



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0910592-1 B1



(22) Data do Depósito: 15/04/2009

(45) Data de Concessão: 19/10/2021

(54) Título: ANTAGONISTA DE RECEPTOR 2 DE SOMATOSTATINA (SSTR2), USO DE UMA COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO O MESMO, KIT E COMPOSTO PARA RADIOIMAGEAMENTO DIAGNÓSTICO E PARA TRATAMENTO DE CÂNCER

(51) Int.Cl.: C07K 14/655; C07K 7/06.

(30) Prioridade Unionista: 16/04/2008 US 12/104,318.

(73) Titular(es): SALK INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STUDIES; UNIVERSITY HOSPITAL BASEL; UNIVERSITÄT BERN.

(72) Inventor(es): JEAN E. F. RIVIER; JUDIT ERCHEGYI; JEAN CLAUDE REUBI; HELMUT R. MAECKE.

(86) Pedido PCT: PCT US2009040672 de 15/04/2009

(87) Publicação PCT: WO 2009/129311 de 22/10/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 18/10/2010

(57) Resumo: ANTAGONISTAS DE RECEPTOR 2 DE SOMATOSTATINA. A presente invenção refere-se a análogos de somatostatina que são antagonistas de receptor do receptor de somatostatina, incluindo antagonistas seletivos de SSTR2. Compostos relacionados, kits e métodos, incluindo antagonistas complexados com ou conjugados aos núclídeos radioativos e usos dos mesmos. Os antagonistas da invenção são úteis no diagnóstico e tratamento de doenças mamíferas neoplásicas e não neoplásicas.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "ANTAGONISTA DE RECEPTOR 2 DE SOMATOSTATINA (SSTR2), USO DE UMA COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO O MESMO, KIT E COMPOSTO PARA RADIOIMAGEAMENTO DIAGNÓSTICO E PARA TRATAMENTO DE CÂNCER".

Pedidos Relacionados

[001] Este é um Pedido de Tratado de Cooperação de Patente (PCT) reivindicando a prioridade para o Pedido US 12/104,318, depositado em 16 de Abril de 2008, que é uma continuação em parte do Pedido PCT nº PCT/US2007/081430 e Pedido US 11/872,367, ambos os quais foram depositados em 15 de Outubro de 2007, os quais reivindicam o benefício do Pedido Provisório US 60/829,637, que foi depositado em 16 de Outubro de 2006. Os teores destes pedidos são incorporados aqui por referência em suas totalidades.

Patrocínio do Governo

[002] O que é descrito aqui foi sustentado sob a concessão nº DK-59953 concedidos pelos Institutos Nacionais de Saúde. O governo pode ter certos direitos nesta invenção.

Antecedentes da Invenção

[003] O tetradecapeptídeo cíclico somatostatina-14 (SRIF) foi originalmente isolado do hipotálamo e caracterizado como um inibidor fisiológico de liberação de hormônio de crescimento (GH) da pituitária anterior. Este tetradecapeptídeo tem uma ligação ponte ou de ciclização entre os grupos sulfidrila dos dois resíduos de aminoácido de cisteinila nas posições 3 e 14. Os análogos relacionados com SRIF e SRIF afetam os processos celulares múltiplos, especificamente aqueles relacionados com a liberação de GH, e também inibem o desenvolvimento de certos tumores. O análogo [D-Trp8]-SRIF, por exemplo, tem a sequência de aminoácido: (ciclo 3 14) H-Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys-OH, e tem uma potência

muito maior para inibir a liberação de GH do que SRIF.

[004] SRIF induz seus efeitos biológicos interagindo com uma família de receptores estruturalmente similares ligados à membrana. Cinco receptores de SRIF foram clonados e são referidos como SSTR 1-5. Todos os cinco receptores ligam SRIF e o peptídeo de SRIF de aminoácido 28, SRIF-28 (de trato gastrointestinal porcino e hipotálamo porcino e ovino), com afinidade elevada. Os agonistas e antagonistas para os vários SSTR's foram identificados.

[005] Os peptídeos de somatostatina e análogos podem ser modificados considerando a ligação seletiva de SSTRs individuais. Tais peptídeos e análogos são úteis, por exemplo, na diferenciação das funções de sinalização individuais dos receptores individuais. O uso de peptídeos e análogos específicos de receptor induziu à noção que diferentes subtipos de receptor mediam as funções distintas de SRIF no corpo.

[006] Os agonistas para SSTR2 e SSTR5, por exemplo, foram identificados e usados para revelar funções distintas destes receptores. Estes dois receptores são acreditados ser os subtipos predominantes nos tecidos periféricos. SSTR2 é acreditado mediar a inibição de hormônio de crescimento, glucagon e secreção de ácido gástrico. Octreotida, um agonista, mostra alguma especificidade em relação ao SSTR2. SSTR5, pelo contrário, parece estar primeiramente envolvido no controle de liberação de amilase e insulina. Os análogos foram descritos ter especificidade em relação ao SSTR2 e SSTR5, respectivamente.

[007] SSTR3 media a inibição de contração de músculo liso gástrico. Os análogos de somatostatina que se ligam especificamente ao SSTR3 são conhecidos.

[008] SSTR4 é encontrado na pituitária, pulmões, trato GI, rins e certos tumores para a exclusão substancial dos outros receptores de

SRIF. Ele é acreditado ser ativado na ligação por SRIF. Os ligantes específicos de SSTR4 e SSTR1 foram usados, por exemplo, nos métodos para o tratamento de células endoteliais. Os análogos de peptídeo de somatostatina seletivos de receptor que são específicos em relação ao SSTR4 são conhecidos na técnica. Os receptores de somatostatina são expressos nos estados patológicos, particularmente nos tumores neuroendócrinos do trato gastrointestinal. A maioria dos tumores humanos originando do tecido alvo de somatostatina tem conservado os receptores de somatostatina. O efeito de sinalização de somatostatina foi primeiro observado em adenomas produtores de hormônio de crescimento e adenomas produtores de TSH; cerca da metade dos adenomas inativos endócrinos exibe receptores de somatostatina. Noventa por cento dos carcinoides e uma maioria de carcinomas de célula de ilhota, incluindo sua metástase, usualmente tem uma densidade elevada de receptores de somatostatina. Entretanto, apenas 10 por cento de carcinomas colorretais e nenhum dos carcinomas pancreáticos exócrinos contêm receptores de somatostatina. Os receptores de somatostatina em tumores podem ser, por exemplo, usando métodos de ligação in vitro ou usando técnicas de imageamento in vivo; o último permite a localização precisa dos tumores e sua metástase nos pacientes. Por que os receptores de somatostatina em tumores gastroenteropancreáticos são funcionais, sua identificação pode ser usada para avaliar a eficácia terapêutica de um análogo para inibir a liberação de hormônio excessiva nos pacientes.

[009] Considerando seu uso como alvos diagnósticos e terapêuticos, existe uma necessidade de antagonistas de peptídeo de somatostatina que se ligam fortemente a SSTR2, enquanto ao mesmo tempo mostrando apenas uma propensão mínima para ligação aos outros quatro receptores. Para uso como agentes de imageamento diagnóstico, tais antagonistas teriam uma vantagem sobre os agonistas seleti-

vos de SSTR2 em que os antagonistas preferivelmente não seriam internalizados.

Sumário

[010] A presente invenção se refere a composições relacionadas com os novos antagonistas específicos de SSTR2 e métodos para uso dos antagonistas descritos.

[011] Uma modalidade está direcionada a um antagonista de somatostatina que se liga à SSTR2 selecionado do grupo que consiste em: (i) DOTA-pNO₂Phe-c[DCys-Tyr- DTrp-Lys-Thr-Cys]-DTyr-NH₂; (ii) H₂N-pNO₂Phe-c[DCys-Tyr- DAph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂; (iii) H₂N-pNO₂Phe-c[DCys-Aph(Hor)-DAph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂; (iv) H₂N-Cpa-c[DCys -L-Agl(NMe.benzoil)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂; (v) H₂N-Cpa-c[DCys -D-Agl(NMe.benzoil)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal- NH₂; (vi) H₂N-Cpa-c[DCys -Leu-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal- NH₂; (vii) H₂N-Cpa-c[DCys -Aph(Cbm)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂; (viii) Cbm-Cpa-c[DCys -Aph(Cbm)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂; (ix) DO-TA-βAla-Cpa-c[DCys -Aph(Cbm)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂; (x) DOTA-Peg-Cpa-c[DCys -Aph(Cbm)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂; (xi) H₂N-Cpa-c[DCys -Aph(Cbm)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-NH₂; (xii) H₂N-Cpa-c[DCys -Aph(Cbm)-DTrp-Lys-Thr-Cys]- Cha-NH₂; (xiii) H₂N-Cpa-c[DCys -Aph(Cbm)-DTrp-Lys-Thr-Cys]- Aph(Hor)- NH₂; (xiv) H₂N-Cpa-c[DCys -Aph(Cbm)-DTrp-Lys-Thr-Cys]- DAph(Cbm)- NH₂; (xv) H₂N-Cpa-c[DCys -Aph(Cbm)-DTrp-Lys-Thr-Cys]- Aph(Cbm)- NH₂; (xvi) H₂N-Cpa-c[DCys -Aph(Cbm)-DTrp-Lys-Thr-Cys]- DAph(Cbm)-GlyOH; (xvii) H₂N-Cpa-c[DCys -Aph(CONH-OCH₃)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂; (xviii) H₂N-Cpa-c[DCys -Aph(CONH-OH)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂; (xix) H₂N-Cpa-c[DCys -Aph(Cbm)-5F-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂; (xx) H₂N-Cpa-c[DCys -Aph(Cbm)-5F-Trp-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂; (xxi) H₂N-Cpa-c[DCys -Tyr-DAph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂; (xxii) H₂N-Cpa-c[DCys -Aph(Hor)-DAph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]-

2Nal-NH₂; (xxiii) Ac-pNO₂Phe-c[DCys-Tyr- DTrp-Lys-Thr-Cys]-DTyr-NH₂; (xxiv) H₂N-Cpa-c[DCys-Tyr-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal- NH₂; (xxv) H₂N-Cpa-c[DCys -Tyr-DTrp-NMeLys-Thr-Cys]-2Nal- NH₂; (xxvi) DO-TA-Cpa-c[DCys-Aph(Hor)-DAph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]-DTyr-NH₂; (xxvii) DOTA-Cpa-c[DCys-Tyr-DAph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]-DTyr-NH₂; e (xxviii) DOTA-Cpa-[DCys-Pal-DAph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]DTyr-NH₂. Em uma modalidade particular, o antagonista não está significativamente internalizado nas células expressando SSTR₂, e reduz a internalização induzida por octreotida de SSTR₂. Em uma modalidade particular, o antagonista de somatostatina também compreende um quelante, um agente de complexação, um agente de conjugação ou um marcador. Em uma modalidade particular, o antagonista é preferivelmente captado por tumores relativo a outro tecido. Em uma modalidade particular, o antagonista é preferivelmente captado por tumores relativo a outro tecido. Em uma modalidade particular, a relação de captação de antagonista em células de tumor para captação de antagonista em células de rim é de pelo menos cerca de 2,0, avaliada 4 horas após a administração.

[012] Uma modalidade está direcionada a um método de radiomagem de câncer, que compreende: (a) administração de uma composição que compreende: um antagonista de somatostatina, e um radionuclídeo; e (b) detecção do radionuclídeo, em que o antagonista de somatostatina é selecionado do grupo que consiste em: (i) DOTA-pNO₂Phe-c[DCys-Tyr- DTrp-Lys-Thr-Cys]-DTyr-NH₂; (ii) H₂N-pNO₂Phe-c[DCys-Tyr- DAph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂; (iii) H₂N-pNO₂Phe-c[DCys-Aph(Hor)-DAph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂; (iv) H₂N-Cpa-c[DCys -L-Agl(NMe.benzoil)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal- NH₂; (v) H₂N-Cpa-c[DCys -D-Agl(NMe.benzoil)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂; (vi) H₂N-Cpa-c[DCys -Leu-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal- NH₂; (vii) H₂N-Cpa-c[DCys -Aph(Cbm)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂; (viii) Cbm-

Cpa-c[DCys -Aph(Cbm)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂; (ix) DOTA-βAla-Cpa-c[DCys -Aph(Cbm)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂; (x) DOTA-Peg-Cpa-c[DCys -Aph(Cbm)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂; (xi) H₂N-Cpa-c[DCys -Aph(Cbm)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-NH₂; (xii) H₂N-Cpa-c[DCys -Aph(Cbm)-DTrp-Lys-Thr-Cys]- Cha-NH₂; (xiii) H₂N-Cpa-c[DCys -Aph(Cbm)-DTrp-Lys-Thr-Cys]- Aph(Hor)- NH₂; (xiv) H₂N-Cpa-c[DCys -Aph(Cbm)-DTrp-Lys-Thr-Cys]- DAph(Cbm)- NH₂; (xv) H₂N-Cpa-c[DCys -Aph(Cbm)-DTrp-Lys-Thr-Cys]- Aph(Cbm)- NH₂; (xvi) H₂N-Cpa-c[DCys -Aph(Cbm)-DTrp-Lys-Thr-Cys]- DAph(Cbm)-GlyOH; (xvii) H₂N-Cpa-c[DCys -Aph(CONH-OCH₃)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂; (xviii) H₂N-Cpa-c[DCys-Aph(CONH-OH)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂; (xix) H₂N-Cpa-c[DCys -Aph(Cbm)-5F-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂; (xx) H₂N-Cpa-c[DCys -Aph(Cbm)-5F-Trp-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂; (xxi) H₂N-Cpa-c[DCys -Tyr-DAph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂; (xxii) H₂N-Cpa-c[DCys -Aph(Hor)-DAph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂; (xxiii) Ac-pNO₂Phe-c[DCys-Tyr- DTrp-Lys-Thr-Cys]-DTyr- NH₂; (xxiv) H₂N-Cpa-c[DCys-Tyr-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal- NH₂; (xxv) H₂N-Cpa-c[DCys -Tyr-DTrp-NMeLys-Thr-Cys]-2Nal- NH₂; (xxvi) DOTA-Cpa-c[DCys-Aph(Hor)-DAph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]-DTyr-NH₂; (xxvii) DOTA-Cpa-c[DCys-Tyr-DAph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]-DTyr-NH₂; e (xxviii) DOTA-Cpa-[DCys-Pal-DAph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]DTyr-NH₂. Em uma modalidade particular, o antagonista de somatostatina liga-se a SSTR2. Em uma modalidade particular, o antagonista de somatostatina seletivamente liga-se a SSTR2.

[013] Uma modalidade está direcionada ao uso de uma composição para a fabricação de um medicamento para o tratamento de um tumor, em que a composição compreende um antagonista de somatostatina descrito aqui e um radionuclídeo. Em uma modalidade particular, o antagonista de somatostatina seletivamente liga-se a SSTR2.

[014] Uma modalidade está direcionada a um kit para o radioi-

mageamento diagnóstico de câncer, que compreende: (a) um antagonista de somatostatina como descrito aqui em um recipiente adequado, em que o antagonista de somatostatina é: (i) marcado com pelo menos um radionuclídeo; (ii) não marcado e fornecido com pelo menos um radionuclídeo em um recipiente adequado para rotulagem; ou (iii) não marcado e capaz de ser subsequentemente marcado com pelo menos um radionuclídeo; e (b) instruções para uso. Em uma modalidade particular, o antagonista de somatostatina seletivamente liga-se a SSTR2.

[015] Uma modalidade está direcionada a um kit para o tratamento de câncer, que compreende (a) um antagonista de somatostatina como descrito aqui em um recipiente adequado, em que, na rotulagem de radionuclídeo do antagonista de somatostatina, o antagonista está presente em uma quantidade terapeuticamente eficaz para o tratamento de câncer, e em que o antagonista de somatostatina é: (i) marcado com pelo menos um radionuclídeo, (ii) não marcado, e fornecido com pelo menos um radionuclídeo em um recipiente adequado para rotulagem, ou (iii) não marcado, e capaz de ser subsequentemente marcado com pelo menos um radionuclídeo; e (b) instruções para uso. Em uma modalidade particular, o antagonista de somatostatina seletivamente liga-se a SSTR2.

[016] Uma modalidade está direcionada a um composto para radioimageamento ou tratamento de câncer que compreende uma quantidade eficaz de um radionuclídeo acoplado a um antagonista de somatostatina como descrito aqui. Em uma modalidade particular, o antagonista seletivamente liga-se a SSTR2, não está significativamente internalizado nas células expressando SSTR2, e reduz a internalização induzida por octreotida de SSTR2.

Breve Descrição dos Desenhos

[017] A figura 1 ilustra as propriedades antagonísticas de alguns

dos antagonistas de sst2 usando um ensaio de liberação de cálcio.

[018] A figura 2 ilustra que, embora o agonista de controle [Tyr3]-octreotida possa induzir a internalização de sst2, os antagonistas seletivos de sst2 testados não têm nenhum efeito quando administrados sozinhos, mesmo em uma concentração de 10 μ M. Além disso, eles previnem a internalização de sst2 induzida por [Tyr3]-octreotida.

[019] A figura 3 mostra as propriedades antagonísticas de outro análogo (32) em um ensaio de internalização ELISA.

[020] A figura 4 é uma tabela mostrando pureza de antagonista e eficácia de internalização.

[021] A figura 5 é uma tabela mostrando as propriedades de ligação de antagonistas.

[022] As figuras 6A e 6B mostram os dados mostrando a captação de análogos de SSTR2 como descrito no exemplo 11.

Descrição Detalhada

[023] Como usado aqui "um" ou "uma" significa um ou mais, a menos que especificamente indicado significar apenas um.

[024] "Administração", como usado aqui, abrange todos os meios adequados de fornecer uma substância a um paciente. Rotinas comuns incluem orais, sublinguais, transmucosais, transdérmicas, retais, vaginais, subcutâneas, intramusculares, intravenosas, intra-arteriais, intratecais, por meio de cateter, por meio de implante, etc. Em algumas modalidades, uma composição é administrada próximo ou diretamente ao tumor, tal como por injeção direta no tumor ou injeção no sangue tal como quando o tumor é um tumor do sangue.

[025] "Paciente" como usado aqui inclui qualquer animal vertebrado, incluindo espécies equinas, ovinas, caprinas, bovinas, porcinas, aviárias, caninas, felinas e primatas. Um paciente pode ser, por exemplo, humano. Uma pessoa versada na técnica reconhecerá que moléculas coestimuladoras imunes, moléculas de sinalização, marcadores

de célula, tipos de célula, agentes infecciosos particulares etc., descritos com referência a uma espécie, podem ter análogos correspondentes em diferentes espécies, e seus usos em espécies correspondentes e relacionadas, são abrangidos pela presente invenção.

[026] "Tumor" como usado aqui inclui tumores sólidos e não sólidos; e diferentes estágios de desenvolvimento de tumor a partir de lesões cancerosas e tumores benignos, a tumores cancerosos, malignos e metastáticos.

[027] Como usado aqui, tal como no contexto de antagonistas de SSTR2, "captação" se refere à quantidade de antagonista encontrada associada com um tumor; e é distinguido de "internalização", que se refere às ações no nível de células individuais, tal como a capacidade de uma molécula entrar no ambiente intracelular. Desse modo, várias modalidades da invenção têm captação elevada, porém não são internalizados.

[028] Como usado aqui, todas as temperaturas são °C, e todas as relações são por volume. As porcentagens de materiais líquidos são também por volume.

[029] O termo "se liga seletivamente a" ou "ligação seletiva" aqui se refere a ligação preferencial de um antagonista a um parceiro de ligação particular, por exemplo, um antagonista que seletivamente se liga à SSTR2 fortemente, ao mesmo tempo que exibindo fraca ou nenhuma ligação a outros SSTRs ou parceiros de ligação. Tipicamente, um antagonista "seletivo" liga-se cerca de 10 vezes, cerca de 100 vezes ou cerca de 1000 vezes (ou mais) mais fortemente ao receptor seletivo do que a outros receptores.

[030] A presente invenção está relacionada à constatação inesperada de que modificações particulares são eficazes para criar os análogos de peptídeo de SRIF que são seletivos em relação ao SSTR2 em comparação com os outros receptores clonados de SRIF.

Verificou-se uma classe de análogos de peptídeo de somatostatina que é SSTR2 altamente seletivo. Estes análogos de peptídeo são antagonistas de somatostatina, e, embora não internalizados em células tendo receptores de SSTR2, estes análogos são captados em quantidades maiores do que agonistas de peptídeo de somatostatina de receptor seletivo comparável. Estes peptídeos ligam-se seletivamente a SSTR2 clonado sem ativar o receptor, e estes análogos de peptídeo, quando iodados ou de outro modo radiomarcados, retêm suas propriedades biológicas desejáveis. Desse modo, estes novos peptídeos são úteis para determinar a localização de tecido e expressão celular do SSTR2 receptor, bem como para regular certas funções farmacológicas sem certos efeitos colaterais acompanhantes até agora característicos da administração de SRIF. Estes antagonistas de peptídeo de SRIF, quando radiomarcados, podem ser usados, por exemplo, na cintilografia para localizar tumores expressando estes receptores, in vitro ou in vivo, usando SPECT ou PET. Os marcadores diferentes dos radiomarcadores são conhecidos na técnica, por exemplo, marcadores fluorescentes, e podem alternativamente ser usados. Em que os análogos de peptídeos incluem um radionucleotídeo quelado apropriado, estes análogos podem servir como radiofarmacêuticos que são adequados para terapia de radionucleotídeo no tratamento de tumores.

[031] Os antagonistas de peptídeo de SRIF são fornecidos tendo uma afinidade seletiva em relação ao SSTR2 receptor de SRIF; eles preferivelmente também têm uma afinidade elevada em relação ao SSTR2, por exemplo, igual a um KD de cerca de 10 nm ou menos. Estes peptídeos abrangem análogos cíclicos reduzidos de SRIF, em que a porção de anel é reduzida para apenas seis resíduos, e em que existe um resíduo no N-terminal e preferivelmente um resíduo é também adicionado no C-terminal. Em outras palavras, os resíduos de posição 1-, 4-, 5-, 6-, 11-, 12- e 13 são deletados do SRIF do resíduo 14 nativo,

criando vários heptapeptídeos. Estes heptapeptídeos podem ter um resíduo, por exemplo, resíduo 15, adicionado no C-terminal para formar um octapeptídeo.

[032] As abreviações de três letras padrões identificam os resíduos de alfa-aminoácido, e em que o resíduo de aminoácido tem formas isoméricas, ele é a forma L do aminoácido que é representado a menos que de outro modo expressamente indicado (por exemplo, Ser = L-serina). "L" ou "D" se refere as dos isômeros D e L de aminoácido particular. Em que a referência é, aqui a seguir, feita a uma posição no peptídeo, a numeração é feita em referência à posição correspondente do peptídeo de somatostatina (SRIF) de resíduo 14 nativo.

[033] Exemplos de antagonistas de peptídeo representativos exibindo a especificidade desejada em relação a SSTR2 incluem, por exemplo, antagonistas em que os resíduos nas posições 1, 4 a 6 e 11 a 13 são preferivelmente eliminados. Exemplos incluem (ciclo 3-14) Xaa1-Xaa2-D-Xaa3-Xaa4-Xaa5-Xaa6-Xaa7-Xaa8-Xaa9-Xaa10-Xaa11-Xaa12-Xaa13-Xaa14-Xaa15; em que Xaa1 é des-Xaa; Xaa2 é Trp(A), Phe(B), Nal ou Tyr (em que A é H, Cl, F, Br, Me, NO₂, OMe ou N-formila e B é H, halogênio, CH₃, NO₂ ou OCH₃); D-Xaa3 é D-Cys, D-Pen, D-HCys ou outro α-aminoácido de isômero D tendo uma cadeia lateral de SH; Xaa4, Xaa5 e Xaa6 são des-Xaa; Xaa7 é Aph(Q1), Ala(tienil), Tyr, ITyr ou Trp(A) (em que Q1 é Cbm, OH-Cbm, CH₃-Cbm, OCH₃-Cbm, OEt-Cbm, Cbm-Et(OEt)₂ ou Hor); Xaa8 é D-Trp(A), Trp(A), Tyr, D-Tyr, Phe(B), D-Phe(B), L ou D-BzlHis, L ou D-(DNP)His, L ou D-Aph(Cbm); Xaa9 é Lys, NaMeLys, hLys, NaMehLys, Orn ou NaMeOrn; Xaa10 é Thr, Ser ou Val; Xaa11, Xaa12 e Xaa13 são des-Xaa; Xaa14 é Cys, Pen, hCys ou outro α-aminoácido de isômero L tendo uma cadeia lateral de SH; e Xaa15 é 2Nal, D-2Nal, Aph(Q2), D-Aph(Q2), (R1)Cha, (R1)D-Cha, (R1)Leu, (R1)D-Leu, Tyr, D-Tyr, Trp, D-Trp ou des-Xaa (em que R1 é H ou CaMe, e Q2 é Cbm, OH-Cbm,

CH₃-Cbm, OCH₃-Cbm ou OEt-Cbm). Adicionalmente, a Tyr na posição 2 pode ser radioiodada, complexada, conjugada ou quelada a um agente ligado diretamente ou por meio de um ligante ao grupo α -amino do resíduo de N-terminal dos análogos de peptídeo. Os agentes podem funcionar, por exemplo, para ligar um nuclídeo radioativo, isto é, radionuclídeo, ao peptídeo. Por exemplo, um quelante macrocíclico, tal como, por exemplo, DOTA, pode ser adicionado no N-terminal ligando-o diretamente a Xaa2 ou indiretamente a ele usando um ligante tal como GABA (ácido butírico de amino gama, veja, por exemplo, Patente dos Estados Unidos nº 6.022.523, os teores da qual são incorporados aqui por referência em sua totalidade) ou β Ala.

[034] Outro exemplo de um análogo de SRIF compreende a sequência de aminoácido (ciclo 3-14) Xaa1-Xaa2-D-Xaa3-Xaa4-Xaa5-Xaa6-Xaa7-Xaa8-Lys-Thr-Xaa11-Xaa12-Xaa13-Cys; em que Xaa2 é Phe substituído; D-Xaa3 é D-Cys; Xaa7 é Aph(Q1), Tyr ou ITyr; e Xaa8 é D-Trp ou D-Aph(Cbm); e em que os grupos Xaa restantes são como descrito aqui.

[035] Como usado aqui, "Trp" e "D-Trp" referem-se ao resíduo não substituído bem como um resíduo em que uma única substituição por hidrogênio é feita na posição 5 ou 6 em Trp. Os substituintes nesta posição podem incluir, por exemplo, cloro, flúor, bromo, metila, nitro e metóxi, com cloro, flúor e bromo, ou com fórmula substituindo o hidrogênio do N de indol.

[036] Como usado aqui, "Nal" se refere a um isômero de alanina que é substituído por naftila no átomo de carbono β , com a ligação a naftaleno preferivelmente sendo à posição 2 no anel, ou opcionalmente à posição 1.

[037] Como usado aqui, "Aph" se refere à aminofenilalanina, em que o grupo amino é preferivelmente ligado à posição 4 no anel fenila, porém a ligação na posição 2 ou 3 é geralmente equivalente. Como

usado aqui, "Aph(Cbm)" se refere à 4-ureído-fenilalanina. Por Aph(OH-Cbm) entende-se 4-(3-hidróxi)-ureído-fenilalanina. Como usado aqui, "Aph (CH₃-Cbm)" se refere a 4-(3-metil)-ureído-fenilalanina. Como usado aqui, "Aph(OCH₃-Cbm)" se refere a 4-(3-metóxi)-ureído-fenilalanina. Como usado aqui, "Aph[(EtO)₂Et-Cbm]" se refere à 4-{3-[2-(2-etóxi-etóxi)-etil]}-ureído-fenilalanina. Como usado aqui, "ITyr" se refere à L-tirosina iodada. Como usado aqui, "Cpa" se refere a clo-ro-Phe, por exemplo, 4-ClPhe. Como usado aqui, "Aph(Hor)" se refere a 4-[(2,6-dioxo-hexa-hidro-pirimidina-4-carbonil)-amino]-fenilalanina. Como usado aqui, "SRIF" se refere ao peptídeo de somatostatina cíclico de resíduo 14. Como usado aqui, "Cha" se refere à cicloexilalanina. Como usado aqui, "Pen" se refere à penicilamina (valina de β-mercaptop). Como usado aqui, "hLys" ou "hCys" se refere ao α-aminoácido com um grupo CH₂ adicional na cadeia lateral.

[038] O C-terminal é usualmente amidado, embora um equivalente, por exemplo, Gly-OH, possa ser usado. O N-terminal do peptídeo pode ser modificado de várias maneiras sem significativamente, adversamente afetar a afinidade de ligação. Todas as modificações a estes peptídeos cíclicos são consideradas estar incluídos como uma parte dos peptídeos da invenção global. Uma variedade de adições pode ser feita, por exemplo, ao aminoácido de N-terminal na forma de um agente de complexação ou conjugação (Z) que pode em seguida ser usado para ligar uma porção desejada ao peptídeo ou para fornecer rotulagem. Uma tal porção Z geralmente pode ser selecionada do grupo que consiste em quelantes com base em DOTA e DTPA, quelantes com base em NOTA, compostos de carbonila, nicotinamida de 2-hidrazino (HYNIC), quelantes de N₄, desferrioxamina, e quelantes de NxSy, todos opcionalmente complexados com um radioisótopo, Tirosina (Tyr) para halogenação, uma marcação fluorescente ou biotina. Cpa pode também servir como um precursor para triciação. Um quelante, tal co-

mo, por exemplo, DTPA, DOTA, HYNIC e P2S2-COOH pode ser ligado. Quelantes incluem, por exemplo, p-NH₂-Bz-DOTA (ácido 2-p-aminobenzil-1,4,7,10-tetra-azaciclododecano-1,4,7,10-tetra-acético), e DOTA-p-NH₂-anilida [mono(p-aminoanilida) de ácido 1,4,7,10-tetra-azaciclododecano-1,4,7,10-tetra-acético]. Alternativamente, um agente quelante pode ser covalentemente ligado ao N-terminal por meio de um ligante adequado (L) se desejado. Ligantes adequados incluem, por exemplo, tirosina, lisina, ácido diaminobutírico, ácido diaminopropiônico, polietileno glicol, ácidos graxos e seus derivados, β-alanina, ácido valérico de 5-amino, sarcosina, e ácido glúcerônico. Em que Tyr aparece no N-terminal, ele pode ser radioiodado ou de outro modo marcado. Os grupos acima tendo não mais do que cerca de 20 aminoácidos podem também estar presentes no N-terminal, como o resíduo de N-terminal pode também ser acilado, se desejado, com uma porção volumosa sem perda de seletividade.

[039] A seletividade em relação à ligação dos peptídeos análogos da invenção a SSTR2 foi demonstrada testando sua interação com os cinco receptores de SRIF humanos clonados diferentes. Geralmente, células recombinantes expressando o receptor são lavadas e homogeneizadas para preparar um homogeneizado de proteína bruto em um tampão adequado. Em um ensaio típico, uma quantidade de proteína do homogeneizado celular é colocada em um pequeno volume de um tampão de ensaio apropriado em um pH apropriado. Substâncias candidatas, tais agonistas e antagonistas de SRIF potenciais, são adicionadas à mistura em concentrações convenientes, e a interação entre a substância candidata e o polipeptídeo de receptor é monitorada. Antagonistas de receptor que se ligam a SSTR2, porém também mostram afinidade em relação aos outros receptores podem ser úteis em várias composições e métodos da invenção, incluindo kits, e composições e métodos para tratamento e imageamento de tumor. Em moda-

lidades preferidas, os peptídeos da invenção ligam-se substancialmente fortemente apenas ao SSTR2, e sua ligação exibe afinidade elevada.

[040] Os ensaios de ligação de receptor são realizados em receptores clonados de SRIF, e ensaios competitivos são usados para gerar valores de IC50 que são indicadores da concentração de um ligante competitivo necessário para remover uma concentração de saturação de um ligante alvo sendo medido de 50 % de sítios de ligação.

[041] A invenção é também direcionada a, por exemplo, um método de intraoperativamente detectar tumores malignos no corpo de um ser humano, em tecidos que em condições saudáveis não contêm quantidades substanciais de SSTR2. O método inclui, por exemplo, (i) administrar a tal ser uma composição que compreende uma quantidade suficiente para detecção por uma sonda de detecção gama, um peptídeo seletivo de SSTR2, em que o peptídeo é marcado, por exemplo, radioativamente com 99mTc, 161Tb, 90Y, 177Lu, 123I ou 125I, e (ii) depois permitindo a substância ativa ser ligada e apreendida nos tumores e após depuração sanguínea de radioatividade, e submetendo tal ser a uma técnica de radiodetecção na área relevante do corpo usando-se uma sonda de detecção gama.

[042] Em uma modalidade, os antagonistas de SRIF da presente invenção são altamente seletivos em relação a SSTR2, e eles são captados em quantidades maiores do que outros agonistas de SRIF conhecidos que são apenas parcialmente específicos a SSTR2. Mais importante, os agonistas de SRIF são considerados ser úteis em tratamento de células de tumor que expressam SSTR2. Tal tratamento pode incluir, por exemplo, radioterapia, o sucesso do qual é diretamente dependente da quantidade de radiação captado por um tumor. Os antagonistas da presente invenção, como eles são captados e não necessariamente interiorizados por uma célula tumoral, são consequen-

temente, mais eficazes do que agonistas conhecidos para radioterapia de tumores.

[043] Os antagonistas da presente invenção são também úteis em cintilografia para determinar a distribuição de células e tecidos expressando SSTR2 por todo o corpo. O uso de imageamento externo por análise radioativa ou por ressonância magnética permite detecção semiquantitativa dentro do corpo.

[044] Os antagonistas da presente invenção são também úteis para seletivamente bloquear certos dos efeitos farmacológicos que são mediados por SSTR2. Os muitos efeitos de SRIF são conhecidos ou serão conhecidos na técnica.

[045] Os antagonistas radiomarcados são úteis para o tratamento de terapia de tumores malignos no corpo de um ser humano em tecidos que, em condição saudável, não contêm quantidades substanciais de SSTR2. Os antagonistas de peptídeo seletivos de radiomarcados SSTR2 podem ser administrados em uma composição que inclui uma quantidade eficaz para cintilografia ou para combater ou controlar tumores. Os peptídeos radiomarcados podem ser marcados, por exemplo, com ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹¹¹In, ^{113m}In, ⁷¹As, ⁹⁰Y, ⁶⁷Cu, ^{99m}Tc, ¹⁶⁹Er, ¹²¹Sn, ¹²⁷Te, ¹⁴²Pr, ¹⁴³Pr, ⁶⁶Ga, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ⁷²Ga, ¹²⁷Te, ¹⁹⁵Pt, ²¹¹At, ¹⁹⁸Au, ¹⁹⁹Au, ¹⁶¹Tb, ¹⁰⁹Pd, ¹⁶⁵Dy, ¹⁴⁹Pm, ¹⁵¹Pm, ¹⁵³Sm, ¹⁵⁷Gd, ¹⁵⁹Gd, ¹⁶⁶Ho, ¹⁷²Tm, ¹⁶⁹Yb, ¹⁷⁵Yb, ¹⁷⁷Lu, ¹⁰⁵Rh, ¹¹⁴Ag, ¹²⁴I ou ¹³¹I.

[046] Os análogos de SRIF marcados são úteis em ensaios de análise de fármaco para triagem quanto aos novos agentes de peptídeo e não peptídeo eficazes que se ligam com alta afinidade a SSTR2 e são antagonistas altamente eficazes. Usando um ligante como descrito aqui, que é seletivo em relação ao receptor SSTR2, alguém pode obter uma atividade de referência para um receptor recombinantemente produzido. Um ensaio de ligação competitivo para SSTR com o li-

gante marcado e o candidato pode em seguida ser realizado para determinar a afinidade de ligação relativa. Alternativamente, os candidatos prospectivos para inibidores ou modificadores, por exemplo, antagonistas da função receptora, podem ser diretamente incorporados em uma mistura de ensaio para determinar o efeito de tal candidato sobre o receptor. Comparando-se o nível de atividade receptora na presença ou ausência da substância candidata, alguém pode em seguida obter informação com respeito ao efeito da substância candidata sobre a função normal do receptor e, desse modo, determinar sua função como um agonista ou um antagonista comparado a um análogo conhecido seletivo de SSTR2. Os peptídeos de SRIF cíclicos descritos nos exemplos seguintes são antagonistas, e eles podem ser empregados para mediar a função normal de SSTR2.

[047] Os peptídeos descritos aqui podem ser sintetizados por síntese de solução clássica, porém os peptídeos amidados são preferivelmente sintetizados por técnica de fase sólida, como em uma resina de metilbenzidrilamina (MBHA) ou uma resina de BHA, como é conhecido nesta técnica. Os peptídeos tendo um terminal C de carboxila livre podem ser sintetizados como ensinado na Patente dos Estados Unidos nº 7.019.109, os teores dos quais são aqui incorporados por referência. Os peptídeos tendo um terminal C amidado podem ser sintetizados como ensinado na Patente dos Estados Unidos nº 5.874.227, os teores dos quais são aqui incorporados por referência em sua totalidade. A síntese de fase sólida é conduzida de uma maneira que adiciona aminoácidos no começo de cadeia no C-terminal de uma maneira gradativa. Os grupos de proteção de cadeia lateral, que são conhecidos na técnica, incluem-se como uma parte de qualquer aminoácido que tem uma cadeia lateral particularmente reativa, e opcionalmente podem ser usados no caso de outros tais como Trp, onde tais aminoácidos são acoplados sobre a cadeia sendo construída sobre a resina.

Tal síntese fornece um peptidoresina intermediário totalmente protegido. Os grupos de proteção são geralmente divididos e o peptídeo é clivado do suporte de resina antes da oxidação para criar uma ligação de sulfeto entre as cadeias laterais de Cys.

[048] Os análogos de SRIF descritos aqui são também úteis para indicações terapêuticas, tais como moduladores de somatostina. Neste uso, os análogos são geralmente eficazes em níveis menores do que cerca de 100 microgramas por quilograma de peso corporal, menor do que cerca de 1000 microgramas por quilograma de peso corporal, menor do que cerca de 100 microgramas por quilograma de peso corporal, menor do que cerca de 10 microgramas por quilograma de peso corporal, ou menor do que cerca de 1 micrograma por quilograma de peso corporal. Para ação prolongada, pode ser desejável usar níveis de dosagem de cerca de 0,1 a cerca de 2,5 miligramas por quilograma de peso corporal. Estes análogos são solúveis em água e, desse modo, podem ser preparados como soluções relativamente concentradas para administração.

[049] Os peptídeos da invenção não apenas fornecem ligantes mais seletivos para ligar SSTR2, porém o uso peptídeos marcados, por exemplo, uma versão radiomarcada dos peptídeos descritos aqui pode facilitar a análise de fármaco quanto aos antagonistas ainda mais eficazes.

[050] Os ensaios de análise, que são conhecidos na técnica, podem empregar o polipeptídeo de receptor SSTR2 diretamente do hospedeiro recombinante, e podem ser usados para identificar agentes úteis no bloqueio ou imitação certos aspectos de somatostina como desejado ao mesmo tempo em que eliminando os aspectos desejados do hormônio que pode originar-se de ativação ou bloqueio de outros receptores. A este respeito, se um análogo radioiodado é desejado com finalidades de análise, o Tyr pode ser adicionado ao N-terminal

em vez de DOTA, ou Tyr pode ser usado na posição 2 em vez de Cpa, ou um radioligante adequado pode ser ligado por um quelante de DOTA. Os ensaios de ligação competitivos com compostos candidatos puderam primeiro ser realizados nesta maneira com SSTR2 para pesquisa quanto à alta afinidade de ligação; em seguida analisando-se os múltiplos receptores de SRIF, pode ser confirmado se houver ligação seletiva a apenas este receptor, como é desejado. Os peptídeos radiomarcados podem ser usados para tratar doenças de todos os órgãos conhecidos para expressar SSTR2, incluindo o pulmão, trato intestinal e rins.

[051] Por que as adições ao terminal N do análogo de SRIF não parecem afetar adversamente a ligação seletiva, deve ficar claro que estes compostos podem ser complexos com um nuclídeo radioativo com a finalidade de transportar tal agente para um tumor ou outro tecido para o qual a apoptose é desejada. Por exemplo, agentes quelantes adequados, tal como DOTA ou DTPA ou outros, podem ser usados para complexar o análogo de SRIF com um metal altamente radioativo como indicado aqui anteriormente. Alguns exemplos de grupos quelantes adequados para quelar um átomo de material radioativo são agentes de quelação tetradenteados ou grupos derivados de ácido tetraacético de etileno diamina (EDTA), ácido penta-acético de dietileno triamina (DTPA), ácido tetra-acético de cicloexil 1,2-diamina (CDTA), ácido etilenoglicol-0,0'-bis(2-aminoetil)-N,N,N',N'-tetra-acético (EGTA), ácido N,N-bis(hidroxibenzil)-etilenodiamina-N,N'-diacético (HBED), ácido hexa-acético de trietileno tetramina (TTHA), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetra-acético (DOTA), ácido triacético de hidroxietildiamina (HEDTA), ácido 1,4,8,11-tetra-azaciclo-tetradecano-N,N',N'',N'''-tetra-acético (TETA), DTPA substituído, EDTA substituído. Outros quelantes, bem como agentes radioativos, são descritos em WO 95/22341 e WO 04/082722 e nas Publicações de Patente dos Es-

tados Unidos 2004/0242842 e 2005/0070470, os conteúdos dos quais são incorporados por referência. Os quelantes podem ser derivados de, por exemplo, EDTA e DOTA. Alguns sais adequados são ^{111}In -oxinte, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tartarato, que podem geralmente ser formados de uma única maneira sob condições que não são prejudiciais ao antagonista de peptídeo.

[052] A solubilidade dos antagonistas de SRIF pode ser melhorada por acilação do grupo amino de terminal N usando um composto hidrofílico, tal como, por exemplo, ácido hidro-orótico (Hor) ou similares, ou por reação com um isocianato adequado, tal como metilisocianato ou isopropilisocianato, para criar uma porção de ureia no N-terminal. Outros agentes podem também ser N-terminalmente ligados que aumentarão a duração de ação do antagonista de SRIF como conhecido nesta técnica.

[053] Estes antagonistas de SRIF ou sais não tóxicos dos mesmos, combinados com um portador farmacêuticamente ou veterinariamente aceitável para formar uma composição farmacêutica, podem ser administrados aos animais, incluindo humanos e outros mamíferos, de forma intravenosa, subcutânea, intramuscular, percutânea, por exemplo, intranasal, intracerebroespinhal ou oral. Uma tal composição farmacêutica destinada a ser usada para detectar tumores de seres humanos malignos, incluindo a metástase dos mesmos, em tecidos pode incluir, além de um material portador farmacêuticamente aceitável, e um adjuvante farmacêuticamente aceitável opcional, o antagonista de peptídeo marcado como a substância ativa, em uma quantidade suficiente para imageamento externo, para detecção por uma sonda de detecção gama ou para combater ou controlar tumores. Os antagonistas de peptídeo devem ser pelo menos cerca de 90 % puros e preferivelmente devem ter uma pureza de pelo menos cerca de 98 %; purezas inferiores são eficazes, entretanto, e podem bem ser usa-

dos com mamíferos diferentes de seres humanos. Esta pureza significa que o peptídeo entendido constitui uma % em peso estabelecida de todos os tipos de peptídeos e fragmentos de peptídeo presentes. A administração a seres humanos deve ser sob a direção de um médico para combater tumores específicos e cânceres ou mediar outras condições em que os receptores de SSTR2 exercem uma função de controle, tal como acoplamento a uma tirosina fosfatase de modo que a estimulação desta enzima possa ser realizada para mediar os efeitos antiproliferativos de SRIF. A dosagem requerida variará com a condição particular sendo tratada, com a gravidade da condição e com a duração de tratamento desejada.

[054] Os tumores frequentemente expressam vários tipos de receptores de peptídeo (Reubi, J. e Waser, B., Eur. J. Nucl. Med. Molec. Imaging, 30:781-793, 2003). Tais grupos de múltiplos receptores de peptídeo podem incluir receptores de sst2, bem como receptores de bombesina, receptores de CCK, receptores de VIP, receptores de GLP-1, receptores de neurotensina, receptores de secretina, receptores de neuromedina B e receptores de, etc. Em um tal exemplo, a administração de antagonistas de SSTR2 em combinação, como um coquetel, com um ou mais antagonistas radiomarcados a estes vários receptores deve muito substancialmente melhorar o alveijamento in vivo de tais tumores.

[055] Tais antagonistas de peptídeo são frequentemente administrados na forma de sais não tóxicos farmacologicamente ou veterinariamente aceitáveis, tais como sais de adição de ácido ou complexos de metal, por exemplo, com zinco, ferro, cálcio, bário, magnésio, alumínio ou similares. Ilustrativos de tais sais não tóxicos são hidrocloreto, hidrobrometo, sulfato, fosfato, tanato, oxalato, fumarato, gliconato, alginato, maleato, acetato, citrato, benzoato, succinato, malato, ascorbato, tartarato e similares.

[056] Pode também ser desejável para liberar estes antagonistas de SRIF durante períodos prolongados de tempo, por exemplo, períodos de uma semana a um ano de uma única administração, e liberação lenta, formas de dosagem de depósito ou implante podem ser utilizadas como bem conhecido nesta técnica. Uma forma de dosagem pode conter, por exemplo, um sal não tóxico farmacologicamente aceitável do composto que tem um baixo grau de solubilidade em fluidos corporais, por exemplo, um sal de adição de ácido com um ácido polibásico, um sal com um cátion de metal polivalente, ou combinação dos dois ácidos. Um sal relativamente insolúvel pode também ser formulado em um gel, por exemplo, um gel de estearato de alumínio. Uma formulação de depósito de liberação lenta, adequada para injeção pode também conter um antagonista de SRIF ou um sal do mesmo disperso ou encapsulado em um polímero não antigênicos ou não tóxicos, de baixa degradação tal como um polímero de ácido polilático/ácido poliglicólico, por exemplo, como descrito na Patente dos Estados Unidos nº 3,773,919.

[057] As quantidades terapeuticamente eficazes dos antagonistas de peptídeo devem ser administradas sob a direção de um médico, e as composições farmacêuticas usualmente conterão o peptídeo junto com um portador convencional, farmacologicamente, ou veterinariamente aceitável. Uma quantidade terapeuticamente eficaz é considerada uma quantidade predeterminada calculada para obter o efeito desejado. A dosagem requerida variará com o tratamento particular e com a duração de tratamento desejada; entretanto, é antecipado que dosagens entre cerca de 10 microgramas e cerca de 1 miligrama por quilograma de peso corporal por dia serão usadas para tratamento terapêutico. Pode ser particularmente vantajoso administrar tais compostos em forma de depósito ou longa duração como anteriormente descrito. Uma quantidade terapeuticamente eficaz é tipicamente uma

quantidade de um antagonista de SRIF que, quando administrada perifericamente, por exemplo, intravenosamente, em uma composição fisiologicamente aceitável, é suficiente para obter uma concentração de plasma do mesmo de cerca de 0,1 µg/mL a cerca de 100 µg/mL, de cerca de 1 µg/mL a cerca de 50 µg/mL, ou pelo menos cerca de 2 µg/mL (usualmente 5 a 10 µg/mL). Nestas quantidades, eles podem ser usados para desejavelmente afetar a secreção gástrica.

[058] Onde a composição deve ser usada para imageamento ou tratamentos terapêuticos, a baixa vida de prateleira do composto radiomarcado e/ou meia vida curta do radionuclídeo pode exigir que o usuário realize a reação de rotulação com o radionuclídeo no hospital clínico ou laboratório. Em tais exemplos, os vários ingredientes de reação podem ser fornecidos ao usuário na forma de um "kit". As manipulações necessárias para realizar a reação desejada devem ser tão simples quanto possível para permitir ao usuário preparar a composição rotulada radioativa do kit usando facilidades que normalmente estão à disposição de alguém. Consequentemente, um kit para preparação de uma composição radiofarmacêutica, para detectar e localizar tumores malignos e suas metástases em tecidos pode compreender (i) um peptídeo seletivo de SSTR2, um portador farmacologicamente aceitável inerte e/ou agente de formulação com adjuvantes opcionais, (ii) uma solução de um sal ou quelato de isótopo de metal radioativo, e (iii) instruções para uso com uma prescrição para reagir os reagentes presentes no kit.

[059] Um antagonista de peptídeo a ser usado como um ingrediente de tal kit pode ser derivado por uma reação com um agente de quelação. O conjugado de peptídeo resultante fornece uma facilidade para ligar firmemente o radionuclídeo de uma maneira simples. Os ácidos di- ou poliacéticos contendo N ou seus derivados, tais como os compostos mencionados acima, provaram ser pré-eminentemente

adequados para ligar vários radionuclídeos de metal, tais como ^{111}In e ^{113}mIn , às moléculas de peptídeo. O kit a ser fornecido ao usuário pode também compreender os outros ingredientes definidos acima, junto com instruções para uso, enquanto a solução de um sal ou quelato do radionuclídeo tendo uma vida de prateleira limitada pode ser fornecida ao usuário separadamente.

[060] Um kit para preparar uma composição radiofarmacêutica rotulada com $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{186}Re ou ^{188}Re pode compreender, por exemplo, além dos ingredientes definidos nos (i) e (ii) acima, um agente de redução e, se desejado, um quelante, e (iii) instruções para uso, com uma prescrição para reagir os ingredientes do kit com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ na forma de uma solução de pertecnetato, ou com ^{186}Re ou ^{188}Re na forma de uma solução de perrenato. Se desejado, vários ingredientes do kit podem ser combinados, desde que eles sejam compatíveis. O kit deve compreender um agente de redução para reduzir o pertecnetato ou perrenato, por exemplo, um ditioneto, um agente de redução de metálico ou um agente de redução estabilizante de complexo, por exemplo, SnCl_2 , Sn(II)-tartrato , Sn(II)-fosfonato ou -piro-fosfato , ou $\text{Sn(II)-glicoeptonato}$. A solução de pertecnetato ou perrenato pode simplesmente ser obtida de um vendedor adequado. Quando o radionuclídeo está presente no kit por si só, a reação formadora de complexo com o peptídeo pode simplesmente ser produzida combinando-se os componentes em um meio neutro e fazendo eles reagirem. Para tal propósito o radionuclídeo pode ser reagido com o peptídeo na forma de uma ligação de quelato para um quelante comparativamente fraco, como descrito aqui anteriormente.

[061] Quando o kit compreende um peptídeo derivado como definido aqui anteriormente e destina-se à preparação de uma composição radiofarmacêutica, rotulada com $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{186}Re ou ^{188}Re , o radionuclídeo preferivelmente será adicionado separadamente na forma

de uma solução de pertecnetato ou perrenato. Em tal caso o kit compreenderá um agente de redução adequado e, se desejado, um quelante, o formador reduz o pertecnetato ou o perrenato. Como um agente de redução pode ser usado, por exemplo, uma ditionita ou um agente de redução metálico. Os agentes de redução podem opcionalmente ser combinados, desde que eles sejam compatíveis. Um tal kit de monocomponente, em que os ingredientes combinados são preferivelmente liofilizados, é adequado para ser reagido, pelo usuário, com a solução de radionuclídeo. Um agente de redução metálico, por exemplo, Sn(II), Ce(III), Fe(II), Cu(I), Ti(III) ou Sb(III); Sn(II), pode ser usado. O constituinte de peptídeo dos kits pode ser fornecido como uma solução, por exemplo, na forma de uma solução de salina fisiológica, ou em alguma solução de tampão, porém está preferivelmente presente em uma condição seca, por exemplo, na condição liofilizada. Quando usado como um componente para um líquido de injeção deve ser estéril. Quando o constituinte está no estado seco, o usuário deve usar uma solução de salina fisiologicamente estéril como um solvente. Se desejado, o constituinte pode ser estabilizado da maneira convencional com estabilizadores adequados, por exemplo, ácido ascórbico, ácido gentísico ou sais destes ácidos.

[062] Embora a invenção tenha sido descrita com referência as suas modalidades preferidas, deve-se entender que várias mudanças e modificações como seria óbvio para alguém versado na técnica podem ser feitas sem afastar-se do escopo da invenção que é apresentado nas reivindicações anexadas relativas a este assunto. Embora as reivindicações variadamente definam a invenção nos termos de uma sequência de peptídeo, deve-se entender que tal destina-se a incluir sais não tóxicos do mesmo que são bem conhecidos por ser a totalidade equivalente do mesmo e que são mais frequentemente administrados.

[063] Os seguintes exemplos são incluídos para demonstrar as modalidades preferidas da invenção. Deve ser apreciado por aqueles versados na técnica que as técnicas descritas nos exemplos que seguem representem técnicas desenvolvidas pelo inventor para funcionarem bem na prática da invenção, e desse modo, possam ser considerados constituir modos preferidos para sua prática. Entretanto, aqueles versados na técnica devem, considerando a presente descrição, apreciar que muitas mudanças possam ser feitas nas modalidades específicas que são descritas e ainda obter um resultado igual ou similar sem afastar-se do espírito e escopo da invenção. As descrições aqui de todas as patentes, pedidos e referências são expressamente incorporadas aqui por referência.

EXEMPLOS

[064] Os seguintes exemplos ilustram a provisão de diversos antagonistas de peptídeo de SRIF representando várias características da invenção. Em cada peptídeo, os resíduos de cisteína nas posições 3 e 14 (numeradas de acordo com SRIF) são ligados pela ligação de dissulfeto ciclizante, e podem ser anotados como "(ciclo 3-14)" ou "c[]".

Exemplo 1.

[065] O análogo de somatostatina DOTA-des-AA^{1,4,5,6,11,12,13}[Cpa², D-Cys³, Tyr⁷, D-4Aph(Cbm)⁸]-SRIF-2Nal-NH₂ tendo a estrutura: (ciclo 3-14) DOTA-Cpa-D-Cys-Tyr-D-4Aph(Cbm)-Lys-Thr-Cys-2Nal-NH₂ é sintetizado. (Peptídeo 28). A metodologia de fase sólida empregando a estratégia de BOC foi usada para sintetizar o octapeptídeo de uma maneira gradativa em uma resina de MBHA, geralmente como descrito no "Exemplo II" da Patente '277. Boc-D-4Aph(Cbm)-OH foi preparado antecipadamente e acoplado na posição 8.

[066] Após clivagem do peptídeo da resina e simultaneamente remoção dos grupos de proteção de cadeia lateral (exceto Fmoc de

Lys) por HF, o peptídeo foi oxidado para criar a ponte de dissulfeto em 75% de solução de ácido acético adicionando uma solução a 10 por cento de iodo em metanol até a solução resultante ficar de cor laranja, em seguida agitando durante 40 minutos e enxaguando com ácido ascórbico. O peptídeo bruto foi purificado por RP-HPLC preparativa, usando um gradiente linear de 1% de B por aumentos de 1 minuto do % de B de referência (Eluente A = 0,1 % de TFA, eluente B = 60% de CH₃CN, 40% de A) em uma taxa de fluxo de 100 mL/minuto. DOTA foi em seguida acoplado no N-terminal como um quelante adicionando DOTA-NHS.3TFA.HPF₆ (Macrocyclics, Dallas, TX) (198 mg, ~20 µM) em DMF (1 mL) e N, N'-di-isopropiletilamina (DIPEA) (36 µL, ~22 µM) ao peptídeo purificado (32 mg, ~20 µM) em N,N-dimetilformamida seco (DMF, 3,5 mL). A mistura foi agitada em temperatura ambiente durante a noite. O progresso da reação foi seguido por HPLC analítica, e a análise de MS mostrou que o produto desejado, DOTA-des-AA^{1,4,5,6,11,12,13}[Cpa², D-Cys³, Tyr⁷, D-4Aph (Cbm)⁸, Lys (Fmoc)⁹]-SRIF-2Nal-NH₂ puro, foi obtido. Após conclusão da reação, a remoção do grupo de proteção Fmoc da cadeia lateral de Lys⁹ foi obtida adicionando 4 mL de uma solução de 20% de piperidina em DMF e aguardando 30 minutos. DOTA-des-AA^{1,4,5,6,11,12,13}[Cpa², D-Cys³, Tyr⁷, D-4Aph (Cbm)⁸]-SRIF-2Nal-NH₂ foi dessalgado por RP-HPLC preparativa usando as mesmas condições como acima descrito. A pureza do conjugado de DOTA-peptídeo cíclico final foi determinada por CZE analítico. Ele foi 94% puro.

[067] A análise de MS mostra uma massa [M+H]⁺ de 1583.72 Da, que se compara muito favoravelmente à massa calculada de 1583.62 Da. O peptídeo é aqui a seguir referido como Peptídeo nº 28.

Exemplo 2.

[068] A síntese inicial descrita no exemplo 1 foi repetida com duas mudanças; 4Aph (Cbm) e D-Trp foram usados nas posições 7 e 8

para fornecer a resina de octapeptídeo: resina de des-AA^{1,4,5,6,11,12,13}[Cpa², D-Cys³, 4Aph(Cbm)⁷, D-Trp⁸, Lys (Fmoc)⁹]-SRIF-2Nal-MBHA.

[069] Após clivagem do peptídeo da resina como a amida e simultaneamente remoção dos grupos de proteção das cadeias laterais dos aminoácidos (exceto Fmoc from Lys) by HF, o peptídeo foi oxidado para criar a ponte de dissulfeto em 75% de solução de ácido acético adicionando uma solução a 10 por cento de iodo em metanol até a solução resultante ficar de cor laranja, em seguida agitando durante 40 minutos e enxaguando com ácido ascórbico. O peptídeo bruto foi purificado por RP-HPLC preparativa, usando um gradiente linear de 1% de B por aumentos de 1 minuto do %B de preferência (Eluente A = 0,1 % de TFA, eluente B = 60% CH₃CN, 40% A) em uma taxa de fluxo de 100 mL/min. Ao peptídeo purificado (34 mg ~24 µM) em N,N-dimetilformamida seco (DMF, 3,5 mL) foi adicionado DOTA-NHS.3TFA.HPF₆ (Macrocyclics, Dallas, TX) (24 mg, 24,2 µM) em DMF (150 µL) e N,N'-di-isopropiletilamina (DIPEA) (40 µL, 24 µM). A mistura foi agitada em temperatura ambiente durante a noite. O progresso da reação foi seguido por HPLC analítica, e após conclusão da reação, 1 mL de piperidina foi adicionado à mistura reacional para remover o grupo de proteção de Fmoc da cadeia lateral de Lys⁹ durante 30 minutos resultando em DOTA-des-AA^{1,4,5,6,11,12,13}[Cpa², D-Cys³, 4Aph(Cbm)⁷, D-Trp⁸]-SRIF-2Nal-NH₂, que tem a fórmula: (ciclo 3-14) DOTA-Cpa-D-Cys-4Aph(Cbm)-D-Trp-Lys-Thr-Cys-2Nal-NH₂.

[070] Este peptídeo foi dessalgado por RP-HPLC preparativa usando as mesmas condições como acima descrito. A pureza do conjugado de DOTA-peptídeo cíclico final foi determinada por CZE analítico ser cerca de 98% puro. Análise de MS mostrou uma massa de [M+H]⁺ de 1606.50 Da, que se compara favoravelmente o valor calculado de 1606.64 Da. Ele é referido como Peptídeo nº 14.

Exemplo 3.

[071] A síntese mencionada no Exemplo 1 foi repetida omitindo 2Nal no C-terminal e substituindo 4Aph(Hor) por Tyr⁷. Boc-4Aph(Hor)-OH foi preparado antecipadamente como descrito (Jiang, G. e outro, *J. Med. Chem.*, 44:453-467). A clivagem, desproteção, ciclização e purificação do peptídeo foram realizadas como no exemplo 1. O peptídeo cíclico purificado tem a fórmula: (ciclo 3-14) DOTA-Cpa-D-Cys-4Aph(Hor)-D-4Aph(Cbm)-Lys-Thr-Cys-NH₂. Ele tinha uma pureza em CZE de cerca de 98%. Ele é referido como Peptídeo nº 33. A análise de MS mostrou uma massa de [M+H]⁺ de 1525.68 Da, que se compara favoravelmente ao valor calculado de 1525.58 Da.

Exemplo 4.

[072] A síntese mencionada no Exemplo 1 foi repetida com uma mudança, em vez de pCl-Phe no N-terminal, pNO₂-Phe foi usado. A clivagem, desproteção, ciclização e purificação do peptídeo foram realizadas como no exemplo 1. O peptídeo cíclico purificado tem a fórmula: (ciclo 3-14) DOTA-pNO₂-Phe-D-Cys-Tyr-D-4Aph(Cbm)-Lys-Thr-Cys-2Nal-NH₂. Ele tinha uma pureza em CZE de cerca de 98%. Ele é referido como Peptídeo nº 5. A análise de MS mostrou uma massa de [M+H]⁺ de 1594.17 Da, que se compara favoravelmente ao valor calculado de 1594.65 Da.

Exemplo 5.

[073] A síntese inicial descrita no exemplo 1 foi repetida com uma mudança; Aph(Hor) foi usado em vez de Tyr na posição 7 para fornecer a resina de octapeptídeo: resina des-AA^{1,4,5,6,11,12,13}[Cpa², D-Cys³, 4Aph(Hor)⁷, D-Aph(Cbm)⁸, Lys (Fmoc)⁹]-SRIF-2Nal-MBHA. As reações foram em seguida realizadas como descrito no exemplo 2 resultando em DOTA-des-AA^{1,4,5,6,11,12,13}[Cpa², D-Cys³, 4Aph(Hor)⁷, D-Aph(Cbm)⁸]-SRIF-2Nal-NH₂, que tem a fórmula: (ciclo 3-14) DOTA-Cpa-D-Cys-4Aph(Hor)-D-Aph(Cbm)-Lys-Thr-Cys-2Nal-NH₂ (Peptídeo

30).

[074] A pureza do conjugado de DOTA-peptídeo cíclico final foi determinada por CZE analítico ser cerca de 98% puro. A análise de MS mostrou uma massa de $[M+H]^+$ de 1722.56 Da, que se compara favoravelmente ao valor calculado de 1722.65 Da.

Exemplo 6.

[075] A síntese mencionada no Exemplo 5 foi repetida, substituindo D-Tyr por 2Nal no terminal de C. A clivagem, desproteção, cicliização e purificação do peptídeo foram realizadas como no exemplo 1. O peptídeo cíclico purificado tem a fórmula: (ciclo 3-14) DOTA-Cpa-D-Cys-4Aph(Hor)-D-4Aph(Cbm)-Lys-Thr-Cys-D-Tyr-NH₂. Ele tinha uma pureza em CZE de cerca de 98%. Ele é referido como Peptídeo nº 31. A análise de MS mostrou uma massa de $[M+H]^+$ de 1688.83 Da, que se compara favoravelmente ao valor calculado de 1688.64 Da.

Exemplo 7.

[076] A síntese mencionada no Exemplo 4 foi repetida substituindo-se D-Tyr por 2Nal no terminal de C. A clivagem, desproteção, cicliização e purificação do peptídeo foram realizadas como no exemplo 1. O peptídeo cíclico purificado tem a fórmula: (ciclo 3-14) DOTA-pNO₂-Phe-D-Cys-Tyr-D-4Aph(Cbm)-Lys-Thr-Cys-D-Tyr-NH₂. Ele tinha uma pureza em CZE de cerca de 98%. Ele é referido como Peptídeo nº 3. Análise de MS mostrou uma massa de $[M+H]^+$ de 1560.63 Da, que se compara favoravelmente ao valor calculado de 1560.83 Da.

Exemplo 8.

[077] A síntese descrita no exemplo 7 foi repetida com duas mudanças; ITyr foi usado na posição 7 e D-Trp foi usado na posição 8 para fornecer a resina de octapeptídeo: resina des-AA^{1,4,5,6,11,12,13}[pNO₂-Phe², D-Cys³, ITyr⁷, D-Trp⁸, Lys (Fmoc)⁹]-SRIF-D-Tyr-MBHA.

[078] Após clivagem do peptídeo da resina como a amida e reali-

zação das reações como geralmente descrito no exemplo 2, o peptídeo foi obtido tendo a fórmula: (ciclo 3-14) DOTA-pNO₂-Phe-D-Cys-I-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-D-Tyr-NH₂ (Peptídeo 32). A pureza do conjugado de DOTA-peptídeo cíclico final foi determinada por CZE analítico ser de cerca de 98% puro. A análise de MS mostrou uma massa de [M+H]⁺ de 1667.74 Da, que se compara favoravelmente ao valor calculado de 1667.52 Da.

Exemplo 9.

[079] *Bioensaio in vitro*: Os efeitos dos vários análogos de somatostatina foram testados *in vitro* quanto a sua capacidade de ligar-se aos receptores clonados isolados expressos em células CHO-K1 e células CCL39. A clonagem molecular dos genes codificando múltiplos subtipos de receptor de somatostatina permitiu a expressão individual destes receptores em células mamíferas e a caracterização de seus respectivos perfis farmacológicos. Tais cinco subtipos de receptor, denominados SSTR1 a SSTR5, foram clonados (Raynor, K. e outro, *Mol. Pharmacol.*, 43:838-844, 1993; Raynor, K. e outro, *Mol. Pharmacol.*, 44:385-392, 1993). Estas referências descrevem os ensaios de ligação que podem ser usados para determinar se os análogos SRIF particulares se ligam seletivamente a um ou mais dos cinco tipos de receptor e também se eles ligam se ligam a tais tipos de receptor com atividade elevada ou baixa. Cada subtipo de receptor pode mediar efeitos fisiológicos distintos, porém de sobreposição de SRIF. Como um resultado, os compostos que se ligam seletivamente aos SSTR2 receptores, por exemplo, podem ser usados para modular a função fisiológica particular de SRIF sem potencialmente tendo um efeito indesejado resultante de outra função fisiológica de SRIF que é mediada por outros receptores de SRIF.

[080] As células CHO-K1 foram desenvolvidas em meio Ham's F-12, e as células CCL39 foram desenvolvidas em mistura de meio Ea-

gle modificado de Dulbecco/Ham's F-12(1:1), suplementado com 10 % de soro bovino fetal, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, em ar umidificado contendo CO₂ a 5% a 37°C. As células foram lavadas duas vezes com e raspadas em Tris-HCl a 0,05 M gelado (pH 7,4), coletadas por centrifugação, e homogeneizadas usando um rotor/estator/sistema no mesmo tampão. Após centrifugação em 120 g durante 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi coletado e centrifugado novamente em 48.000 g durante 30 minutos a 4°C. O pélete resultante foi ressuspenso em tampão de Tris gelado, transferido em um tubo de centrifuga, e centrifugado em 20.000 g durante 15 minutos a 4°C. Após retirada do sobrenadante, o pélete de membrana foi armazenado a -80°C.

[081] A autorradiografia de receptor foi realizada em secções de criostato espesso de 20 µm dos péletes de membrana, montados em lâminas de microscópio, e em seguida armazenados a -20°C. Para cada um dos compostos testados, experimentos de deslocamento completo foram realizados com o radioligante de ligante de somatostatina universal ¹²⁵I-[Leu⁸,D-Trp²²,Tyr²⁵]-somatostatina 28 que se liga com afinidade forte a todos os cinco receptores. Concentrações crescentes do peptídeo não marcado foram usadas variando de 0,1 a 1000 nM. Somatostatina 28 não rotulada foi conduzida em paralelo usando as mesmas concentrações crescentes, como um controle. Os valores de IC₅₀ foram calculados após quantificação dos dados usando um sistema de processamento de imagem assistida por computador como conhecido nesta técnica.

[082] Em concentrações de 100 nM, o Peptídeo nº 28 tinha efeitos mínimos a ligação do radioligante SRIF-28 a SSTR1, SSTR3, SSTR4 e SSTR5. Ao contrário, ele seletivamente liga-se a SSTR2, removendo a ligação do radioligante a SSTR2 humano com um valor de IC₅₀ de cerca de 1,8 nM.

[083] As potências de certos análogos de SRIF para inibir a ligação de radioligante de ^{125}I -[Leu⁸,D-Trp²²,Tyr²⁴]SRIF-28 aos vários receptores de SRIF humanos clonados são mostrados na seguinte tabela 1 em que os valores de IC₅₀ são fornecidos em concentração nanomolar. Os números em parênteses indicam o número de vezes que o teste de ligação particular foi realizado.

Tabela 1.

Composto	IC ₅₀ (nM)				
	hSSTR1	hSSTR2	hSSTR3	hSSTR4	hSSTR5
Peptídeo nº 28 406-034-15	>1,000 (2)	1,8 ± 0,2 (3)	>1,000 (2)	>1,000 (2)	>1,000 (2)
Peptídeo nº 14 363-246-15	>1,000 (3)	9,4 ± 1,6 (3)	>1,000 (2)	816 ± 114 (3)	>1,000 (3)
Peptídeo nº 33 363-300-15	>1,000 (2)	230; 219 (2)	>1,000 (2)	>1,000 (2)	>1,000 (2)
Peptídeo nº 5 406-032-20	>1,000 (2)	1,5 ± 0 (2)	>1,000 (2)	>1,000 (2)	>1,000 (2)
Peptídeo nº 30 363-298-15	>1,000 (2)	1,7 ± 0,3 (3)	>1,000 (2)	>1,000 (2)	>1,000 (2)
Peptídeo nº 31 406-094-15	>1,000 (2)	0,6 ± 0,05 (2)	>1,000 (2)	>1,000 (2)	>1,000 (2)
Peptídeo nº 3 406-092-15	>1,000 (2)	0,53 ± 0,06 (2)	>1,000 (2)	>1,000 (2)	>1,000 (2)
Peptídeo nº 32 406-090-15	>1,000 (2)	1,02 ± 0,88 (2)	>1,000 (2)	493 ± 206 (2)	>1,000 (2)

[084] Além disso, todos os peptídeos testados e reportados na tabela 1 não mostraram nenhuma internalização significativa ao mesmo tempo que antagonizando a internalização induzida por octreotida. Os peptídeos nºs 28, 5, 30, 31, 3 e 32 exibiram propriedades de ligação muito boas e excelentes propriedades de alvejamento de tumor *in*

vivo, a saber enorme captação nos tumores de sst2 em 4 horas e 24 horas, e excelente relação tumor para rim; tais podem ser bloqueadas pelo excesso de peptídeo frio.

Implantação de célula HEK-sst₂ em camundongos nude

[085] Os animais foram mantidos, tratados, e cuidados em concordância com as normas das regulamentações suíças (aprovação 789). Camundongos nude fêmeas atímicos foram subcutaneamente implantados com dez milhões de células HEK-sst₂ frescamente suspensas em PBS estéril. Dez a catorze dias após inoculação, os camundongos mostraram massas de tumor sólido palpáveis (peso de tumor 60-150 mg) e foram usados para os experimentos de biodistribuição *in vivo*.

[086] A confirmação de que os tumores transferidos estavam de fato expressando apenas sst₂ foi obtida em amostras ressecadas de tumor testadas *in vitro* com autorradiografia de receptor de somatostatina usando ligantes seletivos de subtipos.

Biodistribuição *in vivo* de antagonistas e agonistas marcados por ¹¹¹In

[087] Os camundongos foram injetados em uma veia do rabo com 10 pmols de peptídeo radiomarcado por ¹¹¹In (aproximadamente 0,15-0,2 MBq) em 0,1 mL de solução de NaCl (0,9%, com 0,1 % de BSA). A biodistribuição foi estudada em 4 horas ou 24 horas após injeção. Os órgãos de interesse foram coletados, manchados secos, pesados, sua radioatividade avaliada e a porcentagem de atividade injetada por grama (%IA/g) calculada.

[088] Em um experimento 5 µCi de peptídeo nº 28 marcado por ¹¹¹In foram injetados em camundongos nude transportando tumores de HEK-sst₂, 3 a 4 camundongos por grupo de amostra. A presença de 2000 vezes (por mol) de composto não marcado inibiu a ligação. Os resultados da biodistribuição são apresentados na tabela 2.

Tabela 2.

Órgão	4 horas		Bloqueio de 4 horas		24 horas	
sangue	0,26	0,03	0,19	0,03	0,06	0,01
coração	0,36	0,03	0,12	0,01	0,09	0,01
fígado	1,52	0,03	0,88	0,10	0,52	0,08
baço	0,62	0,06	0,36	0,10	0,28	0,05
pulmão	2,31	1,25	0,30	0,10	0,31	0,08
rim	7,48	0,43	6,95	0,39	4,50	0,36
estômago	20,27	2,55	1,84	0,37	3,38	0,69
intestino	1,44	1,18	0,25	0,04	0,23	0,05
adrenal	3,17	0,69	0,21	0,01	0,77	0,14
pâncreas	29,83	2,86	2,41	0,73	2,35	0,47
pituitária	8,29	3,38	0,21	0,06	1,73	0,84
músculo	0,19	0,05	0,06	0,01	0,10	0,05
osso	1,23	0,24	0,16	0,05	0,85	0,66
sst2 tumor	28,41	2,98	2,36	0,27	21,49	0,95

Órgão	4 horas	24 horas
tumor:rim	3,8	4,8
tumor:pâncreas	0,95	9,1
tumor:pituitária	3,4	12,4
tumor:sangue	109,3	358
tumor: músculo	149,5	215
tumor:osso	23,9	25,3

[089] A seguinte biodistribuição (tabela 3) foi observada quando 5 μCi de peptídeo nº 14 marcado por ^{111}In foram injetados em camundongos nude transportando tumores de HEK-sst2, três camundongos por grupo de amostra.

Tabela 3.

Órgão	1 hora	4 horas	24 horas	48 horas	72 horas
tumor:rim	1,95	2,54	3,84	2,93	3,27
tumor:adrenal	14,12	72,27	57,80	31,71	33,53

Órgão	1 hora	4 horas	24 horas	48 horas	72 horas
tumor:pâncreas	2,44	43,15	162,00	157,78	150,70
tumor:pituitária	6,54	34,36	26,00	25,70	12,11
tumor:sangue	24,92	152,94	410,79	595,61	741,89
tumor:músculo	67,19	279,34	347,94	275,34	266,45
tumor:osso	13,14	48,44	50,11	26,99	36,86

[090] Um experimento similar, com peptídeo nº 14 marcado por ^{177}Lu (5 μCi em camundongos nude transportando tumores de HEK-sst2, três camundongos por grupo de amostra) forneceu a seguinte distribuição (tabela 4), expressa como a relação de sinal em tumor: órgão.

Tabela 4.

Órgão	4 horas	24 horas
sangue	0,20	0,061
coração	0,25	0,084
fígado	0,80	0,399
baço	1,03	0,232
pulmão	2,88	0,438
rim	10,82	6,034
estômago	17,26	1,825
intestino	0,96	0,282
adrenal	2,85	1,370
pâncreas	26,11	1,177
pituitária	20,18	8,637
músculo	0,22	0,153
osso	1,06	0,915
sst2	34,90	25,650

[091] Por comparação o peptídeo nº 33 marcado por ^{111}In 33 mostrou a seguinte biodistribuição (tabela 5) após a injeção de 5 μCi em camundongos nude transportando tumores de HEK-sst2 e sst3, 4 camundongos por grupo de amostra. A presença de 1000 vezes de composto não marcado inibiu a ligação:

Tabela 5.

Órgão	4 horas	STDEV	bloqueio de 4 horas	STDEV	24 horas	STDEV
sangue	0,12	0,01	0,12	0,01	0,04	0,01
coração	0,06	0,01	0,05	0	0,05	0,02
fígado	0,33	0,04	0,32	0,04	0,25	0,08
baço	0,17	0,03	0,2	0,01	0,12	0,02
pulmão	0,27	0,06	0,21	0,04	0,18	0,1
rim	13,74	1,26	10,3	1,75	7,07	1,12
estômago	0,16	0,02	0,12	0,01	0,12	0,03
intestino	0,11	0,02	0,09	0	0,06	0,01
adrenal	0,26	0,04	0,23	0,05	0,15	0,04
pâncreas	0,06	0,01	0,05	0,01	0,04	0,01
pituitária	0,46	0,36	0,14	0,1	0,05	0,04
músculo	0,03	0,01	0,02	0,01	0,03	0,01
osso	0,09	0,06	0,04	0,03	0,06	0,01
sst2	3,56	0,65	0,22	0,14	1,21	0,31
sst3	0,22	0,03	0,14	0,07	0,21	0,11

[092] A biodistribuição com relação ao tumor de sst2 é mostrada na tabela 6.

Tabela 6.

Órgão	4 horas	bloqueio de 4 horas	24 horas
sangue	29,7	1,8	30,3
rim	0,3	0,0	0,2
pâncreas	59,3	4,4	30,3
pituitária	7,7	1,6	24,2
músculo	118,7	11,0	40,3
osso	39,6	5,5	20,2

[093] O peptídeo n° 5 marcado por ^{111}In mostrou a seguinte biodistribuição (tabela 7) após a injeção de 5 μCi em camundongos nude transportando tumores de HEK-sst2, 3 a 4 camundongos por grupo de amostra. A presença de 2000 vezes de composto não marcado inibiu a

ligação.

Tabela 7.

Órgão	4 horas	24 horas
tumor:rim	4,0	5,0
tumor:pâncreas	1,8	16,0
tumor:pituitária	14,3	15,3
tumor:sangue	83,9	357,7
tumor:músculo	183,6	268,3
tumor:osso	35,4	33,5

[094] Peptídeo nº 30 foi estudado em maiores detalhes. O peptídeo nº 30 marcado por ^{111}In mostrou a seguinte biodistribuição (tabela 8) após a injeção de 5 μCi em camundongos nude transportando tumores de HEK-sst2, quatro camundongos por grupo de amostra. Um excesso de 2000 vezes de peptídeo frio mostrou bloqueio.

Tabela 8. Relação de tumor para órgão para selecionar os órgãos.

Órgão	1 horas	4 horas	Bloqueio de 4 horas	24 horas	48 horas	72 horas
sangue	19,7	112,8	75,6	519,6	657,5	307,3
coração	27,9	88,2	88,2	259,8	263,0	184,4
fígado	10,2	18,3	7,6	34,6	23,1	18,8
baço	13,2	27,1	13,2	66,6	47,0	36,9
pulmão	2,6	18,4	22,0	61,9	69,2	46,1
rim	2,4	3,3	0,9	4,3	3,5	3,2
estômago	1,4	2,1	18,9	7,5	4,6	5,7
intestino	7,9	25,0	44,1	81,2	54,8	61,5
adrenal	2,5	5,5	26,5	16,8	16,0	13,2
pâncreas	0,6	1,2	23,0	7,0	6,5	6,0
pituitária	2,4	2,9	8,1	5,4	10,4	9,9
músculo	41,5	165,9	132,3	288,7	263,0	92,2
osso	18,2	43,4	22,0	44,0	35,5	29,7

[095] O peptídeo nº 30 marcado por ^{177}Lu mostrou a seguinte biodistribuição (tabela 9) após a injeção de 5 μCi em camundongos nude

transportando tumores de HEK-sst2, quatro camundongos por grupo de amostra.

Tabela 9.

Órgão	4 horas	24 horas	72 horas
tumor:sangue	95,82	2380,57	2679,44
tumor:coração	29,24	217,19	129,21
tumor:fígado	6,60	16,81	13,57
tumor:baço	15,47	21,01	20,61
tumor:pulmão	5,37	94,69	29,51
tumor:rim	3,04	4,83	3,13
tumor:estômago	0,48	0,89	0,90
tumor:intestino	7,27	20,27	6,74
tumor:adrenal	1,26	10,00	2,50
tumor:pâncreas	0,39	0,62	0,84
tumor:pituitária	1,70	9,09	4,08
tumor:músculo	148,53	332,56	750,80
tumor:osso	11,04	35,08	82,58

[096] O peptídeo nº 31 marcado por ^{111}In mostrou a seguinte biodistribuição (tabela 10) após a injeção de 5 μCi em camundongos nude transportando tumores de HEK-sst2, 3 a 4 camundongos por grupo de amostra.

Tabela 10.

Órgão	4 horas	24 horas
tumor:rim	5,51	6,29
tumor:pâncreas	1,48	11,33
tumor:pituitária	3,52	6,73
tumor:sangue	122,84	537,22
tumor:músculo	136,11	127,01
tumor:osso	20,94	16,28

[097] Sob o mesmo protocolo, o peptídeo nº 3 marcado por ^{111}In mostrou a distribuição na tabela 11.

Tabela 11.

Órgão	4 horas	24 horas
tumor:rim	5,35	4,56
tumor:pâncreas	1,91	14,69
tumor:pituitária	5,39	4,98
tumor:sangue	222,39	283,53
tumor:músculo	146,02	128,61
tumor:osso	28,41	21,30

[098] Os peptídeos da invenção não apenas fornecem ligantes mais seletivos em relação à ligação de SSTR2, porém o uso de peptídeos marcados, por exemplo, uma versão radiomarcada de peptídeo nº 28, facilita a análise de fármaco como antagonistas ainda mais eficazes.

Exemplo 10.

[099] Materiais de partida. Resina de MBHA com uma capacidade de 0,3 a 0,4 m equiv/g foi usada nas sínteses de fase sólida. Todos os aminoácidos protegidos por Boc-N^α com proteção de cadeia lateral: Cys(Mob), Lys(ε-2Cl-Z), Lys(Fmoc), Thr(Bzl), Tyr(2Br-Z) e ITyr(3Br-Bzl) foram comercialmente disponíveis (Bachem Inc., Torrance, CA; Chem Impex, Wood Dale, IL; Reanal, Budapest, Hungary) exceto Boc-Aph(Cbm)-OH, Boc-Daph(Cbm)-OH, Boc-Aph(Cbm-OCH₃)-OH, Boc-Aph(Cbm-OH)-OH, Boc-Aph(Hor)-OH, Fmoc-D/L-Agl(NMe,Boc)-OH, (Jiang, G. e outro, *Prot. Pep. Lett.*, 3:219-224, 1996) Fmoc-D-Agl(Boc)-OH (Sypniewski, M. e outros, *J. Org. Chem.*, 65:6595-6600, 2000) Boc-5F-Trp-OH, Boc-5F-DTrp-OH, que foram sintetizados no laboratório. Éster de mono (N-hidroxissuccinimida) de ácido 1,4,7,10-tetra-azaciclododecano-1,4,7,10-tetra-acético 3CH₃COOH.HPF₆ (DO-TA-NHS) foi adquirido de Macrocyclics Inc. (Dallas, TX, USA). Todos os reagentes e solventes foram de grau de ACS e foram usados sem outra purificação.

[0100] Síntese de peptídeo. Os peptídeos foram sintetizados pelo método de fase sólida manualmente ou em um CS-Bio Peptide Synthesizer Model CS536. 3 equivalentes de excesso de Boc-aminoácido (1,2 mmol) com base na substituição original da resina foram usados para cada acoplamento. Os acoplamentos de peptídeo foram mediados durante 1 hora por DIC/HOBt (1,2 mmol/1,8 mmol) em dimetilformamida (DMF) e monitorados pelo teste de ninidrina quantitativa (Kaiser, E. e outros, *Anal. Biochem.*, 34:595-598, 1970). A remoção de Boc foi obtida com ácido trifluoroacético (TFA) (60% em CH₂Cl₂, 1 a 2% de etanoditiol ou m-cresol) durante 20 minutos. Uma lavagem de álcool isopropílico (1% de m-cresol) seguido de tratamento com TFA e em seguida lavagens sucessivas com solução de trietilamina (TEA) (10% em CH₂Cl₂), metanol, solução de trietilamina, metanol e CH₂Cl₂ completaram a sequência de neutralização. O grupo ureído (Cbm) no N-terminal de 13 foi introduzido na resina. O grupo Boc de N-terminal do peptídeo totalmente montado foi desprotegido com TFA, após neutralização, a carbamoilação prosseguiu com NaOCN (100 mg, 0,65 mmol) em N-metilpirrolidinona (NMP) (4 mL) e ácido acético glacial 3 mL por grama de resina inicial. A mistura foi agitada em temperatura ambiente durante 30 minutos e o teste de ninidrina indicou uma reação completa. O peptídeo completo foi em seguida desprotegido e clivado da resina por HF contendo os recuperadores de anisol (10% volume/volume) e sulfeto de metila (5% volume/volume) durante 60 minutos a 0°C. Os peptídeos precipitados de dietil éter foram ciclizados em 75% de ácido acético (200 mL) por adição de iodo (10% de solução em metanol) até o aparecimento de uma cor laranja estável. Quarenta minutos depois, ácido ascórbico foi adicionado para enxaguar o excesso de iodo.

[0101] Para a síntese de 9, Fmoc-D/L-Agl(NMe,Boc)-OH não resolvido foi usado, e os dois diastereômeros foram separados facilmente

durante as etapas de purificação por HPKC padrões. (Miller, C e Rivier, J., *Biopolimers*, 40:265-317, 1996) A configuração ótica dos dois diastereômeros foi experimentalmente inferida a partir da comparação do comportamento de eluição de HPLC com o análogo sintetizado separadamente como diastereômeros de configuração ótica. Em resumo: após acoplamento de Fmoc-DAGl(Boc)-OH na posição 7, o grupo Boc de proteção de cadeia lateral foi removido com 60% de TFA, lavado, neutralizado e a 0,9 g de resina de peptídeo (0,36 mmol/g) dilatado em diclorometano, Dod-Cl (130 mg; 0,5 mmol) foi adicionado juntamente com DIEPA (500 µL). A mistura foi agitada durante uma hora para completar a alquilação. A resina foi lavada, e misturada após a adição de formaldeído (2 mL, 37% de solução) em NMP (18 mL) e ácido acético (100 µL). Após 5 minutos, cianoboro-hidreto de sódio (300 mg) foi adicionado e a mistura foi agitada durante 60 minutos. Após a remoção do grupo Dod com TFA (60%) durante 30 minutos, cloreto de benzoíla (500 µL) foi usado para acilar o grupo amino secundário livre da cadeia lateral (Kaljuste K. e Undén, A., *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 42:118-124, 1993). A remoção do grupo de proteção de N^α-Fmoc com 20% de piperidina em NMP em dois tratamentos sucessivos de 5 e 15 minutos foi seguida pelo protocolo de prolongamento padrão até a conclusão do peptídeo. O peptídeo foi clivado, desprotegido e ciclizado. Em HPLC, este diastereômero de configuração D coeluído com o diastereômero de eluição precoce da síntese realizada com o aminoácido não resolvido, portanto, o peptídeo de eluição mais lenta (9) foi experimentalmente identificado como o análogo contendo L-Agl (NMe, benzil)⁷.

[0102] Geralmente, para a síntese dos conjugados de DOTA-peptídeo, a cadeia lateral de Lys⁹ foi protegida com um grupo de proteção de Fmoc que permanece após a clivagem de HF. A uma solução do antagonista de [Lys(Fmoc)⁹]sst purificado por RP-HPLC

[Lys(Fmoc)⁹]-sst₂ (~20 µM) em DMF seco (800 µL) foi adicionada uma solução de DOTA-NHS-éster (38 mg, 48 µM) em DMF (160 µL) e N,N'-di-isopropiletilamina (DIPEA) (40 µL, 24 µM). A mistura foi agitada em temperatura ambiente durante 5 horas. O progresso da reação foi seguido por HPLC analítica. Após a conclusão da reação, uma purificação por RP-HPLC preparativa foi realizada fornecendo o antagonista DOTA-[Lys(Fmoc)]⁹-sst₂ puro. A remoção do grupo de proteção Fmoc da cadeia lateral Lys foi obtida com 20% de solução de piperidina/DMF resultando no antagonista de DOTA-sst₂, que foi também purificado por RP-HPLC preparativa.

[0103] Purificação de Peptídeos. Os peptídeos liofilizados brutos foram purificados por RP-HPLC preparativa em um cartucho de 5 × 30 cm, empacotados no laboratório com fase reversa 300Å Vydac C₁₈ sílica (tamanho de partícula de 15 a 20 µm). Os peptídeos eluídos com uma taxa de fluxo de 100 mL/minuto usando um gradiente linear de 1% de B durante 3 minutos para aumento do % de B (Eluente A = 0,25 N de TEAP pH 2,25, eluente B = 60% de CH₃CN, 40% de A). Todos os peptídeos foram submetidos a uma segunda etapa de purificação realizada com os eluentes A = 0,1 % de TFA em água e B = 60% de CH₃CN/40% de A no mesmo cartucho usando um gradiente linear de 1% de B por 3 minutos para aumento do % de B de preferência. Análise por HPLC analítica da purificação foi realizada em uma coluna Vydac C₁₈ (0,46 × 25 cm, tamanho de partícula de 5 µm, tamanho de poro de 300Å) conectada a um injetor Rheodyne, duas bombas Waters Model 501, System Controller Programmer, detector Kratos 750 UV, e registradora de diagrama de faixa Houston Instruments D-5000. As frações contendo o produto foram misturadas e submetidas à liofilização.

[0104] Caracterização de análogos de SRIF (figura 4). A pureza dos peptídeos finais foi determinada por RP-HPLC analítica realizada

com um gradiente linear de usando TEAP a 0,1 M pH 2,5 como eluente A e 60% de CH₃CN/40% de A como eluente B em uma Cromatografia Líquida Hewlett-Packard Series II 1090 conectada a uma coluna Vydac C₁₈ (0,21 × 15 cm, tamanho de partícula de 5 µm, tamanho de poro de 300 Å), Controller Model 362 e uma impressora Think Jet. Análise por eletroforese de zona capilar (CZE) foi realizada. Cada peptídeo foi verificado ter uma pureza de >95% por HPLC e CZE. Os espectros de massa (MALDI-MS) foram avaliados em um instrumento ABI-Perseptive DE-STR. O instrumento emprega um laser de nitrogênio (337 nm) em uma taxa de repetição de 20 Hz. A voltagem de aceleração aplicada foi de 20 kV. Os espectros foram registrados em um modo de extração retardada (300 ns de retardo). Todos os espectros foram registrados no modo de refletor positivo. Os espectros foram somas de 100 jatos de laser. Ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico matriz foi preparado como soluções saturadas em ácido trifluoroacético a 0,3% e acetonitrila a 50%. Os valores monoisotópicos (M + H)⁺ observados de cada peptídeo correspondem com os valores (M + H)⁺ calculados.

[0105] Reagentes. Todos os reagentes foram do melhor grau disponível e foram adquiridos de fornecedores comuns. [Tyr³]-octreotida (Reubi, J., *Neurosci. Lett.*, 49:259-26, 1984) foi de Novartis Inc. (Basel, Switzerland). Todos os outros peptídeos, incluindo Coy-14 (Rajeswaran, W. e outros, *J. Med. Chem.*, 44:1305-1311, 2001) foram sintetizados no Salk Institute. O anticorpo R2-88 ao receptor de sst_{2A} foi gerado como anteriormente descrito e foi extensivamente caracterizado (Gu, Y. e Schonbrunn, A., *Mol. Endocrinol.*, 11:527-537, 1997). O Segundo anticorpo IgG anticoelho de cabra Alexa Fluor 488 (H+L) foi de Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR), o anticorpo anti-T7 monoclonal de Novagen (Madison, WI), o conjugado de rábano picante peroxidase anticamundongo de cabra de Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, OR); o Fluo-4NW Calcium Assay kit foi de Molecular Probes, Inc. (Eu-

gene, OR), a mistura de substrato para rábano picante peroxidase (ABTS) foi de Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, OR), hidrolisado de lactalbumina foi de HyClone (Logan, UT).

[0106] Linhagens celulares. As células CHO-K1, CCL39 estavelmente expressando os cinco ssr_5 humanos clonados e a linhagem celular HEK293 expressando o receptor de ssr_{2A} humano marcado por epítipo T7 (HEK- ssr_2) foram desenvolvidas como descrito aqui. Todos os reagentes de cultura foram de Gibco BRL, Life Technologies, (Grand Island, NY).

[0107] Autorradiografia de receptor. Os péletes de membrana celular foram preparados como anteriormente descrito, e armazenados a -80°C . Autorradiografia de receptor foi realizada em seções de criostato espesso de $20\text{ }\mu\text{m}$ (Microm HM 500, Walldorf, Alemanha) dos péletes de membrana, montado em lâminas de microscópio, e em seguida armazenado a -20°C . Para cada um dos compostos testados, experimentos de deslocamento completo com radioligante de SRIF universal [Leu^8 , D-Trp 22 , ^{125}I -Tyr 25]-SRIF-28 (^{125}I -[LTT]-SRIF-28) (2,000 Ci/mmol; Anawa, Wangen, Switzerland) usando 15,000 cpm/100 μL e concentrações crescentes do peptídeo não marcado variando de 0,1 a 1000 nM foram realizados. Como controle, SRIF-28 não marcado foi conduzido em paralelo usando as mesmas concentrações crescentes. As seções foram incubadas com ^{125}I -[LTT]-SRIF-28 durante 2 horas em temperatura ambiente em 170 mmol/L de tampão de Tris-HCl (pH 8,2), contendo 1% de BSA, 40 mg/L de bacitracina, e 10 mmol/L de MgCl_2 para inibir proteases endógenas. As seções incubadas foram lavadas duas vezes durante 5 minutos em 170 mmol/L de Tris-HCl frio (pH 8,2) contendo 0,25% de BSA. Após um breve mergulho em água destilada para remover o excesso de sais, as seções foram secadas rapidamente e expostas durante uma semana à película Kodak BioMax MR. Os valores de IC_{50} foram calculados após quantificação dos dados usando

um sistema de processamento de imagem assistida por computador. Os padrões de tecido (Autoradiographic [^{125}I] microscales, GE Healthcare; Little Chalfont, UK) que contêm quantidades conhecidas de isótopo, transversalmente calibrados para concentrações de ligante de equivalente de tecido foram usados para quantificação (Reubi, J., *J. Nucl. Med.*, 36:1846-1853, 1995).

[0108] Ensaio de sst2 de internalização com base em imunofluorescência. O ensaio de internalização com base em microscopia de imunofluorescência para sst₂ foi realizado com HEK-sst₂ usando o anticorpo R2-88 específico de sst₂. As células HEK-sst₂ foram tratadas com o veículo sozinho, o agonista de sst₂ [Tyr³]-octreotida em uma concentração de 100 nM, [Tyr³]-octreotida em uma concentração de 100 nM na presença de um excesso dos análogos de SRIF a serem testados (100 vezes a concentração de [Tyr³]-octreotida), ou com os análogos de SRIF a serem testados sozinhos em uma concentração de 10 μM , e em seguida preparadas para microscopia de imunofluorescência.

[0109] Ensaio quantitativo para internalização de sst2 (ELISA). A internalização de receptor foi determinada usando um ELISA para quantificar o sst₂ humano marcado por epítipo T7 na superfície celular. As células HEK-sst₂ foram semeadas em placas de 24 cavidades revestidas por poli-D-lisina (20 $\mu\text{g/mL}$) (250.000 células por cavidade) em um meio de crescimento e cultivadas durante um dia a 37°C e CO₂ a 5%. No dia do ensaio, as células foram incubadas com o anticorpo anti-T7 monoclonal em uma diluição de 1:3000 durante 2 horas em temperatura ambiente em DMEM contendo 5 g/L de hidrolisado de lactalbumina +20 mM de HEPES, pH 7,4 (DMEM-LH) para rotular os receptores de superfície celular. Após lavagem com DMEM-LH para remover o anticorpo não ligado, as células foram incubadas durante 30 minutos a 37°C e CO₂ a 5% sem ou com os ligantes adicionados nas

concentrações indicadas. As incubações foram terminadas colocando as placas em um banho de gelo. As células foram em seguida lavadas duas vezes com PBS frio e fixadas durante 10 minutos em temperatura ambiente com 3% de paraformaldeído em PBS (pH 7,4). Os sítios de ligação não específicos foram bloqueados incubando as células durante 60 minutos em temperatura ambiente com PBS contendo 1% de Albumina de soro bovino (BSA; Fraction V; SERVA, Heidelberg, Alemanha). As células s foram em seguida incubadas durante 60 minutos em temperatura ambiente com conjugado de IgG rábano picante peroxidase anticamundongo de cabra (1:1000) em PBS contendo 1% de BSA. Após três lavagens adicionais com PBS, a ligação de anticorpo foi avaliada adicionando 0,3 mL de mistura de substrato de rábano picante peroxidase (ABTS). O OD₄₀₅ foi avaliado após uma incubação de aproximadamente 3 minutos em temperatura ambiente. A quantidade de sst₂ restante na superfície celular após o tratamento de ligante foi calculada como a absorção avaliada em células tratadas expressas como uma porcentagem da absorção em células não tratadas. A absorção não específica foi determinada em experimentos em que as células HEK293-sst2 foram incubadas sem o anticorpo anti-T7.

[0110] Cada ponto de tempo representa a média $\pm$ SEM de três experimentos realizados em duplicata.

[0111] Ensaio de liberação de cálcio. A liberação de cálcio intracelular foi avaliada em HEK-sst₂ usando o Fluo-4NW Calcium Assay kit como anteriormente descrito (Magrys, A. e outros, *J. Clin. Immunol.*, 27:181-192, 2007; Michel, N. e outro, *Mol. Biol. Cell.*, 17:3578-3590, 2006). Em resumo, as células HEK-sst₂ foram semeadas (25.000 células por cavidade) em placas de 96 cavidades revestidas por poli-D-lisina (20 μ g/mL) e cultivadas durante um dia a 37°C e 5% CO₂ em meio de cultura. No dia do experimento, as células foram lavadas com tampão de ensaio (1 $\times$ HBSS, 20 mM de HEPES) contendo 2,5 mM de

probenecida, e em seguida carregadas com 100 μL /cavidade do corante Fluo-4NW em tampão de ensaio contendo 2,5 mM de probenecida durante 30 minutos a 37°C e CO₂ a 5% em seguida durante mais 30 minutos em temperatura ambiente. Para avaliar a mobilização de cálcio intracelular após estimulação com os análogos de SRIF a serem testados, as células carregadas com corante foram transferidas para um SpectraMax M2^e (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). A mobilização de cálcio intracelular foi registrada em uma cinética durante 60 segundos em temperatura ambiente monitorando a emissão de fluorescência a 520 nm (with λ_{ex} = 485 nm) na presença dos análogos nas concentrações indicadas. Fluorescência máxima (F_{max}) foi avaliada após a adição de 25 μM de ionomicina. As avaliações de referência (controle) foram assumidas por células não tratadas, carregadas com tinta. Os dados são mostrados como porcentagem de F_{max} (% F_{max}). Todos os experimentos foram repetidos pelo menos três vezes em triplicata.

[0112] Todos os análogos mostrados na figura 4 foram sintetizados manualmente ou automaticamente em uma resina de MBHA usando a estratégia de Boc, di-isopropilcarbodi-imida (DIC)/HOBt (1-hidroxibenzotriazol) para formação de ligação de amida e ácido trifluoroacético (TFA) para remoção de Boc. As resinas de peptídeo foram tratadas com fluoreto de hidrogênio (HF) na presença de recuperadores para liberar os peptídeos lineares brutos totalmente desprotegidos. A ciclização das cisteínas foi mediada por iodo em um meio ácido. A purificação foi realizada usando múltiplas etapas de HPLC. DOTA foi acoplado aos análogos protegidos por Lys(Fmoc)⁹ em solução. A pureza dos peptídeos foi caracterizada por HPLC, eletroforese de zona capilar e espectrometria de massa. Os valores de massa monoisotópica de $(M + H)^+$ de cada peptídeo correspondem aos valores de massa calculada (M).

[0113] Para investigar suas propriedades de ligação de ss_{ts} , os peptídeos foram testados quanto a sua capacidade de ligar-se às seções de criostato de péletes de membrana de células expressando os cinco ss_{ts} humanos (figura 5). Para cada um dos compostos testados, experimentos de deslocamento completo com radioligante de SRIF universal [Leu⁸,DTrp^{22,125}]-Tyr²⁵]SRIF-28 usando concentrações crescentes do peptídeo não marcado variando de 0,1 a 1000 nM foram realizados. O SRIF-28 não marcado foi conduzido em paralelo usando as mesmas concentrações crescentes, como um controle.

[0114] Inversão da quiralidade nas posições 2 e 3 no andaime de octreotida (H-DPhe²-c[Cys³-Phe⁷-DTrp⁸-Lys⁹-Thr¹⁰-Cys¹⁴]-Thr¹⁵-ol, numeração de SRIF) foi reportada ser a modificação estrutural chave convertendo um agonista de SRIF em um antagonista. Substituições adicionais resultaram em antagonistas parcialmente seletivos Acetil-pNO₂Phe-c[DCys-Tyr-DTrp-Lys-Thr-Cys]-DTyr-NH₂ ou H-Cpa-c[DCys-Tyr-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2NaI-NH₂. Estes antagonistas exibem, preferivelmente afinidade de ligação elevada em relação a ss_2 , e baixa ou nenhuma afinidade em relação a ss_3 , ss_4 e ss_5 . Nenhum dos análogos liga-se a ss_1 . Usando estes compostos induzidos, os antagonistas de SRIF que foram mais afins (> 3 vezes) e mais seletivos de ss_2 do que aqueles reportados até agora foram designados (Bass, R. e outros, *Mol. Pharmacol.*, 50:709-715, 1996; Hocart, S. e outro, *J. Med. Chem.*, 42:1863-1871, 1999).

[0115] Os análogos de antagonistas como Acetil-pNO₂Phe²-c[DCys³-Tyr⁷-DTrp⁸-Lys⁹-Thr¹⁰-Cys¹⁴]-DTyr¹⁵-NH₂ (1) e H-Cpa²-c[DCys³-Tyr⁷-DTrp⁸-Lys⁹-Thr¹⁰-Cys¹⁴]-2NaI¹⁵-NH₂ (7) foram sintetizados para investigar o efeito de diferentes substituições sobre a afinidade de ligação, seletividade de subtipo de receptor, hidrofobicidade total bem como agonismo e antagonismo.

[0116] A substituição do grupo acetila de N-terminal por DOTA em

1 ($IC_{50} = 3,6$ nM em ss_{t2}) resultou em 2, que se liga a ss_{t2} com um $IC_{50} = 1,5$ nM sugerindo que a porção DOTA, que é crucial para a radio-marcção com ^{111}In , ^{90}Y , ou ^{177}Lu para alveijamento *in vivo*, é bem tolerada por ss_{t2} (figura 5).

[0117] A introdução de D ϕ (Cbm)⁸ no lugar de DTrp⁸ em 2 produziu 3 ($IC_{50} = 0,75$ nM). É notável que estas duas substituições sejam cumulativas, desse modo resultando no antagonista de ss_{t2} mais potente nesta série, com nenhuma afinidade de ligação mensurável em relação a qualquer um dos outros receptores. Outra substituição de DTyr¹⁵ em 3 por 2Nal¹⁵ produziu 5 com uma afinidade de ligação similar em relação a ss_{t2} ($IC_{50} = 1,3$ nM). O análogo 4, um peptídeo com a mesma sequência como 5, porém sem DOTA em seu N-terminal teve ainda excelente afinidade de ligação em relação a ss_{t2} ($IC_{50} = 2.6$ nM) e também ligou-se mensuravelmente a ss_{t3} ($IC_{50} = 384$ nM). A substituição de Tyr na posição 7 por ϕ (Hor) resultando em 6 não teve nenhum efeito sobre a seletividade e afinidade de ligação de ss_{t2} quando comparada com o 4 origem ($IC_{50} = 2,6$ e $2,7$ nM em ss_{t2} e 384 nM e 451 nM em ss_{t3} , respectivamente, e nenhuma afinidade de ligação nos outros três receptores) (figura 5).

[0118] H-Cpa²-c[DCys³-Tyr⁷-DTrp⁸-Lys⁹-Thr¹⁰-Cys¹⁴]-2Nal¹⁵-NH₂ (7) foi também usado como uma segunda orientação para os antagonistas seletivos de ss_{t2} . Este antagonista tem valores de IC_{50} no ensaio de ligação iguais a $15,7$, 112 e 218 nM em $ss_{t2/3/5}$, respectivamente, como comparado aos valores reportados de 26 , 93 e 48 nM. Nos ensaios 7 é mais potente do que reportado em ss_{t2} por um fator de cinco e menos potente em ss_{t5} pelo mesmo fator.

[0119] Visto que a N^α-metilação de Lys⁹ em 7 para produzir 8 aumentou a afinidade de ligação 5 vezes em ss_{t2} ($K_i = 26$ nM e $5,51$ nM, respectivamente) com nenhuma melhora em ss_{t3} ou ss_{t5} , ($K_i =$ ca. 50 - 100 nM) os resultados aqui não mostrando nenhuma tal melhora em

sst₂ não suportam esta observação e, como um resultado, o uso desta substituição no planejamento de análogos seletivos de sst₂ adicionais não foi usado. Em vez disso, 9 foi sintetizado com L-Agl(NMe,benzoil)⁷ em uma tentativa de restringir a orientação da cadeia lateral na posição 7. O uso de tais derivados de aminoglicina (betidas) tirou vantagem do planejamento de um antagonista seletivo de sst₃. Ao mesmo tempo que 9 perdeu alguma afinidade de ligação em relação a sst₂ (3 vezes) quando comparável àquela de 7, ele também perdeu afinidade de ligação comparável em relação a sst₃ e sst₅. Esta observação também sugere que a posição 7 é crítica para todos os três sst_{2,3,5}. De fato, 10 com o D-Agl(NMe,benzoil)⁷ perdeu afinidade de ligação em sst₂ ao mesmo tempo que retendo afinidades de ligação similares como 7 em sst_{3/4/5}, desse modo realizando um dos objetivos da identificação do ou daqueles resíduos/conformações responsáveis pela ligação a qualquer receptor particular (sst₂ neste caso).

[0120] Visto que a substituição de Phe por Leu na posição 7 em 7 produziu 11 que perdeu 10 vezes a afinidade de ligação em relação a sst₂ e seletividade, a substituição por Aph(Cbm) produziu 12, que exibiu afinidade de ligação e seletividade similares como 7 nos cinco sst_s. A carbamoilação do N-terminal de 12 para produzir 13, melhorou ligeiramente a afinidade de ligação em sst_{3/4} com alguma perda de afinidade de ligação em relação a sst₂ quando comparado a 12. A adição de DOTA a 12 resultou em 14 cuja afinidade de ligação de sst₂ é similar àquela de 12 e seletividade aumentada em relação a sst₂. Interessantemente, a adição de um espaçador em n 14 entre DOTA e o octapeptídeo tal como βAla em 15 e Peg em 16 foi inesperadamente prejudicial em termos de afinidade de ligação de sst₂ ainda favorável para sst₃ e neutra em sst_{1/4/5} (Chen, X. e outro, *J. Nucl. Med.*, 45:1776-1783, 2004; Antunes, P. e outro, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 34:982-983, 2007).

[0121] A partir da observação de que 2Nal¹⁵ pode contribuir para a bolsa de ligação de sst₃, sst₄, e sst₅, 17 (ausente este resíduo) foi sintetizado e verificado ter afinidades de ligação similares quando comparado ao 12 origem. A substituição de 2Nal¹⁵ em 12 por outros resíduos diferentes tais como Cha em 18, Aph(Hor) em 19, DAph(Cbm) em 20 e Aph(Cbm) em 21 não influenciaria acentuadamente a afinidade em sst₂ ou seletividade. É digno de nota o fato de que existe apenas uma diferença de 3 vezes na afinidade de ligação em sst₂ em relação a 20 (configuração D e IC₅₀ = 5,4 nM) e 21 (configuração L e IC₅₀ = 15 nM) em que o aminoácido de C-terminal é da configuração D ou L, respectivamente. Isto suporta a observação anterior de que DTyr (como em 1 e 2) ou 2Nal (como em 4 e 5) são ambos igualmente aceitos. Por outro lado, a extensão da sequência de 20 por Glicina-OH como em 22 induz à perda significativa de afinidade em todos os receptores.

[0122] Para modular a hidrofiliidade total de 7 (com Tyr na posição 7), os seguintes carbamatos (Aph(Cbm)⁷) 12, (Aph(CONH-OCH₃)⁷) 23 e (Aph(CONH-OH)⁷) 24 foram introduzidos na posição 7. Visto que as afinidades de ligação em relação a estes análogos não são diferentes daquelas do 7 origem, a ordem de eluição destes análogos em HPLC em pH neutro sugere que 24 (RT = 31,6 minuto) pode ser mais hidrofílico do que 7 (RT = 34,8 minuto), 12 (RT = 31,9 minuto) e 23 (RT = 34,2 minuto). Visto que a hidrofiliidade pode ser um critério crítico para um radioligante clinicamente relevante, diferenças sutis na estrutura podem favorecer um destes análogos quando selecionando um candidato clínico. O fato de que 12, 23 e 24 não são superiores a 7 em termos de afinidade de ligação e seletividade de sst₂, suporta a constatação de que o resíduo 7 não é um contribuidor essencial para o farmacóforo de sst₂.

[0123] O efeito das substituições na posição 8 foi em seguida investigado. É possível que 5F-Trp seja uma substituição favorável para

Trp⁸ (Meyers, C. e outro, *Biochemistry*, 17:2326-2330, 1978). Quando introduzido em 12, para produzir 25 e 26, uma leve melhora na afinidade de ligação em relação aos três sst_{2/3/5} foi observada como esperado pelo 25 contendo 5F-DTrp, e menos então para o correspondente 26 contendo o isômero L. Nenhum aumento na seletividade, entretanto, foi observado em relação a qualquer análogo.

[0124] Foi gratificante a constatação de que a substituição de DTrp⁸ em 7 por DAph(Cbm)⁸ produzindo 27 foi claramente superior em termos de seletividade de sst₂ com afinidade de ligação melhorada. Outra derivação com a adição de DOTA no N-terminal produziu 28 com aumento adicional na afinidade de ligação para sst₂ e seletividade maior do que 500 vezes em todos os outros receptores.

[0125] A substituição de Tyr⁷ em 27 e 28 com Aph(Hor) produziu 29 e 30. Visto que 29 reteve afinidade de ligação elevada em sst₂ ele também exibiu afinidade de ligação moderada em relação a sst₃; a afinidade de ligação em sst₃ foi perdida na introdução de DOTA (30). A substituição de Tyr⁷ em 2 com ITyr produziu 32, a afinidade de ligação do qual foi similar àquela de 2 em sst₂.

[0126] 2Nal¹⁵ em 30 foi em seguida substituído por DTyr¹⁵ para produzir 31. Dos análogos apresentados neste exemplo, 31 (por causa de sua hidrofiliabilidade, RT = 13,2 minuto) pode ser o candidato preferido para a biodistribuição e finalmente para investigação clínica sobre 3 (RT = 13,6 minuto), 5 (RT = 26,1 minuto), 28 (RT = 26,7 minuto), 29 (RT = 27,7 minuto) ou 32 (RT = 25,0 minuto) que são igualmente potentes e seletivos no ensaio de ligação. É notável que a sequência de dipeptídeo -Aph(Hor)-DAph(Cbm)- encontrada em 29-31 é idêntica àquela encontrada em degarelix (Fe-200486), um antagonista de hormônio de liberação de gonadotropina em que desempenhou um papel crítico na estabilização de uma ciclo e na duração prolongada da ação.

[0127] Colocado em perspectiva, os antagonistas contendo DOTA

mais afim apresentados neste exemplo (3 e 31) têm afinidades três a quatro vezes maior do que aqueles de SRIF-28 sem nenhuma afinidade de ligação detectável em qualquer um dos quatro ss_{ts} e, são, portanto, candidatos potenciais para uso clínico.

[0128] Todos os análogos testados neste exemplo são antagonistas no ensaio de liberação de cálcio em células HEK293 estavelmente expressando o ss_{t2} humano. Testando-os sozinhos, eles não afetam a liberação de cálcio até 10 μ M. O efeito agonístico do agonista [Tyr³]-octreotida de ss_{t2} , entretanto, pode ser competitivamente antagonizado com um excesso de 100 vezes de cada um dos análogos aplicados individualmente. A figura 1 ilustra as propriedades antagonísticas de alguns dos antagonistas de ss_{t2} usando o ensaio de liberação de cálcio.

[0129] A propriedade antagonística dos análogos 3, 31 e 32 foi também confirmada em um ensaio de internalização com base em imunofluorescência (Cescato, R. e outros, *J. Nucl. Med.*, 47:502-511, 2006) com células HEK293 estavelmente expressando o ss_{t2} humano. A figura 2 ilustra que, embora o agonista [Tyr³]-octreotida de controle possa reduzir a internalização de ss_{t2} , os antagonistas seletivos de ss_{t2} testados não têm nenhum efeito quando fornecidos sozinhos, mesmo em uma concentração de 10 μ M. Além disso, eles previnem a internalização de ss_{t2} induzida por [Tyr³]-octreotida. A figura 3 mostra as propriedades antagonísticas de outro análogo (32) no ensaio de internalização ELISA.

[0130] Para concluir, uma grande maioria dos análogos reportados neste exemplo tem uma ligação de afinidade elevada na faixa nanomolar com relação a ss_{t2} e frequentemente uma seletividade elevada em relação a ss_{t2} igualmente. Os melhores compostos foram 3 e 31 (com valores de IC_{50} abaixo de 1 nM) seguidos por 32, 5, 28, 2 e 29. Todos estes antagonistas são de interesse particular, visto que todos

eles incluem uma porção DOTA, tornando-os candidatos para alveijamento de tumor *in vivo*.

[0131] Referências aos análogos específicos neste exemplo são como segue:

- (1) Ac-pNO₂Phe-c[DCys-Tyr- DTrp-Lys-Thr-Cys]-DTyr- NH₂;
- (2) DOTA-pNO₂Phe-c[DCys-Tyr- DTrp-Lys-Thr-Cys]-DTyr-NH₂;
- (3) DOTA-pNO₂Phe-c[DCys-Tyr- DAph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]-DTyr-NH₂;
- (4) H₂N-pNO₂Phe-c[DCys-Tyr- DAph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂;
- (5) DOTA- pNO₂Phe-c[DCys-Tyr- DAph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂;
- (6) H₂N-pNO₂Phe-c[DCys-Aph(Hor)-DAph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂;
- (7) H₂N-Cpa-c[DCys-Tyr-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal- NH₂;
- (8) H₂N-Cpa-c[DCys -Tyr-DTrp-NMeLys-Thr-Cys]-2Nal- NH₂;
- (9) H₂N-Cpa-c[DCys -L-Agl(NMe.benzoil)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal- NH₂;
- (10) H₂N-Cpa-c[DCys -D-Agl(NMe.benzoil)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal- NH₂;
- (11) H₂N-Cpa-c[DCys -Leu-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal- NH₂;
- (12) H₂N-Cpa-c[DCys -Aph(Cbm)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂;
- (13) Cbm-Cpa-c[DCys -Aph(Cbm)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂;
- (14) DOTA-Cpa-c[DCys -Aph(Cbm)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂;
- (15) DOTA-βAla-Cpa-c[DCys -Aph(Cbm)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂;

- (16) DOTA-Peg-Cpa-c[DCys -Aph(Cbm)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂;
- (17) H₂N-Cpa-c[DCys -Aph(Cbm)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-NH₂;
- (18) H₂N-Cpa-c[DCys -Aph(Cbm)-DTrp-Lys-Thr-Cys]- Cha-NH₂;
- (19) H₂N-Cpa-c[DCys -Aph(Cbm)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-Aph(Hor)- NH₂;
- (20) H₂N-Cpa-c[DCys -Aph(Cbm)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-Daph(Cbm)- NH₂;
- (21) H₂N-Cpa-c[DCys -Aph(Cbm)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-Aph(Cbm)- NH₂;
- (22) H₂N-Cpa-c[DCys -Aph(Cbm)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-Daph(Cbm)-GlyOH;
- (23) H₂N-Cpa-c[DCys -Aph(CONH-OCH₃)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂;
- (24) H₂N-Cpa-c[DCys -Aph(CONH-OH)-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂;
- (25) H₂N-Cpa-c[DCys -Aph(Cbm)-5F-DTrp-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂;
- (26) H₂N-Cpa-c[DCys -Aph(Cbm)-5F-Trp-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂;
- (27) H₂N-Cpa-c[DCys -Tyr-Daph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂;
- (28) DOTA-Cpa-c[DCys -Tyr-Daph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂;
- (29) H₂N-Cpa-c[DCys -Aph(Hor)-Daph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂;
- (30) DOTA-Cpa-c[DCys -Aph(Hor) -Daph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]-2Nal-NH₂;
- (31) DOTA-Cpa-c[DCys -Aph(Hor) -Daph(Cbm)-Lys-Thr-

Cys]-DTyr-NH₂; e

(32) DOTA- pNO₂Phe-c[DCys -ITyr -DTrp-Lys-Thr-Cys]-DTyr-NH₂.

Exemplo 11.

[0132] Os análogos de peptídeo adicionais foram sintetizados e usados em ensaios para determinar suas biodistribuições em HEKs2 em vários pontos de tempo. Os dados de captação são mostrados nas figuras 6A e B.

[0133] A designação de análogos é como segue:

JR11: DOTA-Cpa-[DCys-Aph(Hor)-DAph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]DTyr-NH₂

LM3: DOTA-Cpa-[DCys-Tyr-DAph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]DTyr-NH₂

LM4: DOTA-Cpa-[DCys-Pal-DAph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]DTyr-NH₂

Tabela 12.

	IC ₅₀	% de Internalização 4 horas	HEKs2 de Captação de Tumor 24 horas	Relação de Tumor:Rim	LogD
JR11	0,7 ± 0,12	11,5 ± 0,5	23 ± 2,4	6,29	-2,5
LM3	0,45 ± 0,06	22,5 ± 2,4	24,4 ± 1,7	5,72	-2,14
LM4	0,5 ± 0,2	13,2 ± 0,9			-2,26

[0134] Todas as composições e métodos descritos e reivindicados aqui podem ser feitos e executados sem a devida experimentação levando em consideração a presente descrição. Enquanto as composições e métodos desta invenção foram descritos em termos de modalidades preferidas, será evidente para aqueles versados na técnica que várias variações podem ser aplicadas às composições e/ou métodos e nas etapas na sequência de etapas dos métodos descritos aqui sem afastar-se do conceito, espírito e escopo da invenção. Mais especificamente, será evidente que certos agentes que são quimicamente ou fisiologicamente relacionados podem ser substituídos pelos agentes

descritos aqui enquanto os resultados iguais ou similares seriam obtidos. Todos os tais substitutos similares e modificações evidentes para aqueles versados na técnica são considerados incluírem-se no espírito, escopo e conceito da invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Antagonista de somatostatina que se liga à SSTR2, caracterizado pelo fato de que é DOTA-Cpa-c[DCys-Tyr-DAph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]-DTyr-NH₂, em que Cpa é 4-CIPhe e Aph (Cbm) é 4-ureido-fenilalanina.

2. Antagonista de somatostatina, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que não é significativamente internalizado nas células expressando SSTR2, e reduz a internalização de SSTR2 induzida por octreotida.

3. Antagonista de somatostatina, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é preferivelmente captado por tumores em relação a outro tecido saudável.

4. Antagonista de somatostatina, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a relação de captação de antagonista em células de tumor para captação de antagonista em células de rim é de pelo menos cerca de 2,0, medida 4 horas após a administração.

5. Uso de uma composição para radioimagem de câncer, caracterizado pelo fato de que a composição compreende:

um antagonista da somatostatina, e
um radionuclídeo;

em que o antagonista de somatostatina é DOTA-Cpa-c[DCys-Tyr-DAph (Cbm) -Lys-Thr-Cys] -DTyr-NH₂, em que Cpa é 4-CIPhe e Aph(Cbm) é 4-ureido-fenilalanina.

6. Uso, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o antagonista de somatostatina se liga à SSTR2.

7. Uso, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o antagonista de somatostatina se liga seletivamente à SSTR2.

8. Uso de uma composição, caracterizado pelo fato de que

é para a fabricação de um medicamento para o tratamento de um tumor, em que a composição compreende um antagonista de somatostatina e um radionuclídeo, em que o antagonista de somatostatina é DOTA-Cpa-c[DCys-Tyr-DAph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]-DTyr-NH₂, em que Cpa é 4-CIPhe e Aph(Cbm) é 4-ureido-fenilalanina.

9. Uso, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o antagonista de somatostatina se liga seletivamente à SSTR2.

10. Kit para o radioimageamento diagnóstico de câncer, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) um antagonista de somatostatina em um recipiente adequado, em que o antagonista de somatostatina é:

(i) marcado com pelo menos um radionuclídeo;

(ii) não marcado e fornecido com pelo menos um radionuclídeo em um recipiente adequado para marcação; ou

(iii) não marcado e capaz de ser subsequentemente marcado com pelo menos um radionuclídeo; e

(b) instruções para uso,

em que o antagonista de somatostatina é:

DOTA-Cpa-c[DCys-Tyr-DAph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]-DTyr-NH₂, em que Cpa é 4-CIPhe e Aph(Cbm) é 4-ureido-fenilalanina.

11. Kit, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o antagonista de somatostatina se liga seletivamente à SSTR2.

12. Kit para o tratamento de câncer, caracterizado pelo fato de que compreende

(a) um antagonista de somatostatina em um recipiente adequado, em que, após a marcação do radionuclídeo do antagonista de somatostatina, o antagonista está presente em uma quantidade terapeuticamente eficaz para o tratamento de câncer, e em que o antago-

nista de somatostatina é:

- (i) marcado com pelo menos um radionuclídeo,
- (ii) não marcado, e fornecido com pelo menos um radionuclídeo em um recipiente adequado para marcação, ou
- (iii) não marcado, e capaz de ser subsequentemente marcado com pelo menos um radionuclídeo; e

(b) instruções para uso,

em que o antagonista de somatostatina é:

DOTA-Cpa-c[DCys-Tyr-DAph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]-DTyr-NH₂, em que Cpa é 4-CIPhe e Aph(Cbm) é 4-ureido-fenilalanina.

13. Kit, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o antagonista de somatostatina se liga seletivamente à SSTR2.

14. Composto para radioimageamento ou tratamento de câncer, caracterizado pelo fato de que compreende uma quantidade eficaz de um radionuclídeo acoplado a um antagonista de somatostatina, em que o antagonista se liga à SSTR2 e é DOTA-Cpa-c[DCys-Tyr-DAph(Cbm)-Lys-Thr-Cys]-DTyr-NH₂, em que Cpa é 4-CIPhe e Aph(Cbm) é 4-ureido-fenilalanina.

15. Composto, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que o antagonista se liga seletivamente à SSTR2, não é significativamente internalizado nas células expressando SSTR2, e reduz a internalização de SSTR2 induzida por octreotida.

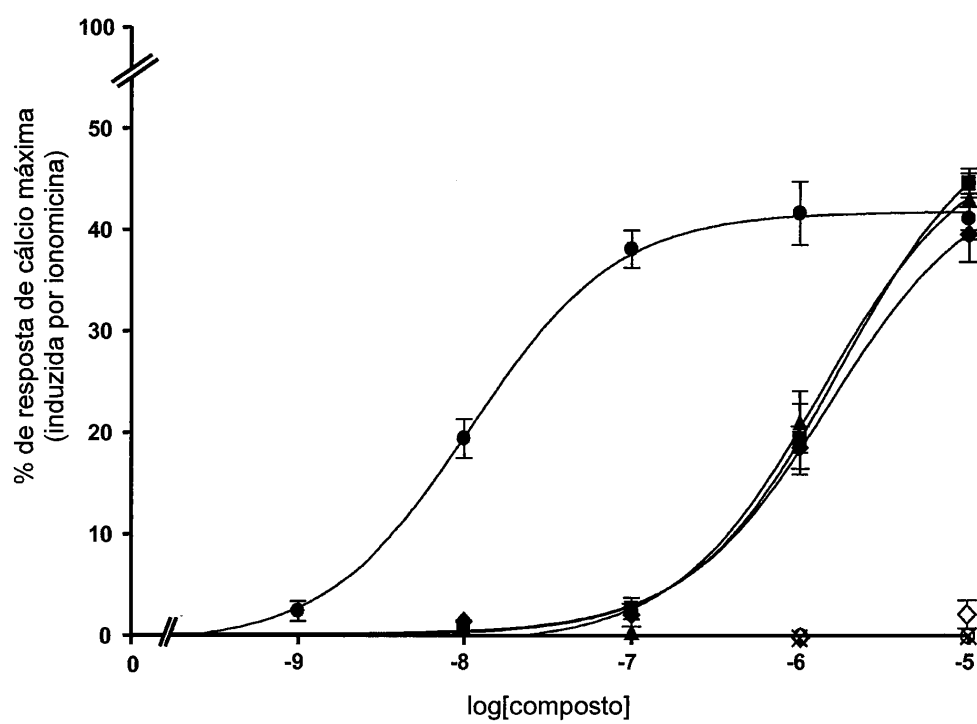


FIG. 1

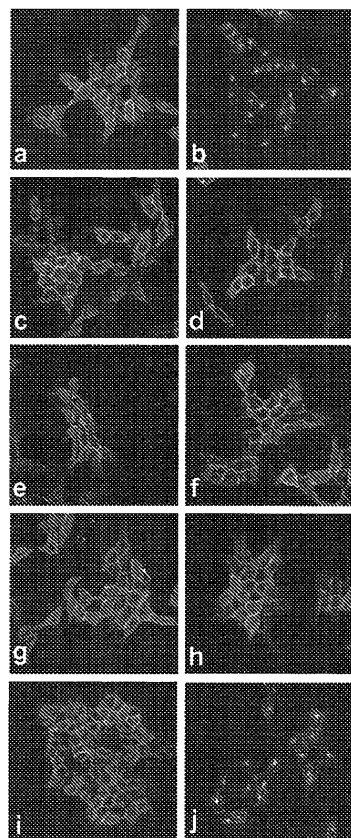


FIG. 2

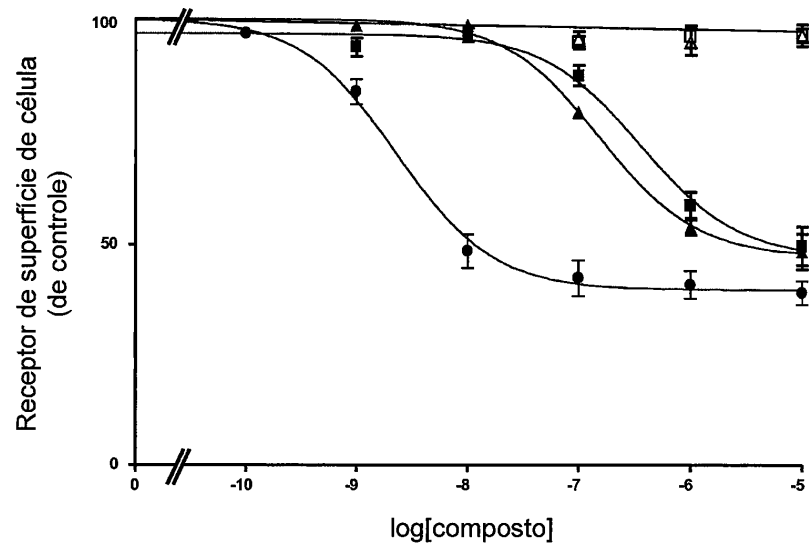


FIG. 3

FIG. 4

Estrutura de análogos de SRIF																			Pureza		MS ^c	
Os resíduos são numerados de acordo com a numeração de SRIF																			HPLC ^a	CZE ^b	M _{calc}	M+H _{obs}
H-Ala ¹ -Gly ² -c[Cys ³ -Lys ⁴ -Asn ⁵ -Phe ⁶ -Phe ⁷ -Trp ⁸ -Lys ⁹ -Thr ¹⁰ -Phe ¹¹ -Thr ¹² -Ser ¹³ -Cys ¹⁴]-OH (SRIF)																						
Substituição em H-D-Phe ² -c[Cys ³ -Phe ⁷ -D-Trp ⁸ -Lys ⁹ -Thr ¹⁰ -Cys ¹⁴ -Thr ¹⁵ -ol (octreotida)																			Terminal de C			
	Terminal de N	2	3	7	8	9	10	14	15													
1	Ac-	pNO ₂ -Phe-	D-Cys-	Tyr-	D-Trp-	Lys-	Thr-	Cys-	D-Tyr-									99	1196.44			
2	Trt ¹ -A-	pNO ₂ -Phe-	D-Cys-	Tyr-	D-Trp-	Lys-	Thr-	Cys-	D-Tyr-									95	1540.61			
3	Trt ¹ -A-	pNO ₂ -Phe-	D-Cys-	Tyr-	D-Trp-(Cbm)-	Lys-	Thr-	Cys-	D-Tyr-									99	1559.63			
4	H ₂ N-	pNO ₂ -Phe-	D-Cys-	Tyr-	D-Trp-(Cbm)-	Lys-	Thr-	Cys-	2-Nal-									99	1207.47			
5	Trt ¹ -A-	pNO ₂ -Phe-	D-Cys-	Tyr-	D-Trp-(Cbm)-	Lys-	Thr-	Cys-	2-Nal-									99	1593.65			
6	H ₂ N-	pNO ₂ -Phe-	D-Cys-	Asp ⁶ (H ₂ O)-	D-Trp-(Cbm)-	Lys-	Thr-	Cys-	2-Nal-									99	1346.50			
7	H ₂ N-	Cpa-	D-Cys-	Tyr-	D-Trp-	Lys-	Thr-	Cys-	2-Nal-									99	1177.43			
8	H ₂ N-	Cpa-	D-Cys-	Tyr-	D-Trp-	NMeLys-	Thr-	Cys-	2-Nal-									97	1191.45			
9	H ₂ N-	Cpa-	D-Cys-	L-Asp ⁶ (NMe ₂ , benzoyl)-	D-Trp-	Lys-	Thr-	Cys-	2-Nal-									95	1204.45			
10	H ₂ N-	Cpa-	D-Cys-	D-Asp ⁶ (NMe ₂ , benzoyl)-	D-Trp-	Lys-	Thr-	Cys-	2-Nal-									98	1204.45			
11	H ₂ N-	Cpa-	D-Cys-	L-Asp ⁶ -	D-Trp-	Lys-	Thr-	Cys-	2-Nal-									99	1127.45			
12	H ₂ N-	Cpa-	D-Cys-	Asp ⁶ (H ₂ O)-	D-Trp-	Lys-	Thr-	Cys-	2-Nal-									97	1219.45			
13	Trt ¹ -A-	Cpa-	D-Cys-	Asp ⁶ (H ₂ O)-	D-Trp-	Lys-	Thr-	Cys-	2-Nal-									96	1262.46			
14	Trt ¹ -A-	Cpa-	D-Cys-	Asp ⁶ (H ₂ O)-	D-Trp-	Lys-	Thr-	Cys-	2-Nal-									98	1605.64			
15	Trt ¹ -A-	Cpa-	D-Cys-	Asp ⁶ (H ₂ O)-	D-Trp-	Lys-	Thr-	Cys-	2-Nal-									99	1676.67			
16	Trt ¹ -A-	Cpa-	D-Cys-	Asp ⁶ (H ₂ O)-	D-Trp-	Lys-	Thr-	Cys-	2-Nal-									99	1809.62			
17	H ₂ N-	Cpa-	D-Cys-	Asp ⁶ (H ₂ O)-	D-Trp-	Lys-	Thr-	Cys-	-----									99	1022.37			
18	H ₂ N-	Cpa-	D-Cys-	Asp ⁶ (H ₂ O)-	D-Trp-	Lys-	Thr-	Cys-	Char-									96	1175.48			
19	H ₂ N-	Cpa-	D-Cys-	Asp ⁶ (H ₂ O)-	D-Trp-	Lys-	Thr-	Cys-	Aph(Hor)-									99	1324.47			
20	H ₂ N-	Cpa-	D-Cys-	Asp ⁶ (H ₂ O)-	D-Trp-	Lys-	Thr-	Cys-	D-Aph(Cbm)-									99	1227.45			
21	H ₂ N-	Cpa-	D-Cys-	Asp ⁶ (H ₂ O)-	D-Trp-	Lys-	Thr-	Cys-	D-Aph(Cbm)-									99	1227.45			
22	H ₂ N-	Cpa-	D-Cys-	Asp ⁶ (H ₂ O)-	D-Trp-	Lys-	Thr-	Cys-	D-Aph(Cbm)-									98	1285.46			

FIG. 1 (CONT.)

Estrutura de análogos de SRIF										Pureza		MS ^c	
Os resíduos são numerados de acordo com a numeração de SRIF										CZE ^b		M ^{calc}	
H-Ala ¹ -Gly ² -c[Cys ³ -Lys ⁴ -Asn ⁵ -Phe ⁶ -Phe ⁷ -Trp ⁸ -Lys ⁹ -Thr ¹⁰ -Phe ¹¹ -Thr ¹² -Ser ¹³ -Cys ¹⁴]-OH (SRIF)										HPLC ^a		M ^{calc}	
Substituição em H-D-Phe ² -c[Cys ³ -Phe ⁴ -D-Trp ⁵ -Lys ⁶ -Thr ⁷ -Lys ⁸ -Thr ⁹ -Cys ¹⁰ -Thr ¹¹ -Ile ¹² -Thr ¹³ -Val ¹⁴ -Ile ¹⁵ (octreotida)													
Terminal de N	2	3	7	8	9	10	14	15	Terminal de C				
23	H ₂ N -	D-Cys-	Asp(OH)(OMe)-	D-Trp-	Lys-	Thr-	Cys-	2-Nal-	NH ₂	99	1249.46	1250.56	
24	H ₂ N -	Cpa-	Asp(OH)(OMe)-	D-Trp-	Lys-	Thr-	Cys-	2-Nal-	NH ₂	99	1235.44	1236.47	
25	H ₂ N -	Cpa-	Asp(OH)(OMe)-	5F-D-Trp-	Lys-	Thr-	Cys-	2-Nal-	NH ₂	96	1237.44	1238.44	
26	H ₂ N -	Cpa-	Asp(OH)(OMe)-	5F-Trp-	Lys-	Thr-	Cys-	2-Nal-	NH ₂	96	1237.44	1238.24	
27	H ₂ N -	Cpa-	Tyr-	D-Asp(OH)(OMe)-	Lys-	Thr-	Cys-	2-Nal-	NH ₂	99	1196.43	1197.36	
28	H ₂ N -	Cpa-	Tyr-	D-Asp(OH)(OMe)-	Lys-	Thr-	Cys-	2-Nal-	NH ₂	99	1582.62	1583.72	
29	H ₂ N -	Cpa-	Asp(OH)(OMe)-	D-Asp(OH)(OMe)-	Lys-	Thr-	Cys-	2-Nal-	NH ₂	91	1335.47	1336.44	
30	H ₂ N -	Cpa-	Asp(OH)(OMe)-	D-Asp(OH)(OMe)-	Lys-	Thr-	Cys-	2-Nal-	NH ₂	95	1721.65	1722.56	
31	H ₂ N -	Cpa-	Asp(OH)(OMe)-	D-Asp(OH)(OMe)-	Lys-	Thr-	Cys-	pTyr-	NH ₂	96	1687.64	1688.83	
32	H ₂ N -	pNO ₂ -Phe-	pTyr-	D-Trp-	Lys-	Thr-	Cys-	pTyr-	NH ₂	99	1666.52	1667.74	

^a percentual de pureza determinado por HPLC usando sistema de tampão: A = TEAP (pH 2,5) e B = 60% de CH₃CN/40% com uma declividade de gradiente de 1% de B/minuto, em taxa de fluxo de 0,2 mL/minuto em uma coluna Vydac C₁₈ (0,21 x 15 cm, tamanho de partícula de 5 µm, tamanho de poro de 300 Å) Detecção a 214 nm. ^b Eletroforese de zona capilar (CZE) foi feita usando um Beckman P/ACE System 2050 controlado por um IBM Personal System/2 Model 50Z e usando um integrador ChromJet. Intensidade de campo de 15 kv a 30°C, fase móvel: 100 mM de fosfato de sódio (85:15, H₂O:CH₃CN) pH 2,50, em um capilar Supelco P175 (363 µm OD x 75 µm ID x 50 cm de comprimento. Detecção a 214 nm. ^c O m/z calculado do monoisótopo comparado com a massa monoisotópica [M + H]⁺ observada: 12

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

FIG. 5

	sst1 ^a	sst2 ^a	sst3 ^a	sst4 ^a	sst5 ^a	Internalização de sst ₂ testada <i>in</i> <i>vitro</i> em células HEK-sst ₂ (n≥2)	Liberação de cálcio testada em células HEK-sst ₂ (n≥2)
SRI							
F-28	2.7 ± 0.2	2.7 ± 0.2	3.3 ± 0.4	2.6 ± 0.4	2.4 ± 0.2		
1	>1000	3.6 ± 0.4	>1000	349 ± 30	276 ± 119	Antagonista	
2	>1000	1.5 ± 0.4	>1000	287 ± 27	>1000	Antagonista	Antagonista
3	>1000	0.75 ± 0.2	>1000	>1000	>1000	Antagonista	Antagonista
4	>1000	2.6 ± 0.7	384 ± 97	>1000	>1000	Antagonista	
5	>1000	1.3 ± 0.2	>1000	>1000	>1000	Antagonista	Antagonista
6	>1000	2.7 ± 0.6	451 ± 80	>1000	>1000		
7	>1000	5.7 ± 1.5	112 ± 32	296 ± 19	218 ± 63	Antagonista	Antagonista
8	>1000	10 ± 3.5	61 ± 14	715 ± 137	53 ± 19	Antagonista	Antagonista
9	>1000	17 ± 5	827 ± 244	>1000	442 ± 254	Antagonista	
10	>1000	158 ± 37	102 ± 10	116 ± 47	728 ± 272		
11	>1000	58 ± 21	340 ± 77	908 ± 138	657 ± 299		
12	>1000	6.9 ± 0.7	155 ± 29	479 ± 8	149 ± 37	Antagonista	Antagonista
13	>1000	23 ± 4.3	54 ± 15	136 ± 7.5	111 ± 17		
14	>1000	9.8 ± 1.2	972 ± 212	831 ± 82	>1000	Antagonista	Antagonista
15	>1000	46 ± 13	124 ± 53	>1000	>1000	Antagonista	Antagonista
16	>1000	40 ± 1.5	88 ± 13	728 ± 158	895 ± 294	Antagonista	
17	>1000	5.9 ± 1.8	138 ± 52	>1000	461 ± 106	Antagonista	Antagonista
18	>1000	4.1 ± 0.9	255 ± 79	>1000	247 ± 66		
19	>1000	27 ± 3.8	162 ± 19	>1000	320 ± 69		
20	>1000	5.4 ± 1	328 ± 69	800 ± 295	191 ± 49		
21	>1000	15 ± 3	336 ± 46	551 ± 151	560 ± 144		
22	>1000	52 ± 4.7	661 ± 115	>1000	810 ± 200		
23	>1000	9.3 ± 0.9	157 ± 49	883 ± 174	313 ± 35		
24	>1000	9.3 ± 1.4	120 ± 45	813 ± 152	426 ± 189		
25	>1000	4.9 ± 1.5	50 ± 5.8	287 ± 64	94 ± 34	Antagonista	Antagonista
26	>1000	23 ± 3.7	90 ± 11	905 ± 132	618 ± 248		

FIG. 5 (CONT)

27	>1000	3.7 ± 1.3	346 ± 81	>1000	>1000		
28	>1000	1.4 ± 0.5	>1000	>1000	>1000	Antagonista	Antagonista
29	>1000	2.4 ± 0.6	83 ± 2.0	>1000	>1000	Antagonista	Antagonista
30	>1000	1.7 ± 0.2	>1000	>1000	>1000	Antagonista	Antagonista
31	>1000	0.7 ± 0.12	>1000	>1000	>1000	Antagonista	Antagonista
32	>1000	1.2 ± 0.4	>1000	455 ± 125	>1000	Antagonista	Antagonista

^a Os valores de IC₅₀ (nM) foram derivados a partir de ensaios de deslocamento de radioligante competitivos refletindo as afinidades dos análogos quanto aos receptores de SRIF clonados usando o [Leu⁸, DTrp²², ¹²⁵I-Tyr²⁵]SRIF28 não seletivo, como o radioligante. Valor médio ± quando N ≥ 3.

Radioligante: ¹¹¹In-LM3

Animal: Camundongos nus transportando tumor de Hek sst2; 3 camundongos/grupo

Quantidade de injeção: 5 µCi / 10 pmol / 100 µl/camundongos

Ponto de tempo: 4h, 24h, 48h

	4h			24h			48h		
Sangue	0.18	±	0.03	0,03	±	0.02	0.03	±	0.01
Coração	0.26	±	0.07	0,10	±	0.01	0.11	±	0.00
Fígado	0.93	±	0.20	0,23	±	0.02	0.18	±	0.01
Baço	0.79	±	0.35	0,22	±	0.03	0.26	±	0.08
Pulmão	3.28	±	1.12	1,01	±	0.40	0.54	±	0.25
Rim	7.93	±	0.82	5,79	±	0.40	3.78	±	0.43
Estômago	17.61	±	0.70	3,33	±	0.51	3.16	±	0.72
Intestino	2.17	±	0.54	0,29	±	0.11	0.19	±	0.03
Adrenal	4.56	±	0.99	1,69	±	0.59	1.40	±	0.46
Pâncreas	20.01	±	16.87	2,99	±	0.63	1.68	±	0.54
Pituitário	10.42	±	5.45	4,54	±	2.51	0.04	±	0.00
Músculo	0.20	±	0.02	0,16	±	0.05	0.13	±	0.05
Osso	3.58	±	1.71	1,24	±	0.75	1.02	±	0.13
Tumor	42.18	±	2.20	27,96	±	4.35	15.02	±	2.52

Órgão	4h	24h	48 h
Tumor: Rim	5.32	4.83	3.97
Tumor: Fígado	45.11	122.15	85.80
Tumor: pâncreas	2.11	9.36	8.94
Tumor: sangue	231.02	846.05	583.53
Tumor: músculo	207.94	178.76	113.67

FIG. 6A

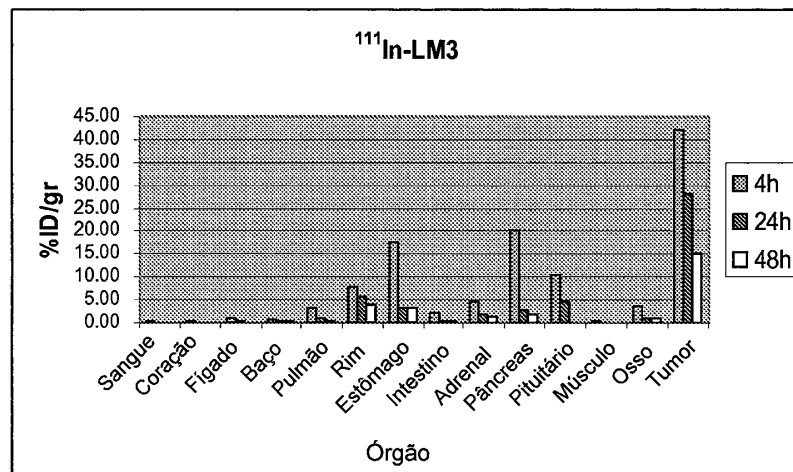


FIG. 6B