



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 305 104**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/655** (2006.01)  
**G01N 33/74** (2006.01)  
**A61K 51/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01969555 .0**  
86 Fecha de presentación : **30.07.2001**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1307486**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **07.05.2003**

54 Título: **Análogos de somatostatina.**

30 Prioridad: **01.08.2000 GB 0018891**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.11.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.11.2008**

73 Titular/es: **Novartis AG.**  
**Lichtstrasse 35**  
**4002 Basel, CH**

72 Inventor/es: **Albert, Rainer;**  
**Bauer, Wilfried;**  
**Bodmer, David;**  
**Bruns, Christian;**  
**Felner, Ivo;**  
**Hellstern, Heribert;**  
**Lewis, Ian;**  
**Meisenbach, Mark;**  
**Weckbecker, Gisbert y**  
**Wietfeld, Bernhard**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 305 104 T3

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

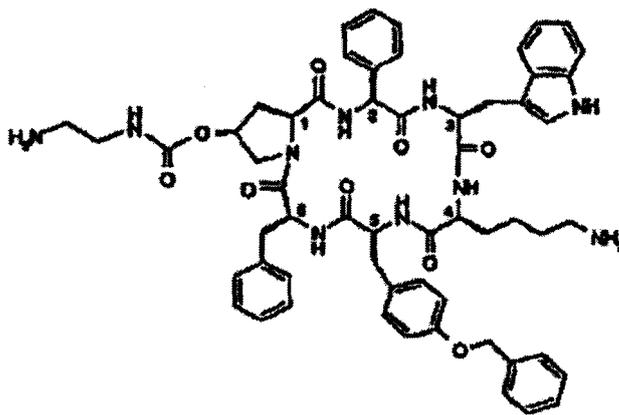
## DESCRIPCIÓN

Análogos de somatostatina.

5 La presente invención se relaciona con peptidomiméticos de somatostatina, un proceso para su producción y preparaciones farmacéuticas que los contienen.

Se han descrito análogos de somatostatina caracterizados por una estructura de ciclohexapéptido, por ejemplo, en la WO-A9701579 y J. Am. Chem. Soc., Vol. 114, 1992 9390-9401.

10 Más particularmente la presente invención provee el compuesto de fórmula



30 También denominado ciclo  $[[4-\{NH_2-C_2H_4-NH-CO-O-\}Pro]-Phg-DTrp-Lys-Tyr(4-Bzl)-Phe]$ , denominado aquí como Compuesto A, así como también los diastereoisómeros y mezclas de estos, en forma libre, en forma de sal o complejo o en forma protegida. Phg significa  $-HN-CH(C_6H_5)-CO-$  y Bzl significa bencilo.

35 El Compuesto A en forma protegida corresponde a la molécula anterior en donde por lo menos uno de los grupos amino es protegido y el cual mediante la desprotección conduce al Compuesto A, preferiblemente fisiológicamente removible. Los grupos protectores amino adecuados son por ejemplo como se describió en "Protective Groups in Organic Synthesis", T. W. Greene, J. Wiley & Sons NY (1981), 219-287, cuyos contenidos se incorporan aquí como referencia. Ejemplo de tal grupo protector amino es acetilo.

40 Cuando el Compuesto A existe en forma de complejo, este puede ser convenientemente un Compuesto A que lleva un grupo quelante sobre el grupo amino de cadena lateral de Pro y complejado con un elemento detectable o radioterapéutico el Compuesto A que golpea un grupo de engaño que se denomina aquí como el Compuesto A conjugado.

45 Ejemplos de grupos quelantes incluyen por ejemplo aquellos derivados de ácidos o anhídridos poli-aminopolicarboxílicos, por ejemplo aquellos derivados de ligandos no cíclicos por ejemplo ácido dietileno triamino pentaacético (DTPA), ácido etilenglicol-0,0'-bis(2-aminoetil)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), ácido N,N'-bis(hidroxibencil)etilenodiamino-N,N'-diacético (HBED) y ácido trietilenotetramina hexaacético (TTHA), aquellos derivados del DTPA sustituido, por ejemplo p-isotiocianato-bencil-DTPA, aquellos derivados de los ligandos macrocíclicos, por ejemplo, ácido 1,4,7,10-tetra-azaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA) y ácido 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (TETA), o ácido 1,4,7,10-tetraazaciclotridecano-N,N',N'',N'''-tetra-acético (TITRA).

55 El grupo quelante se puede unir directamente o a través de un espaciador al grupo amino de cadena lateral de Pro. Los espaciadores adecuados incluyen aquellos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describió en la GB-A-2,225,579, por ejemplo el residuo divalente de un ácido amino-carboxílico, por ejemplo  $\beta$ -Ala o un residuo divalente derivado de ácido 6-amino-caproico.

60 Los grupos quelantes preferidos son aquellos derivados de DTPA, DOTA, o TETA. Los grupos quelantes derivados de DTPA o DOTA son más preferidos.

65 Por elemento detectable se significa cualquier elemento, preferiblemente un ion de metal que exhibe una propiedad detectable en técnicas de diagnóstico *in vivo*, por ejemplo, un ion de metal que emite una radiación detectable a un ion de metal que es capaz de influenciar las propiedades de relajación NMR. Por elemento radioterapéutico significa cualquier elemento que emite una radiación que tiene un efecto benéfico sobre las condiciones a ser tratadas.

Los elementos adecuados incluyen por ejemplo elementos pesados o iones de tierra usadas, por ejemplo, como se utiliza en la exploración CAT (tomografía axial computarizada), iones paramagnéticos, por ejemplo,  $Gd^{3+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Mn^{2+}$

## ES 2 305 104 T3

y  $\text{Cr}^{2+}$ , iones de metal fluorescente, por ejemplo,  $\text{Eu}^{3+}$ , y radionúclidos, por ejemplo, un radiolantano, particularmente un radionúclido emisor de  $\gamma$ , un radionúclido emisor de  $\beta$ , un radionúclido emisor de  $\alpha$ , un radionúclido que emite Auger-e o un radionúclido que emite un positrón por ejemplo  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{18}\text{F}$  ó  $^{86}\text{Y}$ .

5 Radionúclidos adecuados que emiten  $\gamma$  incluyen aquellos que son útiles en técnicas de diagnóstico. Los radionúclidos que emiten  $\gamma$  tienen ventajosamente una vida media desde 1 hora a 40 días, preferiblemente de 5 horas a 4 días, más preferiblemente de 12 horas a 3 días. Ejemplos son radioisótopos de Galio, Indio, Tecnecio, Iterbio, Renio, Terbio, Lutecio, Talio y Samario por ejemplo  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ,  $^{169}\text{Yb}$ ,  $^{186}\text{Re}$  ó  $^{177}\text{Lu}$ .

10 Los radionúclidos adecuados que emiten  $\beta$  incluyen aquellos que son útiles en aplicaciones radioterapéuticas, por ejemplo  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{169}\text{Er}$ ,  $^{121}\text{Sn}$ ,  $^{127}\text{Te}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{143}\text{Pr}$ ,  $^{198}\text{Au}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,  $^{165}\text{Dy}$ ,  $^{142}\text{Pr}$ , ó  $^{153}\text{Sm}$ .

Los radionúclidos adecuados que emiten  $\alpha$  son aquellos que son utilizados en tratamientos terapéuticos, por ejemplo,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Bi}$  ó  $^{201}\text{Tl}$ .

15 El Compuesto A puede existir por ejemplo en forma libre o de sal. Las sales incluyen sales de adición de ácido con por ejemplo ácidos inorgánicos, ácidos poliméricos o ácidos orgánicos, por ejemplo con ácido clorhídrico, ácido acético, ácido láctico, ácido aspártico, ácido benzoico, ácido succínico o ácido pamoico. Las sales de adición de ácido pueden existir como sales mono- o divalentes, por ejemplo que dependen de si 1 o 2 equivalentes ácidos se agregan  
20 al Compuesto A en forma de base libre. Las sales preferidas son el lactato, aspartato, benzoato, succinato y pamoato, que incluyen mono- y di-sales, más preferiblemente la di-sal aspartato y la monosal pamoato.

El Compuesto A conjugado puede adicionalmente existir en formas de sal obtenibles con los grupos de ácido  
25 carboxílico cuando están presentes en el grupo quelante, por ejemplo sales de metal alcalino tales como sodio o potasio, o sales de amonio sustituido o no sustituido.

La presente invención también incluye un proceso para la producción del Compuesto A. Se puede producir en analogía los métodos conocidos, por ejemplo:

30 a) ciclizar un péptido lineal en forma protegida, unida al polímero o no protegida de tal manera que el Compuesto A se obtenga y luego opcionalmente remover el o los grupos protectores,

b) producir un Compuesto A conjugado que se enlaza junto a un grupo quelante y el Compuesto A en forma protegida o no protegida y luego opcionalmente remover el grupo protector,

35 y recuperar el Compuesto A o un Compuesto A conjugado así obtenido, en forma libre, en forma de sal o opcionalmente complejo con un elemento detectable o radioterapéutico.

Es generalmente no crítico que el aminoácido sea seleccionable para estar en la posición C-terminal para iniciar  
40 la cadena de péptido en razón a que el péptido lineal se ciclizará, siempre y cuando solamente que la secuencia de aminoácidos en el péptido lineal corresponda a aquel en el Compuesto A. Sin embargo podría haber otros factores que pueden preferir un aminoácido de partida sobre otro. Cuando el Compuesto A se prepara mediante la síntesis de fase sólida, el primer aminoácido está preferiblemente unido a la resina, por ejemplo una resina con base en poliestireno comercialmente disponible, a través de un ligador adecuado, por ejemplo, un ligador que es clivable bajo condiciones  
45 medias para mantener la protección de la cadena lateral intacta, por ejemplo, SASRIN o un ligador basado en tritilo opcionalmente sustituido, por ejemplo ácido 4-(hidroxi-difenil-metil)-benzoico en donde uno de los grupos fenilo puede ser opcionalmente sustituido por ejemplo por Cl. La construcción de la cadena de péptido deseada se puede efectuar de manera convencional, por ejemplo, utilizando unidades de aminoácido en donde el grupo aminoterminal es Fmoc-prottegido, los grupos amino de cadena lateral donde están presentes están protegidos con un grupo protector amino diferente, por ejemplo, Boc o CBO. Preferiblemente el péptido lineal se cicliza de tal manera de producir un enlace entre Tyr(4-Bzl)-OH y Phe, por ejemplo Phe-{4-(NHR<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-NH-CO-O-)Pro}-Phg-DTrp (R<sub>2</sub>)-Lys( $\epsilon$ -NHR<sub>3</sub>)-Tyr(4-Bzl)-OH o un derivado funcional de esta, en donde cada uno de R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, y R<sub>3</sub> es un grupo protector amino. La etapa de ciclización a) puede ser convenientemente desarrollada de acuerdo con un método conocido, por ejemplo, vía una azida, un éster activo, un anhídrido mezclado a una carbodiimida. Posteriormente los grupos protectores se  
55 remueven, por ejemplo, mediante clivaje por ejemplo con trifluoroacético o mediante hidrogenación.

La ciclización del péptido también se puede desarrollar directamente sobre el soporte sólido, el primer aminoácido estando en forma protegida N $\alpha$ - y C-terminal y unida a través de una cadena lateral, por ejemplo, la función  $\epsilon$ -amino o Lys o mediante un anclaje de estructura. La secuencia lineal es luego sintetizada siguiendo los procedimientos de  
60 síntesis de fase sólida estándar (SPPS). Después del clivaje de la protección C-terminal el péptido de cicliza por ejemplo como se describió anteriormente. Posteriormente el péptido cíclico se somete a separación de la resina y se desprotege.

Si se desea, la cadena lateral presente en Pro se puede introducir sobre el aminoácido antes o después de la etapa de ciclización de péptido a). así, el Pro es un aminoácido de partida o un péptido lineal o cíclico de partida en donde en cada caso Pro es un anillo sustituido por OH, puede ser convertido para suministrar el Compuesto A o la unidad Pro deseada o el correspondiente péptido lineal, respectivamente, en donde Pro se sustituye por NHR<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-NH-CO-O-.

## ES 2 305 104 T3

La formación de complejo del Compuesto A conjugado se puede desarrollar o hacer reaccionar un Compuesto A conjugado con un elemento detectable o radioterapéutico correspondiente que produce el compuesto, por ejemplo una sal de metal, preferiblemente una sal soluble en agua. La reacción se puede llevar a cabo mediante analogía con métodos conocidos, por ejemplo, como se describió en Perrin, Organic Ligand, Chemical Data Series 22. NY Pergamon Press (1982); in Krejcarit and Tucker, Biophys. Biochem. Res. Com. 77: 581 (1977) y en Wagner and Welch, J. Nucl. Med. 20: 428 (1979).

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de la invención. Todas las temperaturas están en °C.

### 10 Abreviaturas

AcOh	= ácido acético
Boc	= Tert.-butoxi-carbonilo
15 Bzl	= bencilo
CBO	= carbobenzoxi
20 DIPCI	= N,N'-diisopropilcarbodiimida
DIPEA	= diisopropiletilamina
DMF	= dimetilformamida
25 DPPA	= difenilfosforilazida
Fmoc	= fluorenilmetoxicarbonilo
30 HOBT	= 1-hidroxibenzotriazol
Osu	= N-hidroxisuccinimida
TFA	= ácido trifluoroacético
35 THF	= tetrahidrofurano.

### Ejemplo 1

#### 40 *Ciclo[4-(NH<sub>2</sub>-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-NH-CO-O)-Pro]-Phg-DTrp-Lys-Tyr(4-Bzl)-Phe]*

##### a) *Síntesis de Fmoc-Pro(4-OCO-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-Boc)-OH*

El clorhidrato de L-hidroxiprolina metiléster reacciona con Fmoc-OSu en carbonato de sodio acuoso 1.0 N/THF a temperatura ambiente. Después de completar la reacción, el Fmoc-Pro(4-OH)-OMe se aísla mediante precipitación. El Fmoc-Pro(4-OH)-OMe se agrega luego gota a gota en una solución de trifosgeno (0.6 eq.) en THF para dar un clorocarbonato intermedio. Después de 1 h se agregan dimetilaminopiridina (1.0 eq.) y N-Boc-diaminoetano (6.0 eq.) y la reacción se agita a temperatura ambiente. Después de completar la reacción, el solvente se remueve *in vacuo* y el Fmoc-Pro(4-OCO-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-Boc)-OMe resultante se extrae del sistema de dos fases de acetato de etilo/ HCl 0.1 M para dar un producto crudo (MH<sup>+</sup> = 554) que se purifica mediante cristalización de acetato de etilo. El metiléster es entonces clivado al ácido libre mediante el tratamiento con NaOH 1 N en dioxano/agua y el producto Fmoc-Pro(4-OCO-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-Boc)-OH se purifica sobre sílica gel, [(M+Na)]<sup>+</sup> = 562).

##### b) *H-Phe-Pro(4-OCO-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-Boc)-Phg-DTrp(Boc)-Lys(Boc)-Tyr(Bzl)-OH*

La resina de Fmoc-Tyr(Bzl)-O-CH<sub>2</sub>-Ph(3-OCH<sub>3</sub>)-O-CH<sub>2</sub>-Poliestireno comercialmente disponible (resina SAS-RIN, 2.4 mM) se utiliza como material de partida y se lleva a través de un protocolo estándar que consiste de ciclos repetitivos de desprotección N $\alpha$  (Piperidina/DMF, 2:8), lavados repetidos con DMF y acoplamiento (DIPCI: 4.8 mM/HOBT: 6 mM, DMF). Los siguientes derivados de aminoácido son secuencialmente acoplados: Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-DTrp(Boc)-OH, Fmoc-Phg-OH, Fmoc-Pro(4-OCO-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-Boc)-OH, Fmoc-Phe-OH. Los acoplamientos (aminoácidos 2 eq.) continúan o se repiten hasta completarse, es decir, hasta que se completa la desaparición de los grupos amino residuales que es monitoreado mediante la prueba de ninhidrina "Kaiser" negativa. Antes del clivaje del péptido lineal protegido completamente ensamblado proveniente de su soporte de resina la protección N $\alpha$ -Fmoc proveniente del último residuo se remueve.

65

## ES 2 305 104 T3

### c) *H-Phe-Pro(4-OCO-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-Boc)-Phg-DTrp(Boc)-Lys(Boc)-Tyr(Bzl)-OH*

Después de lavar con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, el péptido-resina se transfiere a una columna o a un filtro de succión agitado y el fragmento de péptido se cliva y se diluye con un tratamiento corto con TFA 2% en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> en 1 h. El eluido se neutraliza inmediatamente con una solución de NaHCO<sub>3</sub> saturado. La solución orgánica se separa y se evapora y el precursor protegido de cadena lateral (MH<sup>+</sup> = 1366) se cicliza sin purificación adicional.

### d) *Ciclo[-Pro(4-OCO-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>)-Phg-DTrp-Lys-Tyr(Bzl)-Phe-], trifluoroacetato*

El fragmento lineal anterior se disuelve en DMF (4 mM), se enfría a menos 5°C y se trata con DIPEA 2 eq. luego con 1.5 eq. de DPPA y se agita hasta completarse (ca. 20 h) a 0-4°C. el disolvente fue casi completamente removido *in vacuo*; el concentrado se diluye con acetato de etilo, se lavó con NaHCO<sub>3</sub>, agua, se secó y se evaporó *in vacuo*.

Para la desprotección el residuo se disolvió a 0°C en TFA/H<sub>2</sub>O 95:5 (ca. 50 mM) y se agitó en el frío durante 30 min. El producto luego se precipitó con éter que contiene ca. 10 eq. HCl, filtrado, se lavó con éter y se secó. Con el fin de descomponer completamente el resto del ácido Indol-N carbámico el producto se disuelve en 5% de AcOH y se liofiliza después de 15 h a ca. 5°C. El RP-HPLC preparativo se lleva a cabo sobre una columna STAGROMA C-18 10 µm (5-25 cm) utilizando un gradiente de 0.5% TFA a 0.5% TFA en 70% de acetonitrilo. Las fracciones que contiene el compuesto del título puro se combinan diluidas con agua y se liofilizan. El liofilizado se disuelve en agua seguido por la precipitación con 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en agua. La base libre sólida se filtra, se lava con agua y se seca en vacío a temperatura ambiente. El polvo blanco resultante se utiliza directamente para las diferentes sales.

### Ejemplo 2

*Ciclo[{4-(NH<sub>2</sub>-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-NH-CO-O-)Pro}-Phg-DTrp-Lys-Tyr(4-Bzl)-Phe] en forma de sal*

#### a. *Acetato*

La conversión a la forma de sal de acetato se lleva a cabo utilizando una resina de intercambio de ion (por ejemplo AG 3-X4). MS (ESI): m/z 524.5 [M+2H]<sup>2+</sup> [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -42°, c=0.26 en AcOH 95%.

#### b. *Aspartato*

La conversión del mono o di-aspartato se obtiene al hacer reaccionar 1 equivalente del compuesto del ejemplo 1 con 1 o 2 equivalentes de ácido aspártico en una mezcla de acetonitrilo/agua 1:3. La mezcla resultante se congela y se liofiliza. El di-aspartato también se puede obtener al disolver el compuesto del ejemplo 1 en agua/acetonitrilo 4:1, filtrando, cargando sobre una resina de intercambio de ion, por ejemplo una columna BioRad AG4X4, y eluyendo con agua/acetonitrilo 4:1. El eluido se concentra, se congela y se liofiliza. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -47.5°, c= 2.5 mg/ml en metanol.

#### c. *Benzoato*

La conversión del benzoato se puede obtener al disolver el compuesto del ejemplo 1 con 2 equivalentes de ácido benzoico en una mezcla de acetonitrilo/agua 1:2. La mezcla resultante se congela y se liofiliza.

#### d. *Pamoato*

1 equivalente del compuesto del ejemplo 1 se disuelve junto con 1 equivalente de ácido embónico en una mezcla de acetonitrilo/THF/agua 2:2:1. La mezcla resultante se congela y se liofiliza.

### Ejemplo 3

*Ciclo[{4-(DOTA-NH-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-NH-CO-O-)Pro}-Phg-DTrp-Lys-Tyr(4-Bzl)-Phe*

a) ciclo[-Pro(4-OCO-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>)-Phg-DTrp-Lys(Cbo)-Tyr(Bzl)-Phe-], trifluoroacetato. El compuesto se sintetiza de la misma manera que el ciclo[-Pro(4-OCO-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>)-Phg-DTrp-Lys(Cbo)-Tyr(Bzl)-Phe-], trifluoroacetato al utilizar Fmoc-Lys(Cob)-OH en lugar de Fmoc-Lys(Boc)-OH.

b) 400 mg de DOTA comercialmente disponible x 2H<sub>2</sub>O (SYMAFEX - Francia) se disuelve en 20 ml de agua. Después de la adición de 20 ml de DMF, 170 mg ciclo[-Pro(4-OCO-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>)-Phg-DTrp-Lys(CBO)-Tyr(Bzl)-Phe-], junto con 190 mg DCCI y 60 mg de N-hidroxisuccinimida se agregan. La suspensión resultante se mantiene a temperatura ambiente durante 72 horas. Después de la filtración, el disolvente se remueve bajo presión reducida y el crudo restante se purifica sobre sílica gel (DCM/MeOH/HOAc<sub>50%</sub> 8/2/0.25 --> 7/3/1 como fase móvil).

c) Para la desprotección del DOTA anterior - el conjugado se trata con 5 ml de ácido trifluoroacético/tioanisol (9/1) durante dos horas a temperatura ambiente. Después de que la solución se vierte en una mezcla de 100 ml de dietiléter + 5 ml de HCl 3N/dietiléter y el precipitado resultante se aísla mediante filtración. La purificación se desarrolla sobre sílica gel utilizando DCM/MeOH/HOAc<sub>50%</sub> 7/4/2 --> 7/5/4 como fase móvil. El producto final analíticamente puro se

## ES 2 305 104 T3

obtiene después de la etapa de desalinización utilizando 0.1% TFA a 0.1% TFA en 90% de CH<sub>3</sub>CN gradiente sobre una columna de RP<sub>18</sub>-HPLC (Esferisorb 250 x 4.6 mm).

MH<sup>+</sup>: 1434.7

El Compuesto A en la forma libre o en la forma de las sales farmacéuticamente aceptables y los complejos exhiben propiedades farmacológicas valiosas como se indicó en las pruebas *in vitro* e *in vivo* y es indicado por lo tanto para terapia.

Más particularmente, el Compuesto A exhibe un perfil de unión interesante para los receptores de somatostatina humanos (hsst), particularmente con respecto a los subtipos hsst1, hsst2, hsst3 y hsst5. Los subtipos de receptor de somatostatina 5, sst1, sst2, sst3, sst4 y sst5 se han clonado y caracterizado. El hsst1, hsst2 y hsst3 y sus secuencias se han descrito por Y. Yamada *et al.* en Proc. Nat. Acad. Sci., 89, 251-255 (1992). El hsst4 y su secuencia se ha descrito en L. Röhrer *et al.* en Proc. Acad. Sci., 90, 4196-4200 (1993). El hsst5 y su secuencia se ha descrito en R. Panetta *et al.* en Mol. Pharmacol. 45, 417-427, 1993.

Los ensayos de unión se pueden llevar a cabo como se describió anteriormente utilizando membranas provenientes de líneas celulares que expresan selectivamente y establemente hsst1, hsst2, hsst3, hsst4 o hsst5, por ejemplo células CHO o COS.

Las membranas se preparan de acuerdo con métodos conocidos, por ejemplo, como se describió en C. Bruns *et al.* en Biochem. J., 1990, 65, página 39-44. Las membranas se preparan de las líneas celulares selectivas hsst, por ejemplo células CHO o COS expresan establemente el hsst1 o el hsst2 o el hsst3 o el hsst4 o el hsst5 se incuban y se triplican en un volumen total de 300  $\mu$ l a 22°C durante 30 min con concentraciones crecientes de [<sup>125</sup>I-Tyr<sup>11</sup>]-SRIF-14 en 10 mmol/l amortiguador Hepes (pH 7.6) que contiene 0.5% de BSA. La incubación se termina mediante filtración rápida y los filtros se cuentan en un contador. La unión específica es la unión total menos la unión no específica en la presencia de 1  $\mu$ mol/l somatostatina-14. Los experimentos se llevan a cabo en triplicado. La constante afinidad (K<sub>D</sub>) y el número de sitios de unión se calculan utilizando las estadísticas apropiadas y programas gráficos.

El Compuesto A tiene en los ensayos de unión anterior hacia hsst1, hsst2, hsst3 y/o hsst5 un IC<sub>50</sub> en el rango nMolar, preferiblemente un IC<sub>50</sub> de 0.1 a 10 nM (IC<sub>50</sub> = concentración de la inhibición máxima media en un ensayo de unión de competición utilizando [<sup>125</sup>I-Tyr<sup>11</sup>]-SRIF-14 como un radio ligando específico de hsst 1-5).

IC <sub>50</sub>					
	hsst1	hsst2	hsst3	Hsst4	hsst5
Compuesto A	9.3 nM±0.1	1.0 nM±0.1	1.5nM±0.3	>100 nM	0.16nM±0.1

El Compuesto A también se une a los receptores secretagogos de la hormona de crecimiento. Tales receptores se describen por G. Muccioli *et al.*, J. Endocrinol. 1998,157, 99-106, por H. Ong *et al.*, en Endocrinología 1998, 139, 432-435 y por R.G. Smith *et al.*, Horm. Res., 1999, 3), 1-8. el ensayo de unión de estos receptores se puede llevar a cabo como se describió en el J. Endocrinol. Invest. 24: RC1-RC3, 2001. En este ensayo, el Compuesto A desplaza la <sup>125</sup>I-Tyr-Ala-hexarelina. El Compuesto A es de acuerdo con esto útil para modular la actividad de los receptores secretagogos de la hormona del crecimiento, por ejemplo, indicar un posible papel en la ganancia del peso del cuerpo o la regulación metabólica.

Además, el Compuesto A muestra una actividad que inhibe la liberación de GH como se indicó mediante la inhibición de la liberación de GH *in vitro* de células de pituitaria cultivadas. Por ejemplo, las glándulas pituitarias anteriores provenientes de ratas macho adultas se cortan en pequeñas piezas y se dispersan utilizando 0.1% de tripsina en 20 mM de un amortiguador HEPES. Las células dispersadas son cultivadas durante cuatro días en MEM (Gibco) suplementadas con suero bovino fetal 5%, suero de caballo 5%, 1 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 2.5 nM de dexametasona, 2.5 mg/ml de insulina y 20 U/ml de Pen/Strep. En el día del experimento las células pegadas son lavadas dos veces con un medio Krebs-Ringer amortiguadas con 20 mM de HEPES y suplementadas con 5 mM de glucosa y 0.2% de BSA. Posteriormente las células son incubadas durante tres horas con el Compuesto A en la presencia de 3x10<sup>-10</sup> M de factor de liberación de hormona de crecimiento. La cantidad de la hormona de crecimiento liberada en el medio se mide mediante RIA. El Compuesto A tiene un IC<sub>50</sub> de 0.4 nM en este ensayo.

El Compuesto A inhibe la liberación de la hormona de crecimiento (GH) en ratas. El Compuesto A se administra s.c. a ratas anestesiadas. La sangre se recolecta después de la decapitación 1 h después de la administración del compuesto. La duración de la acción se estima sobre la base de la inhibición de la secreción GH basal 6 h después del tratamiento con la droga. Los niveles de hormona se miden mediante RIA 1 h y 6 h después del tratamiento. El valor ID<sub>50</sub> para la inhibición de la secreción de la hormona se determina gráficamente (log-probit) para cada experimento y los valores resultantes son logarítmicamente promediados. En modelo *in vivo* el Compuesto A inhibe significativa-

## ES 2 305 104 T3

mente la liberación de hormona de crecimiento con una larga duración de acción (basal Media  $ID_{50} = 5.5 \mu\text{g}/\text{kg}$  s.c. 6 h). En un ensayo similar para medir el efecto sobre la insulina, el Compuesto A inhibe la secreción de insulina.

5 La inhibición potente y eficaz del GH también se confirmó en estudios con monos. Mas aún, los estudios metabólicos en monos diabéticos demostraron un efecto de sensibilización antidiabético/insulina potente del Compuesto A.

10 Adicionalmente, el Compuesto A inhibe los niveles de plasma IGF-1 *in vivo* como se indica en las pruebas estándar utilizando ratas macho. En resumen, el Compuesto A se administra mediante una bomba osmótica implantada s.c. a ratas macho de una cepa Lewis. Las muestras de sangre son recolectadas del plexo retrobulbar utilizando un poco de anestesia con por ejemplo isoflurano, en este ensayo, el Compuesto A disminuye significativamente los niveles de plasma IGF-1 con un efecto de larga acción: por ejemplo mas del 60% de inhibición se observa después de 14 días de tratamiento con  $10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$  del Compuesto A. Mas particularmente ningún escape se podría observar después del tratamiento continuo en ratas receptoras de aloinjertos de aorta o riñón continuamente infusionadas con el Compuesto A a  $10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$  hasta 126 días lo que induce una disminución significativa y persistente de los niveles de plasma de IGF-1.

20 El Compuesto A es de acuerdo con esto útil para la prevención o tratamiento de trastornos con una etiología que comprende o se asocia con el exceso de secreción de GH y/o el exceso de IGF-1 por ejemplo en el tratamiento de acromegalia así como también en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 1 o tipo 2, especialmente complicaciones de esta, por ejemplo, angiopatía, retinopatía proliferativa diabética, edema macular diabético, nefropatía, neuropatía y el fenómeno de inicio, y otros trastornos metabólicos relacionados con la insulina o la liberación de glucagón, por ejemplo, obesidad, por ejemplo obesidad mórbida o obesidad hipotalámica o hiperinsulinémica. El Compuesto A también es útil en el tratamiento de fístula enterocutánea o pancreático cutánea, el síndrome de intestino irritable, enfermedades 25 inflamatorias, por ejemplo enfermedad de Grave, la enfermedad inflamatoria del intestino, soriasis o artritis reumatoide, diarrea inducida por quimioterapia, pancreatitis aguda o crónica y tumores que secreta la hormona gastrointestinal (por ejemplo tumores GEP, por ejemplo vipomas, glucagonomas, insulinosomas, carcinoides y similares), malignidades de linfocitos, por ejemplo linfomas o leucemias, carcinoma hepatocelular así como también sangrado gastrointestinal por ejemplo sangrado esofágico por várices.

30 El Compuesto A también es útil en el tratamiento de tumores que son positivos al receptor de somatostatina, por ejemplo tumores que llevan *hsst1*, *hsst2*, *hsst3* y/o *hsst5*, como se indicó en las pruebas de proliferación con varias líneas de célula cancerosa que llevan tales receptores de somatostatina.

35 La línea celular del tumor pancreático de rata AR42J se deriva de un tumor pancreático exocrino inducido por azaserina (Jessop and Hay, 1980). Los cultivos libres de célula de micoplasma son propagados en DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal (FCS) a 5% de  $\text{CO}_2$ . Las células crecen en ausencia de antibióticos o agentes antifúngicos. Las células AR42J confluentes son tripsinizadas, diluidas en DMEM + 2.5% de FCS y sembradas en placas de 96 pozos no recubiertas. Después de un periodo de incubación de 48 h (día 0), el numero de células en una placa de control separada se determina tanto mediante conteo de células en un contador Coulter como mediante ensayo 40 colorimétrico SRB. Las células son entonces expuestas al Compuesto A durante 2 a 5 días a varias concentraciones y luego contadas. Bajo estas condiciones el Compuesto A inhibe la proliferación de células tumorales a concentraciones que varían desde  $10^{-12}$  a  $10^{-6}$  M.

### 45 *Estudios de crecimiento de tumor in vivo*

Los ratones desnudos hembra que pesan 19-22 g se mantienen en grupos de 5 animales y tienen acceso libre a agua para beber y una dieta para roedor libre de patógenos. Los tumores subcutáneos se inician de células AR42J cultivadas. El tratamiento comienza 2-4 días luego de la inoculación de las células tumorales, el Compuesto A se administra como 50 una infusión continua, por ejemplo a una tasa de 10 a  $50 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$ . El tamaño de los tumores se determina con un calibrador. Para los cálculos estadísticos se aplica la prueba t de Student. En este ensayo el Compuesto A inhibe el crecimiento tumoral en el día 11 en un 51% vs el control salino.

55 El Compuesto A es así útil para el tratamiento de enfermedades proliferativas de células malignas, por ejemplo, tumores cancerígenos, particularmente tumores que llevan tipos de receptores de somatostatina con los cuales se sostiene una afinidad de unión, por ejemplo, como se describió anteriormente para el Compuesto A conjugado complejoado.

El Compuesto A tiene un efecto inhibitor sobre la angiogénesis, como se indicó en la pruebas estándar, por ejemplo en ratones desnudos. En resumen, las células tumorales ( $0.1$  a  $10 \times 10^6$  en  $0.1$  ml) (células SiHa y células MD AMB-231 preparadas como se describió en angiogénesis, Ed. por R. Steiner, P.B. Weisz y R. Langer, 1992 Suiza) se inoculan intracutáneamente. Usualmente dos sitios/ratón medioventrales se inyectan los cuales están localizados distantes de los vasos de la piel ventrales principales de tal forma que el conteo del vaso de antecedente es bajo. Los grupos de control reciben  $0.1$  ml de 0.02% de azul tripan en PBS. 10 días después de la inyección, los ratones anestesiados son sacrificados mediante inhalación de  $\text{CO}_2$ . La piel es montada sobre un anillo plástico (40 mm de diámetro) para 65 evaluación mediante un microscopio invertido (Zeiss IM) con una ampliación de 12.5- y 25 veces. Como una medida de la angiogénesis, los vasos son fotografiados y aquellos que están directamente conectados son contados con el tumor. En animales de control aquellos vasos que están conectados son contados a un área definida alrededor del sitio de la inyección. Esta área corresponde al área media de los tumores dérmicos. El ultimo se determina mediante el uso

## ES 2 305 104 T3

de un calibrador de acuerdo con la ecuación  $3.14 \times r^2$ . El Compuesto A se administra s.c. el día de la inoculación del tumor o 3 días después. Los animales de control son tratados con vehículo. En este ensayo, el Compuesto A inhibe la formación de vasos sanguíneos cuando se administra a una dosis de por ejemplo 0.01 a 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  s.c.

- 5 El Compuesto A es así útil para la prevención o tratamiento de angiogénesis, de trastornos inflamatorios como se indicó anteriormente incluyendo enfermedades oculares inflamatorias, edema macular, por ejemplo edema macular cistoide, edema macular cistoide idiopático, degeneración macular exudativa relacionada con la edad, trastornos relacionados con la neovascularización corooidal y retinopatía proliferativa.
- 10 El Compuesto A también tiene un efecto inhibitorio sobre la proliferación y migración de células del músculo liso como se indica en las siguientes pruebas.

### *Rechazo Crónico de Aloiinjerto*

- 15 El riñón de una rata DA macho (RT1<sup>a</sup>) es ortotópicamente transplantado en un receptor Lewis macho (RT1<sup>l</sup>). En total se han transplantado 24 animales. Todos los animales son tratados con ciclosporina A a 7.5 mg/kg/día por os durante 14 días partiendo el día del trasplante, para evitar el rechazo celular agudo. La nefrectomía contralateral no se desarrolla. Cada grupo experimental tratado con una dosis distinta del Compuesto A o placebo comprende seis animales. Iniciando 14 días después del trasplante, los animales receptores son tratados hasta 112 días mediante infusión con el Compuesto A o reciben placebo. 14 días después del trasplante se mide la perfusión del órgano mediante MRI. Este se reporta en el día 53-64 después del trasplante y al final del experimento. Los animales son entonces sometidos a autopsia. La administración del Compuesto A a una dosis de 10  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$  en este modelo de aloinjerto de riñón de rata dan como resultado una perfusión de órgano mejorado así como también una reducción del rechazo crónico relacionado con remodelamiento vascular e infiltración de injerto (rechazo celular). Una caída marcada y persistente de los niveles de IGF-1 también se ha medido. Estos resultados se han confirmado en un segundo grupo de experimentos utilizando un modelo de alotransplante de corazón de ratón heterotópico demostrando los efectos benéficos sobre el remodelamiento vascular así como también la infiltración de injerto.

- El Compuesto A también se ha probado en el modelo de trasplante en el circuito de arteria carótida utilizando ratones de B10.A (2R) (H-2<sup>h</sup>) como donadores y ratones B10.BR (H-2<sup>k</sup>) como receptores. En resumen, la arteria carótida donadora es transplantada paratópicamente como un circuito en la arteria carótida del receptor mediante un anastomosis de extremo con lado. Una mini bomba se coloca s.c. inmediatamente después de el trasplante que suministra el Compuesto A a una tasa de 50  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ . Los injertos de la arteria carótida son cosechados 30 días después del trasplante para remodelamiento de análisis vascular por ejemplo mediante análisis morfométricos de elastina Verhoeff tenida con secciones de parafina utilizando un sistema ayudado por computadora. En este modelo el Compuesto A inhibe la formación neointima comparado con animales no tratados donde se forma neointima masiva.

### *Angioplastia*

- 40 Los estudios sobre angioplastia son hechos en el modelo de rata de daño de catéter de globo. La cateterización del globo se desarrolla en el día 0, esencialmente como se describió por Powell *et al.* (1989). Bajo la anestesia con Isoflurano, un catéter Fogarty 2F se introduce en la arteria carótida común izquierda para obtener una desendotelialización uniforme. El catéter es luego removido, la ligadura colocada alrededor de la carótida externa para evitar el sangrado y a los animales se les permite recuperarse. 2 grupos de 12 ratas RoRo (400 g, de aproximadamente 24 semanas de edad) son utilizadas para el estudio: un grupo de control y un grupo que recibe el Compuesto A y las ratas son completamente aleatorizadas. El Compuesto A se administra al final del estudio, 14 días después del daño de globo. Las ratas son entonces anestesiadas con Isoflurano y perfusionadas con 0.1 M de solución salina amortiguada con fosfato (PBS, pH 7.4) y luego durante 15 min. con 2.5% de glutaraldehído en amortiguador de fosfato (pH 7.4). Las arterias carótidas son luego extraídas, separadas del tejido circundante y sumergidas en un amortiguador de cacodilato 0.1 M (pH 7.4) que contiene 7% de sacarosa e incubada durante toda la noche a 4°C. Al siguiente día las carótidas son entonces sumergidas en Tecnovit 7100 de acuerdo con las recomendaciones de elaboración. El área de sección transversal de la neointima media y el lumen son evaluados morfométricamente por medio de un sistema de análisis de imagen (MCID, Toronto, Canada). En este ensayo, el Compuesto A inhibe el engrosamiento de la neointima significativamente.

- 55 El Compuesto A es así también útil para prevenir o combatir enfermedades de injerto de vaso, por ejemplo vasculopatías por alo- o xenotransplante, por ejemplo arterioesclerosis por injerto de vaso, por ejemplo en un trasplante de un órgano, por ejemplo injertos de corazón, pulmón, combinado de corazón-pulmón, hígado, riñón o pancreático, o para evitar o tratar estenosis de injerto de vena, restenosis y/o oclusión vascular luego de daño vascular, por ejemplo, el causado por los procedimientos de caterización o los procedimientos de extracción vascular tales como la angioplastia transluminal percutánea, el tratamiento con láser otros procedimientos invasivos que afecta la integridad de la íntima y el endotelio vascular.

- El Compuesto A tiene una vida media de plasma benéfica. Este tiene una vida media de eliminación entre 15 y 30 horas.

- 65 Para todas las indicaciones anteriores la dosis requerida variara por supuesto dependiendo de, por ejemplo, el huésped, el modo de administración y la severidad de la condición a ser tratada. En general, sin embargo, se obtienen resultados satisfactorios mediante la administración con el orden de 1  $\mu\text{g}$  a 0.7 mg/kg/día del Compuesto A. Una dosis

## ES 2 305 104 T3

diaria indicada para pacientes en el rango desde aproximadamente 2  $\mu\text{g}$  a aproximadamente 50 mg, preferiblemente desde aproximadamente 0.01 a aproximadamente 40 mg, por ejemplo aproximadamente 0.01 a aproximadamente 3 mg s.c. del compuesto administrado convenientemente en dosis divididas hasta 3 veces al día en una forma de dosis unitaria que contiene por ejemplo desde aproximadamente 0.05  $\mu\text{g}$  a aproximadamente 25 mg, por ejemplo desde aproximadamente 2  $\mu\text{g}$  a 20 mg, por ejemplo desde 2  $\mu\text{g}$  a 1.5 mg del Compuesto A.

El Compuesto A se puede administrar en forma libre o en forma de sal o de complejos farmacéuticamente aceptables. Tales sales y complejos se pueden preparar de manera convencional y exhiben el mismo orden de actividad que el compuesto libre. La presente invención también suministra una composición farmacéutica que comprende el Compuesto A en la forma de base libre o en la forma de sal o la forma de complejo farmacéuticamente aceptable, junto con uno o mas diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables. Tales composiciones se pueden formular de manera convencional. El Compuesto A se puede administrar en una forma de liberación sostenida, por ejemplo, en la forma de implantes, microcápsulas, microesferas o nanoesferas que comprenden por ejemplo un polímero o copolímero biodegradable, en la forma de una formulación liposomal, o en la forma de una auto gel, por ejemplo una composición sólida o semi-sólida capaz de formar un gel después de la interacción con los fluidos corporales del paciente.

El Compuesto A o la sal o complejo farmacéuticamente aceptable de este se puede administrar mediante cualquier ruta convencional, por ejemplo parenteralmente por ejemplo en la forma de soluciones o suspensiones inyectables (que incluyen por ejemplo la forma de liberación sostenida como se indicó anteriormente), oralmente utilizando un mejorador de absorción convencional, en forma nasal o de supositorio o tópicamente, por ejemplo, en la forma de un líquido oftálmico, gel, unguento o preparación de suspensión, por ejemplo una formulación de microesfera o nanoesfera liposomal, por ejemplo para inyecciones de instilación o subconjuntivales o intra o peri-oculares.

De acuerdo con lo anterior la presente invención suministra además:

1. Un Compuesto A o una sal o complejo farmacéuticamente aceptables de este para uso como un fármaco;
2. El Compuesto A o una sal o complejo farmacéuticamente aceptable de este para uso en la preparación de una composición farmacéutica para evitar o tratar enfermedades o trastornos como se indicó anteriormente.

El Compuesto A conjugado o una sal farmacéuticamente aceptable de este es útil como un agente de imagen, por ejemplo la visualización de los tejidos y las células positivas del receptor de somatostatina por ejemplo tumores positivos del receptor de somatostatina y metástasis, trastornos inflamatorios o autoinmunes que exhiben los receptores de somatostatina, tuberculosis o rechazo de órgano después del transplante, cuando se hace complejo con un elemento detectable, por ejemplo, un núcleo emisor  $\gamma$  o de positrones, un ion de metal fluorescente o un ion paramagnético, por ejemplo  $^{111}\text{In}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  o  $\text{Cr}^{2+}$ , o un radiofarmacéutico para el tratamiento *in vivo* de tumores y metástasis positivos del receptor de somatostatina, artritis reumatoide y condiciones de inflamación severa cuando se complejan con un núclido emisor  $\alpha$  o  $\beta$  o un núclido con Auger- $\alpha$  mcades, por ejemplo  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{161}\text{Tb}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{213}\text{Bi}$  o  $^{201}\text{Tl}$ , como se indicó mediante las pruebas estándar.

En particular, se observa que el Compuesto A conjugado se une a los receptores de somatostatina con valores pKi desde aproximadamente 8 a 10. El compuesto del ejemplo 3 complejo como por ejemplo  $^{111}\text{In}$ ,  $^{88}\text{Y}$ ,  $^{90}\text{Y}$  o  $^{177}\text{Lu}$  se une en el rango nM a los respectivos subtipos sst de acuerdo con el perfil de unión del Compuesto A.

La afinidad del Compuesto A conjugado y sus complejos para los receptores de somatostatina también se pueden mostrar mediante pruebas *in vivo*, de acuerdo a métodos de prueba estándar, por ejemplo como se describió en la GB-A-2,225,579. Por ejemplo el compuesto del ejemplo 3 complejo como por ejemplo  $^{111}\text{In}$ ,  $^{88}\text{Y}$ ,  $^{90}\text{Y}$  o  $^{177}\text{Lu}$ , da una acumulación tumoral significativa 4 horas después de la inyección en ratones o ratas que llevan receptores hss2 que expresan tumor pancreático exocrino.

Después de la administración de un Compuesto A conjugado en forma complejada, por ejemplo un  $^{111}\text{In}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{88}\text{Y}$  o  $^{161}\text{Tb}$  el Compuesto A complejo, a una dosis desde 1 a 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  marcado con 0.1 a 5 radionúclidos mCi, preferiblemente 0.1 a 2 mCi el sitio de tumor se vuelve detectable.

El Compuesto conjugado A cuando se radio marca con un radionúclido emisor  $\alpha$  o  $\beta$  o un núclido con cascadas Auger- $e^{-}$  exhiben un efecto antiproliferativo y/o citotóxico sobre células tumorales que llevan receptores de somatostatina, por ejemplo como se indica en pruebas con ratones desnudos.

Los ratones desnudos son inoculados con células de tumor pancreático de rata AR42J o células de cáncer de pulmón llamadas pequeñas humanas NCI-H69 como se describió anteriormente. Cuando los tumores han alcanzado un volumen de 1 a 2  $\text{cm}^3$  los animales son aleatorizados en grupos de control y tratamiento. El Compuesto A conjugado en formas complejadas que administra mediante inyecciones i.p. o i.v. Dosis hasta de 40 mCi/kg son dadas por ratón. El tamaño de los tumores se determina con un calibrador como se describió anteriormente. Para los cálculos estadísticos se aplica la prueba t de student. En esta prueba, el encogimiento tumoral transitorio hasta del 50% del inicial es observado después de 1 semana y el crecimiento tumoral se retrasa durante dos semanas luego de una aplicación única del compuesto del ejemplo

## ES 2 305 104 T3

3 complejo con  $^{90}\text{Y}$ . En contraste los grupos de control mostraron crecimiento tumoral continuo con un tiempo que duplica el volumen de aproximadamente siete días.

De acuerdo con esto, en una serie de modalidades específicas o alternativas, la presente invención también describe.

3. Uso de un Compuesto A conjugado complejo con un elemento detectable para la detección *in vivo* de células y tejidos positivos del receptor de somatostatina, por ejemplo tumores y metástasis positivos del receptor de somatostatina, en un sujeto y registrando la localización de los receptores blanco mediante dicho complejo;

El Compuesto A conjugado en forma complejada para uso como un agente de imagen puede ser administrado por ejemplo intravenosamente, por ejemplo en la forma de soluciones o suspensiones inyectables, preferiblemente en la forma de una inyección única. El radiomarcador puede ser preferiblemente desarrollado poco antes de la administración a un sujeto.

En animales como se indica el rango de dosis puede ser de 0.01 a 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  del Compuesto A conjugado complejo con 0.02 a 0.5 mCi de radionúclido emisor  $\gamma$ . En mamíferos grandes, por ejemplo humanos, como se indicó el rango de dosis puede ser de 1 a 100  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  del Compuesto A conjugado complejo por ejemplo con 1 a 100 mCi/ $\text{m}^2$  del elemento detectable, por ejemplo  $^{111}\text{In}$ ,  $^{86}\text{Y}$  o  $^{177}\text{Lu}$ .

4. Uso del Compuesto A conjugado complejo con un núclido emisor  $\beta$  o un núclido con cascadas Auger-e, para el tratamiento *in vivo* de los tumores y las metástasis positivas del receptor de somatostatina.
5. Uso de un Compuesto A conjugado o una sal farmacéuticamente aceptable de este en la elaboración de un agente de imagen o una composición radiofarmacéutica.

Las dosis empleadas en practicar el uso radioterapéutico de la presente invención variarían por supuesto dependiendo por ejemplo de la condición particular a ser tratada, por ejemplo la radiotoxicidad conocida a órganos normales que expresan receptores de somatostatina, el volumen del tumor y la terapia deseada. En general, la dosis se calcula sobre la base de los datos de distribución farmacocinética o de radio actividad obtenidos en órganos saludables y con base en la toma del blanco observada. Un complejo emisor  $\beta$  de un Compuesto A conjugado se puede administrar repetidamente por ejemplo durante un periodo de 1 a 3 meses.

En animales un rango de dosis indicado puede ser de 20 a 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  del Compuesto A conjugado complejo con 15 a 70 mCi de un núclido emisor  $\alpha$  o  $\beta$  o un núclido con cascadas Auger-e como por ejemplo  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$  o  $^{161}\text{Tb}$ . En grandes mamíferos, por ejemplo humanos, como se indica el rango de dosis puede ser de 1 a 100  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  del Compuesto A conjugado complejo, por ejemplo, con 1 a 100 mCi/ $\text{m}^2$  de un núclido emisor  $\alpha$  o  $\beta$  o un núclido con cascadas Auger-e, por ejemplo  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$  o  $^{161}\text{Tb}$ . El Compuesto A conjugado en forma complejada para uso como un agente radioterapéutico se pueda administrar mediante cualquier ruta convencional, por ejemplo, intravenosamente, por ejemplo en forma de soluciones inyectables. Este se puede administrar de manera ventajosa mediante infusión, por ejemplo, una infusión durante 15 a 60 min. Dependiendo del sitio del tumor, este se puede administrar tan cercano como sea posible al sitio del tumor, por ejemplo, por medio de un catéter. La presente invención también suministra una composición farmacéutica que comprende un Compuesto A conjugado en forma de base libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable o complejo con un agente detectable radioterapéutico, junto con uno o más diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

El Compuesto A o el Compuesto A conjugado en forma complejada puede ser adecuado para hacer imágenes o tratar tumores que expresan o acumulan el receptor de somatostatina tales como tumores de pituitaria, gastro entero-pancreáticos, carcinoides, del sistema nervioso central, de mama, prostáticos (que incluyen cáncer de próstata avanzado refractario a hormona), de ovario o de colon, cáncer de pulmón de célula pequeña, obstrucción intestinal maligna, paragangliomas, cáncer de riñón, cáncer de piel, neuroblastomas, feocromocitomas, carcinomas de tiroides medular, mielomas, linfomas, linfomas Hodgkin y no Hodgkin, tumores óseos y metástasis de estos, así como también trastornos auto inmunes o inflamatorios, por ejemplo, artritis reumatoide, enfermedad de Grave y otras enfermedades oculares inflamatorias.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se suministra una composición farmacéutica que comprende un Compuesto A conjugado o un complejo de este junto con uno o mas vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables para este. Tales composiciones se pueden elaborar de manera convencional y se pueden presentar por ejemplo para imágenes, en forma de un kit que comprende dos dosis separadas, siendo uno el radio núclido y el otro el Compuesto A conjugado, con instrucciones para mezclarlos. Para radioterapia, el Compuesto A conjugado en forma complejada puede preferiblemente estar en la forma de una formulación líquida caliente.

El compuesto A o el Compuesto A conjugado en forma complejada se puede administrar como el ingrediente activo único o en conjunto con, por ejemplo, un ayudante para los otros fármacos. Por ejemplo, el Compuesto A se puede utilizar en combinación con un agente inmuno supresor, por ejemplo, un inhibidor

de calcineurina, por ejemplo, ciclosporina A o FK 506; una lactona macrocíclica que tiene propiedades inmuno supresoras, por ejemplo, rapamicina o 40-O-(2-hidroxietyl)-rapamicina (RAD); una ascomicina que tiene propiedades inmuno supresoras, por ejemplo, ABT-281, ASM981, etc.; corticosteroides; ciclofosfamida; azatiopreno; metotrexato; leflunomida; mizoribina; ácido micofenólico o una sal de estos, por ejemplo, Mifortica<sup>R</sup>; mofetil micofenolato; 15-desoxiespergualina o un homólogo inmuno supresor, análogo o derivado de este; un agente hospedero acelerador de linfocito, por ejemplo, FTY720; anticuerpos monoclonales e inmuno supresores, por ejemplo, anticuerpos monoclonales de receptores de leucocito, por ejemplo, MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD25, CD28, CD40, CD45, CD58, CD80, CD86 o sus ligandos; otros compuestos inmuno moduladores, por ejemplo, una molécula de unión recombinante que tiene por lo menos una porción del dominio extracelular del CTLA4 o un mutante de esta, por ejemplo, una porción por lo menos extracelular de CTLA4 o un mutante de esta unido a una secuencia de proteína no CTLA4, por ejemplo CTLA41g (por ejemplo la designada ATCC 68629) o un mutante de esta, por ejemplo la LEA29Y; inhibidores de molécula de adhesión, por ejemplo antagonistas LFA-1, antagonistas ICAM-1 o -3, antagonistas VCAM-4 o antagonistas VLA-4. El Compuesto A también se puede utilizar en combinación con un agente anti inflamatorio, un agente modulador receptor secretagogo, por ejemplo, grelina o hexarelina, un antagonista receptor GH, por ejemplo pegvisomant, un mejorador de la secreción secretagogo o de insulina, por ejemplo una sulfuril urea, por ejemplo, tolbutamida, clorpropamida, tolazamida, acetohexamida, 4-cloro-N-[(1-pirolidinilamino)carbonil]-benzenosulfonamida (glicopiramida), glibenclamida (gliburida), glicazida, 1-butil-3-metanililurea, carbutamida, glibonurida, glipizida, gliquidona, glisoxepid, glibutiazol, glibuzol, glyhexamida, glimidina, glipinamida, fenbutamida o tolliclamida, una no sulfonil urea de corta acción, un derivado de un agente oral insulínico, por ejemplo un mejorador de insulina de acción corta, por ejemplo meglitinida, repaglinida, un derivado de ácido fenil acético, por ejemplo nateglinida, un inhibidor DPP IV, por ejemplo diclorhidrato de 1-{2-[(5-cianopiridin-2-il)amino]etilamino}acetil-(2S)-ciano-pirrolidina, LAF237, GLP-1 o un análogo agonista GLP-1, un sensibilizador de insulina, por ejemplo un agonista receptor activado proliferador de peroxisoma (PPAR $\gamma$ ), por ejemplo una glitazona, por ejemplo (S)-((3,4-dihidro-2-(fenilmetil)-2H-1-benzopirano-6-il)metil-tiazolidina-2,4-diona (englitazona), 5-{{[4-(3-(5-metil-2-fenil-4-oxazolil)-1-oxopropil)-fenil]-metil}-tiazolidina-2,4-diona (darglitazona), 5-{{[4-(1-metil-ciclohexil)metoxi]-fenil]metil}-tiazolidina-2,4-diona (ciglitazona), 5-{{[4-(2-(1-indolil)etoxi)fenil]metil}-tiazolidina-2,4-diona (DRF2189), 5-{{4-[2-(5-metil-2-fenil-4-oxazolil)-etoxi]benzil}-tiazolidina-2,4-diona (BM-13,1246), 5-(2-naftilsulfonil)-tiazolidina-2,4-diona (AY-31637), bis{4-[(2,4-dioxo-5-tiazolidinil)-metil]fenil}metano (YM268), 5-{{4-[2-(5-metil-2-fenil-4-oxazolil)-2-hidroxi-etoxi]benzil}-tiazolidina-2,4-diona (AD-5075), 5-{{4-(1-fenil-1-ciclopropano-carbonilamino)-benzil}-tiazolidina-2,4-diona (DN-108) 5-{{[4-(2-(2,3-dihidroindol-1-il)etoxi)fenil]metil}-tiazolidina-2,4-diona, 5-{{[3-(4-cloro-fenil)]-2-propinil]-5-fenilsulfonil}tiazolidina-2,4-diona, 5-{{[3-(4-clorofenil)]-2-propinil]-5-(4-fluorofenilsulfonil)tiazolidina-2,4-diona, 5-{{[4-(2-(metil-2-piridinil-amino)-etoxi)fenil]metil}-tiazolidina-2,4-diona (rosiglitazona), 5-{{[4-(2-(5-etil-2-piridil)etoxi)fenil]-metil}tiazolidina-2,4-diona (pioglitazona) 5-{{[4-((3,4-dihidro-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-2H-1-benzopirano-2-il)metoxi)-fenil]-metil}-tiazolidina-2,4-diona (troglitazona), 5-{{6-(2-fluorobenziloxi)naftalen-2-ilmetil}-tiazolidina-2,4-diona (MCC555), 5-{{[2-(2-naftil)-benzoxazol-5-il]-metil}tiazolidina-2,4-diona (T-174) o 5-(2,4-dioxotiazolidin-5-ilmetil)-2-metoxi-N-(4-trifluorometil-benzil)benzamidina (KRP297), un tipo no glitazona tal como un análogo de N-(2-benzoilfenil)-L-tirosina, por ejemplo GI-262570, o una oxolidinodiona, por ejemplo JTT501, un agonista PPAR $\gamma$ /PPAR $\alpha$  doble, por ejemplo DRF-554158, NC-2100 o NN-622, un agonista receptor retinoide X o un retinoide, por ejemplo ácido 2-[1-(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetrahidro-2-naftil)-ciclopropil]-piridina-5-carboxílico, ácido 4-[(3,5,5,8,8-pentametil-5,6,7,8-tetrahidro-2-naftil)-2-carbonil]benzoico, ácido 9-cis retinoico o un análogo, derivado o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, una tirosina fosfatasa cinasa 1B, un inhibidor de glucogen sintasa cinasa-3, un compuesto mimético de insulina de molécula pequeña no peptídico, por ejemplo L-783,281 o CLX-901, una dosis baja de insulina, un inhibidor de fructosa-6-fosfato amidotransferasa, un inhibidor de glucosa-6-fosfatasa, una biguanida, por ejemplo Metmorfin, un inhibidor de fructosa-1,6-bifosfatasa, un inhibidor de glicogen fosforilasa, por ejemplo CP-91149, un antagonista receptor de glucagón, por ejemplo, CT-99711, NNC 92-1687, L-168,049 o BAY27-9955, un fenol piruvato carboxicinasas, un inhibidor de piruvato deshidrogenasa cinasa, un inhibidor de  $\alpha$ -Glucosidasas, por ejemplo 4'',6''-dideoxi-4''-[(1S)-(1,4,6/5)-4,5,6-trihidroxi-3-hidroxi-metil-2-ciclo-hexenilamino]maltotriosa o O-4,6-dideoxi-4-{{[1S,4R,5S,6S]-4,5,6-trihidroxy-3-(hidroximetil)-2-ciclohexon-1-il-amino}- $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\alpha$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucopiranosas (acarbose), N-(1,3-dihidroxi-2-propil)valolamina (voglibosa) o miglitol, o un inhibidor vaciador gástrico, por ejemplo GLP-1, CCK-8 y amilina (por ejemplo Pramtintida), un agente que tiene efectos anti angiogénicos, por ejemplo, benzoporfirina, por ejemplo verteporfina, midostaurina o una 4-piridilmetil-efalazina.

El Compuesto A o el Compuesto A conjugado en forma complejada también se puede utilizar en combinación con un agente anti proliferativo, por ejemplo un fármaco quimioterapéutico, por ejemplo paclitaxel, gemcitabina, cisplatina, doxorubicina, 5-fluorouracilo o taxol, un agente o antagonista hormonal, por ejemplo un anti andrógeno o mitoxantrona (especialmente en el caso de cáncer de próstata), o un anti estrógeno, como letrozol (especialmente en el caso de cáncer de mama), un anti metabolito, un alcaloide vegetal, un modificador de respuesta biológica, preferiblemente linfoquina o interferones, un inhibidor de proteína tirosina cinasa y/o serina/treonina cinasa, o un agente con un mecanismo de acción diferente o desconocido, por ejemplo una epotilona o derivado de epotilona, o una lactona macrocíclica, por ejemplo rapamicin, RAD o CC1779.

## ES 2 305 104 T3

5 Donde el Compuesto A o el Compuesto A conjugado en forma complejada se administra en conjunto con otro fármaco, las dosis del fármaco co-administrado por supuesto variaran dependiendo del tipo de co-fármaco empleado, de la droga específica empleada, de la condición a ser tratada, y así sucesivamente. Los términos “co-administración” o “administración combinada” o similares como se utilizan aquí significan comprender la administración del agente terapéutico seleccionado a un paciente único, y pretenden incluir regímenes de tratamiento en los cuales los agentes no son necesariamente administrados mediante la misma ruta de administración o al mismo tiempo.

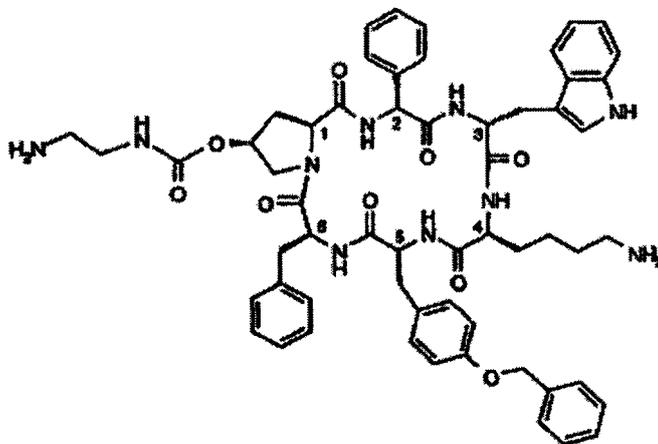
De acuerdo con lo anterior la presente invención suministra en un aspecto adicional:

- 10 6. Una composición farmacéutica que comprende a) un primer agente que es el Compuesto A o un Compuesto A conjugado en forma complejada y b) un co agente, por ejemplo como se definió anteriormente.

15 La combinación particular de la invención se seleccionará dependiendo de la prevención o tratamiento de enfermedades o trastornos; por ejemplo una combinación con un agente inmunosupresor por ejemplo la prevención o tratamiento de un rechazo de injerto crónico, una combinación de un secretagogo de insulina, un mejorador de secreción de insulina, un sensibilizador de insulina o una dosis baja de insulina en el tratamiento de diabetes o complicaciones de estos, una combinación con un agente anti inflamatorio para la prevención o tratamiento de enfermedades o trastornos inflamatorios, una combinación de un agente  
20 que tiene efectos anti angiogénicos para la prevención o tratamiento, de por ejemplo edema macular o degeneración o en cáncer, una combinación con un agente quimioterapéutico para uso en el cáncer.

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula



uno de los grupos amino estando opcionalmente en forma protegida,  
o una sal o complejo de este.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en forma no protegida, en forma de sal.

3. Un compuesto de acuerdo a la reivindicación 2 como una mono o disal.

4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 3 en la forma de una sal de acetato, benzoato, aspartato o pamoato.

5. Un proceso para la producción de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende ciclar un péptido lineal en forma protegida, unida a polímero o desprotegida de tal forma que se obtiene el compuesto deseado y luego se remueve opcionalmente a los grupos protectores y se recupera el compuesto deseado así obtenido, en forma libre o de sal.

6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el grupo amino de cadena lateral de Pro se conjuga a un agente quelante, opcionalmente complejado con un elemento detectable radioterapéutico.

7. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de esta, en asocio con uno o más diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables para estos.

8. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, en forma de liberación sostenida o en forma tópica.

9. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, para uso en combinación con un agente inmuno supresor, un agente anti inflamatorio, un agente modulador del receptor secretagogo GH, un antagonista receptor GH, un secretagogo de insulina, un mejorador de la secreción de insulina, un sensibilizador de insulina, una dosis baja de insulina, un agente que tiene efectos anti angiogénicos o un agente quimioterapéutico.

10. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de fístula enterocutánea o pancreaticocutánea, síndrome de intestino irritable, trastornos y enfermedades inflamatorias, enfermedad policística del riñón, síndrome de vaciamiento, síndrome de diarrea acusa, diarrea relacionada con SIDA, diarrea inducida por quimioterapia, pancreatitis aguda o crónica, sangrado gastrointestinal, tumores y malignidades, angiogénesis, edema macular, trastornos relacionados con neurovascularización coroidal, retinopatía proliferativa, trastornos de injerto de vaso, estenosis de injerto de vena, restenosis y oclusión vascular luego de daño vascular.

11. Uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de acromegalia.

## ES 2 305 104 T3

12. Uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de tumores que secreta la hormona gastrointestinal.

5 13. Uso de acuerdo con la reivindicación 12 en donde el tumor que secreta la hormona gastrointestinal es un tumor carcinoide.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65