(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 495 992**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)
C07K 14/655 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2007** **E 11194516 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.06.2014** **EP 2433963**

(54) Título: **Receptor (SSTR2) antagonistas de somatostatina selectivos**

(30) Prioridad:

16.10.2006 US 82963706 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.09.2014

(73) Titular/es:

THE SALK INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STUDIES (33.3%)
10010 North Torrey Pines Road
La Jolla, CA 92037, US;
UNIVERSITÄT BERN (33.3%) y
UNIVERSITY HOSPITAL BASEL (33.3%)

(72) Inventor/es:

RIVIER, JEAN E.F.;
ERCHEGYI, JUDIT;
REUBI, JEAN CLAUDE y
MAECKE, HELMUT R.

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 495 992 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).

Receptor (SSTR2) antagonistas de somatostatina selectivos

Descripción

[0001] Este invento trata sobre péptidos relacionados con la somatostatina y métodos de tratamiento farmacéutico de mamíferos usando tales péptidos. En concreto, el invento trata de receptores selectivos acortados de somatostatina antagonista de péptidos y la inclusión de substitución y/o adición de aminoácidos en dichos péptidos que les confieren selectividad del receptor, a compuestos farmacéuticos que contienen dichos péptidos, a esos péptidos combinados o conjugados con núcleos radioactivos, con métodos de diagnosis y tratamientos terapéuticos de enfermedades neoplásticas o no neoplásticas en mamíferos con el uso de dichos péptidos, especialmente péptidos unidos a quelatos o marcados de otra forma, y también a métodos de análisis para medicamentos más eficaces utilizando dichos péptidos.

ANTECEDENTES DEL INVENTO

[0002] El tetradecapéptido cíclico somatostatina-14(SRIF) fue aislado originariamente del hipotálamo y descrita como una hormona fisiológica inhibidora del crecimiento (GH) segregada desde la pituitaria anterior. Fue caracterizada por Guillemin et al. y descrita en la Patente de los EEUU No. 3.904.594. Este tetradecapéptido tiene un puente o vínculo ciclado entre los grupos sulfhídricos de los dos residuos de aminoácidos cisteinil en las posiciones 3 y 14. SRIF afecta a multitud de procesos celulares y también se conoce su carácter inhibidor en el crecimiento de ciertos tumores. El análogo [D-Trp8]-SRIF, con la secuencia de aminoácidos: (ciclo 3-14)H-Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys-OH, fue divulgada en la Patente de los EEUU No. 4.372.884 y se asegura que su potencia es varias veces mayor para la inhibición de la secreción de GH que la SRIF.

[0003] SRIF induce sus efectos biológicos interactuando con una familia de receptores vinculados con la membrana estructuralmente similares. Cinco receptores SRIF se han clonado y se los conoce como SSTR1-5. Todos estos cinco receptores se unen a SRIF y a SRIF-28 con gran afinidad. Agonistas selectivos con SSTR2 y SSTR5 se han identificado y usado para revelar distintas funciones de estos receptores. Se cree que estos dos receptores son subtipos predominantes en tejido periférico. Se considera que la SSTR2 actúa como mediadora en la inhibición de la hormona del crecimiento, glucagón y la secreción de ácido gástrico. La Patente de los EEUU No. 5.846.934 describe análogos que se cree tienen alguna particularidad para la SSTR2. Octreotide, un agonista, muestra alguna particularidad para la SSTR2 (ver Yang et al., 1998, PNAS USA 95: 10836). Por el contrario, SSTR5 parece ser el principal responsable en el control de la secreción de insulina y amilasa. La publicación internacional No. WO 97/11962 describe análogos que han sido identificados con comportamientos particulares con la SSTR5. SSTR3 media en la inhibición de la correcta contracción de los músculos gástricos. La Patente de los EEUU No. 6.579.967 revela análogos a la somatostatina específicos de la SSTR3. SSTR4 se encuentra en la pituitaria, pulmones, conducto gastrointestinal, riñones, y en ciertos tumores con la substancial exclusión de otros receptores SRIF; se cree que se activa una vez unido a SRIF. La patente U.S. No. 2002/0137676 desarrolla métodos para el tratamiento de células endoteliales usando ligantes receptores selectivos de somatostatina que son específicos a ambos la SSTR1 o la SSTR4. La Patente de los EEUU Nos. 5.750.499 y 7.019.109 revela péptidos análogos a la somatostatina que son selectivos para la SSTR1. La patente publicada con el U.S. Patent Application (Número de Solicitud de Patente) No. 2005/0245438 revela péptidos receptores selectivos de somatostatina análogos que son específicos a la SSTR4. Estos descubrimientos indican que diferentes subtipos de receptores median en distintas funciones para la SRIF en el cuerpo.

[0004] Se encuentran receptores de somatostatina en estados patológicos, más concretamente en tumores neuroendocrinos de los conductos gastrointestinales. La mayoría de los tumores humanos derivados de los tejidos diana de la somatostatina han conservado sus receptores de somatostatina. Se detectó por primera vez en adenomas productoras de hormonas del crecimiento y adenomas productoras de TSH; alrededor de la mitad de las adenomas inactivas muestran receptores de somatostatina. Un noventa por ciento de los carcinoides y la mayoría de carcinomas de células de los islotes, incluidos sus metástasis, generalmente presentan una alta densidad de receptores de somatostatina. Sin embargo, solamente un diez por ciento de los carcinomas colaterales y ninguno de los carcinomas de páncreas exocrinos contienen receptores de somatostatina. Los receptores de somatostatina en tumores pueden identificarse usando métodos in vitro o usando técnicas de imagen in vivo; estas últimas permiten una localización precisa de los tumores y sus metástasis en pacientes. Debido a que los receptores de somatostatina en tumores gastroenteropancreáticos son funcionales, su identificación puede usarse para valorar la eficacia terapéutica de un análogo para inhibir la secreción excesiva de hormonas en los pacientes.

[0005] WO 98/24807 relaciona los antagonistas de la somatostatina con la existencia de aminoácidos D en el segundo residuo. Revela un número de antagonistas de somatostatina cíclicos tales como H2-Phe-D-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-b-Nal-NH2 y revela que los antagonistas de la somatostatina pueden actuar a través de los receptores subtipo SSTR-2.

[0006] WO 02/32932 describe polipéptidos cíclicos que tienen actividad de antagonista U-II y agonista. Revela el compuesto Cpa-cyclo[D-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Nal como antagonista de urotensina.

[0007] Ginj MIHAELA et al- ("Los receptores antagonistas radiomarcados de somastotina son preferibles a los agonistas para la detección in vivo de tumores con receptores péptidos", Procedimientos de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos, vol. 103, no.44, octubre de 2006, páginas 16436-16441) revela el antagonista específico del SSTR2: 111 In-DOTA-NO2-Phe-D-Cys-Tyr-D.Trp.Lys-Thr-Cys-D-Tyr-NH2.

[0008] Sería valioso tener los antagonistas péptidos de la somatostatina que se unen fuertemente al SSTR2, mientras al mismo tiempo muestran una mínima propensión a su unión a los otros 4 receptores. Así, no ha dejado de buscarse esos antagonistas péptidos de la somatostatina que son altamente selectivos para la SSTR2 pero no se integran en las células.

RESUMEN DEL INVENTO

[0009] Se han descubierto ciertas modificaciones que son eficaces en la creación de péptidos análogos de la SRIF que son selectivos con SSTR2 en contraste con otros receptores SRIF clonados. Se ha descubierto una clase de péptidos análogos a la somatostatina que son altamente selectivos a SSTR2, que son antagonistas a la somatostatina, y que, aún sin ser integrados en las células que tienen receptores SSTR2, se recogen en cantidades que son sorprendentemente mayores a las comparables con los péptidos agonistas receptores selectivos de somatostatina. Los péptidos resultantes se unen selectivamente a las SSTR2 clonadas sin activar los receptores, y estos péptidos análogos, cuando son yodados o radiomarcados, mantendrán sus propiedades biológicas deseables. Así, estos nuevos péptidos son adecuados determinando la localización del tejido y la expresión celular del receptor SSTR2, así como en la regulación de ciertas funciones farmacológicas sin efectos secundarios que hasta el momento caracterizan la administración de SRIF. Estos antagonistas péptidos SRIF, cuando son radiomarcados, pueden usarse en gammagrafías para la localización de tumores que muestran estos receptores, bien *in vitro* o en vivo, utilizando SPECT o PET; otros marcados también conocidos en este artículo, ej marcados fluorescentes, pueden ser usados alternativamente. Cuando incluyen un radionúclido adecuadamente quelatado como ha sido mostrado en este artículo, estos análogos pueden servir como radiofármaco que son adecuados para terapias de radionúclidos en el tratamiento de dichos tumores.

[0010] El antagonista péptido SRIF de este invento inhibe la unión de 125I-[Tyr11]SRIF y 125I-[Leu8,D-Trp22,Tyr25]SRIF-28 al receptor clonado humano SSTR2, pero no une fuertemente a SSTR1, SSTR3, SSTR4 o SSTR5. Así, antagonistas no marcados pueden ser administrados para el bloqueo terapéutico de las funciones de este receptor. Estos SRIF antagonistas, entre los cuales 99mTc, 111In, 68Ga o 90Y, por ejemplo, han sido emparejados por un quelato, como DOTA o DTPA (o a los cuales otro agente complejo/conjugado es asociado a la terminación N- con el propósito de adjuntar fracciones beneficiosas para propósitos de diagnosis o terapia), no se unen significativamente a SSTR1, 3, 4 o 5 pero continúan asociándose poderosa y saturablemente a SSTR2.

[0011] Los antagonistas SRIF deseables no solo se unen selectivamente a SSTR2, sino que lo hacen con gran afinidad. A través de una unión selectiva se pretende que muestren un KD o IC50 con SSTR2 que es alrededor de un uno por ciento o menos con respecto a cualquiera de los otros cuatro receptores. Los análogos preferidos serán al menos alrededor de 200 veces más selectivos para SSTR2 que con cualquier otro receptor SRIF, y preferentemente al menos 500 veces más selectivo.

[0012] Estos análogos SRIF pueden marcarse fácilmente y así usarse en las pruebas con medicamentos, pruebas de imagen, diagnosis y terapia con radionúclidos. Por ejemplo, estos análogos con marcados detectables son efectivos en la localización de dichos receptores en el cuerpo y en el diagnóstico de localización de tumores, especialmente tumores neuroendocrinos. Como agentes en terapias radionucleares, son considerados como especialmente efectivos en la lucha contra tumores con receptores SSTR2; además, son capaces de conseguirlo sin efectos secundarios, por ejemplo sin destruir una parte substancial del tejido adyacente como resultado de su interacción con multitud de receptores SRIF.

[0013] En un aspecto particular, la invención aporta un péptido antagonista a la somatostatina cíclica que se une selectivamente al SSTR2 receptor SSTR2 sin provocar su inclusión en la célula, cuyo péptido se compone de la cadena de aminoácido (cyclo3-14)Xaa1-Xaa2-D-Xaa3-Xaa4-Xaa5-Xaa6-Xaa7-Xaa8-Xaa9-Xaa10-Xaa11-Xaa12-Xaa13-Xaa14-Xaa15 donde Xaa1 es des-Xaa; Xaa_2 es Trp(A), Phe(B), Nal o Tyr, donde A es H, Cl, F, Br, Me, NO_2, OMe o N-formyl y B es H, halógeno, CH_3, NO_2 o OCH_3; D-Xaa_3 es D-Cys, D-Pen, D-HCys u otro D-isómero α-aminoácido que posee una cadena lateral SH; Xaa_4, Xaa_5 y Cbm, CH_3-Cbm, OCH_3-Cbm, OEt-Cbm, Cbm-Et$(OEt)_2$ o Hor y X is H o halogen; Xaa_8 es D-Trp(A), Trp(A), Tyr, D-Tyr, Phe(B), D-Phe(B), L o D-BzlHis, L o D-(DNP)His, L o D-Aph(Cbm); Xaa_9 es Lys, N^{α}MeLys, hLys, N^{α}MehLys, Om o N^{α}MeOrn; Xaa_{10} es Thr, Ser o Val; Xaa_{11}, Xaa_{12} y Xaa_{13} son des-Xaa; Xaa_{14} es Cys, Pen, hCys o otro L-isomer α-aminoacido con una cadena lateral SH; y Xaa_{15} es 2Nal, D-2Nal, Aph(Q_2), D-Aph(Q_2), (R_1)Cha, (R_1)D-Cha, (R_1)Leu, (R_1)D-Leu, Tyr, D-Tyr, Trp, D-Trp o des-Xaa; donde R_1 es H o C^{α}Me, y Q_2 es Cbm, OH-Cbm, CH_3-Cbm, OCH_3-Cbm o OEt-Cbm. Una fracción con quelato puede emparejarse en las terminaciones N como se muestra en el artículo. Alternativamente, una fracción con quelato puede ser compleja (por ejemplo sistemas biotina-avidina) con sus complementos en las terminaciones N del péptido.

[0014] En un aspecto más concreto, el invento aporta un péptido análogo a la somatostatina cíclica (SRIF) que se une selectivamente al receptor SRIF SSTR2, cuyo péptido contiene la cadena de aminoácido ciclo(3-14)Xaa1-Xaa2-D-Cys-Xaa4-Xaa5-Xaa6-Xaa7-Xaa8-Xaa9-Xaa10-Xaa11-Xaa12-Xaa13-Cys-Xaa15-NH2 donde Xaa1 es des-Xaa; Xaa2 es cloro o nitro Phe; Xaa4, Xaa5 y Xaa6 son des-Xaa; Xaa7 es Aph(Hor), Tyr or ITyr; Xaa_8 es D-Aph(Cbm) o D-Trp; Xaa_9 es Lys, Orn, hLys, N^{α}MeLys o N^{α}MeOrn; Xaa_{10} es Thr; Xaa_{11}, Xaa_{12} and Xaa_{13} son des-Xaa; y Xaa_{15} es 2Nal o D-Tyr.

[0015] En otro aspecto más concreto, el invento aporta un método para la toma externa de imágenes de tejidos en humanos, que contienes SSTR2, que consiste: (i) administración a seres humanos, en cantidades suficientes para la toma externa de imágenes, una composición que contiene un antagonista péptido SRIF en contraste con los otros receptores SRIF y que se unen con gran afinidad a los receptores humanos clonados SSTR2 pero que no activan los receptores, dicho antagonista péptido SRIF contiene un marcador detectable, y (ii) toma externa de imágenes del ser humano.

[0016] En otro aspecto más concreto, el invento aporta un método para la toma externa de imágenes de tejidos en humanos, que contiene SSTR2, que consiste en: (i) administrar a seres humanos, en cantidad suficiente para irradiar tejido neoplástico, una composición que contiene un antagonista péptido SRIF que es selectivo para SSTR2 en contraste con los otros receptores clonados SRIF y que se une con gran afinidad a los receptores humanos clonados SSTR2 pero que no activa los receptores, dicho antagonista péptido SRIF con marcado radioactivo, y (ii) permite al antagonista péptido SRIF unirse al tejido neoplástico.

[0017] En otro aspecto concreto, el invento aporta un método de detección, en el cuerpo de un ser humano, de tumores y sus metástasis poseedoras de SSTR2 en los tejidos, que no contienen cantidades sustanciales de SSTR2 en condiciones saludables o en condiciones no neoplásticas de inflamación crónica, dicho método consiste en (i) administrar al ser humano, en cantidades suficientes para la toma externa de imágenes, una composición formada por un péptido descrito en la reivindicación 1, dicho péptido marcado con (a) un isótopo radioactivo metálico enlazado a través de un quelato adecuado o (b) un átomo de metal paramagnético o marcado con un isótopo halógeno radioactivo, y posteriormente (ii) someter a dicho humano a la toma externa de imágenes, a través de escaneado radiactivo o resonancias magnéticas, para determinar los lugares elegidos en el cuerpo en relación con la actividad de fondo, con el propósito de permitir la detección y localización de dichos tumores en el cuerpo de forma semi cuantitativa.

[0018] Este invento presenta un método para el estudio de ligandos que son altamente selectivos para SSTR2 usando un modelo farmacóforo que se basa en una pauta de características de ligandos que son indispensables para la unión selectiva. Dicho método puede consistir en llevar a cabo un exigente ensayo de vinculación con un receptor SSTR2, un ligante según el presente invento, y un antagonista candidato, donde dicho ligante posee un marcado adecuado detectable; se determina la capacidad de antagonista candidato de desplazar al ligando marcado; y se evalúa dicho antagonista candidato por su capacidad de antagonizar una actividad asociada con SRIF.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REPRESENTACIONES PREFERIDAS

[0019] La abreviación estándar de 3 letras identifica los residuos de alpha-aminoácidos, y donde el residuo de aminoácido tiene forma isomérica, es la forma L del aminoácido la que se representad a menos que se exprese lo contrario, por ejemplo Ser=L-serine. Con L o D se refiere a ambos D y L isómeros de un aminoácido particular. Cuando un referencia es desde este momento hecha sobre una posición en el péptido, se refiere a su posición correspondiente al péptido con 14 residuos de somatostatina (SRIF).

[0020] Los péptidos antagonistas SRIF se suministran con un afinidad selectiva para el receptor SRIF SSTR2; preferentemente también poseerán una alta afinidad para SSTR2, ej igual a un k_D de alrededor de 10 nanomolares o menos. Estos péptidos abarcan análogos cíclicos e SRIF acortados, donde la parte circular se acorta a solo 6 residuos, y donde hay un residuo en la terminación N y preferiblemente un residuo también añadido en la terminación C En otras palabras, las posiciones residuales 1-, 4-, 5-, 6-, 11-, 12- y 13 son eliminadas del 14 residuos SRIF nativo, creando heptapéptidos, y preferiblemente un residuo (por ejemplo residuo 15) se añade en la terminación C, que crea un optopétido.

[0021] La siguiente secuencia de aminoácidos aporta ejemplos de péptido antagonista representativos que muestran la especificidad deseada para SSTR2, basada en un sistema numérico uniforme con la secuencia de 14 residuos de SRIF nativo de origen mamífero, donde los residuos en las posiciones 1, 4-6 y 11-13 son preferentemente eliminados: (cyclo3-14)Xaa1-Xaa2-D-Xaa3-Xaa4-Xaa5-Xaa6-Xaa7-Xaa8-Xaa9-Xaa10-Xaa11-Xaa12-Xaa13-Xaa14-Xaa15 donde Xaa1 es des-Xaa; Xaa2 es Trp(A), Phe(B), Nal o Tyr, donde A es H, Cl, F, Br, Me, NO_2, OMe o N-formyl y B es H, halogen, CH_3, NO_2 o OCH_3; D-Xaa3 es D-Cys, D-Pen, D-HCys u otro D-isómero α-aminoácido que posee una cadena lateral SH; Xaa4, Xaa5 y Xaa_6 son des-Xaa; Xaa_7 es Aph(Q_1), Ala(thienyl), Tyr(X) o Trp(A) donde Q_1 es Cbm, OH-Cbm, CH_3-Cbm, OCH_3-Cbm, OEt-Cbm, Cbm-Et$(OEt)_2$ o Hor and X es H o halógeno; Xaa_8 es D-Trp(A), Trp(A), Tyr, D-Tyr, Phe(B), D-Phe(B), L o D-BzlHis, L o D-(DNP)His, L o D-Aph(Cbm); Xaa_9 es Lys, N^{α}MeLys, hLys, N^{α}MehLys, Orn o N^{α}MeOrn; Xaa_{10} es Thr, Ser o Val; Xaa_{11}, Xaa_{12} y Xaa_{13} son des-Xaa; Xaa_{14} es Cys, Pen, hCys o otro L-

isómero α-aminoácido que posee una cadena lateral SH; y Xaa_{15} es 2Nal, D-2Nal, Aph(Q_2), D-Aph(Q_2), (R_1)Cha, (R_1)D-Cha, (R_1)Leu, (R_1)D-Leu, Tyr, D-Tyr, Trp, D-Trp o des-Xaa; donde R_1 es H o $C^{\alpha}Me$, y Q_2 es Cbm, OH-Cbm, CH_3-Cbm, OCH_3-Cbm o OEt-Cbm. Tyr en la posición 2 puede tratarse con yodina radiada, o un agente complejo, conjugado o quelado puede ser unido directa o através de un vinculador al grupo amino del residuo en la terminal N en cualquiera de estos análogos péptidos que es capaz de vincular un núcleo radioactivo a partir de ese momento. Por ejemplo, un quelato macrocíclico, como un DOTA, puede unirse la terminación N bien por unión directa a Xaa2 o indirectamente usando un vinculante como GABA (gamma aminoácido butírico, ver ejemplo en la Patente de EEUU No. 6.022.523) o βAla.

[0022] Un subgénero preferible de análogos SRIF se compone de la secuencia aminoácidoamino: (ciclo 3-14)Xaa_1-Xaa_2-D-Xaa_3-Xaa_4-Xaa_5-Xaa_6-Xaa_7-Xaa_8-Lys-Thr-Xaa_{11}-Xaa_{12}-Xaa_{13}-Cys donde Xaa_2 se sustituye por Phe; D-Xaa_3 es D-Cys; Xaa_7 es Aph(Q_1), Tyr o ITyr; y Xaa_8 es D-Trp o D-Aph(Cbm). Debe comprenderse que los restantes grupos Xaa se definen como se ha referido anteriormente cuando no se especifique.

[0023] En general y para efecto de esta solicitud, las referencias a Trp y D-Trp en cualquier descripción que no sea un ejemplo específico debe entenderse que se incluye el residuo no sustituido así como un residuo donde se ha realizado una única sustitución por hidrógeno en una de las posiciones 5 o 6, y siendo dichos sustitutos cloro, flúor, bromo, metil, nitro y metoxi, con cloro, flúor y bromo siendo los preferibles o con formil en sustitución del hidrógeno de un indol N. Por Nal se entiende el isómero de alanina que se sustituye por naphthyl en elβ átomo de carbono, con la unión a naftaleno preferentemente en la posición 2 del anillo, o opcionalmente en la posición 1. Por Aph se entiende aminofenilalanina, donde el grupo amino se une preferentemente a la posición 4 en el anillo fenil, pero en general la unión en las posiciones 2 o 3 es equivalente. Por Aph(Cbm) se entiende fenilalanina ureido 4. Por Aph(OH-Cbm) se entiende fenilalanina ureido 4 (3 hidrosi). Por Aph (CH3-Cbm) se entiende 4-(3-methyl)-fenilalanina ureido. Por Por Aph (OCH_3-Cbm) se entiende 4-(3-methoxy)-fenilalanina ureido. Por Aph[$(EtO)_2$Et-Cbm] se entiende 4-{3-[2-(2-ethoxy-ethoxy)-etil]}-fenilalanina ureido. Por ITyr se entiende L- tirosina iodinazada, ej 3-iodo-Tyr. Por Cpa se entiende cloro-Phe, y preferentemente 4ClPhe. Por Aph(Hor) se entiende [(2,6-dioxo-hexahydro-pyrimidine-4-carbonyl)-amino]-fenilalanina. Por SRIF se entiende somatostatina péptida cíclica con 14 residuos. Por Cha se entiende ciclohexilalanina, y por Pen se entiende penilcilamina (β-mercapto valine). Por hLys o hCys se entiende el aminoácido a con un grupo CH_2 adicional en la cadena lateral.

[0024] La terminación C normalmente es amidada, aunque puede usarse un equivalente, por ejemplo Gly-OH,. La terminación N puede modificarse de varias formas sin afectar negativamente de forma significativa la afinidad de unión, todas estas modificaciones en los péptidos cíclicos se considera que se incluyen como parte de los péptidos en el conjunto del invento. Por ejemplo, una variedad de adición puede estar formada, preferentemente, en la terminal N del aminoácido en forma de agente (Z) complejo o conjugado que puede usarse posteriormente en las partículas deseadas al péptido o funcionar como marcador. Generalmente dichas partículas Z pueden ser seleccionadas desde un grupo consistente de DOTA- y quelatos basados en DTPA, quelatos basados en NOTA, compuestos carbonil, 2-hydrazino nicotinamida (HYNIC), N_4-quelatos, desferrioxamina, N_xS_y-quelatos, todos opcionalmente complejos con un radio isótopo, Tirosina (Tyr) para halogenado, un tinte fluorescente y biotina. Cpa también puede servir como precursor de tritiación. Por ejemplo, puede añadirse un quelato, como DTPA, DOTA, HYNIC y P_2S_2-COOH; entre los quelatos preferidos pueden incluirse p-NH2-Bz-DOTA(2-p-aminobenzyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7, ácido 10-tetraace-tic), y DOTA-p-NH2-anilide [1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,ácido acético 10-tetraacetic mono(p-aminoanilide)]. Alternativamente, puede unirse un agente quelante de forma covalente a la terminación N a través de un adecuado enlace (L) si se desea; entre los enlaces L adecuados incluimos tirosina, lisina, ácido diaminobutírico, ácido diaminopropionico, polietileno glicol, ácidos grasos y sus derivados, β-alanina, ácido 5-amino valérico, sarcosina, y ácido glucerónico. Cuando Tyr aparece en la terminación N, puede ser radiado con idina o marcado de otro modo. Los grupos Acyl al no poseer más de alrededor de 20 aminoácidos pueden también estar presentes en la terminación N, ya que el residuo en la terminación N puede estar también aciclado, si se desea, con una fracción grande sin pérdida de selectividad.

[0025] Se ha demostrado selectividad para la unión de péptidos análogos del invento a SSTR2 evaluando sus interacciones con cinco receptores humanos SRIF clonados diferentes como se describe posteriormente en detalle. Generalmente, las células recombinadas con receptores se lavan y homogenizan para preparar una proteína homogénea pura en un búfer adecuado, como se describe en el artículo. En un ensayo típico, se coloca una cantidad de la proteína homogenizada en un pequeño volumen adecuado del búfer del ensayo con un pH adecuado. La sustancias candidatas, tales como potenciales antagonistas y antagonistas SRIF, se añaden a la mezcla en concentraciones adecuadas, y la interacción entre las sustancias candidatas y los receptores polipéptidos se monitorizan. Los péptidos del invento se unen substancialmente fuerte solamente a SSTR2, y su unión muestra gran afinidad.

[0026] Los ensayos sobre uniones de receptores se realiza sobre receptores SRIF clonados, y exigentes ensayos se usan para generar valores IC50 que son indicativos de la concentración de un ligante necesario para desplazar una concentración de saturación desde el ligante objetivo midiéndose desde un 50% de los lugares de unión.

[0027] De acuerdo con uno de los aspectos del presente invento, un método de detección intraoperativa de tumores malignos en cuerpos humanos en tejidos que en condiciones saludables no contienen cantidades substanciales de SSTR2 comprende
(i) administrar a dicho organismo una composición formada, en cantidades suficientes para ser detectada con pruebas gamma, un péptido SSTR2 selectivo, cuyo péptido está marcado, por ejemplo radioactivamente con ^{99m}Tc, ^{161}Tb, ^{90}Y, ^{177}Lu, ^{123}I or ^{125}I y (ii) tras permitir la unión de las substancias activas y su incorporación a dicho tumor y después de la liberación de radioactividad de la sangre, sometiendo dicho organismo a una técnica de radiodetención en el área relevante del cuerpo usando una prueba de detección gamma.

[0028] Los antagonistas SRIF del presente invento son altamente selectivos para SSTR2, y se incluyen en mayores cantidades que los anteriores péptidos antagonistas SRIF que eran solo parcialmente específicos a SSTR2. Más importante aún, se cree que los antagonistas SRIF son útiles en el combate de cánceres con aparición de SSTR2 con el uso de radioterapia donde su éxito depende de la cantidad de radiación aplicada al tumor; así, se espera que sean más efectivos que agonistas conocidos por radioterapia de tumores. Por supuesto, también se consideran especialmente efectivos en gammagrafía para determinar la distribución de células y tejido que muestran SSTR2 a lo largo del cuerpo, y el uso de toma externa de imágenes a través de escaneado radioactivo o resonancia magnética permite una detección semicuantitativa en el interior del cuerpo. Son de más utilidad en el bloqueo selectivo de algunos de los efectos farmacológicos en los que media SSTR2, muchos de los efectos de SRIF han sido descritos en las últimas dos décadas.

[0029] Más específicamente, estos antagonistas radioactivos son considerados de gran utilidad en tratamientos terapéuticos de tumores malignos en el cuerpo humano cuando sea en tejidos que en condiciones saludables no contienen cantidades substanciales de SSTR2. A dichos antagonista péptido SSTR2 selectivo se les administra un compuesto que incluye una cantidad efectiva para gammagrafía o para la lucha o control de tumores, y puede marcarse con un isótopo seleccionado del grupo formado por ^{186}Re, ^{188}Re, ^{111}In, ^{113m}In, ^{71}As, ^{90}Y, ^{64}Cu, ^{67}Cu, ^{99m}Tc, ^{169}Er, ^{121}Sn, ^{127}Te, ^{142}Pr, ^{143}Pr, ^{66}Ga, ^{67}Ga, ^{68}Ga, ^{72}Ga, ^{127}Te, ^{195}Pt, ^{211}At, ^{198}Au, ^{199}Au, ^{161}Tb, ^{109}Pd, ^{165}Dy, ^{149}Pm, ^{151}Pm, ^{153}Sm, ^{157}Gd, ^{159}Gd, ^{166}Ho, 172_{Tm}, 169_{Yb}, 175_{Yb}, 177_{Lu}, 105_{Rh}, 111_{Ag}, 124_{I} and 131_{I}.

[0030] También se cree que los análogos SRIF marcados del invento también son útiles en ensayos de valoración de medicamentos para la búsqueda de nuevos agentes efectivos péptidos o no péptidos que se unirán con gran afinidad a SSTR2 y que pueden ser antagonistas altamente efectivos Usando el ligante del invento que es selectivo para los receptores SSTR2, se puede obtener una actividad de base para el receptor producido de forma recombinada. Puede llevarse a cabo un ensayo exigente con el SSTR2, el ligante marcado y el candidato para determinar su capacidad relativa de unión. Alternativamente, pueden incorporarse directamente candidatos prospectivos para inhibidores o modificadores, por ejemplo antagonistas de la función del receptor, en una mezcla para comprobar el efecto de dicho candidato en el receptor. Comparando la extensión de la actividad del receptor en la presencia o ausencia de la sustancia candidata, se puede obtener información sobre el efecto de la sustancia candidata en el normal funcionamiento del receptor y así determinar sus funciones como agonista o como antagonista comparado con análogo SSTR2 selectivo conocido. Los péptidos cíclicos SRIF descritos en los siguientes ejemplos son antagonistas, y pueden usarse en la mediación de las funciones normales de SSTR2.

[0031] Los péptidos del presente invento pueden ser sintetizados con síntesis de solución clásica, pero los péptidos amidados se sintetizan preferiblemente con técnicas de fases sólidas, como en una resina metilmenzidrilamina (MBHA) o una resina BHA, como es bien conocido. Se sintetizan preferentemente péptidos con una terminación C libre de carboxil como muestra la Patente de EEUU No. 7.019.109. Pueden sintetizarse péptidos con una terminación C amidada como en la Patente de EEUU No. 5.874.227. La síntesis de fase sólida se lleva a cabo de forma escalonada añadiendo aminoácidos en la cadena que comienza en la terminación C de la manera descrita en cualquiera de las dos patentes. Se incluyen preferiblemente grupos protectores de la cadena lateral, que aparecen bien descritos en el artículo, como parte de cualquier aminoácido que posee una cadena lateral particularmente reactiva, y opcionalmente puede ser usado en otros casos como Trp, cuando dichos aminoácidos se emparejan en la cadena fabricada desde la resina. Dicha síntesis produce una peptidoresina intermedia completamente protegida. Generalmente, los grupos protectores están divididos y el péptido está separado del soporte resina antes de oxidarse para crear una unión disulfida entre las cadenas laterales C.

[0032] Los análogos SRIF del invento generalmente son efectivos a niveles de menos de 100 microgramos por kilogramo de masa corporal. Para una acción prolongada, puede ser preferible usar dosis de entre 0,1 hasta 2,5 miligramos por kg de masa corporal. Estos análogos son solubles en agua y así pueden prepararse en soluciones relativamente concentradas para su administración.

[0033] Los siguientes ejemplos ilustran la provisión de un número de antagonistas péptidos SRIF que incorporan varias características del invento. En cada péptido, los residuos de cisteína en las posiciones 3 y 14 se acoplan por la unión del disulfido en ciclización.

Ejemplo 1

[0034] El análogo de somatostatina DOTA-des-AA^{1,4,5,6,11,12,13}[Cpa^{2}, D-Cys^{3}, Tyr^{7}, D-4Aph(Cbm)^{8}]-SRIF-2Nal-NH_2 con la estructura: (ciclo 3-14)DOTA-Cpa-D-Cys-Tyr-D-4Aph(Cbm)-Lys-Thr-Cys-2Nal-NH_2 está sintetizado. La metodología de fase sólida que usa la estrategia BOC se utiliza para sintetizar el octapéptido en modo gradual sobre una resina MBHA, generalmente de la forma descrita en el Ejemplo II de la patente 277. Boc-D-4Aph(Cbm)-OH ha sido preparado previamente de la forma descrita en una publicación anterior de Jiang y acoplado a la posición 8.

[0035] Después de separar el péptido de la resina y de retirar de forma simultánea los grupos de protección de cadena lateral (excepto Fmoc de Lys) por HF, el péptido se ha oxidado para crear el puente de disulfito en un 75% de solución de ácido acético añadiendo una solución de 10 por cien de yodina en metanol hasta que la solución resultante obtenga un color naranja, a continuación agitándola durante 40 minutos y enfriándola con ácido ascórbico. El péptido en bruto ha sido purificado por un preparador RP-HPLC, usando un gradiente en aumento lineal del 1% B por 1 min desde el punto de partida %B (Eluyente A = 0,1% TFA, eluyente B = 60% CH_3CN, 40% A) a una tasa de flujo de 100 ml/min. DOTA se ha acoplado a continuación a la terminación N- como quelante añadiendo DOTA-NHS.3TFA.HPF_6 (Macrocyclics, Dallas, TX) (198 mg, ~20 *m*M) en DMF (1 ml) y N, N'-diisopropiletilamina (DIPEA) (36 *m*l, ~22 *m*M) al péptido purificado (32 mg, ~20 *m*M) en N,N-dimetilformamida seca (DMF, 3.5 ml). La mezcla se ha agitado a temperatura ambiente toda la noche. El progreso de la reacción se ha seguido por un HPLC analítico, y el análisis MS ha mostrado el producto deseado, se ha obtenido DOTA-des-AA^{1,4,5,6,11,12,13}[Cpa^{2}, D-Cys^{3}, Tyr^{7}, D-4Aph (Cbm)^{8}, Lys (Fmoc)^{9}]-SRIF-2Nal-NH_2 puro. Tras haber completado la reacción, se ha conseguido retirar el grupo protector del Fmoc de la cadena lateral Lys^{9} añadiendo 4 ml de una solución de 20% de piperidina en DMF y esperando 30 minutos. DOTA-des-AA^{1,4,5,6,11,12,13}[Cpa^{2}, D-Cys^{3}, Tyr^{7}, D-4Aph (Cbm)^{8}]-SRIF-2Nal-NH_2 se ha desalado con un preparado de RP-HPLC usando las mismas condiciones descritas antes. La pureza del conjunto DOTA-péptido cíclico final se ha determinado a través de un CZE analítico. Era de una pureza del 94%.

[0036] El análisis MS muestra una masa $[M+H]^+$ de 1583.72 Da que tiene una comparación muy favorable con la masa calculada de 1583,62 Da. De ahora en adelante, se hará referencia a este péptido como Péptido No. 1.

Ejemplo 2

[0037] La síntesis inicial descrita en el Ejemplo 1 se repite con dos cambios; 4Aph (Cbm) y D-Trp se usan en las posiciones 7- y 8- para proporcionar la resina octapéptida: des-AA^{1,4,5,6,11,12,13}[Cpa^{2}, D-Cys^{3}, 4Aph(Cbm)^{7}, D-Trp^{8}, Lys (Fmoc)^{9}]-SRIF-2Nal-MBHA.

[0038] Después de separar el péptido de la resina y de la amida y simultáneamente retirar los grupos de protección de las cadenas laterales de los amino ácidos (excepto Fmoc de Lys) por HF, el péptido se ha oxidado para crear el puente de disulfito en un 75% de solución de ácido acético añadiendo un 10 por cien de solución de yodina en metanol hasta que la solución resultante obtenga un color naranja, a continuación agitándola durante 40 minutos y enfriándola con ácido ascórbico. El péptido puro ha sido purificado por un preparador RP-HPLC, usando un gradiente en aumento lineal del 1% B por 1 desde el punto de partida %B (Eluent A=0,1% TFA, eluente B = 60% CH_3CN, 40% A) a una tasa de flujo de 100 ml/min. Se ha añadido al péptido purificado (34 mg ~24 *m*M) en seco N,N-dimetilformamida (DMF, 3.5 ml) DOTA-NHS.3TFA.HPF_6 (Macrocyclics, Dallas, TX) (24 mg, 24,2 *m*M) en DMF (150 *m*l) y N,N'-diisopropiletilamina (DIPEA) (40 *m*l, 24 *m*M). La mezcla se ha agitado a temperatura ambiente toda la noche. El progreso de la reacción se ha seguido por un HPLC analítico, y después de completar la reacción, se han añadido 1 ml de piperidina a la mezcla de la reacción para retirar el grupo protector Fmoc de la cadena lateral Lys^{9} durante 30 minutos con el resultado de DOTA-des-AA^{1,4,5,6,11,12,13}[Cpa^{2}, D-Cys^{3}, 4Aph(Cbm)^{7}, D-Trp^{8}]-SRIF-2Nal-NH_2, que tiene la fórmula: (ciclo 3-14)DOTA-Cpa-D-Cys-4Aph(Cbm)-D-Trp-Lys-Thr-Cys-2Nal-NH_2.

[0039] Este péptido se ha desalado con el preparado RP-HPLC usando las mismas condiciones que se han descrito anteriormente. La pureza del conjunto DOTA-péptido cíclico final se ha establecido a través de un CZE analítico en aproximadamente una pureza del 98%. El análisis muestra una masa $[M+H]^+$ de 1606,50 Da, que tiene una comparación favorable con el valor calculado de 1606,64 Da. Se hará referencia a él como Péptido No. 2.

Ejemplo 3

[0040] La síntesis establecida en el Ejemplo 1 se repite omitiendo 2Nal en la terminación C y substituyendo 4Aph(Hor) por Tyr^{7}. Boc-4Aph(Hor)-OH se ha preparado de la forma descrita en una publicación anterior de G. Jiang, J. Stalewski, et al., (2001). "Antagonistas de GnRH: Una nueva generación de análogos de acción prolongada que incorporan urea funciona en las posiciones 5 y 6", J. Med. Chem. 44(3): 453-467. La división, desprotección, ciclización y purificación del péptido se llevan a cabo como en el Ejemplo 1. El péptido cíclico purificado tiene la fórmula:

$$\text{(cyclo 3-14)DOTA-Cpa-D-Cys-4Aph(Hor)-D-4Aph(Cbm)-Lys-Thr-Cys-NH}_2.$$

Tiene una pureza de CZE de aproximadamente el 98%. Se hace referencia a él como Péptido No. 3. El análisis de MS muestra una masa [M+H]+ de 1525,68 Da, que tiene una comparación favorable con el valor calculado de 1525,58 Da.

Ejemplo 4

[0041] La síntesis establecida en el Ejemplo 1 se repite con un cambio, en lugar de pCl-Phe en la terminación N,se usa pNO2-Phe. La división, desprotección, ciclización y purificación del péptido se llevan a cabo como en el Ejemplo 1. El péptido cíclico purificado tiene la fórmula:

(cyclo 3-14)DOTA-pNO$_2$-Phe-D-Cys-Tyr-D-4Aph(Cbm)-Lys-Thr-Cys-

Tiene una pureza de CZE de aproximadamente el 98%. Se hace referencia a él como Péptido No. 4. El análisis de MS muestra una masa $[M+H]^+$ de 1594,17 Da que tiene una comparación favorable con el valor calculado de 1594,65 Da.

Ejemplo 5

[0042] La síntesis inicial descrita en el Ejemplo 1 se repite con un cambio; se usa Aph(Hor) en lugar de Tyr en la posición 7 para proporcionar la resina de octapéptido: des-AA^{1,4,5,6,11,12,13}[Cpa^2, D-Cys^3, 4Aph(Hor)^7, D-Aph(Cbm)^8, Lys (Fmoc)^9]-SRIF-2Nal-MBHA resina. Las reacciones se conducen de la forma descrita en el Ejemplo 2 y tiene como resultado DOTA-des-AA^{1,4,5,6,11,12,13}[Cpa^2, D-Cys^3, 4Aph(Hor)^7, D-Aph(Cbm)^8]-SRIF-2Nal-NH$_2$, que tiene la fórmula

(cyclo 3-14)DOTA-Cpa-D-Cys-4Aph(Hor)-D-Aph(Cbm)-Lys-Thr-Cys-2Nal-NH$_2$.

[0043] El CZE analítico ha determinado que la pureza del conjunto final cíclico de DOTA-péptido es de aproximadamente un 98% de pureza. Se hace referencia a él como Péptido No. 5. El análisis de MS muestra una masa [M+H]+ de 1722.56 Da, que tiene una comparación favorable con el valor calculado de 1722,65 Da.

Ejemplo 6

[0044] La síntesis establecida en el Ejemplo 5 se repite, sustituyendo D-Tyr por 2Nal en la terminación C. La división, desprotección, ciclización y purificación del péptido se llevan a cabo como en el Ejemplo 1. El péptido cíclico purificado tiene la fórmula:

(cyclo 3- 14)DOTA-Cpa-D-Cys-4Aph(Hor)-D-4Aph(Cbm)-Lys-Thr-Cys-D-Tyr-NH$_2$.

Tiene una pureza de CZE de aproximadamente el 98%. Se hace referencia a él como Péptido No. 6. El análisis de MS muestra una masa [M+H]+ de 1688,83 Da, que tiene una comparación favorable con el valor calculado de 1688,64 Da.

Ejemplo 7

[0045] La síntesis establecida en el Ejemplo 4 se repite sustituyendo D-Tyr por 2Nal en la terminación C. La división, desprotección, ciclización y purificación del péptido se llevan a cabo como en el Ejemplo 1. El péptido cíclico purificado tiene la fórmula:

(cyclo 3- 14)DOTA-pNO$_2$-Phe-D-Cys-Tyr-D-4Aph(Cbm)-Lys-Thr-Cys-D-Tyr-NH$_2$.

Tiene una pureza de CZE de aproximadamente el 98%. Se hace referencia a él como Péptido No. 7. El análisis de MS muestra una masa [M+H]+ de 1560,63 Da, que tiene una comparación favorable con el valor calculado de 1560.83 Da.

Ejemplo 8

[0046] La síntesis descrita en el Ejemplo 7 se repita con dos cambios; ITyr se usa en la posición 7 y D-Trp se usa en la posición 8 para proporcionar la resina de octapéptido: resina des-AA1,4,5,6,11,12,13[pNO2-Phe2,D-Cys3, ITyr7, D-Trp8, Lys (Fmoc)9]-SRIF-D-Tyr-MBHA.

[0047] Después de separar el péptido de la resina como la amida y de llevar a cabo las reacciones de la forma descrita de forma general en el Ejemplo 2, el péptido se obtiene con la fórmula:

$$\text{(cyclo 3-14)DOTA-pNO}_2\text{-Phe-D-Cys-ITyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-D-Tyr-NH}_2.$$

El CZE analítico ha determinado que la pureza del conjunto final cíclico de DOTA-péptido es de aproximadamente un 98% de pureza. Se hace referencia a él como Péptido No. 8. El análisis de MS muestra una masa [M+H]+ de 1667,74 Da, que tiene una comparación favorable con el valor calculado de 1667,52 Da.

[0048] Bioensayo in vitro: Los efectos de los varios análogos de somatostatina Se testa in vitro los efectos de los varios análogos de la somatostatina en cuanto a su capacidad de unirse a receptores clonados aislados expresados en células CHO-K1 y células CCL39. Las células CHO-K1 crecen en un medio de Ham F-12, y las células CCL39 crecen en una mezcla de modificado de Dulbecco medio de Eagle/F-12(1:1) de Ham, complementado con un 10% de suero fetal bovino, 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomicina, en aire humedecido que contiene un 5% de CO2 a 37°C.

[0049] La clonación molecular de los genes que codifican múltiples subtipos de receptores de somatostatina permite la expresión individual de dichos receptores en células de mamífero y la caracterización de sus respectivos perfiles farmacológicos. Cinco de dichos subtipos de receptores, denominados de SSTR1 a SSTR5, han sido clonados y se informan y describen en Raynor et al., Farmacología Molecular, 43, 838-844 (1993) y en Raynor et al., Farmacología Molecular Pharmacology, 44, 385-392 (1993). Estas referencias describen ensayos de unión que pueden usarse para determinar si determinados análogos SRIF se unen de forma selectiva a uno o más de los 5 tipos de receptores y también si se unen a dichos tipos de receptores con afinidad alta o baja. Debido a que esos tipos de receptores generalmente han sido caracterizados a respecto de sus perfiles farmacológicos, el conocimiento de los resultados de dichos resultados de los ensayos de unión, junto con el conocimiento de los modelos únicos de distribución de esos receptores en el cuerpo indican que cada uno de los subtipos de receptores pueden mediar efectos fisiológicos distintos pero superpuestos en los SRIF. Como resultado, los compuestos que se unen de forma selectiva a los receptores SSTR2, por ejemplo, pueden usarse para modular una función fisiológica concreta de SRIF sin que potencialmente tenga un efecto no deseado sobre otra función fisiológica de SRIF que sea mediada por otros receptores SRIF.

[0050] Las células se lavan dos veces con y se raspan en 0.05 M Tris-HCl (pH 7,4) enfriado con hielo, se recogen por centrifugado, y se homogenizan usando un sistema rotor/estator en el mismo búfer. Después del centrifugado a 120 g durante 5 min a 4°C, el sobrenadante se recoge y centrifuga de nuevo a 48,000 g durante 30 min a 4°C. El gránulo resultante se re-suspende en un búfer Tris congelado, que se traspasa a un tubo de microfuga, y se centrifuga a 20.000 g durante 15 min a 4°C. Después de la retirada del sobrenadante, el gránulo de la membrana se almacena a -80°C.

[0051] Se lleva a cabo una autoradiografía de receptor sobre cortes criostáticos de 20 mm de espesor de los gránulos de la membrana, montados en láminas de microscopio y almacenados a -20°C. Para cada uno de los compuestos analizados, se llevan a cabo experimentos de desplazamiento completo con el ligando radioligand universal de somatostatina ^{125}I-[Leu^{8},D-Trp^{22},Tyr^{25}]-somatostatina 28 que se une a los cinco receptores de forma sólida. Se usa un aumento de las concentraciones del péptido no marcado en una gama de entre 0,1-1000 nM. La somatostatina no marcada-28 se usa en paralelo con las mismas concentraciones en aumento, a modo de control. Se calculan los valores IC_{50} tras la cuantificación de los datos usando un sistema de procesamiento de imagen asistido por ordenador tal y como se indica. A concentraciones de 100 nM, El Péptido No. 1 ha tenido efectos mínimos sobre la unión del radioligando SRIF-al SSTR1, SSTR3, SSTR4 y SSTR5. En contraste, se unió de forma selectiva a SSTR2, desplazando la unión del radioligando al SSTR2 humano con un valor de IC_{50} de aproximadamente 1,8 nM.

[0052] Las potencias de ciertos análogos de SRIF para inhibir la unión de radioligandos de ^{125}I-[Leu^{8},D-Trp^{22},Tyr^{24}]SRIF-28 a los varios receptores humanos SRIF clonados se muestran en la siguiente tabla en la que los valores IC_{50} se dan en concentración nanomolar. Los números entre paréntesis indican el número de veces que se ha llevado a cabo cada test de unión concreto.

TABLA

Compuesto	IC_{50} (nM)				
	hSSTR1	hSSTR2	hSSTR3	hSSTR4	hSSTR5
Péptido No. 1 406-034-15	>1.000 (2)	1,8 6 0,2 (3)	>1.000 (2)	>1.000 (2)	>1.000 (2)
Péptido No. 2 363-246-15	>1.000 (3)	9,4 6 1,6 (3)	>1.000 (2)	816 6 114 (3)	>1.000 (3)
Péptido No. 3 363-300-15	>1.000 (2)	230; 219 (2)	>1.000 (2)	>1.000 (2)	>1.000 (2)
Péptido No. 4 406-032-20	>1.000 (2)	1,5 60 (2)	>1.000 (2)	>1.000 (2)	>1.000 (2)
Péptido No. 5 363-298-15	>1.000 (2)	1,7 6 0,3 (3)	>1.000 (2)	>1.000 (2)	>1.000 (2)
Péptido No. 6 406-094-15	>1.000 (2)	0,6 6 0,05 (2)	>1.000 (2)	>1.000 (2)	>1.000 (2)
Péptido No. 7 406-092-15	>1.000 (2)	0,53 6 0,06 (2)	>1.000 (2)	>1.000 (2)	>1.000 (2)
Péptido No. 8 406-090-15	>1.000 (2)	1,02 6 0,88 (2)	>1.000 (2)	493 6 206 (2)	>1.000 (2)

[0053] Además, ninguno los péptidos testados e informados en la Tabla anterior ha mostrado ninguna internalización significativa en las células mientras que antagoniza la internalización inducida por octreotida. Los péptidos Nos. 1 y 4 a 8 han mostrado muy buenas propiedades de unión y excelentes propiedades de identificación de tumores in vivo, concretamente una gran respuesta para los tumores de sst2 en 4 h y 24una ratio excelente en tumores de riñón; por lo tanto esta respuesta para tumores puede bloquearse con un exceso de péptido enfriado.

[0054] Los Péptidos del invento no solo proporcionan ligandos más selectivos para la unión de SSTR2, sino que el uso de péptidos marcados , por ejemplo, una versión radioidemarcada del Péptido No. 1, facilita la exploración con medicamentos para antagonistas aún más eficaces. Los ensayos de rastreo, también se conocen en la técnica que usa el receptor polipéptido SSTR2 directamente del receptor recombinante, puede usarse para identificar agentes útiles para bloquear o imitar ciertos aspectos de la somatostatina de la forma deseada mientras que se eliminan los aspectos no deseados de la hormona que puede aparecer con la activación o bloqueo de otros receptores. A este respecto, si se desea un análogo con yodo radioactivo para la exploración, se puede añadir Tyr a la terminación N en lugar de DOTA, o puede usarse Tyr en la posición 2en lugar de Cpa, o puede añadirse con un quelato DOTA un radioligante apropiado. Podrían llevarse a cabo en primer lugar ensayos de unión competitiva con compuestos candidatos de esta forma con SSTR2 para buscar niveles altos de afinidad de unión; a continuación podría confirmarse, con el rastreo de los múltiples receptores SRIF, si hubo unión selectiva solo con este receptor, como se desea. Los péptidos no-radiomarcados del invento pueden usarse para tratar enfermedades de todos los órganos que se conoce que expresan SSTR2, incluido el pulmón, el sistema gastrointestinal y los riñones.

[0055] Ya que, tal y como se ha mostrado antes, los añadidos a la terminación N del análogo SRIF no parecen afectar de manera adversa a la unión selectiva, debería quedar claro que estos compuestos pueden complejarse con un nucleido radioactivo para el objetivo de transportar dicho agente a un tumor u otro tecido para el que se pretenda apoptosis. Por ejemplo, los agentes quelantes adecuados, como DOTA o DTPA u otros, pueden usarse para complejar el análogo SRIF con un metal altamente radiactivo, como se ha indicado anteriormente. Algunos ejemplos de agentes quelantes adecuados para quelar un átomo de metal radiactivo son los agentes quelantes tetraden-tate o grupos derivados del ácido etileno diamina tetra-acética (EDTA), ácido penta-acético dietileno triamine (DTPA), ciclohexil ácido tetra-acético 1,2-diamina (CDTA), etileneglicol-0,0'-bis(2-aminoetil)-N,N,N',N'-tetra- ácido acético (EGTA), N,N-bis(hidroxibenzil)-etilenediamine-N,N'-ácido diacético (HBED), ácido hexa-acético trietlene tetramine (TTHA), 1,4,7,10-tetraaciclododecane-N,N′,N″,N‴-ácido tetra-acético (DOTA), ácido hidroxietildiamine triacético (HEDTA), 1,4,8,11-tetraazacyclo-tetradecane-N,N',N",N"'-ácido tetra-acético (TETA), DTPA sustituido, EDTA sustituido. Otros quelantes, y agentes radiactivos, se exponen en WO 95/22341 y WO 04/082722 y en las Publicaciones de Patentes de los EEUU 2004/0242842 y 2005/0070470. Los quelantes preferidos son los derivados de EDTA y DOTA. Algunas sales apropiadas son ^{111}In-oxinate y ^{99m}Tc-tartrate, que generalmente pueden formarse de una forma más sencilla en condiciones que no son perjudiciales para el péptido antagonista, y $^{99m}Tc(CO)_3$ pueden acoplarse con Tyr o un quelante tridendete apropiado.

[0056] Si se desea, la solubilidad de los antagonistas SRIF puede mejorarse con la acilación del grupo de terminación N usando un compuesto hidrofílico, como el ácido as hidroorótico (Hor) o parecido, o por reacción con un isocianato apropiado, como melisocianado o isopropolisocianado, para crear una fracción de la urea en la terminación N. Otros agentes también pueden estar unidos a la terminación N que aumentará la duración de la acción del antagonista SRIF de la forma conocida en esta técnica.

[0057] Estos antagonistas SRIF o sales no tóxicas, combinadas con un portador aceptable farmacológico o veterinario para formar un compuesto farmacéutico, pueden administrarse a animales, incluidos los humanos y otro mamíferos, ya sea de forma intravenosa, subcutánea, intramuscular, percutánea, por ejemplo intranasal, intracerebrospinal u oral. Un compuesto farmacéutico de este tipo diseñado para usarse para detectar tumores malignos humanos, incluida la metástasis en los tejidos puede incluir, además de un material portador farmacológicamente aceptable, y un adyuvante farmacológicamente aceptable opcional, el péptido antagonista marcado como sustancia activa, en cantidad suficiente para imagen externa, para la detección por una sonda gamma-detectora o para combatir o controlar tumores. Los antagonistas péptidos deberían tener una pureza de al menos el 90% y preferentemente deberían tener una pureza de como mínimo el 98%; de todas formas, los niveles de pureza más bajos son eficaces y pueden usarse con mamíferos distintos de los humanos. Esta pureza significa que el péptido pretendido constituye el % de peso indicado de todos los péptidos similares y los fragmentos de péptidos presentes. La administración en humanos debería darse bajo la dirección de un médico para combatir tumores específicos y cánceres o para mediar otras condiciones en las que los receptores de SSTR2 ejerzan una función de control, como acoplarse a una fosfatasa de tirosina de forma que la estimulación de esta enzima pueda llevarse a cabo para mediar los efectos anti-proliferativos de SRIF. La dosis necesaria variará con la situación concreta que se trate, con la gravedad de la afección y con la duración del tratamiento deseado.

[0058] Recientemente, se ha determinado que los tumores con frecuencia expresan varios tipos de receptores péptidos (Reubi, J. C.; Waser, B. Expresión concomitante de varios receptores péptidos en tumores

neuroendocrinos: base molecular para identificación multirreceptor de tumores in vivo. Eur. J. Nucl. Med. Molec. Imaging 2003, 30, 781-793.). Dichos grupos de receptores múltiples de péptidos pueden incluir receptores sst2, así como receptores bombesin, receptores CCK, receptores VIP, receptores GLP-1, receptores de neurotensina, receptores de secretina, receptores neuromedina B y receptores CRF, etc. En ese caso, la administración de antagonistas SSTR2, en combinación como cóctel, con uno o más antagonistas radio-marcados a esos varios receptores debería mejorar sustancialmente la identificación in vivo de dichos tumores.

[0059] Dichos antagonistas péptidos con frecuencia se administran en forma de sales no tóxicas farmagológica o verterinariamente aceptables, como sales de adición de ácido o complejos de metales, por ejemplo con zinc, hierro, calcio, bario, magnesio, aluminio u otros semejantes. Son ilustrativos de dichos tipos no tóxicos de sales el hidroclorido, el hidrobromida, el sulfato, el fosfato, el tanato, el oxalato, el fumarato, el gluconato, el alginato, el maleato, el acetato, el citrato, el benzoato, el succinado, el malato, el ascorbato, el tartrato y otros semejantes.

[0060] También puede ser deseable dosificar esos antagonistas SRIF en períodos prolongados de tiempo, por ejemplo, en períodos de una semana a un año para una única administración, y también se pueden usar formas de liberación lenta, almacén o dosis por implante, que son bien conocidas. Por ejemplo, una forma de dosis puede contener una sal no tóxica farmacológicamente aceptable del compuesto que tiene un grado bajo de solubilidad en fluidos corporales. Por ejemplo, una sal de adición de ádico con base polibásica; una sal con catión polivalente de metal; o una combinación de las dos sales. También puede formularse una sal relativamente insoluble en un gel, por ejemplo, en un gel de estearato de aluminio. Una formulación adecuada, de liberación lenta para su inyección también podría contener un antagonista SRIF o una sal dispersada o encapulada en un polímero de degradación lenta, no tóxico o no antigénico, como un ácido poliláctico/polímero de ácido poliglicólico, por ejemplo, tal y como se describe en la Pat. de EEUU No. 3.773.919.

[0061] Las cantidades terapéuticamente efectivas de los antagonistas péptidos deben administrarse bajo la dirección de un médico y los compuestos farmacológicos normalmente contendrán el péptido en conjunto con un portador convencional, farmacológico o veterinario. Se considera una cantidad terapéuticamente efectiva la cantidad predeterminada calculada para conseguir el efecto deseado. La dosis necesaria variará con el tratamiento concreto y la duración del tratamiento deseado; de todas formas, se anticipa que para tratamiento terapéutico, las dosis serán de entre 10 microgramos y 1 miligramo por quilogramo de quilo de peso al día. Podría ser especialmente ventajoso administrar dichos compuestos en forma de depósito o de larga duración, tal y como se ha descrito antes. Una cantidad terapéuticamente efectiva normalmente es una cantidad de un antagonista SRIF que, cuando se administra de forma periférica, por ejemplo, intravenosa, en una composición aceptable fisiológicamente, es suficiente para conseguir una concentración de plasma de entre unos 0,1 mg/ml hasta unos 100 mg/ml, preferentemente desde aproximadamente un 1 mg/ml hasta aproximadamente 50 mg/ml, preferentemente como mínimo aproximadamente 2 mg/ml y normalmente entre 5 y 10 mg/ml. En estas cantidades, podrían usarse para actuar sobre la secreción gástrica.

[0062] Cuando el compuesto va a usarse para pruebas de imagen o tratamientos terapéuticos, el corto período de conservación del compuesto radiomarcado y/o la corta vida del radionucleídico pueden hacer necesario que el usuario lleve a cabo la reacción de marcado con el radionucleídico en el hospital clínico o laboratorio. En esos casos, los diferentes ingredientes reactivos pueden suministrarse al usuario en forma de un "kit". Las manipulaciones necesarias para llevar a cabo la reacción deseada deberían ser lo más sencillas que sea posible, para permitir al usuario que prepare el compuesto radioactivo marcado desde el kit usando instrumentos que normalmente vaya a tener a su disposición. Consecuentemente, un kit para preparar un compuesto radiofarmacéutico, para detectar y localizar tumores malignos y sus metástasis en tejidos podría incluir (i) un péptido selectivo SSTR2, un portado inerte farmacológicamente aceptable y/o un agente formulador con adyuvantes optativos, (ii) una solución de una sal o quelante de isótopo de metal radiactivo, e (iii) instrucciones para el uso con una receta para la reacción de los ingredientes incluidos en el kit.

[0063] Preferentemente, para el uso de un antagonista péptido como ingrediente de dicho kit se ha hecho la derivación a través de la reacción con un agente quelante , tal y como se ha definido. El conjugado péptido resultante da la capacidad de anexar firmemente el radionucleido de una forma sencilla. Los agentes queladores adecuados para la modificación del péptido se han descrito detalladamente en el presente documento. Los ácidos di- o poliacéticos que contienen N-o sus derivados, como los compuestos antes mencionados, han demostrado que son especialmente adecuados para unir varios radionucleidos de metales, como ^{111}In y ^{113m}In, a las moléculas del péptido. El kit que se entregará al usuario puede incluir también los otros ingredientes definidos antes, junto con las instrucciones de uso, mientras la solución de una sal o quelante del radionucleido, por tener un corto período de conservación, podría tener que entregarse al usuario por separado.

[0064] Por ejemplo, un kit para preparar un compuesto marcado radiofarmacéutico con ^{99m}Tc, ^{186}Re o ^{188}Re podría incluir, además de los ingredientes definidos en los anteriores (i) y (ii), un agente reductor y, si se desea, un quelato, e (iii) instrucciones de uso, con una receta para la reacción de los ingredientes del kit con ^{99m}Tc en la forma de una solución de pertecnato, o con ^{186}Re o ^{188}Re en la forma de una solución de perrenato. Si se desea, pueden combinarse varios ingredientes del kit, siempre que sean compatibles. El kit debería incluir un agente reductor para reducir el pertecnato o perrenato, por ejemplo, un ditionito, un agente reductor metálico o un agente reductor

complejo-estabilizador, por ejemplo $SnCl_2$, Sn(II)-tartrato, Sn(II)-fosfonato o -piro-fosfato, o Sn(II)-glucoheptonato. La solución de pertecnato o perrenato puede obtenerse de forma sencilla. Cuando el radionucleido está presente en sí mismo en el kit, la reacción de formación complejo con el péptido puede producirse de forma sencilla combinando los componentes en un medio neutral y causando su reacción. Para ese objeto, el radionucleido puede reactivarse con el péptido en la forma de un quelato ligado a un quelante comparativamente más débil, tal y como se ha descrito antes.

[0065] Cuando el kit comprenda un péptido derivado, tal y como se ha definido antes, y su objetivo sea la preparación de un compuesto farmacológico, marcado con 99mTc, 186Re or 188Re, el radionúclido preferentemente se añadirá de forma separada en la forma de una solución de pertecnato o perrenato. En ese caso, el kit incluirá un agente reductor apropiado y, si se desea, un quelante, el primero para reducir el pertecnato o el perrenato. Como agente reductor puede usarse, por ejemplo, un ditionito o un agente reductor metálico. Los ingredientes podrían combinarse, siempre que sean compatibles. El kit monocomponente, en el que los ingredientes combinados estarán preferentemente liofilizados, es muy apropiado para que el usuario efectúe la reacción con la solución del radionúclido. Podría usarse un agente metálico reductor, por ejemplo Sn(II), Ce(III), Fe(II), Cu(I), Ti(III) o Sb(III); Sn(II). El componente péptido de los kits antes mencionados podría entregarse en forma de solución, por ejemplo, en la forma de una solución salina fisiológica, o en algún tipo de solución búfer, pero preferiblemente estará presente en condición sólida, por ejemplo, liofilizada. Cuando se use como componente para líquido inyectable debería ser estéril, para lo que, cuando el componente esté en forma sólida, el usuario debería usar, preferiblemente, una solución salina fisiológica como disolvente. Si se desea, el componente antes mencionado puede estabilizase de forma convencional con un estabilizador adecuado, por ejemplo, con ácido ascórbico, ácido gentísico o sales de esos ácidos.

[0066] Aunque el invento se ha descrito de acuerdo con sus concreciones preferibles, que constituyen el mejor modo actualmente conocido para los inventores, debe entenderse que podrían hacerse varios cambios y modificaciones obvios para quien tenga capacidad en esta materia, sin apartarse del ámbito del invento que se establece en las reivindicaciones que se incluyen. Aunque las reivindicaciones definen el invento en términos de una secuencia de péptidos, debería entenderse que dicha definición pretende incluir sales no tóxicas que se conocen por ser plenamente equivalentes y que se administran muy frecuentemente.

[0067] En el presente documento, todas las temperaturas se expresan en °C y todas las ratios se hacen por volumen. Los porcentajes de materiales líquidos también se establecen en base al volumen.

Reivindicaciones

1. Un péptido análogo de somastotina cíclica (SRIF) que une de forma selectiva el receptor SSTR2 de SRIF, cuyo péptido tiene una de las secuencias de amino ácido donde la terminación C- está amidada:

Cpa-cyclo[D-Cys-4Aph(Cbm)-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-2Nal;

o

pNO2-Phe-cyclo[D-Cys-ITyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-D-Tyr

donde Cpa significa cloro-Phe, Aph(Cbm) significa 4-ureido-fenilalanina, Nal significa isómero de alanina, que se sustituye por naftilo en el átomo de β-carbono, pNO2-Phe significa p-nitrofenilalanina, ITyr significa L-tirosina yodinada.

2. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1 cuando se ligue a la Cpa o al pN02-Phe, una fracción (Z) seleccionada del grupo que consiste en quelatos basados en DOTA, quelatos basados en DTPA, quelatos basados en NOTA, compuestos de carbonilo, 2-hidrazino nicotinamida, quelantes N_4-, desferrioxamina, y quelatos N_xS_y-.

3. El péptido de acuerdo con la reivindicación 2 cuando un quelato DOTA se acople covalentemente al Cpa o al pN02-Phe.

4. Un compuesto farmacológico que incluya una mezcla del péptido de acuerdo con la Reivindicación 1 y por lo menos un portador farmacológicamente aceptable.