

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 942 260**

51 Int. Cl.:

C07K 14/655 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
A61K 38/12 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)
A61K 51/08 (2006.01)
A61K 47/69 (2007.01)
A61K 47/62 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.09.2015 PCT/IB2015/056941**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **17.03.2016 WO16038565**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2015 E 15839915 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2023 EP 3166967**

54 Título: **Ligandos sintéticos de receptores de somatostatina**

30 Prioridad:

14.09.2014 US 201462050153 P
14.09.2014 US 201462050155 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.05.2023

73 Titular/es:

**TEL HASHOMER MEDICAL RESEARCH
 INFRASTRUCTURE AND SERVICES LTD.
 (100.0%)
 The Chaim Sheba Medical Center
 Tel Hashomer, 52621 Ramat Gan, IL**

72 Inventor/es:

**KOSTENICH, GENADY;
 ORON-HERMAN, MOR;
 ORENSTEIN, ARIE;
 SHEKHTER ZAHAVI, TALIA;
 GAZIT, EHUD;
 SALITRA, YOSEPH y
 BUZHANSKY, LUDMILA**

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 2 942 260 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ligandos sintéticos de receptores de somatostatina

5 SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud obtiene la prioridad de tanto la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° de Serie 62/050,153 como de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos N° 62/050.155, presentadas ambas el 14 de septiembre del 2014.

10

LISTADO DE SECUENCIAS

Esta solicitud incorpora por referencia secuencias de aminoácidos, que se presentan en el archivo llamado "196_SEQ_LIST_ST25.txt", que tiene 36 Kbytes de tamaño, y que se creó el 8 de septiembre del 2015 en el formato de máquina de IBM-PC, que tiene compatibilidad de sistema operativo con MS-Windows, y se presenta junto con la presente.

15

CAMPO Y ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20

La invención, en algunas realizaciones, se refiere al campo de los ligandos de receptores, y más particularmente a ligandos para receptores de somatostatina.

25

La somatostatina es una proteína endógena de 116 residuos de aminoácidos de largo (SEQ ID NO: 1) que se secreta, entre otros, en el cerebro, el estómago, el intestino y las células delta pancreáticas cuyo extremo C terminal se escinde in vivo para producir dos formas circulatorias activas, SST-14 (14 residuos de aminoácidos, 103-116; SEQ ID NO: 2):

Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys
y SST-28 (28 residuos de aminoácidos, 89-116; (SEQ ID NO:3):
Ser-Ala-Asn-Ser-Asn-Pro-Ala-Met-Ala-Pro-Arg-Glu-Arg-Lys-(SST-14).

30

SST-14 y SST-28 son ambos ligandos y agonistas para una familia de cinco receptores transmembrana 7 acoplados a proteína G llamados receptores de somatostatina, SSTR1-SSTR5, a los que se hace referencia colectivamente en la presente como SSTRx. Los SSTRx se expresan en células de tejido sano y también se sobreexpresan en algunas células patológicas, incluyendo muchos tipos diferentes de células cancerosas.

35

Tanto SST-14 como SST-28 actúan principalmente como hormonas reguladoras uniéndose a los cinco SSTRx para ser internalizados en las células que expresan SSTRx. Como hormonas reguladoras, se sabe que SST-14 y SST-28 endógenos regulan otras hormonas del sistema endocrino, afectan a la neurotransmisión, afectan a la proliferación celular e inhiben la liberación de numerosas hormonas y proteínas secretoras de las células que expresan SSTRx. Específicamente, la internalización de SST-14 y SST-28 endógenos en una célula que expresa SSTRx activa potencialmente varias vías de señalización que inducen cascadas de señalización complejas (por ejemplo, inhibición de la producción de adenilato ciclasa y AMPc, activación de canales iónicos de potasio, activación de una serie de proteínas fosfatasa de diferentes familias), el efecto específico varía según el subtipo SSTR y el tipo de tejido en el que está localizada la célula. Además, una sola célula o tipo de tejido (tanto células y tejidos patológicos como no patológicos) típicamente expresa más de un subtipo de SSTRx, y la proporción relativa de los diferentes SSTRx de una célula dada puede cambiar con el tiempo y como resultado de diferentes condiciones, incluyendo la etapa de desarrollo de la célula, la exposición a hormonas distintas de la somatostatina, neuropeptidos y otros estímulos bioquímicos.

45

50

Hasta la fecha, hay dos análogos sintéticos de somatostatina aprobados para uso terapéutico: Octreotida y Lanreotida, ambos muestran una alta afinidad de unión a SSTR2, afinidad de unión moderada a SSTR3 y SSTR5, y casi ninguna afinidad de unión a SSTR1 y SSTR4

55

La Lanreotida (disponible comercialmente en forma de acetato como Somatuline® de Ipsen Pharma SAS, París, Francia) es un análogo sintético de la somatostatina que es un octopéptido con una porción cíclica de seis residuos de aminoácidos, que tiene la secuencia de residuos de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:4:

Napht-Cys*-Tyr-Trp-Lys-Val-Cys*-Thr

donde Napht es el residuo de aminoácidos alfa -NH-CH(CH₂-C₁₀H₇)-C(O)- (D-naftilalanina D-Nal), y los asteriscos indican ciclación por un enlace S-S entre dos residuos de aminoácidos de cisteína. La Lanreotida se ha prescrito para el tratamiento de la acromegalia y los síntomas provocados por tumores neuroendocrinos, sobre todo el síndrome carcinoide.

60

65

La Octreotida (disponible comercialmente en forma de acetato como Sandostatin® de Novartis, Basilea, Suiza) es un análogo sintético de somatostatina que es un octopéptido con una porción cíclica de seis residuos de aminoácidos, que tiene la secuencia de residuos de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5:

DPhe-Cys*-Phe-DTrp-Lys-Thr-Cys*-Throl
 donde Throl es el residuo de aminoácidos beta -NH-CH(CH₂OH)-CH(CH₃)-OH (L-treoninol) y los asteriscos indican ciclación por un enlace S-S entre los dos residuos de aminoácidos.

5 Uno de los presentes inventores ha divulgado análogos de somatostatina peptídicos sintéticos adicionales en la US 7.700.717. Un análogo prominente de este tipo (designado como 3207) tiene una secuencia de residuos de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6:

DPhe-Cys*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2*-NH₂
 y el conjugado péptido-fluorescente designado "86" de la misma:
 10 FITC-GABA-DPhe-Cys*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2*-NH₂

que también se identifica en la presente como "Compuesto 1", donde GlyS2 es el residuo de aminoácidos alfa-secundario -N(CH₂CH₂S-)CH₂CO- (glicina con una fracción -CH₂CH₂S- añadida al grupo amino terminal, como se describe en Gazal S et al J Pept Res 2001, 58(6), 527-539; que en el listado de secuencias se denomina N-tioetil Glicina), los asteriscos indican ciclación por un enlace disulfuro (S-S) entre dos residuos de aminoácidos, y FITC-GABA es un agente activo fluorescente compuesto por el fluoróforo FITC (isotiocianato de fluoresceína) y el conector GABA (ácido gamma-aminobutírico).

20 Sería útil disponer de análogos de somatostatina terapéuticamente activos, estables y específicos del receptor.

SUMARIO DE LA INVENCION

25 La invención, se refiere al campo de los ligandos de receptores, y más particularmente a ligandos para receptores de somatostatina.

De acuerdo con la presente invención se proporciona un ligando de receptores de somatostatina, que consiste en: una fracción peptídica o una forma de amida de la misma, dicha fracción peptídica consistiendo en una secuencia de residuos de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- Cys-Phe-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:14);
- Arg-Cys-Phe-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:15);
- DPhe-Arg -Cys-Phe-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:16);
- Cys-Phe-Trp-DTrp-Orn-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:19);
- 35 -DPhe-Cys-Phe-Trp-DTrp-Om-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:20);
- Cys-Tyr-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:23);
- DPhe-Cys-Tyr-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:24);
- Cys-Phe-DTrp-Orn-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:27);
- Arg-Cys-Phe-DTrp-Orn-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:28);
- 40 DPhe-Arg-Cys-Phe-DTrp-Orn-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:29);
- Cys-Tyr-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:32);
- Arg-Cys-Tyr-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:33);
- DPhe-Arg-Cys-Tyr-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:34);
- Cys-Tyr-DTrp-Orn-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:37);
- 45 DPhe-Cys-Tyr-DTrp-Orn-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:38);
- Cys-Arg-Phe-Phe-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:43);
- DPhe-Cys-Arg-Phe-Phe-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:44);
- Cys-Arg-Phe-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:48);
- 50 DPhe-Cys-Arg-Phe-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:49);
- DPhe-HCys-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:51);
- DPhe-DCys-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:53);
- Cys-Phe-Trp-DTrp-Aib-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:56);
- DPhe-Cys-Phe-Trp-DTrp-Aib-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:57);
- Cys-Phe-Trp-DTrp-LysAc-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:60);
- 55 DPhe-Cys-Phe-Trp-DTrp-LysAc-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:61);
- DPhe-Cys-Phe-Trp-DTrp-Arg-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:63)
- Cys-Phe-Trp-DTrp-HomoLys-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:66); y
- DPhe-Cys-Phe-Trp-DTrp-HomoLys-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:67)

60 en donde:
 dicha secuencia de residuos de aminoácidos se cicla con un enlace azufre-azufre entre dicho átomo de azufre de GlyS2 y un átomo de azufre de una fracción de cisteína, de dicha secuencia de residuos de aminoácidos seleccionada; y opcionalmente por lo menos una fracción de agente activo enlazada covalentemente con dicha fracción peptídica, o enlazada indirectamente con el átomo de nitrógeno terminal de un residuo de aminoácidos N-terminal de dicha fracción peptídica a través de un conector;

en donde la fracción de agente activo se selecciona del grupo que consiste en:

una fracción de imagenología, una fracción terapéutica, un colorante, una fracción fluorescente, una toxina, un quelante, una fracción con un átomo metálico, una fracción con un átomo radioactivo, una nanopartícula, un polímero de etilenglicol, fotosensibilizador, un constituyente de liposomas y un constituyente de micelas.

5 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la invención, también se proporciona una composición farmacéutica que comprende: como ingrediente activo, por lo menos un ligando de receptores de somatostatina (sintético) de acuerdo con la presente invención; y un portador farmacéuticamente aceptable.

10 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la invención, también se proporciona el ligando de receptores de somatostatina de acuerdo con la presente invención para su uso en el tratamiento de un organismo vivo.

15 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la invención, también se proporciona un método para tratar una célula que expresa un receptor de somatostatina que comprende: administrar por lo menos un ligando de receptores de somatostatina de acuerdo con la presente invención a una célula que expresa un receptor de somatostatina, tratando de este modo la célula en donde dicha célula y dicha administración es *in vitro*.

20 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece la invención. En caso de conflicto, prevalecerá la memoria descriptiva, incluyendo las definiciones.

25 A los aminoácidos se hace referencia mediante el código estándar de tres letras. Los aminoácidos son L-aminoácidos a menos que se indique lo contrario, por ejemplo, mediante la adición del prefijo "D". Por ejemplo, el código Trp se refiere a L-triptófano, mientras que el código DTrp se refiere a D-triptófano. El código Aib se refiere al ácido 2-aminoisobutírico. El código Orn se refiere a Ornitina. El código Lys-Ac se refiere a acetilisina. El código HomoLys se refiere a la homolisina. El código HCys se refiere a la homocisteína. El código Napht se refiere a D-naftilalanina. El código Throl se refiere a L-treoninol. El código GlyS2 se refiere al residuo de aminoácidos N-tioetil Gly (Gazal et al, *ibid*) como se ha descrito anteriormente.

30 Como se usa en la presente, los términos "que comprende", "que incluye", "que tiene" y variantes gramaticales de los mismos deben considerarse como una especificación de las características, números enteros, pasos o componentes expuestos, pero no impiden la adición de una o más características, números enteros, pasos, componentes o grupos de los mismos adicionales. Estos términos abarcan los términos "que consiste en" y "que consiste esencialmente en".

35 Como se usa en la presente, los artículos indefinidos "un" y "uno" significan "por lo menos uno" o "uno o más" a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

40 Como se usa en la presente, cuando un valor numérico está precedido por el término "aproximadamente", el término "aproximadamente" se pretende que indique +/-10%.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

45 La invención se expone en el conjunto adjunto de reivindicaciones. Las realizaciones y/o los ejemplos de la siguiente descripción que no están cubiertas por las reivindicaciones adjuntas no se consideran parte de la presente invención.

50 Algunas realizaciones de la invención se describen en la presente con referencia a las figuras acompañantes. La descripción, junto con las figuras, hace evidente a un experto en la técnica cómo pueden ponerse en práctica algunas realizaciones de la invención. Las figuras tienen el propósito de un análisis ilustrativo y no se intenta mostrar detalles estructurales de una realización con más detalle del necesario para una comprensión fundamental de la invención. En aras de la claridad, algunos objetos representados en las figuras no están a escala.

55 En las figuras:

La Figura 1 ilustra el vector de transfección y el proceso de transfección usado para preparar líneas celulares para evaluar la afinidad de unión de los ligandos de los receptores de somatostatina de acuerdo con las enseñanzas de la presente;

60 La Figura 2 es un gráfico de barras que muestra las veces de aumento de la expresión del ARNm de SSTRx en células HEK-293 transfectadas;

La Figura 3 muestra reproducciones de fotografías que validan la expresión de SSTRx en bloques de células transfectadas por anticuerpos específicos;

65 Las Figuras 4A-4C muestran reproducciones de fotografías que ilustran la internalización del Compuesto 1 en células HEK transfectadas:

Figura 4A (imagen de la izquierda): fluorescencia verde del Compuesto 1;
 Figura 4B (imagen central): Proteína de fluorescencia roja (RFP) que indica la transfección del gen de SSTR humano;
 Figura 4C (imagen derecha) una imagen combinada;

Las Figuras 5A y 5B muestran reproducciones de fotografías que indican la internalización específica del Compuesto 1 en células HEK transfectadas con SSTR1-SSTR5:

Figura 5A: muestra fluorescencia verde del Compuesto 1;
 Figura 5B: muestra una imagen combinada de la proteína de fluorescencia roja (RFP) que indica la transfección del gen SSTR humano y PTR-86;

Las Figuras 6A, 6B y 6C son gráficos que muestran los resultados de FACS del Compuesto 1 en células HEK: Figura 6A(Control): Células nativas, no transfectadas; Figura 6B (RFP): células transfectadas con SSTR-5 sin Compuesto 1; Figura 6C (PTR86) Células transfectadas que sobreexpresan SSTR-5 incubadas durante 1 h con Compuesto 1 500 nM;

Las Figuras 7A y 7B muestran una evaluación típica ex vivo de la biodistribución del compuesto en ratones con tumor pancreático BON1 usando imagenología de fluorescencia:

Figura 7A: muestras de tejido;
 Figura 7b: fluorescencia de las muestras de tejido 24 horas después de la administración IV de un compuesto divulgado en la presente (excitación 460 nm, emisión >500 nm);

La Figura 8 muestra la fluorescencia de secciones macroscópicas de tumores BON1 24 horas después de la administración IV del Compuesto 1 (marcado en la parte superior con 86), Compuesto 3 (segundo desde arriba marcado con Orn), Compuesto 2 (penúltimo marcado con 58) y Compuesto 4 (marcado en la parte inferior con Y) (10 mg /kg);

La Figura 9 muestra una reproducción de fotografías de la evaluación comparativa de la biodistribución de los compuestos de acuerdo con las enseñanzas de la presente (10 mg/kg) 24 horas después de la administración IV, mediante imagenología de fluorescencia microscópica (x40 aumentos) (columna izquierda Compuesto 2, seguido del Compuesto 1, seguido del Compuesto 3. Columna más a la derecha Compuesto 4);

La Figura 10 muestra una reproducción de fotografías que muestran la biodistribución dependiente del tiempo del Compuesto 3 (10 mg/kg) en bazo, páncreas y tumor después de la administración IV, mediante imagenología de fluorescencia microscópica (x40 aumentos);

Las Figuras 11A y 11B muestran la acumulación intracelular del Compuesto 3 (10 mg/kg) en el tumor BON1 1 h después de la administración IV. Microscopio fluorescente (Figura 11A: x100, Figura 11B: aumento x200);

Las Figuras 12A y 12B muestran la acumulación intracelular del Compuesto 3 (Figura 12A) y del Compuesto 2 (Figura 12B) en un tumor HT116 24 h después de la administración IV. Microscopía de fluorescencia (x200 aumentos); y

La Figura 13 es una descripción esquemática de una realización de un ligando de receptores de somatostatina sintético de acuerdo con las enseñanzas de la presente e incluye una fracción peptídica cíclica que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:68. En algunas realizaciones, por lo menos cuatro de los residuos de aminoácidos en las posiciones 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 están presentes como se ha analizado anteriormente y a continuación en la presente.

DESCRIPCIÓN DE ALGUNAS REALIZACIONES DE LA INVENCION

La invención, en algunas realizaciones, se refiere al campo de los ligandos de receptores, y más particularmente a ligandos para receptores de somatostatina.

Los principios, usos e implementaciones de las enseñanzas de la presente pueden comprenderse mejor con referencia a la descripción y las figuras acompañantes. Después de una lectura cuidadosa de la descripción y las figuras presentes en la presente, un experto en la técnica puede implementar la invención sin un esfuerzo o experimentación indebida.

Antes de explicar con detalle por lo menos una realización de la invención, debe entenderse que la invención no se limita en sus aplicaciones a los detalles de construcción y disposición de los componentes y/o métodos expuestos en la siguiente descripción y/o ilustrado en los dibujos y/o los Ejemplos. La invención puede implementarse con otras realizaciones y puede ponerse en práctica o llevarse a cabo de varias maneras. También se entiende que la fraseología y la terminología empleadas en la presente tienen propósitos descriptivos y no deben considerarse como limitativas.

En el campo de la biología, se sabe que los procesos biológicos en un organismo vivo están regulados por ligandos de receptores endógenos que se unen a un receptor apropiado, afectando de este modo a los procesos

celulares en los que está implicado el receptor. El efecto exacto que tiene un ligando de receptores dado cuando se une a un receptor depende de varios factores, incluyendo si el ligando de receptores es un agonista, antagonista, agonista inverso, agonista parcial o coagonista para el receptor.

5 Muchos ligandos de receptores endógenos son proteínas de las cuales una pequeña porción (típicamente entre 3 y 20 residuos de aminoácidos de largo) es el farmacóforo que realmente se une al receptor, típicamente a través de uno o más enlaces iónicos, enlaces de hidrógeno y fuerzas de van der Waals. La porción no de farmacóforo del ligando de receptores endógeno define y fija la conformación exacta del farmacóforo permitiendo una unión eficiente, específica y/o selectiva al receptor. Las diferencias sutiles en la estructura o conformación de un receptor dado o ligando de receptores correspondiente, por ejemplo, pueden en algunos casos cambiar el efecto o la magnitud del efecto desencadenado por la unión de un ligando de receptores a un receptor. Tales diferencias pueden estar relacionadas con efectos secundarios, interacciones fármaco-fármaco, y porqué dos organismos diferentes de la misma especie pueden reaccionar a un ligando de receptores sintético dado de diferentes maneras, un efecto que ha motivado la necesidad de medicina personalizada.

15 Un ejemplo representativo de tales diferencias es el sistema ligando/receptor de somatostatina.

Los receptores de somatostatina, SSTR1-SSTR5, a los que se hace referencia colectivamente como SSTRx en la presente, se expresan en células de tejido sano:

20 SSTR1 se expresa en los niveles más altos en el yeyuno y el estómago;
 SSTR2 se expresa en los niveles más altos en el cerebro y el riñón;
 SSTR3 se expresa en los niveles más altos en el cerebro y los islotes pancreáticos;
 SSTR4 se expresa en los niveles más altos en el cerebro y los pulmones fetales y adultos; y
 25 SSTR5 se expresa en los niveles más altos en el cerebro, la glándula pituitaria, el páncreas (células alfa y gamma), así como en el tracto gastrointestinal.
 SSTRx también se sobreexpresa en algunas células patológicas, incluyendo muchos tipos diferentes de células cancerosas.

30 A pesar de ser ambos ligandos y agonistas de SSTRx, SST-14 y SST-28 endógenos tienen efectos biológicos similares pero no idénticos y, en algunos casos, incluso tienen efectos distintos. Se sabe que la afinidad de SST-28 por SSTR5 es sustancialmente mayor que la de SST-14 por SSTR5. Se ha demostrado que SST-28 es más potente que SST-14 para bloquear la liberación de insulina de las células beta pancreáticas, mientras que SST-14 es más potente para inhibir la secreción de glucagón de los islotes de células alfa de Langerhans. Además, hay algunas evidencias de que SST-14 y SST-28 inducen cambios opuestos en las corrientes de iones de potasio dependientes de voltaje en las neuronas corticales cerebrales.

35 Además, las funciones *in vivo* específicas de los diferentes subtipos de SSTR todavía no se comprenden bien, aunque varios estudios han demostrado que diferentes SSTRx pueden mediar efectos similares (no necesariamente idénticos) u opuestos. Además, el hecho de que una sola célula o tipo de tejido (células y tejidos tanto patológicos como no patológicos) típicamente exprese más de un subtipo SSTRx, y el hecho de que la proporción relativa de los diferentes SSTRx de una célula determinada puede cambiar con el tiempo (aparentemente, por lo menos en parte, como resultado de la exposición a hormonas distintas de la somatostatina, neuropéptidos y otros cambios bioquímicos) hace que sea difícil, si no imposible, determinar la función de una hormona de SSTRx o SST específica en un tipo de tejido u organismo de tejido específicos.

40 La afinidad de unión de tanto Octreotida como Lanreotida con SSTR2 es sustancialmente mayor que con los otros SSTRx. Como resultado, la Octreotida y la Lanreotida son potencialmente menos eficaces o ineficaces en algunos casos, y pueden provocar efectos secundarios en otros casos como resultado de la distribución diferente y variable en el tiempo de diferentes SSTRx en un tipo de célula dado en un organismo dado. La variación de la distribución de SSTRx en diferentes células puede ser, por lo menos en parte, responsable de la extensa lista de indicaciones para las que se ha sugerido la administración de Octreotida.

45 Se ha informado que la octreotida tiene muchos efectos farmacológicos, que incluyen: inhibición de la secreción de gastrina, colecistoquinina, glucagón, hormona del crecimiento, insulina, secretina, péptido pancreático, TSH y péptido intestinal vasoactivo; reducción de la secreción de fluidos por el intestino y el páncreas; reducción de la motilidad gastrointestinal e inhibición de la contracción de la vesícula biliar; inhibición de la acción de ciertas hormonas de la hipófisis anterior; vasoconstricción en los vasos sanguíneos; y reducción de las presiones de los vasos porta en las várices sangrantes. La Octreotida se ha usado para el tratamiento de tumores productores de hormona de crecimiento (acromegalia y gigantismo), tumores pituitarios que secretan hormona estimulante de la tiroides (tirotropinoma), episodios de diarrea y sofocos asociados con el síndrome carcinoide, y diarrea en pacientes con tumores secretores de péptidos intestinales vasoactivos (VIPomas). La Octreotida también se ha usado de manera no habitual o experimentalmente para el tratamiento de otras patologías que incluyen: diarrea grave refractaria; hipoglucemia recurrente prolongada después de una sobredosis de sulfonilureas y posiblemente meglitinidas; nesidioblastosis en lactantes para ayudar a disminuir la hipersecreción de insulina; obesidad,

particularmente obesidad provocada por lesiones en los centros de hambre y saciedad del hipotálamo; dolor por pancreatitis crónica; neoplasias tímicas; osteoartropatía pulmonar hipertrófica (HPOA) secundaria a carcinoma de pulmón de células no pequeñas; obstrucción intestinal maligna; quilotórax; hemorragia aguda por várices esofágicas en cirrosis hepática; e hipertensión intracraneal idiopática. La Octreotida puede usarse junto con la midodrina para revertir parcialmente la vasodilatación periférica en el síndrome hepatorenal o para tratar la hipotensión crónica refractaria.

Se conocen conjugados de octreotida-agente activo (una sola molécula que incluye una fracción de octreotida unida covalentemente a una fracción de agente activo distinta) en donde un agente activo terapéutico o de imagenología se une covalentemente a la fracción de octreotida a través del átomo de nitrógeno del residuo de aminoácidos DPhe N-terminal. En tales conjugados, la fracción de octreotida funciona como una fracción de guía para concentrar y provocar la internalización de la fracción de agente activo al unirse a SSTR2 de tumores neuroendocrinos y otros que sobreexpresan SSTR2.

En el campo de la química médica, se conoce la síntesis de análogos de ligandos de receptores endógenos para administración farmacéutica como ligandos de receptores exógenos. Aunque se conocen análogos sintéticos de moléculas pequeñas, la investigación de análogos sintéticos de péptidos se considera excepcionalmente atractiva. En tal investigación, se identifica la secuencia de residuos de aminoácidos del farmacóforo de los ligandos del receptor endógeno. Posteriormente, los ligandos exógenos potenciales se elaboran mediante la síntesis de péptidos (en algunos casos, péptidos cíclicos para la restricción conformacional y para proteger el péptido de la proteólisis in vivo) que tienen una secuencia de residuos de aminoácidos del farmacóforo que es similar a la del farmacóforo del ligando de receptores endógeno. Muchos péptidos se sintetizan como candidatos a ligandos, incluyendo variantes con varias secuencias, diferentes tamaños de anillo y química de ciclación para variar la conformación del farmacóforo, así como la variación de los residuos de aminoácidos constituyentes del farmacóforo, por ejemplo, variando con isómeros D, aminoácidos no naturales o aminoácidos similares. Los candidatos a ligandos sintetizados luego se prueban para determinar la afinidad de unión y la actividad farmacéutica inherente.

Un ligando sintético encontrado se usa típicamente en una o ambas de dos maneras. En algunos casos, la actividad farmacéutica inherente del ligando sintético (por ejemplo, como agonista o antagonista) hace que el ligando sintético sea farmacéuticamente útil tal cual. Adicional o alternativamente, cuando la afinidad de unión al receptor es lo suficientemente alta, el ligando sintético se une covalentemente a una fracción de agente activo para formar un conjugado donde la fracción de ligando sintético funciona como una fracción guía para concentrar la fracción de agente activo en los alrededores de células uniéndose al receptor apropiado y, en algunos casos, permitiendo también la internalización de la fracción del agente activo. Los agentes activos típicos son terapéuticos o de diagnóstico e incluyen toxinas y fotosensibilizadores (que, una vez internalizados, potencialmente matan una célula), colorantes y agentes activos fluorescentes (útiles en la identificación de tipos de tejido, por ejemplo, para diagnóstico y cirugía de guía), quelantes (útiles en la administración de metales a las células), fracciones con átomos metálicos, agentes activos radioactivos (útiles en el diagnóstico y, en algunos casos, la muerte de las células), y "paquetes" como nanopartículas, micelas y liposomas (entre otras cosas, para administrar grandes cantidades de otros agentes activos secundarios contenidos en los mismos).

Mientras estudiaban variantes sintéticas de análogos de somatostatina de los péptidos cíclicos designados "3207" en la US 7.700.717:

DPhe-Cys*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2*-NH₂ (SEQ ID NO:6)

y el conjugado de péptido-agente fluorescente designado "86" del mismo:
FITC-GABA-DPhe-Cys*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2*-NH₂

los presentes inventores sintetizaron quince nuevos compuestos, todos ligandos de receptores de somatostatina que comprenden una fracción peptídica y una fracción fluorescente, que demostraron una unión in vitro eficaz a células que sobreexpresan SSTRx. Sorprendentemente, los ligandos de los receptores de somatostatina divulgados tenían afinidades con los varios SSTRx, que son diferentes de la unión preferencial conocida de octreotida y lanreotida con SSTR2 y la unión preferencial de SST-14 y SST-28 con SSTR5. Los compuestos péptido-fluorescente sintetizados se describen en la Tabla 1 y las afinidades de unión relativas para los diferentes SSTRx se presentan en las Tablas 2, 2-A y 2-B, a continuación.

En la presente se proporcionan, entre otras cosas, los siguientes compuestos y métodos:

se divulgan fracciones peptídicas (por ejemplo, proteínas, péptidos) que incluyen secuencias de residuos de aminoácidos que tienen diferentes afinidades relativas con los diferentes SSTRx, que en algunas realizaciones son ligandos de los receptores de somatostatina;
se divulgan ligandos de receptores de somatostatina, cada uno de los cuales tiene una afinidad relativa diferente por los diferentes SSTRx, que son útiles, entre otras cosas, para caracterizar tejidos y células que sobreexpresan SSTRx in vitro;

se divulgan péptidos que son útiles, entre otras cosas, para la síntesis de ligandos de receptores de somatostatina que comprenden una fracción fluorescente, así como de otros ligandos de receptores de somatostatina;

se divulgan péptidos que son útiles, entre otras cosas, para la síntesis de ligandos de receptores de somatostatina para el tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con la expresión de SSTRx;

se divulgan péptidos que son útiles, entre otras cosas, para la síntesis de ligandos de receptores de somatostatina para el diagnóstico de enfermedades y trastornos asociados con la expresión de SSTRx;

se divulgan además péptidos que son útiles, entre otras cosas, para la síntesis de los ligandos de los receptores de somatostatina para la preparación de un medicamento o el tratamiento y diagnóstico de enfermedades y trastornos asociados con la expresión de SSTRx.

Por tanto, de acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de las enseñanzas de la presente, se proporciona un ligando de receptores de somatostatina (en algunas realizaciones, un ligando de receptores de somatostatina sintético), que consiste en: una fracción peptídica o una forma de amida de la misma, dicha fracción peptídica que consiste en una secuencia de residuos de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

	-Cys-Phe-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2	(SEQ ID NO:14);
	-Arg-Cys-Phe-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2	(SEQ ID NO:15);
	-DPhe-Arg -Cys-Phe-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2	(SEQ ID NO:16);
20	-Cys-Phe-Trp-DTrp-Orn-Thr-Phe-GlyS2	(SEQ ID NO:19);
	-DPhe-Cys-Phe-Trp-DTrp-Orn-Thr-Phe-GlyS2	(SEQ ID NO:20);
	-Cys-Tyr-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2	(SEQ ID NO:23);
	DPhe-Cys-Tyr-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2	(SEQ ID NO:24);
	-Cys-Phe-DTrp-Orn-Thr-Phe-GlyS2	(SEQ ID NO:27);
25	-Arg-Cys-Phe-DTrp-Orn-Thr-Phe-GlyS2	(SEQ ID NO:28);
	DPhe-Arg-Cys-Phe-DTrp-Orn-Thr-Phe-GlyS2	(SEQ ID NO:29);
	-Cys-Tyr-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2	(SEQ ID NO:32);
	-Arg-Cys-Tyr-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2	(SEQ ID NO:33);
	DPhe-Arg-Cys-Tyr-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2	(SEQ ID NO:34);
30	-Cys-Tyr-DTrp-Orn-Thr-Phe-GlyS2	(SEQ ID NO:37);
	DPhe-Cys-Tyr-DTrp-Orn-Thr-Phe-GlyS2	(SEQ ID NO:38);
	-Cys-Arg-Phe-Phe-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2	(SEQ ID NO:43);
	DPhe-Cys-Arg-Phe-Phe-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2	(SEQ ID NO:44);
	Cys-Arg-Phe-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2	(SEQ ID NO:48);
35	DPhe-Cys-Arg-Phe-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2	(SEQ ID NO:49);
	DPhe-HCys-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2	(SEQ ID NO:51);
	DPhe-DCys-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2	(SEQ ID NO:53);
	-Cys-Phe-Trp-DTrp-Aib-Thr-Phe-GlyS2	(SEQ ID NO:56);
	DPhe-Cys-Phe-Trp-DTrp-Aib-Thr-Phe-GlyS2	(SEQ ID NO:57);
40	-Cys-Phe-Trp-DTrp-LysAc-Thr-Phe-GlyS2	(SEQ ID NO:60);
	DPhe-Cys-Phe-Trp-DTrp-LysAc-Thr-Phe-GlyS2	(SEQ ID NO:61);
	DPhe-Cys-Phe-Trp-DTrp-Arg-Thr-Phe-GlyS2	(SEQ ID NO:63);
	-Cys-Phe-Trp-DTrp-HomoLys-Thr-Phe-GlyS2	(SEQ ID NO:66); y
45	DPhe-Cys-Phe-Trp-DTrp-HomoLys-Thr-Phe-GlyS2	(SEQ ID NO:67)

en donde:

dicha secuencia de residuos de aminoácidos se cicla con un enlace azufre-azufre entre dicho átomo de azufre de GlyS2 y un átomo de azufre de una fracción de cisteína, de dicha secuencia de residuos de aminoácidos seleccionada; y opcionalmente por lo menos una fracción de agente activo enlazada covalentemente con dicha fracción peptídica, o enlazada indirectamente con el átomo de nitrógeno terminal de un residuo de aminoácidos N-terminal de dicha fracción peptídica a través de un conector;

en donde la fracción de agente activo se selecciona del grupo que consiste en:

una fracción de imagenología, una fracción terapéutica, un colorante, una fracción fluorescente, una toxina, un quelante, una fracción con un átomo metálico, una fracción con un átomo radioactivo, una nanopartícula, un polímero de etilenglicol, fotosensibilizador, un constituyente de liposomas y un constituyente de micelas

Conjugados de fracción peptídica - fracción de agente activo

En algunas realizaciones, un ligando de receptores de somatostatina de acuerdo con el primer aspecto de las enseñanzas de la presente comprende por lo menos una fracción de agente activo enlazada covalentemente a la fracción peptídica. En algunas realizaciones, la por lo menos una fracción de agente activo es por lo menos dos fracciones de agente activo enlazadas covalentemente a la fracción peptídica. En algunas realizaciones, la por lo menos una fracción de agente activo es por lo menos tres fracciones de agente activo enlazadas covalentemente a la fracción peptídica.

En algunas realizaciones, una fracción de agente activo se une covalentemente a la fracción peptídica a través de un átomo de nitrógeno terminal de un residuo de aminoácidos N-terminal de la fracción peptídica.

5 En algunas realizaciones, una fracción de agente activo se une covalentemente a la fracción peptídica a través de un grupo carbonilo terminal de un residuo de aminoácidos C-terminal de la fracción peptídica y constituye por lo menos una parte de la entidad química A.

10 En algunas realizaciones, una fracción de agente activo unida covalentemente a la fracción peptídica a través de una cadena lateral de un residuo de aminoácidos de la fracción peptídica.

En algunas realizaciones, una fracción de agente activo se une covalentemente a la fracción peptídica a través de un átomo de nitrógeno presente en la cadena lateral del residuo de aminoácidos que contiene nitrógeno Xxx6.

15 El enlace covalente entre la fracción de agente activo y la fracción peptídica es cualquier enlace covalente adecuado. Una persona con experiencia ordinaria en la técnica es capaz de seleccionar y sintetizar un enlace covalente adecuado tras la lectura atenta de la memoria descriptiva. En algunas realizaciones, el enlace covalente entre la fracción peptídica y la fracción de agente activo se selecciona del grupo de enlaces que consiste en:

- 20 un enlace amida, por ejemplo, formado por la reacción de acoplamiento de una amina primaria o secundaria con una función de ácido o éster;
- un enlace imina, por ejemplo, formado por la reacción de acoplamiento de una amina primaria o secundaria con una función cetona o aldehído;
- 25 un enlace de amina, por ejemplo, formado por una reacción de alquilación de amina de una amina primaria o secundaria con una función de haluro de alquilo;
- un enlace de sulfamida, por ejemplo, formado por una reacción de acoplamiento de una amina primaria o secundaria con una función de cloruro de sulfonilo; y
- un enlace fosfamida, por ejemplo, formado por una reacción de acoplamiento de una amina primaria o secundaria con una función de cloruro de fosforilo.

30 Una fracción de agente activo dada es cualquier fracción de agente activo adecuada. En algunas realizaciones, una fracción de agente activo se selecciona del grupo que consiste en: una fracción de imagenología, una fracción terapéutica, un colorante, una fracción fluorescente, una toxina, un quelante, una fracción con un átomo metálico, un átomo radiactivo o una fracción con un átomo radiactivo, una nanopartícula, un polímero de etilenglicol, un fotosensibilizador, un constituyente de liposomas y un constituyente de micelas. Es importante tener en cuenta que, en algunos casos, una sola fracción de agente activo cae dentro de la definición de dos o más elementos del grupo anterior, por ejemplo: en algunas realizaciones, una fracción de agente activo es una nanopartícula y un polímero de etilenglicol y cualquiera o ambos de terapéutico/imagenología; en algunas realizaciones, una fracción de agente activo es un colorante, y/o fracción fluorescente y/o un fotosensibilizador y cualquiera o ambos de terapéutico/imagenología; en algunas realizaciones, una fracción de agente activo incluye un átomo radiactivo y cae dentro de una o más de las otras definiciones.

45 En algunas realizaciones, durante el uso de un ligando de receptores de somatostatina de acuerdo con las enseñanzas de la presente, el ligando de receptores se une preferiblemente (o incluso selectivamente) a una célula que expresa o sobreexpresa uno o más receptores de somatostatina, en algunas realizaciones, por lo menos parcialmente debido a la afinidad de la fracción peptídica con un receptor de somatostatina, que en algunas realizaciones va seguido de la internalización del ligando de receptores en la célula. Tal unión preferencial o selectiva a la célula concentra el agente activo sobre o dentro de la célula, lo que posteriormente tiene un efecto deseado que depende de la naturaleza del agente activo.

50 A continuación en la presente se analizan detalles adicionales relacionados con fracciones de agente activo adecuadas para implementar realizaciones de la presente invención.

55 En algunas realizaciones, la fracción peptídica cíclica se une a un soporte de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS), por ejemplo, soporte de vidrio, soporte de fibra de celulosa, soporte de poliestireno, soporte de poli(acrilamida), soporte de polietilenglicol.

60 En algunas realizaciones, la fracción peptídica cíclica (unida a un soporte de SPPS o no unida a un soporte de SPSS) incluye uno o más grupos protectores en los grupos funcionales de la fracción peptídica. Un experto en la técnica es capaz de seleccionar y añadir grupos protectores adecuados a los grupos funcionales tras leer cuidadosamente la memoria descriptiva y, si es necesario, consultar la bibliografía estándar sobre síntesis química. Los grupos protectores adecuados incluyen t-Boc, Fmoc, benciloxicarbonilo (Z), Alloc, bencilo y terc-butilo.

65 *Residuo de aminoácido interno con nitrógeno de cadena lateral*

El residuo de aminoácidos interno con el átomo de nitrógeno (Xxx6 en la realización representada en la Figura 13) es cualquier residuo de aminoácidos adecuado.

5 En algunas realizaciones, el residuo de aminoácidos interno con el átomo de nitrógeno es un residuo seleccionado del grupo que consiste en Lys, Orn, Arg, LysAc y Homo-Lys. En realizaciones que se refieren al segundo aspecto de las enseñanzas de la presente, hay una fracción de agente activo unido covalentemente al átomo de nitrógeno de la cadena lateral del mismo.

10 El enlace covalente entre la fracción peptídica cíclica y la fracción de agente activo que está unida covalentemente al átomo de nitrógeno es cualquier enlace adecuado. En algunas realizaciones, el enlace covalente entre la fracción peptídica cíclica y la fracción de agente activo se selecciona del grupo de enlaces que consiste en:

15 un enlace amida, por ejemplo, formado por la reacción de acoplamiento de una amina primaria o secundaria del residuo de aminoácidos interno con una función de ácido o éster del precursor de la fracción del agente activo;
 un enlace imina, por ejemplo, formado por la reacción de acoplamiento de una amina primaria o secundaria del residuo de aminoácidos interno con una función cetona o aldehído del precursor de la fracción del agente activo;
 un enlace de amina, por ejemplo, formado por una reacción de alquilación de amina de una amina primaria o secundaria de la fracción de aminoácido interno con una función de haluro de alquilo del precursor de la fracción de agente activo;
 20 un enlace de sulfamida, por ejemplo, formado por una reacción de acoplamiento de una amina primaria o secundaria del residuo de aminoácidos interno con una función de cloruro de sulfonilo del precursor de la fracción de agente activo; y
 un enlace de fosfamida, por ejemplo, formado por una reacción de acoplamiento de una amina primaria o secundaria del residuo de aminoácidos interno con una función de cloruro de fosforilo del precursor de la fracción de agente activo.

25 En algunas realizaciones, el residuo de aminoácidos interno es un residuo de Arg, y la fracción de agente activo está unida covalentemente a un átomo de nitrógeno de la cadena lateral de la misma. Para implementar tales realizaciones puede usarse cualquier química adecuada, por ejemplo, acilación, en algunas realizaciones usando dicarbonilos, dicetonas vecinales o glioxales.

Residuos de aminoácidos terminales

35 Como se ha indicado anteriormente, en algunas realizaciones de acuerdo con el primer aspecto de las enseñanzas de la presente, la fracción peptídica cíclica (como la expuesta en la SEQ ID NO: 68) tiene un residuo de aminoácidos N-terminal y un residuo de aminoácidos C-terminal. (Xxx1 y Xxx9), tanto el residuo de aminoácidos N-terminal como el residuo de aminoácidos C-terminal que tienen un grupo funcional que contiene azufre, se unieron covalentemente entre sí a través de un enlace azufre-azufre, ciclando de este modo la fracción peptídica.

40 El residuo de aminoácidos N-terminal y el residuo de aminoácidos C-terminal son cualquier residuo de aminoácidos adecuado que tiene un grupo funcional que contiene azufre que están unidos covalentemente entre sí para ciclar la fracción peptídica a través de un enlace azufre-azufre. En algunas realizaciones, el residuo de aminoácidos N-terminal y el residuo de aminoácidos C-terminal de la fracción peptídica cíclica se seleccionan independientemente del grupo que consiste en Cys, H-Cys (homocisteína), D-Cys y GlyS2.

Agente activo

45 Como se ha indicado con anterioridad, las realizaciones de un ligando de receptores de somatostatina de acuerdo con el segundo aspecto de las enseñanzas de la presente comprenden una fracción de agente activo (Q en la realización representada en la FIG. 13) unido covalentemente a la fracción peptídica cíclica como se expone en la SEQ ID NO: 68 a través del átomo de nitrógeno del grupo funcional del residuo de aminoácido interno, donde la fracción de agente activo se selecciona del grupo que consiste en: una fracción de imagenología, una fracción terapéutica, un colorante, una fracción fluorescente, una toxina, un quelante, una fracción con un átomo metálico, una fracción con un átomo radiactivo, una nanopartícula, un polímero de etilenglicol, un fotosensibilizador, un constituyente de liposomas y un constituyente de micelas. Es importante tener en cuenta que, en algunos casos, una única fracción de agente activo cae dentro de la definición de dos o más elementos del grupo anterior, por ejemplo: en algunas realizaciones, una fracción de agente activo es una nanopartícula y un polímero de etilenglicol y cualquiera o ambos de una fracción de agente terapéutico/de imagenología; en algunas realizaciones, una fracción de agente activo es un colorante y/o una fracción fluorescente y/o un fotosensibilizador y cualquiera o ambos de una fracción de agente terapéutico/de imagenología; en algunas realizaciones, una fracción de agente activo incluye un átomo radiactivo y cae dentro de una o más de las otras definiciones.

60 En algunas realizaciones, durante el uso de un ligando de receptores de somatostatina sintético de acuerdo con las enseñanzas de la presente, el ligando se une preferencialmente (o incluso selectivamente) a una célula que expresa o sobreexpresa un receptor de somatostatina, en algunas realizaciones, por lo menos parcialmente, debido

a la afinidad de la fracción peptídica cíclica para un receptor de somatostatina, que en algunas realizaciones va seguido de la internalización del ligando en la célula. Tal unión preferencial o selectiva a la célula concentra el agente activo sobre o dentro de la célula, lo que posteriormente tiene un efecto deseado que depende de la naturaleza del agente activo.

5

Extremo N-terminal de la fracción peptídica cíclica

Como se ha indicado con anterioridad, en algunas realizaciones, la fracción peptídica cíclica de un ligando de receptores de somatostatina de acuerdo con las enseñanzas de la presente incluye un aminoácido N-terminal que tiene un grupo funcional que contiene azufre (por ejemplo, Xxx1 en las realizaciones descritas por la SEQ ID NO: 68 y realizaciones representadas en la Figura 13).

10

En algunas realizaciones, el átomo de nitrógeno del extremo N-terminal del aminoácido N-terminal (por ejemplo, el átomo de nitrógeno terminal de Xxx1 en las realizaciones descritas por la SEQ ID NO: 68 y las realizaciones representadas en la Figura 13) se selecciona del grupo que consiste en una amina primaria, una amina secundaria y una amina terciaria.

15

En algunas realizaciones, hay una entidad química (representada por B' en la realización representada en la Figura 13) unida covalentemente al aminoácido N-terminal, en algunas realizaciones, a través del nitrógeno terminal, tal entidad química completa la valencia del mismo. En algunas realizaciones, la entidad química (por ejemplo, B') está unida covalentemente al aminoácido N-terminal a través del nitrógeno terminal con un enlace seleccionado del grupo que consiste en un enlace amida, un enlace imina, un enlace amina, un enlace sulfamida y un enlace fosfamida. En algunas realizaciones, la entidad química unida a la amina N-terminal del aminoácido N-terminal de la fracción peptídica del ligando de receptores de somatostatina de acuerdo con el segundo aspecto está unida a cualquier entidad química adecuada, por ejemplo, uno o dos átomos de H, uno o dos grupos alquilo, una o dos fracciones de agente activo (como se detalla a continuación en la presente) y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el átomo de nitrógeno del aminoácido N-terminal de la fracción peptídica se selecciona del grupo que consiste en una amina primaria, una amina secundaria y una amina terciaria. En algunas realizaciones, hay una entidad química unida covalentemente al aminoácido N-terminal de la fracción peptídica del ligando de receptores de somatostatina, en algunas realizaciones, a través del nitrógeno terminal del mismo.

20

25

30

En algunas realizaciones, la entidad química (por ejemplo, B' en la realización representada en la Figura 13) comprende una cadena de aminoácidos o peptídica, de tal manera que el ligando de receptores de somatostatina comprende además un residuo de aminoácidos o una cadena peptídica unida covalentemente al aminoácido N-terminal, típicamente con un enlace amida.

35

En algunas realizaciones, el ligando de receptores de somatostatina de acuerdo con el segundo aspecto de las enseñanzas de la presente comprende además una fracción de agente activo unida covalentemente al residuo de aminoácidos N-terminal de la fracción peptídica cíclica además de a la fracción de agente activo unida a la cadena lateral del aminoácido interna. En la realización representada en la Figura 13, dicha fracción de agente activo adicional es o constituye una parte de B'. En algunas realizaciones, dicha fracción de agente activo se une directamente al aminoácido N-terminal. En algunas realizaciones, dicha fracción de agente activo se une indirectamente al aminoácido N-terminal, por ejemplo, a través de un conector (por ejemplo, GABA (ácido gamma-aminobutírico), un aminoácido, una cadena peptídica). Para implementar tales realizaciones puede usarse cualquier fracción de agente activo adecuada. En algunas de tales realizaciones, la fracción de agente activo se selecciona del grupo que consiste en una fracción de imagenología, una fracción terapéutica, un colorante, una fracción fluorescente, una toxina, un quelante, una fracción con un átomo metálico, una fracción con un átomo radiactivo, una nanopartícula, un polímero de etilenglicol, un fotosensibilizador, un constituyente de liposomas y un constituyente de micelas, sustancialmente como se ha analizado con anterioridad. En algunas realizaciones, un agente activo unido al residuo de aminoácidos N-terminal es de un tipo diferente del agente activo unido al residuo de aminoácidos interno, por ejemplo, uno terapéutico y otro de imagenología. En algunas realizaciones, un agente activo unido al residuo de aminoácidos N-terminal es del mismo tipo que el agente activo unido al residuo de aminoácidos interno, por ejemplo, ambos de imagenología o ambos terapéuticos. En algunas realizaciones, un agente activo unido al residuo de aminoácidos N-terminal es sustancialmente el mismo que el agente activo unido al residuo de aminoácidos interno.

40

45

50

55

Extremo C-terminal de la fracción peptídica cíclica

Como se ha indicado con anterioridad, en algunas realizaciones de la fracción peptídica cíclica de un ligando de receptores de somatostatina de acuerdo con las enseñanzas de la presente, incluye un residuo de aminoácidos C-terminal que tiene un grupo funcional que contiene azufre (por ejemplo, Xxx9 en las realizaciones descritas por la SEQ ID NO:68 y las realizaciones representadas en la Figura 13).

60

En algunas realizaciones, el extremo del residuo de aminoácidos C-terminal se selecciona del grupo que consiste en un ácido libre, una sal de ácido, un éster y una amida.

65

En algunas realizaciones del segundo aspecto de acuerdo con las enseñanzas de la presente, hay una entidad química (que está representada por B en la realización representada en la Figura 13) unida covalentemente a la fracción de aminoácido C-terminal, especialmente a través del grupo carbonilo terminal cuya entidad química completa la valencia de la misma. En algunas realizaciones, la entidad química se une covalentemente al residuo de aminoácidos C-terminal a través del grupo carbonilo terminal con un enlace seleccionado del grupo que consiste en un enlace amida. Para implementar tales realizaciones puede usarse cualquier química adecuada, por ejemplo, química de carbodiimida.

La entidad química unida covalentemente al residuo de aminoácidos C-terminal es cualquier entidad química adecuada unida para completar la valencia del residuo de aminoácidos C-terminal.

En algunas realizaciones, la entidad química unida al residuo de aminoácidos C-terminal comprende por lo menos un residuo de aminoácidos que está unido directamente con un enlace peptídico al carbonilo C-terminal del residuo de aminoácidos C-terminal. En algunas realizaciones, la entidad química comprende por lo menos dos, por lo menos cuatro e incluso por lo menos ocho residuos de aminoácidos. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la fracción química es una cadena de aminoácidos o peptídica, de tal manera que el ligando de receptores de somatostatina comprende además un residuo de aminoácidos o una cadena peptídica unida covalentemente al aminoácido C-terminal, típicamente con un enlace amida.

En algunas realizaciones, la porción de la entidad química que está unida directamente al carbonilo C-terminal del residuo de aminoácidos C-terminal no es un residuo de aminoácidos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la entidad química se selecciona del grupo que consiste en: -OH (en cuyo caso el ligando de receptores es un ácido libre), $-O^-M^+$ (en cuyo caso el ligando de receptores es una sal de ácido), un grupo alcoxi (en cuyo caso el ligando de receptores es un éster), una amina (en cuyo caso el ligando de receptores es una amida C-terminal), una fracción de agente activo (como se detalla a continuación), una entidad que comprende un residuo de aminoácidos (que no está unido directamente al residuo Pjhe), una entidad que comprende -OH, una entidad que comprende $-O^-M^+$, una entidad que comprende un grupo alcoxi, una entidad que comprende una amina, una entidad que comprende una fracción de agente activo y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, el ligando de receptores de somatostatina de acuerdo con el segundo aspecto de las enseñanzas de la presente comprende además una fracción de agente activo unida covalentemente al residuo de aminoácidos C-terminal de la fracción peptídica cíclica, además de la fracción de agente activo unida a la cadena lateral de aminoácidos interna y la fracción de agente activo opcional unida al aminoácido N-terminal. En la realización representada en la Figura 13, dicha fracción de agente activo adicional es o constituye una porción de B. En algunas realizaciones, dicha fracción de agente activo se une directamente al aminoácido C-terminal. En algunas realizaciones, dicha fracción de agente activo se une indirectamente al aminoácido C-terminal, por ejemplo, a través de un conector (por ejemplo, GABA (ácido gamma-aminobutírico), un aminoácido, una cadena peptídica). Para implementar tales realizaciones puede usarse cualquier fracción de agente activo adecuada. En algunas de tales realizaciones, la fracción de agente activo se selecciona del grupo que consiste en una fracción de imagenología, una fracción terapéutica, un colorante, una fracción fluorescente, una toxina, un quelante, una fracción con un átomo metálico, una fracción con un átomo radiactivo, una nanopartícula, un polímero de etilenglicol, un fotosensibilizador, un constituyente de liposomas y un constituyente de micelas, sustancialmente como se ha analizado con anterioridad. En algunas realizaciones, un agente activo unido al residuo de aminoácidos C-terminal es de un tipo diferente del agente activo unido al residuo de aminoácidos interno y/o el agente activo unido al residuo de aminoácidos N-terminal, si lo hay. En algunas realizaciones, un agente activo unido al residuo de aminoácidos C-terminal es del mismo tipo que el agente activo unido al residuo de aminoácidos interno y/o el agente activo unido al residuo de aminoácidos N-terminal, si lo hay. En algunas realizaciones, un agente activo unido al residuo de aminoácidos C-terminal es sustancialmente el mismo que el agente activo unido al residuo de aminoácidos interno y/o el agente activo unido al residuo de aminoácidos N-terminal si lo hay.

Otros residuos de aminoácidos internos

Como se ha indicado con anterioridad, la fracción peptídica cíclica de acuerdo con el segundo aspecto de las enseñanzas de la presente (como la que tiene una secuencia de residuos de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 68) tiene 4, 5, 6 o 7 residuos de aminoácidos internos entre los residuos de aminoácidos N-terminal y C-terminal que contienen azufre, uno de tales residuos de aminoácidos internos incluye un grupo funcional de cadena lateral que tiene un átomo de nitrógeno. Los otros 3, 4, 5 o 6 residuos de aminoácidos internos son cualquier combinación adecuada de residuos de aminoácidos que, junto con los otros residuos de aminoácidos, hacen que el ligando de receptores de somatostatina sea un ligando de somatostatina, incluyendo los residuos de los isómeros L y D de los 23 aminoácidos proteínogénicos así como aminoácidos no proteínogénicos.

Como se ha indicado con anterioridad, en algunas realizaciones, incluyendo las realizaciones descritas por la SEQ ID NO: 68 y/o representadas en la Figura 13, cada uno de Xxx2, Xxx3, Xxx4, Xxx5, Xxx7 y Xxx8 está independientemente presente o ausente y, si está presente, representa un residuo de aminoácidos, en donde están presentes por lo menos 4 de Xxx2, Xxx3, Xxx4, Xxx5, Xxx7 y Xxx8. Cuando el ligando de receptores tiene 4 residuos

de aminoácidos internos, tres de Xxx2, Xxx3, Xxx4, Xxx5, Xxx7 y Xxx8 están ausentes, cuando el ligando de receptores tiene 5 residuos de aminoácidos internos, dos de Xxx2, Xxx3, Xxx4, Xxx5, Xxx7 y Xxx8 están ausentes; cuando el ligando de receptores tiene 6 residuos de aminoácidos internos, uno de Xxx2, Xxx3, Xxx4, Xxx5, Xxx7 y Xxx8 están ausentes; y cuando el ligando de receptores tiene 7 residuos de aminoácidos internos, todos de Xxx2, Xxx3, Xxx4, Xxx5, Xxx7 y Xxx8 están presentes.

En algunas realizaciones, un segundo de los residuos de aminoácidos internos se selecciona del grupo que consiste en Tyr y Phe y un tercero de los residuos de aminoácidos internos se selecciona del grupo que consiste en Trp y DTrp (por ejemplo, lanreotida (SEQ ID NO:4), octreotida (SEQ ID NO:5), compuestos 1-12, 14-16 (Tabla 1 a continuación), análogos de somatostatina de péptidos cíclicos que han sido sintetizados y divulgados por uno de los presentes inventores en la US 7.700.717: **compuesto 30** (GlyS2*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2*-NH₂' SEQ ID NO:69, divulgado en la US 7.700.717, designado 3213); y **compuesto 31** (DPhe-GlyS2*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2*-NH₂ SEQ ID NO:70, divulgado en la US 7.700.717, designado 3173). Es importante tener en cuenta que en algunas realizaciones, el segundo y/o tercer aspecto de las enseñanzas de la presente se implementan proporcionando uno de los compuestos enumerados anteriormente (por ejemplo, lanreotida, octreotida, Compuestos 1-12, 14-16, 30 o 31 o variantes como sales, ésteres, variantes de los mismos protegidas con grupos funcionales y/o unidas a resinas) y uniendo covalentemente una fracción de agente activo a la fracción peptídica, particularmente a través de un átomo de nitrógeno de un grupo funcional de un residuo de aminoácidos interno. En algunas de tales realizaciones, se selecciona un residuo de aminoácidos interno adicional del grupo que consiste en Trp y Phe, especialmente Trp (por ejemplo, Compuestos 1, 3, 4, 8, 11, 12, 14-16, 30, 31). En algunas de tales realizaciones, un residuo de aminoácidos interno adicional es Arg (por ejemplo, Compuestos 8-10).

En algunas realizaciones, un segundo de los residuos de aminoácidos internos se selecciona del grupo que consiste en Tyr y Phe, un tercero de los residuos de aminoácidos internos se selecciona del grupo que consiste en Trp y DTrp, y un cuarto de los residuos de aminoácidos internos es Phe (por ejemplo, Compuestos 1-12, 14-16 y 30-31). En algunas de tales realizaciones, se selecciona un residuo de aminoácidos interno adicional del grupo que consiste en Trp y Phe, especialmente Trp (por ejemplo, Compuestos 1, 3, 4, 8, 11, 12, 14-16, 30, 31). En algunas de tales realizaciones, un residuo de aminoácidos interno adicional es Arg (por ejemplo, Compuestos 8-10).

En algunas realizaciones, un segundo de los residuos de aminoácidos internos se selecciona del grupo que consiste en Tyr y Phe, un tercero de los residuos de aminoácidos internos se selecciona del grupo que consiste en Trp y DTrp, y uno adicional de los residuos de aminoácidos internos es Thr (por ejemplo, Compuestos 1-12, 14-16 y 30-31). En algunas de tales realizaciones, se selecciona un residuo de aminoácidos interno adicional del grupo que consiste en Trp y Phe, especialmente Trp (por ejemplo, Compuestos 1, 3, 4, 8, 11, 12, 14-16, 30, 31). En algunas de tales realizaciones, un residuo de aminoácidos interno adicional es Arg (por ejemplo, Compuestos 8-10).

En algunas realizaciones, un segundo de los residuos de aminoácidos internos se selecciona del grupo que consiste en Tyr y Phe, un tercero de los residuos de aminoácidos internos se selecciona del grupo que consiste en Trp y DTrp, un cuarto de los residuos de los residuos de aminoácidos internos es Phe y un quinto de los residuos de aminoácidos internos es Thr (por ejemplo, Compuestos 1-12, 14-16 y 30-31). En algunas de tales realizaciones, se selecciona un residuo de aminoácidos interno adicional del grupo que consiste en Trp y Phe, especialmente Trp (por ejemplo, Compuestos 1, 3, 4, 8, 11, 12, 14-16, 30, 31). En algunas de tales realizaciones, un residuo de aminoácidos interno adicional es Arg (por ejemplo, Compuestos 8-10).

En algunas realizaciones, un segundo de los residuos de aminoácidos internos es Phe y un tercero de los residuos de aminoácidos internos es Thr (por ejemplo, Compuestos 1-12, 14-16 y 30-31). En algunas de tales realizaciones, se selecciona un residuo de aminoácidos interno adicional del grupo que consiste en Trp y Phe, especialmente Trp (por ejemplo, Compuestos 1, 3, 4, 8, 11, 12, 14-16, 30, 31). En algunas de tales realizaciones, un residuo de aminoácidos interno adicional es Arg (por ejemplo, Compuestos 8-10).

En algunas realizaciones, la fracción peptídica cíclica tiene la secuencia:
-Xxx1*-Xxx2-Xxx3-Xxx4-Xxx5-Xxx6-Xxx7-Xxx8-Xxx9*- (SEQ ID NO:68)

en donde Xxx1 es el residuo de aminoácidos N-terminal,
Xxx9 es el residuo de aminoácidos C-terminal;
los asteriscos indican ciclación por un enlace S-S, y
cada uno de Xxx2-Xxx8 está independientemente presente o ausente y, si está presente, es un aminoácido interno, en donde están presentes por lo menos 4 de Xxx2-Xxx8.

En algunas realizaciones, el Xxx6 es el residuo de aminoácidos interno que incluye el grupo funcional de la cadena lateral que tiene un átomo de nitrógeno. En algunas de tales realizaciones, el Xxx6 se selecciona del grupo que consiste en Lys (por ejemplo, Lanreotida, Octreotida, Compuestos 1, 2, 4, 6, 8-12, 30-31), Orn (por ejemplo, Compuestos 3, 5, 7), Homo-Lys (por ejemplo, Compuesto 16) y Arg (por ejemplo, Compuesto 15).

En algunas realizaciones, el Xxx2 se selecciona del grupo que consiste en Arg (por ejemplo, Compuestos

1-7, 11, 12, 14-16, 30, 31) o no está presente (por ejemplo, Compuestos 8-10).

En algunas realizaciones, el Xxx3 se selecciona del grupo que consiste en Tyr (por ejemplo, Lanreotida, Compuestos 4, 6, 7) y Phe (por ejemplo, Octreotida, Compuestos 1-3, 5, 8-12, 14-16, 30-31).

En algunas realizaciones, el Xxx4 se selecciona del grupo que consiste en Trp (por ejemplo, Compuestos 1, 3, 4, 11, 12, 14-16, 30, 31), Phe (por ejemplo, Compuestos 8), y no presente (por ejemplo, Lanreotida, Octreotida, Compuestos 2, 5-7, 9, 10).

En algunas realizaciones, el Xxx5 se selecciona del grupo que consiste en Trp (por ejemplo, Lanreotida) y DTrp (por ejemplo, Octreotida, Compuestos 1-12, 14-16, 30, 31).

En algunas realizaciones, el Xxx7 se selecciona del grupo que consiste en Thr (Compuestos 1-12, 14-16, 30, 31) y no presente (por ejemplo, Lanreotida, Octreotida).

En algunas realizaciones, el Xxx8 se selecciona del grupo que consiste en Val (por ejemplo, Lanreotida), Thr (por ejemplo, Octreotida) y Phe (por ejemplo, Compuestos 1-12, 14-16, 30, 31).

En algunas realizaciones, el ligando de receptores de somatostatina de acuerdo con las enseñanzas de la presente se selecciona del grupo que consiste en Lanreotida, Octreotida y los Compuestos 1, 2, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 30 y 31 unidos covalentemente a la fracción de agente activo a través del átomo de nitrógeno del residuo de aminoácidos Lys de la fracción peptídica cíclica respectiva.

En algunas realizaciones, el ligando de receptores de somatostatina de acuerdo con las enseñanzas de la presente se selecciona del grupo que consiste en los compuestos 3, 5 y 7 unidos covalentemente a la fracción de agente activo a través del átomo de nitrógeno del residuo de aminoácidos Orn de la fracción peptídica cíclica respectiva.

En algunas realizaciones, el ligando de receptores de somatostatina de acuerdo con las enseñanzas de la presente es el Compuesto 15 unido covalentemente a la fracción de agente activo a través del átomo de nitrógeno del residuo de aminoácidos Arg de la fracción peptídica cíclica respectiva del Compuesto 15.

En algunas realizaciones, el ligando de receptores de somatostatina de acuerdo con las enseñanzas de la presente es el Compuesto 16 unido covalentemente a la fracción de agente activo a través de un átomo de nitrógeno de un residuo de aminoácidos Homo-Lys de la fracción peptídica cíclica del Compuesto 16.

Fracciones de agente activo

Como se ha analizado anteriormente en la presente, en algunas realizaciones de la presente invención, el ligando de receptores de somatostatina comprende por lo menos una fracción de agente activo. Puede usarse cualquier fracción de agente activo adecuada que tenga cualquier propiedad o propiedades adecuadas para implementar las enseñanzas de la presente.

Tamaño de la fracción de agente activo

El tamaño de la fracción de agente activo es cualquier tamaño adecuado. Dicho esto, en algunas realizaciones, la fracción de agente activo tiene un peso molecular de no menos de 250, no menos de 500, no menos de 750, no menos de 1000, no menos de 2000, no menos de 4000, no menos de 8000, e incluso no menos de 16000.

Fracción de imagenología

En algunas realizaciones, la fracción de agente activo es una fracción de imagenología, es decir, es un agente que es claramente observable cuando se concentra en una célula en condiciones adecuadas y/o cuando se usa una modalidad de imagenología adecuada.

Para implementar las enseñanzas de la presente puede usarse cualquier fracción de imagenología adecuada. Las fracciones de imagenología típicas incluyen fracciones que tienen un color distintivo que permite la identificación visual, fracciones que tienen una fluorescencia distintiva que permite la identificación visual en condiciones de iluminación apropiadas, o emisores de positrones que permiten la imagenología mediante tomografía por emisión de positrones.

En algunas de tales realizaciones, después de la administración del ligando de receptores de somatostatina a las células, las fracciones de imagenología se concentran en células que expresan el receptor de somatostatina en mayor grado que otras permitiendo la identificación de tales células. Una utilidad típica de tales realizaciones es

diferenciar entre células normales y células patológicas que sobreexpresan receptores de somatostatina.

Fracción terapéutica

5 En algunas realizaciones, la fracción de agente activo es una fracción terapéutica, es decir, cuando se concentra en una célula, la fracción de agente activo tiene algún efecto farmacológico deseado, que típicamente incluye ayudar a que una célula objetivo desarrolle o atenúe el crecimiento o destruya una célula objetivo, por ejemplo, ejemplo cuando la célula objetivo es patológica.

10 Para implementar las enseñanzas de la presente puede usarse cualquier fracción terapéutica adecuada, por ejemplo, una toxina, una vitamina y un fotosensibilizador. Las fracciones terapéuticas típicas incluyen fracciones que son citotóxicas cuando se concentran en una célula, por ejemplo, influyendo en los procesos celulares o daño por radiación o radicales libres.

15 En algunas de tales realizaciones, después de la administración del ligando de receptores de somatostatina a las células, las fracciones terapéuticas se concentran en las células que expresan los receptores de somatostatina (por ejemplo, especialmente las células que sobreexpresan receptores de somatostatina), en mayor grado que las células que no expresan los receptores de somatostatina o células que expresan niveles bajos de receptores de somatostatina que permiten el direccionamiento y el tratamiento específicos de tales células. Una utilidad típica de
20 tales realizaciones es administrar un agente activo destructor de células a células patológicas que sobreexpresan receptores de somatostatina (por ejemplo, algunos cánceres) a la vez que provocan poco o ningún daño a las células normales.

Colorante

25 En algunas realizaciones, la fracción de agente activo es un colorante, es decir, es una fracción de agente activo que incluye un cromóforo que tiene un color distintivo que puede observarse a una concentración suficiente.

30 Para implementar las enseñanzas de la presente puede usarse cualquier colorante adecuado con cualquier cromóforo adecuado, por ejemplo, derivados de violeta de metilo.

35 En algunas de tales realizaciones, después de la administración del ligando de receptores de somatostatina a las células (in vivo o in vitro), los colorantes se concentran en las células que expresan los receptores de somatostatina en mayor grado que en otras (por ejemplo, especialmente células que sobreexpresan los receptores de somatostatina), permitiendo la identificación de tales células por inspección visual o microscópica.

Agente fluorescente

40 En algunas realizaciones, la fracción de agente activo es fluorescente, es decir, es una fracción de agente activo que incluye un fluoróforo que absorbe energía en una primera longitud de onda de luz y luego emite por lo menos parte de la energía en una segunda longitud de onda de luz más alta que la primera.

45 Para implementar las enseñanzas de la presente puede usarse cualquier agente fluorescente adecuado con cualquier fluoróforo adecuado, por ejemplo, derivados de fluoresceína o rodamina.

50 En algunas de tales realizaciones, después de la administración del ligando de receptores de somatostatina a las células (in vivo o in vitro), los agentes fluorescentes se concentran en células que expresan receptores de somatostatina en mayor grado que en otras (por ejemplo, especialmente células que sobreexpresan receptores de somatostatina), permitiendo la identificación de tales células debido a la distinta fluorescencia del fluoróforo.

55 En algunas de tales realizaciones, los ligandos de los receptores de somatostatina se seleccionan del grupo que consiste en: Compuesto 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16 (SEQ ID NOS: 12, 17, 21, 25, 30, 35, 39, 45, 46, 50, 52, 54, 58, 62 y 64, respectivamente) que incluyen una fracción de agente activo FITC-GABA.

55 Toxina

60 En algunas realizaciones, la fracción de agente activo es una toxina, es decir, es un agente activo que tiene un efecto nocivo sobre las células, por ejemplo, alterando los procesos biológicos en la célula, por ejemplo, atenuando o deteniendo el desarrollo celular (por ejemplo, citostático) o incluso matando la célula (por ejemplo, citotóxico).

65 En algunas de tales realizaciones, después de la administración del ligando de receptores de somatostatina a las células, la toxina se concentra en las células que expresan los receptores de somatostatina en mayor grado que en otras, por ejemplo, especialmente las células que sobreexpresan los receptores de somatostatina, teniendo de este modo un efecto nocivo sobre las células.

Para implementar las enseñanzas de la presente puede usarse cualquier toxina adecuada, por ejemplo, derivados de actinomicina, camptotecina, doxorubicina, gentamicina. Algunas de tales realizaciones pueden usarse in vivo para dañar o destruir células que sobreexpresan uno o más receptores de somatostatina.

5 Quelante

En algunas realizaciones, la fracción de agente activo es un quelante, es decir, es un agente activo configurado para unir iones metálicos por quelación. Para implementar las enseñanzas de la presente puede usarse cualquier quelante adecuado, por ejemplo, derivados de DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético), NOTA (ácido 2-(4,7-bis(2-(terc-butoxi)-2-oxoetil)-1,4,7-triazonan-1-il) acético), NODA (ácido 4-(4,7-bis(2-(terc-butoxi)-2-oxoetil)-1,4,7-triazaciclononan-1-il)-5-(terc-butoxi)-5-oxopentanoico) o EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). En algunas de tales realizaciones, la fracción de agente activo es un quelante que está quelando un metal, en algunas realizaciones un metal radioactivo o detectable por MRI, ver a continuación.

En algunas realizaciones, después de la administración del ligando de receptores de somatostatina a las células, el quelante (dependiendo de la realización, con o sin metal quelado) se concentra en células que expresan uno o más receptores de somatostatina en mayor grado que otras, por ejemplo, especialmente células que sobreexpresan los receptores de somatostatina.

Algunas de tales realizaciones pueden usarse para concentrar iones metálicos (en algunas realizaciones, metales detectables por MRI o/e iones metálicos radiactivos) en células que sobreexpresan uno o más receptores de somatostatina, por ejemplo, con propósitos terapéuticos y/o de imagenología.

25 Fracción con un átomo metálico

En algunas realizaciones, la fracción de agente activo es una fracción con un átomo metálico. Algunas de tales realizaciones pueden usarse para concentrar átomos metálicos en células que sobreexpresan receptores de somatostatina.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, el átomo metálico es un átomo metálico radiactivo, y la somatostatina es para su uso como radiofármaco en el campo de la medicina nuclear, por ejemplo, con propósitos terapéuticos y/o de imagenología, ver a continuación.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, el átomo metálico es un átomo metálico detectable por MRI (por ejemplo, gadolinio, Fe²⁺) para su uso como agente de contraste de MRI en el campo de la imagenología por resonancia magnética, por ejemplo, con propósitos de imagenología.

40 Fracción con átomo radiactivo

En algunas realizaciones, la fracción de agente activo es una fracción con un átomo radiactivo. Algunas de tales realizaciones pueden usarse para concentrar átomos radiactivos en células que sobreexpresan uno o más receptores de somatostatina, por ejemplo, para su uso como radiofármaco en el campo de la medicina nuclear, por ejemplo, con propósitos terapéuticos y/o de imagenología.

En algunas de tales realizaciones, después de la administración del ligando de receptores de somatostatina a las células, los átomos radiactivos se concentran en las células que expresan uno o más receptores de somatostatina en mayor grado que en otras (por ejemplo, especialmente células que sobreexpresan uno o más receptores de somatostatina), permitiendo la identificación de tales células con fracciones detectoras de radiación (por ejemplo, PET/SPECT) y/o que tienen un efecto terapéutico (por ejemplo, tóxico) debido a la radiación emitida.

Para implementar las enseñanzas de la presente puede usarse cualquier fracción adecuada con cualquier agente radiactivo adecuado.

En algunas realizaciones, el átomo radiactivo está unido covalentemente a otras partes de la fracción del agente activo. Tales realizaciones típicas incluyen uno o más átomos radiactivos, por ejemplo, átomos seleccionados del grupo que consiste en yodo-123, yodo-125, yodo-131 en un residuo de iobenguano, flúor-18, carbono-11, carbono-14, tritio, nitrógeno-13, oxígeno-15 y fósforo-32.

En algunas realizaciones, el agente radiactivo es un átomo metálico radiactivo unido iónicamente (por ejemplo, quelado) a otras partes de la fracción activa del agente activo. Tales realizaciones típicas incluyen uno o más átomos radiactivos, por ejemplo, átomos seleccionados del grupo que consiste en tecnecio-99m, cromo-51, cobalto-57, cobalto-58, erbio-169, galio-67, galio-68, indio-111, hierro-59, radio-223, rubidio-82, samario-153, selenio-75, estroncio-89, talio-201 e itrio-90.

65

Nanopartícula

5 En algunas realizaciones, la fracción de agente activo comprende una nanopartícula y, en algunas realizaciones, es una nanopartícula. Un experto en la técnica está familiarizado con la definición del término "nanopartícula", ver, por ejemplo, Murthy SK, Int J Nanomedicine 2007, 2(2) 129-141 que también incluye ejemplos de nanopartículas específicas que pueden usarse para implementar las enseñanzas de la presente. Dicho esto, en algunas realizaciones, una nanopartícula es una partícula de no menos de 1 nanómetro de tamaño y no más de 1000 nanómetros de tamaño, y en algunas realizaciones de no más de 100 nanómetros de tamaño.

10 En algunas de tales realizaciones, después de la administración del ligando de receptores de somatostatina a las células, las fracciones de nanopartículas se concentran en células que expresan uno o más receptores de somatostatina en mayor grado que otras (por ejemplo, especialmente células que sobreexpresan uno o más receptores de somatostatina), permitiendo la identificación de tales células (ver sección experimental).

15 En algunas realizaciones, la nanopartícula define un volumen interno que contiene un agente activo secundario (por ejemplo, un agente terapéutico o de imagenología). En algunas de tales realizaciones, la nanopartícula se usa como un recipiente para la administración de los agentes activos secundarios contenidos en la misma a una célula. Algunas de tales realizaciones se usan para administrar grandes cantidades de agentes activos secundarios a células que sobreexpresan uno o más receptores de somatostatina: una vez que la nanopartícula se internaliza en una célula, el agente activo secundario se libera dentro de la célula. En algunas de tales realizaciones, después de la administración del ligando de receptores de somatostatina a las células, las fracciones de nanopartículas se concentran en células que expresan uno o más receptores de somatostatina en mayor grado que otras (por ejemplo, especialmente células que sobreexpresan uno o más receptores de somatostatina), y luego liberan el agente activo secundario dentro de la célula.

25 Para implementar las enseñanzas de la presente puede usarse cualquier nanopartícula adecuada, por ejemplo, nanopartículas como las descritas en las publicaciones PCT WO2012/054923, WO2012/166923, WO2014/04361 y WO2014/043625 así como nanopartículas que son sustancialmente grupos de albúmina.

30 En algunas realizaciones, la nanopartícula comprende nanotubos de carbono, especialmente nanotubos de carbono de pared simple. En algunas realizaciones, los nanotubos de carbono (opcionalmente se fluoran y luego) se modifican con polietilenoimina ramificada a través de la cual la fracción peptídica cíclica se une covalentemente. En algunas realizaciones, el nanotubo de carbono comprende además un agente activo terapéutico unido al nanotubo de carbono, por ejemplo, a través de una polietilenoimina ramificada. Tales realizaciones pueden ser implementadas por un experto en la técnica tras leer cuidadosamente la memoria descriptiva en combinación con las enseñanzas de Andreoli E et al, en J. Mater. Chem. B 2014, 2, 4740-4747.

35 En algunas realizaciones, la nanopartícula comprende una "nanoflor", por ejemplo, formada por un copolímero de injerto construido mediante la polimerización directa de gamma-camptotecina-glutamato N-carboxianhídrido (Glu(CPT)-NCA) en múltiples sitios de cadena principal basada en poli(etilenglicol) (PEG) mediante polimerización de anillo abierto (ROP). Tales realizaciones pueden ser implementadas por un experto en la técnica tras la lectura cuidadosa de la memoria descriptiva en combinación con las enseñanzas de Tai W et al, en J. Biomaterials 2014, 35(25), 7194-7203.

45 Polímero de etilenglicol

En algunas realizaciones, la fracción de agente activo comprende un polímero de etilenglicol (polietilenglicol).

50 En algunas de tales realizaciones, el polímero de etilenglicol es un componente de una nanopartícula.

55 En algunas de tales realizaciones, la fracción peptídica del ligando de receptores de somatostatina como se describe en la presente es pegilada por el polímero de etilenglicol. Dependiendo de la realización, la pegilación puede tener uno o más atributos útiles, incluyendo el aumento de la solubilidad (in vivo y/o in vitro), la reducción de la inmunogenicidad y la antigenicidad in vivo y la reducción de la tasa de depuración renal del ligando de receptores de somatostatina.

Fotosensibilizador

60 En algunas realizaciones, la fracción de agente activo es un fotosensibilizador. Como se usa en la presente, un fotosensibilizador es una molécula que absorbe energía de la luz para entrar en un estado excitado, y en el estado excitado interactúa con especies de oxígeno triplete para producir especies de oxígeno singlete químicamente activas. Los fotosensibilizadores conocidos incluyen fenotiazinas como azul de metileno, xantenos como rosa de Bengala y porfirinas.

65

En algunas de tales realizaciones, después de la administración del ligando de receptores de somatostatina a las células, las fracciones fotosensibilizadoras se concentran en células que expresan receptores de somatostatina en mayor grado que otras (por ejemplo, especialmente células que sobreexpresan uno o más receptores de somatostatina). Una vez que los fotosensibilizadores están dentro de la célula, las células se irradian, haciendo que los fotosensibilizadores generen especies de oxígeno activo dentro de la célula a partir de moléculas de oxígeno presentes dentro de la célula, las especies de oxígeno activo teniendo un efecto citotóxico potencial.

Constituyente de liposomas

En algunas realizaciones, la fracción de agente activo es un constituyente de liposomas, por ejemplo, un fosfolípido o un polímero de etilenglicol. En algunas de tales realizaciones, el ligando de receptores de somatostatina se usa para formar un liposoma junto con otros constituyentes de liposomas (como se conoce en la técnica) opcionalmente con un agente activo secundario contenido dentro del liposoma en analogía con lo descrito anteriormente con referencia a las nanopartículas. En tales realizaciones, la fracción de agente activo constituyente de liposomas se convierte en parte del liposoma mientras que por lo menos parte de la fracción peptídica actúa como una fracción guía para unir preferiblemente o incluso selectivamente el liposoma a las células que expresan o sobreexpresan los receptores de somatostatina. Algunas de tales realizaciones se usan para administrar liposomas (y en algunas realizaciones, agentes activos secundarios contenidos en los mismos) a células que sobreexpresan uno o más receptores de somatostatina.

En algunas de tales realizaciones, después de la administración del ligando de receptores de somatostatina a las células, el liposoma se concentra en las células que expresan uno o más receptores de somatostatina en mayor grado que otras (por ejemplo, especialmente las células que sobreexpresan uno o más receptores de somatostatina), y luego liberan el agente activo secundario dentro de la célula.

Constituyente de micelas

En algunas realizaciones, la fracción de agente activo es un constituyente de micelas, por ejemplo, un surfactante. En algunas de tales realizaciones, el ligando de receptores de somatostatina se usa para formar una micela junto con otros constituyentes de la micela (como se conoce en la técnica) opcionalmente con un agente activo secundario contenido dentro de la micela en analogía con lo descrito anteriormente con referencia a nanopartículas y liposomas. En dichas realizaciones, la fracción de agente activo constituyente de micelas se convierte en parte de la micela mientras que por lo menos parte de la fracción peptídica actúa como una fracción guía para unir preferiblemente o incluso selectivamente la micela a las células que expresan o sobreexpresan uno o más receptores de somatostatina. Algunas de tales realizaciones se usan para administrar micelas (y en algunas realizaciones, agentes activos secundarios contenidos en las mismas) a células que sobreexpresan uno o más receptores de somatostatina.

En algunas de tales realizaciones, después de la administración del ligando de receptores de somatostatina a las células, la micela se concentra en células que expresan uno o más receptores de somatostatina en mayor grado que otras (por ejemplo, especialmente células que sobreexpresan uno o más receptores de somatostatina), y luego liberan el agente activo secundario dentro de la célula.

Composición farmacéutica y método para elaborar la composición farmacéutica

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de las enseñanzas de la presente, también se proporciona una composición farmacéutica que comprende: como ingrediente activo, por lo menos un ligando de receptores de somatostatina de acuerdo con la presente invención; y un portador farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es útil en el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con la expresión de SSTRx.

La composición farmacéutica y los métodos para elaborar dicha composición están de acuerdo con lo conocido en la técnica de la farmacología usando cualquier método adecuado o combinación de métodos adecuada conocidos en la técnica como se describe en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición. Tales métodos incluyen el mezclado, disolución, granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización convencionales. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de manera convencional usando uno o más portadores, diluyentes, excipientes o agentes auxiliares fisiológicamente aceptables que facilitan el procesamiento del ligando de receptores en una composición farmacéutica. Los detalles exactos de una composición específica dependen, entre otras cosas, de la vía de administración deseada.

Para la administración tópica, un ligando de receptores de acuerdo con las enseñanzas de la presente puede formularse en una solución, gel, pomada, crema, suspensión, espuma y similares.

La administración sistémica puede lograrse mediante una composición configurada para inyección, por ejemplo, inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intratecal o intraperitoneal, así como para administración transdérmica, transmucosal, por inhalación, oral o pulmonar.

5 Para inyección, un ligando de receptores de acuerdo con las enseñanzas de la presente puede formularse en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles como solución de Hank, solución de Ringer o tampón de solución salina fisiológica.

10 Para la administración oral, se puede formular una composición que comprende un ligando de receptores de acuerdo con las enseñanzas de la presente combinando con vehículos farmacéuticamente aceptables para la administración oral como se conoce en la técnica, por ejemplo, para formar comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles., jarabes, lechadas, suspensiones y similares, para ingestión oral. Las composiciones orales sólidas típicamente incluyen rellenos como azúcares, por ejemplo, lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol; preparados de celulosa tales como almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, 15 goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidona (PVP); agentes de granulación; y agentes aglutinantes. Las composiciones orales líquidas como suspensiones, elixires y soluciones, típicamente incluyen agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes de suspensión, agentes aromatizantes y conservantes.

20 Una composición farmacéutica puede estar configurada como un supositorio para administración rectal o vaginal y comprende bases de supositorios convencionales como manteca de cacao y/u otros glicéridos.

Uso del ligando de receptores de somatostatina (sintético)

25 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de las enseñanzas de la presente, también se proporciona el uso de un ligando de receptores de somatostatina de acuerdo con la presente invención para su uso en el tratamiento de un organismo vivo

30 Típicamente, el ligando de receptores de somatostatina se administra al organismo administrando una composición farmacéutica que incluye el ligando de receptores de somatostatina.

35 En algunas realizaciones, el uso es para dirigirse a una célula que expresa uno o más receptores de somatostatina con una fracción de agente activo del ligando de receptores de somatostatina (sintético), en algunas realizaciones para dirigirse a una célula que sobreexpresa uno o más receptores de somatostatina.

En algunas realizaciones, el uso es para identificar una célula que expresa uno o más receptores de somatostatina, en algunas realizaciones para identificar una célula que sobreexpresa uno o más receptores de somatostatina.

40 En algunas realizaciones, la célula que sobreexpresa uno o más receptores de somatostatina es una célula patológica, en algunas realizaciones una célula cancerosa.

Método de tratamiento

45 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de las enseñanzas de la presente, también se proporciona un método para tratar una célula que expresa uno o más receptores de somatostatina que comprende: administrar por lo menos un ligando de receptores de somatostatina de la presente invención a una célula que expresa (y en algunas realizaciones, sobreexpresa) uno o más receptores de somatostatina, tratando de este modo 50 la célula en donde dicha célula y dicha administración es *in vitro*. En algunas realizaciones, el método es para implementar un uso como se ha descrito anteriormente.

55 En algunas realizaciones, la administración de por lo menos un ligando de receptores de somatostatina es la administración de por lo menos dos ligandos de los receptores de somatostatina diferentes. En algunas de tales realizaciones, se administran en serie por lo menos dos de los diferentes ligandos de los receptores de somatostatina. En algunas de tales realizaciones, se administran simultáneamente por lo menos dos de los diferentes ligandos de los receptores de somatostatina. En algunas de tales realizaciones, se administran simultáneamente por lo menos dos de los diferentes ligandos de los receptores de somatostatina.

60 En algunas de tales realizaciones, la célula está viva.

65 En algunas de tales realizaciones, el organismo vivo es un animal no humano. En algunas de tales realizaciones, el organismo vivo es un humano. El método puede comprender además: después de la administración, aplicar una modalidad de imagenología a la célula para identificar una interacción del ligando de receptores de somatostatina con la célula. Típicamente tales realizaciones incluyen la administración de por lo menos un conjugado de fracción peptídica - fracción de agente activo, especialmente un conjugado de fracción

peptídica - fracción de agente de imagenología. Algunas de tales realizaciones se aplican, por ejemplo, para diagnóstico (por ejemplo, presencia o ausencia de células patológicas que sobreexpresan uno o más receptores de somatostatina) y/o visualización de patología intraquirúrgica (cáncer). Para implementar dicha realización puede usarse cualquier modalidad de imagenología adecuada, por ejemplo, microscopio, detector de fluorescencia, detector de radiación, detector de luz, NMR, rayos X, CT y tomografía por emisión de positrones.

El método puede comprender además, después de la administración, manipular una célula como resultado de la interacción del ligando de receptores de somatostatina con la célula. Dependiendo de la realización, dicha manipulación incluye manipulaciones como irradiación con luz, calor, sonido, ultrasonido, ondas de choque, rayos X, radiación o contacto físico (por ejemplo, para escisión).

Conjugados de péptido-agente fluorescente ejemplares

En la Tabla 1 se enumeran las secuencias de residuos de aminoácidos de dieciséis compuestos **1-16**. Los dieciséis compuestos **1-16** son conjugados de péptido-agente fluorescente, que tienen una parte peptídica que incluye una fracción peptídica cíclica ciclada a través de un enlace azufre-azufre, y una fracción de agente activo fluorescente (FITC-GABA), que incluye fluoróforo de isotiocianato de fluoresceína y un conector GABA, donde la fracción de agente activo fluorescente se une covalentemente a la fracción del péptido cíclico a través del átomo de nitrógeno de la amina N-terminal. En los compuestos **1-16**, A es Xxx9 una fracción GlyS2. Como se detalla en la sección experimental, los dieciséis compuestos se sintetizaron y se encontró que eran ligandos de los receptores de somatostatina que tienen una afinidad relativamente alta por uno o más receptores de somatostatina.

El compuesto 1 es idéntico a un ligando de receptores de somatostatina sintético conocido descrito en la US 7.700.717 designado 86, y cuando está desprovisto de la fracción de agente activo fluorescente se designa 3207. Los compuestos **2-16** son compuestos nuevos que tienen una secuencia de residuos de aminoácidos nueva que son adecuados para su uso en la implementación del primer aspecto de las enseñanzas de la presente.

Los compuestos **1-12**, **14-16** son adecuados para su uso en la implementación de las enseñanzas del segundo y tercer aspectos de las enseñanzas de la presente. Además, dos compuestos descritos en la US 7.700.717 y mencionados anteriormente en la presente también se consideran excepcionalmente útiles para implementar el segundo y tercer aspectos de las enseñanzas de la presente, específicamente, el Compuesto 30 (GlyS2*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2*-NH₂, designado 3213) y el Compuesto 31 (DPhe-GlyS2*-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2*-NH₂, designado 3173). Además, la Lanreotida y la Octreotida también se consideran excepcionalmente útiles para implementar el segundo y el tercer aspectos de las enseñanzas de la presente.

Tabla 1: secuencia de compuestos químicos sintetizados

			Xxx1	Xxx2	Xxx3	Xxx4	Xxx5	Xxx6	Xxx7	Xxx8	A=Xxx 9-A'	SEQ ID
1	FITC-GABA-	D-Phe	Cys		Phe	Trp	D-Trp	Lys	Thr	Phe	GlyS2	6
2	FITC-GABA-	D-Phe	Cys	Arg	Phe		D-Trp	Lys	Thr	Phe	GlyS2	12
3	FITC-GABA-	D-Phe	Cys		Phe	Trp	D-Trp	Om	Thr	Phe	GlyS2	17
4	FITC-GABA-	D-Phe	Cys		Tyr	Trp	D-Trp	Lys	Thr	Phe	GlyS2	21
5	FITC-GABA-	D-Phe	Cys	Arg	Phe		D-Trp	Om	Thr	Phe	GlyS2	25
6	FITC-GABA-	D-Phe	Cys	Arg	Tyr		D-Trp	Lys	Thr	Phe	GlyS2	30
7	FITC-	D-Phe	Cys		Tyr		D-Trp	Om	Thr	Phe	GlyS2	35
	GABA-											
8	FITC-GABA-	D-Phe	Cys	Arg	Phe	Phe	D-Trp	Lys	Thr	Phe	GlyS2	39
9	FITC-GABA-		Cys	Arg	Phe		D-Trp	Lys	Thr	Phe	GlyS2	45
10	FITC-GABA-	D-Phe	Cys	Arg	Phe		D-Trp	Lys	Thr	Phe	GlyS2	46
11	FITC-GABA-	D-Phe	H-Cys		Phe	Trp	D-Trp	Lys	Thr	Phe	GlyS2	50
12	FITC-GABA-	D-Phe	D-Cys		Phe	Trp	D-Trp	Lys	Thr	Phe	GlyS2	52
13	FITC-GABA-	D-Phe	Cys		Phe	Trp	D-Trp	Aib	Thr	Phe	GlyS2	54
14	FITC-GABA-	D-Phe	Cys		Phe	Trp	D-Trp	LysAc	Thr	Phe	GlyS2	58
15	FITC-GABA-	D-Phe	Cys		Phe	Trp	D-Trp	Arg	Thr	Phe	GlyS2	62
16	FITC-GABA-	D-Phe	Cys		Phe	Trp	D-Trp	Homo-Lys	Thr	Phe	GlyS2	64

Ligandos de los receptores de somatostatina unidos a nanopartículas

Como se detalla en la sección experimental a continuación, varios de los Compuestos 1-12, 14-16 se conjugaron con nanopartículas mediante unión covalente con el átomo de nitrógeno de una cadena lateral interna de aminoácidos para producir ligandos de receptores de somatostatina de acuerdo con el segundo aspecto de las enseñanzas de la presente. Como se ha indicado con anterioridad, a pesar de la expectativa de que dicha conjugación bloquearía el farmacóforo de unión al receptor de somatostatina de la molécula respectiva, se descubrió sorprendentemente que in vivo, el péptido conjugado con FITC y la nanopartícula seguía siendo un ligando de receptores de somatostatina de acuerdo con las enseñanzas de la presente y fue internalizado selectivamente por células que sobreexpresaban los receptores de somatostatina.

Unión de los compuestos 1-16 a SSTRx

Como se detalla en la sección experimental a continuación, se estudió la afinidad de unión relativa de los compuestos 1-16 a las células que expresan solo un único tipo de SSTRx. Las afinidades de unión relativas encontradas de los compuestos 1-16 se detallan en la Tabla 2. Una "x" indica que no se determinó una afinidad de unión dada. Un "0" indica que no se detectó ninguna unión.

Una conclusión que puede sacarse de los resultados encontrados en la Tabla 2 es que los quince nuevos compuestos **2-16** son ligandos para por lo menos un SSTRx con una afinidad de unión del mismo orden de magnitud que el compuesto **1**. Por lo tanto, en por lo menos una realización, los compuestos de acuerdo con las enseñanzas de la presente son útiles para unirse a células que expresan, especialmente que sobreexpresan, uno o más SSTRx. Como se ha detallado con anterioridad, y en el ejemplo siguiente, dicha unión tiene utilidad en muchos campos, por ejemplo, en el campo de la patología.

Tabla 2: Afinidad de unión relativa de los compuestos 1-16

compuesto	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5
1	3	6.5	17	22.5	28.5
2	5	5	4	4	5
3	3.6	4.3	15.7	13.3	9.3
4	3.6	4.3	15.7	13.3	9.3
5	0	1	3	1	0
6	0	1.5	22.5	1.5	0.5
7	0	1	2	1.5	1
8	2.6	4.5	11.5	31.5	27.5
9	0	10	14	15	20
10	5	5	4	4	5
11	x	x	x	29	41
12	x	x	x	x	x
13	1	0	6	4	9
14	x	x	x	3	2
15	4	5	13.5	9	7.5
16	0	2.5	12	4.5	7

Afinidad de unión relativa de los compuestos 1-16 a diferentes SSTRx

La comparación dentro de una fila de la Tabla 2 muestra la afinidad de unión relativa de un compuesto 1-16 dado a cada uno de los cinco SSTRx como una indicación de como de selectivamente se une ese compuesto a los diferentes SSTRx. Los resultados de la Tabla 2 con cada fila normalizada de acuerdo con la afinidad de unión más alta, se muestran en la Tabla 2-A.

Tabla 2-A: Afinidad de unión ajustada de los compuestos 1-16 a SSTRx

compuesto	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5
1	0.11	0.23	0.60	0.79	1
2	1	1	0.80	0.80	1
3	0.23	0.27	1	0.85	0.59
4	0.13	0.33	1	0.33	0.40
5	0	0.33	1	0.33	0
6	0	0.07	1	0.07	0.02
7	0	0.50	1	0.75	0.50
8	0.08	0.14	0.37	1	0.87
9	0	0.50	0.70	0.75	1
10	1	1	0.80	0.80	1
11	x	x	x	0.71	1
12	x	x	x	x	x
13	0.11	0	0.67	0.44	1
14	x	x	x	1	0.67
15	0.30	0.37	1	0.67	0.56
16	0	0.21	1	0.38	0.58

Una conclusión que puede sacarse del estudio de la Tabla 2-A es que cada uno de los compuestos 1-16 tiene un conjunto único de afinidades relativas para los cinco SSTRx diferentes. En algunas realizaciones, tales afinidades relativas diferentes permiten que las enseñanzas de la presente se usen para dirigirse a células que expresan cualquier SSTRx seleccionando un compuesto adecuado de acuerdo con las enseñanzas de la presente. Como se ha detallado anteriormente, y se detalla en el ejemplo siguiente, dicha unión tiene utilidad en muchos campos, por ejemplo, en el campo de la patología.

Por ejemplo, los resultados indican que el Compuesto 2 (SEQ ID NO: 12) y el Compuesto 10 (SEQ ID NO: 46) tienen poca especificidad de unión y se unen a los cinco SSTRx con aproximadamente la misma afinidad. Por consiguiente, en algunas realizaciones se usa un compuesto de acuerdo con las enseñanzas de la presente que comprende la secuencia de residuos de aminoácidos de cualquiera de los Compuestos 2 y 10 para unirse a cualquier célula que sobreexpresase uno o más SSTRx.

Los resultados indican que el Compuesto 7 (SEQ ID NO: 35) y el Compuesto 9 (SEQ ID NO: 45) se unen a SSTR2, SSTR3, SSTR4 y SSTR5, pero no a SSTR1. Por consiguiente, en algunas realizaciones se usa un compuesto de acuerdo con las enseñanzas de la presente que comprende la secuencia de residuos de aminoácidos de cualquiera de los Compuestos 7 y 9 para diferenciar entre células que sobreexpresan cualquiera de SSTR2-SSTR5 y células que sobreexpresan SSTR1.

Los resultados indican que el Compuesto 6 (SEQ ID NO: 30) es muy específico y se une preferiblemente a SSTR3, mientras que el Compuesto 4 (SEQ ID NO: 21) y el Compuesto 5 (SEQ ID NO: 25) son relativamente específicos y se unen preferiblemente a SSTR3. Por consiguiente, en algunas realizaciones se usa un compuesto de acuerdo con las enseñanzas de la presente que comprende la secuencia de residuos de aminoácidos de cualquiera de los Compuestos 4, 5 y 6 para identificar células que sobreexpresan SSTR3.

Otros compuestos se unen preferiblemente a dos SSTRx con afinidades similares y no a los otros tres SSTRx, específicamente: el Compuesto 8 (SEQ ID NO: 39) a SSTR4 y SSTR5 y no a SSTR1, SSTR2 y SSTR3, y el Compuesto 13 (SEQ ID NO: 54) y el Compuesto 16 (SEQ ID NO: 64) a SSTR3 y SSTR5 y no a SSTR1, SSTR2 y SSTR4. Por consiguiente, en algunas realizaciones se usa un compuesto de acuerdo con las enseñanzas de la presente que comprende la secuencia de residuos de aminoácidos de cualquiera de los Compuestos 8, 13 y 16 para diferenciar entre células que sobreexpresan algunos SSTRx y no otros SSTRx.

Otros compuestos se unen preferiblemente a tres SSTRx con afinidades similares y no a los otros dos SSTRx, específicamente: el Compuesto 1 (SEQ ID NO: 6), el Compuesto 3 (SEQ ID NO: 17) y el Compuesto 15

(SEQ ID NO: 62) se unen todos preferiblemente a SSTR3, SSTR4 y SSTR5 y no a SSTR1 y SSTR2. Por consiguiente, en algunas realizaciones se usa un compuesto de acuerdo con las enseñanzas de la presente que comprende la secuencia de residuos de aminoácidos de cualquiera de los Compuestos 1, 3 y 15 para diferenciar entre células que sobreexpresan algunos SSTRx y no otros SSTRx.

5 La comparación dentro de una fila de la Tabla 2 muestra la afinidad de unión relativa de un compuesto dado 1-16 para cada uno de los cinco SSTRx como una indicación de como de selectivamente se une ese compuesto a los diferentes SSTRx.

10 *Afinidad de unión relativa de los compuestos 1-16 al mismo SSTRx*

La comparación dentro de una columna de la Tabla 2 muestra la afinidad de unión relativa de un compuesto dado 1-16 para un SSTRx específico con respecto a los otros compuestos 1-16, como una indicación de qué compuesto químico se une más eficazmente a qué SSTRx. Los resultados de la Tabla 2 con cada columna normalizada de acuerdo con la afinidad de unión del compuesto 1 del estado de la técnica, se muestran en la Tabla 2-B.

Tabla 2-B: Afinidad de unión de los Compuestos 2-16 a SSTRX con respecto al Compuesto 1

Compuesto	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5
1	100	100	100	100	100
2	167	77	24	18	18
3	120	66	92	59	33
4	100	123	141	36	4
5	0	15	18	4	0
6	0	23	132	7	2
7	0	15	12	7	4
8	78	69	68	140	96
9	0	154	82	67	70
10	167	77	24	18	18
11	x	x	x	129	144
12	x	x	x	x	x
13	33	0	35	18	32
14	x	x	x	13	7
15	133	77	79	40	26
16	0	38	71	20	25

Una conclusión que puede sacarse del estudio de la Tabla 2-B es que para cada uno de los cinco SSTRx, por lo menos un compuesto 2-16 tiene una mayor afinidad de unión que el Compuesto 1 del estado de la técnica.

50 Específicamente, para SSTR1, los Compuestos 2, 3, 10 y 15 tienen una mayor afinidad de unión que el Compuesto 1.

55 Para SSTR2, los Compuestos 4 y 9 tienen una mayor afinidad de unión que el Compuesto 1.

Para SSTR3, los Compuestos 4 y 6 tienen una mayor afinidad de unión que el Compuesto 1.

Para SSTR4, los Compuestos 8 y 11 tienen una mayor afinidad de unión que el Compuesto 1.

60 Para SSTR5, el Compuesto 11 tiene una mayor afinidad de unión que el Compuesto 1.

Uso de conjugados de péptido-agente activo en patología

65 En la técnica de la patología se sabe determinar la naturaleza de una célula o tejido. Por ejemplo, se extrae una biopsia de tejido sospechoso y el patólogo intenta determinar si el tejido es patológico o no.

Algunos compuestos de acuerdo con las enseñanzas de la presente son conjugados de péptido - agente activo, que comprenden una fracción de unión a SSTRx que comprende una secuencia de residuos de aminoácidos de acuerdo con las enseñanzas de la presente conjugados con una fracción de agente activo indicador. Uno o más conjugados de péptido-agente activo se administran a una célula. El conjugado o conjugados se unen al SSTRx expresado por las células con respecto a las afinidades relativas de la fracción de unión administrada a los diferentes SSTRx y la abundancia relativa de cada SSTRx expresado por la célula.

Posteriormente, se determina de la manera habitual la presencia y la abundancia relativa de la fracción o fracciones de agente activo indicador (por ejemplo, observación directa de colorantes, observación en condiciones adecuadas de agentes activos fluorescentes, detectores de radiación para agentes activos radiactivos), lo que permite dilucidar cuál, si los hay, de los SSTRx son expresados (sobreexpresados) por la célula, y en algunas realizaciones, la distribución relativa de los mismos.

En algunas realizaciones, para implementar tales realizaciones se usan los compuestos 1-16.

Conjugado de péptido - agente activo individual en patología

Se proporciona una muestra de biopsia de tejido recuperado de una persona a un patólogo para identificar si el tejido es tejido patológico que sobreexpresa SSTRx.

El patólogo administra una dosis de una composición que comprende un conjugado de péptido-indicador de acuerdo con las enseñanzas de la presente que comprende la secuencia de residuos de aminoácidos del Compuesto 2 (por ejemplo, el Compuesto 2) en una solución tampón a la muestra de biopsia de la manera habitual, permite que la muestra de biopsia se incube en presencia del conjugado y luego elimina el exceso de líquidos. El examen de la muestra de biopsia en condiciones adecuadas que detectan la presencia de la fracción indicadora sobre o dentro de una célula, permite al patólogo determinar si la muestra de biopsia está teñida o no por el conjugado, proporcionando evidencia para ayudar al patólogo a concluir si la muestra de biopsia o partes de la misma incluyen células que sobreexpresan SSTRx. En algunas realizaciones, cuando el agente activo del conjugado administrado es fluorescente (por ejemplo, el Compuesto 2), el examen se en un microscopio adecuado (por ejemplo, el microscopio Leica® TCS SP8 STED 3X equipado con una cámara digital Leica® DFC550) en condiciones de iluminación que permitan que el fluoróforo del conjugado (por ejemplo, FITC en el compuesto 2) emita fluorescencia y permita al patólogo concluir que partes, si las hay, de la muestra de biopsia incluyen células que sobreexpresan SSTRx.

Conjugado de péptido - agente activo múltiple en patología

En algunas realizaciones, se proporcionan por lo menos dos conjugados de péptido-indicador diferentes, cada uno con una fracción peptídica que tiene una secuencia de residuos de aminoácidos diferente de acuerdo con las enseñanzas de la presente, y una fracción indicadora diferente. Típicamente, pero no necesariamente, las fracciones indicadoras son del mismo tipo, por ejemplo, son todas colorantes o son todas fluorescentes.

Se coadministra a una célula una combinación de dos o más conjugados de péptido-indicador diferentes. Los conjugados se unen a SSTRx expresado por la célula con respecto a las afinidades relativas de la fracción de unión administrada a los diferentes SSTRx y la abundancia relativa de cada SSTRx expresado por la célula.

Posteriormente, se determina de la manera habitual la presencia y la abundancia relativa de las dos o más fracciones de agente activo indicador, lo que permite dilucidar qué SSTRx, si los hay, son expresados (sobreexpresados) por la célula y, en algunas realizaciones, la distribución relativa de los mismos.

En algunas realizaciones, para implementar tales realizaciones se usa por lo menos uno de los compuestos 1-16, junto con por lo menos otro compuesto de acuerdo con las enseñanzas de la presente. En algunas realizaciones, por lo menos otro compuesto es un derivado de un compuesto 1-16 que tiene un fluoróforo diferente. Un experto en la técnica de la química sintética es capaz de sintetizar tales derivados sin una experimentación indebida tras leer detenidamente la memoria descriptiva, por ejemplo, usando síntesis basadas en lo divulgado en la presente.

En algunas de tales realizaciones, se administran en serie dos conjugados de péptido-indicador diferentes, es decir, primero se administra un conjugado, después de un tiempo de incubación, parte del primero se elimina del contacto con la célula (por ejemplo, se lava), y luego se administra un segundo conjugado.

En algunas de tales realizaciones, se administran concurrentemente dos conjugados de péptido-indicador diferentes, es decir, primero se administra un conjugado, seguido de la administración de un segundo conjugado.

En algunas de tales realizaciones, se administran sustancialmente de manera simultánea dos conjugados

de péptido-indicador diferentes.

Por ejemplo, en una realización de este tipo, se desea determinar la abundancia relativa del SSTRx expresado por las células que componen una muestra de biopsia de tejido recuperado de una persona proporcionada a un patólogo.

Se sintetiza un primer conjugado de péptido-indicador, compuesto 5' (que se une a SSTR4 y no a SSTR5) que es similar al compuesto 5 pero en lugar de la conjugación con un fluoróforo FITC, se conjuga con un fluoróforo Pacific Blue que se excita con luz de 403 nm para emitir fluorescencia a 455 nm (azul).

Se sintetiza un segundo conjugado de péptido-indicador, compuesto 6' (que se une casi exclusivamente a SSTR3) que es similar al compuesto 6 pero en lugar de la conjugación con un fluoróforo FITC, se conjuga con un fluoróforo TRITC (tetrametilrodamina) que se excita con luz de 547 nm para emitir fluorescencia a 572 nm (naranja).

Se sintetiza un tercer conjugado de péptido-indicador, compuesto 8' (que se une preferiblemente a SSTR4 y SSTR5) que es similar al compuesto 8 pero en lugar de la conjugación con un fluoróforo FITC, se conjuga con un fluoróforo BODIPY-TR (boro-dipirrometeno) que se excita con luz de 588 nm para emitir fluorescencia a 616 nm (rojo).

Se sintetiza un cuarto conjugado de péptido-indicador, compuesto 10 (que se une sustancialmente a todos los SSTRx), anterior, que se conjuga con un fluoróforo FITC que se excita con luz de 492 nm para que emita fluorescencia a 520 nm (verde).

Se sintetiza un quinto conjugado péptido indicador, compuesto 13' (que se une a SSTR1 pero no a SSTR2) que es similar al compuesto 13 pero en lugar de la conjugación con un fluoróforo FITC, se conjuga con un fluoróforo de metoxicumarina que se excita con luz de 360 nm para emitir fluorescencia a 410 nm (azul).

Con la ayuda de un fluorómetro, un farmacéutico prepara una composición que comprende los cinco compuestos 5', 6', 8', 10 y 13' en una solución también en concentraciones relativas que proporcionan emisiones con una intensidad casi idéntica.

El patólogo administra una dosis de la composición con los cinco compuestos, permite que la muestra de biopsia se incube en presencia de la composición y luego elimina el exceso de líquidos. El tejido se examina bajo un microscopio con condiciones de iluminación que permiten que los fluoróforos respectivos de los compuestos administrados emitan fluorescencia, lo que permite al patólogo determinar si la muestra de la biopsia está teñida o no por qué conjugado, proporcionando evidencias para ayudar al patólogo a concluir si la muestra de biopsia o partes de la misma incluyen o no células que sobreexpresan cada SSTRx específico, en algunas realizaciones y si es necesario, usando álgebra básica para resolver un conjunto de cinco ecuaciones con cinco incógnitas.

EXPERIMENTAL

Materiales

GlyS2 se sintetizó de acuerdo con los métodos descritos en Gazal (Gazal S et al J Pept Res 2001, 58(6), 527-539).

Todos los demás compuestos químicos y reactivos requeridos se adquirieron de proveedores comerciales conocidos, entre otros, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Animales

Todos los experimentos in vivo se realizaron en animales anestesiados y se realizaron de conformidad con las normas del Comité de Bienestar Animal del Centro Médico Sheba.

Síntesis de los Compuestos 1-16 (Tabla 1)

Los compuestos 1-16 se sintetizaron usando métodos estándar de síntesis de péptidos en fase sólida (SPSS) como se describe en la US 7.700.717 y Gazal con la modificación apropiada. La conjugación con el agente activo fluorescente (FITC) se realizó mientras los péptidos sintetizados todavía lineales se unían a la resina de peptidilo durante 4 horas usando DIEA (N,N-diisopropiletilamina). La eliminación de los grupos protectores, la ciclación y la escisión de la resina se realizó como se describe en Falb (Falb, E., et al., Bioorg Med Chem, 2001, 9, 3255). Tal escisión dio como resultado que todos los compuestos terminaran en amida (siendo la entidad química A GlyS2-NH₂ y siendo la entidad química A' NH₂).

Después de la escisión, los compuestos químicos resultantes 1-16 se purificaron usando HPLC preparativa

usando una columna LiChrospher® 100 RP-18 (5 micrómetros) Hibar® de 250 mm x 25 mm y un gradiente de agua/acetonitrilo (cada uno con 0,1% de TFA).

Después de la purificación, se confirmaron la pureza y la identidad de los compuestos químicos 1-16 usando HPLC analítica, ESI-MS y, en algunos casos, HPLC-MS (LCQ). Se usó un sistema HPLC-UltiMate® 3000 (Dionex) equipado con bomba 3000, detector VWD-3000 UV-Vis y software Chromeleon® 6.80. Se usaron MS-LCQ Fleet™ LC-MS System, 3D Ion Trap, Thermo Scientific y Waters Xevo TQD para la determinación del peso molecular de los compuestos y la unidad estructural Gly-S2(Acm). El peso molecular teórico se calculó usando ChemDraw Ultra 10.0, CambridgeSoft.

Afinidad de unión de los compuestos 1-16 a SSTRx (Tabla 2)

in vitro

Se probó la afinidad de los compuestos 1-16 con cada uno de los cinco SSTRx usando un modelo in vitro de líneas celulares transfectadas (HEK: riñón embrionario humano), cada una de las cuales expresa un único subtipo de SSTRx humano. La evaluación de la actividad biológica de los compuestos para definir una afinidad específica para cada subtipo se realizó mediante FACS y métodos de imagenología por fluorescencia.

Los SSTRx humanos se expresaron en las células mediante transfección transitoria. Cada SSTR se expresó por separado, creando cinco líneas celulares diferentes usando la transcripción de genes humanos.

El proceso de transfección se ilustra en la Figura 1. El proceso de transfección transitoria se llevó a cabo antes de cada experimento. Brevemente, las células HEK se cultivaron en condiciones de crecimiento celular estándar. Para la prueba, las células se transfirieron a placas de 96 pocillos. Los compuestos probados se disolvieron en DMSO y luego se diluyeron en una solución tampón hasta una concentración final de DMSO del 5% como una composición de acuerdo con las enseñanzas de la presente. Se añadieron varias cantidades de las composiciones preparadas de este medio a las células en medio en las placas de 96 pocillos y se dejaron incubar entre 1 y 24 horas. La unión se determinó usando microscopía fluorescente y FACS.

La evaluación cualitativa de la eficacia de unión se realizó mediante inspección visual y fotografía digital usando un microscopio fluorescente invertido. La evaluación cuantitativa se realizó mediante FACS.

Se cultivaron células HEK-293 (riñón embrionario humano) en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con glutamina 4 mM, suero fetal bovino (FBS) al 10% y 100 unidades/ml de penicilina/estreptomina a 37° C/5% de dióxido de carbono. Un día antes de la transfección, las células se tripsinizaron, se contaron y se sembraron en placas a una densidad de 3×10^5 por plato de 35 mm de diámetro. Hasta el 70% de confluencia, las células se transfectaron transitoriamente con el vector pcDNA 3.1 que lleva la región codificante para los subtipos SSTR1-SSTR5 del receptor de somatostatina humana de SSTR humano. Las transfecciones se llevaron a cabo con el reactivo de transfección JetPei (Polyplus-transfection, NY, USA) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Brevemente, para cada transfección se usaron 2 microgramos de ADN plasmídico y 6 microlitros de reactivo de transfección JetPei. Cada uno de los componentes se volvió a suspender en 100 microlitros de NaCl 150 mM, se mezcló y se incubó durante 25 minutos a temperatura ambiente y después de la incubación se añadió a las células.

Luego, las células se sembraron en una microplaca de fondo plano de 96 pocillos (Costar, Corning, NY) a una concentración de 5×10^4 células/pocillo. Doce horas más tarde, se eliminó el sobrenadante y se reemplazó con DMEM fresco que contenía varias concentraciones (en el intervalo de nM) de los compuestos probados 1-16. Las células se incubaron durante intervalos de tiempo adicionales que variaban entre 0,5 y 24 horas. Al final del período de incubación, se descartó el sobrenadante y las células se lavaron dos veces con PBS frío. Las placas se examinaron usando un microscopio invertido IX81 (Olympus, Japón) equipado con una cámara digital PR71. Además, se usó un ensayo FACS para el análisis cuantitativo.

La expresión de los receptores deseados fue validada por RT-PCR (Figura 2: aumento de veces en la expresión de ARNm de SSTRx en HEK-293 transfectadas) e IHC (Figura 3: Validación de la expresión de SSTR en bloques de células transfectadas por anticuerpos específicos), lo que demuestra una transfección eficaz y una sobreexpresión específica de los 5 SSTR humanos.

Las Figuras 4A, 4B y 4C muestran los resultados típicos del ensayo de unión microscópica cualitativa en células HEK. Se observa claramente la internalización selectiva del Compuesto 1 en células transfectadas que sobreexpresan SSTR5.

La Figura 5 muestra los resultados comparativos de la unión específica del Compuesto 1 a las 5 líneas de células HEK transfectadas, cada una de las cuales expresa un único SSTR.

La evaluación cuantitativa de la afinidad de unión de los Compuestos 1-16 se realizó mediante FACS en el modelo de células HEK transfectadas. En la Figura 6 se muestran los resultados típicos de FACS. La transición de la fluorescencia desde la región espectral verde (cuarto inferior izquierdo) hacia las regiones verde-roja (GR) teñidas doblemente (cuarto superior derecho) demuestra la unión específica del compuesto 1 a las células transfectadas que sobreexpresan SSTR-5.

Cuantitativamente, la afinidad de unión específica se evaluó como el porcentaje de doble tinción [(GR=verde y rojo que indica transfección) / (R es rojo total) menos (G es verde que indica unión inespecífica)]:

$$\text{afinidad de unión específica} = [\text{GR/R} - \text{G}]$$

Las muestras de control (PcDNA) mostraron generalmente >1% de unión, por tanto, el umbral de eficiencia de unión positiva significativa se definió como >5%.

Los resultados para todos los compuestos que se unen a todos los SSTRx se presentan y analizan en las Tablas 2, que muestran que todos los compuestos tienen afinidad de unión y, por lo tanto, son ligandos para por lo menos un SSTRx.

in vivo

Se estudió la farmacocinética y la biodistribución de algunos de los compuestos en modelos de xenoinjerto de ratón para el cáncer humano. Se administraron por vía intravenosa (IV) en la vena lateral de la cola de ratones desnudos portadores de tumores BON1 o H116, cuatro composiciones farmacéuticas de acuerdo con las enseñanzas de la presente, cada una de las cuales comprendía un único compuesto de acuerdo con las enseñanzas de la presente. Los animales se sacrificaron 1, 3, 6 y 24 horas después de la inyección y se extirparon los tejidos tumorales y normales. Se estudió la biodistribución tisular de los compuestos usando técnicas de imagenología de fluorescencia.

Se indujeron tumores sólidos derivados de humanos (BON-1 y HT116) en ratones desnudos mediante inyección subcutánea de una suspensión que contenía $\sim 1,50^5$ células en el área del costado. Los experimentos se iniciaron 7-10 días después de la inyección, cuando el diámetro del tumor era de aproximadamente 5-10 mm.

Los compuestos seleccionados (a una dosis de 1 mg/ml, ~ 200 microlitros/ratón, 10 mg/kg de peso corporal) se administraron por vía intravenosa en la vena lateral de la cola de ratones con tumores.

Se usaron métodos de imagenología de fluorescencia de cuerpo entero, microscopía de fluorescencia de bajo aumento y microscopía de fluorescencia a nivel celular para estudiar la biodistribución tisular de los compuestos. Para estos propósitos, se usaron el microscopio de fluorescencia SZX-12 (Olympus, Japón), el microscopio de fluorescencia invertida IX81 (Olympus, Japón) equipado con cubos de filtro apropiados y una cámara digital a color (DP71, Olympus). Además, se realizó imagenología de fluorescencia de todo el cuerpo mediante el sistema de imagenología WB (Prizmatix, Israel). La imagenología cuantitativa de fluorescencia con resolución espectral se llevó a cabo usando un sistema de imagenología espectral (SI) (SD300, Applied Spectral Imaging, Migdal Ha'Emek, Israel).

Se eligieron los cuatro compuestos Compuesto 1 (86), Compuesto 2 (58), Compuesto 3 (Orn) y Compuesto 4 (Y) para la evaluación de la biodistribución in vivo y la eficiencia de direccionamiento de tumores en 2 modelos animales de tumores humanos. La fluorescencia en tejidos tumorales y normales se estudió mediante técnicas macro- y microscópicas en diferentes momentos después de la administración sistémica de composiciones que incluyen los compuestos.

Las Figuras 7 y 8 muestran los resultados de la evaluación macroscópica típica de la biodistribución de PTR en muestras de tejido ex vivo de ratones portadores de tumores 24 horas después de la administración i.v. de los compuestos. Los 4 compuestos muestran claramente una acumulación selectiva en el tumor BON1, en comparación con los tejidos normales.

La evaluación comparativa de la intensidad de la fluorescencia en muestras de tejido realizada mediante microscopía de fluorescencia reveló que todos los compuestos probados tenían un patrón similar de biodistribución (Figura 9). Por ejemplo, 24 horas después de la administración del Compuesto 4 (Y) se observó fluorescencia máxima en el tumor con disminución de la fluorescencia en el siguiente orden:

tumor>bazo>páncreas>riñón>hígado

La Figura 10 muestra el patrón de biodistribución del Compuesto 3 (Orn) en función del tiempo después de la administración por inyección. Se detectó una señal de fluorescencia máxima en todos los tejidos 6 horas después de la administración del agente. Luego, en los tejidos normales, la fluorescencia disminuyó significativamente

mientras que en el tumor la señal permaneció alta, lo que dio como resultado una proporción de tejido tumoral a tejido normal (TNR) de 5 a 8 veces a las 24 horas después de la inyección. Estos resultados son consistentes con estudios previos in vivo realizados mediante espectroscopia de fibra óptica.

5 A nivel celular, la microscopía de gran aumento reveló una rápida internalización de los compuestos en las células tumorales comenzando 1 hora después de la inyección y duró por lo menos 24 horas (Figuras 11 y 12).

Administración in vivo de composiciones farmacéuticas

10 Se prepararon cinco composiciones farmacéuticas diferentes, cada una disolviendo 1 mg de un ligando de receptores de somatostatina diferente en 1 litro de PBS.

15 Se indujeron tumores sólidos derivados de humanos en 15 ratones desnudos mediante inyección subcutánea de una suspensión que contenía $\sim 510^5$ células de cáncer humano (PANC-1) en el área del costado de los ratones.

2-3 semanas después de la inyección de las células cancerosas, se observó que los ratones desarrollaron tumores sólidos con diámetros de aproximadamente 5-10 mm.

20 Se administraron sistemáticamente 0,3 ml de cada una de las cinco composiciones farmacéuticas a tres de los quince ratones con xenoinjerto mediante inyección en la vena de la cola usando una aguja de 30 G.

25 1 día después de la administración de las composiciones farmacéuticas, ninguno de los ratones mostró ningún comportamiento de efecto inusual, lo que indica que las composiciones administradas que incluyen ligandos de los receptores de somatostatina no fueron tóxicas a la dosis administrada.

Los quince ratones fueron sacrificados y de los cuerpos se recogieron tumores, páncreas, bazo, riñón e hígado.

30 La fluorescencia del tejido recogido se determinó usando el sistema de imagenología de fluorescencia in vivo Maestro™ (Cambridge Research & Instrumentation, Inc., Woburn, MA, USA). La fluorescencia detectada fue atribuible a la fluorescencia de la fracción FITC unida al extremo N-terminal de cada ligando de receptores de somatostatina que había sido internalizado por las células del tejido.

35 Los resultados se presentan en la Tabla 3 donde cada una de las columnas a, b, c, d y e es la media de los resultados obtenidos de tejido de tres ratones a los que se administró la misma composición.

40 Col. a, señal total adquirida de los tumores en unidades de recuentos/seg (media de tres ratones); Col. b, proporción de la señal del tumor dividida por la señal del páncreas (media de tres ratones); Col. c, proporción de la señal del tumor dividida por la señal del bazo (media de tres ratones); Col. d, proporción de la señal del tumor dividida por la señal del riñón (media de tres ratones); y Col. e, proporción de la señal del tumor dividida por la señal del hígado (media de tres ratones). Los guiones (“-”) indican que la señal del tejido sano estaba por debajo del límite inferior de detección del sistema MAESTRO™.

45 **Tabla 3: internalización in vivo de ligandos del receptor de somatostatina**

		a	b	c	d	e
compuesto	código	Tumor [recuento/s]	Tumor / páncreas	Tumor / bazo	Tumor / riñón	Tumor / hígado
1	86	130	150	298	38	-
2	58	80	80	-	-	-
3	Orn	80	29	-	-	-
9	21	290	-	-	-	-
4	Y	380	662	560	25	103

60 A partir de los resultados de la Tabla 3, se observa que en todos los casos, el tejido tumoral emitía una fluorescencia sustancialmente más intensa que el tejido sano, lo que indica que los ligandos de los receptores de somatostatina se internalizaron preferiblemente en células tumorales.

65 El Compuesto 9 tenía la segunda intensidad absoluta más alta en el tejido tumoral, pero era indetectable en los tejidos sanos.

El Compuesto 4 tenía la intensidad absoluta más alta en el tejido tumoral, cuya intensidad era desde 25 veces más alta que en el tejido renal hasta 662 veces más alta que en el tejido pancreático.

5 El Compuesto 1 tenía la tercera intensidad absoluta más alta en tejido tumoral, tal intensidad era indetectable en tejido hepático, y de 38 veces más alta que en tejido renal hasta 298 veces más alta que en tejido esplénico.

10 Los Compuestos 2 y 3 tenían la intensidad absoluta más baja en tejido tumoral, tal intensidad era indetectable en tejido de bazo, riñón e hígado, y 80 veces más alta o 29 más alta que en tejido de páncreas, respectivamente.

Preparación de ligandos de los receptores de somatostatina con nanopartículas

15 Se sintetizaron tres ligandos de los receptores de somatostatina de acuerdo con las enseñanzas de la presente, cada uno de los tres ligandos incluía un residuo de un Compuesto 1, 2, o 3 con una fracción peptídica cíclica que tenía un agente activo fluorescente (FITC-GABA-) unido covalentemente al extremo N-terminal de la fracción peptídica y un agente activo de nanopartículas unido covalentemente a la fracción peptídica cíclica a través del átomo de nitrógeno de un grupo funcional de un residuo de aminoácidos interno de la fracción peptídica cíclica.

20 Las nanopartículas se sintetizaron de acuerdo con el procedimiento descrito en una patente, solicitud de patente y/o artículo científico que describe la nanopartícula.

25 Las nanopartículas sintetizadas se conjugaron con los Compuestos 1, 2 y 3 para elaborar un ligando de receptores de somatostatina de acuerdo con las enseñanzas de la presente. Específicamente, cada nanopartícula se unió covalentemente al Compuesto 1, 2 o 3 a través del átomo de nitrógeno del grupo funcional del residuo de aminoácidos interno (Lys para los Compuestos 1 y 2, Orn para el Compuesto 3) usando la química apropiada.

30 Después de la purificación en HPLC, los ligandos de los receptores de somatostatina resultantes se disolvieron a 1 mg en 1 litro de solución de PBS para elaborar las tres composiciones farmacéuticas

compuesto	código	nanopartícula
1	86	
2	58	
3	Orn	

40 **Tabla 4-A. Ligandos de los receptores de somatostatina sintetizados con nanopartículas**

Administración in vivo de composiciones farmacéuticas que comprenden nanopartículas

45 Se indujeron tumores sólidos derivados de humanos en doce ratones desnudos mediante inyección subcutánea de una suspensión que contenía ~5 x 10⁵ células cancerosas humanas (cuatro con BON1, cuatro con PANC-1, cuatro con HT116) en el área del costado.

50 2-3 semanas después de la inyección de las células cancerosas, se observó que los ratones desarrollaron tumores sólidos con un diámetro de aproximadamente 5-10 mm.

55 Se administraron sistemáticamente 0,3 ml de cada una de las tres composiciones farmacéuticas a tres de los doce ratones con xenoinjerto mediante inyección en la vena de la cola usando una aguja de 30 G, cada uno con un xenoinjerto diferente.

Se administraron 0,1 ml de solución de PBS de la misma manera a los tres ratones restantes (control).

60 1 día después de la administración de las composiciones farmacéuticas, ninguno de los ratones mostró ningún comportamiento de efecto inusual, lo que indica que los ligandos de los receptores de somatostatina administrados no eran tóxicos a la dosis administrada.

Se sacrificaron los ratones. Se extirpó el tejido a examinar y se preparó para examen con microscopio de la manera habitual.

65 El examen con microscopio encontró una acumulación selectiva de los ligandos de los receptores de

5 somatostatina administrados (que incluían tanto la fracción de agente activo de nanopartículas como la fracción de agente activo fluorescente) en los tres tipos de tejido tumoral y células tumorales (BON-1, PANC-1, HT116) con poca o ninguna de tal acumulación en tejido no patológico como el hígado, riñón, páncreas y bazo y pulmón. La proporción de acumulación entre tejidos tumorales y normales fue estadísticamente significativa, lo que indica que los ligandos de los receptores de somatostatina de acuerdo con las enseñanzas de la presente reconocieron selectivamente los receptores de somatostatina expresados por las células tumorales y que los ligandos de los receptores se internalizaron posteriormente juntos con la fracción de nanopartículas.

10 Se aprecia que ciertas características de la invención que, por claridad, se describen en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una única realización. A la inversa, varias características de la invención que, por brevedad, se describen en el contexto de una única realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada o como adecuadas en cualquier otra realización descrita de la invención. Ciertas características descritas en el contexto de varias realizaciones no deben considerarse características esenciales de esas realizaciones, a menos que la realización no funcione sin esos elementos.

15

REIVINDICACIONES

1. Un ligando de receptores de somatostatina, que consiste en: una fracción peptídica o una forma de amida de la misma, dicha fracción peptídica consistiendo en una secuencia de residuos de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

Cys-Phe-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:14);
 Arg-Cys-Phe-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:15);
 DPhe-Arg -Cys-Phe-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:16);
 Cys-Phe-Trp-DTrp-Orn-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:19);
 DPhe-Cys-Phe-Trp-DTrp-Orn-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:20);
 Cys-Tyr-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:23);
 DPhe-Cys-Tyr-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:24);
 Cys-Phe-DTrp-Orn-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:27);
 Arg-Cys-Phe-DTrp-Orn-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:28);
 DPhe-Arg-Cys-Phe-DTrp-Orn-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:29);
 Cys-Tyr-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:32);
 Arg-Cys-Tyr-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:33);
 DPhe-Arg-Cys-Tyr-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:34);
 Cys-Tyr-DTrp-Orn-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:37);
 DPhe-Cys-Tyr-DTrp-Orn-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:38);
 Cys-Arg-Phe-Phe-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:43);
 DPhe-Cys-Arg-Phe-Phe-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:44);
 Cys-Arg-Phe-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:48);
 DPhe-Cys-Arg-Phe-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:49);
 DPhe-HCys-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:51);
 DPhe-DCys-Phe-Trp-DTrp-Lys-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:53);
 Cys-Phe-Trp-DTrp-Aib-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:56);
 DPhe-Cys-Phe-Trp-DTrp-Aib-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:57);
 Cys-Phe-Trp-DTrp-LysAc-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:60);
 DPhe-Cys-Phe-Trp-DTrp-LysAc-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:61);
 DPhe-Cys-Phe-Trp-DTrp-Arg-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:63);
 Cys-Phe-Trp-DTrp-HomoLys-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:66); y
 DPhe-Cys-Phe-Trp-DTrp-HomoLys-Thr-Phe-GlyS2 (SEQ ID NO:67)

en donde GlyS2 es N(CH₂CH₂S-)-CH₂CO-::

y en donde dicha secuencia de residuos de aminoácidos seleccionada se cicla con un enlace azufre-azufre entre dicho átomo de azufre de GlyS2 y un átomo de azufre de una fracción de cisteína, de dicha secuencia de residuos de aminoácidos seleccionada; y opcionalmente por lo menos una fracción de agente activo unida covalentemente con dicha fracción peptídica, o unida indirectamente con el átomo de nitrógeno terminal de un residuo de aminoácidos N-terminal de dicha fracción peptídica a través de un conector;

en donde la fracción de agente activo se selecciona del grupo que consiste en:

una fracción de imagenología, una fracción terapéutica, un colorante, una fracción fluorescente, una toxina, un quelante, una fracción con un átomo metálico, una fracción con un átomo radioactivo, una nanopartícula, un polímero de etilenglicol, fotosensibilizador, un constituyente de liposomas y un constituyente de micelas.

2. El ligando de receptores de somatostatina de la reivindicación 1, en donde dicha por lo menos una fracción de agente activo se une covalentemente directamente a dicha fracción peptídica.

3. El ligando de receptores de somatostatina de la reivindicación 1, que comprende por lo menos un átomo intermedio entre dicha fracción peptídica y dicha fracción de agente activo que funciona como un conector de tal manera que dicha por lo menos una fracción de agente activo se una covalentemente indirectamente a dicha fracción peptídica.

4. El ligando de receptores de somatostatina de la reivindicación 1 o 3 en donde el conector es un aminoácido o GABA.

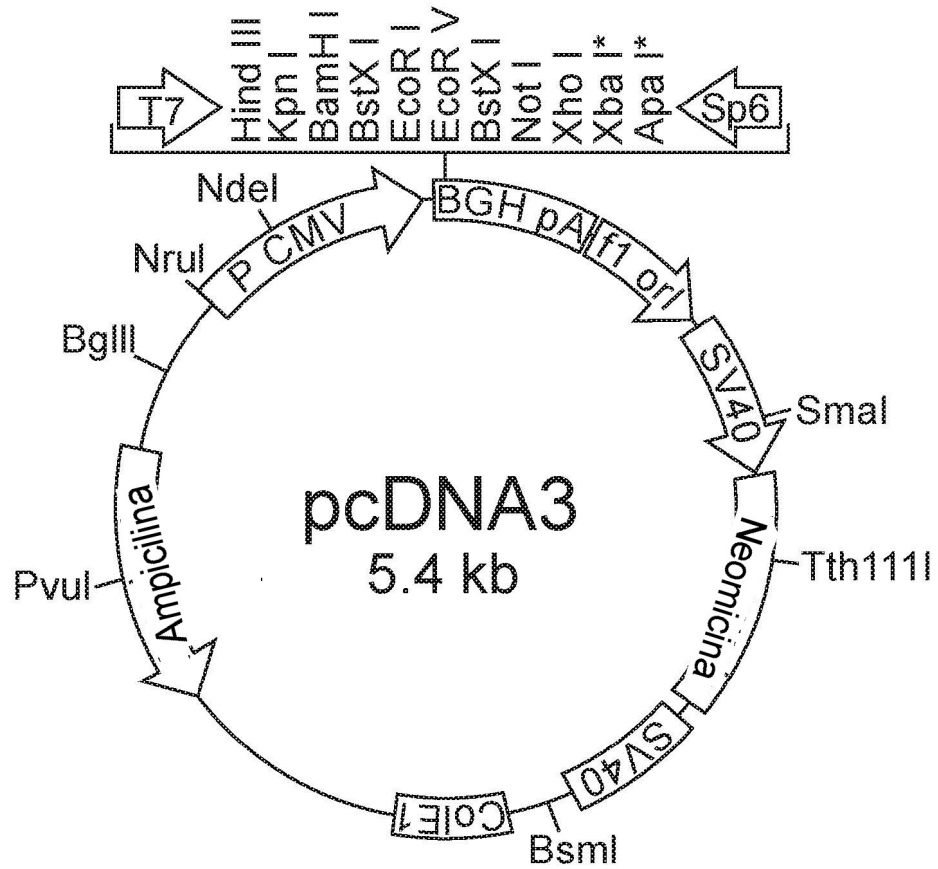
5. El ligando de receptores de somatostatina de la reivindicación 4 en donde el conector es GABA.

6. El ligando de receptores de somatostatina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la fracción de agente activo es una toxina seleccionada del grupo que consiste en actinomicina, camptotecina, doxorubicina y gentamicina.

7. El ligando de receptores de somatostatina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en donde la

fracción de agente activo es un quelante, seleccionado del grupo que consiste en: derivados de DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético), NOTA (ácido 2-(4,7-bis(2-(terc-butoxi)-2-oxoetil)-1,4,7-triazonan-1-il)acético), NODA (ácido 4-(4,7-bis(2-(terc-butoxi))-2-oxoetil)-1,4,7-triazaciclononan-1-il)-5-(terc-butoxi)-5-oxopentanoico) o EDTA (ácido etilendiaminotetraacético).

- 5
8. El ligando de receptores de somatostatina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en donde la fracción de agente activo es una fracción que comprende un átomo metálico que comprende gadolinio o hierro.
- 10
9. El ligando de receptores de somatostatina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en donde la fracción de agente activo es una fracción que comprende un átomo radioactivo, que comprende un átomo seleccionado del grupo que consiste en: yodo-123, yodo-125, yodo-131, flúor-18, carbono-11, carbono-14, tritio, nitrógeno-13, oxígeno-15 y fósforo-32, tecnecio-99m, cromo-51, cobalto-57, cobalto-58, erbio-169, galio-67, galio-68, indio-111, hierro-59, radio-223, rubidio-82, samario-153, selenio-75, estroncio-89, talio-201 e itrio-90.
- 15
10. El ligando de receptores de somatostatina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en donde la fracción de agente activo es un fotosensibilizador seleccionado del grupo que consiste en una fenotiazina, un xanteno y una porfirina.
- 20
11. El ligando de receptores de somatostatina de la reivindicación 3, seleccionado del grupo que consiste en:
- isotiocianato de fluoresceína (FITC)-ácido gamma-aminobutírico (GABA)-D-Phe-Arg -Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-GlyS₂;
- FITC-GABA- D-Phe-Cys-Phe-Trp-D-Trp-Om-Thr-Phe-GlyS₂;
- FITC-GABA- D-Phe-Cys-Tyr-Trp-D-Trp-Lys-Thr-Phe-GlyS₂;
- 25
- FITC-GABA- D-Phe-Arg-Cys-Phe-D-Trp-Orn-Thr-Phe-GlyS₂;
- FITC-GABA- D-Phe-Arg-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Phe-GlyS₂;
- FITC-GABA- D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Phe-GlyS₂;
- FITC-GABA- D-Phe-Cys-Arg-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-GlyS₂
- FITC-GABA- Cys- Arg-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-GlyS₂;
- 30
- FITC-GABA- D-Phe-Cys- Arg-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-GlyS₂;
- FITC-GABA- D-Phe-H-Cys- Phe-Trp-D-Trp-Lys-Thr-Phe-GlyS₂;
- FITC-GABA- D-Phe-D-Cys- Phe-Trp-D-Trp-Lys-Thr-Phe-GlyS₂;
- FITC-GABA- D-Phe-Cys- Phe-Trp-D-Trp-Aib-Thr-Phe-GlyS₂;
- FITC-GABA- D-Phe-Cys- Phe-Trp-D-Trp-LysAc-Thr-Phe-GlyS₂;
- 35
- FITC-GABA- D-Phe-Cys- Phe-Trp-D-Trp-Arg-Thr-Phe-GlyS₂; y
- FITC-GABA- D-Phe-Cys- Phe-Trp-D-Trp-HomoLys-Thr-Phe-GlyS₂
- en donde GlyS₂ es N(CH₂CH₂S-)CH₂CO
- 40
12. Una composición farmacéutica que comprende:
- como ingrediente activo, por lo menos un ligando de receptores de somatostatina de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11; y
- un portador farmacéuticamente aceptable.
- 45
13. El ligando de receptores de somatostatina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso en el tratamiento de un organismo vivo.
- 50
14. Un método para tratar una célula que expresa un receptor de somatostatina que comprende:
- administrar por lo menos un ligando de receptores de somatostatina de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 a una célula que expresa un receptor de somatostatina,
- tratando de este modo la célula,
- en donde dicha célula y dicha administración es *in vitro*.
- 55
15. El método de la reivindicación 14, en donde dicha administración de por lo menos un ligando de receptores de somatostatina es la administración de por lo menos dos ligandos de receptores de somatostatina diferentes.



*Hay una corriente ascendente de ATG del sitio Xbz i

A - 150228

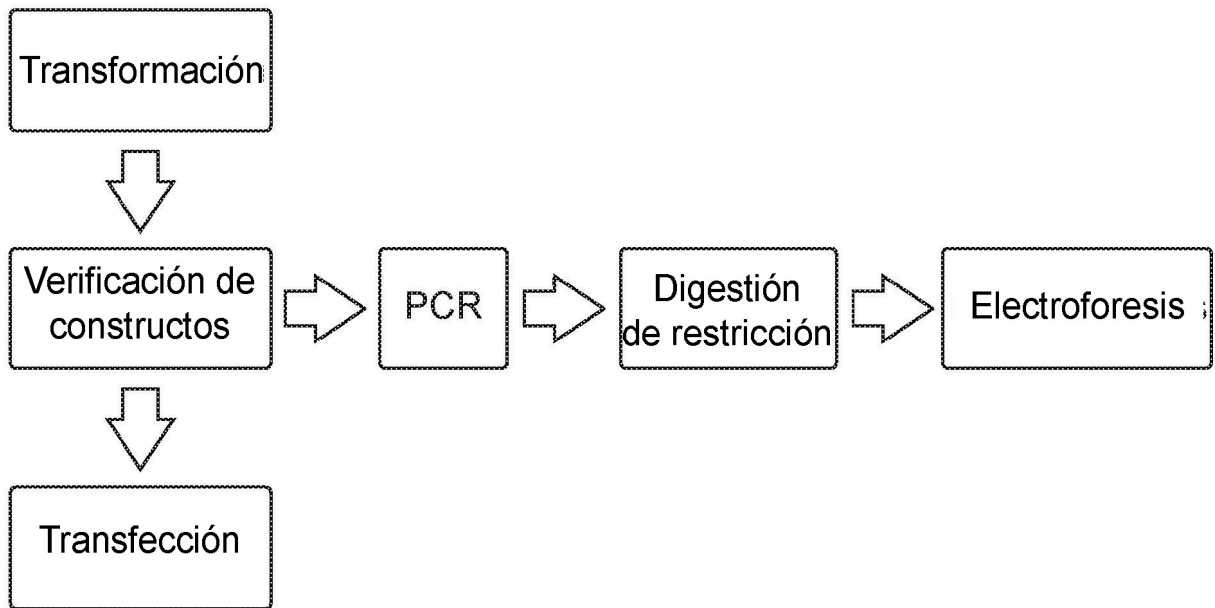


FIG. 1

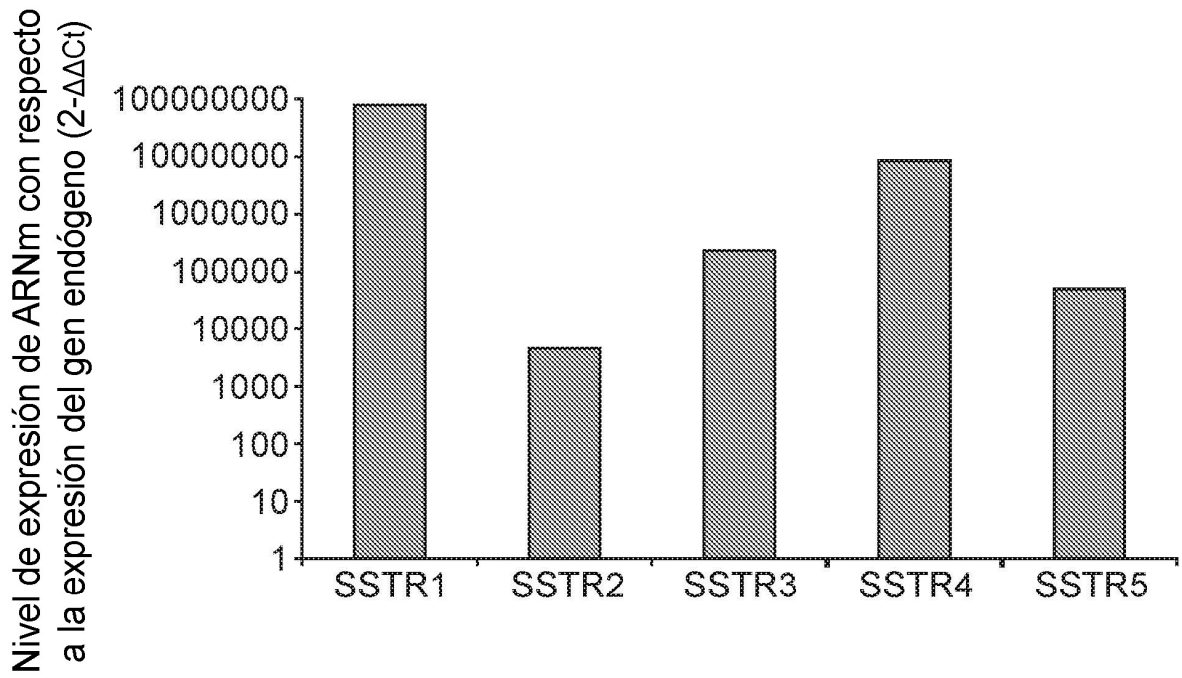


FIG. 2

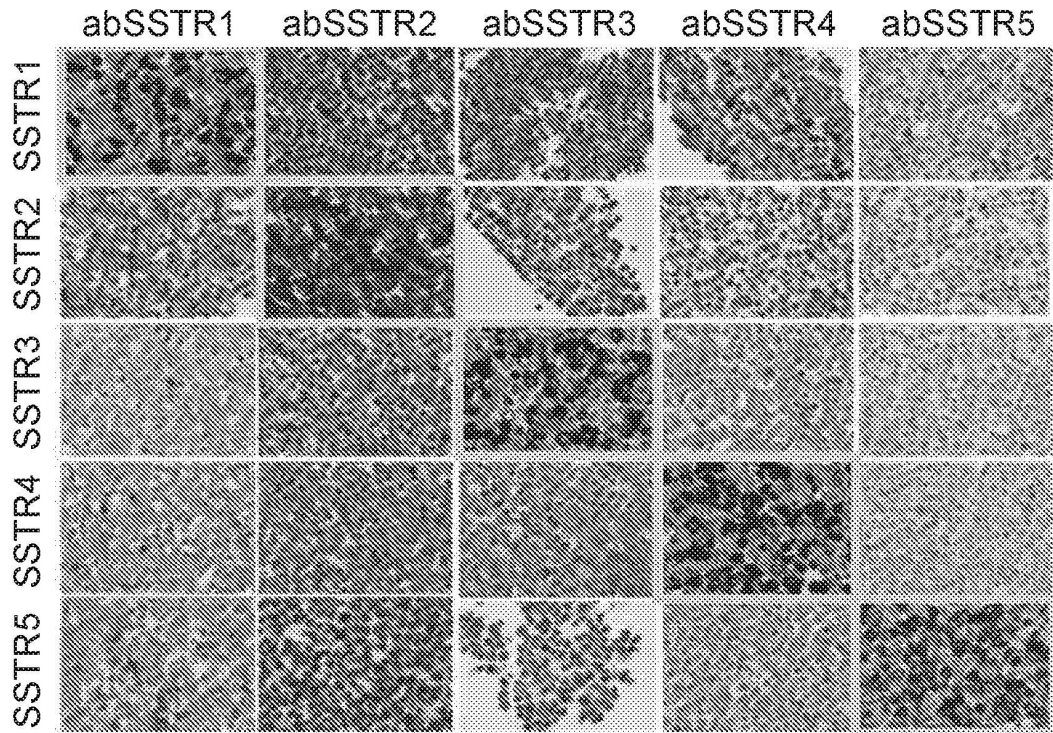


FIG. 3

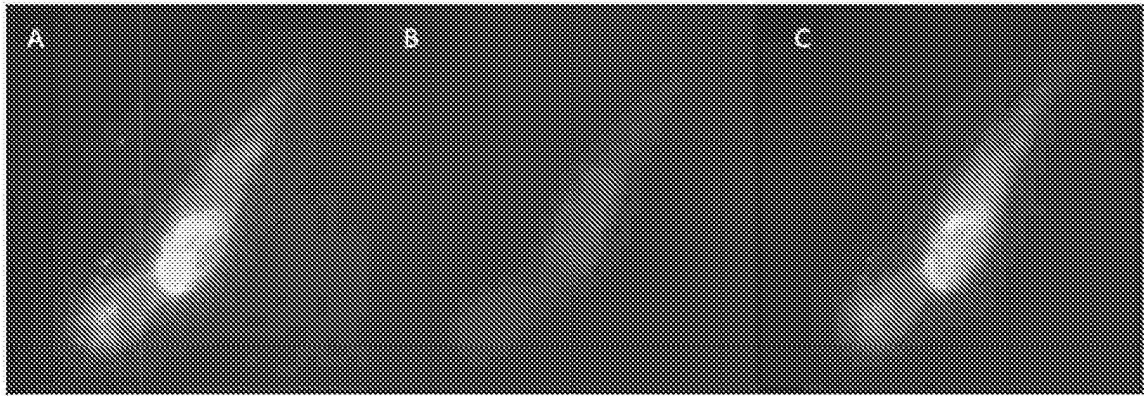


FIG. 4

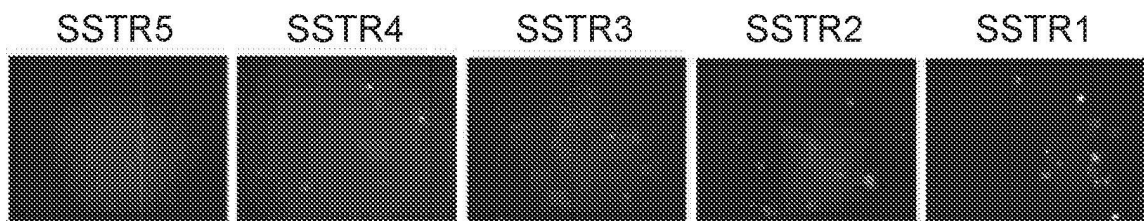


FIG. 5A

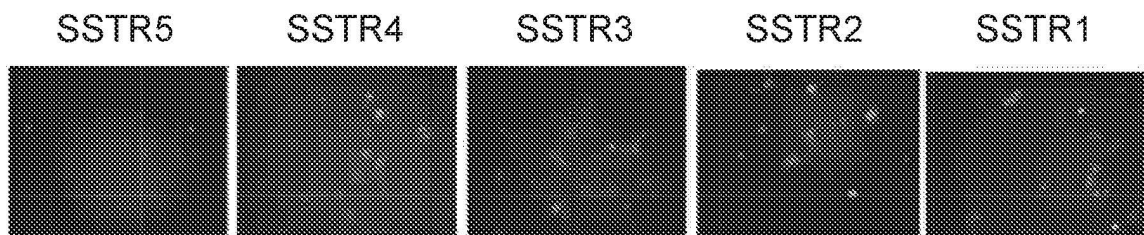


FIG. 5B

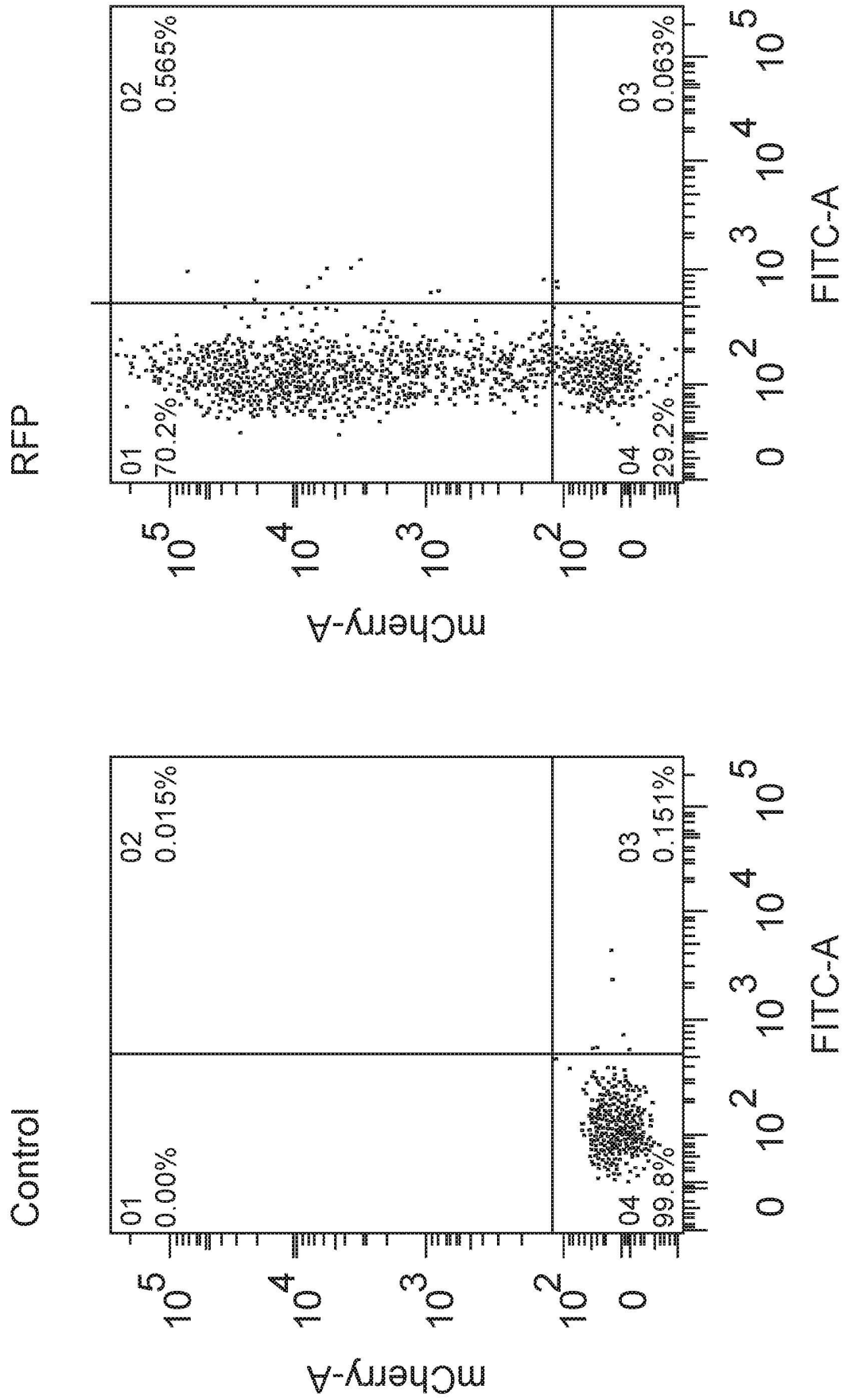


FIG. 6A

FIG. 6B

PTR 86 500nM 1 h+ST-5

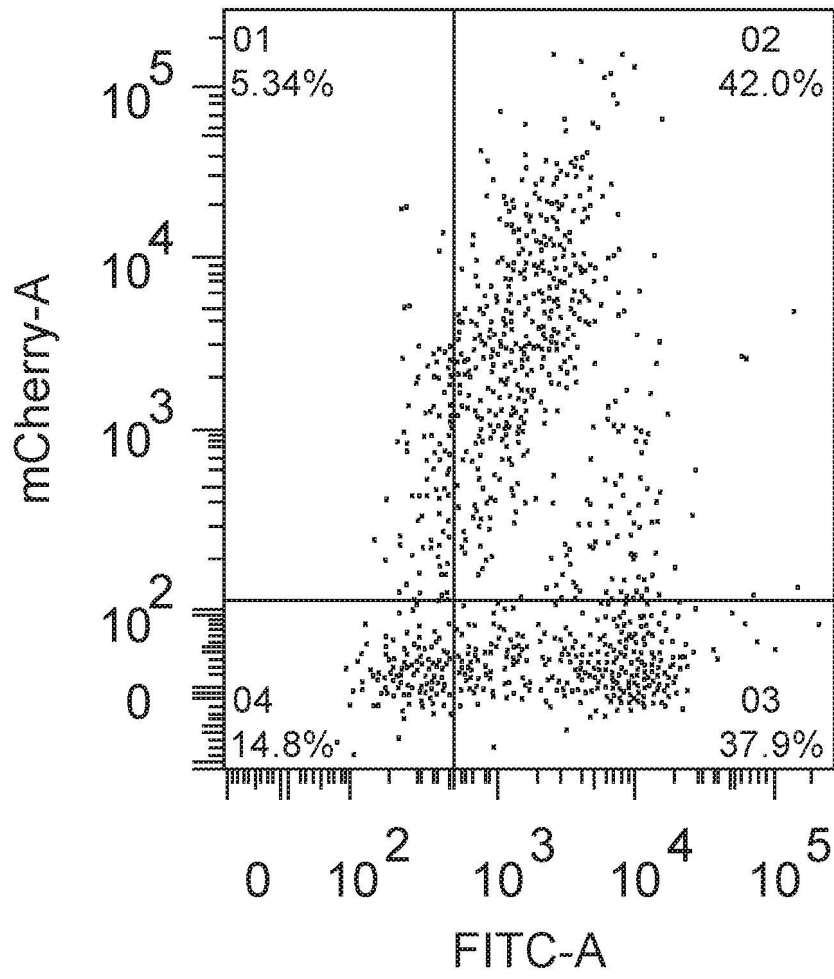


FIG. 6C

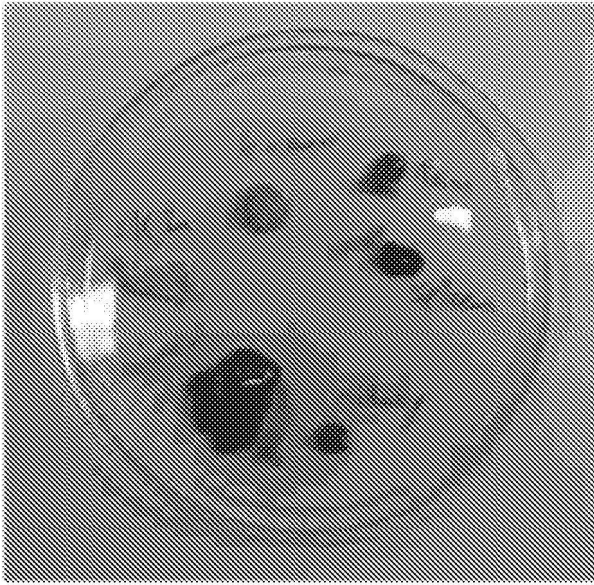


FIG. 7A

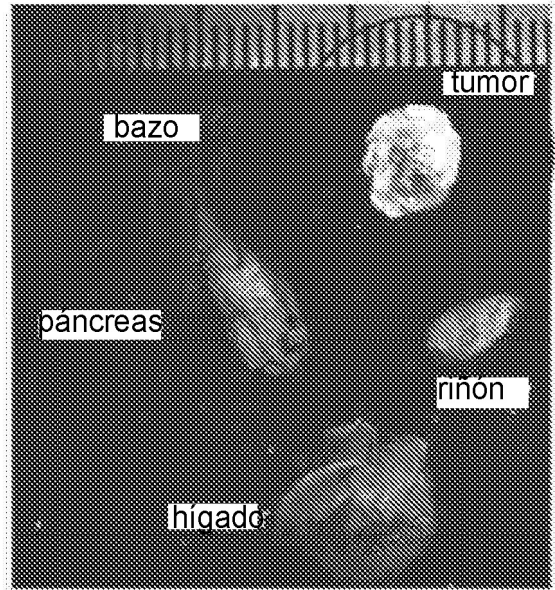


FIG. 7B

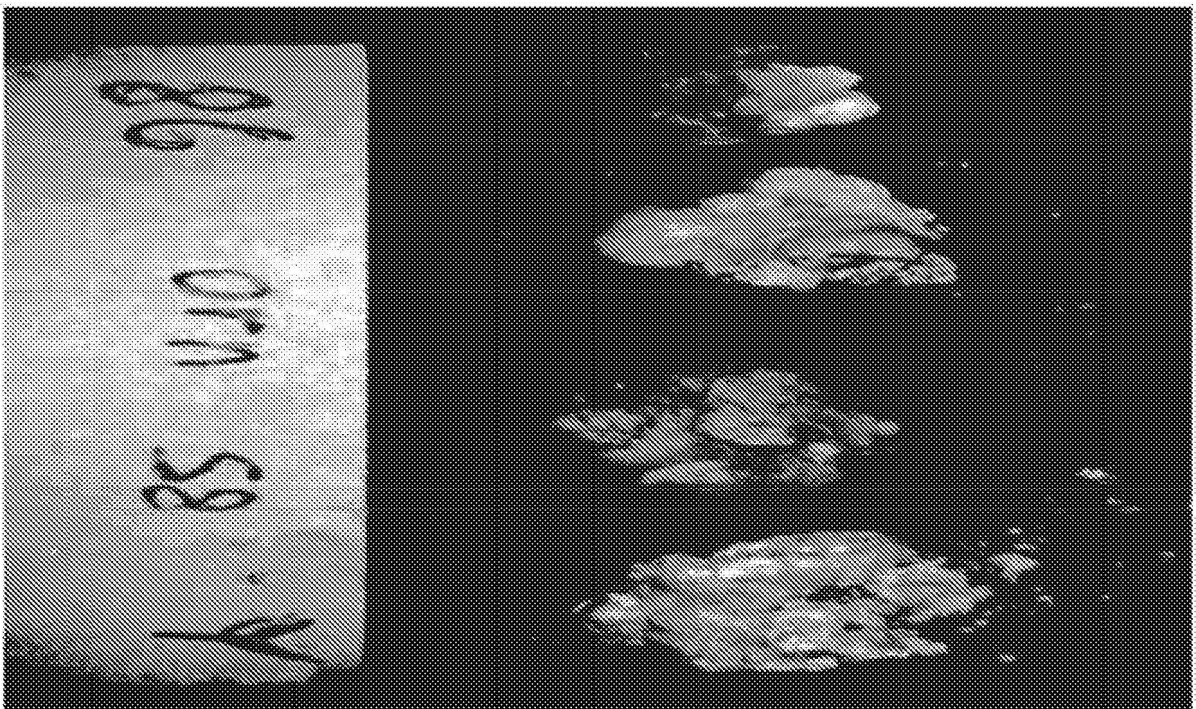


FIG. 8

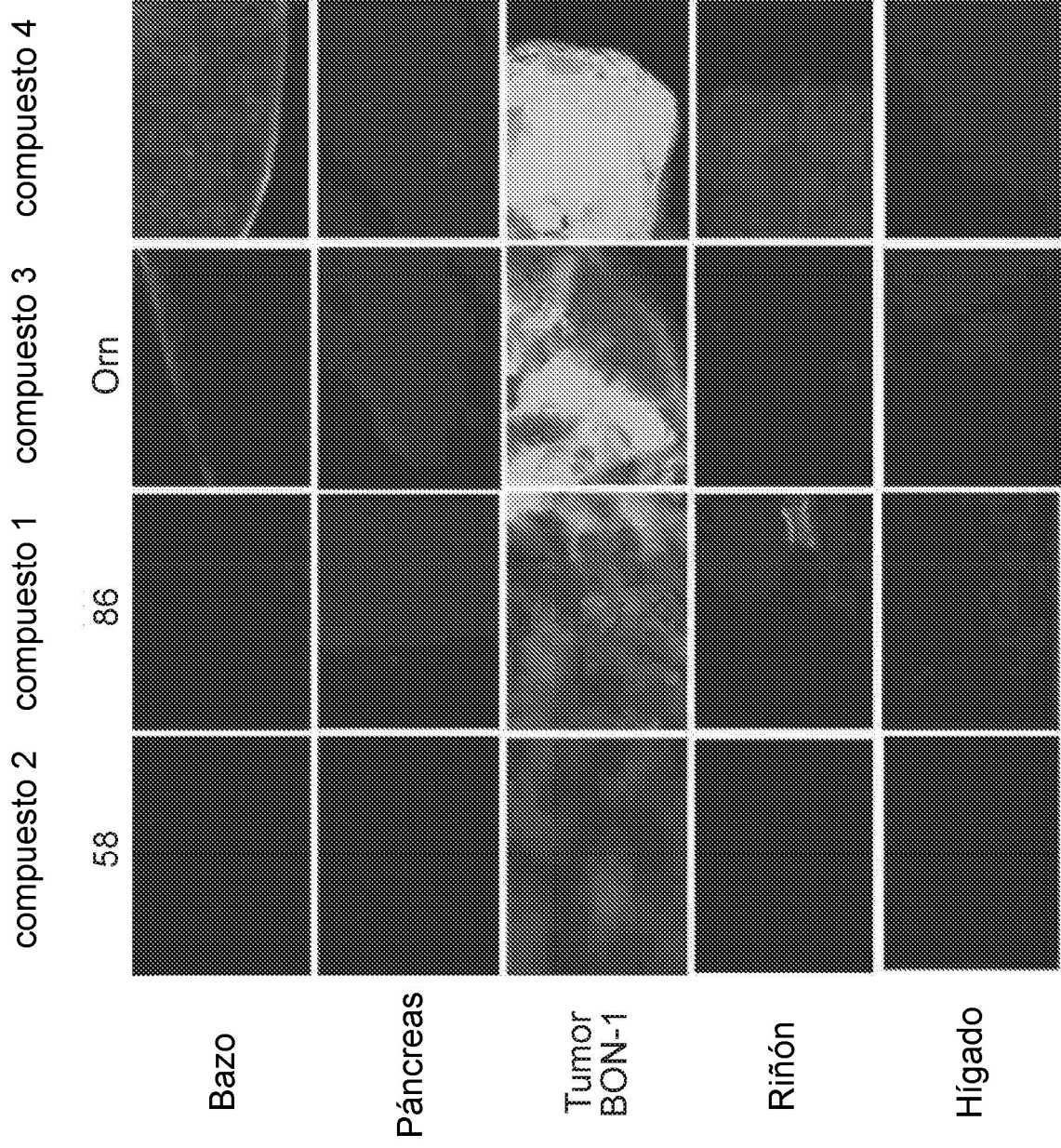


FIG. 9

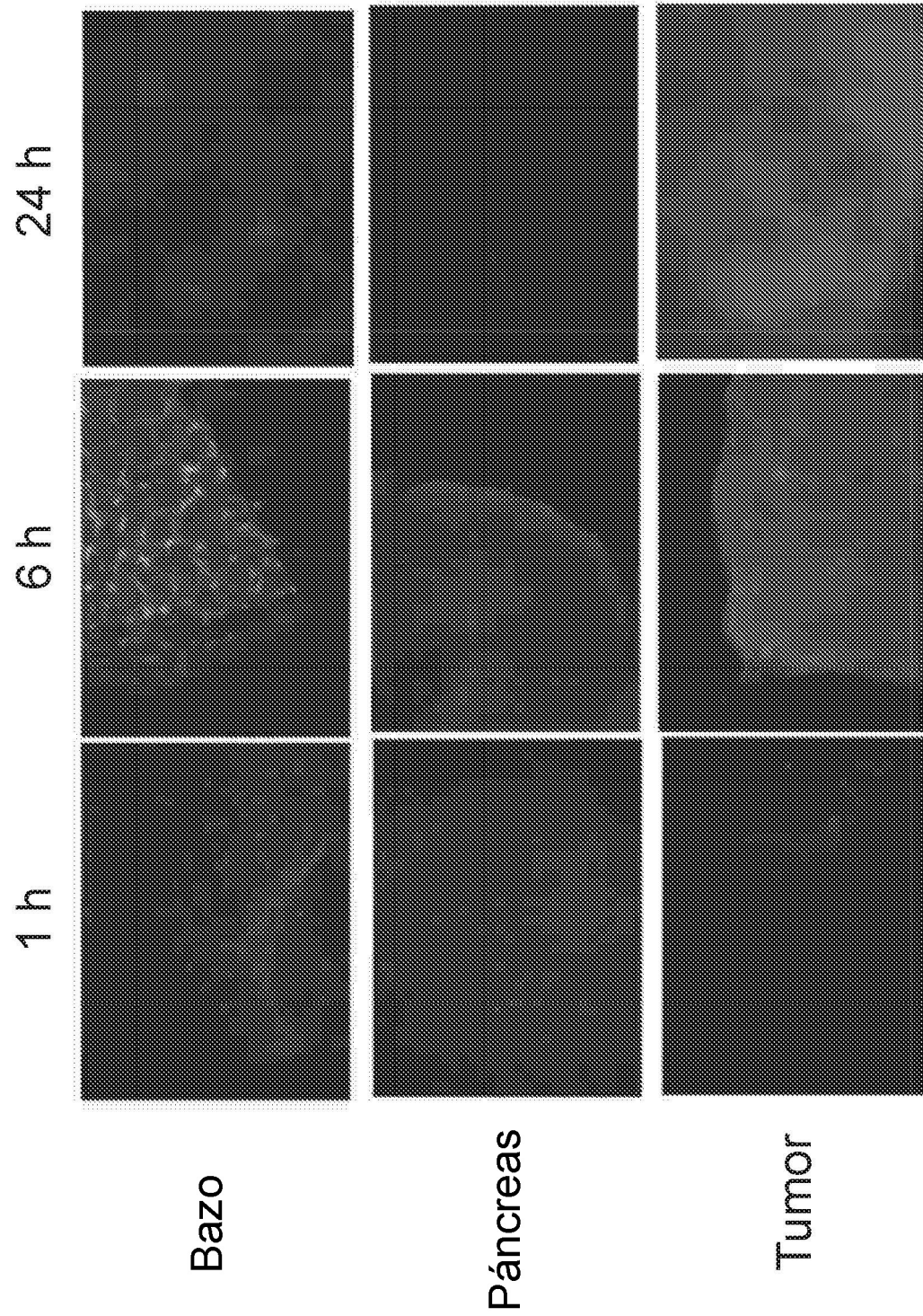


FIG. 10

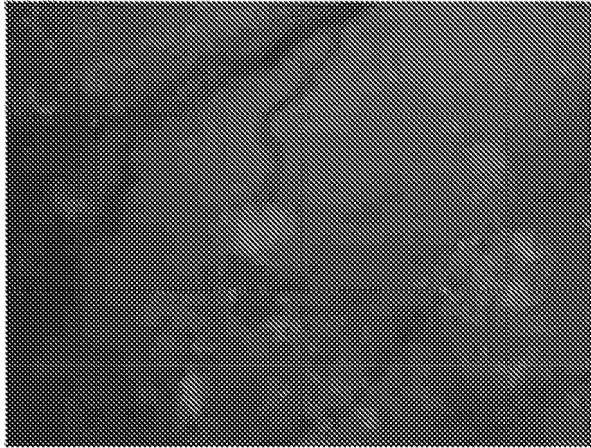


FIG. 11A

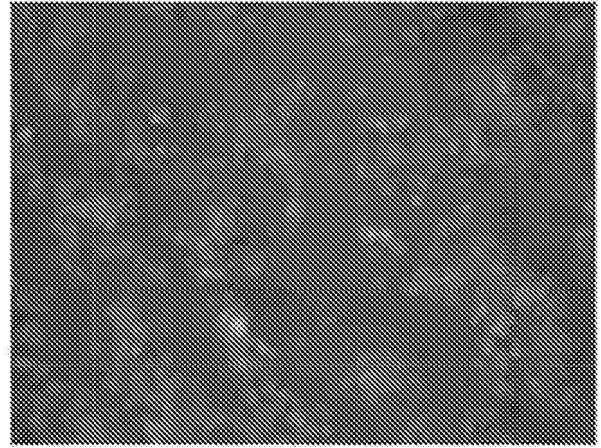


FIG. 11B

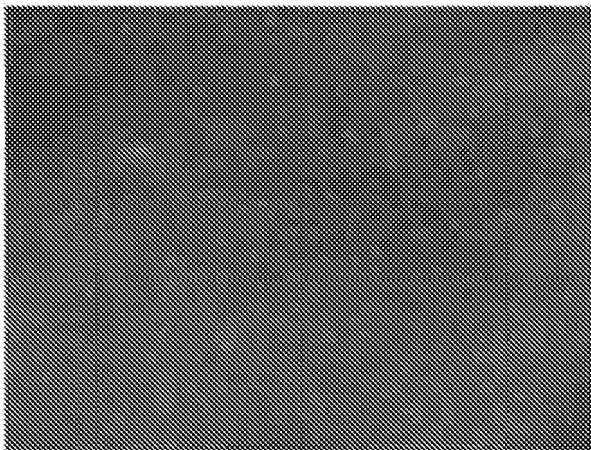


FIG. 12A

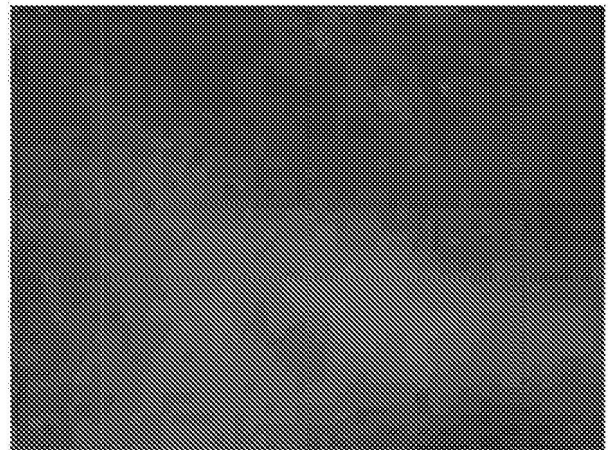


FIG. 12B

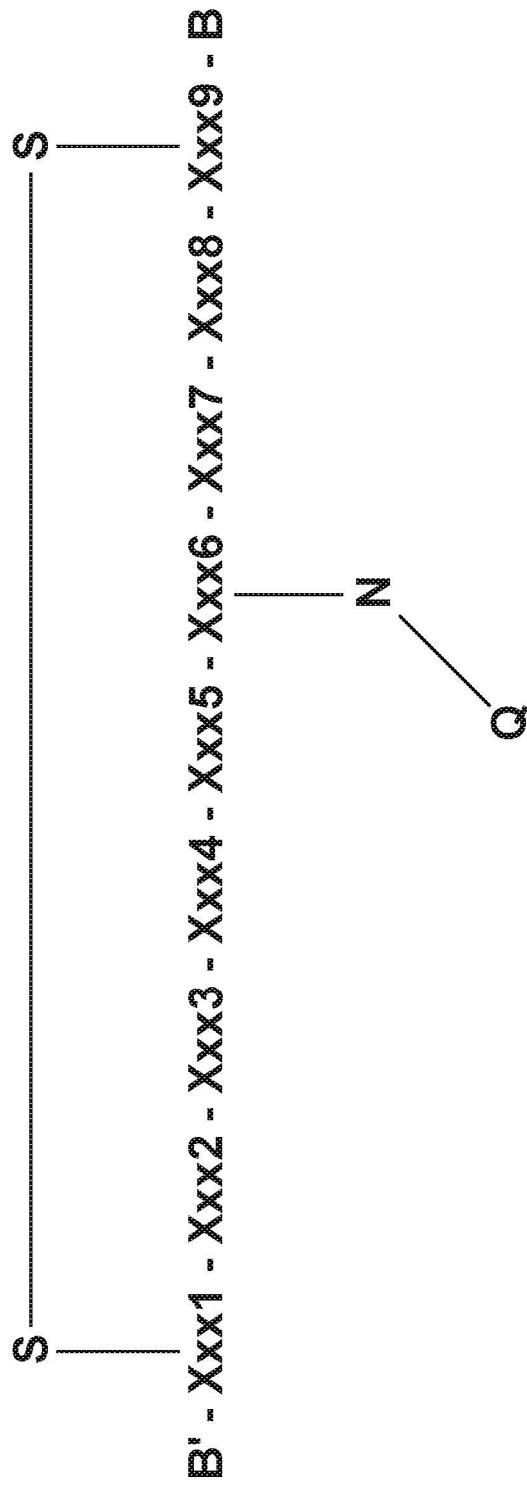


FIGURA 13