]** Los compuestos farmacológicos, que pueden utilizarse oralmente, incluyen cápsulas duras hechas de gelatinas,

así como cápsulas blandas, cápsulas selladas hechas de gelatina y un plastificante, como puede ser el glicerol o el sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener ingredientes activos mezclados con ingredientes de relleno, como lactosa, aglutinantes, como las féculas, lubricantes como el talco o el estereato de magnesio, y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los componentes activos pueden encontrarse disueltos o en suspensión en líquidos apropiados, como aceites grasos, parafina líquida o glicoles polietilenos líquidos. También se le puede añadir un estabilizante. Todas las formulaciones para administración oral deberán presentarse en dosis apropiadas para la vía de administración elegida. Para administración por ingesta, las composiciones pueden presentarse en forma de pastillas o píldoras formuladas de la forma convencional.

[0082] Para su administración por inhalación, de acuerdo con la presente invención, se debe utilizar la variante que presenta el fármaco en forma de un aerosol con el producto presurizado, o un nebulizador que se utilice con un agente propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, trichorofluorometano, dicloro-tetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de los aerosoles presurizados, la unidad de la dosis podría venir determinada por una válvula que proporcionase una cantidad determinada de fármaco. Las cápsulas y cartuchos de gelatina, por ejemplo, que puedan usarse en un inhalador o insuflador se podrán formular de forma que contenga una mezcla en polvo del péptido y una base en polvo adecuada, como lactosa o fécula.

[0083] Los compuestos farmacológicos para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los ingredientes activos en forma soluble en agua. Además, se pueden preparar suspensiones de los componentes activos en forma de suspensiones oleosas inyectables. Los portadores naturales y sintéticos apropiados para ello son ampliamente conocidos en el campo (Pillai et al., Curr. Opin. Chem. Biol. 5, 447, 2001). La suspensión puede contener también estabilizantes o agentes adecuados, que aumenten la solubilidad de los componentes, para permitir la elaboración de soluciones de alta concentración. Otra alternativa es presentar el componente activo en forma de polvo para su reconstitución por medio de un vehículo apropiado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos.

[0084] Los compuestos de la presente invención se pueden formular, igualmente, en composiciones rectales en forma de supositorios o enemas de retención, usando para tal efecto, bases convencionales de supositorio, como la manteca de cacao u otros glicéridos, por ejemplo.

[0085] Los compuestos farmacológicos apropiados para usar en el contexto de la presente invención incluyen compuestos en los que los ingredientes activos estén presentes en una cantidad efectiva para alcanzar el propósito que persiguen. Específicamente, deben presentar una cantidad efectiva terapéuticamente, lo que significa, una cantidad suficiente de compuesto que sirva para prevenir, paliar, o mejorar los síntomas de la enfermedad por la que el paciente recibe el tratamiento. Está en manos de los expertos en el campo determinar qué cantidad se considera eficiente terapéuticamente.

[0086] La toxicidad y eficacia terapéutica de los péptidos descritos en este documento se pueden determinar mediante procedimientos farmacológicos normales en cultivos celulares o mediante la experimentación en animales, por ejemplo, determinando el IC50 (concentración que proporciona el 50 % de inhibición) y el LD50 (dosis letal que cause la muerte del 50% de los animales sometidos a experimentación) para el estudio de un compuesto. Los datos obtenidos de dichos ensayos con cultivos celulares o animales pueden después usarse para formular la dosis para administración a humanos. La dosis variará dependiendo del método de elaboración y de la vía de administración utilizada. El propio doctor podrá elegir la formulación exacta, la vía de administración y el método de elaboración apropiados en cada caso, según el estado del paciente (véase Fingl, et al., 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p.1).

[0087] Dependiendo de la severidad y el grado de respuesta de la enfermedad que se quiere tratar, la dosis puede ser única, siendo en este caso un compuesto de liberación lenta, en el que el tratamiento podría durar desde varios días hasta varias semanas o hasta que tenga lugar la curación o una disminución del nivel de la enfermedad. La cantidad del compuesto que se administre dependerá, naturalmente, del sujeto al que se quiera tratar, la gravedad de su estado, el tipo de administración, el juicio del doctor que prescriba el compuesto, y otros factores relevantes.

[0088] En la invención se presentan nuevos péptidos análogos que se caracterizan por incorporar nuevas unidades estructurales con grupos Puente unidos al nitrógeno alfa de los aminoácidos alfa. En concreto, estos compuestos son análogos de la somatostatina de esqueleto ciclado que comprenden una secuencia peptídica de entre trece y veinticuatro aminoácidos. Cada análogo incorpora, además, al menos una unidad estructural que contiene a su vez un átomo de nitrógeno del esqueleto del péptido conectado a un grupo puente que contiene una amida, tíoeter, tíoester, disulfuro, urea, carbamato o sulfonamida, y en la que al menos una unidad estructural está conectada por medio de dicho grupo puente a una forma de estructura cíclica con una fracción seleccionada del grupo formada por una segunda unidad estructural, la cadena lateral de un residuo de aminoácido de la secuencia o un residuo de aminoácido terminal. Preferiblemente, la secuencia peptídica incorporará entre 3 y 14 residuos, más preferiblemente, entre 4 y 12 aminoácidos, y aún más preferiblemente, entre 5 y 9 aminoácidos.

[0089] Los análogos de esqueleto cíclico de la presente invención se unen con una afinidad alta a un subconjunto definido de receptores SST humanos. La selectividad de este receptor indica la selectividad fisiológica potencial de este in-vivo. Además, la presente invención proporciona por primera vez la posibilidad de obtener un panel de análogos con

marcador fotoactivo de esqueleto ciclado con una selectividad específica para receptor SST o con combinaciones de selectividad de receptor. Esto permite su uso diagnóstico y terapéutico en diferentes tipos de cáncer y otras enfermedades de acuerdo con las necesidades específicas de cada paciente y cada enfermedad.

5 **[0090]** De acuerdo con la presente invención, se presenta el hecho de que los análogos de SST preferidos poseen una afinidad y selectividad mejoradas respecto a subtipos de SST específicos. Los análogos preferidos incluyen nuevos análogos de SST de esqueleto cíclico que presentan selectividad a los subtipos 2, 5 o 2 y 5 de SST-R. Otros análogos preferidos se unen a más de dos receptores de somatostatina. Otros análogos preferidos adicionales de SST presentan la ventaja de incluir estructuras bicíclicas que contienen al menos una estructura cíclica que conecta dos unidades
10 estructurales y una segunda estructura cíclica que se selecciona del grupo consistente en cadena lateral-cadena lateral; esqueleto-esqueleto; y esqueleto-terminal.

[0091] La invención además proporciona péptidos reactivos de esqueleto cíclico capaces de portar un marcador con fracción fotoactiva para convertirse en agentes terapéuticos o diagnósticos, cada uno de los cuales contiene un análogo
15 SST de esqueleto ciclado unido por enlace covalente a una fracción fotoactiva. Según la presente invención, la fracción fotoactiva puede unirse al análogo por medio de cualquier grupo funcional libre disponible en el péptido. En los análogos más preferidos, la fracción fotoactiva se une por enlace covalente bien al nitrógeno terminal de péptido padre de forma directa o gracias a un elemento de unión, bien al nitrógeno alfa de un residuo Lys.

20 **[0092]** El diseño de los componentes con marcador fotoactiva de la presente invención se basó en anteriores estudios sobre análogos de somatostatina de esqueleto ciclado caracterizados por su alta afinidad y selectividad respecto a SST-R. Se demostró que los análogos de somatostatina de esqueleto ciclado pueden estar conjugados con fluoróforos relativamente voluminosos y que los conjugados resultantes podían dirigirse a hSSTR2. La síntesis de compuestos
25 fotoactivos se llevó a cabo tanto en formato "Síntesis en paralelo múltiple" (MPS) como en "tandas". Primero se analizó la potencia de los compuestos para unirse a un objetivo primario, un receptor humano de SSTR de subtipo 2 (hSST-R2). A continuación, se examinó los componentes in-vivo para observar su biodistribución en diferentes tejidos de ratones portadores del tumor NCI-H69.

30 **[0093]** La somatostatina es una hormona tetradecapéptida cuyas numerosas funciones reguladoras están determinadas por una familia de cinco receptores, cuya presencia varía según el tipo de tejido. Se cree que los análogos de la SST con objetivo de receptor específico podrían tener gran valor como agentes diagnósticos y terapéuticos en el tratamiento y la diagnosis de un amplio número de enfermedades. Ha habido diversos intentos de diseñar péptidos análogos pequeños, sin demasiado éxito en cuando a su selectividad. La presente invención propone análogos de SST de
35 esqueleto cíclico conformacionalmente restringidos que suponen una novedad inesperada debido a su alta selectividad en relación con los subtipos de receptores SST, y que son, por lo tanto, útiles de cara al diagnóstico y el tratamiento de diversos tipos de cáncer, como el cáncer de colon, el adenoma secretor de la hormona del crecimiento de la pituitaria, el cáncer de tiroides, el carcinoide gástrico, el carcinoma de células pulmonares pequeñas, el melanoma, el linfoma medular no Hogking, y el cáncer de mama y otros tipos de cáncer. Además, los análogos de SST de esqueleto ciclado de la presente invención se pueden utilizar para la detección de rechazo de aloinjertos, incluyendo el cardíaco, aunque
40 no limitado a este.

[0094] Las Fuentes luminosas para la irradiación (y la excitación electrónica) de los análogos de SST con marcador fotoactivo de la presente invención pueden ser coherentes (LÁSER) o no coherentes (convencionales). En el caso de
45 las fuentes luminosas coherentes, se utiliza un diodo para ajustar la longitud de onda para una irradiación óptima del agente para la obtención de imágenes ópticas o fármaco PDT. En el caso de las fuentes luminosas no coherentes, se utiliza un filtro para ajustar la longitud de onda de la luz. La longitud de onda óptima para la obtención de imágenes será la que excite electrónicamente el fluoróforo del compuesto y haga que emita luz fluorescente a una longitud de onda e intensidad determinadas para la detección, que se llevará a cabo, preferiblemente, utilizando una cámara CCD
50 enfriada. La longitud de onda óptima para la PDT de acuerdo con la presente invención es la que excita la fracción PDT del componente electrónicamente, de forma que produce (en presencia de oxígeno) la especie reactiva de oxígeno (ROS) que funciona como elemento terapéutico en la PDT.

[0095] Las fracciones fotoactivas, de acuerdo con la presente invención, podrán corresponderse con cualquier fracción de las ya conocidas en el campo, que se encuentre a la venta o en fase de investigación o desarrollo. Las fracciones
55 fotoactivas más preferidas para la obtención de imágenes ópticas y PDT según la presente invención se seleccionan de un grupo que contiene fluoresceína, Lissamine™, rodamina B, porfirinas, clorinas, ftalocianina e indocianina verde. Otras fracciones fotoactivas preferidas son: derivados de la hematoporfirina (HPD), derivados de la ftalocianina (BPD), M-THPC (meta-tetrahidroxifenilclorina), 5,10,15,20-tetraariletinilporfirinatozinc(II), zinc ftalocianina tetrasulfonato, tetrafenilporfirinas, porfírenes, porfirinoides, porfirin-diquetones, deuteroporfirina IX, hematoporfirina, paladio (II) coproporfirina y complejos tetraariletinilporfirinatozinc(II).

[0096] En los casos en que sea posible usar un complejo metálico para un péptido análogo de esqueleto cíclico fotoactivo, tanto la fracción sin metal como la metálica o que contiene metal se incluyen en la invención.

65 **[0097]** Los análogos de esqueleto ciclado de la presente invención se pueden utilizar como compuestos diagnósticos en

5 diferentes métodos para el diagnóstico del cáncer y para la obtención de imágenes de tumores existentes y sus metástasis, y en la detección de rechazo de injertos, incluyendo injertos cardíacos, aunque no limitándose a estos. Los métodos para la diagnosis de cáncer y rechazo de aloinjertos comprende la administración a un mamífero, que puede ser un paciente humano, de análogos de esqueleto ciclado marcados con un fluoróforo detectable. Los métodos para el diagnóstico o la obtención de imágenes de cáncer y rechazo de aloinjertos por medio del uso de dichos compuestos representan otra aplicación de la invención.

10 **[0098]** Los agentes para la obtención de imágenes que presenta esta invención sirven para la obtención de imágenes de tumores, sobre todo de sitios primarios y metastáticos neoplásicos, en los que las células neoplásicas presentan receptores SST, y en particular en las células tumorales primarias y sobre todo metastáticos que son clínicamente difíciles de detectar y determinar por medio de métodos convencionales. Los reactivos para la obtención de imágenes de la presente invención se pueden usar para visualizar órganos, tumores, y en particular, tumores gastrointestinales, mielomas, cauciona pulmonar de las células pequeñas y otros APUDomas, tumores endocrinos como los carcinomas de tiroides medular y tumores de la hipófisis, tumores cerebrales como los meningiomas y astrocitomas, y tumores de la próstata, de mama, de colon y de ovarios.

20 **[0099]** Los componentes descritos en la presente invención se pueden administrar utilizando cualquier tipo de vía de administración conocida. Los reactivos diagnósticos con marcador fotoactivo se administrarán, preferiblemente, por vía intravenosa, en una única dosis inyectable en cualquier tipo de medio para inyección intravenosa, como un medio acuoso salino. Otra vía de administración preferida es la aplicación tópica, especialmente en el tratamiento y el diagnóstico de lesiones de la piel y varios tipos de cáncer (por ejemplo BBC, o melanoma). La administración subcutánea de los compuestos y las composiciones farmacológicas de acuerdo con la presente invención se hará preferiblemente en tumores abdominales, de cabeza, de cuello, y similares. La aplicación intraoperativa es la administración preferida en el caso de la extirpación o reducción de masa de tumores, para resecciones de control (PDD), en extirpación de tumores residuales por PDT (sobre todo tumores pequeños) o en PDT coadyuvante. La aplicación por vía endoscópica es preferible en tumores de pulmón, tráquea (sistema respiratorio, fosas nasales, senos paranasales), boca, esófago, estómago, colon, recto (sistema gastrointestinal); sistema ginecológico y urinario, próstata, vejiga, en cirugía general/mínimamente invasiva.

30 **[0100]** La aplicación de luz para excitar las fracciones fotoactivas y para obtener imágenes se hará de forma tópica, preferiblemente, subcutánea (a través de la piel y hasta niveles relativamente profundos, con una emisión de luz altamente penetrante y la consiguiente excitación (por ejemplo, infrarrojo cercano, intraoperativo o endoscópico).

35 **[0101]** Los compuestos farmacológicos que contengan análogo SST de esqueleto ciclado activo farmacológicamente y un portador o diluyente aceptables farmacológicamente son otra posible formación de la invención, al igual que los métodos para el tratamiento de cánceres en PDT con objetivo específico que utilicen dichos compuestos. Los compuestos farmacológicos podrán administrarse por cualquier vía de administración apropiada, ya sea oral, tópica o sistémica. Los métodos de administración preferidos incluyen pero no se limitan a vías parenterales, como las inyecciones intravenosas e intramusculares, y administración por vía intranasal o ingestión oral. Las dosis preferidas para la administración de dichos compuestos farmacológicos oscilan entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg de masa corporal/día.

45 **[0102]** Los compuestos farmacológicos de acuerdo con la presente invención son de utilidad en el tratamiento de determinados tejidos objetivo mediante la aplicación de PDT transcutánea, tejidos como el tejido endotelial vascular, las paredes vasculares con tumores anormales, tumores sólidos de la cabeza y el cuello, tumores del tracto gastrointestinal, tumores de hígado, de mama, de próstata, de pulmón, tumores no sólidos, células malignas del tejido hematopoyético y el tejido linfático, y otras lesiones en el sistema vascular y la médula ósea, y en tejido y células relacionadas con enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias.

50 **[0103]** Si el tratamiento es localizado, por ejemplo, tratamiento de tumores superficiales o enfermedades cutáneas, los conjugados activos se podrán administrar por vía tópica, por medio del uso de composiciones tópicas normales, como lociones, suspensiones o pastas.

55 **[0104]** Los compuestos farmacológicos podrán ser usados, preferiblemente, para ayudar en la regresión de ciertos tipos de tumores, en particular aquellos que presentan receptores SST. Además, los compuestos farmacológicos también pueden emplearse en la reducción de hipersecreción hormonal, síntoma frecuente en algunos tipos de cáncer, como el APUDomas. Otras enfermedades para las que los compuestos de la presente invención pueden ser de ayuda terapéutica son las enfermedades endocrinas, gastrointestinales, complicaciones derivadas de la diabetes, pancreatitis, enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias, rechazo de aloinjertos, aterosclerosis y restenosis.

60 **[0105]** En este documento también se describe un método para aliviar enfermedades relacionadas con la somatostatina en animales, preferiblemente humanos, por medio de la administración al animal de una cantidad de análogos de SST de esqueleto cíclico con marcador fotoactivo que sea eficaz terapéuticamente.

65 **[0106]** Los compuestos y composiciones farmacológicas de acuerdo con la presente invención se pueden usar además

5 en terapia génica, en la que un gen (o varios genes) está orientado a una célula cualquiera (por ejemplo, una célula cancerosa). El vector orientado al objetivo puede portar sólo el gen SST-R, en cuyo caso, la SST-R presente se puede usar para obtención de imágenes y también para terapia. El vector puede portar tanto el gen SST-R como otro gen, en cuyo caso la SST-R presente se puede usar para obtención de imágenes y el segundo producto génico se utilizaría para terapia. En general, los agentes para la obtención de imágenes orientados a SST-R se utilizarían para dilucidar si la terapia génica tiene éxito. Tras confirmar que el gen ha alcanzado su objetivo y se está presentando como un producto génico (a través de imágenes de ST-R), comenzaría la terapia (ya fuera utilizando el SST-R o el segundo producto).

10 **[0107]** Una aplicación adicional de los compuestos y las composiciones farmacológicas de esta invención es la terapia celular de células genéticamente modificadas, en la que, de forma parecida a la terapia génica, las células (madre o de otro tipo) se pueden modificar para que presenten SST-R (para obtener imágenes/ terapia) solos o junto con otros productos génicos (para terapia). La obtención de imágenes de las células genéticamente modificadas ayudaría a saber, por tanto, si la célula ha alcanzado su objetivo.

15 **[0108]** Otro aspecto de la presente invención proporciona métodos para elaborar agentes PDD y PDT y los reactivos necesarios para dicha elaboración. Cada uno de estos reactivos comprende un análogo SST de esqueleto ciclado unido por enlace covalente a una fracción fotoactiva.
Formaciones preferidas

20 **[0109]** A continuación se detalla una relación de los análogos SS de esqueleto ciclado preferidos de acuerdo con la presente invención:

25 **[0110]** En los análogos preferidos de acuerdo con la presente invención, el péptido está conectado a la fracción fotoactiva por medio de un elemento de unión, de forma que se obtiene una estructura como la de la Fórmula general 1:

Z-Q-PTR Formula Número 1

30 en la que Z es una fracción fotoactiva; Q es un enlace directo o una fracción que actúa como elemento de unión que puede estar conectada a un grupo funcional libre del péptido; y PTR designa al análogo de somatostatina de esqueleto ciclado, como se describe a continuación.

[0111] Preferiblemente, el elemento de unión Q está conectado al N-terminal del péptido por medio de un enlace peptídico.

35 **[0112]** En concreto, Q es seleccionada de un grupo consistente en un enlace directo, ácido aminohexanoico, ácido aminopentanoico, β Ala, GABA y Gly; la fracción fotoactiva Z se selecciona de un grupo consistente en 5-(4-((oxocarbonilo)metil)fenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina5-(4-carboxifenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina; 5-(4-((aminocarbonyl) metil)fenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina; 5-(4-((oxocarbonilo)metil)fenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-de cloro (isómeros mixtos); 5-(aminotionilo)fluoresceína; 4-sulfonilo-2-sulfo-Lisamina™ rodamina B; 2-sulfonilo-4- sulfo-Lisamina™ rodamina B (isómeros mixtos); y 5- y 6-carboxifluoresceína (isómeros mixtos); y PTR se selecciona de un grupo de:

45 PTR 3207 con la estructura DPhe-Cys*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2*-NH₂;
PTR 3213 con la estructura GlyS2*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2*-NH₂;
PTR 3219 con la estructura DPhe-GlyS2*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2*-NH₂;
DesGABA-PTR 3173 con la estructura Phe-Trp-DTrp- Lys-Thr-Phe-GlyC3*-NH₂;
Los asteriscos señalan los puntos de ciclado.

50 **[0113]** Otros compuestos preferidos de acuerdo con la presente invención contienen análogos de somatostatina fotoactiva de esqueleto ciclado que responden a la Fórmula Número 2:

Z-Lys(GABA-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyC3)-NH₂ Fórmula N° 2

55 en la que Z es una fracción fotosensible conectada al nitrógeno alfa de la Lisina C-terminal, y en la que el péptido entre paréntesis está conectado a Lys Epsilon amina y ciclado por medio de un enlace peptídico formado entre el nitrógeno terminal GABA y la unidad estructural de carboxilato Gly-C3.

60 **[0114]** Preferentemente, la fracción fotoactiva Z será un derivativo fluorescente conectado al nitrógeno alfa de la Lisina C-terminal por enlace seleccionado de la tiourea o un enlace peptídico.

[0115] Estos péptidos análogos de SST de esqueleto ciclado se preparan incorporando al menos un derivativo N α - ω -funcionalizado de un aminoácido en una secuencia peptídica, para después ciclar selectivamente el grupo con una de las cadenas laterales de aminoácidos en la secuencia peptídica o con otro derivativo de un aminoácido ω -funcionalizado.

65

[0116] La Tabla 2 describe algunos de los análogos preferidos de la presente invención y su afinidad con hSST-R2.

Tabla 2.

Péptido	Secuencia	IC ₅₀ nM
1007A-01	5- and 6-carboxifluoresceína-Dab*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyC3*-NH ₂	78
1017A-01	5- and 6-carboxifluoresceína-Lys(GABA*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyC3*)-NH ₂	13.2
YS-1-86	5-(aminotil)fluoresceína-GABA-DPhe-Cys**Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2*-NH ₂	1.7
YS-1-70	5-(aminotil)fluoresceína-aminopentanoyl-DPhe-GlyS2*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2*-NH ₂	2.9
YS-1-62	5-(aminotil)fluoresceína-βAla-DPhe-GlyS2*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2*-NH ₂	3.0
YS-1-64	5- and 6-carboxifluoresceína-βAla-DPhe-GlyS2*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2*-NH ₂	3.9
YS-1-48	5- and 6-carboxifluoresceína-GABA-GlyS2*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2*-NH ₂	5.4
YS-1-68	5- and 6-carboxifluoresceína-GABA-DPhe-GlyS2*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2*-NH ₂	5.7

Los asteriscos señalan los puntos de ciclado.

5 [0117] Como se puede observar, la afinidad de los análogos preferidos con el receptor tipo 2SST se encuentra en la escala nanomolar y oscila hasta decimales nanomolares, lo que significa que estos análogos podrían ser efectivos como compuestos diagnósticos y terapéuticos.

Métodos comunes para la síntesis, purificación y caracterización de péptidos de esqueleto cíclico

Síntesis:

[0118]

Resina: 1g resina de amida Rink o resina Tenta-gel, con una carga de 0.2-0.7 mmol/g.

Desprotección Fmoc: con 7 mL de piperdina al 20% en NMP (dos veces durante 15 minutos). A continuación, 5 lavados con 10 mL de NPM durante 2 minutos, agitando.

Acoplamientos:

1. Acoplamiento normal (acoplamiento a aminoácidos simples): con una solución que contenga 3 equivalentes de aminoácido, 3 equivalentes de PyBrop y 6 equivalentes de DIEA en 7 mL de NPM. Durante 0,5-2 horas, agitando. El acoplamiento se monitoriza con un test de nihidrina y se repite hasta que la solución de nihidrina se quede amarilla.

2. Acoplamiento de His y Asn con una solución que contenga 5 equivalentes de DIC y 5 equivalentes de HOBT en mL de DMF.

3. Acoplamiento con unidades estructurales Gly: con una solución que contenga 3 equivalentes de aminoácidos, 3 equivalentes de PyBrop y 6 equivalentes de DIEA en 7 mL de NPM. Dos veces durante 1-4 horas, agitando.

4. Acoplamiento con unidades estructurales no Gly: con una solución que contenga 5 equivalentes de aminoácidos, 1,5 equivalentes de trifosgeno y 13 equivalentes de colidina en 15 mL de dioxanos de tetrahidrofurano. Dos veces durante 0,5-2 horas a 50°C, agitando.

Extracción de los grupos protectores Allyl y Alloc de las unidades estructurales: con 0,6 equivalentes por Allyl o Alloc de Pd(PPh₃)₄ en 30 mL de DCM que contengan un 50% de ácido acético y un 2,5% de NMM. Durantes 1-4 horas, agitando.

Ciclado: con una solución que contenga 3 equivalentes de PyBOP y 6 equivalentes DIEA en 7mL de NPM. Durantes 0,5-2 horas, agitando. El ciclado se monitoriza con un test de nihidrina, y se repite, en caso de que sea necesario.

División: con un 82%-95% de TFA suplementado con elementos eliminadores: un 1-15% de H₂O, un 1-5% de TIS y un 0-5% de EDT.

Purificación:

[0119] Se desarrollará un método individual de purificación para cada péptido de esqueleto cíclico utilizando HPL analítica para optimizar el aislamiento del péptido de otros componentes. El método analítico suele llevarse a cabo utilizando una columna C-18 Vydac de 250x0,46 mm en la fase estacionaria, con agua/acetonitrilo que contenga un

0,1% de la mezcla de TFA.

[0120] El método de elaboración se diseña adaptando el método de la separación analítica a una columna preparativa C-18 Vdyac. Durante el proceso de purificación, el pico que contiene el péptido cíclico se recoge utilizando un dispositivo colector de fracciones semi-automático. Las fracciones recolectadas se inyectan en el HPLC analítico para comprobar la pureza. Las fracciones puras se combinan y liofilizan.

Caracterización:

[0121] El material puro combinado y liofilizado se analiza para comprobar su pureza por medio de HPLC, MS y electroforesis capilar y un análisis de aminoácidos para determinar la proporción de contenido de péptidos y aminoácidos.

El método de general de síntesis, purificación y caracterización de librerías en formato Síntesis en Paralelo Múltiple (MPS):

[0122] El procedimiento MPS se utiliza como procedimiento de rutina en el desarrollo de péptidos. Los péptidos individuales, o grupos de varios péptidos, se sintetizan en placas de microtitulación de 96 pocillos equipadas con filtros que permiten el paso del solvente pero no de la matriz en fase sólida. Se utilizará un simple pero eficiente aparato de válvulas permite cerrar y abrir las válvulas simultáneamente (fabricado por Millpore). El sistema utiliza un enfoque en el que cada pozo está equipado con una membrana que permite permear el solvente en el fondo, pero no dejar pasar partículas mayores de un determinado tamaño. El proceso permite poner resina en los pocillos, provocar una reacción en el solvente y retirar el solvente de todos los pozos a la vez aplicando vacío. Estas placas especiales, que están disponibles en formato estándar de 96 pocillos, permiten la síntesis en paralelo de 96 péptidos simultáneamente. La escala sintética del procedimiento oscila entre 1 y 5 mmoles por pocillo. A continuación se lleva a cabo la purificación con columnas C18 de fase inversa (SepPak o semi-preparativas de Vydac), que también se realiza en placas de 96 pocillos de formato estándar, los péptidos se disuelven normalmente en 1ml de agua para producir una concentración teórica de crudo de 1-5 mM (dependiendo de la escala de síntesis). El control de calidad química de los péptidos resultantes se lleva a cabo por medio de análisis ESI-MS. El análisis de varias placas preparadas en diferentes tandas y por distintos operadores tuvo indicó una tasa de éxito de aproximadamente el 80% en relación a la presencia de masa del péptido deseado en el preparado crudo. Se llevan a cabo estudios posteriores de los péptidos del MPS utilizando LC-MS. El análisis reveló una calidad de péptido crudo similar a los preparados crudos de péptidos sintetizados individualmente a gran escala. Cada uno de los pasos de proceso, o el proceso al completo, se lleva a cabo ahora de manera automática, utilizando sintetizadores de péptidos automáticos. De acuerdo con los ejemplos aquí expuestos, en la actualidad los péptidos se están sintetizando automáticamente utilizando la ACT 396 y VANTAGE, de Advanced ChemTech, el dispositivo para calentar que se utiliza es Lab Tech 4, de Advanced ChemTech.

Procedimiento detallado para la síntesis en formato MPS:

[0123] Para una capacidad de 6mmoles, se utilizan 10 mg de resina con una sustitución de 0,6 mmoles/gr.
Desprotección Fmoc: a cada pocillo se le añade 500 µl de piperdina al 5% en NMP dos veces. La mezcla se agita durante 15 minutos. El NMP se extrae mediante succión.
Lavado tras desprotección Fmoc: la resina se lava poniendo 600 µl de NMO en cada pocillo, a continuación, se vacían los pocillos de solución por medio de una corriente de nitrógeno. El proceso de lavado se repite 4 veces.

Acoplamiento usando HBTU:

[0124]

Capacidad del pozo: 6 µmoles
 Cantidad de aminoácido por acoplamiento por pozo: 30 µmoles
 Aminoácido en concentración de NMP: 0,2 M
 Volumen de aminoácido utilizado: 150 µl
 Cantidad de HBTU: 30 µmoles
 Concentración de HBTU: 0,2 M
 Volumen de HBTU utilizado: 150 µl
 DIEA añadido: 150 µl de 0,4 M en NMP
 Volumen total de la reacción: 450 µl

[0125] Los aminoácidos se disuelven en una solución de HOBT en NMP. La resina se lava poniendo 600 µl de NMP en cada pocillo, y posterior vaciado de los pocillos por medio de una corriente de nitrógeno. El proceso de lavado se repite 4 veces. La reacción de acoplamiento se repite dos veces en una hora.

Acoplamiento usando reactivo Mukayama (realizado solo en ciertas situaciones):

[0126]

Solución de aminoácido a 650 mM - 40 µl

Reactivo Mukayama a 111 mg/ml- 60 µl
 Colidina añadida por pozo- 15 µl

5 **[0127]** Se aplica el mismo procedimiento para el acoplamiento con PyBop. Temperatura de reacción 50°C, tiempo de reacción: primer acoplamiento 4h, segundo acoplamiento 16h.

10 **[0128]** Desprotección Allyl Alloc: se realiza tras completar el ensamblado, añadiendo 180 µl de solución de 1,5 g Pd(PPh₃)₄ en 20 ml CH₂Cl₂ con un 5% de ácido acético + 2,5 de NMM. Ciclado: este paso se completa añadiendo 100 µl de PyBop en NMP + DIEA.

15 **[0129]** División del péptido de la resina y purificación SepPak: después de la última desprotección Fmoc, la resina se transfiere a una placa de microtitulado profunda, en cada pocillo se introducen 300 µl de solución TFA que contiene un 2,5% de TIS, 2,5% H₂O y 2,5% de EDT. La extracción del TFA se hace por liofilizado. Después de la división, los péptidos se purifican con SepPak.

Método general para el análisis in-vitro de análogos de la somatostatina

20 **[0130]** La habilidad de los análogos SST de la invención para unirse a receptores SST in-vitro se demostró mediante estudios de la habilidad de dichos análogos para inhibir la unión de un análogo SST radiomarcado a membranas celulares que contenían receptor SST.

25 **[0131]** Los análogos SST se sometieron a estudios para comprobar su potencia para inhibir la unión de 125I-Tyr11-SRIF (basándose en el método descrito por Raynor et. al., Molecular Pharmacology 43: 838, 1993) a preparados de membrana que presentaban receptores SST transmembrana (SST-R1, 2, 3, 4 o 5). Los preparados de receptores usados para dichos tests fueron bien clones de receptores humanos que se presentan de forma estable y selectiva en células de Ovario de Hámster Chino (OHC), bien clones de líneas celulares que presentaban SST-R de forma natural. Normalmente, las membranas celulares se homogeneizaban en tampón tris en presencia de inhibidores de proteasa y después se incubaba durante 30-40 minutos con 125I-Tyr11-SRIF a concentraciones distintas de la de la muestra testada. Se filtró las reacciones de unión, se lavaron los filtros y se midió la radioactividad de los enlace con un contador β después de añadir la solución de centelleo. Se definió la unión no específica como radioactividad que permanecía unida en presencia de 1mM de SRIF-14 sin marcador.

Ensayos de caracterización biológica in-vitro

35 **[0132]** Se lleva a cabo una serie de experimentos biológicos in-vitro para caracterizar completamente a los conjugados. En dichos experimentos, la fluorescencia de la molécula se utiliza para medición cuantitativa de los parámetros (ensayos de fluorometría). Siempre que estuviera indicado un análisis celular, se podía llevar a cabo igualmente un ensayo sobre la membrana celular (menos para internalización). La cinética de los cultivos celulares (kon y koff, ligando "on rate" y "off rate", respectivamente) se mide en células OHC transfectadas con hSSTR1-5, células AR42J y NCI-H69. Las cifras resultantes se utilizan para calcular el Kd o constante de disociación en equilibrio de cada componente. Se realiza un experimento de saturación (por ejemplo, generación de un "análisis Scatchard") para determinar las uniones específicas (también es otra manera de medir Kd). Se llevan a cabo estudios de enlaces competitivos para cada ligando en comparación con SROF, sandostatina y otros ligandos SST-R de interés. Se estudia la internalización de los conjugados por incubación de células con diferentes concentraciones de los conjugados. La internalización es importante, ya que aumenta en gran medida el tiempo de residencia celular del conjugado. Así, la internalización debería orientar a las ROS para destruir componentes intracelulares, lo que podría hacer más productiva la PDT. Los conjugados que muestran mayores niveles de internalización son los que se espera que den mejores resultados in-vivo. Además, la dosis óptima in-vivo se podría predecir mediante la determinación de las concentraciones de internalización óptimas.

50 **[0133]** Se realizan estudios in-vitro de PDT teniendo en cuenta la longitud de onda óptima para la PDT y la concentración para internalización óptima. Se incuban células en conjugado PDT (en algunos casos, a continuación se lavan para eliminar el conjugado PDT del medio) y se irradian con luz. Acto seguido, se mide la supervivencia celular respecto al grupo de control (sin conjugado, sin luz).

Caracterización física de compuestos con marcador fotoactivo

55 **[0134]** La caracterización espectroscópica (o "foto física") in-vitro de cada compuesto incluye:
 60 i. espectro de absorción de longitud de onda;
 ii. coeficientes de absorción molar a una longitud de onda específica de absorbancia máxima;
 iii. espectros de emisión fluorescente (a ciertas longitudes de onda de excitación);
 iv. rendimiento cuántico de fluorescencia (a ciertas longitudes de onda);
 v. tasa de fotoblanqueo; y
 65 vi. para compuestos PDT, eficiencia de la generación de ROS (rendimiento cuántico de oxígeno singlete).

Métodos de obtención de imágenes ópticas**Espectrofluorimetría con fibra óptica**

5 **[0135]** Se acopló un láser de iones de argón (Melles Griot, serie 43) a un espectrofluorímetro (Shimadzu, modelo RF-5301PC) utilizando un haz de fibras bifurcadas (Oriol, Stratford, CT, modelo 77533). La luz láser (488 nm) se hizo pasar a través de una pata del haz de fibras, el extremo común del haz de fibras colocado a una distancia de 1mm de la muestra de tejido, mientras que el extremo de la segunda pata estaba dispuesto frente a la hendidura de entrada del espectrofluorímetro. Se reguló la irradiación láser a 5mW, utilizando un medidor de potencia láser (Laserstar, Ophir, Israel). Se hizo una media de tres grabaciones para cada dato específico.

Obtención de imágenes por fluorescencia

15 **[0136]** Para la obtención de imágenes por fluorescencia se utilizó un sistema de análisis de imágenes espectrales (SpectraCube™ SD 300, Applied Spectral Imaging, Migdal Ha'Emek, Israel). Este sistema combina la obtención de imágenes tradicional con un sistema de espectroscopia transformada de Fourier. En resumen, la luz emitida por un objeto se recopila y se colima por medio de un objetivo óptico. El rayo se dispersa espectralmente, pasando por un interferómetro de Sagnac (triangular) que pasa por un punto común, del cual se obtiene una imagen enfocando las lentes con una matriz CCD 1280x1024 de una cámara digital de alta resolución. Cada píxel de la imagen CCD recoge un interferograma, que después se transforma en el espectroscopio de Fourier para proporcionar el espectro de dicho píxel. Durante la medición, todos los espectros se obtienen simultáneamente y se almacenan en un archivo. La resolución espacial, dependiendo de las lentes del objetivo que se utilizara, era mejor que a 0,1 mm. El rango espectral (más de un 55 de respuesta) es de 400-1000 nm y a 600 nm de resolución espectral es mayor de 5nm.

Ensayos in-vivo

25 **[0137]** Los ensayos de biodistribución se llevan a cabo inyectando primero el conjugado fotoactiva y después siguiendo su biodistribución in-vivo por medio de excitación (ya sea usando una luz coherente o no coherente) y obtención de imágenes con cámara CCD enfriada. Los animales utilizados pueden ser ratas normales (en las que los órganos con objetivo específico SSTR son el páncreas y las glándulas suprarrenales), o ratas o ratones (normales o inmunodeficientes) que tienen un tumor que presenta SST-R. Estos estudios se realizan por medio de cirugía (intraoperativa) o en animales intactos.

35 **[0138]** La PDT in-vivo se realiza a animales con un tumor que presenta SST-R. Se le inyecta el conjugado PDT a los animales y, después del tiempo de espera (predeterminado por el experimento de biodistribución o medido por obtención de imágenes ópticas durante el estudio de PDT), se comienza con la irradiación PDT del tumor. Se consigue un nivel de control de PDT irradiando el tumor para PDT y mediante la obtención de imágenes fluorescentes del tumor para determinar la cantidad de fármaco no fotoblanqueado. El éxito de la PDT viene determinado por la medición de la reducción del tamaño del tumor y la supervivencia de los animales respecto al grupo de control (sin tratamiento, sin luz, sin conjugado).

Modelos in-vivo para la evaluación de la actividad de los análogos de somatostatina

45 **[0139]** Los compuestos con marcador fotoactivo de la presente invención se analizan in-vivo para la captación de tumores en xenoinjertos derivados de líneas celulares como las que siguen:

- a. Células de adenoma de pituitaria de rata (GH3) en ratas atímicas.
- b. Células de adenocarcinoma de colon humano (HT-29) en ratones atímicos o ratas atímicas.
- 50 c. Células de carcinoma pancreático de células acinares de rata (CA20948) en ratas normales.
- d. Células de cáncer de páncreas de rata (AR42J) en ratones atímicos.
- e. Células de carcinoma pulmonar de células pequeñas humano (NCI-H69) en ratones atímicos.
- f. Células de carcinoma pancreático humano (BON-1) en ratones atímicos o ratas atímicas.
- g. Células LCC-18 en ratones atímicos o ratas atímicas.
- 55 h. Línea celular DSL 62-38 en ratas o ratones atímicos o normales.

[0140] En resumen, las células se implantan por vía intramuscular en una suspensión de 0,05 a 0,1 mL/animal, los tumores se dejan crecer hasta 0,5-2 gr, después se recolecta el tumor, y se utiliza para implantar a una segunda serie de animales nunca antes expuestos a él. Este método de inoculación de la enfermedad se repite para producir generaciones sucesivas de animales portadores del tumor. Los animales portadores del tumor de la tercera a la quinta generación reciben una inyección intravenosa del compuesto radiomarcado. Alternativamente, los animales portadores del tumor son aquellos en los que el tumor se desarrolla después de la inyección de células de un cultivo in-vitro. Para el uso in-vivo, son adecuados tumores con una superficie y dimensión de 0,5x0,5 cm.

65 **[0141]** Se llevan a cabo otros modelos in-vivo para la obtención de imágenes de los receptores SST presentes en células tumorales animales por medio de los métodos que se describen en esencia en obras de Achilefu et al. *ibid.* y

Becker et al. Nat. Biotechnol. 19,327-31,2001.

[0142] A continuación se presentan ejemplos de análogos de SST conformacionalmente restringidos sintetizados tanto siguiendo en parte las secuencias de una serie de péptidos biológicamente activos ya conocidos como basándose en secuencias nuevas previamente desconocidas. Los siguientes ejemplos tienen por objetivo ilustrar la forma de elaboración y de uso de los compuestos y métodos descritos en esta invención, y no suponen en absoluto una limitación de esta. La invención se describirá a continuación junto con formaciones específicas de esta.

EJEMPLOS

[0143] A continuación se ilustra la invención por medio de los siguientes ejemplos con carácter no limitativo:

Ejemplo 1 Procedimiento detallado de la síntesis de PTR-1017.

[0144] La resina de amida Rink MBHA (1g, 0,5 mmoles) se hidrata/reconstituye en NMP (4horas) en un reactor de vidrio equipado con un fondo de vidrio fritado. Se extrajo el Fmoc de la resina utilizando 2 tratamientos de piperdina-NMP (1:3, 10 mL), durante 15 minutos cada uno. Tras lavar bien la resina (NMP, 7x, 10mL, 2 minutos), se acopló DDE-Lys(Fmoc)OH (2mmoles) en NMP (10 mL) con PyBrop (2mmoles) y DIEA (4 mmoles), como agentes reactivantes (1 hora, RT). Tras el acoplamiento, la resina modificada se lavó (NMP, 5x, 10mL, 2 minutos). Se comprobó que la reacción se hubiese completado por medio de un test cualitativo de nihidrina (Kaiser). La extracción de Fmoc y los lavados posteriores se llevaron a cabo según lo descrito anteriormente, y a continuación se procedió a un lavado con DCM (3x, 10mL, 2 minutos). Se acopló Fmoc-GlyC3-OH (2,0 mmoles) al nitrógeno Epsilon del residuo de lisina utilizando el mismo método NMP/PyBroP/DIEA descrito anteriormente. Acto seguido, tuvieron lugar adicciones sucesivas de Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-(D)Trp(Boc)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Phe-OH y Fmoc-GABA(Alloc)-O por medio de los ciclos estándar de acoplamiento ya descritos. Tras lavar la peptidil-resina con DCM (3X, 10 mL, 2 minutos), se realizó la desprotección Allyl/Alloc añadiendo Pd(P(Ph)₃)₄ (1 g) en cloroformo - ácido acético - NMM (67:2:1, 10,5 mL, asperjado con argón) al reactor, eliminando los gases con burbujas de argón a través del fondo de vidrio fritado del reactor y después agitando con potencia durante 1,5 horas en la oscuridad. La peptidil-resina cíclica se lavó bien a continuación con DCM y NMP. Se obtuvo el ciclado del esqueleto utilizando HATU (2,6 mmoles) y DIEA (5,2 mmoles) en NMP (10mL) durante una hora. Después de la desprotección DDE (3X, 2% hidrazina en DMF, RT, 3 minutos) y el lavado con DMF y NMP, se añadió la fluoresceína por medio de 5- y 6-carboxilfluoresceína succinimidil éster (isómeros mixtos, 2mmoles) (DIEA, 4 mmol; NMP, 10 mL, RT, 1 hora). Después de lavar (NMP, MeOH, DCM) se secó la resina con aire (30 minutos) primero, y después al vacío (30 minutos). El péptido se separó de la resina (con extracción simultánea del grupo protector tBu) bajo argón usando primero TFA-TIS-agua (+38:1:1, 12 mL) a 0°C (15 minutos) y después a temperatura ambiente (75 minutos). La solución se filtró a través de un tubo de polipropileno y la resina se lavó en un tubo con una mezcla de división y TFA. La concentración bajo una corriente de N₂ produjo un residuo oleoso (0,631 g) que se trituró hasta solidificar con Et₂O frío. El secado en vacío produjo un resultado de 52 mg de péptido crudo. La fase inversa, el HPLC preparativo produjo 6,4 mg (4,0 mmoles) de PTR 1017A de un 98% de pureza (rendimiento de 0,8% de la resina).

Ejemplo 2: Enlace de los análogos fotoactivos a los receptores de somatostatina.

[0145] La habilidad in-vitro de los análogos SST de la invención para unirse a receptores SST se demostró por medio de ensayos de la habilidad de dichos análogos para inhibir la unión de análogos SST radiomarcados a membranas celulares con receptores SST, como ya se ha descrito anteriormente. Los preparados de receptores membrana que se utilizaron para estos tests era de receptores humanos clonados que presentaban de forma selectiva y estable células OHC, y el análogo radiomarcado que se utilizó fue (3-[¹²⁵I]tirosil11)SRIF-14. La Tabla 2, véase más arriba, describe los resultados de los ensayos de enlace lo análogos seleccionados con los clones de ST-R2 humano.

[0146] Los datos presentados para estos compuestos muestran que los péptidos de la invención presentan una alta afinidad de enlace con receptores SST, como se puede observar en los valores IC₅₀ en dicha tabla.

Ejemplo 3: Análogos de péptidos de esqueleto cíclico con marcador fotoactivo PTR 3173

[0147] El compuesto con estructura GABA*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-PheGlyC3*-NH₂ que presentó PTR 3173 es un análogo de la somatostatina de esqueleto ciclado con 6,355,613 y WO 99/65508. PTR 3173 fue escogido como compuesto predominante debido a sus propiedades químicas y farmacológicas. Además de la afinidad al subtipo 2 de hSST-R, que permitiría la detección de la mayor parte de tumores neuroendocrinos, este compuesto podría producir conjugados para la detección y la terapia de tumores derivados de la pituitaria (que presentan mayoritariamente hSST-R5). El péptido central es fácil de sintetizar, y el derivativo de un azúcar, PTR-3229, conserva la potencia de su péptido padre, lo que sugiere que este podría ser un buen sitio para conjugar las fracciones fotoactivas.

[0148] Se diseñaron, sintetizaron y analizaron varios análogos con marcador fotoactivos en base a la estructura PTR 3173 para comprobar su unión a hSST-R2. Los compuestos sintetizados se realizaron siguiendo la fórmula:

Z-Lys(GABA-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyC3)-NH₂

Formula N° 2

5 [0149] Preferiblemente, la fracción fotoactiva Z está formada mediante la conexión del carboxi terminal del péptido análogo con una fracción seleccionada del grupo que consiste en fluoresceína-5-isotiocianato, en el que, preferiblemente, el carbono del grupo isotiocianato estará conectado a nitrógeno alfa Lys por medio de un enlace tiourea; 5- Y 6-carboxilfluoresceína succinimidil éster (isómeros mixtos) en los que el grupo carboxi estará conectado al nitrógeno alfa Lys por medio de un enlace amida.

10 [0150] Se descubrió que algunos de los análogos fotoactivos (PTR-1013A - PTR-1017A) presentaban una gran afinidad con hSST-R2, tal y como se expone en la Tabla 2.

Ejemplo 4: Síntesis de 96 compuestos en formato MPS

15 [0151] Se sintetizó una placa MPS de 96 pocillos (YS-PDT-1) que contenía 96 péptidos con marcador fotoactivo basados en cuatro estructuras básicas:

20 DPhe-Cys*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2*-NH₂ indica PTR 3207;
 GlyS2*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2*-NH₂ indica PTR 3213;
 DPhe-GlyS2*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2*-NH₂ indica PTR 3219;
 GABA*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyC3*-NH₂ indica PTR 3173.

El asterisco señala que el grupo de enlace está conectado entre el derivativo N α - ω -funcionalizado del residuo marcado y el grupo funcional libre de dicho residuo o el segundo residuo derivativo N α - ω -funcionalizado.

25 [0152] Los componentes, su síntesis y su actividad se encuentran descritos en 6,355,613 y WO 99/65508. Los elementos de unión/espaciadores se utilizaron para entender la relación estructura-actividad de la distancia entre la fracción fotoactiva, a menudo bastante voluminosa (y a veces con carga, sobre todo cuando funciona como complejo metálico), y el farmacóforo.

30 [0153] Los compuestos sintetizados en la placa YS-1 están representados por la siguiente estructura genérica: (Fracción fotoactiva)-(Elemento de unión/Espaciador)-(PTR-XXXX), tal y como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Placa YS-PDT-1 MPS de análogos de esqueleto ciclado con marcador fotoactivo.

	Reactivo fluoróforo	Elemento de unión	Centro PTR
1	5-(hidroximetilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina	Gly	NH-3173
2	5-(4-carboxifenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina	Gly	NH-3173
3	5-(4-aminometilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina	Gly	NH-3173
4	5-(4-hidroximetilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-de cloro #	Gly	NH-3173
5	fluoresceína-5-isotiocianato	Gly	NH-3173
6	Lisamina(TM) rodamina B sulfonilo cloruro #	Gly	NH-3173
7	5- y 6-carboxilfluoresceína éster succinimidil #	Gly	NH-3173
8	5-(hidroximetilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina	β Ala	NH-3173
9	5-(4-carboxifenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina	β Ala	NH-3173
10	5-(4-aminometilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina	β Ala	NH-3173
11	5-(4-hidroximetilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-de cloro #	β Ala	NH-3173
12	2,3,7,8,12,13,17,18-octametil-5-(4-hidroximetilfenilo)-21,23H-porfirina	β Ala	NH-3173
13	fluoresceína-5-isotiocianato	β Ala	NH-3173
14	Lisamina(TM) rodamina B sulfonilo cloruro #	β Ala	NH-3173
15	5- y 6-carboxilfluoresceína succinimidil éster #	β Ala	NH-3173
16	5-(hidroximetilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina	GABA	NH-3173
17	5-(4-carboxifenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina	GABA	NH-3173
18	5-(4-aminometilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina	GABA	NH-3173
19	5-(4-hidroximetilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-de cloro #	GABA	NH-3173
20	fluoresceína-5-isotiocianato	GABA	NH-3173
21	Lisamina(TM) rodamina B sulfonilo cloruro #	GABA	NH-3173
22	5- y 6-carboxilfluoresceína succinimidil éster #	GABA	NH-3173

23	5-(hidroximetilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina	amino pentanoico	NH-3173
24	5-(4-carboxifenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina	amino pentanoico	NH-3173
25	5-(4-aminometilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina	amino pentanoico	NH-3173
26	5-(4-hidroximetilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-de cloro #	amino pentanoico	NH-3173
27	fluoresceína-5-isotiocianato	amino pentanoico	NH-3173
28	Lisamina(TM) rodamina B sulfonilo cloruro #	amino pentanoico	NH-3173
29	5- y 6-carboxilfluoresceína succinimidil éster #	amino pentanoico	NH-3173
30	5-(hidroximetilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina	amino hexanoico	NH-3173
31	5-(4-carboxifenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina	amino hexanoico	NH-3173
32	5-(4-aminometilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina	amino hexanoico	NH-3173
33	5-(4-hidroximetilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-de cloro #	amino hexanoico	NH-3173
34	fluoresceína-5-isotiocianato	amino hexanoico	NH-3173
35	Lisamina(TM) rodamina B sulfonilo cloruro #	amino hexanoico	NH-3173
36	5- y 6-carboxilfluoresceína succinimidil éster #	amino hexanoico	NH-3173
37	5-(hidroximetilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina	Gly	NH-3173
38	fluoresceína-5-isotiocianato	Gly	3213
39	Lisamina(TM) rodamina B sulfonilo cloruro #	Gly	3213
40	5- y 6-carboxilfluoresceína succinimidil éster #	Gly	3213
41	5-(hidroximetilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina	βAla	3213
42	fluoresceína-5-isotiocianato	βAla	3213
43	Lisamina(TM) rodamina B sulfonilo cloruro #	βAla	3213
44	5- y 6-carboxilfluoresceína succinimidil éster #	βAla	3213
45	5-(hidroximetilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina	GABA	3213
46	fluoresceína-5-isotiocianato	GABA	3213
47	Lisamina(TM) rodamina B sulfonilo cloruro #	GABA	3213
48	5- y 6-carboxilfluoresceína succinimidil éster #	GABA	3213
49	5-(hidroximetilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina	amino pentanoico	3213
50	fluoresceína-5-isotiocianato	amino pentanoico	3213
51	Lisamina(TM) rodamina B sulfonilo cloruro #	amino pentanoico	3213
52	5- y 6-carboxilfluoresceína succinimidil éster #	amino pentanoico	3213
53	5-(hidroximetilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina	amino hexanoico	3213
54	fluoresceína-5-isotiocianato	amino hexanoico	3213
55	Lisamina(TM) rodamina B sulfonilo cloruro #	amino hexanoico	3213
56	5- y 6-carboxilfluoresceína succinimidil éster #	amino hexanoico	3213
57	5-(hidroximetilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina	Gly	3219
58	fluoresceína-5-isotiocianato	Gly	3219
59	Lisamina(TM) rodamina B sulfonilo cloruro #	Gly	3219
60	5- y 6-carboxilfluoresceína succinimidil éster #	Gly	3219
61	5-(hidroximetilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina	βAla	3219
62	fluoresceína-5-isotiocianato	βAla	3219
63	Lisamina(TM) rodamina B sulfonilo cloruro #	βAla	3219
64	5- y 6-carboxilfluoresceína succinimidilo éster #	βAla	3219
65	5-(hidroximetilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina	GABA	3219
66	fluoresceína-5-isotiocianato	GABA	3219
67	Lisamina(TM) rodamina B sulfonilo cloruro #	GABA	3219
68	5- y 6-carboxilfluoresceína succinimidil éster #	GABA	3219
69	5-(hidroximetilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina	amino pentanoico	3219
70	fluoresceína-5-isotiocianato	amino pentanoico	3219
71	Lisamina(TM) rodamina B sulfonilo cloruro #	amino pentanoico	3219

72	5- y 6-carboxilfluoresceína succinimidil éster #	amino pentanoico	3219
73	5-(hidroximetilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina	amino hexanoico	3219
74	fluoresceína-5-isotiocianato	amino hexanoico	3219
75	Lisamina(TM) rodamina B sulfonilo cloruro #	amino hexanoico	3219
76	5- y 6-carboxilfluoresceína succinimidil éster #	amino hexanoico	3207
77	5-(hidroximetilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina	Gly	3207
78	fluoresceína-5-isotiocianato	Gly	3207
79	Lisamina(TM) rodamina B sulfonilo cloruro #	Gly	3207
80	5- y 6-carboxilfluoresceína succinimidil éster #	Gly	3207
81	5-(hidroximetilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina	βAla	3207
82	fluoresceína-5-isotiocianato	βAla	3207
83	Lisamina(TM) rodamina B sulfonilo cloruro #	βAla	3207
84	5- y 6-carboxilfluoresceína succinimidil éster #	βAla	3207
85	5-(hidroximetilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina	GABA	3207
86	fluoresceína-5-isotiocianato	GABA	3207
87	Lisamina(TM) rodamina B sulfonilo cloruro #	GABA	3207
88	5- y 6-carboxilfluoresceína succinimidil éster #	GABA	3207
89	5-(hidroximetilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina	amino pentanoico	3207
90	fluoresceína-5-isotiocianato	amino pentanoico	3207
91	Lisamina(TM) rodamina B sulfonilo cloruro #	amino pentanoico	3207
92	5- y 6-carboxilfluoresceína succinimidil éster #	amino pentanoico	3207
93	5-(hidroximetilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina	amino hexanoico	3207
94	fluoresceína-5-isotiocianato	amino hexanoico	3207
95	Lisamina(TM) rodamina B sulfonilo cloruro #	amino hexanoico	3207
96	5- y 6-carboxilfluoresceína succinimidil éster #	amino hexanoico	3207
# isómeros mixtos			

5

[0154] Estos compuestos han sido analizados a una concentración de 10nM, con un desplazamiento SRIF-14 en células que presentaban hSST-R2. Los compuestos con enlaces significativos en la concentración de la prueba, se seleccionaron para una siguiente fase de evaluación. Se tomaron medidas precisas de IC. La tabla 4 resume el análisis de los resultados de los compuestos más activos, basándose en el centro PTR, el elemento de unión y el enlace.

[0155] La Figura 1 describe las curvas de inhibición de enlace de los primeros 6 análogos de la Tabla 4, que presentan valores IC50 por debajo de los 6nM, en las pruebas realizadas en células CHO clonadas con presencia de hSST-R2.

Análogo	87	70	62	64	48	68	54	52	76	58	44	29
IC50, nM	1,7	2,9	3,0	3,9	5,4	5,7	48	9,0	13,0	18,0	19,0	32
PTR	3207	3219	3219	3219	3213	3219	3213	3213	3219	3219	3213	3173-NH2
Elemento de unión	GABA	amino pentanoico	βAla	βAla	GABA	GABA	(ninguno)	amino pentanoico	amino hexanoico	Gly	βAla	amino pentanoico
Enlace*	tiourea	tiourea	tiourea	amida	amida	Amida	tiourea	amida	amida	tiourea	amida	amida
Fluoróforo							fluoresceína					

*Chemical bond connecting the fluorophore to the linker

Ejemplo 5: Síntesis de compuestos adicionales en formato MPS

[0156] Más compuestos con marcador fotoactiva se sintetizan con formato MPS de 96 pocillos. En la Tabla 5 se describen las estructuras de los compuestos (placa YS-PDT-2 MPS), basadas en la secuencia descrita en el ejemplo 4.

Tabla 5. Placa YS-PDT-2 MPS

	Fluoróforo / compuesto PDT	Elemento de unión	PTR
11	5-(4-carboxilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina	β Ala	3207
12	5-(4-hidroximetilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-de cloro #	β Ala	3207
14	5-(4-carboxilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina	GABA	3207
15	5-(4-hidroximetilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-de cloro #	GABA	3207
17	5-(4-carboxilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina	amino pentanoico	3207
18	5-(4-hidroximetilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-de cloro #	amino pentanoico	3207
20	5-(4-carboxilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina	β Ala	3219
21	5-(4-hidroximetilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-de cloro #	β Ala	3219
23	5-(4-carboxilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina	GABA	3219
24	5-(4-hidroximetilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-de cloro #	GABA	3219
26	5-(4-carboxilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina	amino pentanoico	3219
27	5-(4-hidroximetilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-de cloro #	amino pentanoico	3219
29	5-(hidroximetilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina	GABA	3213-NH2
30	5-(hidroximetilfenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina	amino pentanoico	3213-NH2
# isómeros mixtos			

Ejemplo 6: Control in-vivo y ex vivo de la biodistribución en compuestos fluorescentes con objetivo específico SSTR.

[0157] Los seis compuestos más potentes de la Tabla 4 (números 62, 64, 68, 70, 86 y 48), fueron sometidos a pruebas in-vivo y ex-vivo para analizar su biodistribución en diferentes tejidos de ratones portadores cáncer de pulmón humano H69 implantado subcutáneamente.

Modelo de tumor

[0158] Xenoinjertos por inoculación subcutánea de cáncer de pulmón de células pequeñas de línea celular H69 en ratones atímicos Balb/c.

Procedimientos del experimento

[0159] Se disolvió cien ml de cada agente (1mM) en 0,5 ml de solución salina, y se inyectó por vía intravenosa a los sujetos. Como grupo de control, se inyectó fluoresceína a uno de los ratones.

[0160] Se llevaron a cabo mediciones de fluorescencia:

1. In-vivo durante 24 tras la administración del agente utilizando mediciones por punción (en un área de ~1mm²) utilizando un sistema de espectroscopia por fibra óptica (FOS).
2. Ex-vivo 24 horas después de la inyección por medio de FOS.
3. Ex vivo 24 horas después de la inyección por medio de un sistema de imagen spectral SD300.

Resultados:

[0161] La Table 6 describe los resultados ex-vivo de la fluorescencia en diferentes tejidos, 24 después de la administración, medición realizada por medio de FOS.

5

Tabla 6

Tejido	Intensidad de luz fluorescente (a.u.)				Compuesto N°	
	62	64	68	70	86	48
Tumor	106±16	110±17	97±18	122±18	626±55	50±20
Piel	120±18	120±18	77±14	116±17	65±13	90±20
Hígado	17±3	12±2	35±6	5±1	13±3	10±5
Riñón	32±5	20±3	11±2	18±3	23±5	15±6
Bazo	4±1	4±1	2±0.4	2±0.3	7±1.4	7±2
Pulmón	37±6	40±6	35±6	27±4	70±14	25±8
Páncreas	-	-	-	10±2	22±6	16±5

[0162] Como se puede observar en la Tabla 7 y la Figura 2, las moléculas con objetivo específico SSTR se acumularon principalmente en el tumor y en la piel. El compuesto número 886 obtuvo la mayor afinidad con la SSTR-2, tal y como se muestra en la Tabla 4. Este compuesto demuestra además una especificidad particularmente alta con el tumor en el análisis in-vivo.

10

[0163] En las Figuras 3 y 4 presentamos imágenes espectrales ex-vivo de los compuestos fluorescentes con objetivo específico SSTR medidos 24 después de la inyección intravenosa. Al inyectar el compuesto número 62 (Figura 3), no se aprecia ninguna fluorescencia (pulmones y riñón), o se aprecia poca fluorescencia (dermis) en los órganos normales, mientras que el tumor presenta una fluorescencia alta y selectiva. El compuesto número 86 (Figura 4) presenta de nuevo una fluorescencia alta y selectiva en el tumor, mientras que no presenta fluorescencia alguna en los órganos normales (pulmón, riñón, dermis, hígado, páncreas y bazo).

15

20 LISTA DE SECUENCIAS

<110> Peptor Ltd.

<120> ANÁLOGOS DE LA SOMATOSTATINA DE ESQUELETO CICLADO FOTOACTIVOS PARA LA TERAPIA Y LA OBTENCIÓN DE IMÁGENES

25 <130> PTR/025/PCT

<150> IL 148921

<151> 2002-03-26

<160> 5

<170> PatentIn version 3.1

30 <210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Péptido sintético

<220>

35 <221> Aminoácido N acilado

<222> (9)..(9)

<223>

<220>

<221> MOD_RES

40 <222> (9)..(9)

<223> AMIDACIÓN

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

	<223> D isómero
	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (5)..(5)
5	<223> D isómero
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (2)..(9)
10	<223> ciclado esqueleto-cadenal lateral entre residuos2 y 9
	<400> 1
	<210> 2
	<211> 8
	<212> PRT
	<213> Péptido Sintético
15	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (1) .. (8)
	<223> ciclado esqueleto-esqueleto entre residuos 1 y 8
	<220>
20	<221> MOD_RES
	<222> (1)..(1)
	<223> ACETILACIÓN - Aminoácido N acilado
	<220>
	<221> MOD_RES
25	<222> (8)..(8)
	<223> ACETILACIÓN - Aminoácido N acilado
	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (8)..(8)
30	<223> AMIDACIÓN
	<400> 2
	<210> 3
	<211> 9
	<212> PRT
35	<213> Péptido Sintético
	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (1)..(1)
	<223> D isómero
40	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (2)..(9)
	<223> ciclado esqueleto-esqueleto entre residuos 2 y 9
	<220>
45	<221> MOD_RES
	<222> (5)..(5)
	<223> D isómero
	<220>
	<221> MOD_RES
50	<222> (2)..(2)
	<223> ACETILACIÓN - Aminoácido N acilado
	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (8)..(8)
55	<223> ACETILACIÓN - Aminoácido N acilado
	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (8) .. (8)
	<223> AMIDACIÓN
60	<400> 3
	<210> 4
	<211> 8
	<212> PRT
	<213> Péptido Sintético
65	<220>

- <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (1)
 <223> X se selecciona del ácido amino hexanoico, el ácido amino pentanoico, GABA, beta-Ala y Gly
 <220>
- 5 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (8)
 <223> ciclado de esqueleto N-terminal entre residuos 1 y 8
 <220>
- 10 <221> MOD_RES
 <222> (4) .. (4)
 <223> D isómero
 <220>
- <221> MOD_RES
 <222> (8) .. (8)
- 15 <223> ACETILACIÓN - Aminoácido N acilado
 <220>
- <221> MOD_RES
 <222> (8) .. (8)
 <223> AMIDACIÓN
- 20 <400> 4
 <210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Péptido Sintético
- 25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> X = GABA
 <220>
- 30 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(9)
 <223> ciclado de esqueleto N-terminal entre residuos 2 y 9
 <220>
- <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> D Isómero
 <220>
- <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
- 40 <223> AMIDACIÓN
 <220>
- <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> ACETILACIÓN - Aminoácido N acilado
- 45 <400> 5

REIVINDICACIONES

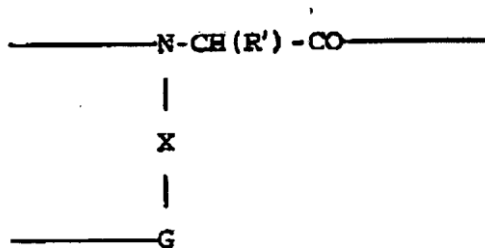
1. Un análogo de somatostatina de esqueleto ciclado de la Fórmula general N° 1

5 Z-Q-PTR Formula N° 1

En el que Q se selecciona de un grupo que consiste en un enlace directo, ácido amino hexanoico, ácido amino pentanoico, β Ala, GABA y Gly; en la que Q puede estar conectada a un grupo funcional libre del péptido, Z es una fracción fotoactiva seleccionada del grupo formado por 5-(4((oxocarbonilo)metil)fenilo) 10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina; 5-(4-carboxifenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina; 5-(4((aminocarbonilo)metil)fenilo)-10,15,20-trifenilo-21,23H-porfirina; 5-(4((oxocarbonilo)metil)fenilo) 10,15,20 trifenilo-21,23H-de cloro(isómeros mixtos); 5-(aminotionilo)fluoresceína; 4-sulfonilo-2-sulfurodamina B; 2-sulfonilo-4-sulfurodaminaB (isómeros mixtos); and 5-and 6-carboxifluoresceína (isómeros mixtos); y el análogo de somatostatina PTR se selecciona de un grupo formado por:

15 DPhe-Cys*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-Gly(S2)*-NH2 con PTR 3207;
GlyS2*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-Gly(S2)*-NH2 con PTR 3213;
DPhe-GlyS2*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-Gly(S2)*-NH2 con PTR 3219; y
GABA*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-Gly(C3)*-NH2 con PTR 3173

20 y
Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-Gly(C3)-NH2; y
en el que los asteriscos señalan los puntos de ciclado, y en el que Gly(C3) y Gly(S2) describen un residuo de glicina Na- ω -funcionalizado que responde a la Fórmula N° 3:



Formula No. 3

en la que

25 R' es H;
X designa un espaciador de 3 grupos de metileno en Gly(C3) y dos grupos de metileno en Gly(S2);
G es un grupo carboxi en Gly(C3) y un grupo tiol en Gly (S2).

2. Un análogo de somatostatina de esqueleto ciclado de la Fórmula general N° 2

30 Z-Lys(GABA-Phe- Trp-DTrp-Lys- Thr-Phe-Gly(C3))-NH2 Formula N° 2

En la que Z es una fracción fotoactiva conectada al nitrógeno alfa de la Lisina C-terminal, y el péptido entre paréntesis está conectado a la Lisina Epsilon amina y ciclado por medio de un enlace amida formado entre un nitrógeno GABA terminal y la unidad estructural Gly(C3) ω -carboxilato, y en la que Gly(C3) describe un residuo de glicina modificado con un grupo carboxilo reactivo y un espaciador de tres carbono metilenos.

3. El análogo de somatostatina de la reivindicación 2 en el que la fracción fotoactiva Z es un derivado de fluoresceína que está conectado al nitrógeno alfa de la Lisina C-terminal por medio de un enlace seleccionado de la tiourea o un enlace amida.

4. El análogo de somatostatina de la reivindicación 1, en el que el análogo de somatostatina de esqueleto ciclado se selecciona del grupo formado por
H-Lys(GABA*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-Gly(C3)*)-NH2;

45 5- and 6-carboxifluorescein-Lys(GABA*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-Gly(C3)*)-NH2;
5-(aminotionilo)fluoresceína-GABA-DPhe-Cys*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-Gly(S2)*-NH2;
5-(aminotionilo)fluoresceína-aminopentanoyl-DPhe-Gly(S2)*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-Gly(S2)*-NH2;
5-(aminotionilo)fluoresceína- β Ala-DPhe-Gly(S2)*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-Gly(S2)*-NH2;
5- and 6-carboxifluoresceína- β Ala-DPhe-Gly(S2)*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-Gly(S2)*-NH2;

50 5- and 6-carboxifluoresceína-GABA-Gly(S2)*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-Gly(S2)*-NH2; and
5- and 6-carboxifluoresceína-GABA-DPhe-Gly(S2)*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe- Gly(S2)*NH2; y en el que los asteriscos señalan los puntos de ciclado.

5. Un compuesto farmacológico que contiene un análogo de somatostatina de esqueleto ciclado correspondiente a cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

6. El uso de un análogo de somatostatina de esqueleto ciclado correspondiente a cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para la elaboración de un compuesto farmacológico destinado al tratamiento de una enfermedad que se clasifique dentro de los grupos cáncer, rechazo de aloinjertos, enfermedades endocrinas, enfermedades inflamatorias, tumores gastrointestinales y pancreatitis.
- 5
7. El uso de un análogo de somatostatina de esqueleto ciclado correspondiente a cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para la elaboración de un compuesto farmacológico destinado al diagnóstico de una enfermedad que se clasifique dentro de los grupos cáncer o rechazo de aloinjertos.
- 10
8. El uso descrito en la reivindicación 6, en el que el cáncer es cáncer de pulmón o carcinoma de pulmón de las células pequeñas.

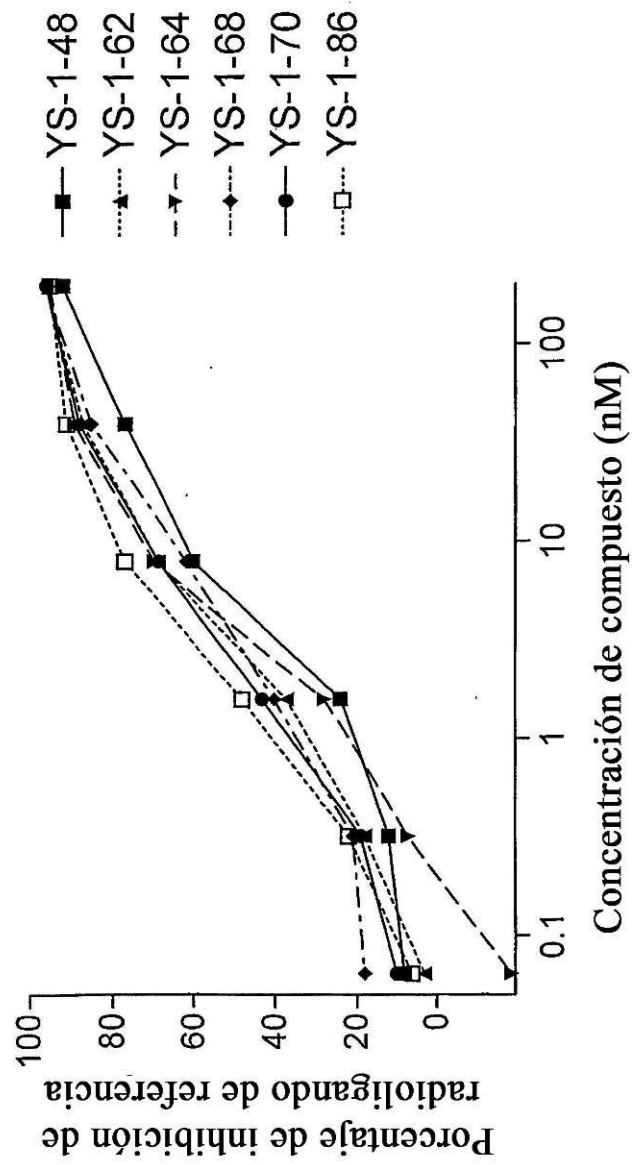
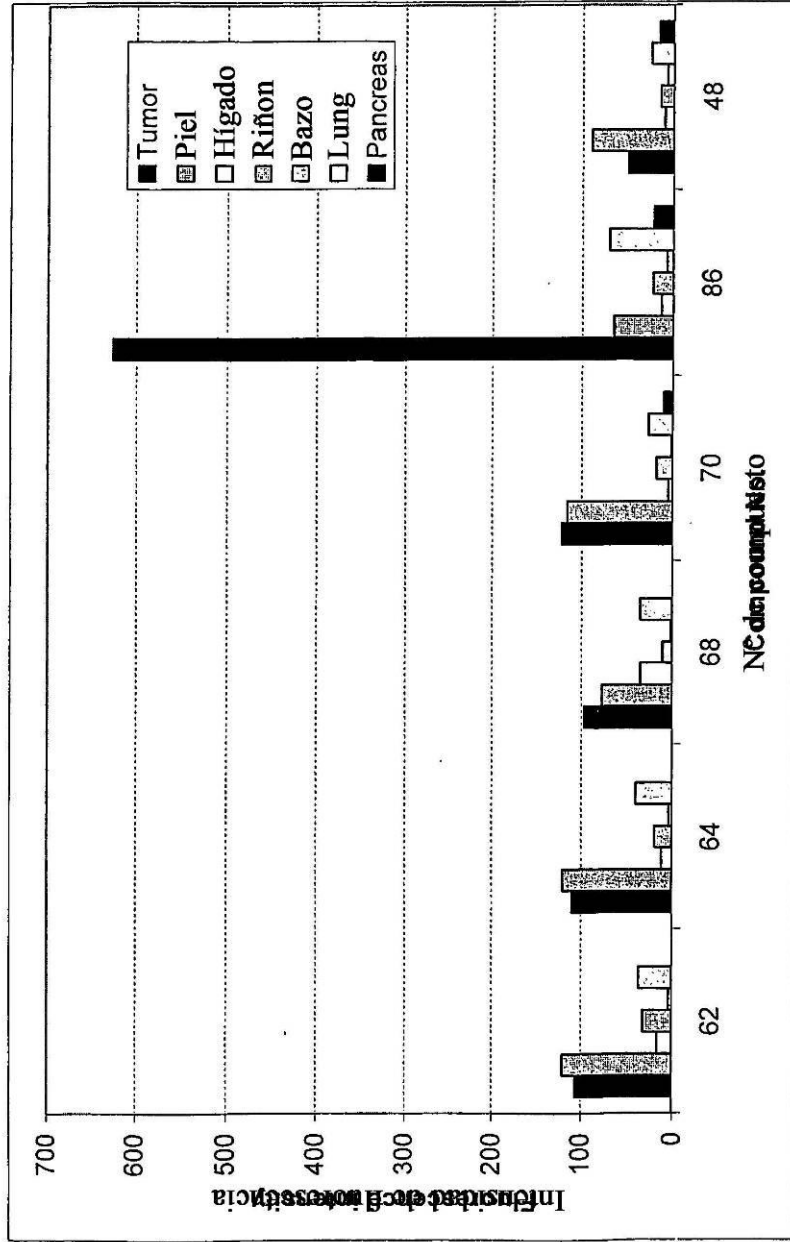


Figura 1

Figura 2



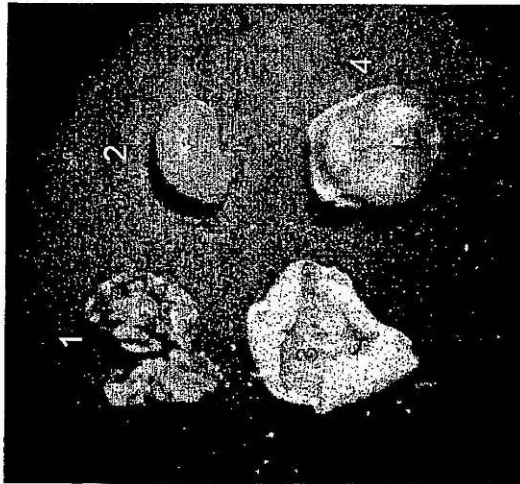
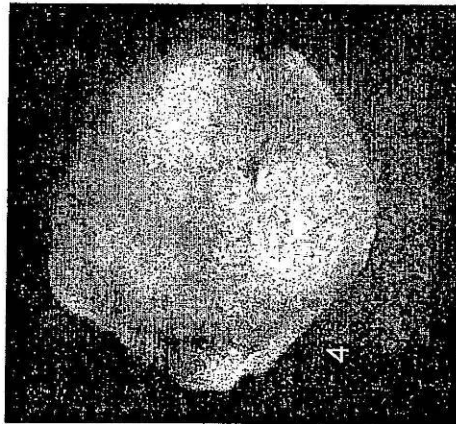


Figura 3

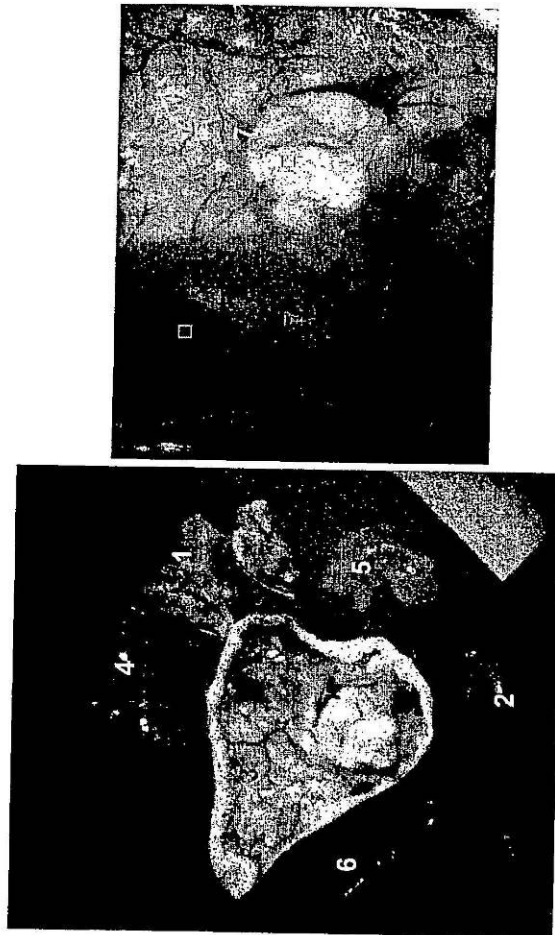


Figura 4