



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 284 859**

51 Int. Cl.:
C07K 14/655 (2006.01)
A61K 38/31 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02725077 .8**
86 Fecha de presentación : **06.03.2002**
87 Número de publicación de la solicitud: **1390406**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **25.02.2004**

54 Título: **Procedimiento para modular la proliferación de células de carcinoma medular tiroideo.**

30 Prioridad: **06.03.2001 US 273699 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2007

73 Titular/es: **Il Consorzio Ferrara Richerche
Universita Degli Studi di Ferrara
Corso Giovecca
44100 Ferrara, IT
SOCIÉTÉ DE CONSEILS DE RECHERCHES ET
D'APPLICATIONS SCIENTIFIQUES S.A.S.**

72 Inventor/es: **Degli Uberti, Ettore, Ciro;
Zatelli, Maria, Chiara y
Culler, Michael, DeWitt**

74 Agente: **Polo Flores, Carlos**

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para modular la proliferación de células de carcinoma medular tiroideo.

5 Antecedentes de la invención

Se ha demostrado que la somatostatina (SS), un tetradecapéptido descubierto por Brazeau y col., tiene potentes efectos inhibidores sobre varios procesos secretores en tejidos tales como la pituitaria, el páncreas y el tracto gastrointestinal. La SS también actúa como un neuromodulador en el sistema nervioso central. Estos efectos biológicos de la SS, todos de naturaleza inhibidora, son desencadenados a través de una serie de receptores acoplados a proteínas G, de los cuales se han caracterizado cinco subtipos diferentes (SSTR1 - SSTR5) (Reubi JC, y col., Cancer Res 47: 551-558, Reisine T, y col., Endocrine Review 16: 427-442, Lamberts SW, y col., Endocr Rev 12: 450-482, 4 Patel YC, 1999 Front Neuroendocrinology 20: 157-198). Estos cinco subtipos tienen unas afinidades similares por los ligandos endógenos de la SS, pero tienen una distribución diferente en diversos tejidos. La somatostatina se une a los cinco subtipos distintos de receptores (SSTR) con una afinidad relativamente alta e igual para cada subtipo.

Existen pruebas de que la SS regula la proliferación celular deteniendo el crecimiento celular a través de los subtipos de SSTR1, 2, 4 y 5 (Buscail L, y col., 1995 Proc Natl Acad Sci EE.UU. 92: 1580-1584; Buscail L, y col., 1994 Proc Natl Acad Sci EE.UU. 91: 2315-2319; Florio T, y col., 1999 Mol Endocrinol 13: 24-37; Sharma K, y col., 1999 Mol Endocrinol 13: 82-90), o induciendo apoptosis a través del subtipo SSTR3 (Sharma K, y col., 1996 Mol Endocrinol 10: 1688-1696). Se ha demostrado que la SS y diversos análogos inhiben la proliferación celular normal y neoplásica *in vitro* e *in vivo* (Lamberts SW, y col., Endocr Rev 12: 450-482) a través de receptores específicos de la SS (SSTR) (Patel YC, 1999 Front Neuroendocrinology 20: 157-198) y posiblemente en diferentes acciones postreceptor (Weckbecker G, y col., Pharmacol Ther 60: 245-264; Bell GI, Reisine T 1993 Trends Neurosci 16: 34-38; Patel YC, y col., Biochem Biophys Res Commun 198: 605-612; Law SF, y col., Cell Signal 7: 1-8). Además, existen pruebas de que los distintos subtipos de SSTR son expresados en tejidos humanos normales y neoplásicos (Virgolini I, y col., Eur J Clin Invest 27: 645-647), confiriendo diferentes afinidades tisulares para los diversos análogos de la SS y una respuesta clínica variable a sus efectos terapéuticos.

La unión a los diferentes tipos de subtipos de receptores de somatostatina se ha asociado con el tratamiento de diversas dolencias y/o enfermedades. Por ejemplo, la inhibición de la hormona del crecimiento se ha atribuido al receptor de la somatostatina de tipo 2 ("SSTR2") (Raynor, y col., Molecular Pharmacol. 43: 838 (1993); Lloyd, y col., Am. J. Physiol. 268: G102 (1995)), mientras que la inhibición de la insulina se ha atribuido al receptor de la somatostatina de tipo 5 ("SSTR5") (Coy, y col. 197: 366-371 (1993)). La activación de los tipos 2 y 5 se ha asociado con la supresión de la hormona del crecimiento, y más particularmente, de adenomas secretores de GH (acromegalia) y adenomas secretores de TSH. La activación del tipo 2 pero no del tipo 5 se ha asociado con el tratamiento de adenomas secretores de prolactina. Otras indicaciones asociadas con la activación de los subtipos de receptores de somatostatina incluyen la inhibición de la insulina y/o el glucagón para tratar la diabetes sacarina, angiopatías, retinopatía proliferativa, fenómeno del alba y nefropatías; inhibición de la secreción de ácido gástrico, y más particularmente de úlceras pépticas, fístulas enterocutáneas y pancreaticocutáneas, síndrome de intestino irritable, síndrome de evacuación gástrica rápida, síndrome de diarrea líquida, diarrea asociada al SIDA, diarrea inducida por quimioterapia, pancreatitis aguda o crónica y tumores secretores de hormona gastrointestinal; tratamiento del cáncer, tal como del hepatoma; inhibición de la angiogénesis; tratamiento de alteraciones inflamatorias tales como la artritis; retinopatía; rechazo crónico de alotransplantes; angioplastia; prevención de de las hemorragias de vasos trasplantados y gastrointestinales. Se prefiere tener un análogo que sea selectivo para el subtipo o subtipos de receptores específicos de la somatostatina responsables de la respuesta biológica deseada, reduciendo por tanto la interacción con otros subtipos de receptores que podría dar lugar a efectos secundarios indeseables.

La somatostatina (SS) y sus receptores (SSTR1 a SSTR5) se expresan en las células parafoliculares C normales humanas y en células de carcinoma medular tiroideo (CMT). El CMT es un tumor que se origina en las células parafoliculares C tiroideas que produce calcitonina (CT), somatostatina, así como otros diversos péptidos (Moreau JP, y col., Metabolism 45 (8 Suppl 1): 24-26). Recientemente, Mato y col. demostraron que la SS y los SSTR son expresados en el CMT humano (Mato E, y col., J Clin Endocrinol Metab 83: 2417-2420). Se ha documentado que la SS y sus análogos inducen una disminución en los niveles plasmáticos de CT y una mejora sintomática en los pacientes con CMT. Sin embargo, hasta ahora la actividad antiproliferativa de los análogos de la SS sobre las células tumorales no había sido demostrada claramente (Mahler C, y col., Clin Endocrinol 33: 261-9; Lupoli G, y col., Cancer 78: 1114-8; Smid WM, y col., Neth J Med 40: 240-243). Por lo tanto, el desarrollo y la valoración de los análogos selectivos de los subtipos de SSTR sobre el crecimiento de células de CMT proporcionan una herramienta útil para su aplicación clínica. Hasta ahora no se había informado de ningún dato relativo a la implicación específica de los subtipos de SSTR en la regulación del crecimiento de las células de CMT.

La presente invención se refiere al descubrimiento de que la línea celular de CMT humano TT, que muestra características celulares del CMT (Zabel M, y col., 1992 Histochemistry 102: 323-327, 2 Gagel RF, y col., 1986 Endocrinology 118: 1643-1651, Liu JL, y col., 1995 Endocrinology 136: 2389-2396) y que expresa de forma estable todos los subtipos de SSTR, responde a la activación de SSTR2 y de SSTR5 mediante agonistas selectivos de subtipo con dos patrones diferentes en términos de incorporación de [³H]thy y del número de células. Los agonistas preferentes del SSTR2 suprimen significativamente la incorporación de [³H]thy, es decir, inhiben la síntesis de ADN y reducen la proliferación celular. Los agonistas selectivos del SSTR5 aumentan significativamente la incorporación de [³H]thy

en células TT, es decir, aumentan la síntesis de ADN, pero individualmente fracasan para influir en la proliferación celular. Adicionalmente, los antagonistas del SSTR2 contrarrestan la acción de los agonistas preferentes del SSTR2 sobre las células TT. Además, el aumento de las concentraciones de un agonista selectivo de SSTR5 de una forma dependiente de la dosis evita la supresión de la incorporación de [3 H]thy en las células TT y la proliferación producida por un agonista preferente de SSTR2, y viceversa, mostrando un antagonismo entre dichos agonistas.

Recientemente se han demostrado las interacciones hetero y homodiméricas entre los subtipos de las familias de los receptores de opiáceos (Jordan BA, y col., 1999 Nature 399: 697-700.) y SS (Rocheville M, y col., 2000 J. Biol. Chem. 275: 7862-7869). Los estudios en células cultivadas de adenoma de pituitaria han demostrado que los subtipos de SSTR 2 y 5 actúan sinérgicamente en la supresión de la hormona de crecimiento y la secreción de prolactina (Shimon I, y col., 1997 J. Clinical Invest. 100: 2386-2392, Jaquet P, y col., 2000 J Clin Endocrinol Metab. 85: 781-792). El hallazgo de que la activación del SSTR5 reduce la actividad antiproliferativa mediada por el SSTR2 difiere de los resultados en otros tejidos (Patel YC, 1999 Front Neuroendocrinology 20: 157-198, Buscail L, y col., 1995 Proc Natl Acad Sci EE.UU. 92: 1580-1584, Buscail L, y col., 1994 Proc Natl Acad Sci EE.UU. 91: 2315-2319, Sharma K, y col., 1996 Mol Endocrinol 10: 1688-1696). Esta es la primera demostración de que los subtipos de SSTR 2 y 5 pueden actuar en forma de antagonista para regular el crecimiento celular.

Por lo tanto, los agonistas preferentes de SSTR2 y SSTR5 ejercen efectos diferenciales sobre la proliferación de la línea celular TT de carcinoma medular tiroideo humano *in vitro*, según su selectividad específica para SSTR. La proliferación de la línea celular TT puede ser reducida por agonistas selectivos de SSTR2, pero no por agonistas de SSTR5, y un agonista de SSTR5 puede evitar los efectos antiproliferativos mediados por el SSTR2. El papel inhibidor clave del SSTR2 sobre la proliferación de las células de CMT demuestra que los análogos con una afinidad y una selectividad por SSTR2 incrementadas con respecto a SSTR5 serían útiles como agentes antiproliferativos en el tratamiento del CMT.

Resumen de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de que los agonistas de somatostatina selectivos para el SSTR-2 son eficaces para reducir la tasa de proliferación de las células de carcinoma medular tiroideo, y que los agonistas de somatostatina selectivos para el SSTR-5 son eficaces para atenuar esta reducción inducida por el agonista del SSTR-2 en la tasa de proliferación.

En un aspecto, la presente invención está dirigida a un procedimiento para modular la tasa de proliferación de células de CMT *in vitro* que comprende poner en contacto células de CMT con uno o más agonistas de SSTR2 y uno o más agonistas de SSTR5, en el que dicho agonista de SSTR2 sirve para reducir la tasa de proliferación de las células de CMT, y dicho agonista de SSTR5 sirve para atenuar la reducción inducida por el agonista de SSTR-2 en la tasa de proliferación.

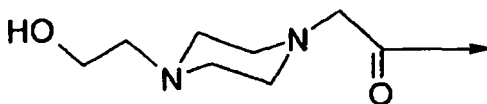
En una forma de realización, la invención está dirigida al procedimiento inmediatamente anterior en el que dicho agonista de SSTR-5 es D-Phe-Phe-Trp-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otra forma de realización, la invención está dirigida a un procedimiento para disminuir la tasa de proliferación de las células de carcinoma medular tiroideo que comprende poner en contacto células de carcinoma medular tiroideo *in vitro* con uno o más agonistas de SSTR2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

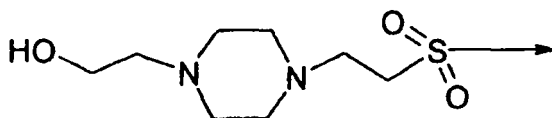
En un ejemplo preferido de la forma de realización inmediatamente anterior, el agonista de SSTR-2 es un agonista selectivo de SSTR-2. En un ejemplo más preferido, el agonista de SSTR-2 o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo tiene un valor de K_i para el SSTR-5 que es al menos 2 veces mayor del que tiene para el SSTR-2, más preferiblemente al menos 5 veces mayor del que tiene para el SSTR-2, aún más preferiblemente al menos 10 veces mayor del que tiene para el SSTR-2.

En otro ejemplo preferido de la forma de realización anterior, el agonista de SSTR-2, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tiene un valor de K_i menor de 5 nM, más preferiblemente menor de 1 nM.

En otro ejemplo preferido de la forma de realización anterior, el agonista selectivo de SSTR-2 es un compuesto elegido de la lista constituida por D-Nal-ciclo[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH₂, ciclo[Tic-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Phe], 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinilacetilo-D-Phe-ciclo(Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys)-Thr-NH₂ y 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-2-etansulfonilo-D-Phe-ciclo(Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys)-Thr-NH₂; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que "4-(2-hidroxietil)-1-piperazinilacetilo" denota la estructura:



y "4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-2-etansulfonilo-" denota la estructura:



En una tercera forma de realización, la invención está dirigida al uso de una cantidad efectiva de un agonista de SSTR2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la fabricación de un medicamento para tratar el carcinoma medular tiroideo.

En un ejemplo preferido de la tercera forma de realización, el agonista de SSTR-2 es un agonista selectivo de SSTR-2. En un ejemplo más preferido, el agonista de SSTR-2, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tiene un valor de K_i para el SSTR-5 que es al menos 2 veces mayor del que tiene para SSTR-2, más preferiblemente al menos 5 veces mayor del que tiene para el SSTR-2, aún más preferiblemente al menos 10 veces mayor del que tiene para el SSTR-2.

En otro ejemplo preferido de la tercera forma de realización, el agonista de SSTR-2, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tiene un valor de K_i menor de 5 nM, más preferiblemente menor de 1 nM.

En otro ejemplo preferido más de la tercera forma de realización, el agonista selectivo de SSTR-2 es un compuesto elegido de la lista constituida por D-Nal-ciclo[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH₂, ciclo[Tic-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Phe], 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinilacetilo-D-Phe-ciclo(Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys)-Thr-NH₂ y 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-2-etansulfonilo-D-Phe-ciclo(Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys)-Thr-NH₂; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que “4-(2-hidroxietil)-1-piperazinilacetilo” y “4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-2-etansulfonilo” son según se definió previamente.

De forma relevante, como es bien sabido en la técnica, la terapia convencional con yodo radiactivo, por ejemplo, la administración de una sal de yodo radiactivo a un paciente, no está disponible para el tratamiento del carcinoma medular tiroideo dado que las células parafoliculares no captan yodo. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención proporciona el uso de una cantidad efectiva de un agonista de SSTR2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que dicho agonista de SSTR-2 o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo comprende un resto de Tyr(I), en el que el átomo de yodo de dicho resto de Tyr(I) comprende un isótopo de yodo radiactivo en la fabricación de un medicamento para tratar el carcinoma medular tiroideo. Preferiblemente, dicho isótopo de yodo comprende ¹²⁵I, ¹²⁷I o ¹³¹I.

En una forma de realización de la invención, dichas células de carcinoma medular tiroideo han formado metástasis fuera del tiroides. En una forma de realización adicional, dichas metástasis están presentes en la linfa, el pulmón, el hígado, el cerebro o el hueso.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1

Movilización de calcio intracelular *in vitro* mediada por el SSTR2

Se recogieron células CHO-K1, que expresan el SSTR2 humano, según se describe en Material y Procedimientos, entonces se añadieron los análogos de SS (10^{-7} - 10^{-6} M) para medir la movilización de Ca²⁺ intracelular, expresada como la proporción entre la concentración de calcio intracelular medida después de la adición de los análogos de SS y el valor observado en el nivel basal. Las longitudes de onda de excitación y de emisión fueron de 340 y 510 nm, respectivamente. Los datos están representados como la media $\pm$ EEM.

Figura 2

Movilización de calcio intracelular *in vitro* mediada por el SSTR5

Se recogieron células CHO-K1, que expresan el SSTR5 humano, según se describe en Material y Procedimientos, entonces se añadieron los análogos de SS (10^{-7} - 10^{-6} M) para medir la movilización de Ca²⁺ intracelular, expresada como la proporción entre la concentración de calcio intracelular medida después de la adición de los análogos de SS (Compuesto 1, Compuesto 5 y Compuesto 6) y el valor observado en el nivel basal. Las longitudes de onda de excitación y de emisión fueron de 340 y 510 nm, respectivamente. Los datos están representados como la media $\pm$ EEM.

Las estructuras de los compuestos que aparecen en la Figura 2 son como sigue:

Compuesto 1: D-Nal-ciclo[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH₂ (ID. SEC. N°: 2);

Compuesto 2: ciclo[Tic-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Phe] (ID. SEC. N°: 3);

ES 2 284 859 T3

Compuesto 3: 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinilacetilo-D-Phe-ciclo(Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys)-Thr-NH₂ (ID. SEC. N°: 4);

Compuesto 4: 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-2-etansulfonilo-D-Phe-ciclo(Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys)-Thr-NH₂ (ID. SEC. N°: 5);

Compuesto 5: D-Phe-Phe-Trp-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-NH₂ (ID. SEC. N°: 1); y

Compuesto 6: Cpa-ciclo(D-Cys-4-Pal-D-Trp-Lys-Thr-Cys)-Nal-NH₂ (ID. SEC. N°: 6).

Figura 3

Inhibición in vitro de la movilización de calcio intracelular estimulada por SS por parte de un antagonista de SSTR2

Se recogieron células CHO-K1, que expresan el SSTR2 humano, según se describe en Material y Procedimientos, entonces se añadieron Compuesto 6 (10^{-9} - 10^{-6} M) y SS (10 nM) para medir el efecto del Compuesto 6 sobre la movilización de calcio intracelular estimulada por SS (10^{-8} M), y se expresó como el porcentaje frente a SS sola. Las longitudes de onda de excitación y de emisión fueron de 340 y 510 nm, respectivamente. Los datos están representados como la media $\pm$ EEM.

Figura 4

Expresión del ARNm de los receptores de somatostatina en células TT

El ARN extraído (1 μ g/reacción) se trató con desoxirribonucleasa y se sometió a una transcripción inversa usando Oligo(dT) como cebador. Las muestras incubadas sin enzima RT sirvieron como control. Las alícuotas del ADNc generado y los controles negativos se sometieron a una subsiguiente amplificación mediante PCR de los SSTR, usando los cebadores indicados en la Tabla 1. Los productos de la PCR se resolvieron en un gel de agarosa al 2%. Los productos de la PCR esperados de los SSTR 1-5 se representan en A (carril M, marcador de PCR; G, producto de PCR de la amplificación con GAPDH).

Figura 5

Efecto de los análogos de SS sobre la incorporación de [³H]thy en células TT

Las células se incubaron en placas de 24 pocillos durante 48 horas en un medio de cultivo complementado con análogos de SS a varias concentraciones (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} y 10^{-6} M). Los pocillos de control se trataron con la disolución vehicular y se midió la incorporación de [³H]thy como radioactividad en el material precipitado con TCA. Los datos de seis experimentos individuales evaluados independientemente por cuadruplicado se expresan como la media $\pm$ EEM del porcentaje de inhibición por incorporación de [³H]thy frente a las células de control sin tratar *P < 0,05 y **P < 0,01 frente a control.

Figura 6

Efecto de los análogos de SS sobre la proliferación de células TT

Las células se incubaron en placas de 96 pocillos durante 48 horas en un medio de cultivo complementado con análogos de SS a varias concentraciones (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} y 10^{-6} M). Los pocillos de control se trataron con la disolución vehicular. La proliferación de las células TT se midió como la absorbancia a 490 nm de cada pocillo. Los datos de seis experimentos individuales se evaluaron independientemente con ocho replicados expresados como la media $\pm$ EEM del porcentaje de inhibición de la proliferación celular frente a las células de control sin tratar *P < 0,05 y **P < 0,01 frente a control.

Figura 7

Efecto del antagonista selectivo de SSTR2 sobre la incorporación de [³H]thy en células TT y la proliferación celular durante el tratamiento con el agonista de SSTR2

Panel superior: las células se incubaron en placas de 24 pocillos durante 48 horas en un medio de cultivo complementado con 100 nM de Compuesto 1 o de Compuesto 2, con o sin Compuesto 6 (10^{-7} M). Los pocillos de control se trataron con la disolución vehicular. La incorporación de [³H]thy se midió como radioactividad en el material precipitado con TCA. Los datos de seis experimentos individuales se evaluaron independientemente con cuatro replicados expresados como la media $\pm$ EEM del porcentaje de inhibición de la incorporación de [³H]thy frente a las células de control sin tratar *P < 0,05 y **P < 0,01 frente a control.

Panel inferior: las células se incubaron en placas de 96 pocillos durante 48 horas en un medio de cultivo complementado con 10^{-7} M de Compuesto 1 o de Compuesto 2, con o sin Compuesto 6 (10^{-7} M). Los pocillos de control se trataron con la disolución vehicular.

La proliferación de las células TT se midió como la absorbancia a 490 nM de cada pocillo. Los datos de seis experimentos individuales se evaluaron independientemente con ocho replicados expresados como la media $\pm$ EEM del porcentaje de inhibición de la proliferación celular frente a las células de control sin tratar *P < 0,05 y **P < 0,01 frente a control.

Figura 8

Efecto del agonista selectivo de SSTR5 sobre la incorporación de [³H]thy en células TT y la proliferación celular durante el tratamiento con el agonista selectivo de SSTR2

- Panel superior: las células se incubaron en placas de 24 pocillos durante 48 horas en un medio de cultivo complementado con Compuesto 2 (10^{-7} M) con o sin concentraciones crecientes de Compuesto 5 (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} y 10^{-6} M), o con Compuesto 5 (10^{-7} M) con o sin concentraciones decrecientes de Compuesto 2 (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-9} M). Los pocillos de control se trataron con la disolución vehicular. La incorporación de [³H]thy se midió como radioactividad en el material precipitado con TCA. Los datos de seis experimentos individuales se evaluaron independientemente con cuatro replicados expresados como la media $\pm$ EEM del porcentaje de inhibición de la incorporación de [³H]thy frente a las células de control sin tratar *P < 0,05 y **P < 0,01 frente a control
- Panel inferior: las células se incubaron en placas de 96 pocillos durante 48 horas en un medio de cultivo complementado con Compuesto 2 (10^{-7} M) con o sin concentraciones crecientes de Compuesto 5 (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} y 10^{-6} M), o con Compuesto 5 (10^{-7} M) con o sin concentraciones decrecientes de Compuesto 2 (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-9} M). Los pocillos de control se trataron con la disolución vehicular, y la proliferación de las células TT se midió como la absorbancia a 490 nM de cada pocillo. Los datos de seis experimentos individuales se evaluaron independientemente con ocho replicados expresados como la media $\pm$ EEM del porcentaje de inhibición de la proliferación celular frente a las células de control sin tratar *P < 0,05 y **P < 0,01 frente a control.

Descripción detallada de la invención

Se cree que el experto en la materia puede utilizar, basándose en la descripción de este documento, la presente invención hasta su más completa magnitud. Las siguientes formas de realización específicas deben interpretarse, por tanto, como meramente ilustrativas, y no limitantes del resto de la descripción, que está limitado únicamente por el ámbito de las reivindicaciones anexas.

Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado al comúnmente comprendido por el experto habitual en la materia a la que pertenece esta invención.

Se han aislado varios receptores de la somatostatina (SSTR), por ejemplo, SSTR-1, SSTR-2, SSTR-3, SSTR-4 y SSTR-5. Por lo tanto, un agonista de la somatostatina puede ser uno o más de un agonista de SSTR-1, un agonista de SSTR-2, un agonista de SSTR-3, un agonista de SSTR-4 o un agonista de SSTR-5. Lo que se entiende por un agonista del receptor de tipo 2 de la somatostatina (es decir, un agonista de SSTR-2) es un compuesto que (1) tiene una alta afinidad de unión (por ejemplo, una K_i menor de 100 nM o preferiblemente menor de 10 nM o menor de 1 nM) por el SSTR-2 (por ejemplo, según se define en el ensayo de unión a receptores descrito a continuación) y (2) disminuye la tasa de proliferación de las células de carcinoma medular tiroideo (por ejemplo, según se muestra en el ensayo biológico descrito a continuación). Lo que se entiende por un agonista selectivo del receptor de tipo 2 de la somatostatina es un agonista del receptor de tipo 2 de la somatostatina que tiene una afinidad de unión mayor (es decir, una menor K_i) por el SSTR-2 que por el SSTR-5. Lo que se entiende por un agonista del receptor de tipo 5 de la somatostatina es un agonista de la somatostatina que (1) tiene una alta afinidad de unión (por ejemplo, una K_i menor de 100 nM o preferiblemente menor de 10 nM o menor de 1 nM) por el SSTR-5 (por ejemplo, según se define en el ensayo de unión a receptores descrito a continuación) y (2) atenúa el descenso en la tasa de proliferación de las células de carcinoma medular tiroideo inducido por el agonista de SSTR-2 (por ejemplo, según se muestra en el ensayo biológico descrito a continuación). Lo que se entiende por un agonista selectivo del receptor de tipo 5 de la somatostatina es un agonista del receptor de tipo 5 de la somatostatina que tiene una afinidad de unión mayor (es decir, una menor K_i) por el SSTR-5 que por el SSTR-2.

En una forma de realización, el agonista de SSTR-2 es también un agonista selectivo de SSTR-2. En otra forma de realización, el agonista selectivo de SSTR-2 tiene un valor de K_i para el SSTR-5 que es al menos 2 veces (por ejemplo, al menos 5 veces o al menos 10 veces) mayor que el que tiene para el receptor SSTR-2 (por ejemplo, según se define en el ensayo de unión a receptores descrito a continuación).

Algunos ejemplos de agonistas de SSTR-2 que pueden usarse para practicar la presente invención son:

D-Nal-ciclo[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH₂, (Compuesto 1),

ciclo[Tic-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Phe], (Compuesto 2),

ES 2 284 859 T3

4-(2-hidroxietil)-1-piperazinilacetilo-D-Phe-ciclo(Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys)-Thr-NH₂, (Compuesto 3) y
4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-2-etansulfonilo-D-Phe-ciclo(Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys)-Thr-NH₂, (Compuesto
4).

Un ejemplo de agonista de SSSTR-5 que puede usarse para practicar la presente invención es:

D-Phe-Phe-Trp-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-NH₂ (Compuesto 5).

Algunos ejemplos adicionales de agonistas de la somatostatina son aquellos englobados por las fórmulas o aquellos mencionados específicamente en las publicaciones establecidas a continuación.

Solicitud EP N° P5164EU (Inventor: G. Keri);

Van **Binst**, G. y col. *Peptide Research* 5: 8 (1992);

Horvath, A. y col. Resumen, "Conformations of Somatostatin Analogs Having Antitumor Activity", 22° European peptide Symposium, 13-19 de septiembre de 1992, Interlaken, Suiza;

Solicitud PCT N° WO91/09056 (1991);

Solicitud EP N° 0363589A2 (1990);

Patente de EE.UU. N° 4.904.642 (1990);

Patente de EE.UU. N° 4.871.717 (1989);

Patente de EE.UU. N° 4.853.371 (1989);

Patente de EE.UU. N° 4.725.577 (1988);

Patente de EE.UU. N° 4.684.620 (1987);

Patente de EE.UU. N° 4.650.787 (1987);

Patente de EE.UU. N° 4.603.120 (1986);

Patente de EE.UU. N° 4.585.755 (1986);

Solicitud EP N° 0203031A2 (1986);

Patente de EE.UU. N° 4.522.813 (1985);

Patente de EE.UU. N° 4.486.415 (1984);

Patente de EE.UU. N° 4.485.101 (1984);

Patente de EE.UU. N° 4.435.385 (1984);

Patente de EE.UU. N° 4.395.403 (1983);

Patente de EE.UU. N° 4.369.179 (1983);

Patente de EE.UU. N° 4.360.516 (1982);

Patente de EE.UU. N° 4.358.439 (1982);

Patente de EE.UU. N° 4.328.214 (1982);

Patente de EE.UU. N° 4.316.890 (1982);

Patente de EE.UU. N° 4.310.518 (1982);

Patente de EE.UU. N° 4.291.022 (1981);

Patente de EE.UU. N° 4.238.481 (1980);

ES 2 284 859 T3

Patente de EE.UU. N° 4.235.886 (1980);

Patente de EE.UU. N° 4.224.199 (1980);

5 Patente de EE.UU. N° 4.211.693 (1980);

Patente de EE.UU. N° 4.190.648 (1980);

Patente de EE.UU. N° 4.146.612 (1979);

10 Patente de EE.UU. N° 4.133.782 (1979);

Patente de EE.UU. N° 5.506.339 (1996);

15 Patente de EE.UU. N° 4.261.885 (1981);

Patente de EE.UU. N° 4.728.638 (1988);

Patente de EE.UU. N° 4.282.143 (1981);

20 Patente de EE.UU. N° 4.215.039 (1980);

Patente de EE.UU. N° 4.209.426 (1980);

25 Patente de EE.UU. N° 4.190.575 (1980);

Patente EP N° 0389180 (1990);

Solicitud EP N° 0505680 (1982);

30 Solicitud EP N° 0083305 (1982);

Solicitud EP N° 0030920 (1980);

35 Solicitud PCT N° WO88/05052 (1988);

Solicitud PCT N° WO90/12811 (1990);

Solicitud PCT N° WO97/01579 (1997);

40 Solicitud PCT N° WO91/18016 (1991);

Solicitud británica N° GB 2.095.261 (1981); y

45 Solicitud francesa N° FR 2.522.655 (1983).

Nótese que para todos los agonistas de la somatostatina descritos en este documento, cada resto de aminoácido representa la estructura -NH-C(R)H-CO-, en la que R es la cadena lateral (por ejemplo, CH₃ para Ala). Las líneas entre los restos de aminoácidos representan enlaces peptídicos que unen los aminoácidos. También, cuando el resto de aminoácido es ópticamente activo, la configuración pretendida es la de la forma L salvo que expresamente se indique la forma D. Por claridad, los enlaces de disulfuro (por ejemplo, un puente disulfuro) que existen entre dos tioles libres de restos de Cys, no se muestran. Las abreviaturas de los aminoácidos habituales son de acuerdo a las recomendaciones de la IUPAC-IUB.

55 *Síntesis de agonistas de la somatostatina*

Los procedimientos para sintetizar agonistas de la somatostatina están bien documentados y entran en la capacidad de una persona experta habitual en la materia.

60 La síntesis de secuencias cortas de aminoácidos está bien establecida en la técnica de péptidos. Por ejemplo, la síntesis de H-D-Phe-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-NH₂, descrito anteriormente, puede conseguirse siguiendo el protocolo establecido en el Ejemplo I de la Solicitud de Patente Europea 0395417A1. La síntesis de agonistas de la somatostatina con un N-terminal sustituido puede conseguirse, por ejemplo, siguiendo el protocolo establecido en el documento WO88/02756, en la Solicitud de Patente Europea N° 0329295 y en la Publicación PCT N° WO94/04752.

65 Algunos de los compuestos de la actual invención pueden tener al menos un centro asimétrico. Algunos centros asimétricos adicionales pueden estar presentes en la molécula, dependiendo de la naturaleza de los diversos sustitui-

yentes de la molécula. Cada uno de dichos centros asimétricos producirá dos isómeros ópticos, y se pretende que todos de dichos isómeros ópticos, por separado, puros o parcialmente ópticamente purificados, las mezclas racémicas o las mezclas diastereoméricas de los mismos, estén incluidas en el ámbito de la actual invención.

5 Los compuestos de la actual invención generalmente pueden aislarse en forma de sus sales de adición ácida farmacéuticamente aceptables, tales como las sales derivadas del uso de ácidos inorgánicos y orgánicos. Algunos ejemplos de dichos ácidos son clorhídrico, nítrico, sulfúrico, fosfórico, fórmico, acético, trifluoroacético, propiónico, maleico, succínico, D-tartárico, L-tartárico, malónico, metansulfónico y similares. Además, ciertos compuestos que contienen una función ácida, tales como un carboxi pueden aislarse en forma de su sal inorgánica en la que contraíón puede
10 elegirse entre sodio, potasio, litio, calcio, magnesio y similares, así como entre bases orgánicas.

Las sales farmacéuticamente aceptables pueden formarse tomando aproximadamente 1 equivalente de un agonista de SST-2, por ejemplo, el compuesto 1, y poniéndolo en contacto con aproximadamente 1 equivalente o más del correspondiente ácido apropiado de la sal que se desea. El desarrollo y aislamiento de la sal resultante es conocido por
15 los expertos habituales en la materia.

Los compuestos de esta invención pueden administrarse por las vías de administración oral, parenteral (por ejemplo, por inyección intramuscular, intraperitoneal, intravenosa o subcutánea, o un implante), nasal, vaginal, rectal, sublingual o tópica, y pueden formularse con vehículos farmacéuticamente aceptables para proporcionar formas de dosificación apropiadas para cada vía de administración. Consecuentemente, la presente invención incluye en su ámbito composiciones farmacéuticas que comprenden, como principio activo, al menos un agonista de SST-2 en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las formas de dosificación sólidas para su administración por vía oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En dichas formas de dosificación sólidas, el compuesto activo se mezcla con al menos un vehículo inerte farmacéuticamente aceptable tal como sacarosa, lactosa o almidón. Dichas formas de dosificación también pueden comprender, como en la práctica normal, sustancias adicionales distintas a dichos diluyentes inertes, por ejemplo, agentes lubricantes tales como estearato magnésico. En el caso de las cápsulas, los comprimidos y las píldoras, las formas de dosificación también pueden comprender agentes tamponantes. Los comprimidos y las píldoras pueden prepararse adicionalmente con cubiertas entéricas.

Las formas de dosificación líquida para su administración por vía oral incluyen emulsiones, disoluciones, suspensiones, jarabes farmacéuticamente aceptables, conteniendo los elixires diluyentes inertes usados habitualmente en la técnica, tales como agua. Además de dichos diluyentes inertes, las composiciones también pueden incluir coadyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsificantes y de suspensión, y agentes edulcorantes, saborizantes y aromatizantes.

Las preparaciones según esta invención para su administración por vía parenteral incluyen disoluciones acuosas o no acuosas, suspensiones o emulsiones estériles. Algunos ejemplos de disolventes o vehículos no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y aceite de maíz, gelatina, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Dichas formas de dosificación también pueden contener coadyuvantes tales como agentes conservantes, humectantes, emulsificantes y dispersantes. Pueden esterilizarse mediante, por ejemplo, filtración a través de un filtro de retención de bacterias, incorporando agentes esterilizantes en las composiciones, irradiando las composiciones o calentando las composiciones. También pueden fabricarse en forma de composiciones sólidas estériles que pueden ser disueltas en agua estéril o algún otro medio inyectable estéril inmediatamente antes de su uso.

Las composiciones para su administración por vía rectal o vaginal son preferiblemente supositorios que pueden contener, además de la sustancia activa, excipientes tales como manteca de cacao o una cera para supositorios.

Las composiciones para su administración por vía nasal o sublingual también se preparan con excipientes convencionales bien conocidos en la técnica.

En general, una dosis eficaz de principio activo en las composiciones de esta invención puede ser variable; sin embargo, es necesario que la cantidad de principio activo sea tal que se obtenga una forma de dosificación adecuada. La dosis elegida depende del efecto terapéutico deseado, de la vía de administración y de la duración del tratamiento, todo lo cual está en el dominio del conocimiento de experto habitual en la materia. Generalmente se administran unos niveles de dosificación de entre 0,0001 y 100 mg/kg de peso corporal por día a los seres humanos y a otros animales, por ejemplo, mamíferos.

Un intervalo de dosificación preferido es de 0,01 a 10,0 mg/kg de peso corporal por vía, que puede administrarse como una dosis individual o dividirse en dosis múltiples.

Materiales y procedimientos

Se usó un análisis mediante RT-PCR para demostrar que los cinco subtipos de ARNm de los SST-2 son expresados en una línea celular de CMT humano, TT. La capacidad de los análogos de la SS, con diferentes actividades y especificidades por el SST-2 y los 5 subtipos, para influir sobre la actividad proliferativa de las células, puede evaluarse

considerando la incorporación de [^3H]thy, considerada como una medida indirecta de la actividad sintética de ADN, y el número de células viables.

Todos los agonistas preferentes de SSTR2 fueron capaces de suprimir significativamente el número de células TT a unas concentraciones que varían desde 10^{-9} M hasta 10^{-6} M. El Compuesto 3 y el Compuesto 4 redujeron significativamente ($p < 0,05$) la incorporación de [^3H]thy a 10^{-9} M pero no a 10^{-8} M y 10^{-7} M, cuando su máximo efecto inhibitor sobre el número de células era apreciable. Cada compuesto SSTR2 probado mostró una tendencia a disminuir la eficacia con el aumento de la concentración, sin embargo, las curvas de respuesta con forma de campana son habituales para la SS. La inhibición de la incorporación de [^3H]thy y el número de células TT por el Compuesto 1 y el Compuesto 2 a 10^{-7} M no se asoció con ninguna acción citotóxica, según se demuestra mediante una tinción con azul de tripano. Además, este efecto era completamente contrarrestado mediante el cotratamiento de las células TT con Compuesto 6, un antagonista selectivo de SSTR2. Considerados conjuntamente, estos resultados indican que los análogos de la SS con una selectividad preferente por el SSTR2 inhiben la proliferación de las células TT interactuando específicamente con el SSTR2.

Cultivo de la línea celular TT

La línea celular TT se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EE.UU.). La línea celular TT consiste en células parafoliculares aneuploides transformadas productoras de CT que se caracterizan por la presencia de una mutación de TGC a TGG (Cys a Trp) en el exón 11 codón 634 del protooncogen RET (Cooley LD, y col., 1995 Cancer Genet Cytogenet 80: 138-149), una característica que nosotros confirmamos para la línea celular con la que trabajamos. Además, las células TT muestran una expresión deteriorada del gen supresor tumoral p53 (Velasco JA, y col., 1997 Int J Cancer 73: 449-455). Los estudios de inmunohistoquímica demuestran que las células TT expresan CT y el receptor de la CT (Frendo JL, y col., 1994 FEBS Lett. 342: 214-216), antígeno carcinoembrionario (CEA), SS, neurotensina, péptido liberador de gastrina (GRP), leu- y metencefalina, péptido liberador de hormona paratiroidea (PTHrp), cromogranina A, SP-I, sinaptofisina, enolasa específica de neuronas (NSE), receptor de 1,25-dihidroxitamina D_3 , hidroxilasa de tirosina, α -tubulina y citoqueratina (Zabel M, y col., 1995 Histochemical J. 27: 859-868). Las células TT secretan una cantidad significativa de CT y responden a cambios en los niveles de calcio ionizado (Zabel M, y col., 1992 Histochemistry 102: 323-327). Por lo tanto, la línea celular TT es adecuada para estudios sobre la función parafolicular y las respuestas a estímulos endocrinos y farmacológicos.

Las células se mantuvieron en la Mezcla Nutriente de Ham F12 con Glutamina (EuroClone Ltd, Torquay, Reino Unido), complementada con un 10% de suero bovino fetal (FBS, Life Technologies, Milán, Italia), 100 U/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomycin y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anfotericina (EuroClone Ltd, Torquay, Reino Unido) a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% CO_2 y un 95% de aire.

Aislamiento del ARN

Se extrajo el ARN total de células TT subconfluentes usando TRIZOL (Life Technologies, Milán, Italia). El protocolo de TRIZOL es una modificación de la extracción con guanidinio/fenol. En resumen, se aspiró el medio celular cultivado y las células se lavaron con 1 x PBS. Se añadió el reactivo de TRIZOL y las células se lisaron a temperatura ambiente durante 10 min. Se añadió cloroformo a la mezcla de TRIZOL/lisado celular, y se dejó reposar durante 2-3 min, y después se centrifugaron a $12000 \times g$ durante 15 min. La capa acuosa se eliminó de la mezcla centrifugada. Se añadió isopropanol para precipitar el ARN, se recogió el sedimento, se lavó con etanol al 75% y se secó al aire. El ARN total se resuspendió en agua tratada con pirocarbonato de dietilo (DEPC) y se cuantificó usando una espectrofotometría de UV a 260 nm. Para evitar la contaminación con ADN, se trató el ARN con desoxirribonucleasa exenta de ribonucleasa (Promega, Milán, Italia).

RT-PCR

Usando un kit de síntesis de la primera hebra de ADN complementario (ADNc) (SuperScript Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis, Life Technologies, Milán, Italia), se retrotranscribió 1 μg de ARN total según el protocolo del fabricante. La mezcla RT de los tubos de PCR se cubrió con 50 μl de aceite mineral ligero blanco (Sigma-Aldrich Corp. Milán, Italia); la RT se llevó a cabo en el Minicycler (MJ Research Inc., Watertown, MA, EE.UU.) usando un programa con los siguientes parámetros: 10 min a 70°C , 1 min a 4°C , 5 min a 4°C . Después de complementar con SuperScript II, la reacción se concretó a 42°C durante 50 min y después a 70° durante 15 min. Las muestras se digirieron con ARNasa H (Promega, Milán, Italia) a 37°C durante 20 min, y después se almacenaron a -20°C hasta la primera PCR.

El ADNc (1 μl de reacción de RT) se amplificó entonces mediante PCR con 1 U de polimerasa Taq de ADN (Life Technologies, Milán, Italia), en las condiciones recomendadas por los proveedores, en una mezcla de reacción de 50 μl . Después de la desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, se llevaron a cabo las reacciones de PCR usando los cebadores oligonucleotídicos y las condiciones enumeradas en la Tabla 1, describiendo el tamaño de los fragmentos esperados. Los productos de la PCR se analizaron en un gel de agarosa al 2% y se visualizaron mediante una tinción con bromuro de etidio (ETB). Para asegurar que no se producía una contaminación durante el transcurso del procedimiento de RT-PCR se prepararon dos clases de controles negativos. El primer control negativo se fabricó omitiendo el ARN total en la RT. El segundo se preparó sustituyendo la mezcla de ADNc por agua en la reacción de PCR. La PCR sólo se consideró útil si no se observaba ninguna banda en los carriles de control negativo en un gel de

agarosa al 2%. Cada producto de la PCR se sometió a una digestión con enzimas de restricción y se analizó sobre un gel de agarosa al 2% para confirmar adicionalmente la correcta identificación de los amplicones.

Agonistas y antagonistas selectivos de SSTR

Los análogos de la SS usados en este estudio y sus respectivas afinidades por los diferentes SSTR se enumeran en la Tabla 2. Cada compuesto, proporcionado por Biomeasure Incorporated (Milford, MA, EE.UU.), se resuspendió en ácido acético 0,01 N que contenía un 0,1% de albúmina sérica bovina (BSA) con objeto de proporcionar una solubilidad uniforme y evitar una unión no específica a las diversas superficies de preparación. La especificidad y la selectividad de los análogos se determinaron mediante un Ensayo de Unión con Radioligando en células CHO-K1 transfectadas de forma estable con cada uno de los subtipos de SSTR, como sigue.

Las secuencias codificantes completas de los fragmentos genómicos de los genes de los SSTR 1, 2, 3 y 4 y un clon de ADNc de SSTR 5 se subclonaron en el vector de expresión mamífero pCMV (Life Technologies, Milán, Italia). Se obtuvieron líneas celulares clonadas que expresaban de forma estable los SSTR 1-5 mediante transfección en células CHO-K1 (ATCC, Manassas, Va, EE.UU.) usando el método de coprecipitación con fosfato cálcico (Davis L, y col., 1994 In: Basic methods in Molecular Biology, 2ª edición, Appleton & Lange, Norwalk, CT, EE.UU.: 611-646). Se incluyó el plásmido pRSV-neo (ATCC) como un marcador seleccionable. Las líneas celulares clonadas se seleccionaron en medio RPMI 1640 que contenía 0,5 mg/ml de G418 (Life Technologies, Milán, Italia), se clonaron en anillo y se expandieron en un cultivo.

Las membranas para los ensayos de unión al receptor *in vitro* se obtuvieron homogeneizando las células CHO-K1 que expresaban los subtipos de SSTR en Tris-HCl 50 mM enfriado en hielo y centrifugando dos veces a 39000 g (10 min), con una resuspensión intermedia en tampón fresco. Los sedimentos finales se resuspendieron en Tris-HCl 10 mM para el ensayo. Para los ensayos de los SSTR 1, 3, 4 y 5 las alícuotas de las preparaciones de membrana se incubaron 90 min a 25°C con [¹²⁵I-Tyr11]SS-14 0,05 nM en HEPES 50 mM (pH 7,4) que contenía 10 mg/ml de BSA, MgCl₂ 5 mM, 200 KIU/ml de Trasylol, 0,02 mg/ml de bacitracina y 0,02 mg/ml de fluoruro de fenilmetilsulfonilo. El volumen final de ensayo fue de 0,3 ml. Para el ensayo del SSTR 2 se empleó como radioligando [¹²⁵I]MK-678 0,05 nM, y el tiempo de incubación fue de 90 min a 25°C. Las incubaciones se terminaron mediante una filtración rápida a través de filtros GF/C (previamente empapados con polietilénimina al 0,3%) usando un colector de filtración Brandel. Cada tubo y filtro se lavaron entonces tres veces con alícuotas de 5 ml de tampón enfriado en hielo. La unión específica se definió como el radioligando total unido menos el unido en presencia de SS-14 1000 nM para los SSTR 1, 3, 4 y 5, o de MK-6781000 nM para el SSTR2.

Evaluación de la actividad biológica

La actividad biológica de los agonistas y antagonistas selectivos de SSTR se evaluó mediante el ensayo de movilización de calcio en células CHO-K1 que expresan el SSTR2 o el SSTR5 humanos. Las células se recogieron incubándolas en una disolución salina tamponada con EDTA/fosfato al 0,3% (25°C), y se lavaron dos veces mediante centrifugación. Las células lavadas se resuspendieron en disolución salina tamponada de Hank (HBSS) para cargar el indicador fluorescente de Ca²⁺ Fura-2AM. Las suspensiones celulares (aproximadamente 10⁶ células/ml) se incubaron con Fura-2AM 2 mM durante 30 min a 25°C. El Fura-2AM no cargado se eliminó mediante centrifugación dos veces en HBSS, y las suspensiones finales se transfirieron a un espectrofluorómetro (Hitachi F-2000) equipado con un mecanismo agitador magnético y un soporte de cubeta con la temperatura regulada. Tras equilibrar a 37°C, se añadieron los análogos de SS para la medida de la movilización intracelular de Ca²⁺. Las longitudes de onda de excitación y de emisión fueron 340 y 510 nm, respectivamente. En las células que expresan el SSTR2 (Figura 1), el Compuesto 2 y el Compuesto 1 estimularon significativamente la movilización intracelular de Ca²⁺ (indicada como la proporción entre el valor estimulado y el basal), mientras que el Compuesto 6 no lo hizo, a las concentraciones probadas. Además, el Compuesto 4 y el Compuesto 3 también eran muy potentes en la estimulación de la movilización de Ca²⁺. En las células que expresan el SSTR5 (Figura 2), el Compuesto 5 y el Compuesto 1 estimularon significativamente la movilización intracelular de Ca²⁺, mientras que el Compuesto 6 mostró una ligera actividad agonista en el intervalo de 300 a 1000 nM. En las células que expresan el SSTR2 (Figura 3), el Compuesto 6 inhibió la movilización intracelular de Ca²⁺ inducida por la SS en las células que expresan el SSTR2 de una forma dependiente de la dosis, con una supresión completa de la acción de la SS aproximadamente a 10⁻⁷ M. Por lo tanto, la evaluación de la movilización intracelular de Ca²⁺ demostró que la actividad biológica de cada uno de los diversos análogos estaba en conformidad con su perfil de unión al receptor.

Síntesis de ADN

Los efectos de los agonistas y antagonistas selectivos de SSTR sobre la síntesis de ADN en las células TT se evaluaron determinando la tasa de incorporación de [³H]timidina ([³H]thy), según se describió previamente (Davis L, y col., 1994 en: Basic methods in Molecular Biology, 2ª edición, Appleton & Lange, Norwalk, CT, EE.UU.: 611-646, degli Uberti EC, y col., 1991 J Clin Endocrinol Metab 72: 1364-1371). Las células TT se colocaron en placas múltiples de 24 pocillos (10⁵ células/pocillo) y se incubaron durante 48 horas en un medio complementado con FBS al 10% en presencia de ([³H]thy (1,5 µCi/ml; 87 Ci/mmol) con o sin cada análogo de la SS a unas concentraciones que varían desde 10⁻⁶ hasta 10⁻⁹ M. Los tratamientos se renovaron añadiendo nuevos análogos a los pocillos después de las primeras 24 h de incubación, sin eliminar el medio.

Tras la incubación, las células se lavaron tres veces con PBS enfriado en hielo y dos veces con ácido tricloroacético al 10% enfriado en hielo (TCA). El material precipitado con el TCA se solubilizó en 500 μ L de hidróxido sódico 0,2 mol/L y SDS al 0,1%. Entonces se contó la radioactividad asociada a las células con un espectrómetro de centelleo. Los resultados (recuentos por min por pocillo) se obtuvieron determinando el valor medio de al menos seis experimentos por cuadruplicado. La viabilidad de las células TT en los cultivos de control y tratado se evaluó mediante una tinción con azul de tripano después de 24 y de 48 horas, y el número de células viables era siempre del 85-95%.

Proliferación celular

Los efectos de los agonistas y antagonistas selectivos de SSTR sobre la proliferación de las células TT se evaluaron mediante el Ensayo de Proliferación Celular no Radioactivo Acuoso CELL-TITER 96 (Promega, Milán, Italia), un método colorimétrico para determinar el número de células viables en ensayos de proliferación. El ensayo contiene soluciones de un compuesto de tetrazolio (reactivo de Owen; MTS) y un reactivo acoplador de electrones (metosulfato de fenacina; PMS). El MTS es biorreducido por las células a formazán, que es soluble en el medio de cultivo tisular. La absorbancia del formazán a 490 nm puede medirse directamente a partir de las placas de ensayo de 96 pocillos (Zatelli MC, y col., 2000 J Clin Endocrinol Metab 85: 847-852; Cory AH, y col., 1991 Cancer Commun 3: 207-212). La conversión del MTS en la forma acuosa soluble del formazán se consigue mediante las enzimas deshidrogenasas que se encuentran en las células metabólicamente activas. La cantidad de producto de formazán, medida por la cantidad de absorbancia a 490 nm, es directamente proporcional al número de células vivas en el cultivo. En resumen, las células TT se colocaron en placas múltiples de 96 pocillos (2×10^4 células/pocillo) y se incubaron durante 48 horas en un medio complementado con FBS al 10% en presencia o ausencia de cada análogo de SS, a unas concentraciones que varían desde 10^{-6} hasta 10^{-9} M. Los tratamientos se renovaron añadiendo nuevos análogos a los pocillos después de las primeras 24 h de incubación. Al final del periodo de incubación se añadieron a cada pocillo 20 μ L de una disolución combinada de MTS/PMS con una pipeta de repetición, y las placas se incubaron durante 4 horas adicionales a 37°C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5%. Entonces se registró la absorbancia a 490 nm usando un lector de placas ELISA (EASIA Reader, Medgenix, Camarillo, CA). Los resultados (absorbancia a 490 nm) se obtuvieron determinando el valor medio de al menos seis experimentos en ocho replicados.

Resultados

Expresión del SSTR en la línea celular TT de CMT humano

Para comprender el papel individual de los subtipos SSTR2 y SSTR5 en el control de la proliferación de las células C parafofoculares, evaluamos si las células TT expresaban SSTR que pudieran mediar en una potencial respuesta a compuestos selectivos para los subtipos individuales de SSTR. Para estudiar esta cuestión, aislamos el ARN total de las células TT cultivadas y realizamos las reacciones de RT-PCR en las condiciones descritas en Materiales y Procedimientos. La integridad del ADNc se aseguró mediante la presencia de la señal de GAPDH. La ausencia de contaminación por ADN genómico en las muestras de ADNc se evaluó por la ausencia de amplificación en una reacción de PCR usando muestras no retrotranscritas. La amplificación positiva de los SSTR1, 2, 3, 4 y 5 se encontró en la línea celular examinada (Fig. 4), lo que demuestra que estos receptores son expresados en la línea celular TT del CMT humano. La demostración de que la línea celular TT expresa de forma estable estos subtipos de SSTR hizo a este sistema de modelo celular adecuado para evaluar la acción de los análogos de la SS selectivos de receptores.

Efecto de los análogos selectivos de la SS sobre la incorporación de [³H]thy en células TT

Los valores de la incorporación de [³H]thy obtenidos con unas concentraciones de 10^{-9} a 10^{-6} M de agonistas preferentes del SSTR2 (Compuesto 1, Compuesto 2, Compuesto 3 y Compuesto 4), de agonista preferente del SSTR5 (Compuesto 5) y de antagonista preferente del SSTR2 (Compuesto 6) se presentan en la Figura 5. Según se indica, el Compuesto 2 suprimió significativamente la incorporación de [³H]thy en un 58-23% a unas concentraciones que varían de 10^{-9} a 10^{-7} M. El Compuesto 1 suprimió significativamente la incorporación de [³H]thy en un 41-21% a unas concentraciones que varían de 10^{-9} a 10^{-6} M. La incorporación de [³H]thy también fue significativamente reducida por el Compuesto 4 (-13%, $p < 0,05$) y por el Compuesto 3 (-17%, $p < 0,05$) a 10^{-9} M. Por el contrario, el Compuesto 5 aumentó significativamente la incorporación de [³H]thy en células TT en un 80-175%. El antagonista selectivo del SSTR2, el Compuesto 6, no alteró la incorporación de [³H]thy en células TT en comparación con las células de control sin tratar.

Efecto de los análogos selectivos de la SS sobre la proliferación de las células TT

Para examinar con más detalle la actividad de los análogos de la SS sobre el crecimiento de las células TT, también se analiza su efecto sobre el número de células viables. Los efectos de los agonistas preferentes del SSTR2, de un agonista preferente del SSTR5 y de un antagonista preferente del SSTR2 sobre el número de células TT viables a unas concentraciones que varían desde 10^{-9} hasta 10^{-6} M están representados en la Figura 6. Según se indica, todos los compuestos preferentes del SSTR2 inhibieron significativamente la proliferación celular cuando se comparaban con las células de control sin tratar a cada concentración probada. El agonista selectivo del SSTR5, el Compuesto 5, produjo un ligero aumento en la proliferación de las células TT (de hasta el 11% a 10^{-8} M), sin embargo, esto no representa una diferencia estadística con respecto a las células de control sin tratar. El antagonista selectivo del SSTR2, el Compuesto 6, no parecía afectar al crecimiento de las células TT a las concentraciones probadas.

El antagonista selectivo del SSTR2 contrarresta los efectos del agonista preferente del SSTR2

Para clarificar adicionalmente si el SSTR2 estaba específicamente implicado en la mediación de la actividad anti-proliferativa de los agonistas preferentes del SSTR2, se evaluaron la incorporación de [^3H]thy y el crecimiento celular en células TT expuestas durante 48 horas a Compuesto 1 y a Compuesto 2, cada uno de ellos solo (a 10^{-7} M) o en combinación con el Compuesto 6, un antagonista selectivo del SSTR2, a una concentración equimolar (10^{-7} M). La inhibición de la incorporación de [^3H]thy inducida tanto por el Compuesto 1 como por el Compuesto 2 fue suprimida por el cotratamiento de las células TT con Compuesto 6 (Figura 7, panel superior). La inhibición de la proliferación de las células TT inducida por el Compuesto 1 se redujo significativamente desde el 46% hasta el 10% por el cotratamiento con el Compuesto 6. Adicionalmente, el Compuesto 6 parecía bloquear completamente la actividad antiproliferativa del Compuesto 2 (Figura 7, panel inferior). Por lo tanto, la implicación específica del SSTR2 en la mediación del efecto inhibitor de un agonista del SSTR2 sobre la proliferación de las células TT está claramente demostrada.

Efecto de la combinación de un agonista preferente del SSTR2 con un agonista preferente del SSTR5 sobre la incorporación de [^3H]thy y la proliferación celular

Con objeto de analizar los efectos de un agonista del SSTR2 y del SSTR5 combinados, se examinaron la incorporación de [^3H]thy y la proliferación de células TT probando cada uno de Compuesto 2 y Compuesto 5 a 10^{-7} M en combinación con dosis crecientes (desde 10^{-9} M hasta 10^{-6} M) del otro Compuesto. Los resultados se resumen en la Figura 8. Las concentraciones crecientes del agonista del SSTR5 (desde 10^{-9} M hasta 10^{-6} M) evitaban de una forma dependiente de la dosis la supresión de la incorporación de [^3H]thy (Figura 8, panel superior) y la proliferación de las células TT (Figura 8, panel inferior) producida por el agonista del SSTR2 (10^{-7} M). Estos datos demuestran un antagonismo entre los efectos mediados por el SSTR5 y el SSTR2 sobre la proliferación.

Tabla 1: cebadores y condiciones de la PCR para la amplificación de los SSR

SSR	Cebadores	Desnaturalización	Hibridación	Extensión	Ciclos	Fragmento
1	Directo: 5' - AGCCGGTTGACTATTACGCC - 3' (ID. SEC. N° 7)	95°C, 30"	60°C, 1'	72°C, 2'	45	334
	Inverso: 5' - GCTCTCACTTCTACCAATTGTC - 3' (ID. SEC. N° 8)					
2	Directo: 5' - GGTGAA GTCCTCTGGAATCC - 3' (ID. SEC. N° 9)	95°C, 30"	63°C, 1'	72°C, 2'	45	461
	Inverso: 5' - CCATTGCCAGTAGACAGAGC - 3' (ID. SEC. N° 10)					
3	Directo: 5' - TCATCTGCCCTCTGTACCTG - 3' (ID. SEC. N° 11)	95°C, 30"	65°C, 1'	72°C, 2'	45	221
	Inverso: 5' - GAGCCCAAGAGGAGGCT - 3' (ID. SEC. N° 12)					
4	Directo: 5' - CGGCAGTCTCGTGGTCTAC - 3' (ID. SEC. N° 13)	94°C, 30"	63°C, 1'	72°C, 2'	45	247
	Inverso: 5' - GCATCAAGTCGGTCAAGAC - 3' (ID. SEC. N° 14)					
5	Directo: 5' - AACACGCTGGTCATCTACGTGGT - 3' (ID. SEC. N° 15)	94°C, 1'	60°C, 1'	72°C, 1'15"	40	211
	Inverso: 5' - AGACACTGGTGAAGTGGTTGAC - 3' (ID. SEC. N° 16)					
GAPDH	Directo: 5' - ATGACCCCTTCATTGACCTC - 3' (ID. SEC. N° 17)	95°C, 30"	60°C, 1'	72°C, 2"	40	820
	Inverso: 5' - AAGTGGTCGTTGAGGGCAAT - 3' (ID. SEC. N° 18)					

ES 2 284 859 T3

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 2

Especificidad de los subtipos de receptores humanos de la somatostatina (IC_{50} , nM)

<u>Compuesto</u>	<u>Subtipo de receptor</u>				
	1	2	3	4	5
1	2129	0,75	98	1826	12,7
2	1000	0,34	412	1000	213,5
3	5210	0,35	215	7537	11,2
4	6016	0,19	26,8	3897	9,8
5	1152	166	1000	1618	2,4
6 (antagonista)	2757	6,4	44	423	86,5

La afinidad del subtipo se determinó mediante ensayos de unión de radioligando al receptor de membrana en células de ovario de hámster chino que expresan el gen del SSR2 humano o el ADNc del SSR5.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para modular la tasa de proliferación de células de carcinoma medular tiroideo que comprende poner en contacto células de CMT *in vitro* con uno o más agonistas de SSTR2 y uno o más agonistas de SSTR5, en el que dicho agonista de SSTR2 reduce la tasa de proliferación de las células de CMT y dicho agonista de SSTR5 atenúa la reducción inducida por el agonista de SSTR-2 en la tasa de proliferación celular.
2. Un procedimiento según la reivindicación 1 en el que dicho agonista de SSTR-5 es D-Phe-Phe-Trp-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-NH₂ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
3. Un procedimiento para disminuir la tasa de proliferación de células de carcinoma medular tiroideo que comprende poner en contacto dichas células de carcinoma medular tiroideo *in vitro* con uno o más agonistas de SSTR2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
4. Un procedimiento según la reivindicación 3 en el que dicho agonista de SSTR-2 es un agonista selectivo de SSTR-2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
5. Un procedimiento según la reivindicación 3 en el que dicho agonista de SSTR-2 o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo tiene un valor de K_i para el SSTR-5 que es al menos 2 veces mayor del que tiene para el SSTR-2.
6. Un procedimiento según la reivindicación 3 en el que dicho agonista de SSTR-2 o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo tiene un valor de K_i para el SSTR-5 que es al menos 5 veces mayor del que tiene para el SSTR-2.
7. Un procedimiento según la reivindicación 3 en el que dicho agonista de SSTR-2 o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo tiene un valor de K_i para el SSTR-5 que es al menos 10 veces mayor del que tiene para el SSTR-2.
8. Un procedimiento según la reivindicación 3 en el que dicho agonista de SSTR-2 o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo tiene un valor de K_i menor de 5.
9. Un procedimiento según la reivindicación 3 en el que dicho agonista de SSTR-2 o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo tiene un valor de K_i menor de 1.
10. Un procedimiento según la reivindicación 3 en el que dicho agonista selectivo de SSTR-2 es un compuesto elegido de la lista constituida por:
D-Nal-ciclo[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH₂;
ciclo[Tic-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Phe];
4-(2-hidroxietil)-1-piperazinilacetilo-D-Phe-ciclo(Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys)-Thr-NH₂; y
4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-2-etansulfonilo-D-Phe-ciclo(Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys)-Thr-NH₂;
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
11. Uso de un agonista de SSTR-2 o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del carcinoma medular tiroideo.
12. Uso según la reivindicación 11 en el que dicho agonista de SSTR-2 comprende un agonista selectivo de SSTR-2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
13. Uso según la reivindicación 11 en el que dicho agonista de SSTR-2 o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo tiene un valor de K_i para el SSTR-5 que es al menos 2 veces mayor del que tiene para el SSTR-2.
14. Uso según la reivindicación 11 en el que dicho agonista de SSTR-2 o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo tiene un valor de K_i para el SSTR-5 que es al menos 5 veces mayor del que tiene para el SSTR-2.
15. Uso según la reivindicación 11 en el que dicho agonista de SSTR-2 o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo tiene un valor de K_i para el SSTR-5 que es al menos 10 veces mayor del que tiene para el SSTR-2.
16. Uso según la reivindicación 11 en el que dicho agonista de SSTR-2 o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo tiene un valor de K_i menor de 5 nM.

ES 2 284 859 T3

17. Uso según la reivindicación 11 en el que dicho agonista de SSTR-2 o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo tiene un valor de K_i menor de 1 nM.

18. Un procedimiento según la reivindicación 11 en el que dicho agonista de SSTR-2 o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo es un compuesto elegido de la lista constituida por:

D-Nal-ciclo[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH₂;

ciclo[Tic-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Phe];

4-(2-hidroxietil)-1-piperazinilacetilo-D-Phe-ciclo(Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys)-Thr-NH₂; y

4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-2-etansulfonilo-D-Phe-ciclo(Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys)-Thr-NH₂;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

19. Un procedimiento según la reivindicación 11, en el que dicho agonista de SSTR-2 o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo comprende un resto de Tyr(I), en el que el átomo de yodo de dicho resto de Tyr(I) comprende un isótopo de yodo radioactivo.

20. Un procedimiento según la reivindicación 11 o la reivindicación 19, en el que dichas células de carcinoma medular tiroideo han formado metástasis fuera del tiroides.

21. Un procedimiento según la reivindicación 20, en el que dichas metástasis están presentes en la linfa, el pulmón, el hígado, el cerebro o el hueso.

22. Un procedimiento según la reivindicación 21, en el que dicho yodo es ¹²⁵I, ¹²⁷I o ¹³¹I.

23. Uso de un agonista de SSTR2 y de un agonista de SSTR5 en combinación en la fabricación de un medicamento para modular una tasa de proliferación de células de carcinoma medular tiroideo, en el que el agonista de SSTR2 reduce la tasa de proliferación de las células de CMT, y dicho agonista de SSTR5 atenúa la reducción inducida por el agonista de SSTR-2 en la tasa de proliferación celular.

FIGURA 1

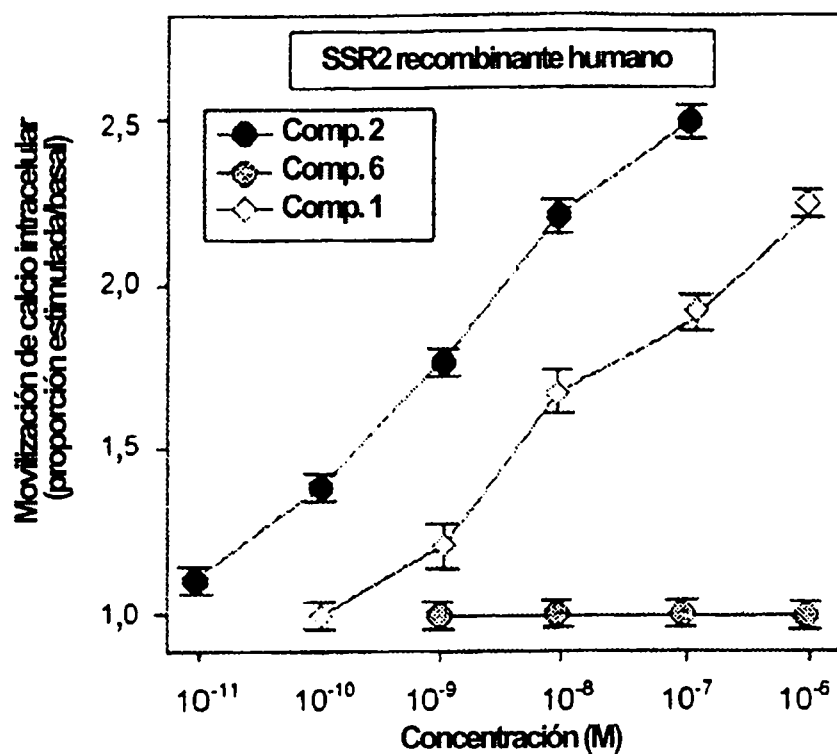


FIGURA 2

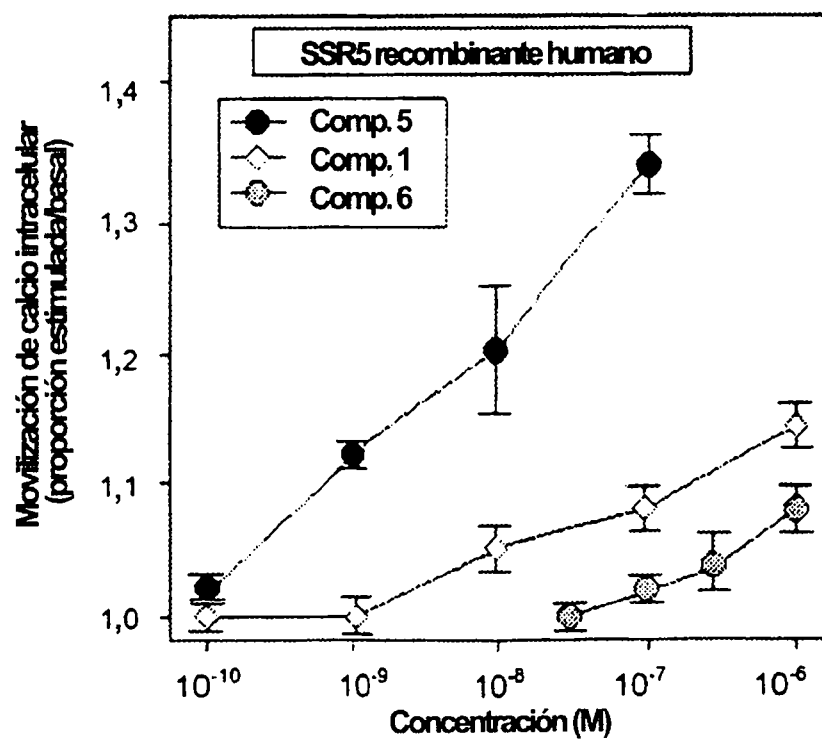
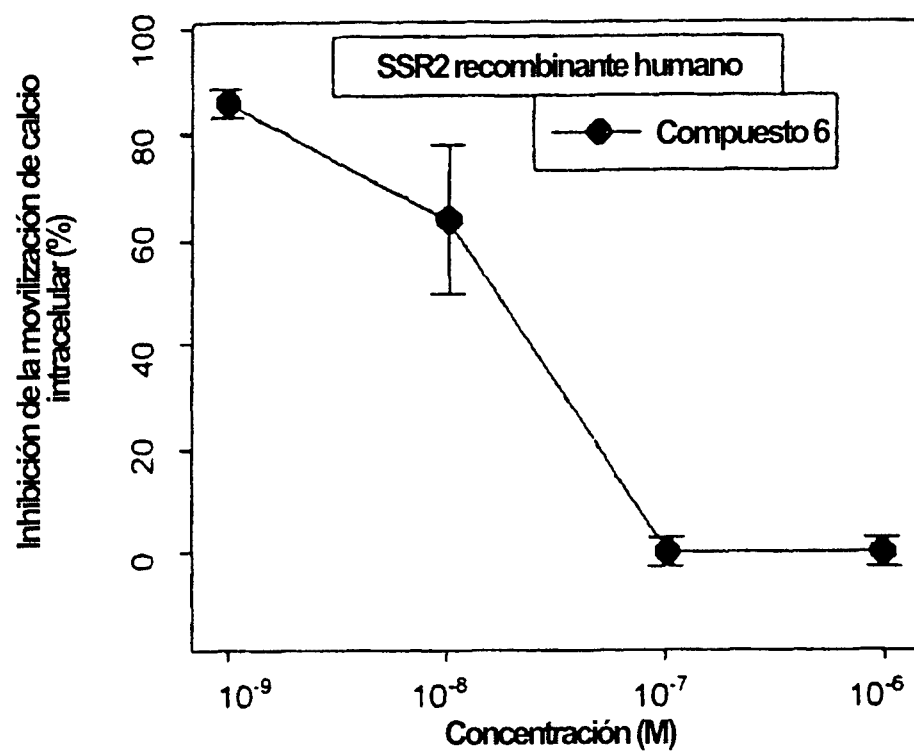


FIGURA 3



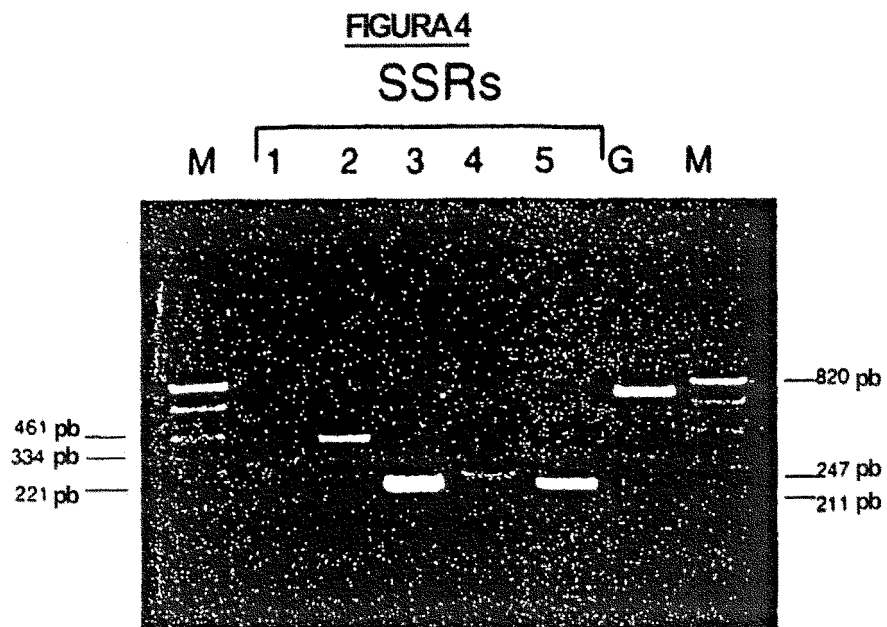


FIGURA 5

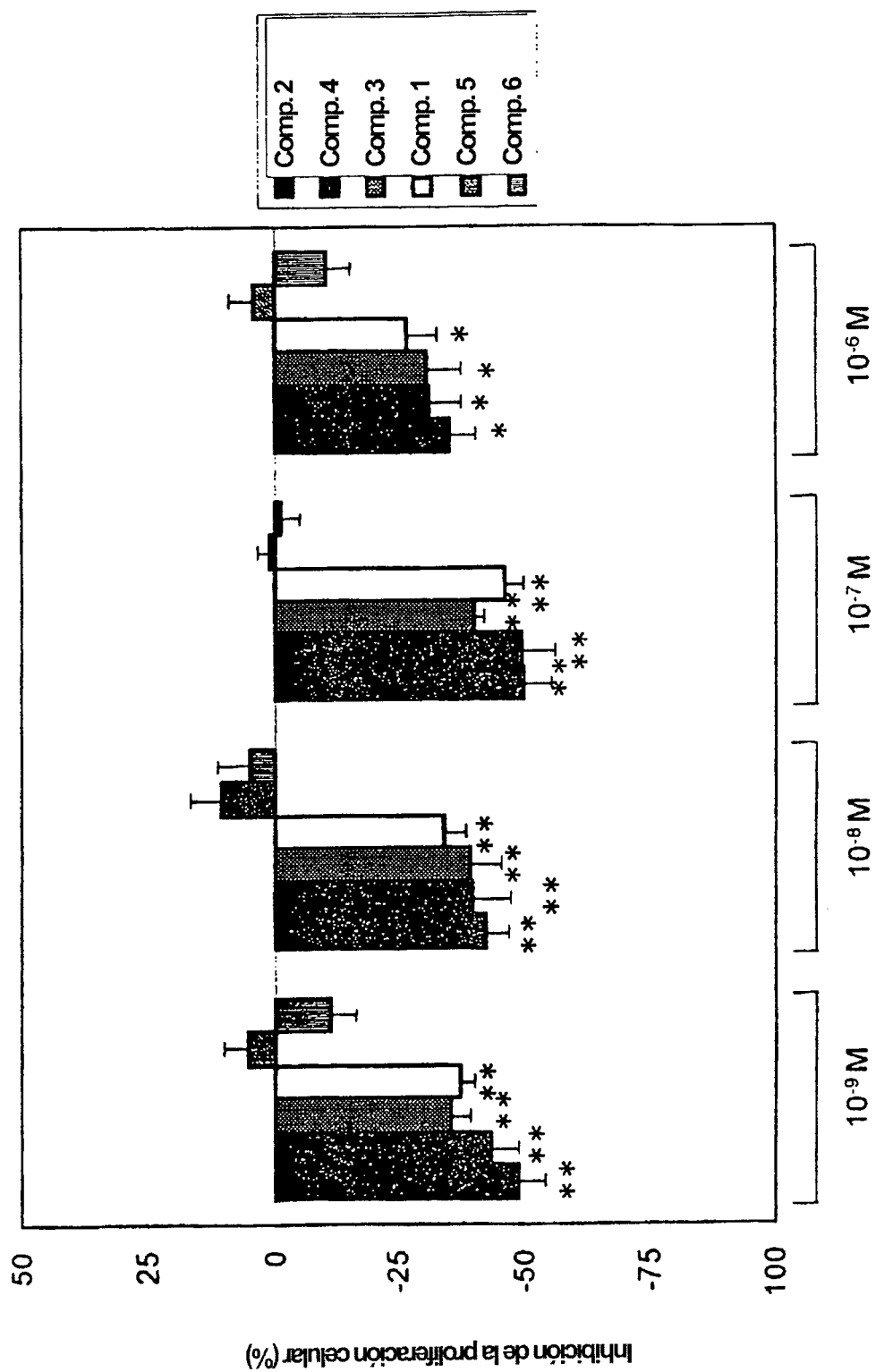


FIGURA 6

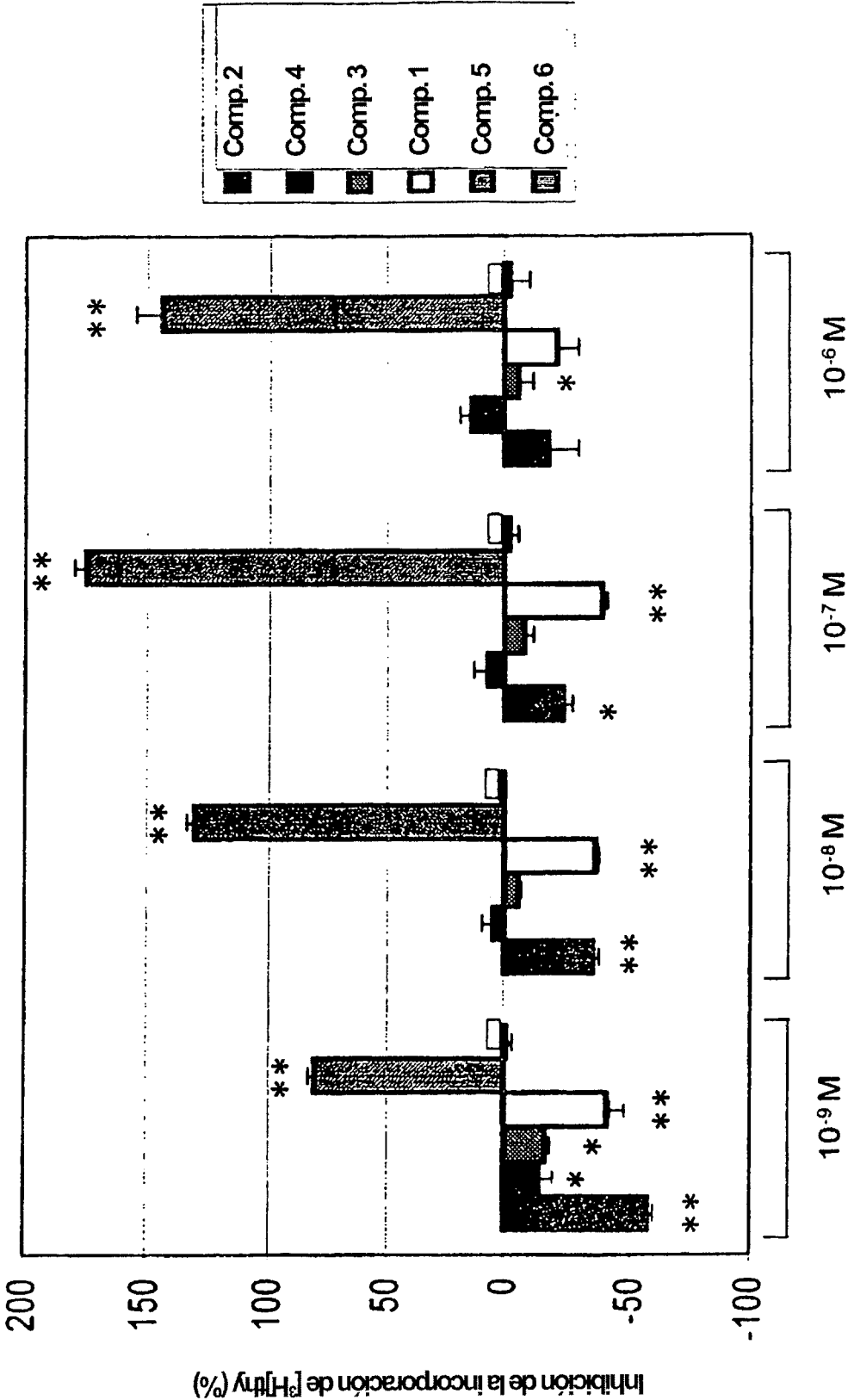
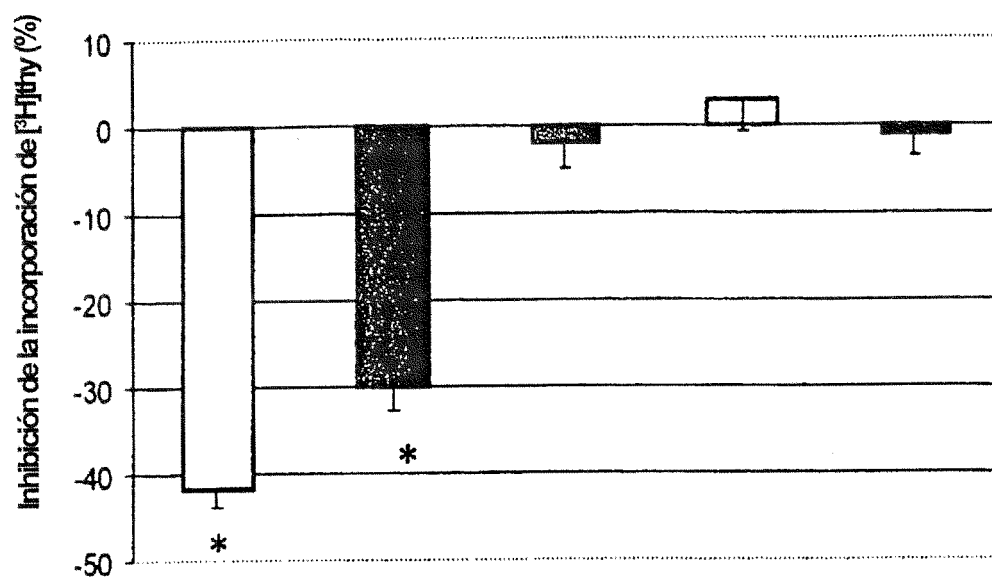


FIGURA 7



Comp. nº	Concentración (M)					
	10 ⁻⁷	0	0	10 ⁻⁷	0	0
2	0	10 ⁻⁷	0	0	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷
6	0	0	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷

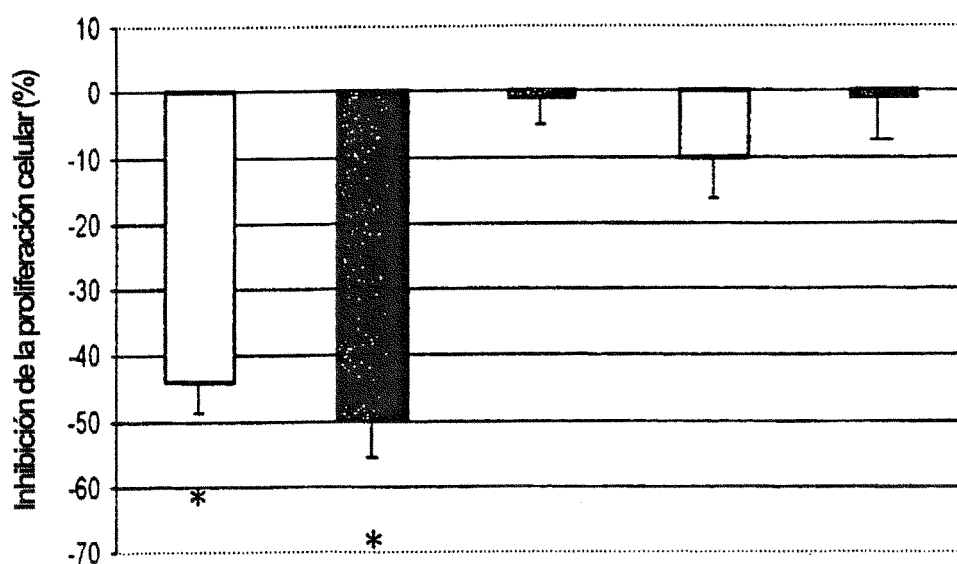


Figura 8



ES 2 284 859 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Il Consorzio Ferrara Richerche
Societe de Conseils de Recherches et D'Applications Scientifiques, S.A.S.
- 5 <120> Procedimiento para Modular la Proliferación de Células de Carcinoma Medular Tiroideo
<130> 50165/006EP2
<150> PCT/US02/06729
- 10 <151> 2002-03-06
<150> US 60/273.699
<151> 2001-03-06
<160> 18
- 15 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
<210> 1
<211> 8
<212> PRT
- 20 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Sintético
- 25 <221> MOD_ RES
<222> 1
<223> Phe en la posición 1 es D-Phe.
<221> MOD_ RES
- 30 <222> 4
<223> Trp en la posición 4 es D-Trp.
- 35 <400> 1
Phe Phe Trp Trp Lys Thr Phe Thr
1 5
- 40 <210> 2
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- 45 <220>
<223> Sintético
<221> VARIANTE
- 50 <222> 1
<223> Xaa en la posición 1 es D-Nal.
<221> MOD_ RES
<222> 2, 7
- 55 <223> Cys en las posiciones 2 y 7 están cicladas.
<400> 2
- 60 Xaa Cys Tyr Trp Lys Val Cys Thr
1 5
- <210> 3
- 65 <211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

ES 2 284 859 T3

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1
 5 <223> Xaa en la posición 1 es Tic.
 <221> MOD_ RES
 <222> 2
 10 <223> Trp en la posición 3 es D-Trp.
 <221> VARIANTE
 <222> 5
 <223> Xaa en la posición 5 es Abu.
 15 <221> MOD RES
 <222> (1)... (6)
 <223> Péptido está ciclado en la posición 1 y en la posición 6.
 20 <223> Sintético
 <400> 3
 Xaa Tyr Trp Lys Xaa Phe
 25 1 5
 <210> 4
 <211> 8
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> VARIANTE
 35 <222> 6
 <223> Xaa en la posición 6 es Abu
 <221> MOD_ RES
 40 <222> 1
 <223> Phe en la posición 1 es 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinilacetilo-D-Phe.
 <221> MOD_ RES
 <222> 2, 7
 45 <223> Cys en las posiciones 2 y 7 están cicladas.
 <221> MOD_ RES
 <222> 4
 50 <223> Trp en la posición 4 es D-Trp.
 <223> Sintético
 <400> 4
 55 Phe Cys Tyr Trp Lys Xaa Cys Thr
 1 5
 <210> 5
 60 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 5

ES 2 284 859 T3

<223> Xaa en la posición 5 es Abu.
 <221> MOD_ RES
 <222> 1
 5 <223> Phe en la posición 1 es 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-2-etansulfonilo-D-Phe.
 <221> MOD_ RES
 <222> 2, 7
 10 <223> Cys en las posiciones 2 y 7 están cicladas.
 <221> MOD_ RES
 <222> 4
 <223> Trp en la posición 4 es D-Trp
 15 <223> Sintético

 <400> 5

 20 Phe Cys Tyr Trp Lys Xaa Cys Thr
 1 5

 <210> 6
 25 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <221> VARIANTE
 <222> 1
 <223> Xaa en la posición 1 es Cpa.
 <221> MOD_ RES
 35 <222> 2
 <223> Cys en la posición 2 es D-Cys.
 <221> MOD_ RES
 40 <222> 2, 7
 <223> Cys en las posiciones 2 y 7 están cicladas.
 <221> MOD_ RES
 <222> 4
 45 <223> Trp en la posición 4 es D-Trp.
 <221> VARIANTE
 <222> 8
 50 <223> Xaa en la posición 8 es Nal.
 <223> Sintético

 <400> 6

 55 Xaa Cys Xaa Trp Lys Thr Cys Xaa
 1 5

 <210> 7
 60 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 65 <223> Sintético

ES 2 284 859 T3

	<400> 7	
	agccggttga ctattacgcc	20
5	<210> 8	
	<211> 21	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sintético	
15	<400> 8	
	gctctcactt ctaccattgt c	21
20	<210> 9	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	EP 1 390 406 B1	
25	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sintético	
30	<400> 9	
	ggtgaagtcc tctggaatcc	20
35	<210> 10	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
40	<220>	
	<223> Sintético	
45	<400> 10	
	ccattgccag tagacagagc	20
50	<210> 11	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
55	<220>	
	<223> Sintético	
	<400> 11	
60	tcattctgcct ctgctacctg	20
	<210> 12	
65	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	

ES 2 284 859 T3

	<220>		
	<223> Sintético		
5	<400> 12		
	gagcccaaag aaggcaggct		20
10	<210> 13		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
15	<220>		
	<223> Sintético		
	<400> 13		
20	cggcagctctt cggtgtctac		20
	<210> 14		
25	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
30	<220>		
	<223> Sintético		
	<400> 14		
35	gcatcaaggt cggtcacgac		20
	<210> 15		
40	<211> 23		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
45	<223> Sintético		
	<400> 15		
50	aacacgctgg tcactctacgt ggt		23
	<210> 16		
	<211> 22		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Sintético		
60	<400> 16		
	agacactggt gaactggttg ac		22
65	<210> 17		
	<211> 20		

ES 2 284 859 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
5	<223> Sintético	
	<400> 17	
10	atgaccctt cattgacctc	20
	<210> 18	
	<211> 20	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
20	<223> Sintético	
	<400> 18	
25	aagtggctgt tgagggaat	20
30		
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		