



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 328 077**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07006463 .9**
96 Fecha de presentación : **06.03.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1813625**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.08.2007**

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

30 Prioridad: **06.03.2001 US 273699 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.11.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.11.2009

73 Titular/es: **The Administrators of the Tulane
Educational Fund
1430 Tulane Avenue
New Orleans, Louisiana 70112, US**

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

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 de modulación de la proliferación de células de carcinoma tiroideo medular.

5 Antecedentes de la invención

Se ha demostrado que la somatostatina (SS), un tetradecapéptido descubierto por Brazeau y col., tiene potentes efectos inhibidores en diversos procesos secretores en tejidos tales como pituitaria, páncreas y tracto gastrointestinal. La SS actúa también como un neuromodulador en el sistema nervioso central. Estos efectos biológicos de SS, todos de naturaleza inhibidora, están estimulados a través de una serie de receptores acoplados a la proteína 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 afinidades similares para los ligandos SS endógenos pero tienen una distribución que difiere en diversos tejidos. La somatostatina se une a los cinco subtipos diferentes del receptor (SSTR) con afinidad relativamente alta e igual para cada subtipo.

Existe evidencia de que la SS regula la proliferación celular deteniendo el crecimiento celular mediante los subtipos 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 la apoptosis mediante el subtipo SSTR3 (Sharma K, y col., 1996 Mol Endocrinol 10: 1688-1696). Se ha demostrado que la SS y diversos análogos inhiben la proliferación normal y neoplásica *in vitro* e *in vivo* (Lamberts SW, y col., Endocr Rev 12: 450-482) mediante receptores SS específicos (SSTR) (Patel YC, 1999 Front Neuroendocrinology 20: 157-198) y acciones postreceptoras posiblemente diferentes (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, existe evidencia de que distintos subtipos de SSTR se expresan en tejidos humanos normales y neoplásicos (Virgolini I, y col., Eur J Clin Invest 27: 645-647), confiriendo diferentes afinidades tisulares respecto de diversos análogos de SS y respuesta clínica variable para sus efectos terapéuticos.

Se ha asociado la unión a los diferentes tipos de subtipos del receptor de la somatostatina con el tratamiento de dolencias y/o enfermedades. Por ejemplo, se ha atribuido la inhibición de la hormona del crecimiento al receptor de tipo 2 de la somatostatina ("SSTR2") (Raynor, y col., Molecular Pharmacol. 43: 838 (1993); Lloyd, y col., Am. J. Physiol. 268: G102 (1995)) mientras que se ha atribuido la inhibición de la insulina al receptor de tipo 5 de la somatostatina ("SSTR5") (Coy, y col. 197: 366-371 (1993)). Se ha asociado la activación de los tipos 2 y 5 con la supresión de la hormona del crecimiento y más concretamente con los adenomas que segregan GH (acromegalia) y los adenomas que segregan TSH. Se ha asociado la activación del tipo 2 pero no la del tipo 5 con el tratamiento de los adenomas que segregan prolactina. Otras conjeturas asociadas con la activación de los subtipos del receptor de la somatostatina incluyen la inhibición de la insulina y/o glucagón para tratar diabetes mellitus, angiopatía, retinopatía proliferativa, el fenómeno de alba y la nefropatía; la inhibición de la secreción de ácido gástrico y más concretamente las úlceras pépticas, fístula enterocutánea y pancreatocutánea, síndrome del intestino irritable, síndrome de evacuación gástrica rápida, síndrome de la diarrea líquida, diarrea relacionada con SIDA, diarrea inducida por quimioterapia, pancreatitis aguda o crónica y tumores gastrointestinales que segregan hormonas; tratamiento del cáncer tal como hepatoma; inhibición de la angiogénesis, tratamiento de trastornos inflamatorios tales como artritis; retinopatía, rechazo crónico al aloinjerto; angioplastia; evitando el sangrado del injerto de vaso y gastrointestinal. Se prefiere tener un análogo que sea selectivo para el subtipo o subtipos específicos del receptor de la somatostatina responsable(s) de la respuesta biológica deseada, reduciendo de esta manera la interacción con otros subtipos del receptor que podría provocar efectos secundarios indeseables.

La somatostatina (SS) y sus receptores (SSTR1 a SSTR5) se expresan en células C parafoliculares humanas y células de carcinoma tiroideo medular (MTC). MTC es un tumor que se origina a partir de células C parafoliculares tiroideas que producen calcitonina (CT), somatostatina, así como otros péptidos diversos (Moreau JP, y col., Metabolism 45 (8 Supl. 1): 24-26). Recientemente, Mato y col. demostraron que la SS y los SSTR se expresaban en MTC humano (Mato E, y col., J Clin Endocrinol Metab 83: 2417-2420). Se ha documentado que la SS y sus análogos inducen una disminución de los niveles de CT en plasma y una mejora sintomática en pacientes con MTC. Sin embargo, hasta ahora no se había demostrado claramente la actividad antiproliferativa de los análogos de la SS sobre las células tumorales (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). De esta manera, el desarrollo y la evaluación de los análogos del subtipo SSTR selectivos respecto del crecimiento de las células de MTC proporciona una herramienta útil para aplicación clínica. Hasta ahora no se ha informado de datos que conciernen a la implicación específica del subtipo SSTR en la regulación del crecimiento de células de MTC.

La presente memoria descriptiva se refiere al descubrimiento de que la línea de células TT de MTC humano, que muestra características de las células de MTC (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 manera estable todos los subtipos SSTR, responde a la activación de SSTR2 y SSTR5 mediante agonistas selectivos del subtipo con dos modelos diferentes en términos de incorporación de [³H]thy y número de células. Los SSTR2 suprimen significativamente la incorporación de [³H]thy en las células TT, es decir, por ejemplo, inhiben la síntesis de ADN y reducen la proliferación celular. Los agonistas selectivos para SSTR5 aumentan significativamente la incorporación

de [^3H]thy en las células TT, es decir, aumentan la síntesis de ADN, pero en solitario fracasan en influenciar la proliferación celular. Además, los antagonistas de SSTR2 contrarrestan la acción de los agonistas con preferencia por SSTR2 en las células TT. Aún más, concentraciones crecientes de un agonista selectivo de SSTR5 evita de manera dependiente de la dosis la supresión de la incorporación de [^3H]thy en las células TT y la proliferación producida por un agonista con preferencia por SSTR2, y viceversa, mostrando un antagonismo entre dichos agonistas.

Se han demostrado recientemente interacciones hetero y homodiméricas entre subtipos de familias de receptores 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 la pituitaria han demostrado que el subtipo 2 y el 5 de SSTR actúan sinérgicamente en la supresión de la hormona del 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 de SSTR5 reduce la actividad antiproliferativa mediada por 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 2 y 5 de SSTR pueden actuar de forma antagonista en la regulación del crecimiento celular.

De esta manera, los agonistas con preferencia por SSTR2 y SSTR5 ejercen efectos diferenciales sobre la proliferación de la línea de células TT tiroideas medulares *in vitro*, según su selectividad específica de SSTR. Se puede reducir la proliferación de la línea de células TT mediante los agonistas selectivos de SSTR2, pero no mediante los agonistas de SSTR5, y un agonista de SSTR5 puede evitar los efectos antiproliferativos mediados por SSTR2. El papel inhibidor clave de SSTR2 sobre la proliferación de células de MTC demuestra que los análogos que mejoran la afinidad y selectividad de SSTR2 frente a SSTR5 serían útiles como agentes antiproliferativos en el tratamiento del MTC.

Resumen de la invención

En un aspecto, la presente invención se dirige a un compuesto de fórmula: Cpa-ciclo(D-Cys-4-Pal-D-Trp-Lys-Thr-Cys)-NaI-NH₂, o una de sus sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula Cpa-ciclo(D-Cys-4-Pal-D-Trp-Lys-Thr-Cys)-NaI-NH₂, o una de sus sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptable para uso como antagonista del receptor de la somatostatina.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula Cpa-ciclo(D-Cys-4-Pal-D-Trp-Lys-Thr-Cys)-NaI-NH₂, o una de sus sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptable como antagonista del receptor de la somatostatina.

En una realización, dicho antagonista del receptor de la somatostatina es un antagonista selectivo de SSTR2.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1

Movilización de calcio intracelular mediada por SSTR2 in vitro

Se cosecharon células CHO-K1, que expresan el SSTR2 humano según se describe en la sección de Materiales y Procedimientos y a continuación se añadieron los análogos de SS (10^{-7} - 10^{-6} M) para la medida de la movilización del Ca²⁺ intracelular, expresada en forma de relación entre la concentración de calcio intracelular medida tras la adición de los análogos de SS y el valor basal observado. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron de 340 y 510 nm, respectivamente. Los datos se representan como promedio $\pm$ DEM.

Figura 2

Movilización de calcio intracelular mediada por SSTR5 in vitro

Se cosecharon células CHO-K1, que expresan el SSTR5 humano según se describe en la sección de Materiales y Procedimientos y a continuación se añadieron los análogos de SS (10^{-7} - 10^{-6} M) para la medida de la movilización del Ca²⁺ intracelular, expresada en forma de relación entre la concentración del calcio intracelular medida tras la adición de los análogos de SS (Compuesto 1, Compuesto 5 y Compuesto 6) y el valor basal observado. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron de 340 y 510 nm, respectivamente. Los datos se representan como promedio $\pm$ DEM.

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

Compuesto 1: D-NaI-ciclo[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH₂;

Compuesto 2: ciclo[Tic-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Phe];

Compuesto 3: 4-(2-Hidroxiethyl)-1-piperazinilacetil-D-Phe-ciclo(Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys)-Thr-NH₂;

Compuesto 4: 4-(2-Hidroxiethyl)-1-piperazina-2-etanosulfonil-D-Phe-ciclo(Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys)-Thr-NH₂;

Compuesto 5: D-Phe-Phe-Trp-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-NH₂; y

Compuesto 6: Cpa-ciclo(D-Cys-4-Pal-D-Trp-Lys-Thr-Cys)-NaI-NH₂

Figura 3

Inhibición in vitro de la movilización de calcio intracelular estimulada por SS mediante el antagonista de SSTR2

Se cosecharon células CHO-K1, que expresan el SSTR2 según se describe en la sección de Materiales y Procedimientos, y a continuación se añadieron el compuesto 6 (10^{-9} - 10^{-6} M) y SS (10 nM) para la medida del efecto de la movilización del calcio intracelular estimulada por el Compuesto 6 sobre SS (10^{-8} M), y se expresó en forma de porcentaje frente a SS sólo. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron de 340 y 510 nm, respectivamente. Los datos se representan como promedio $\pm$ DEM.

Figura 4

Expresión del ARNm de los receptores de somatostatina en células TT

Se trató el ARN extraído (1 μ g/reacción) con desoxirribonucleasa y se sometió a transcripción inversa usando Oligonucleótido(dT) como cebador. Las muestras incubadas sin enzima RT sirvieron como control. Se sometieron las alícuotas del ADNc generado y los controles negativos a la amplificación mediante la PCR subsiguiente de los SSTR, usando los cebadores indicados en la Tabla 1. Se resolvieron los productos de la PCR en un gel de agarosa al 2%. Se representan gráficamente en A los productos de la PCR esperados de SSTR1-5 (banda M, marcador de la PCR; G, producto de la PCR de la amplificación de GAPDH).

Figura 5

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

Se incubaron las células en placas de 24 pocillos durante 48 horas en un medio de cultivo suplementado con análogos de SS a diversas concentraciones (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , y 10^{-6} M). Los pocillos control se trataron con disolución vehículo y se midió la incorporación de [³H]thy como radioactividad en el material precipitado con TCA. Se evaluaron independientemente los datos de seis experimentos individuales por cuadruplicado y se expresaron como promedio $\pm$ DEM de porcentaje de inhibición de la incorporación de [³H]thy frente a las células control no tratadas *P < 0,05 y **P < 0,01 frente a control.

Figura 6

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

Se incubaron las células en placas de 96 pocillos durante 48 horas en un medio de cultivo suplementado con análogos de SS a diversas concentraciones (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , y 10^{-6} M). Los pocillos control se trataron con disolución vehículo. Se midió la proliferación de células TT como absorbancia a 490 nm de cada pocillo. Se evaluaron los datos de seis experimentos individuales independientes con ocho réplicas expresados como el promedio $\pm$ DEM del porcentaje de inhibición de la proliferación celular frente a las células control no tratadas *P < 0,05 y **P < 0,01 frente al control.

Figura 7

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

Panel superior: Se incubaron las células en placas de 24 pocillos durante 48 horas en un medio de cultivo suplementado con 100 nM de Compuesto 1 o Compuesto 2, con o sin el Compuesto 6 (10^{-7} M). Los pocillos control se trataron con disolución vehículo. Se midió la incorporación de [³H]thy como radioactividad en el material precipitado con TCA. Se evaluaron los datos de seis experimentos individuales independientemente con cuatro réplicas expresados como el promedio $\pm$ DEM del porcentaje de inhibición de la incorporación de [³H]thy frente a las células control no tratadas *P < 0,05 y **P < 0,01 frente al control.

Panel inferior: se incubaron las células en placas de 96 pocillos durante 48 horas en un medio de cultivo suplementado con 10^{-7} M de Compuesto 1 o compuesto 2 con o sin Compuesto 6 (10^{-7} M). Las células control se trataron con disolución vehículo. Se midió la proliferación de células TT como absorbancia a 490 nm de cada pocillo. Se evaluaron los datos de seis experimentos individuales con ocho réplicas expresados como el promedio $\pm$ DEM del porcentaje de inhibición de la proliferación celular frente a las células control no tratadas *P < 0,05 y **P < 0,01 frente al control,

Figura 8

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

Panel superior: Se incubaron las células en placas de 24 pocillos durante 48 horas en un medio de cultivo suplementado con el 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 el 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 control se trataron con disolución vehículo. Se midió la incorporación de [3 H]thy como radioactividad en material precipitado con TCA. Se evaluaron los datos de seis experimentos individuales independientemente con cuatro réplicas expresados como el promedio $\pm$ DEM del porcentaje de inhibición de la incorporación de [3 H]thy frente a las células control no tratadas *P < 0,05 y **P < 0,01 frente al control.

Panel inferior: Se incubaron las células en placas de 96 pocillos durante 48 horas en un medio de cultivo suplementados con el Compuesto 2 (10^{-7} M) sin o con concentraciones crecientes de Compuesto 5 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , y 10^{-6} M), o con el Compuesto 5 (10^{-7} M) con o sin concentraciones decrecientes de Compuesto 2 (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , y 10^{-9} M). Las células control se trataron con disolución vehículo y se midió la proliferación de células TT como absorbancia a 490 nm de cada pocillo. Se evaluaron los datos de seis experimentos individuales con ocho réplicas expresados como el promedio $\pm$ DEM del porcentaje de inhibición de la proliferación celular frente a las células control no tratadas *P < 0,05 y **P < 0,01 frente al control.

Descripción detallada de la invención

A no ser que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la técnica a la cual esta invención pertenece.

Se han aislado diversos receptores de somatostatina (los SSTR), por ejemplo, SSTR-1, SSTR-2, SSTR-3, SSTR-4, y SSTR-5. De esta manera, un agonista de la somatostatina puede ser uno o más de un agonista de SSTR-1, agonista de SSTR-2, agonista de SSTR-3, 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, agonista de SSTR-2) es un compuesto que (1) tiene una alta afinidad de unión (por ejemplo, K_i de menos de 100 nM o preferiblemente de menos de 10 nM o menos de 1 nM) para SSTR-2 (por ejemplo, según se define mediante el ensayo de unión con el receptor descrito a continuación) y (2) disminuye la velocidad de proliferación de las células del carcinoma tiroideo medular (por ejemplo, según se muestra mediante 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, K_i menor) para SSTR-2 que para 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, K_i de menos de 100 nM o preferiblemente menos de 10 nM o menos de 1 nM) para SSTR-5 (por ejemplo, según se define mediante el ensayo de unión con el receptor descrito a continuación) y (2) atenúa la disminución inducida por el agonista de SSTR-2 sobre la velocidad de proliferación de las células del carcinoma tiroideo medular (por ejemplo, según se muestra mediante 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 de tipo 5 de la somatostatina que tiene una afinidad de unión mayor (es decir, menor K_i) para SSTR-5 que para SSTR-2.

En una realización, el agonista de SSTR-2 es también un agonista selectivo de SSTR-2. En otra realización, el agonista selectivo de SSTR-2 tiene un valor de K_i para 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 mediante el ensayo de unión con el receptor descrito a continuación).

Los ejemplos de agonistas de SSTR-2 que se pueden usar para llevar a cabo la presente invención incluyen, pero no se limitan a:

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

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

4-(2-Hidroxietil)-1-piperazinilacetil-D-Phe-ciclo (Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys)-Thr-NH₂, (Compuesto 3), y

4-(2-Hidroxietil)-1-piperazina-2-etanosulfonil-D-Phe-ciclo(Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys)-Thr-NH₂, (Compuesto 4).

ES 2 328 077 T3

Un ejemplo de agonista de SSSTR-5 que se puede usar para llevar a cabo la presente invención incluye, pero no se limita a:

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

Los ejemplos adicionales de agonistas de la somatostatina son aquellos cubiertos por las fórmulas o aquellos enumerados específicamente en las publicaciones que se muestran a continuación.

Solicitud Europea N° P5 164 EU (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, 1992, Interlaken, Suiza;

Solicitud PCT N° WO 91/09056 (1991);

Solicitud Europea N° 0 363 589 A2 (1990);

Patente de los Estados Unidos N° 4.904.642 (1990);

Patente de los Estados Unidos N° 4.871.717 (1989);

Patente de los Estados Unidos N° 4.853.371 (1989);

Patente de los Estados Unidos N° 4.725.577 (1988);

Patente de los Estados Unidos N° 4.684.620 (1987);

Patente de los Estados Unidos N° 4.650.787 (1987);

Patente de los Estados Unidos N° 4.603.120 (1986);

Patente de los Estados Unidos N° 4.585.755 (1986);

Solicitud Europea N° 0 203 031 A2 (1986);

Patente de los Estados Unidos N° 4.522.813 (1985);

Patente de los Estados Unidos N° 4.486.415 (1984);

Patente de los Estados Unidos N° 4.485.101 (1984);

Patente de los Estados Unidos N° 4.435.385 (1984);

Patente de los Estados Unidos N° 4.395.403 (1983);

Patente de los Estados Unidos N° 4.369.179 (1983);

Patente de los Estados Unidos N° 4.360.516 (1982);

Patente de los Estados Unidos N° 4.358.439 (1982);

Patente de los Estados Unidos N° 4.328.214 (1982);

Patente de los Estados Unidos N° 4.316.890 (1982);

Patente de los Estados Unidos N° 4.310.518 (1982);

Patente de los Estados Unidos N° 4.291.022 (1981);

Patente de los Estados Unidos N° 4.238.481 (1980);

Patente de los Estados Unidos N° 4.235.886 (1980);

Patente de los Estados Unidos N° 4.224.199 (1980);

Patente de los Estados Unidos N° 4.211.693 (1980);

Patente de los Estados Unidos N° 4.190.648 (1980);

5 Patente de los Estados Unidos N° 4.146.612 (1979);

Patente de los Estados Unidos N° 4.133.782 (1979);

10 Patente de los Estados Unidos N° 5.506.339 (1996);

Patente de los Estados Unidos N° 4.261.885 (1981);

Patente de los Estados Unidos N° 4.728.638 (1988);

15 Patente de los Estados Unidos N° 4.282.143 (1981);

Patente de los Estados Unidos N° 4.215.039 (1980);

20 Patente de los Estados Unidos N° 4.209.426 (1980);

Patente de los Estados Unidos N° 4.190.575 (1980);

Patente Europea N° 0 389 180 (1990);

25 Solicitud Europea N° 0505 680 (1982);

Solicitud Europea N° 0 083 305 (1982);

Solicitud Europea N° 0 030 920 (1980);

30 Solicitud PCT N° WO 88/05052 (1988);

Solicitud PCT N° WO 90/12811 (1990);

35 Solicitud PCT N° WO 97/01579 (1997);

Solicitud PCT N° WO 91/18016 (1991);

40 Solicitud Británica N° GB 2.095.261 (1981); y

Solicitud Francesa N° FR 2.522.655 (1983).

45 Señalar que para todos los agonistas de la somatostatina descritos en el presente documento, cada resto de aminoácido representa la estructura de $-\text{NH}-\text{C}(\text{R})\text{H}-\text{CO}-$, en la que R es la cadena secundaria (por ejemplo, CH_3 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, se pretende que sea la configuración de la forma L a no ser que se designe expresamente la forma D. Por claridad, no se muestran los enlaces disulfuro (por ejemplo, el puente disulfuro) que existen entre dos tioles libres de restos Cys. Las abreviaturas de los aminoácidos comunes son según las recomendaciones de la IUPAC-IUB.

Síntesis de agonistas de la somatostatina

55 Los procedimientos para sintetizar agonistas de la somatostatina están bien documentados y están comprendidos dentro de la capacidad de una persona normalmente experta en la técnica.

60 La síntesis de secuencias cortas de aminoácidos está bien establecida en la técnica de péptidos. Por ejemplo, la síntesis de HD-Phe-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr- NH_2 , descrita anteriormente se puede conseguir siguiendo el protocolo que se muestra en el Ejemplo I de la Solicitud de Patente Europea 0 395 417 A1. La síntesis de agonistas de la somatostatina con un término N sustituido se puede conseguir, por ejemplo, siguiendo el protocolo que se define en el documento WO 88/02756, la Solicitud de Patente Europea N° 0 329 295 y la Publicación PCT N° WO 94/04752.

65 Alguno de los compuestos de la presente invención puede tener al menos un centro asimétrico. Pueden estar presentes centros asimétricos adicionales en la molécula dependiendo de la naturaleza de los diversos sustituyentes de la molécula. Cada uno de dichos centros asimétricos producirá dos isómeros ópticos y se pretende que todos los mencionados isómeros ópticos, ya sean isómeros ópticos separados, puros o parcialmente purificados, mezclas racémicas o mezclas diasterómeras de los mismos, estén incluidos dentro del alcance de la presente invención.

Se pueden aislar generalmente los compuestos de la presente invención en forma de sus sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables, tales como las sales derivadas de usar ácidos inorgánicos y orgánicos. Los ejemplos de dichos ácidos son clorhídrico, nítrico, sulfúrico, fosfórico, fórmico, acético, trifluoroacético, propiónico, maleico, succínico, D-tartárico, L-tartárico, malónico, metanosulfónico y similares. Además, algunos compuestos que contienen una función ácida tales como carboxilo se pueden aislar en forma de su sal inorgánica en la que el contraión se puede seleccionar a partir de sodio, potasio, litio, calcio, magnesio y similares, así como de bases orgánicas.

Se pueden formar sales farmacéuticamente aceptables tomando aproximadamente 1 equivalente de un agonista de SSTR-2, por ejemplo, el compuesto 1, y poniendo éste en contacto con aproximadamente 1 equivalente o más del ácido correspondiente apropiado de la sal que se desea. La preparación y el aislamiento de la sal resultante son bien conocidas por la persona normalmente experta en la técnica.

Los compuestos de esta invención se pueden administrar mediante rutas de administración oral, parenteral (por ejemplo, inyección intramuscular, intraperitoneal, intravenosa o subcutánea, o implante), nasal, vaginal, rectal, sublingual o tópica y se pueden formular con vehículos farmacéuticamente aceptables para proporcionar formas de dosificación apropiadas para cada ruta de administración. Según esto, la presente invención incluye dentro de su alcance composiciones farmacéuticas que comprenden, como ingrediente activo, al menos un agonista de SSTR-2 en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las formas de dosificación sólidas para la administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En dichas formas de dosificación sólidas, el compuesto activo se premezcla con al menos un vehículo inerte farmacéuticamente aceptable tal como sacarosa, lactosa, o almidón. Dichas formas de dosificación pueden comprender también, como es habitual en la práctica, otras sustancias adicionales diferentes tales como diluyentes inertes, por ejemplo, agentes lubricantes tales como estearato de magnesio. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las formas de dosificación pueden comprender también agentes tamponantes. Se pueden preparar adicionalmente los comprimidos y las píldoras con recubrimientos entéricos.

Las formas de dosificación líquidas para la administración oral incluyen emulsiones, disoluciones, suspensiones, jarabes farmacéuticamente aceptables, conteniendo los elixires diluyentes inertes comúnmente usados en la técnica, tales como agua. Además de dichos diluyentes inertes, las composiciones pueden incluir también adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, y agentes endulzantes, aromatizantes y perfumantes.

Las preparaciones según esta invención para la administración parenteral incluyen disoluciones, suspensiones, o emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Los 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 pueden contener también adyuvantes tales como agentes conservantes, humectantes, emulsionantes, y dispersantes. Se pueden esterilizar mediante, por ejemplo, filtración a través de un filtro que retiene bacterias, incorporando agentes esterilizantes en las composiciones, irradiando las composiciones, o calentando las composiciones. Se pueden preparar también en forma de composiciones sólidas estériles que se pueden disolver en agua estéril, o algún otro medio inyectable estéril inmediatamente antes del uso.

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

Las composiciones para la administración nasal o sublingual se preparan también con excipientes estándar bien conocidos de la técnica.

En general, se puede variar una dosificación efectiva del ingrediente activo en las composiciones de esta invención; sin embargo, es necesario que la cantidad del ingrediente activo sea tal que se obtenga una forma de dosificación adecuada. La dosificación seleccionada depende del efecto terapéutico deseado, de la ruta de administración, y de la duración del tratamiento, todo lo cual está dentro de la esfera del conocimiento de una persona normalmente experta en la técnica. En general, se administran niveles de dosificación de entre 0,0001 a 100 mg/kg de peso corporal diario a seres humanos y otros animales, por ejemplo, mamíferos.

Un intervalo de dosificación preferido es 0,01 a 10,0 mg/kg de peso corporal diariamente, que se puede administrar como una dosis única o dividida en múltiples dosis.

Materiales y procedimientos

Se usó el análisis de la RT-PCR para demostrar que los ARN de los cinco subtipos de SSTR se expresaban en la línea de células de MTC humano, TT. Se puede evaluar la capacidad de los análogos de SS con diferentes afinidades y especificidades respecto de los subtipos de SSTR 2 y 5 para influenciar la actividad proliferativa de las células TT teniendo en cuenta la incorporación de [³H]thy, considerada una medida indirecta de la actividad sintética del ADN, y del número de células viables.

Todos los agonistas preferentes de SSTR2 fueron capaces de suprimir significativamente el número de células TT a concentraciones que oscilaban entre 10⁻⁹ M y 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 fue evidente su máximo efecto inhibidor sobre el número de células. Cada compuesto SSTR2 ensayado mostró una tendencia a disminuir la eficacia con el aumento de la concentración, sin embargo, las curvas de respuesta en forma de campana son comunes para SS. La inhibición de la incorporación de [^3H]thy y del 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 demostró por la tinción del Azul Trypan. Además, este efecto estuvo completamente contrarrestado por el tratamiento simultáneo de las células TT con el Compuesto 6, un antagonista selectivo de SSTR2. Tomados en su conjunto, estos resultados indican que los análogos de SS con selectividad preferente por SSTR2 inhibieron la proliferación de células TT que interactuaban específicamente con SSTR2. Cultivo de la línea de células TT.

Se obtuvo la línea de células TT de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EE.UU.). La línea de células TT está constituida por células parafooliculares que producen CT transformado aneuploide que se caracterizan por la presencia de una mutación TGC a TGG (Cys a Trp) en el exón 11 del codón 634 en el protooncogén RET (Cooley LD, y col., 1995 Cancer Genet Cytogenet 80: 138-149), una característica que los inventores confirmaron en la línea celular con la que trabajaron. Además, las células TT muestran una expresión desequilibrada del gen p53 supresor del tumor (Velasco JA, y col., 1997 Int J Cancer 73: 449-455). Los estudios de inmunohistoquímica demostraron que las células TT expresan CT y el receptor de CT (Frendo JL, y col., 1994 FEBS Lett. 342: 214-216), el antígeno carcino-embriónico (CEA), SS, la neurotensina, el péptido que libera la gastrina (GRP), Leu y Met-enkefalina, el péptido que libera la hormona paratiroidea (PTHrp), la cromogranina A, SP-I, la sinaptofisina, la enolasa específica de neuronas (NSE), el receptor de la 1,25-dihidroxitamina D_3 , la tiroxina hidroxilasa, la α -tubulina, y la citoqueratina (Zabel M, y col., 1995 Histochemical J. 27: 859-868). Las células TT segregan una cantidad significativa de CT y responden a los cambios en los niveles de calcio ionizado (Zabel M, y col., 1992 Histochemistry 102: 323-327). De esta manera, la línea de células TT es adecuada para los estudios sobre la función parafoolicular y las respuestas a los estímulos endocrinos y farmacológicos.

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

Se extrajo el ARN total de las células TT subconfluentes usando TRIZOL (Life Technologies, Milán, Italia). El protocolo del TRIZOL es una modificación de la extracción con guanidinio/fenol. Brevemente, los medios celulares cultivados se aspiraron y las células se lavaron con PBS 1 X. Se añadió reactivo TRIZOL y se lisaron las células 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 a continuación se centrifugó a $12000 \times g$ durante 15 min. Se retiró la capa acuosa de la mezcla centrifugada. Se añadió isopropanol para precipitar el ARN, se recogió el residuo, se lavó con etanol al 75% y se secó al aire. Se volvió a suspender el ARN total en agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) y se cuantificó usando espectrometría UV a 260 nm. Para evitar la contaminación del ADN, se trató el ARN con desoxirribonucleasa libre de ribonucleasa (Promega, Milán, Italia).

RT-PCR

Usando un kit de síntesis del ADN complementario (ADNc) de primera cadena (Sistema de Preamplificación SuperScript para la síntesis del ADNc de Primera Cadena, Life Technologies, Milán, Italia), 1 μg de ARN total se transcribió de manera inversa según el protocolo del fabricante. La mezcla RT en tubos de PCR se cubrió con 50 μl de aceite mineral ligero blanco (Sigma-Aldrich Corp. Milán, Italia); Se llevó a cabo la RT en el Minicycler (MJ Research Inc., Watertown, MA, EE.UU.) usando un programa con los parámetros siguientes: 10 min a 70°C , 1 min a 4°C , 5 min a 4°C . Tras suplementar con SuperScript II, se completó la reacción a 42°C durante 50 min y a continuación a 70° durante 15 min. Las se digirieron muestras con RNasa H (Promega, Milán, Italia) a 37°C durante 20 min, y a continuación se almacenaron a -20°C hasta la primera PCR.

A continuación se amplificó el ADNc (1 μl de la reacción de la transcriptasa inversa) mediante la PCR con 1 U de Taq ADN polimerasa (Life Technologies, Milán, Italia), en las condiciones recomendadas por los suministradores en una mezcla de reacción de 50 μl . Tras la desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, se llevaron a cabo las reacciones de la PCR usando los cebadores de oligonucleótidos y las condiciones relacionadas en la Tabla 1, describiendo el tamaño de los fragmentos esperados. Se analizaron los productos de la PCR en un gel de agarosa al 2% y se visualizaron mediante la tinción de bromuro de etidio (ETB). Para asegurar que no se producía contaminación durante el curso del procedimiento de la RT-PCR, se prepararon dos tipos de controles negativos. Se preparó el primer control negativo omitiendo el ARN total en la RT. Se preparó el segundo sustituyendo la mezcla de ADNc con agua en la reacción de la PCR. Se consideró útil la PCR sólo si no se observaban bandas en las bandas de control negativo en un gel de agarosa al 2%. Cada producto de la PCR se sometió a la digestión mediante enzima de restricción y se analizó sobre un gel de agarosa al 2% para confirmar adicionalmente la identificación correcta de los amplicones.

Agonistas y antagonistas selectivos de SSTR

Se relacionan en la Tabla 2 los análogos de SS usados en este estudio y sus afinidades respectivas respecto de los diferentes SSTR. Cada compuesto, proporcionado por Biomeasure Incorporated (Milford, MA, EE.UU.), se volvió a suspender en ácido acético 0,01 N que contenía albúmina de suero bovino al 0,1% (BSA) con el fin de proporcionar

una solubilidad uniforme y evitar la unión no específica a las diversas superficies de la preparación. Se determinaron la especificidad y la selectividad de los análogos mediante el Ensayo de Unión al Radioligando y se transfectaron de manera estable las células CHO-K1 con cada uno de los subtipos de SSTR, como sigue.

5 Las secuencias completas de codificación de los fragmentos genómicos de los genes de SSTR 1, 2, 3, y 4 y el clon de un ADNc de SSTR5 se subclonaron en el vector de expresión en mamíferos pCMV (Life Technologies, Milán, Italia). Se obtuvieron líneas de células clonales que expresaban de manera estable los SSTR 1-5 mediante transfección en células CHO-K1 (ATCC, Manassas, Va, EE.UU.) usando el procedimiento de precipitación simultánea con fosfato de calcio (Davis L, y col., 1994 en: Basic Methods in Molecular Biology, 2ª edición, Appleton & Lange, Norwalk, CT, EE.UU.: 611-646). Se incluyó el plásmido pRSV-neo (ATCC) como marcador seleccionable. Se seleccionaron
10 las líneas celulares clonales en los medios RPMI 1640 que contenían 0,5 mg/ml de G418 (Life Technologies, Milán, Italia), se clonó el anillo, y expandió en el cultivo.

Se obtuvieron las membranas para los ensayos de unión del receptor *in vitro* 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 residuos finales se volvieron a suspender en Tris-HCl 10 mM para el ensayo. Para los ensayos de los SSTR 1, 3, 4, y 5, se incubaron alícuotas de las preparaciones de membrana durante 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 del ensayo fue de 0,3 ml. Para el ensayo de SSTR 2, se empleó [¹²⁵I]MK-678
20 0,05 nM como radioligando y el tiempo de incubación fue de 90 min a 25°C. las incubaciones se terminaron mediante filtración rápida a través de filtros de GF/C (prehumedecidos en polietileneimina al 0,3%) usando un manguito de filtración Brandel. A continuación se lavaron cada tubo y filtro tres veces con alícuotas de 5 ml de tampón enfriado en hielo. Se definió la unión específica como la unión total de radioligando menos la unión en presencia de 1000 nM de SS-14 para SSTR 1, 3, 4, y 5, o de 1000 nM de MK-678 para SSTR2.
25

Evaluación de la actividad biológica

30 Se evaluó la actividad biológica de los agonistas y antagonistas selectivos de SSTR mediante el ensayo de movilización del calcio en células CHO-K 1 que expresaban el SSTR2 o el SSTR5 humano. Se cosecharon las células incubando en una disolución salina tamponada con EDTA/fosfato al 0,3% (25°C) y se lavaron dos veces mediante centrifugación. Las células lavadas se volvieron a suspender en disolución salina tamponada con Hank (HBSS) para introducir el indicador de Ca²⁺ fluorescente Fura-2AM. Las suspensiones celulares (aproximadamente 10⁶ células/ml)
35 se incubaron con Fura-2AM 2 mM durante 30 min a 25°C. Se retiró el fura-2AM no introducido mediante centrifugación dos veces en HBBS, y las suspensiones finales se transfirieron a un espectrofluorómetro (Hitachi F-2000) equipado con un mecanismo de agitación magnética y un recipiente de tipo cubeta con temperatura regulada. Tras el equilibrio a 37°C, se añadieron los análogos de SS para la medida de la movilización del Ca²⁺ intracelular. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron de 340 y 510 nm, respectivamente. En las células que expresaban SSTR2 (Figura 1), el Compuesto 2 y el Compuesto 1 estimularon significativamente la movilización del Ca²⁺ intracelular (indicado como la relación entre el valor estimulado y el basal) mientras que el Compuesto 6 no lo hizo, a las concentraciones ensayadas. Además, el Compuesto 4 y el Compuesto 3 fueron igualmente muy potentes en la estimulación de la movilización del Ca²⁺. En las células que expresaban SSTR5 (Figura 2), el Compuesto 5 y el Compuesto 1 estimularon significativamente la movilización del Ca²⁺ intracelular, mientras que el Compuesto 6 mostró una ligera actividad agonista en el intervalo de 300 a 1000 nM. En las células que expresaban SSTR2 (Figura 3), el Compuesto 6 inhibió la movilización del Ca²⁺ intracelular inducida por SS en las células en las células que expresaban SSTR2 en una manera dependiente de la dosis con la supresión completa de la acción de SS a aproximadamente 10⁻⁷ M. Por tanto, la evaluación de la movilización del Ca²⁺ intracelular demostró que la actividad biológica de cada uno de los diversos análogos era acorde con su perfil de unión al receptor. Síntesis de ADN.
40
45
50

Se evaluaron los efectos de los agonistas y antagonistas selectivos de SSTR sobre la síntesis de ADN de las células TT determinando la velocidad de incorporación de [³H]timidina ([³H]thy), según se ha descrito anteriormente (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). Se plaquearon las células TT en placas de 24 multipocillos (10⁵ células/pocillo) y se incubaron durante 48 horas en un medio suplementado con FBS al 10% en presencia de [³H]thy (1,5 μCi/ml; 87 Ci/mmol) con o sin cada análogo de SS a concentraciones que oscilaban entre 10⁻⁶ a 10⁻⁹ M. Los tratamientos se renovaron añadiendo análogos frescos a los pocillos después de las primeras 24 h de incubación, sin retirar el medio.
55

60 Tras la incubación, se lavaron las células tres veces con PBS enfriado en hielo y dos veces con ácido tricloroacético (TCA) al 10% enfriado en hielo. El material precipitado con TCA se solubilizó en 500 μl de hidróxido de sodio 0,2 mol (1 y SDS al 0,1%. A continuación se contó la radioactividad asociada a las células en un espectrómetro por centelleo. Se obtuvieron los resultados (cuentas por min por pocillo) determinando el valor promedio de al menos seis experimentos por cuadruplicado. Se evaluó la viabilidad de las células TT en los cultivos control y tratados mediante la tinción del azul Trypan tras 24 y 48 horas, y el número de células viables fue de casi el 85-95%.
65

Proliferación celular

Se evaluaron los efectos de los agonistas y antagonistas selectivos de SSTR sobre la proliferación de células TT mediante el Ensayo de Proliferación Celular No Radioactivo Acuoso CELL-TITER 96 (Promega, Milán, Italia), un procedimiento colorimétrico para determinar el número de células viables en los ensayos de proliferación. El ensayo contiene disoluciones de un compuesto de tetrazolio (reactivo de Owen, MTS) y un reactivo de acoplamiento electrónico (metosulfato de fenazina; PMS). El MTS fue biorreducido por las células a formazán, que es soluble en medio de cultivo de tejido. Se puede medir la absorbancia del formazán a 490 nm directamente en 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 de MTS en formazán soluble acuoso se lleva a cabo mediante las enzimas deshidrogenasas que se encuentran en células metabólicamente activas. La cantidad de producto de formazán según se determinó por la cantidad de absorbancia a 490 nm es directamente proporcional al número de células vivas en el cultivo. Brevemente, se plaquearon las células TT en placas de 96 multipocillos (2×10^4 células/pocillo) y se incubaron durante 48 horas en un medio suplementado con FBS al 10% en presencia o ausencia de cada análogo de SS a concentraciones que oscilaban entre 10^{-6} y 10^{-9} M. Se renovaron los tratamientos añadiendo análogos frescos a los pocillos tras las primeras 24 h de incubación. Al final del período de incubación, se añadieron 20 μ l de una disolución combinada de MTS/PMS a cada pocillo con una pipeta automática, y se incubaron las placas durante 4 horas más a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% humidificada. A continuación se registró la absorbancia a 490 nm usando un lector de placas ELISA (EASIA Reader, Medgenix, Camarillo, CA). Se obtuvieron los resultados (absorbancia a 490 nm) determinando el valor promedio de al menos seis experimentos en ocho réplicas.

Resultados*Expresión de SSTR en la línea de células TT de MTC humano*

Para entender el papel individual de los subtipos SSTR2 y SSTR5 en el control de la proliferación de células C parafoliculares, los inventores evaluaron si las células TT expresaban los SSTR que podrían mediar una respuesta potencial a los compuestos selectivos para los subtipos SSTR individuales. Para responder a esta pregunta, los inventores aislaron el ARN total de las células TT cultivadas y llevaron a cabo las reacciones de la RT-PCR en las condiciones descritas en Materiales y Procedimientos. Se aseguró la integridad del ADNc mediante la presencia de la señal GAPDH. Se evaluó la ausencia de contaminación en el ADN genómico en las muestras de ADNc mediante la ausencia de cualquier amplificación en la reacción de la PCR usando muestras transcritas de manera no inversa. Se encontró que la amplificación positiva de SSTR1, 2, 3, 4, y 5 en la línea celular examinada (Fig. 4) demostraba que estos receptores se expresaban en la línea de células TT de MTC humano. La demostración de que la línea de células TT expresa de manera estable los subtipos SSTR hace de este sistema un modelo celular adecuado para evaluar la acción de los análogos de SS selectivos para el receptor.

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

Se presentan en la Figura 5 los valores de la incorporación de [³H]thy con concentraciones de 10^{-9} a 10^{-6} M de agonistas preferentes de SSTR2 (Compuesto 1, Compuesto 2, Compuesto 3, y Compuesto 4), el agonista preferente de SSTR5 (Compuesto 5) y el antagonista preferente de SSTR2 (Compuesto 6). Según se indica, el Compuesto 2 suprimió significativamente la incorporación de [³H]thy en un 58-23% a concentraciones que oscilaban entre 10^{-9} y 10^{-7} M. El Compuesto 1 suprimió significativamente la incorporación de [³H]thy en un 41-21% a concentraciones que oscilaban entre 10^{-9} y 10^{-6} M. La incorporación de [³H]thy se redujo también significativamente mediante el Compuesto 4 (-13%, $p < 0,05$) y 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 las células TT en un 80-175%. El antagonista selectivo de SSTR2, el compuesto 6, no altera la incorporación de [³H]thy en las células TT en comparación con las células control no tratadas.

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

Para examinar con más detalle la actividad de los análogos de SS sobre el crecimiento de las células TT, se analizó también su efecto sobre el número de células viables. Se representan en la Figura 6 los efectos de los agonistas preferentes de SSTR2, un agonista preferente de SSTR5 y un antagonista preferente de SSTR2 sobre el número de células TT viables a concentraciones que oscilan entre 10^{-9} y 10^{-6} M. Según se indica, todos los compuestos preferentes de SSTR2 inhibieron significativamente la proliferación celular, cuando se los comparó con las células control no tratadas a cada concentración ensayada. El agonista selectivo de SSTR5, el Compuesto 5, produjo un ligero aumento de la proliferación de células TT (hasta un 11% a 10^{-8} M), sin embargo, esto no representa una diferencia estadística respecto de las células control no tratadas. El antagonista selectivo de SSTR2, el Compuesto 6, no parece afectar el crecimiento de las células TT a las concentraciones ensayadas.

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

Para aclarar adicionalmente si SSTR2 está específicamente implicado en la mediación de la actividad antiprolifera-
tiva de los agonistas preferentes de SSTR2, se evaluaron la incorporación de [^3H]thy y el crecimiento celular en células
TT expuestas durante 48 horas al Compuesto 1 y el Compuesto 2, cada uno solo (a 10^{-7} M) o en combinación con el
Compuesto 6, un antagonista selectivo de SSTR2 a concentración equimolar (10^{-7} M). Se suprimió la inhibición de la
incorporación de [^3H]thy inducida por el Compuesto 1 y el Compuesto 2 mediante el tratamiento simultáneo de célu-
las TT con el Compuesto 6 (Figura 7, panel superior). La inhibición de la proliferación de células TT inducida por el
Compuesto 1 se redujo significativamente desde el 46% al 10% mediante el tratamiento simultáneo con el Compuesto
6. Además, el Compuesto 6 pareció bloquear completamente la actividad antiproliferativa del Compuesto 2 (Figura
7, panel inferior). De esta manera, se demostró claramente la implicación específica de SSTR2 en la mediación del
efecto inhibitor de un agonista de SSTR2 sobre la proliferación de las células TT.

*Efecto de la combinación de un agonista preferente de SSTR2 con un agonista preferente de SSTR5 sobre la incorpo-
ración de [^3H]thy y la proliferación celular*

Con el fin de analizar los efectos de un agonista de SSTR2 y de SSTR5 en combinación, se examinaron la incorpo-
ración de [^3H]thy y la proliferación ensayando cada uno del Compuesto 2 y el Compuesto 5 a 10^{-7} M en combinación
con dosis crecientes (desde 10^{-9} M a 10^{-6} M) del otro compuesto. En la Figura 8 se resumen los resultados. El aumento
de las concentraciones del agonista de SSTR5 (10^{-9} M a 10^{-6} M) evitó de manera dependiente de la dosis la supresión
de la incorporación de [^3H]thy a las células TT (Figura 8, panel superior) y la proliferación (Figura 8, panel inferior)
producida por el agonista de SSTR2 (10^{-7} M). Estos datos demuestran un antagonismo entre los efectos mediados por
SSTR5 y SSTR2 sobre la proliferación.

(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla 1: Cebadores y condiciones de PCR para amplificación de los SSR

SSR	Cebadores	Hibridación	Desnaturalización	Extensión	Ciclos	Fragmento esperado (pb)
1	Dir: 5'-AGCCGGTTGACTATTACGCC-3' Inv: 5'-GCTCTCACTTCTACCAATTGTC-3'	95°C, 30"	60°C, 1'	72°C, 2'	45	334
2	Dir: 5'-GGTGAAGTCCTCTGGAATCC-3' Inv: 5'-CCATTGCCAGTAGACAGAGC-3'	95°C, 30''	63°C, 1'	72°C, 2'	45	461
3	Dir: 5'-TCACTGCTCTCTGTACCTG-3' Inv: 5'-GAGCCCAAGAAGGCAGGCT-3'	95°C, 30"	65°C, 1'	72°C, 2'	45	221
4	Dir: 5'-CGGCAGTCTTCGTGGTCTAC-3' Inv: 5'-GCATCAAGGTCGGTCACGAC-3'	94°C, 30''	63°C, 1'	72°C, 2'	45	247
5	Dir: 5'-AACACGCTGGTTCATCTACGTGGT-3' Inv: 5'-AGACACTGGTGAACCTGGTTGAC-3'	94°C, 1'	60°C, 1'	72°C, 1'15"	40	211
<u>GAPDH</u>	Dir: 5'-ATGACCCCTTCATTGACCTC-3' Inv: 5'-AAGTGGTCGTTGAGGCAAT-3'	95°C, 30"	60°C, 1'	72°C, 2'	40	820

TABLA 2

Especificidad del subtipo del receptor de la somatostatina humana (CI_{50} , nM)

	Subtipo de receptor				
Compuesto	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

Se determinó la afinidad por subtipo mediante ensayos de unión del receptor de la membrana a radioligando en células de ovario de hámster chino expresando el ADNc de los genes SSR2 o SSR5.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula:

5 Cpa-ciclo(D-Cys-4-Pal-D-Trp-Lys-Thr-Cys)-NaI-NH₂ o una de sus sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptable.

10 2. Un compuesto de la fórmula Cpa-ciclo(D-Cys-4-Pal-D-Trp-Lys-Thr-Cys)-NaI-NH₂ o una de sus sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptable para uso como antagonista del receptor de la somatostatina.

3. El uso de un compuesto de la fórmula Cpa-ciclo(D-Cys-4-Pal-D-Trp-Lys-Thr-Cys)-NaI-NH₂ o una de sus sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptable como antagonista del receptor de la somatostatina.

15 4. El uso según la reivindicación 3, en el que dicho antagonista del receptor de la somatostatina es un antagonista selectivo para SSTR2.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1

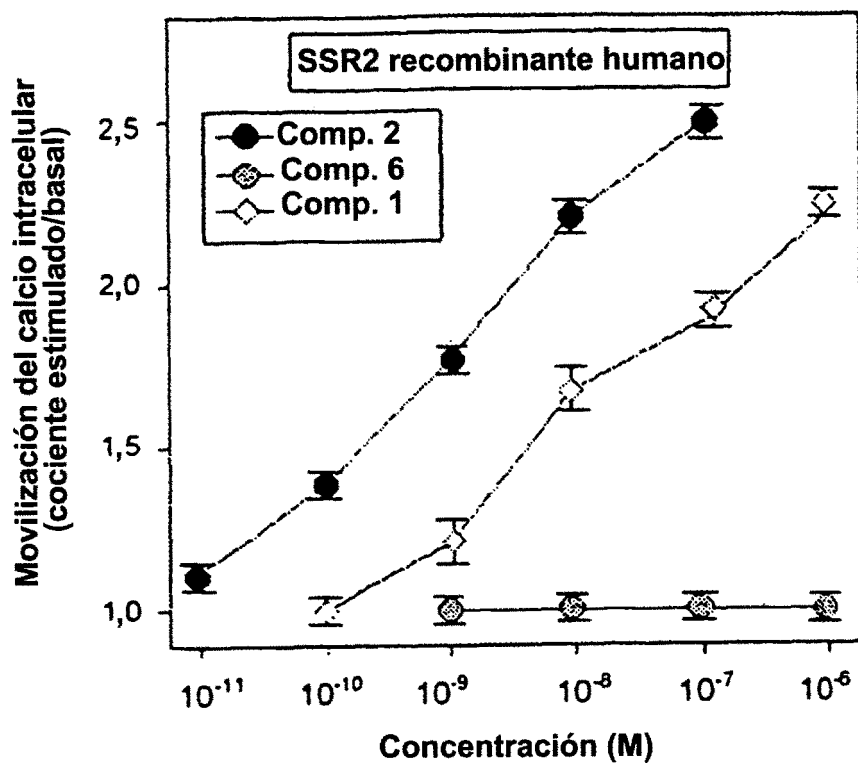
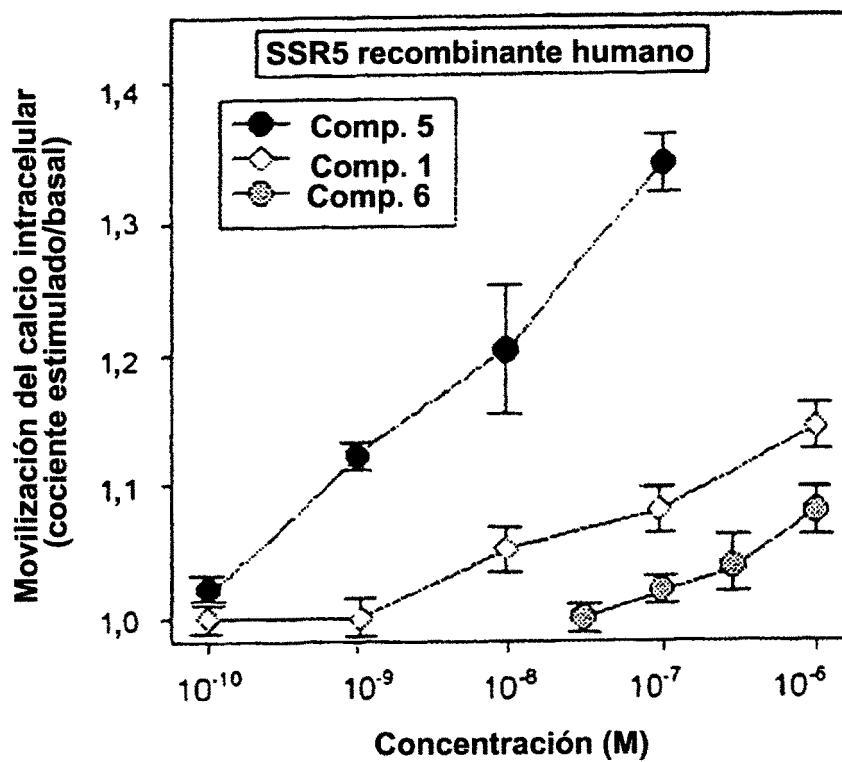


FIGURA 2



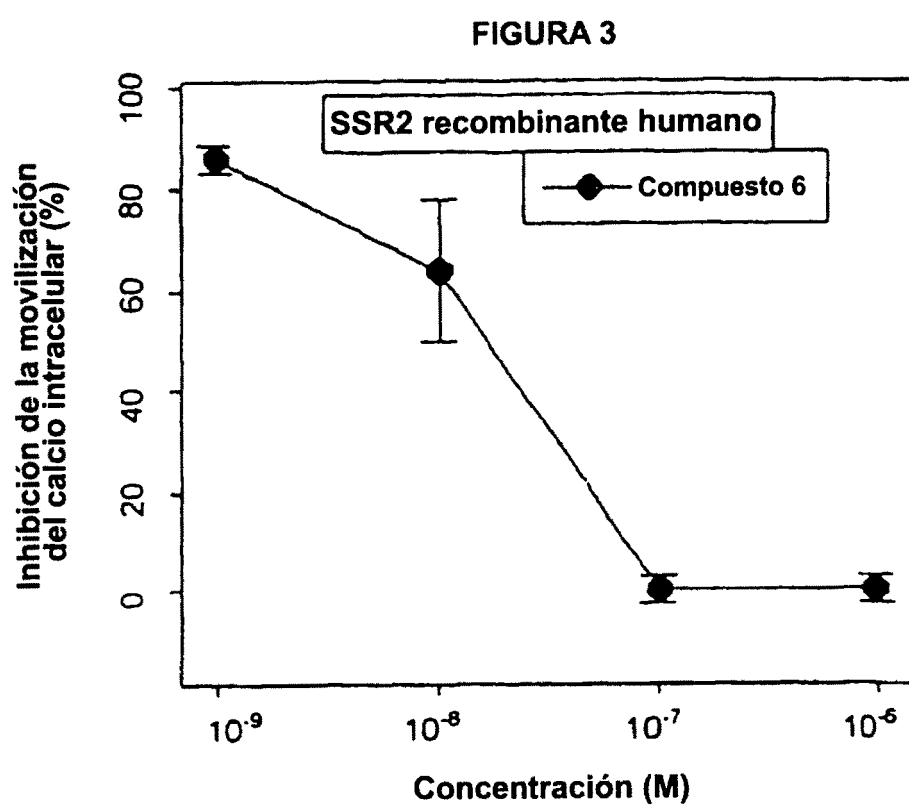


FIGURA 4
SSR

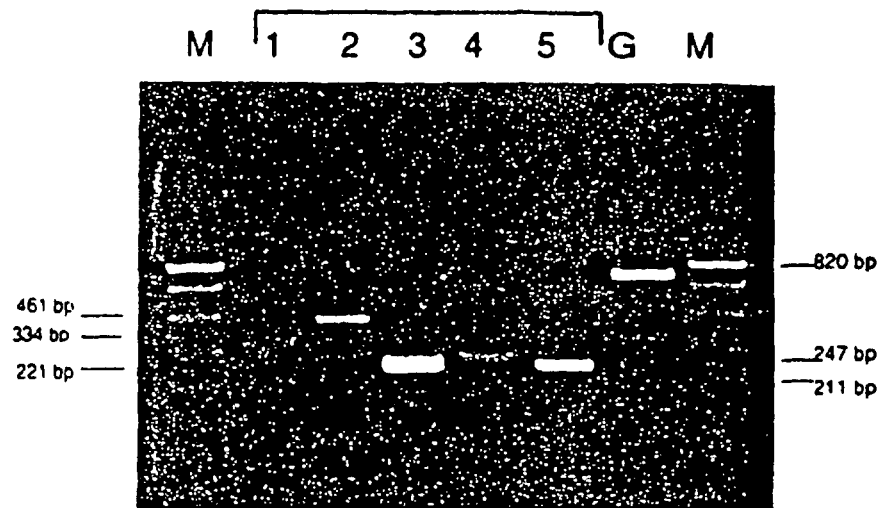


FIGURA 5

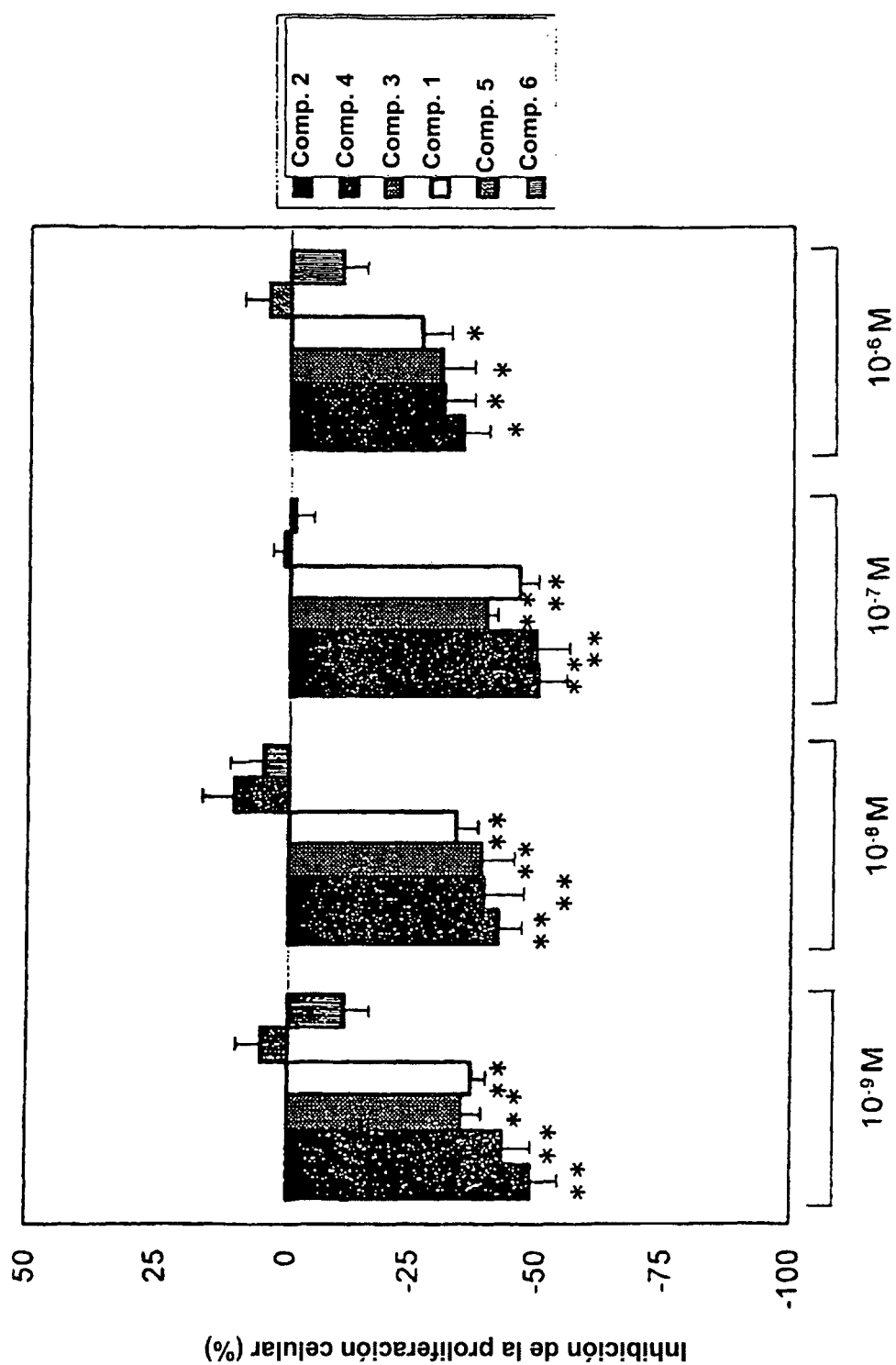


FIGURA 6

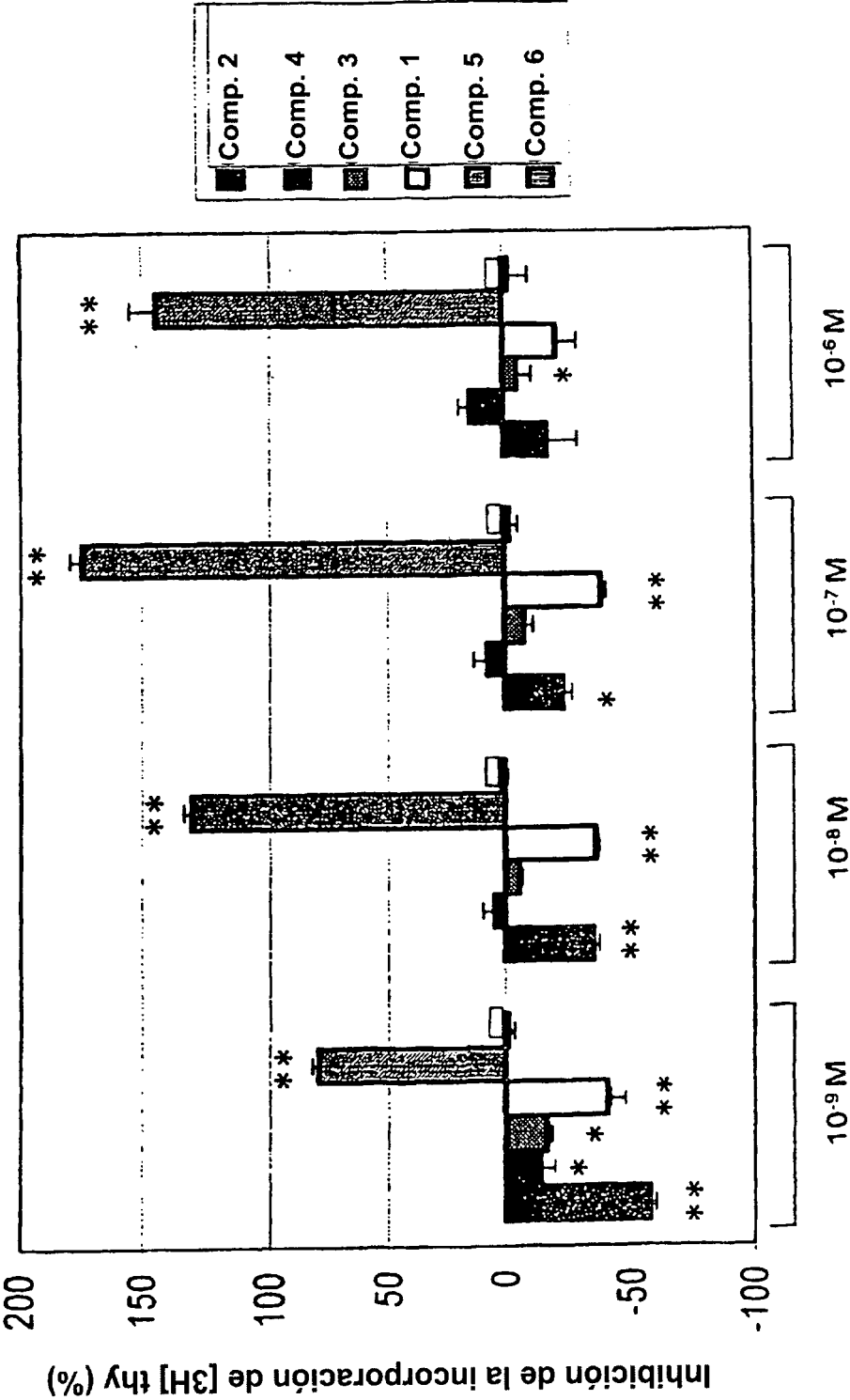
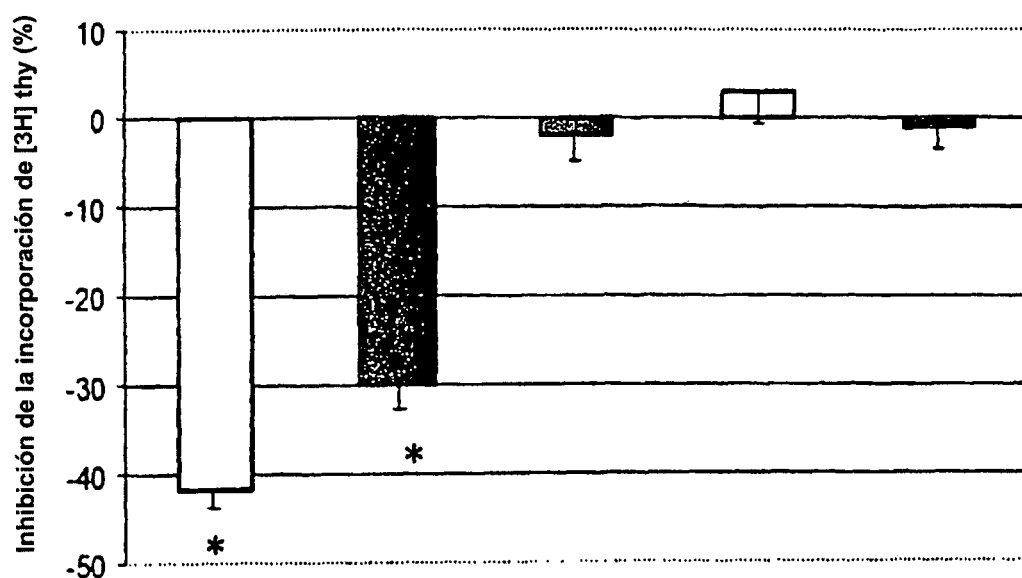


FIGURA 7



Comp. N°	Concentración (M)					
1	10^{-7}	0	0	10^{-7}	0	
2	0	10^{-7}	0	0	10^{-7}	
6	0	0	10^{-7}	10^{-7}	10^{-7}	

