

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 646 192**

51 Int. Cl.:

C07K 14/655 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2009** **E 14170052 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017** **EP 2801582**

54 Título: **Antagonistas del receptor 2 de somatostatina**

30 Prioridad:

16.04.2008 US 104318

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

12.12.2017

73 Titular/es:

Salk Institute For Biological Studies (33.3%)
10010 North Torrey Pines Road
La Jolla, CA 92037-1099, 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

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes

ES 2 646 192 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).

Antagonistas del receptor 2 de somatostatina**Descripción****5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

El tetradecapéptido cíclico somatostatina-14 (SRIF) se aisló originalmente a partir del hipotálamo y se caracterizó como un inhibidor fisiológico de la liberación de la hormona del crecimiento (GH) desde la hipófisis anterior. Este tetradecapéptido tiene un puenteo o enlace de ciclación entre los grupos sulfhidrilo de los dos residuos aminoacídicos cisteinilo en las posiciones 3 y 14. SRIF y los análogos relacionados con SRIF influyen en múltiples procesos celulares, específicamente los relacionados con la liberación de GH, y también inhiben el crecimiento de determinados tumores. El análogo [D-Trp⁸]-SRIF, por ejemplo, tiene la secuencia de aminoácidos: (ciclo 3-14) H-Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys-OH, y tiene una potencia mucho mayor que SRIF para inhibir la liberación de GH.

SRIF induce sus efectos biológicos al interactuar con una familia de receptores unidos a la membrana, estructuralmente similares. Se han clonado cinco receptores de SRIF y se conocen como SSTR 1-5. Los cinco receptores se unen a SRIF y al péptido SRIF de 28 aminoácidos, SRIF-28 (procedente del tracto gastrointestinal porcino y del hipotálamo porcino y ovino), con alta afinidad. Se han identificado agonistas y antagonistas para los diversos SSTR.

Los péptidos y análogos de somatostatina pueden modificarse para permitir la unión selectiva de los SSTR individuales. Tales péptidos y análogos son útiles, por ejemplo, para diferenciar las funciones de señalización individuales de los receptores individuales. El uso de péptidos y análogos específicos de receptor ha llevado a la idea de que diferentes subtipos de receptores intervienen en distintas funciones de SRIF en el cuerpo. Se divulgan formas de realización ejemplares de agonistas de SSTR2 en D1 - D4.

Se han identificado y utilizado agonistas selectivos para SSTR2 y SSTR5, por ejemplo, para poner de manifiesto distintas funciones de estos receptores. Se cree que estos dos receptores son los subtipos predominantes en los tejidos periféricos. Se cree que SSTR2 interviene en la inhibición de la secreción de la hormona del crecimiento, el glucagón y el ácido gástrico. El octreótido, un agonista, muestra cierta especificidad para SSTR2. Por el contrario, SSTR5 parece estar implicado principalmente en el control de la liberación de insulina y amilasa. Se han descrito análogos con especificidad para SSTR2 y SSTR5, respectivamente.

SSTR3 interviene en la inhibición de la contracción del músculo liso gástrico. Se conocen análogos de somatostatina que se unen específicamente a SSTR3.

SSTR4 se encuentra en la hipófisis, pulmones, tracto gastrointestinal, riñones y determinados tumores con exclusión sustancial de los demás receptores de SRIF. Se cree que se activa tras la unión de SRIF. Se han utilizado ligandos específicos de SSTR4 y SSTR1, por ejemplo, en métodos para tratar células endoteliales. Se conocen en la técnica análogos peptídicos de la somatostatina selectivos de receptor que son específicos para SSTR4.

Los receptores de somatostatina se expresan en estados patológicos, particularmente en tumores neuroendocrinos del tracto gastrointestinal. La mayoría de los tumores humanos que se originan en el tejido diana para la somatostatina tienen receptores de somatostatina conservados. El efecto de la señalización de la somatostatina se observó por primera vez en los adenomas productores de hormona del crecimiento y los adenomas productores de TSH; aproximadamente la mitad de los adenomas inactivos endocrinos presentan receptores de somatostatina. El noventa por ciento de los carcinoides y la mayoría de los carcinomas de células de los islotes, incluida su metástasis, tienen normalmente una alta densidad de receptores de somatostatina. Sin embargo, solo el 10 por ciento de los carcinomas colorrectales y ninguno de los carcinomas de páncreas exocrino contienen receptores de somatostatina. Los receptores de somatostatina en los tumores pueden identificarse, por ejemplo, utilizando métodos de unión *in vitro* o utilizando técnicas de obtención de imágenes *in vivo*; estas últimas permiten la localización precisa de los tumores y su metástasis en los pacientes. Debido a que los receptores de somatostatina en los tumores gastroenteropancreáticos son funcionales, su identificación puede utilizarse para evaluar la eficacia terapéutica de un análogo para inhibir la excesiva liberación de hormonas en los pacientes.

En vista de su uso como dianas terapéuticas y de diagnóstico, existe la necesidad de antagonistas peptídicos de la somatostatina que se unan fuertemente a SSTR2, al tiempo que muestran solo una mínima propensión a unirse a los otros cuatro receptores. Para utilizarse como agentes para el diagnóstico por radioimágenes, tales antagonistas tendrían una ventaja sobre los agonistas selectivos para SSTR2 en el sentido de que los antagonistas preferentemente no se internalizarían.

RESUMEN

En el presente documento se describen composiciones relacionadas con nuevos antagonistas específicos de SSTR2 y métodos para utilizar los antagonistas descritos tal como se define en las reivindicaciones.

Una forma de realización se refiere a un antagonista de somatostatina que se une a SSTR2, en la que el antagonista es (xxvii) DOTA-Cpa-c[DCys-Tyr-Daph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]-DTyr-NH₂. En una forma de realización particular, el antagonista no se internaliza significativamente en células que expresan SSTR2, y reduce la internalización de SSTR2 inducida por octreótido. En una forma de realización particular, el antagonista de somatostatina comprende adicionalmente un quelante, un agente complejante, un agente conjugante o un marcador. En una forma de realización particular, el antagonista es captado preferentemente por los tumores en comparación con otro tejido. En una forma de realización particular, la relación entre la captación de antagonista en las células tumorales y la captación de antagonista en las células renales es al menos aproximadamente 2,0, medida 4 horas después de la administración.

Una forma de realización se refiere a un antagonista de somatostatina para utilizarse en un método de obtención de radioimágenes de cáncer, que comprende: (a) administrar una composición que comprende: un antagonista de somatostatina, y un radionúclido; y (b) detectar el radionúclido, en la que el antagonista de somatostatina es (xxvii) DOTA-Cpa-c[DCys-Tyr-Daph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]-DTyr-NH₂. En una forma de realización particular, el antagonista de somatostatina se une a SSTR2. En una forma de realización particular, el antagonista de somatostatina se une selectivamente a SSTR2.

Una forma de realización se refiere al uso de una composición para la fabricación de un medicamento para tratar un tumor, en la que la composición comprende un antagonista de somatostatina descrito en el presente documento y un radionúclido. En una forma de realización particular, el antagonista de somatostatina se une selectivamente a SSTR2.

Una forma de realización se refiere a un kit para el diagnóstico por radioimagen del cáncer, que comprende: (a) un antagonista de somatostatina según se describe en el presente documento en un recipiente adecuado, en la que el antagonista de somatostatina: (i) está marcado con al menos un radionúclido; (ii) no está marcado y está provisto de al menos un radionúclido en un recipiente adecuado para el marcado; o (iii) no está marcado y puede marcarse posteriormente con al menos un radionúclido; y (b) instrucciones de uso. En una forma de realización particular, el antagonista de somatostatina se une selectivamente a SSTR2.

Una forma de realización se refiere a un kit para el tratamiento del cáncer, que comprende (a) un antagonista de somatostatina según se describe en el presente documento en un recipiente adecuado, en la que, tras el marcado del antagonista de somatostatina con radionúclidos, el antagonista está presente en una cantidad terapéuticamente eficaz para el tratamiento del cáncer, y en la que el antagonista de somatostatina: (i) está marcado con al menos un radionúclido, (ii) no está marcado, y está provisto de al menos un radionúclido en un recipiente adecuado para el marcado, o (iii) no está marcado y puede marcarse posteriormente.

con al menos un radionúclido; y (b) instrucciones de uso. En una forma de realización particular, el antagonista de somatostatina se une selectivamente a SSTR2.

Una forma de realización se refiere a un compuesto para la obtención de radioimágenes o el tratamiento del cáncer que comprende una cantidad eficaz de un radionúclido acoplado a un antagonista de somatostatina según se describe en el presente documento. En una forma de realización particular, el antagonista se une selectivamente a SSTR2, no se internaliza significativamente en células que expresan SSTR2 y reduce la internalización de SSTR2 inducida por octreótido.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 ilustra las propiedades antagónicas de algunos de los antagonistas de sst₂ mediante un ensayo de liberación de calcio.

La FIG. 2 ilustra que, aunque el agonista de control [Tyr³]-octreótido puede inducir la internalización de sst₂, los antagonistas selectivos de sst₂ ensayados no tienen efecto cuando se administran en solitario, incluso a una concentración de 10 μM. Además, evitan la internalización de sst₂ inducida por [Tyr³]-octreótido.

La FIG. 3 muestra las propiedades antagónicas de otro análogo (32) en un ensayo de internalización ELISA.

La FIG. 4 es una tabla que muestra la pureza y eficacia de internalización de los antagonistas.

La FIG. 5 es una tabla que muestra las propiedades de unión de los antagonistas.

Las FIGS. 6A y 6B muestran datos que muestran la captación de los análogos de SSTR2 según se describe en el Ejemplo 11.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Tal como se utiliza en el presente documento, "un" se refiere a uno o más, a menos que se indique específicamente que se refiera solo a uno.

"Administración", tal como se utiliza en el presente documento, abarca todos los medios adecuados para proporcionar una sustancia a un paciente. Las vías comunes incluyen oral, sublingual, transmucosa, transdérmica, rectal, vaginal, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intratecal, mediante un catéter, mediante un implante, etc. En algunas formas de realización, una composición se administra cerca de o directamente al tumor, tal como mediante inyección directa en el tumor o inyección en sangre, como cuando el tumor es un tumor sanguíneo.

"Paciente", tal como se utiliza en el presente documento, incluye cualquier animal vertebrado, incluidas las especies equinas, ovinas, caprinas, bovinas, porcinas, aviares, caninas, felinas y de primates. Un paciente puede ser, por ejemplo, un ser humano. Un experto en la materia reconocerá que las moléculas coestimuladoras inmunitarias, moléculas de señalización, marcadores celulares, tipos de células, agentes infecciosos, etc., particulares, analizados con respecto a una especie, pueden tener análogos correspondientes en diferentes especies, y que la presente invención abarca tales análogos, y su uso en las especies correspondientes y relacionadas.

"Tumor", tal como se utiliza en el presente documento, incluye tumores sólidos y no sólidos; y diferentes estadios de desarrollo tumoral desde lesiones precancerosas y tumores benignos, hasta tumores cancerosos, malignos y metastásicos.

Tal como se utiliza en el presente documento, tal como en el contexto de los antagonistas de SSTR2, "captación" se refiere a la cantidad de antagonista que se encuentra asociado con un tumor; y se distingue de "internalización", que se refiere a las acciones a nivel de las células individuales, tal como la capacidad de una molécula para entrar en el entorno intracelular. Por lo tanto, diversas formas de realización de la invención tienen alta captación, pero no se internalizan.

Tal como se utiliza en el presente documento, todas las temperaturas están en °C, y todas las relaciones están en volumen. Los porcentajes de materiales líquidos también están en volumen.

La expresión "se une selectivamente" o "unión selectiva" se refiere en el presente documento a la unión preferencial de un antagonista a una pareja de unión particular, por ejemplo, un antagonista que se une selectivamente a SSTR2 se une fuertemente a SSTR2, presentando al mismo tiempo una unión débil o nula a otros SSTR o parejas de unión. Por lo general, un antagonista "selectivo" se une al receptor selectivo con una fuerza aproximadamente 10 veces, aproximadamente 100 veces o aproximadamente 1.000 veces (o más) mayor que a otros receptores.

La presente invención está relacionada con el descubrimiento inesperado de que modificaciones particulares son eficaces para crear análogos peptídicos de SRIF que son selectivos para SSTR2 a diferencia de los demás receptores de SRIF clonados. Se ha descubierto una clase de análogos peptídicos de la somatostatina que son altamente selectivos para SSTR2. Estos análogos peptídicos son antagonistas de la somatostatina, y, aunque no se internalizan en las células que tienen receptores SSTR2, estos análogos se captan en mayores cantidades que los agonistas peptídicos de la somatostatina selectivos de receptor comparables. Estos péptidos se unen selectivamente al SSTR2 clonado sin activar el receptor, y estos análogos peptídicos, cuando se yodan o se marcan radiactivamente, conservan sus propiedades biológicas deseables. Por lo tanto, estos nuevos péptidos son útiles para determinar la ubicación en el tejido y la expresión celular del receptor SSTR2, así como para regular determinadas funciones farmacológicas sin determinados efectos secundarios que las acompañaban hasta ahora característicos de la administración de SRIF. Estos antagonistas peptídicos de SRIF, cuando están marcados radiactivamente, pueden utilizarse, por ejemplo, en escintigrafía para localizar tumores que expresan estos receptores, *in vitro* o *in vivo*, mediante SPECT o PET. Se conocen en la técnica marcadores distintos de los marcadores radiactivos, por ejemplo, marcadores fluorescentes, y pueden utilizarse como alternativa. Cuando los análogos peptídicos incluyen un radionúclido quelado apropiado, estos análogos pueden hacer de radiofármacos que son adecuados para la terapia con radionúclidos en el tratamiento de tumores.

Se proporcionan antagonistas peptídicos de SRIF con una afinidad selectiva por el receptor de SRIF SSTR2; también tienen preferentemente una alta afinidad por SSTR2, por ejemplo, igual a una K_D de aproximadamente 10 nM o menos. Estos péptidos abarcan análogos cíclicos acortados de SRIF, en los que la porción de anillo se acorta a solo seis residuos, y en los que hay un residuo en el extremo N-terminal y, preferentemente, también hay un residuo añadido en el extremo C-terminal. En otras palabras, los residuos en la posición 1, 4, 5, 6, 11, 12 y 13 se eliminan del SRIF nativo de 14 residuos, creando diversos heptapéptidos. Estos heptapéptidos pueden tener un residuo, por ejemplo, un residuo 15, añadido en el extremo C-terminal para formar un octapéptido.

Las abreviaturas convencionales de tres letras identifican los residuos de aminoácidos alfa, y cuando el residuo de aminoácido tiene formas isoméricas, es la forma L del aminoácido la que se representa a menos que se indique expresamente de otra manera (por ejemplo, Ser = L-serina). "L" o "D" se refieren a cualquiera de los

isómeros L y D de un aminoácido particular. Cuando en lo sucesivo se haga referencia a una posición en el péptido, la numeración se hace en referencia a la posición correspondiente al péptido somatostatina de 14 residuos (SRIF) nativo.

5 Los ejemplos de antagonistas peptídicos representativos que presentan la especificidad deseada para SSTR2 incluyen, por ejemplo, antagonistas en los que los residuos en las posiciones 1, 4-6 y 11-13 están preferentemente eliminados. Los ejemplos incluyen (ciclo 3-14) Xaa₁-Xaa₂-D-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Xaa₁₀-Xaa₁₁-Xaa₁₂-Xaa₁₃-Xaa₁₄-Xaa₁₅-, en el que Xaa₁ es desXaa; Xaa₂ es Trp(A), Phe(B), Nal o Tyr (en el que A es H, Cl, F, Br, Me, NO₂, OMe o N-formilo y B es H, halógeno, CH₃, NO₂ u OCH₃); D-Xaa₃ es D-Cys, D-Pen, D-HCys u otro isómero D de α-aminoácido con una cadena lateral SH; Xaa₄, Xaa₅ y Xaa₆ son desXaa; Xaa₇ es Apb(Q₁), Ala(tienilo), Tyr, ITyr o Trp(A) (en el que Q₁ es Cbm, OH-Cbm, CH₃-Cbm, OCH₃-Cbm, OEt-Cbm, Cbm-Et(OEt)₂ u Hor); Xaa₈ 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); Xaa₉ es Lys, N^oMeLys, hLys, N^oMehLys, Om o N^oMeOm; Xaa₁₀ es Thr, Ser o Val; Xaa₁₁, Xaa₁₂ y Xaa₁₃ son des-Xaa; Xaa₁₄ es Cys, Pen, hCys u otro L-isómero de α-aminoácido con una cadena lateral SH; y Xaa₁₅ es 2Nal, D-2Nal, Aph(Q₂), D-Aph(Q₂), (R₁)Cha, (R₁)D-Cha, (R₁)Leu, (R₁)D-Leu, Tyr, D-Tyr, Trp, D-Trp o des-Xaa (en el que R₁ es H o C^oMe, y Q₂ es Cbm, OH-Cbm, CH₃-Cbm, OCH₃-Cbm u OEt-Cbm). Además, el Tyr en la posición 2 puede estar radioyodado, complejoado, conjugado o quelado con un agente fijado directamente o mediante un enlazador al grupo amino en posición alfa del residuo N-terminal de los análogos peptídicos. Los agentes pueden actuar, por ejemplo, para enlazar un núclido radiactivo, es decir, un radionúclido, al péptido. Por ejemplo, puede añadirse un quelante macrocíclico, tal como, por ejemplo, DOTA, en el extremo N-terminal uniéndolo directamente a Xaa₂ o indirectamente al mismo utilizando un enlazador tal como GABA (ácido gamma amino butírico, véase, por ejemplo, la patente estadounidense n° 6.022.523, cuyo contenido se incluye en el presente documento por referencia en su totalidad) o βAla.

25 Otro ejemplo de un análogo de SRIF comprende la secuencia de aminoácidos (ciclo 3-14) Xaa₁-Xaa₂-D-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-Lys-Thr-Xaa₁₁-Xaa₁₂-Xaa₁₃Cys; en la que Xaa₂ es Phe sustituido; D-Xaa₃ es D-Cys; Xaa₇ es Aph(Q₁), Tyr o ITyr; y Xaa₈ es D-Trp o D-Aph(Cbm); y en la que los grupos Xaa restantes son según se describe en el presente documento.

30 Tal como se utiliza en el presente documento, "Trp" y "D-Trp" se refieren al residuo no sustituido así como a un residuo en el que se realiza una sola sustitución del hidrógeno en la posición 5 o 6 en Trp. Los sustituyentes en estas posiciones pueden incluir, por ejemplo, cloro, fluoro, bromo, metilo, nitro y metoxi, sustituyendo el cloro, fluoro y bromo, o el formilo al hidrógeno del indol N.

35 Tal como se utiliza en el presente documento, "Nal" se refiere a un isómero de alanina que está sustituido por naftilo en el átomo de carbono en posición β, siendo preferentemente la fijación al naftaleno a la posición 2 en el anillo, u opcionalmente a la posición 1.

40 Tal como se utiliza en el presente documento, "Aph" se refiere a aminofenilalanina, en la que el grupo amino está preferentemente fijado a la posición 4 en el anillo fenilo, pero la fijación a la posición 2 o 3 es generalmente equivalente. Tal como se utiliza en el presente documento, "Aph(Cbm)" se refiere a 4-ureido-fenilalanina. Por Aph(OH-Cbm) se entiende 4-(3-hidroxi)-ureido-fenilalanina. Tal como se utiliza en el presente documento, "Aph(CH₃-Cbm)" se refiere a 4-(3-metil)-ureido-fenilalanina. Tal como se utiliza en el presente documento, "Aph(OCH₃-Cbm)" se refiere a 4-(3-metoxi)-ureido-fenilalanina. Tal como se utiliza en el presente documento, "Aph[(EtO)₂ET-Cbm]" se refiere a 4-{3-[2-(2-etoxi-etoxi)-etil]}-ureido-fenilalanina. Tal como se utiliza en el presente documento, "ITyr" se refiere a L-tirosina yodada. Tal como se utiliza en el presente documento, "Cpa" se refiere a cloro-Phe, por ejemplo, 4-ClPhe. Tal como se utiliza en el presente documento, "Aph(Hor)" se refiere a 4-[(2,6-dioxo-hexahidropirimidina-4-carbonil)-amino]-fenilalanina. Tal como se utiliza en el presente documento, "SRIF" se refiere al péptido somatostatina cíclico de 14 residuos. Tal como se utiliza en el presente documento, "Cha" se refiere a ciclohexilalanina. Tal como se utiliza en el presente documento, "Pen" se refiere a penicilamina (β-mercaptopivalina). Tal como se utiliza en el presente documento, "hLys" o "hCys" se refieren al α-aminoácido con un grupo CH₂ adicional en la cadena lateral.

55 El extremo C-terminal está normalmente amidado, aunque puede utilizarse un equivalente, por ejemplo, Gly-OH. El extremo N-terminal del péptido puede modificarse de diversas maneras sin influir negativamente en la afinidad de unión de manera significativa. Todas las modificaciones de estos péptidos cíclicos se consideran incluidas como parte de los péptidos divulgados en el presente documento. Se pueden realizar diversas adiciones, por ejemplo, al aminoácido N-terminal en forma de agente complejante o conjugante (Z) que, a continuación, puede utilizarse para unir un resto deseado al péptido o para proporcionar el marcado. Tal resto Z puede seleccionarse generalmente del grupo que consiste en quelantes basados en DOTA y DTPA, quelantes basados en NOTA, compuestos de carbonilo, 2-hidrazino nicotinamida (HYNIC), quelantes con N₄, desferrioxamina y quelantes con N₃S₂, todos ellos opcionalmente complejados con un radioisótopo, tirosina (Tyr) para la halogenación, un colorante fluorescente o biotina. Cpa también puede hacer de precursor para la trititación. Puede fijarse un quelante, tal como, por ejemplo, DTPA, DOTA, HYNIC y P₂S₂-COOH. Los quelantes incluyen, por ejemplo, p-NH₂-Bz-DOTA(ácido 2-pamino bencil-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético) y DOTA-p-NH₂-anilida [(p-aminoanilida) del ácido1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético]. Como alternativa, puede enlazarse covalentemente un

quelante al extremo N-terminal a través de un enlazador (L) adecuado si se desea. Los enlazadores adecuados incluyen, por ejemplo, tirosina, lisina, ácido diaminobutírico, ácido diaminopropiónico, polietilenglicol, ácidos grasos y sus derivados, B-alanina, ácido 5-aminovalérico, sarcosina y ácido glucerónico. Cuando Tyr aparece en el extremo N-terminal, puede estar radioyodado o marcado de otra manera. Los grupos acilo con no más de aproximadamente 20 aminoácidos también pueden estar presentes en el extremo N-terminal, ya que el residuo N-terminal también puede acilarse, si se desea, con un resto voluminoso sin pérdida de selectividad.

La selectividad para la unión de los péptidos análogos de la invención a SSTR2 se ha demostrado ensayando su interacción con los cinco diferentes receptores de SRIF humanos clonados. En general, las células recombinantes que expresan el receptor se lavan y se homogeneizan para preparar un homogeneizado de proteína bruta en un tampón adecuado. En un ensayo típico, se coloca una cantidad de proteína del homogeneizado celular en un pequeño volumen de un tampón de ensayo apropiado a un pH apropiado. Las sustancias candidatas, tal como los posibles agonistas y antagonistas de SRIF, se añaden a la mezcla a concentraciones convenientes, y se supervisa la interacción entre la sustancia candidata y el polipéptido receptor. Los antagonistas del receptor que se unen a SSTR2 pero también muestran afinidad por otros receptores pueden ser útiles en diversas composiciones y métodos, incluidos kits, y composiciones y métodos para el tratamiento y la obtención de imágenes de tumores. En formas de realización preferentes, los péptidos se unen sustancialmente de manera fuerte sólo a SSTR2, y su unión presenta alta afinidad.

Los ensayos de unión al receptor se realizan en receptores de SRIF clonados, y se utilizan ensayos competitivos para generar valores de CI_{50} que son indicativos de la concentración de un ligando competitivo necesario para desplazar una concentración de saturación de un ligando diana que se mide a partir del 50% de sitios de unión.

Por ejemplo, se divulga un método de detección de tumores malignos durante una intervención quirúrgica en el cuerpo de un ser humano en tejidos que en estado saludable no contienen cantidades sustanciales de SSTR2. El método incluye, por ejemplo (i) administrar a tal ser una composición que comprende, en una cantidad suficiente para la detección mediante una sonda detectora de gamma, un péptido selectivo para SSTR2, en el que el péptido está marcado, por ejemplo, radiactivamente con ^{99m}Tc , ^{161}Tb , ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{123}I o ^{125}I , y (ii) después de permitir que la sustancia activa se una a y sea captada en los tumores y después de la eliminación sanguínea de la radioactividad, someter a tal ser a una técnica de radiodetección en la zona pertinente del cuerpo utilizando una sonda detectora de gamma.

En una forma de realización, los antagonistas de SRIF divulgados en el presente documento son altamente selectivos para SSTR2, y son captados en mayores cantidades que otros agonistas peptídicos de SRIF conocidos que son solo parcialmente específicos para SSTR2. Más importante aún, los antagonistas de SRIF se consideran útiles en el tratamiento de células tumorales que expresan SSTR2. Tal tratamiento puede incluir, por ejemplo, radioterapia, cuyo éxito depende directamente de la cantidad de radiación absorbida por un tumor. Los antagonistas divulgados en el presente documento, cuando son captados y no necesariamente internalizados por una célula tumoral, son, por lo tanto, más eficaces que los agonistas conocidos para la radioterapia de tumores.

Los antagonistas divulgados en el presente documento también son útiles en escintigrafía para determinar la distribución de las células y tejidos que expresan SSTR2 en todo el cuerpo. El uso de imágenes externas mediante exploración con radioisótopos o mediante resonancia magnética permite la detección semicuantitativa dentro del cuerpo.

Los antagonistas divulgados en el presente documento también son útiles para bloquear selectivamente algunos de los efectos farmacológicos que están mediados por SSTR2. Los muchos efectos de SRIF son conocidos o serán conocidos en la técnica.

Los antagonistas marcados radiactivamente son útiles para el tratamiento terapéutico de tumores malignos en el cuerpo de un ser humano en tejidos que, en estado saludable, no contienen cantidades sustanciales de SSTR2. Los antagonistas peptídicos selectivos para SSTR2 marcados radiactivamente pueden administrarse en una composición que incluye una cantidad eficaz para la escintigrafía o para combatir o controlar los tumores. Los péptidos marcados radiactivamente pueden marcarse, por ejemplo, con ^{186}Re , ^{188}Re , ^{111}In , ^{113m}In , ^{71}As , ^{90}Y , ^{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 , ^{114}Ag , ^{124}I o ^{131}I .

Los análogos de SRIF marcados son útiles en ensayos de selección de fármacos para seleccionar nuevos péptidos y agentes no peptídicos eficaces que se unan con alta afinidad a SSTR2 y que sean antagonistas altamente eficaces. Utilizando un ligando según se describe en el presente documento que es selectivo para el receptor SSTR2, puede obtenerse una actividad basal para un receptor producido por recombinación. A continuación, puede llevarse a cabo un ensayo de unión competitiva para SSTR2 con el ligando marcado y el candidato para determinar la afinidad de unión relativa. Como alternativa, los posibles candidatos como inhibidores o modificadores, por ejemplo, antagonistas de la función del receptor, pueden incorporarse directamente en una mezcla de ensayo para determinar el efecto de tal candidato sobre el receptor. Al comparar el grado de actividad del

receptor en presencia o ausencia de la sustancia candidata, puede obtenerse información sobre el efecto de la sustancia candidata sobre la función normal del receptor y determinar así su función como agonista o como antagonista en comparación con un análogo selectivo para SSTR2 conocido. Los péptidos SRIF cíclicos descritos en los siguientes Ejemplos son antagonistas, y pueden emplearse para intervenir en la función normal de SSTR2.

Los péptidos descritos en el presente documento pueden sintetizarse mediante síntesis en solución clásica, pero los péptidos amidados se sintetizan preferentemente mediante una técnica en fase sólida, como sobre una resina metilbenzimidilamina (MBHA) o una resina BHA, tal como se conoce en esta técnica. Los péptidos con un carboxilo libre C-terminal pueden sintetizarse como se muestra en la patente estadounidense nº 7.019.109. Los péptidos con un extremo C-terminal amidado pueden sintetizarse como se muestra en la patente estadounidense nº 5.874.227. La síntesis en fase sólida se lleva a cabo de manera que añada aminoácidos en la cadena que comienza en el extremo C-terminal de manera progresiva. Los grupos protectores de cadena lateral, que se conocen en la técnica, se incluyen como parte de cualquier aminoácido que tenga una cadena lateral particularmente reactiva y, opcionalmente, pueden utilizarse en el caso de otros tales como Trp, en los que dichos aminoácidos se acoplan a la cadena que se está formando sobre la resina. Tal síntesis proporciona una peptidoresina intermedia completamente protegida. Los grupos protectores generalmente se separan y el péptido se escinde del soporte de resina antes de oxidarse para crear un enlace disulfuro entre las cadenas laterales Cys.

Los análogos de SRIF descritos en el presente documento también son útiles para indicaciones terapéuticas, tales como moduladores de somatostatina. En este uso, los análogos son generalmente eficaces a niveles inferiores a aproximadamente 100 microgramos por kilogramo de peso corporal, inferiores a aproximadamente 1.000 microgramos por kilogramo de peso corporal, inferiores a aproximadamente 100 microgramos por kilogramo de peso corporal, inferiores a aproximadamente 10 microgramos por kilogramo de peso corporal, o inferiores a aproximadamente 1 microgramo por kilogramo de peso corporal. Para una acción prolongada, puede ser deseable utilizar niveles de dosificación de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2,5 miligramos por kilogramo de peso corporal. Estos análogos son solubles en agua y, por lo tanto, pueden prepararse como soluciones relativamente concentradas para la administración.

Los péptidos divulgados en el presente documento no solo proporcionan ligandos más selectivos para la unión de SSTR2, sino que el uso de péptidos marcados, por ejemplo, una versión marcada radiactivamente de los péptidos descritos en el presente documento puede facilitar la selección de fármacos para antagonistas aún más eficaces.

Los ensayos de cribado, que se conocen en la técnica, pueden emplear el polipéptido receptor SSTR2 directamente del huésped recombinante, y pueden utilizarse para identificar agentes útiles para bloquear o imitar determinados aspectos de la somatostatina según se desee, eliminando al mismo tiempo los aspectos no deseados de la hormona que pueden surgir de la activación o el bloqueo de otros receptores. A este respecto, si se desea un análogo radioyodado para fines de cribado, se puede añadir Tyr en el extremo N-terminal en lugar de DOTA, o puede utilizarse Tyr en la posición 2 en lugar de Cpa, o puede fijarse un radioligando adecuado mediante un quelante DOTA. Los ensayos de unión competitiva con los compuestos candidatos pueden llevarse a cabo en primer lugar de esta manera con SSTR2 para buscar una alta afinidad de unión; a continuación, mediante cribado de los múltiples receptores de SRIF, podría confirmarse si hubo una unión selectiva sólo a este receptor, como se desea. Pueden utilizarse péptidos no marcados radiactivamente para tratar enfermedades de todos los órganos que se sabe expresan SSTR2, incluidos el pulmón, el tracto gastrointestinal y los riñones.

Debido a que las adiciones al extremo N-terminal del análogo de SRIF no parecen influir negativamente en la unión selectiva, debe quedar claro que estos compuestos pueden complejarse con un núclido radiactivo con el fin de llevar ese agente a un tumor o a otro tejido para el cual se desea la apoptosis. Por ejemplo, pueden utilizarse quelantes adecuados, tales como DOTA o DTPA u otros, para complejar el análogo de SRIF con un metal altamente radiactivo como se ha indicado anteriormente en el presente documento. Algunos ejemplos de grupos quelantes adecuados para quelar un átomo de metal radiactivo son los quelantes tetradentados o grupos derivados del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido ciclohexil-1,2-diaminotetraacético (CDTA), ácido etilenglicol-0,0'-bis(2-aminoetil)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), ácido N,N-bis(hidroxibencil)-etilendiamina-N,N'-diacético (HBED), ácido trietilen tetramina hexaacético (TTHA), ácido 1,4,7,1 O-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA), ácido hidroxietildiamina triacético (HEDTA), ácido 1,4,8,11-tetraazaciclo-tetradecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (TETA), DTPA sustituido, EDTA sustituido. Se divulgan otros quelantes, así como agentes radiactivos, en los documentos WO 95/22341 y WO 04/082722 y en las publicaciones de patente estadounidense 2004/0242842 y 2005/0070470. Los quelantes pueden derivarse, por ejemplo, de EDTA y DOTA. Algunas sales adecuadas son ^{111}In -oxina, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tartrato, que generalmente puede formarse de manera simple en condiciones que no son perjudiciales para el antagonista peptídico.

La solubilidad de los antagonistas de SRIF puede mejorarse por acilación del grupo amino N-terminal utilizando un compuesto hidrófilo, tal como, por ejemplo, ácido hidroorótico (Hor) o similar, o mediante reacción con un isocianato adecuado, tal como como metilisocianato o isopropilisocianato, para crear un resto urea en el extremo N-terminal. También pueden enlazarse otros agentes al extremo N-terminal que aumentan la duración de la acción del antagonista de SRIF como se conoce en esta técnica.

Estos antagonistas de SRIF o sales no tóxicas de los mismos, combinados con un transportador farmacéutica o veterinariamente aceptable para formar una composición farmacéutica, pueden administrarse a animales, incluidos seres humanos y otros mamíferos, por vía intravenosa, subcutánea, intramuscular, percutánea, por ejemplo, por vía intranasal, intracerebrospinal u oral. Tal composición farmacéutica diseñada para utilizarse para detectar tumores humanos malignos, incluida la metástasis de los mismos, en tejidos puede incluir, además de un material de transporte farmacéuticamente aceptable, y un adyuvante opcional farmacéuticamente aceptable, el antagonista peptídico marcado como sustancia activa, en una cantidad suficiente para formar imágenes externas, para la detección mediante una sonda detectora de gamma o para combatir o controlar los tumores. Los antagonistas peptídicos deben tener una pureza de al menos aproximadamente un 90% y, preferentemente, deben tener una pureza de al menos aproximadamente un 98%; sin embargo, son eficaces purezas inferiores y pueden utilizarse con mamíferos que no sean seres humanos. Esta pureza se refiere a que el péptido deseado constituye el % en peso indicado de todos los péptidos y fragmentos peptídicos similares presentes. La administración a seres humanos debe estar bajo la dirección de un médico para combatir tumores y cánceres específicos o para intervenir en otras afecciones en las que los receptores SSTR2 ejercen una función de control, tal como el acoplamiento a una tirosina fosfatasa de manera que pueda llevarse a cabo la estimulación de esta enzima para intervenir en los efectos antiproliferativos de SRIF. La dosificación requerida variará en función de la afección particular que se está tratando, de la gravedad de la afección y de la duración del tratamiento deseado.

Los tumores expresan con frecuencia varios tipos de receptores peptídicos (Reubi, J. y Waser, B., Eur. J. Nucl. Med. Molec. Imaging, 30:781-793, 2003). Tales grupos de múltiples receptores peptídicos pueden incluir receptores sst₂, así como receptores de bombesina, receptores de CCK, receptores de VIP, receptores de GLP-1, receptores de neurotensina, receptores de secretina, receptores de neuromedina B y receptores de CRF, etc. En tal caso, la administración de antagonistas de SSTR2, en combinación como un cóctel, con uno o más antagonistas marcados radiactivamente para estos diversos receptores debería mejorar considerablemente la dianización *in vivo* a tales tumores.

Tales antagonistas peptídicos se administran con frecuencia en forma de sales no tóxicas farmacéutica o veterinariamente aceptables, tales como sales de adición de ácido o complejos metálicos, por ejemplo, con zinc, hierro, calcio, bario, magnesio, aluminio o similares. Son ilustrativas de tales sales no tóxicas el clorhidrato, bromhidrato, sulfato, fosfato, tannato, oxalato, fumarato, gluconato, alginato, maleato, acetato, citrato, benzoato, succinato, malato, ascorbato, tartrato y similares.

También puede ser deseable suministrar estos antagonistas de SRIF durante períodos de tiempo prolongados, por ejemplo, durante períodos de una semana a un año a partir de una sola administración, y pueden utilizarse formas farmacéuticas de liberación lenta, de depósito o de implante como se conoce en esta técnica. Una forma farmacéutica puede contener, por ejemplo, una sal no tóxica farmacéuticamente aceptable del compuesto que tenga un bajo grado de solubilidad en los fluidos corporales, por ejemplo, una sal de adición de ácido con un ácido polibásico, una sal con un catión de metal polivalente, o una combinación de las dos sales. Una sal relativamente insoluble también puede formularse en un gel, por ejemplo, un gel de estearato de aluminio. Una formulación de depósito de liberación lenta adecuada para inyección puede contener también un antagonista de SRIF, o una sal del mismo, dispersado o encapsulado en un polímero no tóxico o no antigénico de degradación lenta, tal como un polímero de ácido poliláctico/ácido poliglicólico, por ejemplo, según se describe en la patente estadounidense nº 3.773.919.

Las cantidades terapéuticamente eficaces de los antagonistas peptídicos deben administrarse bajo la dirección de un médico, y las composiciones farmacéuticas contendrán normalmente el péptido junto con un transportador convencional farmacéutica o veterinariamente aceptable. Se considera que una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad predeterminada calculada para conseguir el efecto deseado. La dosificación necesaria variará en función del tratamiento particular y de la duración del tratamiento deseado; sin embargo, se prevé el uso de dosis de entre aproximadamente 10 microgramos y aproximadamente 1 miligramo por kilogramo de peso corporal al día para el tratamiento terapéutico. Puede ser particularmente ventajoso administrar tales compuestos en forma de depósito o de larga duración como se ha descrito anteriormente. Una cantidad terapéuticamente eficaz es por lo general una cantidad de un antagonista de SRIF que, cuando se administra periféricamente, por ejemplo, por vía intravenosa, en una composición fisiológicamente aceptable, es suficiente para conseguir una concentración plasmática de la misma de aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 100 µg/ml, de aproximadamente 1 µg/ml a aproximadamente 50 µg/ml, o al menos de aproximadamente 2 µg/ml (normalmente de 5 µg/ml a 10 µg/ml). En estas cantidades, pueden utilizarse para influir de manera deseable en la secreción gástrica.

Cuando la composición vaya a utilizarse para la obtención de imágenes o tratamientos terapéuticos, el escaso período de validez del compuesto marcado radiactivamente y/o la corta semivida del radionúclido puede requerir que el usuario lleve a cabo la reacción de marcado con el radionúclido en el hospital clínico o el laboratorio. En tales casos, los diversos ingredientes de reacción pueden proporcionarse al usuario en forma de "kit". Las manipulaciones necesarias para realizar la reacción deseada deberían ser lo más simples posible para permitir al usuario preparar la composición marcada radiactiva del kit utilizando instalaciones que se estén normalmente a su disposición. Por consiguiente, un kit para preparar una composición radiofarmacéutica, para detectar y localizar

tumores malignos y sus metástasis en tejidos podría comprender (i) un péptido selectivo para SSTR2, un agente de formulación y/o transportador inerte farmacéuticamente aceptable con adyuvantes opcionales, (ii) una solución de una sal o quelato de un isótopo de metal radioactivo, y (iii) instrucciones de uso con una receta para la reacción de los ingredientes presentes en el kit.

Un antagonista peptídico para utilizarse como ingrediente de un kit de este tipo puede derivatizarse mediante una reacción con un quelante. El conjugado peptídico resultante proporciona facilidad para fijar con firmeza el radionúclido de manera simple. Los ácidos di o poliacéticos que contienen N o sus derivados, tales como los compuestos mencionados anteriormente, han demostrado ser especialmente adecuados para fijar diversos radionúclidos metálicos, tales como ^{111}In y $^{113\text{m}}\text{In}$, a las moléculas peptídicas. El kit a suministrar al usuario también puede comprender los demás ingredientes definidos anteriormente, junto con instrucciones de uso, mientras que la solución de una sal o quelato del radionúclido con un período de validez limitado, puede suministrarse al usuario por separado.

Un kit para preparar una composición radiofarmacéutica marcada con $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{186}Re o ^{188}Re puede comprender, por ejemplo, además de los ingredientes definidos en los (i) y (ii) anteriores, un agente reductor y, si se desea, un quelante, y (iii) instrucciones de uso, con una receta para hacer reaccionar los ingredientes del kit con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ en forma de solución de pertecnetato, o con ^{186}Re o ^{188}Re en forma de solución de perrenato. Si se desea, pueden combinarse diversos ingredientes del kit, siempre que sean compatibles. El kit debe comprender un agente reductor para reducir el pertecnetato o perrenato, por ejemplo, un ditionito, un agente reductor metálico o un agente reductor estabilizador de complejos, por ejemplo, SnCl_2 , Sn(II)-tartrato , Sn(II)-fosfonato o -piro-fosfato, o $\text{Sn(II)-glucoheptonato}$. La solución de pertecnetato o perrenato puede obtenerse sencillamente de un proveedor adecuado. Cuando el radionúclido está presente en el propio kit, la reacción de formación del complejo con el péptido puede producirse sencillamente combinando los componentes en un medio neutro y haciendo que reaccionen. Para ello, puede hacerse reaccionar el radionúclido con el péptido en forma de quelato unido a un quelante comparativamente débil, según se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Cuando el kit comprende un péptido derivatizado tal como se ha definido anteriormente en el presente documento, y está destinado a la preparación de una composición radiofarmacéutica, marcado con $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{186}Re o ^{188}Re , el radionúclido se añadirá preferentemente por separado en forma de solución de pertecnetato o perrenato. En ese caso, el kit comprenderá un agente reductor adecuado y, si se desea, un quelante, el primero para reducir el pertecnetato o el perrenato. Como agente reductor puede utilizarse, por ejemplo, un ditionito o un agente reductor metálico. Los ingredientes pueden combinarse opcionalmente, siempre que sean compatibles. Un kit monocomponente de este tipo, en el que los ingredientes combinados están preferentemente liofilizados, es adecuado para que el usuario lo haga reaccionar con la solución de radionúclido. Puede utilizarse un agente reductor metálico, por ejemplo, Sn(II) , Ce(III) , Fe(II) , Cu(I) , Ti(III) o Sb(III) ; Sn(II) . El constituyente peptídico de los kits puede suministrarse como solución, por ejemplo, en forma de solución salina fisiológica, o en alguna solución tampón, pero está presente preferentemente en estado seco, por ejemplo, en estado liofilizado. Cuando se utiliza como componente para un líquido de inyección, debe ser estéril. Cuando el constituyente está en estado seco, el usuario debe utilizar una solución salina fisiológica estéril como disolvente. Si se desea, el constituyente puede estabilizarse de forma convencional con estabilizadores adecuados, por ejemplo, ácido ascórbico, ácido genticónico o sales de estos ácidos.

Aunque las reivindicaciones definen de diversas maneras la invención en términos de una secuencia peptídica, debe entenderse que ésta pretende incluir sales no tóxicas de la misma que se sabe son el equivalente completo de la misma y que se administran con mayor frecuencia.

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar formas de realización preferentes de la invención. Los expertos en la materia deben entender que las técnicas divulgadas en los ejemplos que a continuación siguen representan técnicas descubiertas por el inventor para funcionar bien en la puesta en práctica de la invención, y por lo tanto puede considerarse que constituyen modos preferentes para su puesta en práctica.

EJEMPLOS

Los siguientes Ejemplos ilustran la provisión de un número de antagonistas peptídicos de SRIF. En cada péptido, los residuos de cisteína en las posiciones 3 y 14 (numeración según SRIF) están unidas por el enlace disulfuro de ciclación, y pueden ser anotados como "(ciclo 3-14)" o "c[]".

Ejemplo 1.

Se sintetiza el análogo de somatostatina DOTA-des-AA^{1,4,5,6,11,12,13}[Cpa²,D-Cys³,Tyr⁷,D-4Aph(Cbm)⁸]-SRIF-2Nal-NH₂ que tiene la estructura: (ciclo 3-14) DOTA-Cpa-D-Cys-Tyr-D-4Aph(Cbm)-Lys-Thr-Cys-2Nal-NH₂. (Péptido 28). Se utilizó una metodología en fase sólida empleando la estrategia BOC para sintetizar el octapéptido de manera progresiva sobre una resina MBHA, generalmente según se describe en el "Ejemplo II" de la patente '277. Se preparó previamente Boc-D-4Aph(Cbm)-OH y se acopló en la posición 8.

Después de escindir el péptido a partir de la resina y eliminar simultáneamente los grupos protectores de cadena lateral (excepto Fmoc de Lys) mediante HF, se oxidó el péptido para crear el puente disulfuro en solución de ácido acético al 75% añadiendo una solución de yodo al 10 por ciento en metanol hasta que la solución resultante se mantuvo de color naranja, agitando a continuación durante 40 minutos e inactivándola con ácido ascórbico. El péptido bruto se purificó mediante RP-HPLC preparativa, utilizando un gradiente lineal de aumentos del 1% de B por minuto desde el % de B basal (eluyente A = TFA al 0,1%, eluyente B = CH₃CN al 60%, A al 40%) a un caudal de 100 ml/min. A continuación, se acopló DOTA en el extremo N-terminal como quelante añadiendo DOTA-NHS.3TFA.HPF₆ (Macrocylics, Dallas, TX) (198 mg, ~ 20 µM) en DMF (1 ml) y N,N'-diisopropiletilamina (DIPEA) (36 µl, ~ 22 µM) al péptido purificado (32 mg, ~ 20 µM) en N,N-dimetilformamida seca (DMF, 3,5 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El desarrollo de la reacción se siguió mediante HPLC analítica, y el análisis MS mostró que se había obtenido el producto deseado puro DOTA-des-AA^{1,4,5,6,11,12,13}[Cpa²,DCys³,Tyr⁷,D-4Aph(Cbm)⁸,Lys(Fmoc)⁹]-SRIF-2Nal-NH₂. Al término de la reacción, se consiguió eliminar el grupo protector Fmoc de la cadena lateral Lys⁹ añadiendo 4 ml de una solución de piperidina al 20% en DMF y esperando 30 minutos. El DOTA-des-AA^{1,4,5,6,11,12,13}[Cpa²,D-Cys³,Tyr⁷,D-4Aph(Cbm)⁸]-SRIF-2Nal-NH₂ se desaló mediante RP-HPLC preparativa utilizando las mismas condiciones que las descritas anteriormente. La pureza del péptido conjugado con DOTA cíclico final se determinó mediante CZE analítica. Tenía una pureza del 94%.

El análisis MS muestra una masa $[M+H]^+$ de 1.583,72 Da, que se compara muy favorablemente con la masa calculada de 1.583,62 Da. El péptido se denomina en lo sucesivo Péptido nº 28.

Ejemplo 2.

Se repitió la síntesis inicial descrita en el Ejemplo 1, con dos cambios; se utilizaron 4Aph(Cbm) y D-Trp en las posiciones 7 y 8 para proporcionar el octapéptido-resina: des-AA^{1,4,5,6,11,12,13}[Cpa²,D-Cys³,4Aph(Cbm)⁷,D-Trp⁸,Lys(Fmoc)⁹]-SRIF-2Nal-resina MBHA.

Después escindir el péptido de la resina como la amida y eliminar al mismo tiempo los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos (excepto Fmoc de Lys) mediante HF, se oxidó el péptido para crear el puente disulfuro en solución de ácido acético al 75% añadiendo una solución de yodo en metanol hasta que la solución resultante se mantuvo de color naranja, agitando a continuación durante 40 minutos e inactivándola con ácido ascórbico. El péptido bruto se purificó mediante RP-HPLC preparativa, utilizando un gradiente lineal de aumentos del 1% de B por minuto desde el % de B basal (eluyente A = TFA al 0,1%, eluyente B = CH₃CN al 60%, A al 40%) a un caudal de 100 ml/min. Al péptido purificado (34 mg ~ 24 µM) en N,N-dimetilformamida seca (DMF, 3,5 ml) se añadió DOTA-NHS.3TFA.HPF₆ (Macrocylics, Dallas, TX) (24 mg, 24,2 µM) en DMF (150 µl) y N,N'-diisopropiletilamina (DIPEA) (40 µl, 24 µM). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El desarrollo de la reacción se siguió mediante HPLC analítica, y al término de la reacción, se añadió 1 ml de piperidina a la mezcla de reacción para eliminar el grupo protector Fmoc de la cadena lateral Lys⁹ durante 30 minutos dando como resultado DOTA-des-AA^{1,4,5,6,11,12,13}[Cpa²,D-Cys³,4Aph(Cbm)⁷,D-Trp⁸]-SRIF-2Nal-NH₂, que tiene la fórmula: (ciclo 3-14) DOTA-Cpa-D-Cys-4Aph(Cbm)-D-Trp-Lys-Thr-Cys-2Nal-NH₂.

Este péptido se desaló mediante RP-HPLC preparativa utilizando las mismas condiciones descritas anteriormente. Se determinó mediante CZE analítica que la pureza del conjugado DOTA-péptido cíclico final era de aproximadamente un 98%. El análisis MS mostró una masa $[M+H]^+$ de 1.606,50 Da, que es comparable al valor calculado de 1.606,64 Da. Se denomina Péptido nº 14.

Ejemplo 3.

Se repitió la síntesis expuesta en el Ejemplo 1, omitiendo 2Nal en el extremo C-terminal y sustituyendo Tyr⁷ por 4Aph(Hor). Boc-4Aph(Hor)-OH se preparó previamente tal como se describe (Jiang, G. *et al.*, J. Med. Chem., 44:453-467). La escisión, desprotección, ciclación y purificación del péptido se llevaron a cabo como en el Ejemplo 1. El péptido cíclico purificado tiene la fórmula: (ciclo 3-14) DOTA-Cpa-D-Cys-4Aph(Hor)-D-4Aph(Cbm)-Lys-Thr-Cys-NH₂. Tenía una pureza según la CZE de aproximadamente un 98%. Se conoce como Péptido nº 33. El análisis MS mostró una masa $[M+H]^+$ de 1.525,68 Da, que es comparable al valor calculado de 1.525,58 Da.

Ejemplo 4.

Se repitió la síntesis expuesta en el Ejemplo 1, con un cambio; en lugar de pCl-Phe en el extremo N-terminal, se utilizó pNO₂-Phe. La escisión, desprotección, ciclación y purificación del péptido se llevaron a cabo como en el Ejemplo 1. El péptido cíclico purificado tiene la fórmula: (ciclo 3-14) DOTA-pNO₂-Phe-D-Cys-Tyr-D-4Aph(Cbm)-Lys-Thr-Cys-2Nal-NH₂. Tenía una pureza según la CZE de aproximadamente un 98%. Se denomina Péptido nº 5. El análisis MS mostró una masa $[M+H]^+$ de 1.594,17 Da, que es comparable al valor calculado de 1.594,65 Da.

Ejemplo 5.

Se repitió la síntesis inicial descrita en el Ejemplo 1, con un cambio; se utilizó Aph(Hor) en lugar de Tyr en la posición 7 para proporcionar el octapéptido-resina: des-AA^{1,4,5,6,11,12,13}[Cpa²,D-Cys³,4Aph(Hor)⁷,D-Aph(Cbm)⁸,Lys(Fmoc)⁹]-SRIF-2Nal-resina MBHA. A continuación, se llevaron a cabo las reacciones según se describe en el Ejemplo 2, dando como resultado DOTA-des-AA^{1,4,5,6,11,12,13}[Cpa²,D-Cys³,4Aph(Hor)⁷,D-Aph(Cbm)⁸]-SRIF-2Nal-NH₂, que tiene la fórmula: (ciclo 3-14) DOTA-Cpa-D-Cys-4Aph(Hor)-D-Aph(Cbm)-Lys-Thr-Cys-2Nal-NH₂ (Péptido 30).

Se determinó mediante CZE analítica que la pureza del conjugado DOTA-péptido cíclico final era de aproximadamente un 98%. El análisis MS mostró una masa $[M+H]^+$ de 1.722,56 Da, que es comparable al valor calculado de 1.722,65 Da.

Ejemplo 6.

Se repitió la síntesis expuesta en el Ejemplo 5, sustituyendo 2Nal por D-Tyr en el extremo C-terminal. La escisión, desprotección, ciclación y purificación del péptido se llevaron a cabo como en el Ejemplo 1. El péptido cíclico purificado tiene la fórmula: (ciclo 3-14) DOTA-Cpa-D-Cys-4Aph(Hor)-D-4Aph(Cbm)-Lys-Thr-Cys-D-Tyr-NH₂. Tenía una pureza según la CZE de aproximadamente un 98%. Se conoce como Péptido n° 31. El análisis MS mostró una masa $[M+H]^+$ de 1.688,83 Da, que es comparable al valor calculado de 1.688,64 Da.

Ejemplo 7

Se repitió la síntesis expuesta en el Ejemplo 4, sustituyendo 2Nal por D-Tyr en el extremo C-terminal. La escisión, desprotección, ciclación y purificación del péptido se llevaron a cabo como en el Ejemplo 1. El péptido cíclico purificado tiene la fórmula: (ciclo 3-14) DOTA-pNO₂-Phe-D-Cys-Tyr-D-4Aph(Cbm)-Lys-Thr-Cys-D-Tyr-NH₂. Tenía una pureza según la CZE de aproximadamente un 98%. Se denomina Péptido n° 3. El análisis MS mostró una masa $[M+H]^+$ de 1.560,63 Da, que es comparable al valor calculado de 1.560,83 Da.

Ejemplo 8.

Se repitió la síntesis descrita en el Ejemplo 7, con dos cambios; se utilizó ITyr en la posición 7 y se utilizó D-Trp en la posición 8 para proporcionar el octapéptido-resina: des-AA^{1,4,5,6,11,12,13}[pNO₂-Phe²,D-Cys³,ITyr⁷,D-Trp⁸,Lys(Fmoc)⁹]-SRIF-D-Tyr-resina MBHA.

Después de escindir el péptido a partir de la resina como la amida y llevar a cabo las reacciones según se describe generalmente en el Ejemplo 2, se obtuvo el péptido que tiene la fórmula: (ciclo 3-14) DOTA-pNO₂-Phe-D-Cys-ITyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-D-Tyr-NH₂ (Péptido 32). Se determinó mediante CZE analítica que la pureza del conjugado DOTA-péptido cíclico final era de aproximadamente un 98%. El análisis MS mostró una masa $[M+H]^+$ de 1.667,74 Da, que es comparable al valor calculado de 1.667,52 Da.

Ejemplo 9

Bioensayo *in vitro*. Los efectos de los diversos análogos de somatostatina se ensayaron *in vitro* para determinar su capacidad para unirse a los receptores clonados aislados expresados en células CHO-K1 y células CCL39. La clonación molecular de los genes que codifican múltiples subtipos de receptores de somatostatina permitió la expresión individual de estos receptores en células de mamífero y la caracterización de sus respectivos perfiles farmacológicos. Se han clonado cinco de estos subtipos de receptores, denominados SSTR1 a SSTR5, (Raynor, K. *et al.*, Mol. Pharmacol., 43:838-844, 1993; Raynor, K. *et al.*, Mol. Pharmacol., 44:385-392, 1993). Estas referencias describen ensayos de unión que pueden utilizarse para determinar si análogos de SRIF particulares se unen selectivamente a uno o más de los cinco tipos de receptores y también si se unen a tales tipos de receptores con alta o baja afinidad. Cada subtipo de receptor puede intervenir en efectos fisiológicos de SRIF distintos pero solapantes. Como resultado, los compuestos que se unen selectivamente a los receptores SSTR2, por ejemplo, pueden utilizarse para modular una función fisiológica de SRIF particular sin tener posiblemente un efecto no deseado resultado de otra función fisiológica de SRIF que está mediada por otros receptores de SRIF.

Se cultivaron células CHO-K1 en medio F-12 de Ham, y se cultivaron células CCL39 en una mezcla de medio de Eagle modificado por Dulbecco/F-12 de Ham (1:1), complementado con suero bovino fetal al 10%, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin, en aire humidificado que contenía CO₂ al 5% a 37°C. Las células se lavaron dos veces con y se rasparon en Tris-HCl 0,05 M (pH 7,4) enfriado en hielo, se recogieron por centrifugación, y se homogeneizaron utilizando un sistema de rotor-estator en el mismo tampón. Después de centrifugación a 120 g durante 5 minutos a 4°C, se recogió el sobrenadante y se centrifugó de nuevo a 48.000 g durante 30 minutos a 4°C. El sedimento resultante se resuspendió en tampón Tris enfriado en hielo, se transfirió a un tubo de microcentrífuga y se centrifugó a 20.000 g durante 15 minutos a 4°C. Después de extraer el sobrenadante, el sedimento de membranas se almacenó a -80°C.

Se realizó la autorradiografía de receptores en secciones de criostato de 20 µm de espesor de los sedimentos de membranas, se montaron en portaobjetos de microscopio, y, a continuación, se almacenaron a -20°C. Para cada uno de los compuestos ensayados, se realizaron experimentos de desplazamiento completo con el

ligando de somatostatina universal radioligando ^{125}I -[Leu,D-Trp²²,Tyr²⁵]-somatostatina-28 que se une con fuerte afinidad hacia los cinco receptores. Se utilizaron concentraciones crecientes del péptido no marcado que iban de 0,1 nM-1.000 nM. Se procesó en paralelo la somatostatina-28 no marcada utilizando las mismas concentraciones crecientes, como control. Los valores de CI_{50} se calcularon después de la cuantificación de los datos utilizando un sistema de procesamiento de imágenes asistido por ordenador como se conoce en esta técnica.

A concentraciones de 100 nM, el Péptido nº 28 tuvo efectos mínimos sobre la unión del radioligando SRIF-28 a SSTR1, SSTR3, SSTR4 y SSTR5. Por el contrario, se unía selectivamente a SSTR2, desplazando la unión del radioligando para SSTR2 humano con un valor de CI_{50} de aproximadamente 1,8 nM.

Las potencias de determinados análogos de SRIF para inhibir la unión del radioligando ^{125}I -[Leu⁸, D-Tip²², Tyr²⁴]SRIF-28 a los diversos receptores de SRIF humanos clonados se muestran en la siguiente Tabla 1 en la que los valores de CI_{50} se dan en concentración nanomolar. Los números entre paréntesis indican el número de veces que se llevó a cabo el ensayo de unión particular.

Tabla 1

Compuesto	CI_{50} (nM)				
	hSSTR1	hSSTR2	hSSTR3	hSSTR4	hSSTR5
Péptido nº 28 406-034-15	>1.000 (2)	$1,8 \pm 0,2$ (3)	>1.000 (2)	>1.000 (2)	>1.000 (2)
Péptido nº 14 363-246-15	>1.000 (3)	$9,4 \pm 1,6$ (3)	>1.000 (2)	816 ± 114 (3)	>1.000 (3)
Péptido nº 33 363-300-15	>1.000 (2)	230; 219 (2)	>1.000 (2)	>1.000 (2)	>1.000 (2)
Péptido nº 5 406-032-20	>1.000 (2)	$1,5 \pm 0,6$ (2)	>1.000 (2)	>1.000 (2)	>1.000 (2)
Péptido nº 30 363-298-15	>1.000 (2)	$1,7 \pm 0,3$ (3)	>1.000 (2)	>1.000 (2)	>1.000 (2)
Péptido nº 31 406-094-15	>1.000 (2)	$0,6 \pm 0,05$ (2)	>1.000 (2)	>1.000 (2)	>1.000 (2)
Péptido nº 3 406-092-15	>1.000 (2)	$0,53 \pm 0,06$ (2)	>1.000 (2)	>1.000 (2)	>1.000 (2)
Péptido nº 32 406-090-15	>1.000 (2)	$1,02 \pm 0,88$ (2)	>1.000 (2)	493 ± 206 (2)	>1.000 (2)

Además, ninguno de los péptidos ensayados y presentados en la Tabla 1 mostró internalización significativa en las células, mientras que antagonizaban la internalización inducida por octreótido. Los péptidos nº 28, 5, 30, 31, 3 y 32 presentaron muy buenas propiedades de unión y excelentes propiedades de dianización del tumor *in vivo*, a saber, una enorme captación en los tumores sst₂ a las 4 horas y a las 24 horas, y una excelente relación entre tumor y riñón; tal puede bloquearse mediante un exceso de péptido frío.

Implantación de células HEK-sst₂ en ratones desnudos

Se mantuvo, trató y atendió a los animales de conformidad con las directrices de la normativa suiza (aprobación 789). Se implantaron por vía subcutánea a ratones hembra desnudos atímicos diez millones de células HEK-sst₂ recién suspendidas en PBS estéril. Diez a catorce días después de la inoculación, los ratones mostraron masas tumorales palpables sólidas (peso del tumor 60 mg-150 mg) y se utilizaron para los experimentos de biodistribución *in vivo*.

La confirmación de que los tumores transfectados expresaban efectivamente únicamente sst₂ se obtuvo en muestras de tumores resecados ensayadas *in vitro* con autorradiografía de receptores de somatostatina utilizando ligandos selectivos de subtipo.

Biodistribución *in vivo* de antagonistas y agonistas marcados con ^{111}In

Se inyectaron a los ratones en una vena de la cola 10 pmol de péptido marcado radiactivamente con ^{111}In (aproximadamente 0,15 MBq-0,2 MBq) en 0,1 ml de solución de NaCl (0,9%, con BSA al 0,1%). Se estudió la biodistribución a las 4 horas o a las 24 horas después de la inyección. Los órganos de interés se recogieron, se secaron con papel de filtro, se pesaron, se midió su radiactividad y se calculó el porcentaje de actividad inyectada por gramo (%IA/g).

En un experimento se inyectaron 5 μCi de Péptido nº 28 marcado con ^{111}In en ratones desnudos portadores de tumores HEK-sst₂, 3-4 ratones por grupo de muestra. La presencia de 2.000 veces (por mol) más cantidad de compuesto no marcado inhibía la unión. Los resultados de biodistribución se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2

Órgano	4h		bloqueo 4h		24 h	
sangre	0,26	0,03	0,19	0,03	0,06	0,01
corazón	0,36	0,03	0,12	0,01	0,09	0,01
hígado	1,52	0,03	0,88	0,10	0,52	0,08
bazo	0,62	0,06	0,36	0,10	0,28	0,05
pulmón	2,31	1,25	0,30	0,10	0,31	0,08
riñón	7,48	0,43	6,95	0,39	4,50	0,36
estómago	20,27	2,55	1,84	0,37	3,38	0,69
intestino	1,44	1,18	0,25	0,04	0,23	0,05
suprarrenal	3,17	0,69	0,21	0,01	0,77	0,14
páncreas	29,83	2,86	2,41	0,73	2,35	0,47
hipófisis	8,29	3,38	0,21	0,06	1,73	0,84
músculo	0,19	0,05	0,06	0,01	0,10	0,05
hueso	1,23	0,24	0,16	0,05	0,85	0,66
tumor sst ₂	28,41	2,98	2,36	0,27	21,49	0,95
Órgano	4h				24 h	
tumor:riñón			3,8			4,8
tumor:páncreas			0,95			9,1
tumor:hipófisis			3,4			12,4
tumor:sangre			109,3			358
tumor:músculo			149,5			215
tumor:hueso			23,9			25,3

Se observó la siguiente biodistribución (Tabla 3) cuando se inyectaron 5 μ Ci del Péptido n° 14 marcado con ¹¹¹In en ratones desnudos portadores de tumores HEK-sst₂, tres ratones por grupo de muestra.

Tabla 3

Órgano	1 h	4 h	24 h	48 h	72 h
tumor:riñón	1,95	2,54	3,84	2,93	3,27
tumor:suprarrenal	14,12	72,27	57,80	31,71	33,53
tumor:páncreas	2,44	43,15	162,00	157,78	150,70
tumor:hipófisis	6,54	34,36	26,00	25,70	12,11
tumor:sangre	24,92	152,94	410,79	595,61	741,89
tumor:músculo	67,19	279,34	347,94	275,34	266,45
tumor:hueso	13,14	48,44	50,11	26,99	36,86

Un experimento similar, con el Péptido n° 14 marcado con ¹⁷⁷Lu (5 μ Ci en ratones desnudos portadores de tumores HEK-sst₂, tres ratones por grupo de muestra) dio la siguiente distribución (Tabla 4), expresada como la relación de la señal en tumor:órgano.

Tabla 4

Órgano	4 h	24 h
sangre	0,20	0,061
corazón	0,25	0,084
hígado	0,80	0,399
bazo	1,03	0,232
pulmón	2,88	0,438
riñón	10,82	6,034
estómago	17,26	1,825
intestino	0,96	0,282
suprarrenal	2,85	1,370
páncreas	26,11	1,177
hipófisis	20,18	8,637
músculo	0,22	0,153
hueso	1,06	0,915
sst ₂	34,90	25,650

En comparación, el Péptido n° 33 marcado con ¹¹¹In mostró la siguiente biodistribución (Tabla 5) después de inyectar 5 μ Ci en ratones desnudos portadores de tumores HEK-sst₂ y sst₃, 4 ratones por grupo de muestra. La presencia de 1.000 veces más compuesto no marcado inhibía la unión:

Tabla 5

Órgano	4 h	DE	bloqueo 4 h	DE	24 h	DE
sangre	0,12	001	0,12	0,01	0,04	0,01
corazón	0,06	0,01	0,05	0	0,05	002
hígado	0,33	0,04	0,32	0,04	0,25	0,08
bazo	0,17	0,03	0,2	0,01	0,12	0,02
pulmón	0,27	0,06	0,21	0,04	0,18	0,1
riñón	13,74	1,26	10,3	1,75	7,07	1,12
estómago	0,16	0,02	0,12	0,01	0,12	0,03
intestino	0,11	0,02	0,09	0	0,06	0,01
suprarrenal	0,26	0,04	0,23	0,05	0,15	0,04
páncreas	0,06	0,01	0,05	0,01	0,04	0,01
hipófisis	0,46	0,36	0,14	0,1	0,05	0,04
músculo	0,03	0,01	0,02	0,01	0,03	0,01
hueso	0,09	0,06	0,04	0,03	0,06	0,01
sst ₂	3,56	0,65	0,22	0,14	1,21	0,31
sst ₃	0,22	0,03	0,14	0,07	0,21	0,11

La biodistribución con respecto al tumor sst₂ se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6

Órgano	4 h	bloqueo 4h	24 h
sangre	29,7	1,8	30,3
riñón	0,3	0,0	0,2
páncreas	59,3	4,4	30,3
hipófisis	7,7	1,6	24,2
músculo	118,7	11,0	40,3
hueso	39,6	5,5	20,2

El Péptido n° 5 marcado con ¹¹¹In mostró la siguiente biodistribución (Tabla 7) después de inyectar 5 µ Ci en ratones desnudos portadores de tumores HEK-sst₂, 3-4 ratones por grupo de muestra. La presencia de 2.000 veces más compuesto no marcado inhibía la unión.

Tabla 7

Órgano	4h	24 h
tumor:riñón	4,0	5,0
tumor:páncreas	1,8	16,0
tumor:hipófisis	14,3	15,3
tumor:sangre	83,9	357,7
tumor:músculo	183,6	268,3
tumor:hueso	35,4	33,5

Se estudió el Péptido n° 30 con mayor detalle. El Péptido n° 30 marcado con ¹¹¹In mostró la siguiente biodistribución (Tabla 8) después de inyectar 5 µ Ci en ratones desnudos portadores de tumores HEK-sst₂, cuatro ratones por grupo de muestra. Una cantidad 2.000 veces mayor de péptido frío mostró bloqueo.

Tabla 8. Relación entre tumor y órgano para los órganos seleccionados.

Órgano	1h	4h	bloqueo 4h	24h	48h	72h
sangre	19,7	112,8	75,6	519,6	657,5	307,3
corazón	27,9	88,2	88,2	259,8	263,0	184,4
hígado	10,2	18,3	7,6	34,6	23,1	18,8
bazo	13,2	27,1	13,2	66,6	47,0	36,9
pulmón	2,6	18,4	22,0	61,9	69,2	46,1
riñón	2,4	3,3	0,9	4,3	3,5	3,2
estómago	1,4	2,1	18,9	7,5	4,6	5,7
intestino	7,9	25,0	44,1	81,2	54,8	61,5
suprarrenal	2,5	5,5	26,5	16,8	16,0	13,2
páncreas	0,6	1,2	23,0	7,0	6,5	6,0

hipófisis	2,4	2,9	8,1	5,4	10,4	9,9
músculo	41,5	165,9	132,3	288,7	263,0	92,2
hueso	18,2	43,4	22,0	44,0	35,5	29,7

El Péptido nº 30 marcado con ^{177}Lu mostró la siguiente biodistribución (Tabla 9) después de inyectar 5 μCi en ratones desnudos portadores de tumores HEK-sst₂, cuatro ratones por grupo de muestra.

Tabla 9

Órgano	4h	24h	72h
tumor:sangre	95,82	2.380,57	2.679,44
tumor:corazón	29,24	217,19	129,21
tumor:hígado	6,60	16,81	13,57
tumor:bazo	15,47	21,01	20,61
tumor:pulmón	5,37	94,69	29,51
tumor:riñón	3,04	4,83	3,13
tumor:estómago	0,48	0,89	0,90
tumor:intestino	7,27	20,27	6,74
tumor:suprarrenal	1,26	10,00	2,50
tumor:páncreas	0,39	0,62	0,84
tumor:hipófisis	1,70	9,09	4,08
tumor:músculo	148,53	332,56	750,80
tumor:hueso	11,04	35,08	82,58

El Péptido nº 31 marcado con ^{111}In mostró la siguiente biodistribución (Tabla 10) después de inyectar 5 μCi en ratones desnudos portadores de tumores HEK-sst₂, 3-4 ratones por grupo de muestra.

Tabla 10

Órgano	4h	24 h
tumor:riñón	5,51	6,29
tumor:páncreas	1,48	11,33
tumor:hipofisis	3,52	6,73
tumor:sangre	122,84	537,22
tumor:músculo	136,11	127,01
tumor:hueso	20,94	16,28

Siguiendo el mismo protocolo, el Péptido nº 3 marcado con ^{111}In mostró la distribución de la Tabla 11.

Tabla 11

Órgano	4h	24 h
tumor:riñón	5,35	4,56
tumor:páncreas	1,91	14,69
tumor:hipófisis	5,39	4,98
tumor:sangre	2.2239	283,53
tumor:músculo	146,02	128,61
tumor:hueso	28,41	21,30

Los péptidos divulgados en el presente documento no sólo proporcionan ligandos más selectivos para la unión a SSTR2, sino que el uso de péptidos marcados, por ejemplo, una versión marcada radiactivamente del Péptido nº 28, facilita la selección de fármacos para antagonistas aún más eficaces.

Ejemplo 10.

Materiales de partida. Se utilizó resina MBHA con una capacidad de 0,3-0,4 miliequiv/g en las síntesis en fase sólida. Todos los aminoácidos protegidos con Boc-N^α con protección de la cadena lateral: Cys(Mob), Lys(ε-2Cl-Z), Lys(Fmoc), Thr(Bzl), Tyr(2Br-Z) e ITyr(3Br-Bzl) se encontraban disponibles en el mercado (Bachem Inc., Torrance, CA; Chem Impex, Wood Dale, IL; Reanal, Budapest, Hungría), excepto Boc-Aph(Cbm)-OH, BOC-Daph(Cbm)-OH, Boc-Aph(Cbm-OCH₃)-OH, Boc-Aph(Cbm-OH)-OH, Boc-Aph(Hor)-OH, Fmoc-D/L-Agl(NMe,Boc)-OH (Jiang, G. *et al.*, Prot. Pep. Lett., 3:219-224, 1996), Fmoc-D-Agl(Boc)OH (Sypniewski, M. *et al.*, J. Org. Chem., 65:6595-6600, 2000) Boc-5F-Trp-OH, Boc-5F-DTrp-OH, que se sintetizaron en el laboratorio. El éster mono-(N-hidroxisuccinimida) del ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA-NHS).3CH₃COOH.HPF₆

se adquirió de Macrocyclics Inc. (Dallas, TX, EE.UU.). Todos los reactivos y disolventes eran de calidad ACS y se utilizaron sin purificación adicional.

Síntesis de péptidos. Los péptidos se sintetizaron mediante el método en fase sólida, ya sea manualmente o en un sintetizador CS-Bio Peptide Synthesizer modelo CS536. Se utilizó un exceso de 3 equivalentes de aminoácido Boc (1,2 mmol), basándose en la sustitución original de la resina para cada acoplamiento. Los acoplamientos de péptidos fueron mediados durante 1 hora por DIC/HOBt (1,2 mmol/1,8 mmol) en dimetilformamida (DMF) y supervisados mediante el ensayo cualitativo de ninhidrina (Kaiser, E. *et al.*, Anal. Biochem., 34:595-598, 1970). La eliminación de Boc se consiguió con ácido trifluoroacético (TFA) (60% en CH₂Cl₂, m-cresol o etanoditiol al 1%-2%) durante 20 minutos. Al tratamiento con TFA le siguió un lavado con alcohol isopropílico (m-cresol al 1%) y, a continuación, lavados sucesivos con una solución de trietilamina (TEA) (10% en CH₂Cl₂), metanol, solución de trietilamina, metanol y CH₂Cl₂ completaron la secuencia de neutralización. Se introdujo en la resina el grupo ureido (Cb_{nm}) en el extremo N-terminal de 13. El grupo Boc N-terminal del péptido totalmente ensamblado se desprotegió con TFA; después de la neutralización, siguió la carbamoylación con NaOCN (100 mg, 0,65 mmol) en N-metilpirrolidinona (NMP) (4 ml) y 3 ml de ácido acético glacial por gramo de resina inicial. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y el ensayo de ninhidrina indicó la finalización de la reacción. A continuación, se desprotegió el péptido completo y se escindió de la resina mediante HF que contenía los eliminadores anisol (10% v/v) y sulfuro de metilo (5% v/v) durante 60 minutos a 0°C. Los péptidos brutos precipitados con éter dietílico se ciclaron en ácido acético al 75% (200 ml) añadiendo yodo (solución al 10% en metanol) hasta la aparición de un color naranja estable. Cuarenta minutos más tarde, se añadió ácido ascórbico para inactivar el exceso de yodo.

Para la síntesis de 9, se utilizó Fmoc-D/L-Agl(NMe,Boc)-OH no resuelto, y los dos diastereómeros se separaron fácilmente durante las etapas de purificación mediante HPLC convencional (Miller, C. y Rivier, I., Biopolymers, 40:265-317, 1996). La configuración óptica de los dos diastereómeros se infirió provisionalmente a partir de una comparación del comportamiento de la elución mediante HPLC con análogo sintetizado por separado como diastereómeros de configuración óptica conocida. En resumen: después del acoplamiento Fmoc-DAgl(Boc)-OH en la posición 7, se eliminó el grupo Boc protector de la cadena lateral con TFA al 60%, se lavó, se neutralizó y la resina peptídica de 0,9 g (0,36 mmol/g) se hinchó en diclorometano, se añadió Dod-Cl (130 mg; 0,5 mmol) junto con DIEPA (500 µl). La mezcla se agitó durante una hora para terminar la alquilación. La resina se lavó, y se agitó después de añadir formaldehído (2 ml, solución al 37%) en NMP (18 ml) y ácido acético (100 µl). Después de 5 minutos, se añadió cianoborohidruro sódico (300 mg) y la mezcla se agitó durante 60 minutos. Después de eliminar el grupo Dod con TFA (60%) durante 30 minutos, se utilizó cloruro de benzoilo (500 µl) para acilar el grupo amino secundario libre de la cadena lateral (Kaljuste K. y Unden, A., Int. J. Pept. Prot. Res., 42:118-124, 1993). A la eliminación del grupo protector N^α-Fmoc con piperidina al 20% en NMP en dos tratamientos sucesivos de 5 y 15 minutos siguió el protocolo de elongación convencional una vez finalizado el péptido. El péptido se escindió, se desprotegió y se cicló. En la HPLC, este diastereómero de configuración D coeluyó con el diastereómero de elución más temprana de la síntesis realizada con el aminoácido no resuelto, por lo tanto, el péptido de elución más lenta (9) se identificó provisionalmente como el análogo que contenía L-Agl(NMe,benzoilo)⁷.

En general, para la síntesis de los conjugados DOTA-péptido, la cadena lateral de Lys⁹ estaba protegida con un grupo protector Fmoc que permanece después de la escisión mediante HF. A una solución del [Lys(Fmoc)⁹]-sst₂-antagonista purificado mediante RP-HPLC (20 µM) en DMF seco (800 µl) se añadió una solución de DOTA-NHS-éster (38 mg, 48 µM) en DMF (160 µl) y N,N'-diisopropiletilamina (DIPEA) (40 µl, 24 µM). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. El desarrollo de la reacción se siguió mediante HPLC analítica. Al término de la reacción, se realizó una purificación mediante RP-HPLC preparativa, lo que produjo el DOTA-[Lys(Fmoc)⁹]-sst₂-antagonista puro. La eliminación del grupo protector Fmoc de la cadena lateral de Lys se consiguió con solución de piperidina/DMF al 20% que dio como resultado el DOTA-sst₂-antagonista, que se purificó adicionalmente mediante RP-HPLC preparativa.

Purificación de péptidos. Los péptidos liofilizados brutos se purificaron mediante RP-HPLC preparativa en un cartucho de 5 cm x 30 cm, preparado en el laboratorio con sílice Vydac C₁₈ 300Å de fase inversa (tamaño de partícula de 15 µm-20 µm). Los péptidos eluidos con un caudal de 100 ml/min utilizando un gradiente lineal de aumentos del 1% de B cada 3 minutos desde el % de B basal (eluyente A = TEAP 0,25 N pH 2,25, eluyente B = CH₃CN al 60%, A al 40%). Todos los péptidos se sometieron a una segunda etapa de purificación llevada a cabo con los eluyentes A = TFA al 0,1% en agua y B = CH₃CN al 60%/A al 40% en el mismo cartucho utilizando un gradiente lineal de aumentos del 1% de B por minuto desde el % de B basal. El cribado mediante HPLC analítica de la purificación se realizó en una columna Vydac C₁₈ (0,46 cm x 25 cm, tamaño de partícula de 5 µm, tamaño de poro de 300Å) conectada a un inyector Rheodyne, dos bombas Waters modelo 501, un programador y controlador del sistema, un detector de UV Kratos 750 y un registrador gráfico D-5000 de Houston Instruments. Las fracciones que contenían el producto se agruparon y se sometieron a liofilización.

Caracterización de los análogos de SRIF (FIG. 4). La pureza de los péptidos finales se determinó mediante RP-HPLC analítica realizada con un gradiente lineal utilizando TEAP 0,1 M pH 2,5 como eluyente A y CH₃CN al 60%/A al 40% como eluyente B en un cromatógrafo de líquidos 1090 serie II de Hewlett-Packard conectado a una columna Vydac C₁₈ (0,21 cm x 15 cm, tamaño de partícula de 5 µm, tamaño de poro de 300Å), un controlador

modelo 362 y una impresora de chorro Think. Se realizó el análisis de electroforesis capilar de zona (CZE). Se descubrió que cada péptido tenía una pureza de > 95% mediante HPLC y CZE. Los espectros de masas (MALDI-MS) se midieron en un instrumento ABI-Perseptive DE-STR. El instrumento emplea un láser de nitrógeno (337 nm) a una frecuencia de repetición de 20 Hz. La tensión de aceleración aplicada fue 20 kV. Los espectros se registraron en modo de extracción retardada (retardo de 300 ns). Todos los espectros se registraron en modo de reflector positivo. Los espectros fueron sumas de 100 disparos de láser. Se preparó la matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico en forma de soluciones saturadas en ácido trifluoroacético al 0,3% y acetonitrilo al 50%. Los valores (M+H)⁺ monoisotópicos observados de cada péptido se correspondían con los valores (M+H)⁺ calculados.

Reactivos. Todos los reactivos eran de la mejor calidad disponible y se adquirieron de proveedores comunes. El [Tyr³]-octreótido (Reubi, L., *Neurosci. Lett.*, 49:259-26, 1984) era de Novartis Inc. (Basilea, Suiza). Los demás péptidos, incluido Coy-14 (Rajeswaran, W. *et al.*, *J. Med. Chem.*, 44:1305-1311, 2001) se sintetizaron en el Instituto Salk. El anticuerpo R2-88 contra el receptor sst₂A se generó como se ha descrito anteriormente y se ha caracterizado exhaustivamente. (Gu, Y. y Schonbrunn, A., *Mol. Endocrinol.*, 11:527-537, 1997). El anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo Alexa Fluor 488 (H+L) era de Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR), el anticuerpo monoclonal anti-T7 de Novagen (Madison, WI), el anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante de Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, OR); el kit de ensayo de calcio Fluo-4NW era de Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR), la mezcla de sustrato para la peroxidasa de rábano picante (ABTS) era de Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, OR), el hidrolizado de lactalbúmina era de Hyclone (Logan, UT).

Estirpes celulares. Se cultivaron células CCL39, CHO-K1 que expresaban de manera estable los cinco sst humanos clonados y la estirpe celular HEK293 que expresaba el receptor sst₂A humano marcado con epítipo T7 (HEK-sst₂), según se describe en el presente documento. Todos los reactivos de cultivo eran de Gibco BRL, Life Technologies, (Grand Island, NY).

Autorradiografía de receptores. Se prepararon sedimentos de membrana celular tal como se ha descrito anteriormente, y se almacenaron a -80°C. La autorradiografía de receptores se realizó en secciones de criostato (Microm HM 500, Walldorf, Alemania) de 20 μ m de espesor de los sedimentos de membrana, se montaron en portaobjetos de microscopio, y, a continuación, se almacenaron a -20°C. Para cada uno de los compuestos ensayados, se realizaron experimentos de desplazamiento completo con el radioligando de SRIF universal [Leu,D-Trp²²,¹²⁵I-Tyr²⁵]-SRIF-28 (¹²⁵I-[LTT]-SRIF-28) (2.000 Ci/mmol; Anawa, Wangen, Suiza) utilizando 15.000 cpm/100 μ l y concentraciones crecientes del péptido no marcado que variaban de 0,1 nM-1000 nM. Como control, se procesó en paralelo SRIF-28 no marcado utilizando las mismas concentraciones crecientes. Las secciones se incubaron con ¹²⁵I-[LTT]-SRIF-28 durante 2 horas a temperatura ambiente en 170 mmol/l de tampón Tris-HCl (pH 8,2), que contenía BSA al 1%, 40 mg/l de bacitracina y 10 mmol/l de MgCl₂ para inhibir las proteasas endógenas. Las secciones incubadas se lavaron dos veces durante 5 minutos en 170 mmol/l de Tris-HCl frío (pH 8, 2) que contenía BSA al 0,25%. Después de una breve inmersión en agua destilada para eliminar el exceso de sales, las secciones se secaron rápidamente y se expusieron durante una semana a una película Kodak BioMax MR. Los valores de Cl₅₀ se calcularon después de la cuantificación de los datos mediante un sistema de procesamiento de imágenes asistido por ordenador. Para la cuantificación se utilizaron patrones tisulares ([¹²⁵I]-microescalas autorradiográficas, GE Healthcare; Little Chalfont, UK) que contenían cantidades conocidas de isótopo, sometidos a calibración cruzada frente a concentraciones de ligando equivalente de tejido (Reubi, L., *J. Nucl. Med.*, 36:1846-1853, 1995).

Ensayo de internalización de sst₂ basado en inmunofluorescencia. Se realizó un ensayo de internalización basado en microscopía de inmunofluorescencia para sst₂ con HEK-sst₂ utilizando el anticuerpo específico para sst₂ R2-88. Se trataron células HEK-sst₂ con vehículo en solitario, el agonista de sst₂ [Tyr³]-octreótido a una concentración de 100 nM, [Tyr³]-octreótido a una concentración de 100 nM en presencia de un exceso de los análogos de SRIF a ensayar (100 veces la concentración de [Tyr³]-octreótido), o con los análogos de SRIF a ensayar en solitario a una concentración de 10 μ M, y, a continuación, se procesaron para la microscopía de inmunofluorescencia.

Ensayo cuantitativo para internalización de sst₂ (ELISA). Se determinó la internalización del receptor mediante un ELISA para cuantificar el sst₂ humano marcado con epítipo T7 en la superficie celular. Se sembraron células HEK-sst₂ en placas de 24 pocillos (250.000 células por pocillo) recubiertas con poli-D-lisina (20 μ g/ml) en medio de crecimiento y se cultivaron durante un día a 37°C y CO₂ al 5%. El día del ensayo, las células se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-T7 a una dilución de 1:3.000 durante 2 horas a temperatura ambiente en DMEM que contenía 5 g/l de hidrolizado de lactalbúmina + HEPES 20 mM, pH 7,4 (DMEM-LH) para marcar los receptores de la superficie celular. Después de lavar con DMEM-LH para eliminar el anticuerpo no unido, las células se incubaron durante 30 minutos a 37°C y CO₂ al 5%, sin o con los ligandos añadidos a las concentraciones indicadas. Se interrumpieron las incubaciones colocando las placas en un baño de hielo. A continuación, las células se lavaron dos veces con PBS frío y se fijaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con paraformaldehído al 3% en PBS (pH 7,4). Los sitios de unión no específicos se bloquearon incubando las células durante 60 minutos a temperatura ambiente con PBS que contenía albúmina de suero bovino al 1% (BSA; fracción V; SERVA, Heidelberg, Alemania). A continuación, se incubaron las células durante 60 minutos a temperatura ambiente con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (1:1.000) en PBS que contenía BSA al 1%. Después de tres lavados más con PBS, se midió la unión del anticuerpo añadiendo 0,3 ml de la mezcla de sustrato para

peroxidasa de rábano picante (ABTS). La DO_{405} se midió después de una incubación de aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. Se calculó la cantidad de ss_{t2} que quedaba en la superficie celular después del tratamiento con ligando como la absorbancia medida en las células tratadas expresada como porcentaje de la absorbancia en las células no tratadas. Se determinó la absorbancia no específica en experimentos en los que las células HEK293- ss_{t2} se incubaron sin el anticuerpo anti-T7.

Cada punto de datos representa la media $\pm$ EEM de tres experimentos realizados por duplicado.

Ensayo de liberación de calcio. Se midió la liberación de calcio intracelular en células HEK- ss_{t2} utilizando el kit de ensayo de calcio Fluo-4NW como se ha descrito anteriormente (Magrys, A. *et al.*, J. Clin. Immunol., 27:181-192, 2007; Michel, N. *et al.*, Mol. Biol. Cell, 17:3578-3590, 2006). En resumen, se sembraron células HEK- ss_{t2} (25.000 células por pocillo) en placas de 96 pocillos recubiertas con poli-D-lisina (20 μ g/ml) y se cultivaron durante un día a 37°C y CO_2 al 5% en medio de cultivo. El día del experimento, las células se lavaron con tampón de ensayo (1 x HBSS, HEPES 20 mM) que contenía probenecid 2,5 mM, y, a continuación, se cargaron con 100 μ l/pocillo de colorante Fluo-4NW en tampón de ensayo que contenía probenecid 2,5 mM durante 30 minutos a 37°C y CO_2 al 5% y, a continuación, durante otros 30 minutos a temperatura ambiente. Para medir la movilización de calcio intracelular después de la estimulación con los análogos de SRIF a ensayar, las células cargadas con colorante se transfirieron a un SpectraMax M2^e (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Se registró la movilización de calcio intracelular en un cinético durante 60 segundos a temperatura ambiente, supervisando la emisión de fluorescencia a 520 nm (con λ_{ex} = 485 nm) en presencia de los análogos a las concentraciones indicadas. Se midió la fluorescencia máxima (F_{max}) después de añadir ionomicina 25 μ M. Se recogieron las mediciones basales (control) para las células no tratadas cargadas con colorante. Los datos se muestran como porcentaje de F_{max} (% de F_{max}). Todos los experimentos se repitieron al menos tres veces por triplicado.

Todos los análogos mostrados en la FIG. 4 se sintetizaron manual o automáticamente sobre una resina MBHA mediante la estrategia Boc, diisopropilcarbodiimida (DIC)/HOBt (1-hidroxibenzotriazol) para la formación del enlace amida y ácido trifluoroacético (TFA) para la eliminación de Boc. Las resinas peptídicas se trataron con fluoruro de hidrógeno (HF) en presencia de eliminadores para liberar los péptidos lineales brutos completamente desprotegidos. La ciclación de las cisteínas estuvo mediada por yodo en un medio ácido. La purificación se llevó a cabo utilizando múltiples etapas de HPLC. Se acopló DOTA a los análogos protegidos Lys(Fmoc)⁹ en solución. La pureza de los péptidos se caracterizó mediante HPLC, electroforesis capilar de zona y espectrometría de masas. Los valores $(M+H)^+$ de masa monoisotópica observados de cada péptido se corresponden con los valores de masa (M) calculados.

Para investigar sus propiedades de unión a los ss_{t} , los péptidos se ensayaron para determinar su capacidad para unirse a las secciones de criostato de los sedimentos de membrana de células que expresaban los cinco ss_{t} humanos (FIG. 5). Para cada uno de los compuestos ensayados, se realizaron experimentos de desplazamiento completo con el radioligando de SRIF universal [$Leu^8, DTrp^{22, 125}I-Tyr^{25}$]SRIF-28 utilizando concentraciones crecientes del péptido no marcado que variaban de 0,1 nM-1.000 nM. El SRIF-28 no marcado se procesó en paralelo utilizando las mismas concentraciones crecientes, como control.

Se notificó que la inversión de la quiralidad en las posiciones 2 y 3 en el armazón de octreótido (H-DPhe²-C[Cys³-The⁷-DTrp⁸-Lys⁹-Thr¹⁰-Cys¹⁴]-Thr¹⁵-ol, numeración de SRIF) era la modificación estructural clave que convertía un agonista de SRIF en un antagonista. Sustituciones adicionales dieron como resultado los antagonistas parcialmente selectivos acetil-pNO₂Phe-c[DCys-Tyr-DTrp-Lys-Thr-Cys]-DTyr-NH₂ o H-Cpa-c[DCys-Tyr-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2NaI-NH₂. Estos antagonistas presentan de manera preferencial una alta afinidad de unión por ss_{t2} , y menor o ninguna afinidad hacia ss_{t3} , ss_{t4} y los ss_{t5} . Ninguno de los análogos se une a ss_{t1} . Utilizando estos compuestos "cabeza de serie", se diseñaron antagonistas de SRIF que eran más afines (> 3 veces) y más selectivos para ss_{t2} que los notificados hasta ahora (Bass, R. *et al.*, Mol. Pharmacol., 50:709-715, 1996; Hocart, S. *et al.*, J. Med. Chem., 42:1863-1871, 1999).

Se sintetizaron análogos de antagonistas como acetil-pNO₂Phe²-C[DCys³-Tyr⁷-DTrp⁸-Lys⁹-Thr¹⁰-Cys¹⁴]-DTyr¹⁵-NH₂ (1) y H-Cpa²-c[DCys³-Tyr⁷-DTrp⁸-Lys⁹-Thr¹⁰-Cys¹⁴]-2NaI¹⁵-NH₂ (7) para investigar el efecto de diferentes sustituciones sobre la afinidad de unión, la selectividad del subtipo de receptor, la hidrofilia global, así como el agonismo y antagonismo.

La sustitución del grupo acetilo N-terminal por DOTA en 1 (Cl_{50} = 3,6 nM hacia ss_{t2}) dio como resultado 2, que se unió a ss_{t2} con una Cl_{50} = 1,5 nM, lo que sugiere que el resto DOTA, que es crucial para el marcado radiactivo con ¹¹¹In, ⁹⁰Y o ¹⁷⁷Lu para la dianización *in vivo*, es bien tolerado por ss_{t2} (FIG. 5).

La introducción de DAph(Cbm)⁸ en lugar de DTrp⁸ en 2 produjo 3 (Cl_{50} = 0,75 nM). Cabe señalar que estas dos sustituciones son acumulativas, dando así como resultado el antagonista de ss_{t2} más potente de esta serie, sin afinidad de unión cuantificable hacia ninguno de los demás receptores. La sustitución adicional de DTyr¹⁵ en 3 por 2NaI¹⁵ produjo 5 con una afinidad de unión similar por ss_{t2} (Cl_{50} = 1,3 nM). El análogo 4, un péptido con la misma secuencia que 5 pero sin DOTA en su extremo N-terminal todavía tenía una excelente afinidad de unión por ss_{t2} (Cl_{50} = 2,6 nM) y también se unió de forma apreciable a ss_{t3} (Cl_{50} = 384 nM). La sustitución de Tyr en la posición 7

por Aph(Hor), que dio como resultado 6, no tuvo ningún efecto sobre la afinidad de unión por sst₂ ni la selectividad en comparación con el precursor 4 (Cl₅₀ = 2,6 nM y 2,7 nM hacia sst₂ y 384 nM y 451 nM hacia sst₃, respectivamente, y ninguna afinidad de unión hacia los otros tres receptores) (FIG. 5).

También se utilizó H-Cpa²-c[DCys³-Tyr⁷-DTrp⁸-Lys⁹-Thr¹⁰-Cys¹⁴]-2Nal¹⁵-NH₂ (7) como segundo “cabeza de serie” para los antagonistas selectivos para sst₂. En el ensayo de unión, este antagonista tiene valores de Cl₅₀ iguales a 5,7 nM, 112 nM y 218 nM hacia sst_{2/3/5}, respectivamente, en comparación con los valores notificados de 26 nM, 93 nM y 48 nM. En los ensayos, 7 es más potente que el notificado hacia sst₂ por un factor de cinco y menos potente hacia sst₅ por el mismo factor.

Mientras que la N^α-metilación de Lys⁹ en 7 para producir 8 aumentó 5 veces la afinidad de unión hacia sst₂ (K_i = 26 nM y 5,51 nM, respectivamente) sin mejora hacia sst₃ ni sst₅, (K_i = aproximadamente 50 nM-100 nM) los resultados del presente documento que no muestran tal mejora hacia sst₂ no respaldan esta observación y, como resultado, no se utilizó el uso de esta sustitución en el diseño de análogos selectivos para sst₂ adicionales. En su lugar, se sintetizó 9 con un L-Agl(NMe,benzoilo)⁷ en un intento de limitar la orientación de la cadena lateral en la posición 7. El uso de tales derivados aminoglicina (betides) aprovechaba el diseño de un antagonista selectivo para sst₃. Aunque 9 perdió algo de afinidad de unión por sst₂ (3 veces) en comparación con la de 7, también perdió afinidad de unión comparable por sst₃ y sst₅. Esta observación sugiere además que la posición 7 es crítica para los tres sst_{2,3,5}. De hecho, 10 con el D-Agl(NMe,benzoilo)⁷ perdió afinidad de unión hacia sst₂ al tiempo que conservaba afinidades de unión similares a 7 hacia sst_{3/4/5}, logrando así uno de los objetivos de identificar el o los residuos/conformaciones responsables de la unión a cualquier receptor particular (sst₂ en este caso).

Mientras que la sustitución de Phe por Leu en la posición 7 en 7 produjo 11, que perdió 10 veces la afinidad de unión por sst₂ y la selectividad, la sustitución por Aph(Cbm) proporcionó 12, que presentó afinidad de unión y selectividad similar a 7 hacia los cinco sst. La carbamoylación N-terminal de 12 para producir 13, mejoraba la afinidad de unión ligeramente hacia sst_{3/4} con cierta pérdida de afinidad de unión por sst₂ en comparación con 12. La adición de DOTA a 12 dio como resultado 14, cuya afinidad de unión por sst₂ es similar a la de 12, y aumentó la selectividad para sst₂. Curiosamente, la adición de un espaciador en 14 entre DOTA y el octapéptido, tal como βAla en 15 y Peg en 16, fue inesperadamente perjudicial en términos de afinidad de unión por sst₂ y, sin embargo, favorable para sst₃ y neutra hacia sst_{1/4/5} (Chen, X. *et al.*, J. Nucl. Med., 45:1776-1783, 2004; Antunes, P. *et al.*, Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging, 34:982-983, 2007)

A partir de la observación de que 2Nal¹⁵ puede contribuir al bolsillo de unión de sst₃, sst₄ y sst₅, se sintetizó 17 (sin este residuo) y se descubrió que tenía afinidades de unión similares en comparación con el precursor 12. La sustitución de 2Nal¹⁵ en 12 por otros residuos diferentes tales como Cha en 18, Aph(Hor) en 19, DAph(Cbm) en 20 y Aph(Cbm) en 21 no influyó notablemente en la afinidad hacia sst₂ ni la selectividad. Esto resulta notable en cuanto a que sólo hay una diferencia de tres veces en la afinidad de unión hacia sst₂ para 20 (configuración D y Cl₅₀ = 5,4 nM) y 21 (configuración L y Cl₅₀ = 15 nM) donde el aminoácido C-terminal tiene la configuración D o L, respectivamente. Esto respalda la observación anterior de que DTyr (como en 1 y 2) o 2Nal (como en 4 y 5) son igualmente aceptados. Por otra parte, la ampliación de la secuencia de 20 mediante glicina-OH como en 22 conduce a una pérdida significativa de afinidad hacia todos los receptores.

Para modular la hidrofilia global de 7 (con Tyr en la posición 7), se introdujeron en la posición 7 los siguientes carbamatos (Aph(Cbm)⁷) 12, (Aph(CONH-OCH₃)⁷) 23 y (Aph(CONH-OH)⁷) 24. Mientras que las afinidades de unión para estos análogos no son distintas de la del precursor 7, el orden de elución de estos análogos en la HPLC a pH neutro sugiere que 24 (RT = 31,6 min) puede ser más hidrófilo que 7 (RT = 34,8 min), 12 (RT = 31,9 min) y 23 (RT = 34,2 min). Puesto que la hidrofilia puede ser un criterio fundamental para un radioligando clínicamente pertinente, sutiles diferencias en la estructura pueden favorecer a uno de estos análogos de la hora de seleccionar un candidato clínico. El hecho de que 12, 23 y 24 no sean superiores a 7 en términos de afinidad de unión por sst₂ y selectividad, respalda la conclusión de que el residuo 7 no es un contribuyente esencial al farmacóforo de sst₂.

A continuación se investigó el efecto de las sustituciones en la posición 8. Es posible que la sustitución de Trp⁸ por SF-Trp sea favorable (Meyers, C. *et al.*, Biochemistry, 17:2326-2330, 1978). Cuando se introdujo en 12, para producir 25 y 26, se observó una ligera mejora en la afinidad de unión por los tres sst_{2/3/5} como se esperaba para el 25 que contenía SF-DTrp y no tanto para el correspondiente 26 que contenía el isómero L. Sin embargo, no se observó aumento de la selectividad para ninguno de los dos análogos.

Fue gratificante descubrir que la sustitución de DTrp⁸ en 7 por DAph(Cbm)⁸ que producía 27 fue claramente superior en términos de selectividad para sst₂ con afinidad de unión mejorada. Además, la derivatización con la adición de DOTA en el extremo N-terminal produjo 28 con aumento adicional de la afinidad de unión hacia sst₂ y una selectividad más de 500 veces mayor hacia todos los demás receptores.

La sustitución de Tyr⁷ en 27 y 28 con Aph(Hor) produjo 29 y 30. Mientras que 29 conservaba alta afinidad de unión hacia sst₂ también presentaba afinidad de unión moderada por sst₃; la afinidad de unión hacia sst₃ se

perdió tras la introducción de DOTA (30). La sustitución de Tyr⁷ en 2 con ITyr produjo 32, cuya afinidad de unión fue similar a la de 2 hacia sst₂.

A continuación, se sustituyó 2Nal en 30 por DTyr para producir 31. De los análogos presentados en este ejemplo, 31 (debido a su hidrofilia, RT = 13,2 min) puede ser el candidato preferente para la biodistribución y, en última instancia, la investigación clínica con respecto a 3 (RT = 13,6 min), 5 (RT = 26,1 min), 28 (RT = 26,7 min), 29 (RT = 27,7 min) o 32 (RT = 25,0 min) que son igualmente potentes y selectivos en el ensayo de unión. Es notable que la secuencia dipeptídica -Aph(Hor)-Daph(Cbm)- descubierta en 29-31 sea idéntica a la descubierta en degarelix (Fe-200486), un antagonista de la hormona liberadora de gonadotropina donde desempeñó un papel crucial en la estabilización de una crisis y en la prolongación de la duración de la acción.

Puesto en perspectiva, los antagonistas que contienen DOTA más afines presentados en este ejemplo (3 y 31) tienen afinidades de unión de tres a cuatro veces mayores que la de SRIF-28 sin afinidad de unión detectable hacia ninguno de los otros cuatro sst y, por lo tanto, son posibles candidatos para el uso clínico.

Todos los análogos ensayados en este ejemplo son antagonistas en el ensayo de liberación de calcio en células HEK293 que expresan de manera estable el sst₂ humano. Ensayándolos en solitario, no influyen en la liberación de calcio de hasta 10 µM. Sin embargo, el efecto agonista del agonista de sst₂ [Tyr³]-octreótido puede antagonizarse competitivamente con una cantidad 100 veces mayor de cada uno de los análogos aplicados individualmente. La FIG. 1 ilustra las propiedades antagonistas de algunos de los antagonistas de sst₂ mediante el ensayo de liberación de calcio.

La propiedad antagonista de los análogos 3, 31 y 32 también se confirmó en un ensayo de internalización basado en inmunofluorescencia (Cescato, R. *et al.*, J. Nucl. Med., 47:502511, 2006), expresando las células HEK293 de manera estable el sst₂ humano. La FIG. 2 ilustra que, aunque el agonista de control [Tyr³]-octreótido puede inducir la internalización de sst₂, los antagonistas selectivos para sst₂ ensayados no tienen ningún efecto cuando se administran en solitario, incluso a una concentración de 10 µM. Además, impiden la internalización de sst₂ inducida por [Tyr³]-octreótido. La FIG. 3 muestra las propiedades antagonistas de otro análogo (32) en el ensayo de internalización ELISA.

Para concluir, una gran mayoría de los análogos presentados en este ejemplo tiene una alta afinidad de unión en el intervalo nanomolar por sst₂ y, con frecuencia, también una alta selectividad para sst₂. Los mejores compuestos fueron 3 y 31 (con valores de Cl₅₀ por debajo de 1 nM), seguidos de 32, 5, 28, 2 y 29. Todos estos antagonistas son de particular interés, ya que todos ellos incluyen un resto DOTA, lo que los convierte en candidatos para la dianización de tumores *in vivo*.

Las referencias a análogos específicos en este ejemplo son las siguientes:

- (1) Ac-pNO₂Phe-c[DCys-Tyr-DTrp-Lys-Cys]-DTyr-NH₂
- (2) DOTA-pNO₂Phe-c[DCys-Tyr-DTrp-Lys-Thr-Cys]-DTyr-NH₂;
- (3) DOTA-pNO₂Phe-c[DCys-Tyr-Daph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]-DTyr-NH₂;
- (4) H₂N-pNO-Phe-c[DCys-Tyr-Daph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂;
- (5) DOTA-pNO-Phe-c[DCys-Tyr-Daph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂;
- (6) H₂N-pNO₂-Phe-c[DCys-Aph(Hor)-Daph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂;
- (7) H₂N-Cpa-c[DCys-Tyr-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂;
- (8) H₂N-Cpa-c[DCys-Tyr-DTrp-NMcLys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂;
- (9) H₂N-Cpa-c[DCys-L-Agl(NMe.benzoilo)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂;
- (10) H₂N-Cpa-c[DCys-D-Agl(NMe.benzoilo)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂;
- (11) H₂N-Cpa-c[DCys-Leu-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂;
- (12) H₂N-Cpa-c[DCys-Aph(Cbm)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂;
- (13) Cbm-Cpa-c[DCys-Aph(Cbm)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂;
- (14) DOTA-Cpa-c[DCys-Aph(Cbm)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂;
- (15) DOTA-βAla-Cpa-c[DCys-Aph(Cbm)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂;
- (16) DOTA-Peg-Cpa-c[DCys-Aph(Cbm)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂;
- (17) H₂N-Cpa-c[DCys-Aph(Cbm)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-NH₂;
- (18) H₂N-Cpa-c[DCys-Aph(Cbm)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-Cha-NH₂;
- (19) H₂N-Cpa-c[DCys-Aph(Cbm)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-Apb(Hor)-NH₂;
- (20) H₂N-Cpa-c[DCys-Aph(Cbm)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-Daph(Cbm)-NH₂;
- (21) H₂N-Cpa-c[DCys-Aph(Cbm)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-Aph(Cbm)-NH₂;
- (22) H₂N-Cpa-c[DCys-Aph(Cbm)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-Daph(Cbm)-GlyOH;
- (23) H₂N-Cpa-c[DCys-Aph(CONH-OCH₃)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂;
- (24) H₂N-Cpa-c[DCys-Aph(CONH-OH)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂;
- (25) H₂N-Cpa-c[DCys-Aph(Cbm)-5F-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂;
- (26) H₂N-Cpa-c[DCys-Aph(Cbm)-5F-Trp-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂;
- (27) H₂N-Cpa-c[DCys-Tyr-Daph(Cbm)-Lys-Trp-Cys]-2Nal-NH₂;
- (28) DOTA-Cpa-c[DCys-Tyr-Daph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂;

- (29) $\text{H}_2\text{N-Cpa-c[DCys-Aph(Hor)-DAph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH}_2$;
 (30) $\text{DOTA-Cpa-c[DCys-Aph(Hor)-DAph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH}_2$;
(31) $\text{DOTA-Cpa-c[DCys-Aph(Hor)-DAph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]-DTyr-NH}_2$; y
 (32) $\text{DOTA-pNO}_2\text{Phe-c[DCys-[Tyr-DTrp-Lys-Thr-Cys]-DTyr-NH}_2$

Ejemplo 11.

Se sintetizaron análogos peptídicos adicionales y se utilizaron en ensayos para determinar su biodistribución en HEK-sst₂ en diversos momentos. Los datos de captación se muestran en las FIGS. 6A y B.

Las denominaciones de los análogos son las siguientes:

JR11: $\text{DOTA-CPA-[DCys-Aph(Hor)-DAph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]-DTyr-NH}_2$

LM3: $\text{DOTA-CPA-[DCys-Tyr-DAph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]-DTyr-NH}_2$

LM4: $\text{DOTA-CPA-[DCys-Pal-DAph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]-DTyr-NH}_2$

Tabla 12

	CI ₅₀	% de internalización 4h	Captación tumoral de HEK-sst ₂ 24h	Relación tumor:riñón	LogD
JR11	0,7 ± 0,12	11,5 ± 0,5	23 ± 2,4	6,29	-2,5
LM3	0,45 ± 0,06	22,5 ± 2,4	24,4 ± 1,7	5,72	-2,14
LM4	0,5 ± 0,2	13,2 ± 0,9			-2,26

REIVINDICACIONES

1. Antagonista de somatostatina que se une a SSTR2, en el que el antagonista de somatostatina es:

5 (xxvii) DOTA-Cpa-c[DCys-Tyr-D_APh(Cbm)-Lys-Thr-Cys]-DTyr-NH₂ ;

en el que

Cpa se refiere a cloro-Phe y A_{Ph}(Cbm) se refiere a 4-ureido-fenilalanina.

10 2. Antagonista de somatostatina según la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un quelante, un agente complejante, un agente conjugante o un marcador.

3. Antagonista de somatostatina según la reivindicación 1 para utilizarse en un método de obtención de radioimágenes de cáncer, que comprende:

15 (a) administrar una composición que comprende el antagonista de somatostatina según la reivindicación 1, y un radionúclido; y
(b) detectar el radionúclido.

20 4. Uso del antagonista de somatostatina según la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento para tratar un tumor, en el que la composición comprende el antagonista de somatostatina y un radionúclido.

5. Kit para el diagnóstico por radioimagen del cáncer, que comprende:

25 (a) el antagonista de somatostatina según la reivindicación 1 en un recipiente adecuado, en el que el antagonista de somatostatina:

(i) está marcado con al menos un radionúclido;
(ii) no está marcado y está provisto de al menos un radionúclido en un recipiente adecuado para el marcado;
30 o
(iii) no está marcado y puede marcarse posteriormente con al menos un radionúclido; y
(b) instrucciones de uso.

35 6. Kit para el tratamiento del cáncer, que comprende

(a) el antagonista de somatostatina según la reivindicación 1 en un recipiente adecuado, en el que, tras el marcado del antagonista de somatostatina con radionúclidos, el antagonista está presente en una cantidad terapéuticamente eficaz para el tratamiento del cáncer, y en el que el antagonista de somatostatina:

40 (i) está marcado con al menos un radionúclido,
(ii) no está marcado, y está provisto de al menos un radionúclido en un recipiente adecuado para el marcado,
o
(iii) no está marcado, y puede marcarse posteriormente con al menos un radionúclido; y
45 (b) instrucciones de uso.

7. Antagonista de somatostatina según la reivindicación 1 para utilizarse en la obtención de radioimágenes o para el tratamiento del cáncer.

50

55

60

65

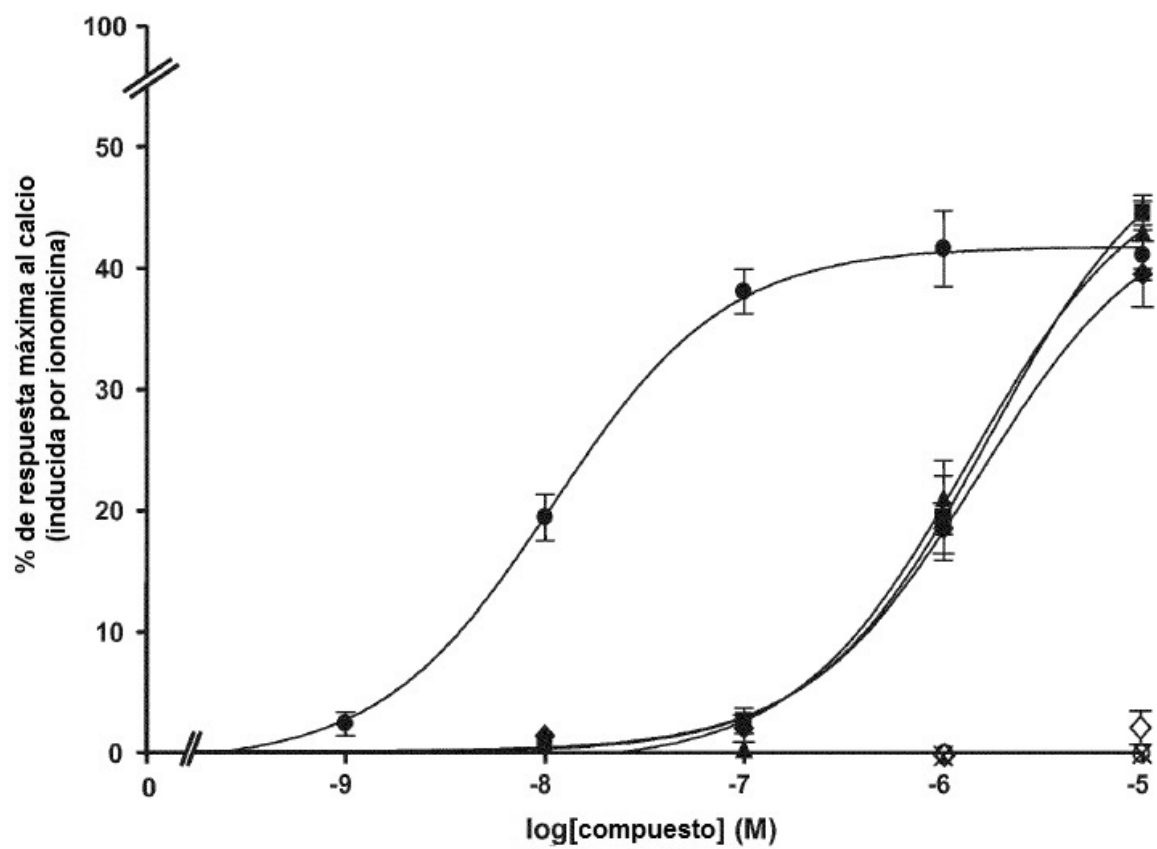


FIG. 1

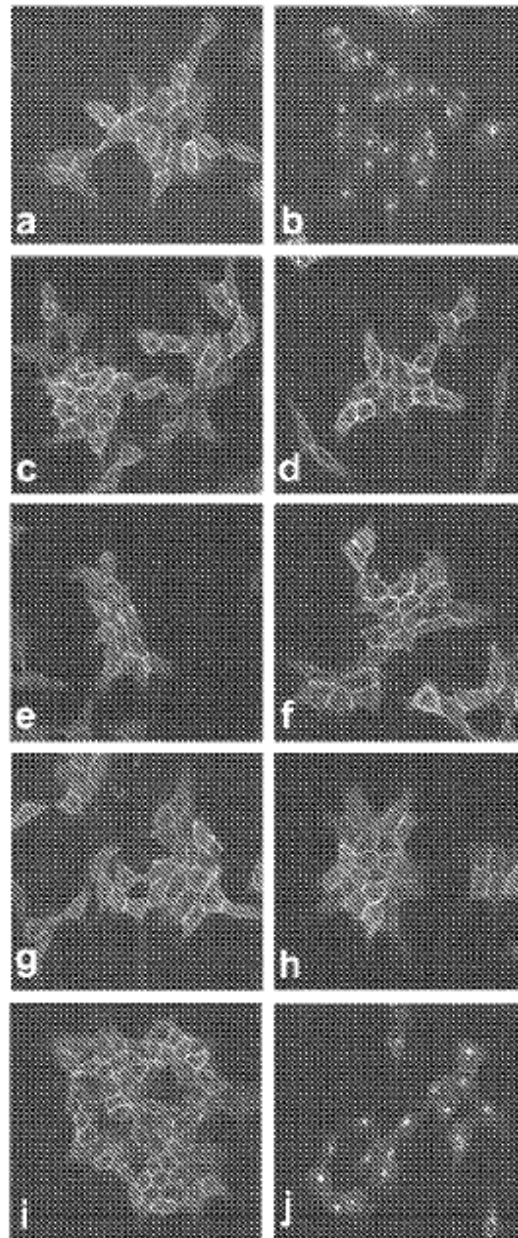


FIG. 2

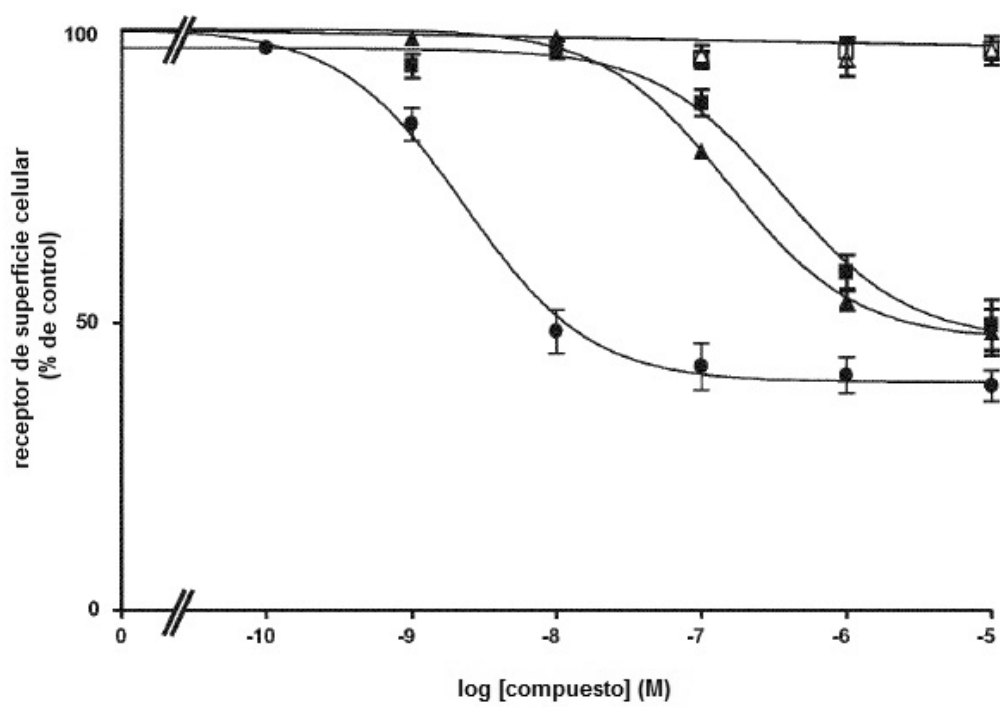


FIG. 3

Figura 4

Estructura de análogos de SRIF															Pureza		MS ^c	
Los residuos se numeran según la numeración de SRIF																		
H-Ala ¹ -Gly ² -c[Cys ³ -Lys ⁴ -Asn ⁵ -Phe ⁶ -Phe ⁷ -Trp ⁸ -Lys ⁹ -Thr ¹⁰ -Phe ¹¹ -Thr ¹² -Ser ¹³ -Cys ¹⁴]-OH (SRIF)															HPLC ^a	CZE ^b	M _{calc}	M+H _{obs}
Sustitución en H-DPhe ² -c[Cys ³ -Phe ⁷ -DTrp ⁸ -Lys ⁹ -Thr ¹⁰ -Cys ¹⁴]-Thr ¹⁵ -ol (octreótido)																		
	N-terminal	2	3	7	8	9	10	14	15	C-terminal								
1	Ac-	pNO ₂ Phe-	DCys-	Tyr-	DTrp-	Lys-	Thr-	Cys-	DTrp-	NH ₂	99	99	99	99	99	1196,44	1197,59	
2	Trp ¹ -	pNO ₂ Phe-	DCys-	Tyr-	DTrp-	Lys-	Thr-	Cys-	DTrp-	NH ₂	95	97	97	97	97	1540,61	1541,46	
3	Trp ¹ -	pNO ₂ Phe-	DCys-	Tyr-	D ¹ Aph(Cbm)-	Lys-	Thr-	Cys-	DTrp-	NH ₂	99	99	99	99	99	1559,63	1560,83	
4	H ₂ N-	pNO ₂ Phe-	DCys-	Tyr-	D ¹ Aph(Cbm)-	Lys-	Thr-	Cys-	2Nal-	NH ₂	99	99	99	99	99	1207,47	1208,54	
5	Trp ¹ -	pNO ₂ Phe-	DCys-	Tyr-	D ¹ Aph(Cbm)-	Lys-	Thr-	Cys-	2Nal-	NH ₂	99	99	99	99	99	1593,65	1594,17	
6	H ₂ N-	pNO ₂ Phe-	DCys-	D ¹ Aph(Cbm)-	D ¹ Aph(Cbm)-	Lys-	Thr-	Cys-	2Nal-	NH ₂	99	99	99	99	99	1346,50	1347,59	
7	H ₂ N-	Cpa-	DCys-	Tyr-	DTrp-	Lys-	Thr-	Cys-	2Nal-	NH ₂	99	99	99	99	99	1177,43	1178,43	
8	H ₂ N-	Cpa-	DCys-	Tyr-	DTrp-	NMeLys-	Thr-	Cys-	2Nal-	NH ₂	97	99	99	99	99	1191,45	1192,52	
9	H ₂ N-	Cpa-	DCys-	Lys-A ¹ D ¹ (Cbm)- Ser ¹ -	DTrp-	Lys-	Thr-	Cys-	2Nal-	NH ₂	95	98	98	98	98	1204,45	1205,51	
10	H ₂ N-	Cpa-	DCys-	Lys-A ¹ D ¹ (Cbm)- Ser ¹ -	DTrp-	Lys-	Thr-	Cys-	2Nal-	NH ₂	98	99	99	99	99	1204,45	1205,48	
11	H ₂ N-	Cpa-	DCys-	Lys-	DTrp-	Lys-	Thr-	Cys-	2Nal-	NH ₂	99	99	99	99	99	1127,45	1128,46	
12	H ₂ N-	Cpa-	DCys-	D ¹ Aph(Cbm)-	DTrp-	Lys-	Thr-	Cys-	2Nal-	NH ₂	99	97	97	97	97	1219,45	1220,12	
13	Cbm-	Cpa-	DCys-	D ¹ Aph(Cbm)-	DTrp-	Lys-	Thr-	Cys-	2Nal-	NH ₂	96	98	98	98	98	1262,46	1263,40	
14	Trp ¹ -	Cpa-	DCys-	D ¹ Aph(Cbm)-	DTrp-	Lys-	Thr-	Cys-	2Nal-	NH ₂	99	98	98	98	98	1605,64	1606,50	
15	Trp ¹ -	Cpa-	DCys-	D ¹ Aph(Cbm)-	DTrp-	Lys-	Thr-	Cys-	2Nal-	NH ₂	99	98	98	98	98	1676,67	1677,67	
16	Trp ¹ -	Cpa-	DCys-	D ¹ Aph(Cbm)-	DTrp-	Lys-	Thr-	Cys-	2Nal-	NH ₂	99	99	99	99	99	1809,62	1810,24	
17	H ₂ N-	Cpa-	DCys-	D ¹ Aph(Cbm)-	DTrp-	Lys-	Thr-	Cys-	-----	NH ₂	99	99	99	99	99	1022,37	1023,49	
18	H ₂ N-	Cpa-	DCys-	D ¹ Aph(Cbm)-	DTrp-	Lys-	Thr-	Cys-	Cha-	NH ₂	99	99	96	96	96	1175,48	1176,36	
19	H ₂ N-	Cpa-	DCys-	D ¹ Aph(Cbm)-	DTrp-	Lys-	Thr-	Cys-	Aph(Hor)-	NH ₂	99	99	99	99	99	1324,47	1325,55	
20	H ₂ N-	Cpa-	DCys-	D ¹ Aph(Cbm)-	DTrp-	Lys-	Thr-	Cys-	D ¹ Aph(Cbm)-	NH ₂	99	99	99	99	99	1227,45	1228,45	
21	H ₂ N-	Cpa-	DCys-	D ¹ Aph(Cbm)-	DTrp-	Lys-	Thr-	Cys-	Aph(Cbm)-	NH ₂	99	99	99	99	99	1227,45	1228,37	
22	H ₂ N-	Cpa-	DCys-	D ¹ Aph(Cbm)-	DTrp-	Lys-	Thr-	Cys-	D ¹ Aph(Cbm)-	Gly-OH	98	98	98	98	98	1285,46	1286,34	

Estructura de análogos de SRIF											
Los residuos se numeran según la numeración de SRIF											
H-Ala ¹ -Gly ² -c[Cys ³ -Lys ⁴ -Asn ⁵ -Phe ⁶ -Phe ⁷ -Trp ⁸ -Lys ⁹ -Thr ¹⁰ -Phe ¹¹ -Thr ¹² -Ser ¹³ -Cys ¹⁴]-OH (SRIF)											
Sustitución en H-DPhe ² -c[Cys ³ -Phe ⁷ -DTrp ⁸ -Lys ⁹ -Thr ¹⁰ -Cys ¹⁴]-Thr ¹⁵ -ol (octreótido)											
	N-terminal	2	3	7	8	9	10	14	15	C-terminal	
23	H ₂ N -	Cpa-	DCys-	Asp(Asn) ₂	DTrp-	Lys-	Thr-	Cys-	2Nal-	NH ₂	99
24	H ₂ N -	Cpa-	DCys-	Asp(Asn) ₂	DTrp-	Lys-	Thr-	Cys-	2Nal-	NH ₂	99
25	H ₂ N -	Cpa-	DCys-	Asp(Asn) ₂	5F-DTrp-	Lys-	Thr-	Cys-	2Nal-	NH ₂	96
26	H ₂ N -	Cpa-	DCys-	Asp(Asn) ₂	5F-Trp-	Lys-	Thr-	Cys-	2Nal-	NH ₂	96
27	H ₂ N -	Cpa-	DCys-	Tyr-	DAsp(Chn) ₂	Lys-	Thr-	Cys-	2Nal-	NH ₂	99
28	DTrp-A-	Cpa-	DCys-	Tyr-	DAsp(Chn) ₂	Lys-	Thr-	Cys-	2Nal-	NH ₂	99
29	H ₂ N -	Cpa-	DCys-	Asp(Asn) ₂	DAsp(Chn) ₂	Lys-	Thr-	Cys-	2Nal-	NH ₂	91
30	DTrp-A-	Cpa-	DCys-	Asp(Asn) ₂	DAsp(Chn) ₂	Lys-	Thr-	Cys-	2Nal-	NH ₂	95
31	DTrp-A-	Cpa-	DCys-	Asp(Asn) ₂	DAsp(Chn) ₂	Lys-	Thr-	Cys-	DTrp-	NH ₂	96
32	DTrp-A-	pNO ₂ -Phe-	DCys-	DTrp-	DTrp-	Lys-	Thr-	Cys-	DTrp-	NH ₂	99
										MS ^c	
										HPCL ^a	CZE ^b
										M _{calc}	
										M _{obs}	
										M+H _{obs}	
										M+H _{calc}	

^aPorcentaje de pureza determinado mediante HPLC utilizando un sistema tampón: A = TEAP (pH 2,5) y B = CH₃CN al 60%/A al 40% con una pendiente del gradiente del 1% de B/min, a un caudal de 0,2 ml/min en una columna Vydac C₁₈ (0,21 cm x 15 cm, tamaño de partícula de 5 µm, tamaño de poro de 300Å). Detección a 214 nm. ^bLa electroforesis capilar de zona (CZE) se realizó con un Beckman P/ACE System 2050 controlado por un IBM Personal System/2 modelo 50Z y utilizando un integrador ChromJet. Intensidad del campo de 15 kV a 30°C, fase móvil: fosfato sódico 100 mM (85:15, H₂O:CH₃CN) pH 2,50, en un capilar Supelco P175 (363 µm OD x 75 µm ID x 50 cm de longitud). Detección a 214 nm.

^cLa m/z calculada del monoisótopo comparada con la masa monoisotópica [M + H]⁺ observada.

1. Bass, R.T., et al., *Identification and characterization of novel somatostatin antagonists*, Mol. Pharmacol., 1996, **50**(4): p. 709-715.
2. Hocart, S.J., et al., *Highly potent cyclic disulfide antagonists of somatostatin*, J. Med. Chem., 1999, **42**(11): p. 1863-1871.
3. Rajeswaran, W.G., et al., *Highly potent and subtype selective ligands derived by N-methyl scan of a somatostatin antagonist*, J. Med. Chem., 2001, **44**(8): p. 1305-1311.

Figura 5

	sst1 ^a	sst2 ^a	sst3 ^a	sst4 ^a	sst5 ^a	Internalización de sst ₂ ensayada <i>in vitro</i> en células HEK-sst ₂ (n ≥ 2)	Liberación de calcio ensayada <i>in vitro</i> en células HEK-sst ₂ (n ≥ 2)
SRI							
F-28	2,7 ± 0,2	2,7 ± 0,2	3,3 ± 0,4	2,6 ± 0,4	2,4 ± 0,2		
1	>1000	3,6 ± 0,4	>1000	349 ± 30	276 ± 119	Antagonista	
2	>1000	1,5 ± 0,4	>1000	287 ± 27	>1000	Antagonista	Antagonista
3	>1000	0,75 ± 0,2	>1000	>1000	>1000	Antagonista	Antagonista
4	>1000	2,6 ± 0,7	384 ± 97	>1000	>1000	Antagonista	
5	>1000	1,3 ± 0,2	>1000	>1000	>1000	Antagonista	Antagonista
6	>1000	2,7 ± 0,6	451 ± 80	>1000	>1000		
7	>1000	5,7 ± 1,5	112 ± 32	296 ± 19	218 ± 63	Antagonista	Antagonista
8	>1000	10 ± 3,5	61 ± 14	715 ± 137	53 ± 19	Antagonista	Antagonista
9	>1000	17 ± 5	827 ± 244	>1000	442 ± 254	Antagonista	
10	>1000	158 ± 37	102 ± 10	116 ± 47	728 ± 272		
11	>1000	58 ± 21	340 ± 77	908 ± 138	657 ± 299		
12	>1000	6,9 ± 0,7	155 ± 29	479 ± 8	149 ± 37	Antagonista	Antagonista
13	>1000	23 ± 4,3	54 ± 15	136 ± 7,5	111 ± 17		
14	>1000	9,8 ± 1,2	972 ± 212	831 ± 82	>1000	Antagonista	Antagonista
15	>1000	46 ± 13	124 ± 53	>1000	>1000	Antagonista	Antagonista
16	>1000	40 ± 1,5	88 ± 13	728 ± 158	895 ± 294	Antagonista	
17	>1000	5,9 ± 1,8	138 ± 52	>1000	461 ± 106	Antagonista	Antagonista
18	>1000	4,1 ± 0,9	255 ± 79	>1000	247 ± 66		
19	>1000	27 ± 3,8	162 ± 19	>1000	320 ± 69		
20	>1000	5,4 ± 1	328 ± 69	800 ± 295	191 ± 49		
21	>1000	15 ± 3	336 ± 46	551 ± 151	560 ± 144		
22	>1000	52 ± 4,7	661 ± 115	>1000	810 ± 200		
23	>1000	9,3 ± 0,9	157 ± 49	883 ± 174	313 ± 35		
24	>1000	9,3 ± 1,4	120 ± 45	813 ± 152	426 ± 189		
25	>1000	4,9 ± 1,5	50 ± 5,8	287 ± 64	94 ± 34	Antagonista	Antagonista
26	>1000	23 ± 3,7	90 ± 11	905 ± 132	618 ± 248		

27	>1000	3,7 ± 1,3	346 ± 81	>1000	>1000		
28	>1000	1,4 ± 0,5	>1000	>1000	>1000	Antagonista	Antagonista
29	>1000	2,4 ± 0,6	83 ± 2,0	>1000	>1000	Antagonista	Antagonista
30	>1000	1,7 ± 0,2	>1000	>1000	>1000	Antagonista	Antagonista
31	>1000	0,7 ± 0,12	>1000	>1000	>1000	Antagonista	Antagonista
32	>1000	1,2 ± 0,4	>1000	455 ± 125	>1000	Antagonista	Antagonista

^aLos valores de CI₅₀ (nM) se obtuvieron a partir de ensayos competitivos de desplazamiento de radioligando que reflejan las afinidades de los análogos por los receptores de SRIF clonados utilizando como radioligando el [Leu⁸, DTrp²², ¹²⁵I-Tyr²⁵]SRIF-28 no selectivo. Valor medio ± EEM cuando N ≥ 3.

Radioligando: ^{111}In -LM3
Animal: ratones desnudos portadores de tumor Hek sst2; 3 ratones/grupo
Cantidad de inyección: 5 μCi / 10 pmol / 100 μl /ratón
Momento: 4h, 24h, 48h

	4h			24h			48h		
sangre	0,18	±	0,03	0,03	±	0,02	0,03	±	0,01
corazón	0,26	±	0,07	0,10	±	0,01	0,11	±	0,00
hígado	0,93	±	0,20	0,23	±	0,02	0,18	±	0,01
bazo	0,79	±	0,35	0,22	±	0,03	0,26	±	0,08
pulmón	3,28	±	1,12	1,01	±	0,40	0,54	±	0,25
riñón	7,93	±	0,82	5,79	±	0,40	3,78	±	0,43
estómago	17,61	±	0,70	3,33	±	0,51	3,16	±	0,72
intestino	2,17	±	0,54	0,29	±	0,11	0,19	±	0,03
suprarrenal	4,56	±	0,99	1,69	±	0,59	1,40	±	0,46
páncreas	20,01	±	16,87	2,99	±	0,63	1,68	±	0,54
hipófisis	10,42	±	5,45	4,54	±	2,51	0,04	±	0,00
músculo	0,20	±	0,02	0,16	±	0,05	0,13	±	0,05
hueso	3,58	±	1,71	1,24	±	0,75	1,02	±	0,13
tumor	42,18	±	2,20	27,96	±	4,35	15,02	±	2,52

Órgano	4h	24h	48 h
tumor:riñón	5,32	4,83	3,97
tumor:hígado	45,11	122,15	85,80
tumor:páncreas	2,11	9,36	8,94
tumor:sangre	231,02	846,05	583,53
tumor:músculo	207,94	178,76	113,67

FIG. 6A

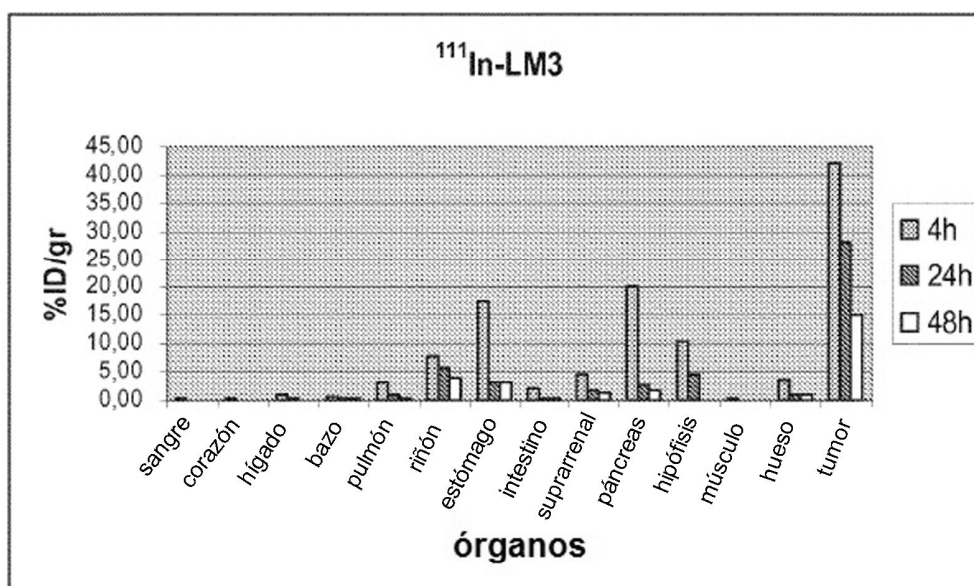


FIG. 6B