



(12) **PATENT**

(19) **NO**

(11) **331093**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

C07K 7/64 (2006.01)
C07K 14/655 (2006.01)
C07K 1/06 (2006.01)
A61K 38/12 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
A61K 49/04 (2006.01)
A61K 51/00 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01)
A61P 1/12 (2006.01)
A61P 1/18 (2006.01)
A61P 5/10 (2006.01)
A61P 5/48 (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 9/08 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20030484	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2001.07.30 PCT/EP2001/08824
(22)	Inng.dag	2003.01.30	(85)	Videreføringsdag	2003.01.30
(24)	Løpedag	2001.07.30	(30)	Prioritet	2000.08.01, GB, 0018891
(41)	Alm.tilgj	2003.03.19			
(45)	Meddelt	2011.10.03			

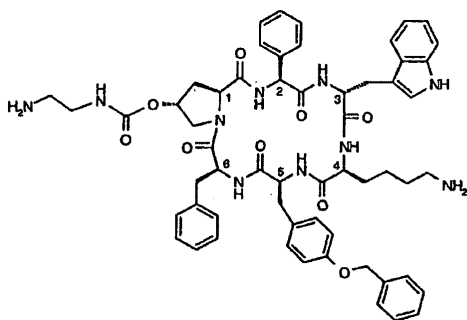
(73)	Innehaver	Novartis AG, Schwarzwaldallee 215, CH-4058 BASEL, Sveits
(72)	Oppfinner	Bernhard Wietfeld, Dichleweg 27, DE-79588 EFRINGEN-KIRCHEN, Tyskland David Bodmer, Rottrotenweg 8, CH-5313 KLINGNAU, Sveits Rainer Albert, Wartenbergstrasse 21, CH-4052 BASEL, Sveits Wilfried Bauer, Rüssacherstrasse 10, CH-4432 Lampenberg, Sveits Ian Lewis, Grenzacherweg 309, CH-4125 Riehen, Sveits Christian Bruns, Ziegelhofstrasse 120, DE-79110 FREIBURG, Tyskland Gisbert Weckbecker, Löfling 31, CH-4105 BIEL-BENKEN, Sveits Ivo Felner, Robinienweg 59, CH-4153 Reinach, Sveits Heribert Hellstern, Im Backacker 9, DE-79423 HEITERSHEIM, Tyskland Mark Meisenbach, 11, rue de Chemin de Fer, F-68480 Durmenach, Frankrike
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Somatostatinanaloger, fremgangsmåte for fremstilling, farmasøytisk sammensetning og anvendelse derav.
(56)	Anførte publikasjoner	WO 9701579 A2, HUANG, ZIWEI ET AL: "Main chain and side chain chiral methylated somatostatin analogs: syntheses and conformational analysis", Journal of American Chemical Society, vol. 114, nr. 24, side 9390-9401, XP002189302
(57)	Sammendrag	

Oppfinnelsen fremskaffer syklo[{4-(NH₂-C₂H₄-NH-CO-O-)Pro}-Phg-DTrp-Lys-Tyr(4-Benzyl)-Phe], eller et farmasøytisk egnet salt eller kompleks derav, som har interessante farmasøytiske egenskaper.

Foreliggende oppfinnelse relateres til somatostatinpeptidomimetika, en fremgangsmåte for deres fremstilling, farmasøytiske prepareringer som inneholder disse og anvendelse for fremstilling av et medikament for behandling av sykdommer.

- 5 Spesielt fremskaffer foreliggende oppfinnelse forbindelsen med formel



- også betegnet syklo[4-(NH₂-C₂H₄-NH-CO-O-)Pro}-Phg-DTrp-Lys-Tyr(4-Bzl)-Phe],
 10 refereres heri til som forbindelse A, i tillegg til diastereisomerer og blandinger derav, på fri form, i salt eller kompleks form eller som beskyttet. Phg betyr -HN-CH(C₆H₅)-CO- og Bzl betyr benzyl.

- Forbindelse A på beskyttet form korresponderer til ovennevnte molekyl hvori minst en
 15 av aminogruppene er beskyttet og ved avbeskyttelse føres til forbindelse A, fortrinnsvis som kan fjernes fysiologisk. Egnede aminobeskyttelsesgrupper er for eksempel som beskrevet i "Protective Groupe in Organic Synthesis", T.W. Greene, J. Wiley & Sons ny (1981), 219-287, innholdet av hvilken er inkorporert heri ved referanse. Eksempel på slik aminobeskyttelsesgruppe er acetyl.

20

WO 9701579 beskriver somatostatin peptidanaloger med formel I: -(D/L)Trp-Lys-X₁-X₂- Formelen representerer aminosyreposisjonene 8-11 av naturlig forekommende somatostatin -14 og er rettkjedet eller sykliske.

- 25 Ziwei Huang et al., Journal of American Chemical Society, vol. 114, nr. 24, 1992, s. 9390-9401 har utviklet en metode for å undersøke bioaktive konformasjoner av hovedkjeden og sidekjedene i somatostatinanalogene c[Pro⁶-Phe⁷-D-Trp⁸-Lys⁹-Thr¹⁰-Phe¹¹].

- 30 Når forbindelse A foreligger på kompleks form, kan det passende være en forbindelse A som har en chelaterende gruppe på sidekjedeaminogruppen til prolin og kompleksert

med et detekterbart eller radioterapeutisk element. Forbindelse A som har en chelaterende gruppe er referert til heri som konjugert forbindelse A.

Eksempler på chelaterende grupper inkluderer for eksempel de som er avledet fra poly-aminopolykarboksylsyrer eller anhydrider, for eksempel de avledet fra ikke-sykliske
 5 ligander for eksempel dietylntriaminpentaeddiksyre (DTPA), etylen glykol-0-0'-bis(2-aminoetyl)-N,N,N',N'-tetraeddiksyre (EGTA), N, N'-bis(hydroksybensyl) etylenediamin-N,N'-eddiksyre HBED) og trietylentetramin heksaeddiksyre (TTHA), de avledet fra substituert DTPA, for eksempel p-isotiocyanato-bensyl-DTPA, de avledet
 10 fra makrosykliske ligander, for eksempel 1,4,7,10-tetra-azasyklododekan-N,N',N'', N'''-tetraeddiksyre (DOTA) og 1,4,8,11-tetraazasyklotetradekan-N,N', N'', N'''-tetraeddiksyre (TETA), eller 1,4,7,10-tetraazasyklodtridekan-N,N',N'',N'''-tetraeddiksyre (TITRA).

15 Den chelaterende gruppen kan være bundet enten direkte eller gjennom en spacer til sidekjedeaminogruppen til prolin. Egnede spacere inkluderer disse kjent innenfor fagområdet, for eksempel som beskrevet i GB-A-2,225,579, for eksempel den divalente gruppen på en aminokarboksylsyre, for eksempel β -Ala eller en divalent gruppe avledes fra 6-amino-kapronsyre.

20

Foretrukne chelaterende grupper er de avledet fra DTPA, DOTA eller TETA. Chelaterende grupper avledes fra DTPA eller DOTA er de mest foretrukne.

Med detekterbart grunnstoff betyr ethvert grunnstoff, fortrinnsvis et metallion som har
 25 en egenskap som er detekterbar i in vivo diagnostiske teknikker, for eksempel et metallion som emitterer detekterbar stråling eller et metallion som er i stand til å innvirke på NMR relaksasjonsegenskaper. Med radioterapeutisk grunnstoff betyr ethvert grunnstoff som emitterer en stråling som har en fordelaktig effekt på tilstanden som skal behandles.

30

Egnede grunnstoffer inkluderer for eksempel tungmetaller eller sjeldne jordioner, for eksempel som anvendt i CAT-skanning (Computer aksial tomografi), paramagnetiske ioner, for eksempel Gd^{3+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} og Cr^{2+} , fluoriserende metallioner, for eksempel Eu^{3+} , og radionuklider, for eksempel et radiolantanid, spesielt et γ -emitterende radionuklid, β -emitterende radionuklid, α -emitterende radionuklid, Auger- e^- -emitterende
 35 nuklid eller et positron-emitterende radionuklid for eksempel ^{68}Ga , ^{18}F eller ^{86}Y .

Egnede γ -emitterende radionuklider inkluderer de som er anvendbare i diagnostiske teknikker. De γ -emitterende radionuklidene har fordel med en halveringstid på fra 1 time til 40 dager, fortrinnsvis fra 5 timer til 4 dager, mer fordelaktig fra 12 timer til 3 dager. Eksempler er radioisotoper fra gallium, indium, teknesium, ytterbium, rhenium, 5 terbium, lutetium, thallium og samarium for eksempel ^{67}Ga , ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{161}Tb , ^{169}Yb , ^{186}Re eller ^{177}Lu .

Egnede β -emitterende radionuklider inkluderer de som er anvendbare i radio-terapeutiske applikasjoner, for eksempel ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{169}Er , ^{121}Sn , ^{127}Te , 10 ^{177}Lu , ^{143}Pr , ^{198}Au , ^{109}Pd , ^{165}Dy , ^{142}Pr eller ^{153}Sm .

Egnede α -emitterende radionuklider er de som er anvendt i terapeutisk behandling, for eksempel ^{211}At , ^{212}Bi eller ^{201}Ti .

15 Forbindelse A kan foreligge for eksempel på fri eller saltform. Salter inkluderer syreadhesjonssalter med for eksempel uorganiske syrer, polymere syrer eller organiske syrer. For eksempel med saltsyre, eddiksyre, melkesyre, asparbinsyre, benzoesyre, ravsyre eller tanosyre. Syreadhesjonssalter kan foreligge som mono- eller divalente salter, for eksempel avhengig av om en eller to syreekvivalenter er tilsatt til forbindelse 20 A på fri baseform. Foretrukne salter er laktat, aspartat, benzoat, suksinat og pamoat inkluderende mono- og disalter, fortrinnsvis aspartat-disaltet og pamoat-monosaltet.

Den konjugerte forbindelse A kan i tillegg foreligge på saltformer som er oppnåelig med karboksylsyregruppene når de er til stede i den chelaterende gruppen, for eksempel 25 alkaliske metallsalter slik som natrium eller kalium, eller substituerte eller usubstituerte ammoniumsalter.

Foreliggende oppfinnelse inkluderer også en fremstillingsmåte for tilvirkning av forbindelse A. Den kan fremstilles analogt til kjente metoder, for eksempel:

- 30 a) syklisering av et lineært peptid på beskyttet, polymerbunnet eller ubeskyttet form på slik måte at forbindelse A fremskaffes og deretter eventuell avbeskyttelse av beskyttelsesgruppene,
- b) å fremstille en konjugert forbindelse A ved å binde sammen en chelaterende gruppe og forbindelse A på beskyttet eller ubeskyttet form og deretter 35 avbeskyttelse av beskyttelsesgruppen,

og gjenvinning av forbindelse A eller en konjugert forbindelse A fremskaffet på denne måte, på fri form, på saltform eller eventuell kompleksert med et påviselig eller radioterapeutisk grunnstoff.

- 5 Det er generelt ikke kritisk hvilken aminosyre som er valgt til å være i C-terminal stilling for å starte peptidkjeden siden det lineære peptidet vil sykliseres, forutsatt at aminosyresekvensen i det lineære peptidet korresponderer til den i forbindelse A. Imidlertid kan det være andre faktorer som kan foretrekke en startaminosyre i forhold til en annen. Når forbindelse A fremstilles ved fast fasesyntese, er den første aminosyren
- 10 fortrinnsvis bundet til polymeren, for eksempel en alminnelig tilgjengelig polystyren-basert polymer, gjennom en egnet linker, for eksempel en linker som er spaltbar under milde betingelser for å beholde sidekjedebeskyttelsen intakt, for eksempel SASRIN eller en valgfri substituert tritylbasert linker, for eksempel 4-(hydroksy-difenyl-metyl)-benzoesyre hvori en av fenylgruppene eventuelt kan substitueres for eksempel med Cl.
- 15 Oppbygningen av den ønskede peptidkjeden kan utføres på vanlig måte, for eksempel ved anvendelse av aminosyreenheter hvori aminogruppen på enden er Fmoc-beskyttet, sidekjedeaminogrupeer hvor de er tilstede er beskyttet med en annen aminobeskyttelsesgruppe, for eksempel Boc eller CBO. Fortrinnsvis sykliseres det lineære peptidet på en slik måte at det blir dannet en binding mellom Tyr(4-Bzl)-OH og Phe, for eksempel
- 20 Phe- $\{4-(\text{NHR}_1-\text{C}_2\text{H}_4-\text{NH}-\text{CO}-\text{O}-)\text{Pro}\}$ -Pjg-DTrp(R₂)-Lys(ϵ -NHR₃)-Tyr(4-Bzl)-OH eller et funksjonelt derivat derav, hvori hver av R₁, R₂ og R₃ er en aminobeskyttelsesgruppe. Sykliseringstrinnet a) kan utføres i henhold til kjent metode, for eksempel via et azid, en aktiv ester, kombinert anhydrid eller et karbodiimid. Deretter fjernes beskyttelsesgruppene, for eksempel ved spalting for eksempel med trifluoreddiksyre eller ved
- 25 hydrogenering.

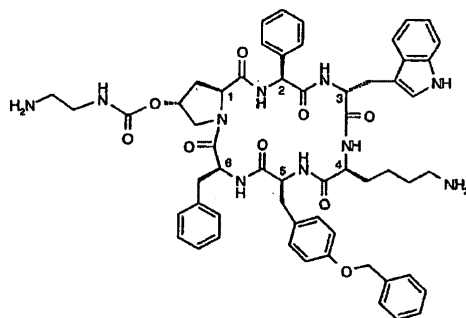
- Syklisering av peptidet kan også utføres direkte på polymeren, hvor den første aminosyren er på en N α - og C-terminalbeskyttet form og bundet gjennom en sidekjede, for eksempel ϵ -aminofunksjonen til lysin eller ved forankring i peptidstammen. Den
- 30 lineære sekvensen syntetiseres deretter ved å følge standard fast fasesyntese (SPPS). Etter spalting av C-terminalbeskyttelse sykliseres peptidet for eksempel som beskrevet ovenfor. Deretter spaltes det sykliske peptidet fra polymeren og avbeskyttes.

- Hvis ønsket, kan sidekjeden tilstedeværende på prolin introduseres på aminosyren før
- 35 eller etter sykliseringstrinnet a). Derfor, prolin som første aminosyre eller et start-lineært eller syklisk peptid hvori i hvert tilfelle prolin er ringsubstituert med OH, kan konverteres for å fremskaffe forbindelse A eller den ønskede prolinenheten eller det

korresponderende lineære peptidet, respektivt, hvori prolin er substituert med $\text{NHR}_1\text{-C}_2\text{H}_4\text{-NH-CO-O-}$.

Komplekseringen av en konjugert forbindelse A kan utføres ved å reagere den
 5 konjugerte forbindelse A med et korresponderende påviselig eller radioterapeutisk
 grunnstoff for å gi forbindelse, for eksempel et metallsalt, fortrinnsvis et vannløselig
 salt. Reaksjonen kan utføres analogt til kjente metoder, for eksempel som beskrevet i
 Perrin, Organic Ligand, Chemical Data Series 22. NY Pergamon Press (1982); i
 Krejcarit og Tucker, Biophys. Biochem. Res. Com. 77: 581 (1977) og i Wagner og
 10 Welch, J. Nucl. Med. 20: 428 (1979).

Foreliggende oppfinnelse omfatter forbindelse med formel



15

n av aminogruppene er eventuelt beskyttet, eller et salt eller kompleks derav.

Videre omfatter foreliggende oppfinnelse fremgangsmåte for fremstilling av en
 forbindelse i henhold til krav 1, kjennetegnet ved at den omfatter syklisering av et
 20 lineært peptid på beskyttet, polymerbundet eller ubeskyttet form på en slik måte at den
 ønskede forbindelse oppnås og beskyttelsesgruppen(e) fjernes eventuelt deretter og
 gjenvinning av den ønskede forbindelse oppnås deretter, på fri eller saltform.

Foreliggende oppfinnelse omfatter også farmasøytisk sammensetning kjennetegnet ved
 25 at den omfatter en forbindelse i henhold til krav 1 eller et farmasøytisk egnet salt derav,
 i assosiasjon med ett eller flere farmasøytisk egnede fortynningsmidler eller bærere
 derfor.

Omfattet av foreliggende oppfinnelse er også anvendelse av en forbindelse i følge krav
 30 1, for fremstilling av et medikament for behandling av sykdommer med en etiologi som
 omfatter eller er assosiert med overskudd GH-sekresjon og/eller overskudd av IGF-1 og

andre metabolske sykdommer relatert til insulin eller glukagon frigivelse, enterokutant og pankreatiskcutanøs fistula, irritabelt tarmsyndrom, inflammatoriske tilstander og sykdommer, polycystisk nyresykdom, dumpingsyndrom, vandig diaré-syndrom, AIDS-relatert diaré, kjemoterapeutisk induisert diaré, akutt eller kronisk pankreatitt, mave-
 5 tarmlblødning, tumorer og maligniteter, angiogenese, makulært ødem, korroidal neo-vaskularisering relaterte tilstander, proliferativ retinopati, transplantasjonsåresykdommer, transplantasjonsvenestenose, restenose og vaskulær blokkering etter vaskulær skade.

- 10 De følgende eksemplene illustrerer oppfinnelsen. Alle temperaturer er i C.

Forkortelser:

	AcOH	= eddiksyre
	Boc	= tert.-butoksy-karbonyl
15	Bzl	= bensyl
	CBO	= karbobenzoksy
	DIPCI	= N, N'-diisopropylkarbodiimid
	DIPEA	= diisopropyletylamin
	DMF	= dimetylformamid
20	DPPA	= difenylfosforylazid
	Fmoc	= fluorenylmetoksykarbonyl
	HOBT	= 1-hydrokybenzotriasol
	Osu	= N-hydrokysuksinimid
	TFA	= trifluoreddiksyre
25	THF	= tetrahydrofuran

Eksempel 1: Syklo[{4-(NH₂-C₂H₄-NH-CO-O-)Pro} -Phg-DTrp-Lys-Tyr(4-Bzl)-Phe]

a) Syntese av Fmoc-Pro(4-OCO-NH-CH₂-CH₂-NH-Boc)-OH

- L-hydroksyprolinmetylesterhydroklorid reageres med Fmoc-OSu i vandig 1,0 N
 30 natriumkarbonat/THF ved romtemperatur. Etter at reaksjonen er ferdig, isoleres Fmoc-Pro(4-OH)-OMe ved utfelling. Fmoc-Pro(4-OH)-OMe tilsettes deretter dråpevis til en løsning av trisfosgen (0,6 ekvivalenter) i THF for å gi et klorkarbonat mellomprodukt. Etter 1 time tilsettes dimetylaminopyridin (1,0 ekvivalenter) og N-Boc-diaminoetan (6,0 ekvivalenter) og reaksjonen røres ved romtemperatur. Etter reaksjonen er ferdig, fjernes
 35 løsningsmiddelet under vakuum og det resulterende Fmoc-Pro(4-OCO-NH-CH₂-CH₂-NH-Boc)-OMe ekstraheres fra et tofasesystem av etylacetat (0,1 M HCl) for å gi ubearbeidet produkt (MH⁺ = 554) som renses ved krystallisering fra etylacetat.

Metylesteren spaltes deretter til fri syre ved behandling med 1N NaOH i dioksan/vann og produktet Fmoc-Pro(4-OCO-NH-CH₂-CH₂-NH-Boc)-OH renses på silikagel, [(M+Na)]⁺ = 562).

- 5 b) H-Phe-Pro(4-OCO-NH-CH₂-CH₂-NH-Boc)-Phg-DTrp(Boc)-Lys(Boc)-Tyr(Bzl)-OH
Fmoc-Tyr(Bzl)-O-CH₂-Ph(3-OCH₃)O-CH₂-polystyren alminnelig tilgjengelig polymer (SASRIN-polymer, 2,4 mM) benyttes som utgangsmateriale og kjøres gjennom en standardprotokoll bestående av gjentakende sykluser med N α -avbeskyttelse (piperidin/DMF, 2:8), gjentatte vaskinger med DMF og kobling DIPCI: 4,8 med mer/HOBT: 6
10 mM, DMF). De følgende aminosyrederivater kobles sekvensielt: Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-DTrp(Boc)-OH, Fmoc-Phg-OH, Fmoc-Pro(α -OCO-NH-CH₂-CH₂-NH-Boc)-OH, Fmoc-Phe-OH. Koplinger (2 ekvivalent aminosyrer) fortsettes eller repeteres til komplettering, det vil si til gjenværende aminogrupeer er fullstendig fjernet som monitoreres ved en negativ "Kaiser" Ninhydrin-test. Før spalting av det fullstendig
15 sammensatte beskyttede lineære peptidet fra dets polymer fjernes N α -Fmoc-beskyttelse fra det siste residiet.

- c) H-Phe-Pro(4-OCO-NH-CH₂-CH₂-NH-Boc)-Phg-DTrp(Boc)-Lys(Boc)-Tyr(Bzl)-OH
Etter vaskinger med CH₂Cl₂, overføres peptidpolymeren til en kolonne eller et filter
20 med sug og peptidfragmentet spaltes og elueres med en kort behandling med 2 % TFA i CH₂Cl₂ innen 1 time. Eluatet nøytraliseres umiddelbart med en mettet NaHCO₃-løsning. Den organiske løsningen separeres og inndampes og den sidekjedebeskyttede forløperen (MH⁺ = 1366) sykliseres uten ytterligere rensing.

- 25 d) syklo[-Pro(4-OCO-NH-CH₂-CH₂-NH₂)-Phg-DTrp(Boc)-Tyr(Bzl)-OH
Det ovennevnte lineære fragmentet løses i DMF (4 mM), avkjølt til -5 °C og behandles med to ekvivalenter DIPEA deretter 1,5 ekvivalenter med DPPA og røres til komplettering (ca 20 timer) ved 0-4 °C. Løsningsmiddelet fjernes nesten fullstendig under vakuum; konsentratet fortynnes med etylacetat, vasket med NaHCO₃, vann, tørket
30 og inndampet under vakuum.

- For avbeskyttelse løses restene ved 0 °C i TFA/H₂O 95:5 (ca 50 mM) og røres kaldt i 30 minutter. Produktet felles deretter med eter som inneholder ca 10 ekvivalenter HCl, filtrert, vasket med eter og tørket. For å fullstendig dekomponere gjenværende indol-N
35 karbaminsyre løses produktet i 5 % AcOH og frysetørkes etter 15 timer ved ca 5 °C. Preparativ RP-HPLC utføres på en C-18 10 μ m STAGROMA kolonne (5-25 cm) ved anvendelse av en gradient på 0,5 % TFA til 0,5 % TFA i 70 % acetonnitril. Fraksjoner

som inneholder den rene tittelforbindelsen forenes, fortynnes med vann og frysetørkes. Det frysetørkede materialet løses i vann etterfulgt av presipitering med 10 % Na_2CO_3 i vann. Den faste frie basen filtreres fra, vaskes med vann og tørkes under vakuum ved romtemperatur. Det resulterende hvite pulveret anvendes direkte for de ulike saltene.

5

Eksempel 2: (Syklo[4-($\text{NH}_2\text{-C}_2\text{H}_4\text{-NH-CO-O-}$)Pro]-Phg-DTrp-Lys-Tyr(4-Bzl)-Phe] i saltform

a. Acetat

Overføring til acetatsaltform utføres ved anvendelse av en ionebytterpolymer (for
10 eksempel AG 3-x4). MS (ESI): m/z 524,5 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 42^\circ$, $c=0,25$ i AcOH 95 %

b. Aspartat

Overføring til mono- eller di-aspartat utføres ved reaksjon av 1 ekvivalent av
forbindelsen fra eksempel 1 med 1 eller 2 ekvivalenter av asparginsyre i en blanding av
15 acetonitril/vann 1:3. Den resulterende blandingen fryses og frysetørkes. Di-aspartatet
kan også fremskaffes ved å løse forbindelsen fra eksempel 1 i vann/acetonitril 4:1,
filtrering, påsetting på en ionebytterpolymer, for eksempel BioRad AG4X4-kolonne, og
eluering med vann/acetonitril 4:1. Eluatet konsentreres, fryses og frysetørkes. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -$
47,5°, $c=2,5$ mg/ml i metanol

20

c. Benzoat

Overføring til benzoatet kan utføres ved å løse forbindelsen fra eksempel 1 med 2
ekvivalenter benzosyre i en blanding av acetonitril/vann 1:2. Den resulterende
blandingens fryses og frysetørkes.

25

d. Pamoat

1 ekvivalent av forbindelsen fra eksempel 1 løses sammen med 1 ekvivalent av
embonsyre i en blanding av acetonitril/THF/vann 2:2:1. Den resulterende blandingen
fryses og frysetørkes.

30

Eksempel 3: (Syklo[4-(DOTA-NH-C₂H₄-NH-CO-O)Pro]-Phg-DTrp-Lys-Tyr(4-Bzl)-Phe]

a) syklo-[-Pro(4-OCO-NH-CH₂-CH₂-NH₂)-Phg-DTrp-Lys(Cbo)-Tyr(Bzl)-Phe-],
trifluoracetat. Forbindelsen syntetiseres på samme måte som syklo-[-Pro(4-OCO-NH-
35 CH₂-CH₂-NH₂)-Phg-DTrp-Lys(Cbo)-Tyr(Bzl)-Phe-], trifluoracetat ved anvendelse av
Fmoc-Lys(Boc)-OH ved anvendelse av et Fmoc-Lys(Cbo)-OH i stedet for Fmoc-
Lys(Boc)-OH.

- b) 400 mg kommersielt tilgjengelig DOTA x 2H₂O (SYMAFEX – Frankrike) løses i 20 ml vann. Etter tilsats av 20 ml DMF, 170 mg syklo[-Pro(4-OCO-NH-CH₂-CH₂-NH₂)-Phg-DTrp-Lys(CBO)-Tyr(Bzl)-Phe-], sammen med 190 mg DCCl og 60 mg N-hydroksysuksinimid tilsettes. Den resulterende suspensjonen holdes ved romtemperatur i 72 timer. Etter filtrering, fjernes løsningsmiddelet under redusert trykk og det gjenværende ubearbeidede materialet renses på silikagel (DCM/MeOH/HOAc_{50%} 8/2/0,25 → 7/3/1 som mobilfase).
- c) For avbeskyttelse behandles det ovennevnte DOTA-konjugatet med 5 ml trifluoreddiksyre/tioanezol (9/1) i to timer ved romtemperatur. Etter det helles løsningen over en blanding av 100 ml dietyleter pluss 5 ml 3N HCl/dimetyleter og det resulterende bunnfallet isoleres ved filtrering. Rensing utføres på silikagel ved anvendelse av DCM/MeOH/HOAc_{50%} 7/4/2 → 7/5/4 som mobilfase. Analytisk rent sluttprodukt fremskaffes etter et avsaltningsstrinn ved anvendelse av en 0,1% TFA til 0,1 % TFA i 90 % CH₃CN-gradient på en RP₁₈-HPLC-kolonne (Spherisorb 250 x 4,6 mm). MH⁺: 1434,7

Forbindelse A på fri form eller på form av et farmasøytisk egnet salt og kompleks innehar verdifulle farmakologiske egenskaper som indikert i in vitro og in vivo-tester og er derfor indikert for terapi.

Mer utførlig, forbindelse A innehar en interessant bindingsprofil for humane somatostatin-reseptorer (hsst), spesielt med hensyn på hsst1, hsst2, hsst3 og hsst5. 5 somatostatinreseptorundergrupper, sst1, sst2, sst3, sst4, sst5 har blitt klonet og karakterisert. hsst1, hsst2 og hsst3 og deres sekvenser har blitt beskrevet ved Y. Yamada et al. i Proc. Nat. Acad. Sci., 89, 251-255 (1992). hsst4 og dens sekvens har blitt beskrevet ved L. Rohrer et al. i Proc. Aca. Sci., 90, 4196-4200 (1993). hsst5 og dens sekvens har blitt beskrevet ved R. Panetta et al. i Mol. Pharmacol. 45, 417-427, 1993.

Bindingstestene kan utføres som beskrevet under ved anvendelse av membraner fra cellelinjer som selektivt og stabilt uttrykker hsst1, hsst2, hsst3, hsst4 eller hsst5, for eksempel CHO eller COS-celler.

Membranet fremstilles i henhold til kjente metoder, for eksempel som beskrevet ved C. Bruns et. al i Biochem. J., 1990, 65, side 29-44. Membranet fremstilt fra hsst-selektive

cellelinjer, for eksempel CHO eller COS-celler som stabilt uttrykker hsst1 eller hsst2 eller hsst3 eller hsst4 eller hsst5 inkuberes i triplikat i et totalt volum på 300 µl ved 22 °C i 30 minutter med økende konsentrasjoner av [¹²⁵I-Tyr¹¹]-SRIF-14 i 10 mmol/l Hepes buffer (pH 7,6) inneholdende 0,5 % BSA. Inkuberingen stoppes ved rask filtrering og
 5 filtrene telles i en teller. Spesifikk binding er totalbinding minus ikke-spesifikk binding ved tilstedeværelse av en µmol pr liter somatostatin-14. Forsøkene utføres i triplikat. Affinitetskonstanten (K_D) og antall bindings seter beregnes ved anvendelse av egnet statistikk og grafiske programmer.

- 10 Forbindelse A har i ovennevnte bindingstestsystemer mot hsst1, hsst2, hsst3 og/eller hsst5 en IC₅₀ i nMolarområdet, fortrinnsvis en IC₅₀ fra 0,1 til 10 nM (IC₅₀ = konsentrasjon for halvparten av maksimal hemming i et konkurransebindingstestsystem ved anvendelse av [¹²⁵I-Tyr¹¹]-SRIF-14 som hsst1-5 spesifikk radioligand.

	hsst1	hsst2	hsst3	hsst4	hsst5
Forbindelse	9,3 nM±0,1	1,0 nM±0,1	1,5 nM±0,3	>100 nM	0,16 nM±0,1

15

Forbindelse A binder også til veksthormonreseptorer. Slike reseptorer er beskrevet ved G. Muccioli et al., J. Endocrinol. 1998, 157, 99-106, ved H. Ong et al., i Endocrinology 1998, 139, 432-435 og ved R.G. Smith et al., Horm. Res., 1999, 3), 1-8. Bindingsassayet til disse reseptorene kan utføres som beskrevet i J. Endocrinol.

- 20 Invest. 24: RC1-RC3, 2001. I dette testsystemet, fortrengr forbindelse A ¹²⁵I-Tyr-Ala-heksarelin. Følgelig er forbindelse A anvendbar for modulering av aktiviteten til veksthormonreseptorer, det indikerer for eksempel en mulig rolle ved vektøkning eller metabolsk regulering.

- 25 Videre, viser forbindelse A inhiberende aktivitet på GH-frigjøring som indikert ved inhibering av frigjøring av GH in vitro fra hypofyseceller i kultur. For eksempel, bakre hypofysekjertler fra voksne hannrotter kuttes i små biter og fordeles ved anvendelse av 0,1 % trypsin i 20 mM HEPES-buffer. De disperse cellene dyrkes i fire dager i MEM (Gibco) supplementert med 5 % foster kalveserum, 5 % hesteserum, en mM NaHCO₃,
 30 2,5 nM deksametason, 2,5 mg/ml insulin og 20 U/ml/ Pen/strep. På forsøksstadiet vaskes cellene to ganger med Krebs-Ringermedium buffret med 20 mM HEPES og supplementert med 5 mM glukose og 0,2 % BSA. Deretter inkuberes cellene i tre timer med forbindelse A ved tilstedeværelse av 3 x 10⁻¹⁰ molar veksthormonfrigjøringsfaktor. Mengde av veksthormon som blir frigjort inn i mediet måles ved RIA. Forbindelse A
 35 har en IC₅₀ på 0,4 nM i dette testsystemet.

Forbindelse A hemmer frigjøring av veksthormon (GH) i rotter. Forbindelse A administreres s.c. til bedøvede rotter. Blod samles etter avlivning 1 time etter administrering av forbindelsen. Virkningstiden estimeres på basis av hemming av basal GH-sekresjon 6 timer etter behandling med middelet. Hormonnivået måles ved RIA 1 time og 6 timer etter behandling. ID₅₀-verdien for hemming av hormonsekresjon bestemmes grafisk (log-probit) for hvert forsøk og gjennomsnittet av de resulterende verdiene beregnes logaritmisk. I denne in vivo-modellen inhiberer forbindelse A veksthormonfrigjøring signifikant med en lang virkningstid (gjennomsnittlig basal ID₅₀ = 5,5 µg/kg s.c. 6 timer). I et lignende testsystem for måling av effekten på insulin, hemmer forbindelse A sekresjon av insulin.

Den potente og effektive hemming av GH ble også bekreftet i apestudier. Dessuten, demonstrerte metabolske studier i diabetiske aper en potent antidiabetisk/insulin-sensitiviserende effekt av forbindelse A.

Videre, forbindelse A hemmer IGF-1 plasmanivåer in vivo som indikert i standardtester ved anvendelse av hannrotter. Kort, forbindelse A administreres ved osmotisk pumpe implantert s.c. i hannrotter fra en Lewis-stamme. Blodprøver samles fra vevet bak øye-eplet ved anvendelse av kort bedøvelse med for eksempel isofluran. I dette testsystemet, reduserer forbindelse A signifikant IGF-1 plasmanivåer med en langvarende effekt: for eksempel mer enn 60 % hemming observeres etter 14 dager med behandling med 10 µg/kg/time med forbindelse A. Nærmere forklart, ingen lekkasje kunne observeres etter kontinuerlig behandling i rotteresipienter i aorta eller nyreallografter kontinuerlig infusert med forbindelse A ved 10 µg/kg/time opptil 126 dager som induserer en signifikant og vedvarende reduksjon av IGF-1 plasmanivå.

Forbindelse A er følgelig anvendbar for forebygging eller behandling av tilstander med en etiologi som omfatter eller assosieres med overskudd av GH-sekresjon og/eller overskudd av IGF-1 for eksempel ved behandling av akromegali i tillegg til behandling av type 1 eller type 2 diabetes mellitus, spesielt komplikasjoner derav, for eksempel angiopati, diabetisk retinopati, diabetisk makulært ødem, nepropati, neuropati og begynnende tilfeller, og andre metabolske tilstander relatert til frigjøring av insulin eller glukagon, for eksempel fedme, for eksempel ekstrem fedme eller hypotalamisk eller hyperinsulemisk fedme. Forbindelse A er også anvendbar ved behandling av en enterokutant og pankreatisk kutant fistel, irritabelt tarmsyndrom, betennelsessykdommer, for eksempel Grave's sykdom, inflammatorisk tarmsykdom, psoriasis eller rheumatoid

artritt, polycystisk nyresykdom, postgastrektromisk syndrom, vandig diarésyndrom, AIDS-relatert diaré, kjemoterapiindusert diaré, akutt eller kronisk pankreatitt og mave-tarmhormonsekreterende tumorer (for eksempel GEP-tumorer, foklukagonoma, insulinoma, karcinoider og lignende), lymfosyttiske ondartetheter, for eksempel
 5 lymfoma eller leukemi, hepatocellulært karcinoma i tillegg til mave-tarmblødning, for eksempel blødning i spiserøret.

Forbindelse A er også anvendbar i behandling av tumorer som er positive for somatostatinreseptor, for eksempel tumorer som har *hsst1*, *hsst2*, *hsst3* og/eller *hsst5*,
 10 som indikert i prolifereringstester med ulike kreftcellelinjer som har slike somatostatinreseptorer.

AR42J rottepankreatisk tumorcellelinje er avledet fra en azaserin-indusert eksokrin pankreatisk tumor (Jessop and Hay, 1980). Mykoplasma cellefrie kulturer dyrkes i
 15 DMEM supplementert med 10 % embryotisk kalveserum (FCS) under 5 % CO₂. Cellene dyrkes i fravær av antibiotika eller fungisive midler. Subkonfluentet AR42J-celler tripsineres, fortynnes i DMEM + 2,5 % FCS og såes i 96-bredders plater. Etter en 48-timers inkubasjonsperiode (dag 0), bestemmes antall celler i en separat kontrollplate både ved å telle cellene i en Coulter-teller og ved SRB kolorimetrisk testmetode.
 20 Cellene utsettes deretter for forbindelse A i 2 til 5 dager ved ulike konsentrasjoner og telles deretter. Under disse betingelser inhiberer forbindelse A proliferering av tumorcellene i konsentrasjonsområdet fra 10⁻¹² til 10⁻⁶ M.

Tumorvekststudier in vivo

25 Pelsløse hunnmus som veier 19-22 g holdes i grupper på 5 dyr og har fri tilgang til drikkevann og en patogen-fri gnagerdiett. Subkutane tumorer initieres fra dyrkede AR42J-celler. Behandling påbegynnes 2 til 4 dager etter injisering av tumorcellene, forbindelse A administreres som en kontinuerlig infusjon, for eksempel ved en hastighet på 10 til 50 µg/kg/time. Tumorstørrelsen bestemmes ved klavemål. For statistiske
 30 beregninger anvendes Student's t-test. I dette testsystemet inhiberer forbindelse A tumorvekst på dag 11 med 51 % mot saltvannskontroll.

Forbindelse A er derfor anvendbar for behandling av ondartede sykdommer hvor cellene forøker seg raskt, for eksempel krefttumorer, spesielt tumorer som har
 35 somatostatinreseptorene hvortil den har bindingsaffinitet, for eksempel som beskrevet under for den komplekserte konjugerte forbindelse A.

Forbindelse A har også en hemmende effekt på angiogenese, som indikert i standard-tester, for eksempel i pelsløse mus. Kort, tumorceller ($0,1$ til 10×10^6 i $0,1$ ml) (SiHa-celler og MDA MB-231-celler fremstilt som beskrevet i Angiogenesis, red. ved R. Steiner, P.B. Weisz og R. Langer, 1992, Sveits) injiseres intrakutant. Vanligvis
 5 injiseres to steder midt i buken pr mus som er langt fra hovedårene i buken slik at bakgrunnstallet er lavt. Kontrollgruppene mottar $0,1$ ml $0,02$ % trypan blue i PBS. Etter 10 dagers injeksjon, tas bedøvede mus av dage ved CO_2 -inhalering. Huden monteres på en plastikkring (40 mm diameter) for evaluering ved et invertert mikroskop (Zeiss IM) ved $12,5$ og 25 ganger forstørrelse. Som et mål på angiogenese, fotograferes
 10 årene og de som hører sammen ved tumoren telles. I kontrolldyr telles de årene som hører sammen med et definert område rundt injeksjonsområdet. Dette området korresponderer til gjennomsnittsarealet av de dermale tumorene. Det siste bestemmes ved anvendelse av et mål i henhold til ligningen $3,14 \times r^2$. Forbindelse A administreres s.c. enten på samme dag som tumorinjeksjon eller tre dager senere. Kontrolldyr
 15 behandles med bindemiddel. I dette testsystemet, hemmer forbindelse A dannelsen av blodåre når den administreres ved en dose på for eksempel $0,01$ til 1000 $\mu\text{g/kg}$ s.c.

Forbindelse A er derfor nyttig for forebygging eller behandling av angiogenese, betennelsestilstander som indikert ovenfor som inkluderer betennelsestilstander i et øye,
 20 makulært ødem, for eksempel cystoid makulært ødem, idiopatisk cystoid makulært ødem, eksudatisk aldersrelatert makulær forringelse, korroidale neovaskulæriseringsrelaterte tilstander og proliferativ retinopati.

Forbindelse A har også en hemmende effekt på proliferering og migrering av glatte
 25 muskelceller som indikert i følgende tester.

Kronisk allograft forkastning

Nyren til en hann DA (RT 1^a) rotte transplanteres ortotopisk inn i en hann Lesis (RT 1¹) mottaker. Totalt transplanteres 24 dyr. Alle dyrene behandles med syklosporin A ved
 30 en $7,5$ mg/kg/dag pr os i 14 dager med start på transplantasjonsdagen, for å forhindre akutt cellulær forkastelse. Kontralateral nefrektomi utføres ikke. Hver forsøksgruppe som behandles med en bestemt dose av forbindelse A eller placebo omfatter seks dyr. Start 14 dager etter transplantasjon, behandles mottakeren opptil 112 dager med infusjon med forbindelse A eller mottar placebo. 14 dager etter transplantasjonen måles
 35 organperfusjon ved MRI. Dette gjentas på dagene 53-64 etter transplantasjon og ved slutten av forsøket. Dyrene ble deretter obdusert. Administrering av forbindelse A ved en dose på 10 $\mu\text{g/kg/time}$ i den rottenyreallograftmodellen resulterer i en forbedret organ

prefusjon i tillegg til en reduksjon i kronisk forkastning relatert vaskulær omforming og transplantasjonsinfiltrasjon (cellulær forkastning). Et tydelig og vedholdende fall i IGF-1-nivåer ble også målt. Disse resultatene ble bekreftet i et nytt forsøkssett ved anvendelse av en heterotopisk musehjerte allotransplantasjonsmodell, hvor fordelaktige effekter på vaskulær omforming ble demonstrert i tillegg til i transplantasjonsinfiltrasjon.

Forbindelse A har også blitt testet i en halspulsåretransplantasjonsmodell ved anvendelse av B10.A (2R) (H-2^h) mus som donor og B10.BR (H-2^k) mus som mottakere. Kort, donorhalspulsåren transplanteres paratopisk som en loop over i mottakerens halspulsåre ved en ende-til-side-anastomose. En minipumpe plasseres s.c. straks etter transplantasjonen som leverer forbundelse A ved en hastighet på 50 µg/kg/time. Halspulsåretransplantater høstes etter 30 dager etter transplantasjon for å analysere vaskulær omforming for eksempel ved morfometrisk analyse av Verhoeff elastinfargede parfinutsnitt ved anvendelse av datamaskinassistert system. Denne modellen hemmer forbindelse A neointimal dannelse sammenlignet med ikke-behandlede dyr hvor en massiv neointima dannes.

Angioplasti

Studier av angioplasti utføres i rottemodellen av ballongkateterskade. Ballongkateterisering utføres på dag 0, hovedsakelig som beskrevet av Powell et al. (1989). Under isoflurananestesi, introduserer et Fogarty 2F-kateter inn i venstre halsarterie for å oppnå en uniform de-endotelialisering. Kateteret fjernes deretter, en ligatur plasseres rundt den utvendige halspulsåren for å forhindre blødning og dyrene tillates å komme seg igjen. 2 grupper av 12 RoRo-rotter (400 g, rundt 24 uker gamle) anvendes i forsøket: en kontrollgruppe og en gruppe som mottar forbindelse A og rottene er fullstendig randomisert. Forbindelse A administreres ved kontinuerlig infusjon ved anvendelse av minipumper ved en hastighet på 10 µg/kg/time som starter 2 dager før ballongskade (dag 3) til forsøket er ferdig, 14 dager etter oppsvulmingen. Rottene bedøves deretter med isofluoran og perfiseres med 0,1 M fosfatbufret saltløsning (PBS, pH 7,4) og deretter i 15 minutter med 2,5 % glutaraldehyd i fosfatbuffer (pH 7,4). Halsarterier tas deretter ut, separeres fra omliggende vev og overføres til 0,1 M kakodylatbuffer (pH 7,4) inneholdende 7 % sakkarose og inkuberes over natt ved 4 °C. Den påfølgende dag innkapsles halsarterien i Technovit 7100 i henhold til produsentens anbefaling. Tverrsnittsarealet av mediet, neointima og lumen evalueres morfometrisk ved et bildeanalyseprogram (MCID, Toronto, Canada). I dette testsystemet, hemmer forbindelse A neointimal fortykning signifikant.

Forbindelse A er derfor også nyttig i å hindre eller bekjempe transplantasjonsåre-sykdommer, allo- eller xenotransplantasjon vaskulopatii, for eksempel transplantasjonsåreatrosklerose, for eksempel ved transplantasjon av et organ, for eksempel hjerte, lunge, forenet hjerte-lunge, lever, nyre eller bukspyttkjertel-transplantasjoner, eller for å hindre eller behandle transplantasjonsvenesteno-
5 restenose og/eller vaskulær blokkering som følge av vaskulær skade, for eksempel forårsaket av kateteriseringsprosedyrer eller vaskulære skrapingsprosedyrer slik som perkutan transluminal angioplasti, laserbehandling eller andre invasive metoder som
10 ødelegger integriteten til det vaskulære intima eller endotel.

Forbindelse A har en gunstig halveringstid i plasma. Den har en eliminerings-halveringstid mellom 15 og 30 timer.

15 For alle ovennevnte indikasjoner vil den nødvendige dosen selvfølgelig variere avhengig av, for eksempel, verten, administreringsmåten og alvorlighetsgraden av tilstanden som skal behandles. Generelt, imidlertid, er tilfredsstillende resultater oppnådd ved administrering i området fra 1 µg til 0,7 mg/kg/dag av forbindelse A. En indikert daglig dose for pasienter er i området fra rundt 2 µg til rundt 50 mg, fortrinnsvis
20 rundt 0,01 til rundt 40 mg, for eksempel rundt 0,01 til rundt 3 mg s.c. av forbindelsen administrert i oppdelte doser opptil 3 ganger pr dag i enhetsdoseform som inneholder for eksempel fra rundt 0,5 µg til rundt 25 mg, for eksempel fra rundt 2 µg til 20 mg, for eksempel fra 2 µg til 1,5 mg av forbindelsen A.

25 Forbindelse A kan tilføres i fri form eller i form av et farmasøytisk egnet salt eller komplekser. Slike salter og komplekser kan fremstilles på konvensjonell måte og innehar den samme orden av aktivitet som den frie forbindelsen. Foreliggende oppfinnelse fremskaffer i tillegg en farmasøytisk sammensetning som omfatter forbindelse A på fri baseform eller på en egnet farmasøytisk saltform eller kompleks
30 form, sammen med en eller flere farmasøytisk egnet fortynner eller bærer. Slike sammensetninger kan formuleres på konvensjonell måte. Forbindelse A kan også administreres over lang tid, for eksempel i form av implantater, mikrokapsler, mikrokuler eller nanokuler som omfatter for eksempel en biodegraderbar polymer eller kopolymer, på form av en liposomal formulering, eller på form av en autogel, for
35 eksempel et fast stoff eller semi-fast stoff sammensetning som er i stand til å danne en gel etter interaksjon med pasientens kroppsvæsker.

Forbindelse A eller et farmasøytisk egnet salt eller kompleks derav kan administreres på enhver konvensjonell måte, for eksempel parenteralt for eksempel på form av injiserbare løsninger eller suspensjoner (inkluderende for eksempel over lang tid som indikert ovenfor), oralt ved anvendelse av en konvensjonell absorpsjonsforøker, på en
 5 nasal eller stikkpilleform eller topisk, for eksempel på form av en øyevæske, gel, salve eller suspensjonsfremstilling, for eksempel en liposomal, mikrokule eller nanokule-formulering, for eksempel for inndrypping eller subkonjunktival eller intra- eller peri-okulare injeksjoner.

10 I henhold til det foregående fremskaffer foreliggende oppfinnelse videre:

1. Forbindelse A eller et farmasøytisk egnet salt eller kompleks derav for anvendelse som et legemiddel;
2. En anvendelse av forbindelse A for fremstilling av et medikament for
 15 behandling av sykdommer eller tilstander som indikert ovenfor i et kasus i behov av slik behandling, som omfatter administrering til nevnte kasus en effektiv mengde av forbindelse A eller et farmasøytisk egnet salt eller kompleks derav; eller
- 20 3. Forbindelse A eller et farmasøytisk egnet salt eller kompleks derav for anvendelse i fremstilling av en farmasøytisk sammensetning for benyttelse i definert under 2. ovenfor.

Den konjugerte forbindelse A eller et farmasøytisk egnet salt derav er nyttig enten som
 25 et diagnostisk middel via bildebehandling, for eksempel visualisering av somatostatin-reseptorpositivt vev og celler, for eksempel somatostatinreseptorpositive tumorer og metastaser, inflammatoriske eller autoimmune tilstander som har somatostatin-reseptorer, tuberkulose eller organforkastning etter transplantasjon, når kompleksert med et påviselig grunnstoff, for eksempel et γ eller posisjonemitterende nuklid, et
 30 fluoriserende metallion eller et paramagnetisk ion, for eksempel ^{111}In , ^{161}Tb , ^{177}Lu , ^{86}Y , ^{68}Ga Eu^{3+} , Gd^{3+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} eller Cr^{2+} , eller som et radiolegemiddel for behandling in vivo av somatostatinreseptorpositive tumorer og metastaser, rheumatoid artritt og alvorlige inflammasjonstilstander når kompleksert med en α - eller β -emitterende nuklid eller et nuklid med Auger- e^- -kaskader, for eksempel ^{90}Y , ^{161}Tb , ^{177}Lu , ^{211}At , ^{213}Bi eller
 35 ^{201}Tl , som indikert ved standardtester.

Spesielt, er det observert at den konjugerte forbindelse A binder til somatostatin-reseptorer med pKi-verdier på fra rundt 8 til 10. Forbindelsen fra eksempel 3 kompleksert med for eksempel ^{111}In , ^{88}Y , ^{90}Y eller ^{177}Lu bider i nM-området til de respektive sst-undergrupper i henhold til bindingsprofilen til forbindelse A.

5

Affiniteten til den konjugerte forbindelse A og dens komplekser for somatostatin-reseptorer kan også vises ved in vivo-testing, i henhold til standard testmetoder, for eksempel som beskrevet i GB-A-2,225,579. For eksempel gir forbindelsen fra eksempel 3 kompleksert med for eksempel ^{111}In , ^{88}Y , ^{90}Y eller ^{177}Lu , en signifikant tumorakkumulering 4 timer etter injeksjon inn i mus eller rotter som har en eksokrin pankreatisk tumor som uttrykker hst2-reseptorer.

10

Etter administrering av konjugert forbindelse A på kompleksert form, for eksempel en ^{111}In , ^{177}Lu , ^{86}Y eller ^{161}Tb kompleksert forbindelse A, i en dose på fra 1 til 5 $\mu\text{g/kg}$ merket med 0,1 til 5 mCi radionuklid, fortrinnsvis 0,1 til 2 mCi blir tumoren påviselig.

15

Den konjugerte forbindelse A radiomerket med en α - eller β -emitterende radionuklid eller et nuklid med Auger- e^- -kaskader fremviser en antiproliferativ og/eller cytotoxisk effekt på tumorceller med somatostatinreseptorer, for eksempel som indikert i tester med mus uten pels.

20

Disse musene injiseres med AR42J-rottepankreatiske tumorceller eller NCI-H69 humane småcelle lungekreftceller som beskrevet ovenfor. Når tumorer har nådd et volum på 1 til 2 cm^3 ble dyrene randomisert i kontroll- og behandlingsgruppe. Konjugert forbindelse A på kompleks form administreres ved i.p. eller i.v. injeksjoner. Doser opptil 40 mCi/kg gis pr mus. Størrelsen på tumorene bestemmes med nåler som beskrevet ovenfor. For statistiske beregninger anvendes Student's t-test. I denne testen, observeres transient tumorreduksjon opptil 50 % av initiell størrelse etter en uke og tumorvekst forsinkes i to uker ved en enkel påføring av forbindelsen fra eksempel 3 kompleksert med 90 Y. På den annen side viste kontrollgruppene kontinuerlig tumorvekst med en doblingstid av volum på rundt sju dager.

30

I henhold til dette, en serie av spesifikke eller alternative utforminger, fremskaffer foreliggende oppfinnelse også:

35

4. Anvendelse av en konjugert forbindelse A kompleksert med et påviselig grunnstoff for in vivo-bestemmelse av somatostatin-reseptorpositive celler og vev,

for eksempel somatostatinreseptorpositive tumorer og metastase, i et kasus og bestemmelse av lokalisering av reseptorene ved nevnte kompleks;

5. Metode for in vivo-deteksjon av somatostatinreseptorpositive vev og celler, for eksempel somatostatinreseptorpositive tumorer av metastase, i et kasus som omfatter administrering til nevnte kasus et konjugert forbindelse A kompleksert med et påviselig grunnstoff, eller en farmasøytisk egnet saltform, og dokumentering av lokalisering av reseptorene utpekt av nevnte kompleks.
- 10 Den konjugerte forbindelse A på kompleksert form for anvendelse som et imaging-middel kan administreres for eksempel intravenøst, for eksempel på form av injiserbare løsninger eller suspensjoner, fortrinnsvis på form av en enkeltinjeksjon. Radiomerking utføres fortrinnsvis kort før administrering til et kasus.
- 15 I dyr kan et indikert doseområde være fra 0,01 til 1 µg/kg av en konjugert forbindelse A kompleksert med 0,02 til 0,5 mCi γ-emitterende radionuklid. I større pattedyr, for eksempel mennesker, kan et indikert doseområde være fra 1 til 100 µg/m² konjugert forbindelse A kompleksert for eksempel med 1 til 100 mCi/m² påviselig grunnstoff, for eksempel ¹¹¹In, ⁸⁶Y eller ¹⁷⁷Lu.
- 20 6. Anvendelse av en konjugert forbindelse A kompleksert med en α- eller β-emitterende nuklid eller et nuklid med Auger-e⁻-kaskade, for in vivo-behandling av somatostatinreseptor positive tumorer og metastaser.
- 25 7. Metode for in vivo-bestemmelse av somatostatinpositive tumorer og metastaser, for eksempel for behandling av invasivgraden av slike tumorer eller assosiert med slik tumorvekst, i et kasus i behov av slik behandling som omfatter administrering til nevnte kasus en terapeutisk effektiv mengde av en konjugert forbindelse A kompleksert med et α- eller β-emitterende nuklid eller et nuklid med Auger-e⁻-kaskade.
- 30 8. Anvendelse av en konjugert forbindelse A eller et farmasøytisk egnet salt derav i fremstilling av et imaging-middel eller en radiofarmasøytisk sammensetning.
- 35 Anvendte doser ved praktisering av den radioterapeutiske anvendelse av foreliggende oppfinnelse vil selvfølgelig variere avhengig av for eksempel den spesielle tilstanden som skal behandles, for eksempel den kjente radiotoksisiteten til normale organer som

uttrykker somatostatinreseptorer, tumorvolumet og den ønskede terapi. Generelt, beregnes dosen på basis av farmakokinetikk og radioaktivitetsfordelingsdata funnet i friske organer og basert på det observerte måloptaket. Et β -emitterende kompleks av en konjugert forbindelse A kan administreres flere ganger for eksempel over en periode på 1 til 3 måneder.

I dyr kan et indikert doseområde være fra 20 til 100 μg pr kilo konjugert forbindelse A kompleksert med 15 til 70 mCi av en α - eller β -emitterende nuklid eller et nuklid med Auger- e^- -kaskader, for eksempel ^{90}Y , ^{177}Lu eller ^{161}Tb . I større pattedyr, for eksempel mennesker, kan et indikert doseområde være fra 1 til 100 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ konjugert forbindelse A kompleksert for eksempel med 1 til 100 mCi/ m^2 av et α - eller β -emitterende nuklid eller et nuklid med Auger- e^- -kaskader, for eksempel ^{90}Y , ^{177}Lu eller ^{161}Tb .

Den konjugerte forbindelse A i kompleksert form for anvendelse som et radioterapeutisk middel kan administreres ved enhver konvensjonell metode, for eksempel intravenøst, for eksempel på form av injiserbare løsninger. Den kan med fordel også administreres ved infusjon, for eksempel en infusjon over 15 til 60 minutter. Avhengig av lokalisering av tumoren, kan den administreres så nær som mulig til stedet hvor tumoren sitter, for eksempel ved hjelp av et kateter. Foreliggende oppfinnelse fremskaffer også en farmasøytisk sammensetning som omfatter en konjugert forbindelse A på fri baseform eller på farmasøytisk egnet saltform eller kompleksert med et påviselig eller radioterapeutisk middel, sammen med en eller flere farmasøytisk egnede fortynningsmidler eller bærere.

Forbindelse A eller den konjugerte forbindelse A på kompleksert form kan være egnet for imaging eller behandling av somatostatinreceptor uttrykkende eller akkumulerende tumorer slik som hypofyse, gastro-enteropankreatisk, karcinoider, sentrale nervesystem, bryst, prostata (inkluderende fremskreden hormon-motstandsdyktig prostatakreft), eggstokk eller tykktarmstumorer, småcelle lungekreft, ondartet bukobstruksjon, paragangliomas, nyrekreft, hudkreft, neuroblastomer, feokromcystomer, marg-skjold-bruskkjertelkarcinomer, myelomer, lymfomer, Hodgkins og non-Hodgkins lymfomer, bentumorer og metastaser derav, i tillegg til autoimmun- eller inflammatoriske sykdommer, for eksempel rheumatoid artritt, Graves sykdom eller andre inflammatoriske øyesykdommer.

I henhold til et ytterligere aspekt av oppfinnelsen, fremskaffes det en farmasøytisk sammensetning som omfatter en konjugert forbindelse A eller et kompleks derav

sammen med en eller flere farmasøytisk egnede bærere eller fortynningsmidler. Slike sammensetninger kan fremstilles på konvensjonell måte og kan presenteres, for eksempel for imaging, på form av et kit som omfatter to separate doser, hvor en er radionuklidet og den andre den konjugerte forbindelse A, med instruksjoner for hvordan de skal blandes. For radioterapi, kan den konjugerte forbindelse A på kompleksert form fortrinnsvis være på form av en varm væskeformulering.

Forbindelse A eller en konjugert forbindelse A på kompleksert form kan administreres som den eneste aktive forbindelse eller sammen med, for eksempel som et hjelpemiddel til, andre legemidler. For eksempel kan forbindelse A anvendes sammen med et immunundertrykkende middel, for eksempel en kalsineurinhemmer, for eksempel syklosporin A eller FK 506; et makrosyklisk lakton med immunundertrykkende egenskaper, for eksempel rapamycin eller 40-O-(2-hydroksyetyl)-rapamycin (RAD); en ascomycin med immunundertrykkende egenskaper, for eksempel ABT-281, ASM981, osv; kortikosteroider; syklofosfamid; azatiopren; metotreksat; leflunomid; mizoribin; mykofenolsyre eller et salt derav, for eksempel Myfortic®; fykofenolatmofetil; 15-deoksyspergualin eller en immunundertrykkende homolog, analog eller derivat derav; et akselererende lymfosittmiddel, for eksempel FTY720; immunundertrykkende monoklonale antistoffer, for eksempel monoklonale antistoffer mot leukosytreseptorer, for eksempel MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD25, CD28, CD40, CD45, CD58, CD80, CD86 eller til deres ligander; andre immunomodulerende forbindelser, for eksempel et rekombinant bindingsmolekyl som har minst en del av det ekstracellulære domenet av CTLA4 eller en mutant derav, for eksempel minst en ekstracellulær del av CTLA4 eller en mutant derav bundet til en ikke-CTFA4 proteinsekvens, for eksempel CTLA4lg (for eksempel betegnet ATCC 68629) eller en mutant derav, for eksempel LEA29Y; adhesjonsmolekylhemmende, for eksempel LFA-1-antagonister, ICAM-1 eller -3 antagonister, VCAM-4-antagonister eller VLA-4, antagonister. Forbindelse A kan også anvendes sammen med et antiinflammatorisk middel, et GH-reseptormodulerende middel, for eksempel ghrelin eller heksarhelin, en GH-reseptorantagonist, for eksempel pegvisomant, en insulinstimulator eller økning av insulinutskillelse, for eksempel en sulfonyl urea, for eksempel tolbutamid, klorpropamid, tolazamid, acetoheksamid, 4-kloro-N-[(1-pyrolidinylamino)karbonyl]-benzensulfonamid(glykopyramid), glibenklamid (glyburid), gliclazid, 1-butyl-3-metanylurea, karbutamid, glibonurid, glipizid, glikidon, glisoekspid, lybutiazol, glibuzol, glyheksamid, glymidin, glypinamid, fenbutamid eller tolylsyklamid, en kortvirkende ikke-sulfonyl urea, et oralt insulinotrofisk middeldderivat, for eksempel en kortvirkende insulinforsterker, for eksempel meglitinid, repaglinid, et

fenyleddiksyrederivat, for eksempel nateglinid, en DPP IV-hemmer, for eksempel 1-{2-[5-cyanopyridin-2-yl]amino}etyl-amino}acetyl-(2S)-cyano-pyrolidindihydroklorid, LAF237, GLP-1 eller en GLP-1-agonistanalog, en insulinsensibiliserer, for eksempel en peroksisomproliferatoraktivert reseptor γ -agonist (PPAR γ), for eksempel et glitazon, for eksempel (S)-((3,4-dihydro-2-(fenylmetyl)-2H-1-benzopyran-6-yl)metyl-tiazolidin-2,4-dion (englitazon), 5-{[4-(3-(5-metyl-2-fenyl-4-oksazolyl)-1-oksopropyl)-fenyl]metyl}-tiazolidin-2,4-dion (darglitazon), 5-{[4-(1-metyl-sykloheksyl)metoksy]-fenyl]metyl}-tiazolidin-2,4-dion (ciglitazon), 5-{[4-(2-(1-indolyl)etoksy)fenyl]metyl}-tiazolidin-2,4-dion (DRF2189), 5-{4-[2-(5-metyl-2-fenyl-4-oksazolyl)-etoksy]}benzyl}-tiozolidin-2,4-dion (BM-13.1246), 5-(2-naftylsulfonyl)-tiazolidin-2,4-dion (AY-31637), bis{4-[(2,4-diokso-5-tiazolidinyl)-metyl]fenyl}metan (YM268), 5-{4-[2-(5-metyl-2-fenyl-4-oksazolyl)-2-hydroksyetoksy] benzyl}-tiazolidin-2,4-dion (AD-5075), 5-[4-(1-fenyl-1-syklopropankarbonylamino)-benzyl]-thiazolidin-2,4-dion (DN-108) 5-{[4-(2-(2,3-dihydrolindol-1-yl)etoksy)fenyl]metyl}-tiazolidin-2,4-dion, 5-[3-(4-kloro-fenyl)]-2-propynyl]-5-fenylsulfonyl)tiazolidin-2,4-dion, 5-[3-(4-klorofenyl)]-2-propynyl]-5-(4-fluorfenylsulfonyl)tiazolidin-2,4-dion, 5-{[4-(2-(metyl-2-fyrodinyl-amino)-etoksy)fenyl]metyl}-tiazolidin-2,4-dion (rosglitazon), 5-{[4-(2-(5-etyl-2-pyridyl)etoksy)fenyl]-metyl}tiazolidin-2,4-dion (pioglitazon), 5-{[4-((3,4-dihydro-6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametyl-2H-1-benzopyran-2-yl)metoksy)-fenyl]-metyl}-tiazolidin-2,4-dion (troglitazon), 5-[6-(2-fluor-benzyl)oksy]naftalen-2-ylmetyl]-tiazolidin-2,4-dion (MCC555), 5-{[2-(2-naftyl)-benzoksazol-5-yl]-metyl}tiazolidin-2,4-dion (T-174) eller 5-(2,4-dioksotiazolidin-5-ylmetyl)-2-metoksy-N-(4-trifluormetyl-benzyl)benzamid (KRP297), en ikke-glitazontype slik som en N-(2-benzoylfenyl)L-tyrosinanalogue, for eksempel GI-262570, eller et oksolidindion, for eksempel JTT501, en todelt PPAR γ /PPAR α -agonist, for eksempel DRF-554158, NC-2100 eller NN-622, en retinoid X reseptor-agonist eller et reksinoid, for eksempel 2-[1-(3,5,5,8,8-pentametyl-5,6,7,8-tetrahydro-2-naftyl)syklopropyl]-pyridin-5-karboksytsyre, 4-[(3,5,5,8,8-pentametyl-5,6,7,8-tetrahydro-2-naftyl)-2-karbonyl]-benzosyre, 9-cis retinosyre eller en analog, derivat eller et farmasøytisk egnet salt derav, en proteintyrosinfosfatase kinase 1B, en glukogen syntase kinase-3-hemmer, et lite ikke-peptidisk molekyl som indikerer insulin, for eksempel L-783,281 eller CLX-901, eller en lav dose insulin, et glutamin: fruktose-6-fosfat amidotransferasehemmer, en glukose-6-fosfatasehemmer, et biguanid, for eksempel Metformin, en fruktose-1,6-bifosfatasehemmer, en glykogen fosforylasehemmer, for eksempel CP-91149, en glukagonreseptorantagonist, for eksempel CP-99711, NNC 92-1687, L-168,049 eller BAY27-9955, en fosfoenolpyruvatkarboksykinase, en pyruvatdehydrogenasekinasehemmer, en α -Glukosidasehemmer, for eksempel 4'',6''-dideoksy-4''-[(S-(1,4,6/5)-4,5,6-trihydroksy-3-hydroksymetyl-2-

syklo-heksylamino} maltotriose eller O-4,6-dideoksy-4-{[1S,4R,5S,6S]-4,5,6-trihydroksey-3-(hydroksymetyl)-2-sykloheksen-1-yl]-amino}- α -D-glukopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-O- α -D-glukopyranosyl-(1,4 $\rightarrow$)-D-glukopyranose (acarbose), N-1,3-dihydroksey-2-propyl)valiolamin (voglibose) eller miglitol, eller en maveetømmende hemmer, for eksempel GLP-1, CCK-8 og amyling (for eksempel Pramlintid), et middel som har antiangiogenetiske virkninger, for eksempel et benzoprfyrin, for eksempel verteporfin, midostaurin eller et 4-pyridylmetyl-ftalasin.

Forbindelse A eller en konjugert forbindelse A på kompleksert form kan også anvendes sammen med et antiprolifererende middel, for eksempel et kjemoterapeutisk legemiddel, for eksempel paclitaxel, gencitabin, cisplatinum, doksorubicin, 5-fluorasil eller taksol, et hormonelt middel eller antagonist, for eksempel et antiandrogen eller mitoksantron (spesielt i tilfelle av prostatakreft), eller et antiøstrogen, som letrosol (spesielt i tilfelle av brystkreft), en antimetabolitt, et plantealkaloid, en modifikator av biologisk respons, fortrinnsvis et lymfokin eller interferoner, en hemmer av proteintyrosinkinase og/eller serin/tereoninkinase, eller et middel med andre eller ukjent virkningsmekanisme, for eksempel ethvert epotilon eller epotilonderivat, eller et makrosyklisk lakton, for eksempel rapamysin, RAD eller CCI779.

Hvor forbindelse A eller en konjugert forbindelse A på kompleksert form administreres sammen med et annet legemiddel, vil dosene til det koadministrerte legemiddelet selvsagt variere avhengig av type kolegemiddel som anvendes, av de spesifikke legemidlene anvendt, av tilstanden som skal behandles, og så videre. Begrepene "koadministrering" eller "forent administrering" eller lignende som benyttet heri er ment å omfatte administrering av de utvalgte terapeutiske midler til en enkelt pasient, og er ment å inkludere behandlingsregimer hvor midlene ikke nødvendigvis administreres ved samme administreringsmetode eller samtidig.

I henhold til det foregående fremskaffer foreliggende oppfinnelse i et atter ytterligere aspekt:

9. En farmasøytisk kombinasjon som omfatter a) et første middel som er forbindelse A eller en konjugert forbindelse A på kompleksert form og b) et ko-middel, for eksempel som definert ovenfor.
10. Metode som definert ovenfor som omfatter koadministrering, for eksempel samtidig eller etter hverandre, av en terapeutisk effektiv mengde av forbindelse

A eller en konjugert forbindelse A på kompleksert form, og et annet legemiddel, nevnte andre legemiddel er, for eksempel som indikert ovenfor.

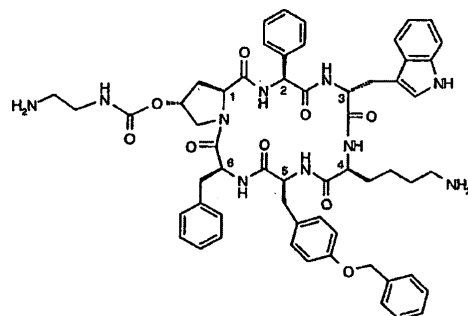
Den spesielle sammensetning av foreliggende oppfinnelse vil selekteres avhengig av
5 forebygging eller behandling av sykdommer eller tilstander; for eksempel en
sammensetning med et immunundertrykkende middel for eksempel forebygging eller
behandling av kronisk transplantasjonsforkastning, en sammensetning med en
insulinøker, insulinutskillelsesforøker, insulinsensibiliserer eller en lav dose av insulin i
behandling av diabetes eller komplikasjoner derav, en sammensetning med et anti-
10 inflammatorisk middel for forebyggelse eller behandling av inflammatoriske
sykdommer eller tilstander, en sammensetning med et middel som har antiangiogenetisk
virkning for forebyggelse eller behandling av for eksempel makulært ødem eller
forringelse eller i kreft, en sammensetning med et kjemoterapeutisk middel for
anvendelse i kreft.

P a t e n t k r a v

1.

Forbindelse med formel

5



n av aminogruppene er eventuelt beskyttet, eller et salt eller kompleks derav.

10 2.

Forbindelse i henhold til krav 1 i ubeskyttet form, i saltform.

3.

Forbindelse i henhold til krav 2 som et mono- eller disalt.

15

4.

Forbindelse i henhold til krav 3 på form av et acetat, benzoat, aspartat eller pamoatsalt.

5.

20 Fremgangsmåte for fremstilling av en forbindelse i henhold til krav 1, k a r -
a k t e r i s e r t v e d at den omfatter syklisering av et lineært peptid
på beskyttet, polymerbundet eller ubeskyttet form på en slik måte at den ønskede
forbindelse oppnås og beskyttelsesgruppen(e) fjernes eventuelt deretter og gjenvinning
av den ønskede forbindelse oppnås deretter, på fri eller saltform.

25

6.

Forbindelse i henhold til krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at
sidekjedeaminogruppen til Pro er konjugert til et chelaterende middel, eventuelt
kompleksert med et påviselig eller et radioterapeutisk grunnstoff.

30

7.

Farmasøytisk sammensetning k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter en forbindelse i henhold til krav 1 eller et farmasøytisk egnet salt derav, i assosiasjon med ett eller flere farmasøytisk egnede fortynningsmidler eller bærere
5 derfor.

8.

Farmasøytisk sammensetning i henhold til krav 7, k a r a k t e r i - s e r t v e d at den frigjøres over lang tid eller som en topisk formulering.

10

9.

Farmasøytisk sammensetning i henhold til krav 7, k a r a k t e r i - s e r t v e d at den anvendes sammen med et immunundertrykkende middel, et antiinflammatorisk middel, et GH-"secretagogue" reseptormodulerende middel, en GH-reseptorantagonist, en insulin "secretagogue", en insulin-utskillelsesforsterker,
15 en insulinsensibilisator, en lav dose av insulin, et middel med antiangiogenetisk virkninger eller et kjemoterapeutisk middel.

10.

20 Anvendelse av en forbindelse i følge krav 1, for fremstilling av et medikament for behandling av sykdommer med en etiologi som omfatter eller er assosiert med overskudd GH-sekresjon og/eller overskudd av IGF-1 og andre metabolske sykdommer relatert til insulin eller glukagon frigivelse, enterokutant og pankreatiskcutanøs fistula, irritabelt tarmsyndrom, inflammatoriske tilstander og sykdommer, polycystisk
25 nyresykdom, dumpingsyndrom, vandig diaré-syndrom, AIDS-relatert diaré, kjemoterapeutisk indusert diaré, akutt eller kronisk pankreatitt, mave-tarmblødning, tumorer og maligniteter, angiogenese, makulært ødem, korroidal neo-vaskularisering relaterte tilstander, proliferativ retinopati, transplantasjonsåresykdommer, transplantasjonsvenestenose, restenose og vaskulær blokkering etter vaskulær skade.

30

11.

Anvendelse av en forbindelse i følge krav 1, for fremstilling av et medikament for behandling av acromegali.

35 12.

Anvendelse av en forbindelse i følge krav 1, for fremstilling av et medikament for behandling av magetarm hormonsekreterende tumorer.

13.

Anvendelse i følge krav 12, der den mægetarm hormonsekreterende tumoren er en carcinoid tumor.