

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **238779**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **419612**

(22) Data zgłoszenia: **28.11.2016**

(51) Int.Cl.

C07K 5/107 (2006.01)

A61K 38/07 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

(54) **Peptydomimetyki i ich zastosowanie w terapii nowotworowej jelit
oraz w zapewnieniu ich prawidłowej perystaltyki**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
04.06.2018 BUP 12/18

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
04.10.2021 WUP 27/21

(73) Uprawniony z patentu:

**INSTYTUT HOMEOSTAZY
SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ
ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ, Warszawa, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**ANDRZEJ WOJCIECH LIPKOWSKI,
Warszawa, PL
ALEKSANDRA MISICKA-KĘSIK, Pruszków, PL
KRZYSZTOF RÓŻYCKI, Warszawa, PL
PIOTR SOSNOWSKI, Czerwin, PL
ANNA KATARZYNA PUSZKO, Warszawa, PL
ANNA LASKOWSKA, Pruszków, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Rafał Witek

PL 238779 B1

Opis wynalazku

Przedmiot wynalazku stanowią analogi peptydomimetyków nadające się do stosowania w terapii nowotworów jako antagonistów leków opioidowych oraz zastosowanie tych związków w terapii nowotworów jelit. Opisane związki wykazują efekt cytostatyczny i cytotoksyczny w stosunku do komórek nowotworów jelit, wykazują powinowactwo do receptorów μ i δ a działają jako antagoniści leków opioidowych. Przeznaczone są do podawania przez układ pokarmowy, w postaci tabletek, wlewów, zastrzyków lub implantów, w leczeniu i wspomaganiu terapii nowotworów jelit oraz zapewnieniu prawidłowej perystaltyki jelit przy przyjmowaniu opioidów.

Stan techniki

Związkami powszechnie stosowanymi w leczeniu raka jelit, jak i innych rodzajów nowotworów są fluoropirymidyny, na czele z 5-fluorouracilem (5-FU). Preparat ten często podawany jest z leukoworyną w postaci iniekcji bolusowej bądź w formie ciągłego wlewu dożylnego (Humeniuk R., et. al., 2009). 5-FU często stosowany jest w chemoterapii w połączeniu z innymi lekami, jak oksaliplatyna, która osłabia replikację DNA i indukuje apoptozę komórkową (Raymond E., Faivre S., et. al., 1998; Raymond E., Chaney S. G., et. al., 1998), czy irynotekan, hamujący działanie topoizomerazy I (Akhtar R., et. al., 2014). Popularnym związkiem farmakologicznym stosowanym w terapii nowotworów jelita jest też kapecytabina podawana doustnie i wchłaniania przez błonę śluzową przewodu pokarmowego (Pentheroudakis G., et. al., 2002).

Bardzo często terapiom leczenia nowotworów towarzyszą leki przeciwbólowe, stosowane we wszystkich stadiach rozwoju guza o sile rosnącej wraz z zaawansowaniem choroby. W szczególności ciężkich przypadkach, gdy leczenie operacyjne bądź farmakologiczne przestaje być skuteczne lub nie jest możliwe, terapia ogranicza się w zasadzie jedynie do uśmierzania bólu w ostatnich dniach życia pacjenta. Grupę najsilniejszych leków opioidowych od lat tworzą określone związki, wśród których jedynym z najczęściej stosowanych jest morfina.

Silna aktywność przeciwbólowa morfiny sprawia, że jest to środek powszechnie stosowany w terapii wszelkiego rodzaju nowotworów. Środowiska naukowe podjęły jednak nowe tematy badań, analizując również wpływ morfiny na same nowotwory. Do chwili obecnej wyniki nie są jasne. Dowiedziono m.in., że morfina w dawkach istotnych klinicznie przyspieszała wzrost nowotworu piersi u modeli mysich (Bimonte S., et. al., 2015; Nguyen J., et. al., 2014); było to związane z przyspieszoną angiogenezą, zahamowaniem apoptozy i progresją cyklu komórkowego (Farooqui M., et. al., 2007). Podobne wnioski wyciągnięto z doświadczeń na mysich modelach mięsaka i białaczki (Ishikawa M., et. al., 1993). W badaniach *in vitro* i *in vivo* stwierdzono ponadto, że wzrostowi guza sprzyjać może sporadyczne aplikowanie dużych dawek morfiny lub długotrwałe jej podawanie w małych dawkach (Zong J., et. al., 2000). Co więcej, morfina hamować może apoptozę komórek rakowych (Lin X., et. al., 2007) bądź indukować wzrost guza poprzez zwiększenie ekspresji cyklooksygenazy-2 (COX-2) (Farooqui M., et. al., 2006; Salvemini D., et. al., 1993; Arerangaiah R., et. al., 2007; Nédélec E., et. al., 2001) i/lub stymulowanie angiogenezy za pośrednictwem prostaglandyny E2 (Chang S. H., et. al., 2004; Griffin R. J., et. al., 2002; Salvemini D., et. al., 1994; Leahy K. M., et. al., 2002).

Celem wynalazku jest dostarczenie nowych związków nadających się do leczenia i zapobiegania nowotworu jelit i jednocześnie wypierające opioidy z receptorów opioidowych w przewodzie pokarmowym i przywracające/utrzymujące motorykę jelit podczas podawania morfiny.

Szczególnym celem wynalazku było jednoczesne zniwelowanie negatywnych efektów towarzyszących u chorych przyjmujących morfinę w ramach terapii przeciwbólowej podczas leczenia antynowotworowego a także leczenia nowotworów w obszarze jelit. W przypadku tych chorób około 75% pacjentów wymaga stałego leczenia przeciwbólowego. Ponadto, leczenie bólu przewlekłego związane jest z szybkim rozwojem tolerancji na lek, co powoduje konieczność zwiększania dawek analgetyków, a to z kolei może powodować nasilenie się skutków ubocznych ich stosowania [Hiliger M. Współczesna onkologia 2001; 5(4): 168–174]. Niektóre analgetyki opioidowe, tj. morfina, wykazują także działanie stymulujące proliferację nowotworów [Farooqui M, Li Y, Rogers T et al., British Journal of Cancer 2007; 97(11): 1523–1531] co obniża skuteczność stosowanej terapii antynowotworowej.

Istota wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest związek wybrany spośród:

tyrozylo-D-alanylo-glicylo-feniloalanylo-cynamylopiperydzyny (TyrDAlaGlyPheCyn),
tyrozylo-D-alanylo-glicylo-tryptofylo-cynamylopieparydzyny (TyrDAlaGlyTrpCyn),
tyrozylo-D-treonylo-glicylo-feniloalanylo-cynamylopiperydzyny (TyrDThrGlyPheCyn),
tyrozylo-D-treonylo-glicylo-tryptofylo-cynamylopieparydzyny (TyrDThrGlyTrpCyn),
lub ich farmaceutycznie dopuszczalnych soli.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest związek określony powyżej do stosowania w leczeniu lub zapobieganiu nowotworu jelita.

Korzystnie, związek do stosowania według wynalazku jest stosowany w postaci przeznaczonej do podawania doustnego, iniekcyjnego lub dożylnego. Korzystnie, w postaci doustnej tabletki do podawania bezpośrednio do układu pokarmowego lub wlewu dożylnego do podawania obwodowego lub zastrzyku do iniekcji guza i jego okolic.

Korzystnie, związek do stosowania według wynalazku jest stosowany w postaci wielolekowej kompozycji farmaceutycznej, zwłaszcza zawierającej dodatkowo opioid o działaniu przeciwbólowym i/lub lek przeciwnowotworowy.

Korzystnie, związek do stosowania według wynalazku jest przeznaczony do stosowania w klasycznej chemioterapii raka jelit prowadzonej przedoperacyjnie (terapia neo-adiuwantowa) lub pooperacyjnie (terapia adiuwantowa) lub w chemioterapii nieoperacyjnego raka jelita lub w jej wspomaganiu lub jest przeznaczony do stosowania w leczeniu innych nowotworów do zabezpieczania jelit przed przerzutem do nich nowotworu pierwotnie pochodzącego z innej tkanki.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest związek określony powyżej do stosowania w terapii przeciwbólowej jako antagonistą leków opioidowych.

Korzystnie, jest on przeznaczony do podawania doustnego lub obwodowego w celu eliminowania zapałów wywołanych przez leki opioidowe. Równie korzystnie, jest przeznaczony do oddziaływania na receptory opioidów. Równie korzystnie, jest stosowany w postaci doustnej tabletki do podawania bezpośrednio do układu pokarmowego, lub wlewu dożylnego do podawania obwodowego. Równie korzystnie, jest stosowany w postaci wielolekowej kompozycji farmaceutycznej, korzystnie zawierającej opioid stosowany w terapii przeciwbólowej. Równie korzystnie, jest stosowany w postaci kompozycji zawierającej polimer stanowiący nośnik substancji aktywnej.

Nieoczekiwanie okazało się, że związki według wynalazku oprócz właściwości antagonistycznych względem opioidów wykazują działanie cytostatyczne i cytotoksyczne względem komórek nowotworowych jelit. Wykazano również, że wykazują one działanie cytostatyczne i cytotoksyczne w stosunku do komórek nowotworowych jelit, a także mają powinowactwo do receptorów opioidowych będąc antagonistami leków opioidowych. Tym samym wynalazek łączy efekt zabezpieczenia jelit przed niekorzystnym oddziaływaniem opioidów na motorykę a także jest pomocny w terapii ich nowotworów jelit lub prewencji w ich rozwoju np. w wyniku przerzutu do jelit.

Szczegółowy opis wynalazku

Ogólnie, wynalazek dotyczy peptydomimetyków nadających się do stosowania w leczeniu i profilaktyce nowotworów jelita.

Podczas poszukiwania nowych peptydomimetyków opioidów, które powinny wykazywać wysokie powinowactwo do receptorów opioidowych, szczególnie receptorów opioidowych mu, a jednocześnie działać jako antagonistą wobec leków opioidowych, takich jak morfina, fentanyl lub peptydów opioidowych, takich jak enkefalina lub bialina, nieoczekiwanie okazało się, że uzyskane peptydowe analogi opioidów wykazują również działanie cytotoksyczne w stosunku do komórek nowotworowych jelit. Działanie to przejawia się zarówno poprzez efekt cytostatyczny i uśmiercanie komórek nowotworowych jak też poprzez rozluźnienie struktur guza i ułatwianie wnikania innych substancji czynnych do wnętrza guza.

Poniższe przykłady ilustrują efekt cytostatyczny i cytotoksyczny w stosunku do komórek nowotworu jelit wywołany zgodnie z wynalazkiem. Przedstawiono także przykłady oddziaływania z receptorami opioidowymi.

Peptydomimetyki według wynalazku mogą być uzyskane metodami znanymi ze stanu techniki, w szczególności sposobem opisanym w treści polskiego zgłoszenia patentowego numer P.402324. Podane poniżej opisy syntezy przykładowych peptydomimetyków mogą być łatwo zaadoptowane przez specjalistę do uzyskiwania dowolnego związku według wynalazku,

a) chlorowodorek tyrozylo-D-alanylo-glicylo-cynamonylopiperazyny

Trans-1-cynamonylo piperazynę acylowano t-Boc-Tyr-D-Ala-Gly, przy użyciu N,N-dicykloheksylokarbodiimidu za pomocą metody sprzęgania N-hydroksysukcynimidu w roztworze N,N-dimetyloformamidu. Po odsączeniu N, N'-dicykloheksylomocznika, surowy produkt pośredni został wytrącony wodą. Osad przemywano trzy razy wodą i wysuszono. T-butyloksykarbonylową grupę ochronną usunięto z użyciem 5% chlorowodoru w octanie etylu. Surowy produkt końcowy w postaci soli (chlorowodorku) wytrącano eterem etylowym. Surowy produkt oczyszczono za pomocą preparatywnej HPLC w układzie gradientu 0,5% kwas solny/etanol.

Jako czysty produkt izolowano chlorowodorek tyrozylo-D-alanylo-glicylo-cynamonylopiperazyny.

b) chlorowodorek tyrozylo-D-treonylo-glicylo-feniloalanylo-cynamonylopiperazyny

Trans-1-cynamonylo piperazynę acylowano t-Boc-Tyr-D-Thr-Gly-Phe, przy użyciu N,N-dicykloheksylokarbodiimidu za pomocą metody sprzęgania N-hydroksysukcynimidu w roztworze N,N-dimetyloformamidu. Po odsączeniu N,N'-dicykloheksylomocznika, surowy produkt pośredni został wytrącony wodą. Osad przemywano trzy razy wodą i wysuszono. T-butyloksykarbonylową grupę ochronną usunięto z użyciem 5% chlorowodoru w octanie etylu. Surowy produkt końcowy w postaci soli (chlorowodorku) wytrącano eterem etylowym. Surowy produkt oczyszczono za pomocą preparatywnej HPLC w układzie gradientu 0,5% kwas solny/etanol. Jako czysty produkt izolowano chlorowodorek tyrozylo-D-treonylo-glicylo-feniloalanylo-cynamonylopiperazyny (określanego jako peptydomimetyk 2)

c) dichlorowodorek tyrozylo-D-arginylo-cynamonylopiperazyny

Trans-1-cynamonylopiperazynę acylowano t-Boc-Tyr-D-Arg, przy użyciu N,N-dicykloheksylokarbodiimidu za pomocą metody sprzęgania N-hydroksysukcynimidu w roztworze N,N-dimetyloformamidu. Po odsączeniu N,N'-dicykloheksylomocznika, surowy produkt pośredni został wytrącony wodą. Osad przemywano trzy razy wodą i wysuszono. T-butyloksykarbonylową grupę ochronną usunięto z użyciem 5% chlorowodoru w octanie etylu. Surowy produkt końcowy w postaci soli (chlorowodorku) wytrącano eterem etylowym. Surowy produkt oczyszczono za pomocą preparatywnej HPLC w układzie gradientu 0,5% kwas solny/etanol. Jako czysty produkt izolowano dichlorowodorek tyrozylo-D-arginylo-cynamonylopiperazyny.

Analogicznie mogą być uzyskane szczególnie korzystne związki według wynalazku wybrane spośród:

Korzystnie, związek według wynalazku został wybrany z grupy składającej się z:

tyrozylo-D-alanylo-glicylo-cynamonylopiperazyny,
tyrozylo-D-treonylo-glicylo-fenilo-cynamonylopiperazyny,
tyrozylo-D-arginylo-cynamonylopiperazyny, i tyrozylo-D-treonylo-cynamonylopiperazyny,
L-tyrozylo-D-alanylo-L-feniloalanylo-cynamonylopiperazyny,
L-tyrozylo-D-alanylo-L-tryptofylo-cynamonylopiperazyny,
L-tyrozylo-D-treonylo-L-feniloalanylo-cynamonylopiperazyny,
L-tyrozylo-D-treonylo-L-tryptofylo-cynamonylopiperazyny,

Wyżej wymienione związki otrzymuje się najpierw poprzez syntezę Boc-L-Tyr-D-Ala lub Boc-L-Tyr-D-Thr lub Boc-L-Tyr-D-Ala-Gly lub Boc-L-Tyr-D-Thr-Gly przy zastosowaniu żywicy 2-chlorotrytylowej, gdzie wykorzystuje się Fmoc-zabezpieczone aminokwasy i metodę HATU/DIPEA w trakcie sprzęgania oraz 20% piperidynę w DMF w trakcie zdejmowania grup ochronnych. Po zdjęciu z żywicy za pomocą mieszaniny AcO:TFE:DCM, otrzymane produkty wykorzystuje się do zacytowania fenylalanylo-trans-1-cynamonylopiperazyny oraz tryptofylo-trans-1-cynamonylopiperazyny wykorzystując metodę TBTU/DIPEA. Grupa t-butyloksykarbonylowa usuwana jest za pomocą TFA:DCM.

Aby lepiej zilustrować aktywność prezentowanego wynalazku jak związku wykazującego efekt cytostatyczny i cytotoksyczny w stosunku do komórek nowotworowych jelit, poniżej przedstawiono przykład efektywnego działania na liniach komórkowych raka jelit. Przedstawiono także przykłady oddziaływania z receptorami opioidowymi.

Przykład 1

Przeprowadzono ocenę hamowania migracji z wykorzystaniem płytek 24-dołkowych wyposażonych w inserty z membraną PET (polyethylene terephthalate). Doświadczenie wykonano dla stężeń IC₅₀ badanych związków obserwując hamowanie migracji komórek, czyli ilości komórek wędrujących/przechodzących na dolną stronę membrany. Komórki po przejściu przez membranę były barwione fioletem krystalicznym i liczone.

A) TyrDAlaGlyPheCyn

Fenylalanylo-trans-1-cynamylopiiperazyna została zacylowana za pomocą t-Boc-Tyr-D-Ala-Gly wykorzystując metodę TBTU/DIPEA. Produkt reakcji został wytrącony 10% NaHCO₃ i oddzielony od mieszaniny poreakcyjnej za pomocą filtracji. Osad został przemyty 3-krotnie wodą do momentu uzyskania neutralnego pH przesącza. Grupa t-butyloksykarbonylowa usunięta została za pomocą TFA:DCM (1:1). Surowy produkt oczyszczono za pomocą preparatywnego systemu HPLC w układzie gradientowym woda/metanol z dodatkiem 0.1% kwasu trifluorooctowego. Przeciwnym wymieniono na Cl⁻ za pomocą żywicy jonowymiennej Dowex. Oczyszczony produkt hydrochlorek tyrozylo-D-alanylo-glicylo-fenylalanylo-cynamylopiiperazyyny zwany dalej TyrDAlaGlyPheCyn. Związek użyto w badaniach komórkowych:

- Dla komórek HT29 (rak jelita) wyznaczono hamowanie migracji do ok. 70% przy 150 μM.
- Dla komórek Colo205 (rak jelita) wyznaczono hamowanie migracji do ok. 60% przy 170 μmol.
- Dla komórek SW480 (rak jelita) wyznaczono hamowanie migracji do ok. 62% przy 304 μmol
- Dla komórek SW620 (rak jelita) wyznaczono hamowanie migracji do ok. 40% przy 400 μmol

B) TyrDAlaGlyTrpCyn

Tryptofylo-Trans-1-cynamylopiiperazyna została zacylowana za pomocą t-Boc-Tyr-D-Ala-Gly wykorzystując metodę TBTU/DIPEA. Produkt reakcji został wytrącony 10% NaHCO₃ i oddzielony od mieszaniny poreakcyjnej za pomocą filtracji. Osad został przemyty 3-krotnie wodą do momentu uzyskania neutralnego pH przesącza. Grupa t-butyloksykarbonylowa usunięta została za pomocą TFA:DCM (1:1). Surowy produkt oczyszczono za pomocą preparatywnego systemu HPLC w układzie gradientowym woda/metanol z dodatkiem 0.1% kwasu trifluorooctowego. Przeciwnym wymieniono na Cl⁻ za pomocą żywicy jonowymiennej Dowex. Oczyszczony produkt hydrochlorek tyrozylo-D-alanylo-glicylo-tryptofylo-cynamylopiiperazyyny jest zwany dalej TyrDAlaGlyTrpCyn. Związek użyto w badaniach komórkowych:

- Dla komórek HT29 (rak jelita) wyznaczono hamowanie migracji do ok. 50% przy 300 μM.
- Dla komórek Colo205 (rak jelita) wyznaczono hamowanie migracji do ok. 40% przy 280 μmol.
- Dla komórek SW480 (rak jelita) wyznaczono hamowanie migracji do ok. 33% przy 291 μmol
- Dla komórek SW620 (rak jelita) wyznaczono hamowanie migracji do ok. 28% przy 452 μmol

C) TyrDThrGlyPheCyn

Fenylalanylo-trans-1-cynamylopiiperazyna została zacylowana za pomocą t-Boc-Tyr-D-Thr-Gly wykorzystując metodę TBTU/DIPEA. Produkt reakcji został wytrącony 10% NaHCO₃ i oddzielony od mieszaniny poreakcyjnej za pomocą filtracji. Osad został przemyty 3-krotnie wodą do momentu uzyskania neutralnego pH przesącza. Grupa t-butyloksykarbonylowa usunięta została za pomocą TFA:DCM (1:1). Surowy produkt oczyszczono za pomocą preparatywnego systemu HPLC w układzie gradientowym woda/metanol z dodatkiem 0.1% kwasu trifluorooctowego. Przeciwnym wymieniono na Cl⁻ za pomocą żywicy jonowymiennej Dowex. Oczyszczony produkt hydrochlorek tyrozylo-D-treonylo-glicylo-fenylalanylo-cynamylopiiperazyyny zwany dalej TyrDThrGlyPheCyn. Związek użyto w badaniach komórkowych:

- Dla komórek SW480 (rak jelita) wyznaczono hamowanie migracji do ok. 45% przy 430 μmol

D) TyrDThrGlyTrpCyn

Tryptofylo-Trans-1-cynamylopiiperazyna została zacylowana za pomocą t-Boc-Tyr-D-Thr-Gly wykorzystując metodę TBTU/DIPEA. Produkt reakcji został wytrącony 10% NaHCO₃ i oddzielony od mieszaniny poreakcyjnej za pomocą filtracji. Osad został przemyty 3-krotnie wodą do momentu uzyskania neutralnego pH przesącza. Grupa t-butyloksykarbonylowa usunięta została za pomocą TFA:DCM (1:1). Surowy produkt oczyszczono za pomocą preparatywnego systemu HPLC w układzie gradientowym woda/metanol z dodatkiem 0.1% kwasu trifluorooctowego. Przeciwnym wymieniono na Cl⁻ za pomocą żywicy jonowymiennej Dowex. Oczyszczony produkt hydrochlorek tyrozylo-D-treonylo-glicylo-tryptofylo-cynamylopiiperazyyny jest zwany dalej TyrDThrGlyTrpCyn. Związek użyto w badaniach komórkowych:

- Dla komórek SW480 (rak jelita) wyznaczono hamowanie migracji do ok. 39% przy 426 μmol
- Dla komórek SW620 (rak jelita) wyznaczono hamowanie migracji do ok. 33% przy 552 μmol

Przykład 2

Przeprowadzono ocenę wpływu badanych związków na wzrost komórek metodą kolorymetryczną z użyciem odczynnika MTT lub XTT wyznaczając IC₅₀. Testy były oparte na redukcji soli pod wpływem

mitochondrialnej dehydrogenazy, aktywnych metabolicznie komórek. Barwny produkt redukcji oznaczano spektrofotometrycznie i w ten sposób oznaczano ilość żywych komórek.

- A) TyrDAlaGlyPheCyn (związek otrzymany według schematu pokazanego w przykładzie 1)
- Dla komórek HT29 (rak jelita) wyznaczono IC₅₀ dla 150 μ M.
 - Dla komórek Colo205 (rak jelita) wyznaczono IC₅₀ dla 170 μ mol.
 - Dla komórek HCT116 (rak jelita) wyznaczono IC₅₀ dla 284 μ mol.
 - Dla komórek SW480 (rak jelita) wyznaczono IC₅₀ dla 304 μ mol.
 - Dla komórek SW620 (rak jelita) wyznaczono IC₅₀ dla 400 μ mol.
- B) TyrDAlaGlyTrpCyn (związek otrzymany według schematu pokazanego w przykładzie 1)
- Dla komórek HT29 (rak jelita) wyznaczono IC₅₀ dla 300 μ M.
 - Dla komórek Colo205 (rak jelita) wyznaczono IC₅₀ dla 280 μ mol.
 - Dla komórek HCT116 (rak jelita) wyznaczono IC₅₀ dla 321 μ mol.
 - Dla komórek SW480 (rak jelita) wyznaczono IC₅₀ dla 291 μ mol.
 - Dla komórek SW620 (rak jelita) wyznaczono IC₅₀ dla 452 μ mol.
- C) TyrDThrGlyPheCyn (związek otrzymany według schematu pokazanego w przykładzie 1)
- Dla komórek HCT116 (rak jelita) wyznaczono IC₅₀ dla 557 μ mol.
 - Dla komórek SW480 (rak jelita) wyznaczono IC₅₀ dla 430 μ mol.
 - Dla komórek SW620 (rak jelita) wyznaczono IC₅₀ dla 634 μ mol.
- D) TyrDThrGlyTrpCyn (związek otrzymany według schematu pokazanego w przykładzie 1)
- Dla komórek HT29 (rak jelita) wyznaczono IC₅₀ dla 500 μ M.
 - Dla komórek Colo205 (rak jelita) wyznaczono IC₅₀ dla 610 μ mol.
 - Dla komórek HCT116 (rak jelita) wyznaczono IC₅₀ dla 403 μ mol.
 - Dla komórek SW480 (rak jelita) wyznaczono IC₅₀ dla 426 μ mol.
 - Dla komórek SW620 (rak jelita) wyznaczono IC₅₀ dla 552 μ mol.

Przykład 3

Tryptofylo-Trans-1-cynamylopiperazyna została zacylowana za pomocą t-Boc-Tyr-D-Ala-Gly wykorzystując metodę TBTU/DIPEA. Produkt reakcji został wytrącony 10% NaHCO₃ i oddzielony od mieszaniny poreakcyjnej za pomocą filtracji. Osad został przemyty 3-krotnie wodą do momentu uzyskania neutralnego pH przesącza. Grupa t-butyloksykarbonylowa usunięta została za pomocą TFA:DCM (1:1). Surowy produkt oczyszczono za pomocą preparatywnego systemu HPLC w układzie gradientowym woda/metanol z dodatkiem 0.1% kwasu trifluorooctowego. Przeciwnion wymieniono na Cl⁻ za pomocą żywicy jonowymiennej Dowex. Oczyszczony produkt hydrochlorek tyrozylo-D-alanylo-glicylo-tryptofylo-cynamylopiperyzyny jest zwany dalej TyrDAlaGlyTrpCyn. Tryptofylo-Trans-1-cynamylopiperazyna została zacylowana za pomocą t-Boc-Tyr-D-Thr-Gly wykorzystując metodę TBTU/DIPEA. Produkt reakcji został wytrącony 10% NaHCO₃ i oddzielony od mieszaniny poreakcyjnej za pomocą filtracji. Osad został przemyty 3-krotnie wodą do momentu uzyskania neutralnego pH przesącza. Grupa t-butyloksykarbonylowa usunięta została za pomocą TFA:DCM (1:1). Surowy produkt oczyszczono za pomocą preparatywnego systemu HPLC w układzie gradientowym woda/metanol z dodatkiem 0.1% kwasu trifluorooctowego. Przeciwnion wymieniono na Cl⁻ za pomocą żywicy jonowymiennej Dowex. Oczyszczony produkt hydrochlorek tyrozylo-D-treonylo-glicylo-tryptofylo-cynamylopiperyzyny jest zwany dalej TyrDThrGlyTrpCyn. Fenylalanylo-trans-1-cynamylopiperazyna została zacylowana za pomocą t-Boc-Tyr-D-Ala-Gly wykorzystując metodę TBTU/DIPEA. Produkt reakcji został wytrącony 10% NaHCO₃ i oddzielony od mieszaniny poreakcyjnej za pomocą filtracji. Osad został przemyty 3-krotnie wodą do momentu uzyskania neutralnego pH przesącza. Grupa t-butyloksykarbonylowa usunięta została za pomocą TFA:DCM (1:1). Surowy produkt oczyszczono za pomocą preparatywnego systemu HPLC w układzie gradientowym woda/metanol z dodatkiem 0.1% kwasu trifluorooctowego. Przeciwnion wymieniono na Cl⁻ za pomocą żywicy jonowymiennej Dowex. Oczyszczony produkt hydrochlorek tyrozylo-D-alanylo-glicylo-fenylalanylo-cynamylopiperazyny jest zwany dalej TyrDAlaGlyPheCyn.

Fenylalanylo-trans-1-cynamylopiperazyna została zacylowana za pomocą t-Boc-Tyr-D-Thr-Gly wykorzystując metodę TBTU/DIPEA. Produkt reakcji został wytrącony 10% NaHCO₃ i oddzielony od mieszaniny poreakcyjnej za pomocą filtracji. Osad został przemyty 3-krotnie wodą do momentu uzyskania neutralnego pH przesącza. Grupa t-butyloksykarbonylowa usunięta została za pomocą TFA:DCM (1:1). Surowy produkt oczyszczono za pomocą preparatywnego systemu HPLC w układzie gradiento-

wym woda/metanol z dodatkiem 0.1% kwasu trifluorooctowego. Przeciwnon wymieniono na Cl- za pomocą żywicy jonowymiennej Dowex. Oczyszczony produkt hydrochlorek tyrozylo-D-treonylo-glicylo-fenyloalanylo-cynamylopiperydzyny jest zwany dalej TyrDThrGlyPheCyn.

Badanie powinowactwa receptorowego analizowanych związków zbadano metodą radioizotopową polegającą na konkurencyjnym wiązaniu 0.5 nM selektywnego radioaktywnego agonisty receptora opioidowego μ : [3H]DAMGO oraz δ : [3H]DELT w obecności rosnących stężeń badanych związków w postaci nieznakowanej (10–10,5 – 10–6) wykazało wartości:

TyrDAlaGlyPheCyn – dla receptora μ poniżej 1,7 a dla receptora δ poniżej 11

TyrDAlaGlyTrpCyn – dla receptora μ poniżej 76 a dla receptora δ poniżej 250

TyrDThrGlyPheCyn – dla receptora μ poniżej 1,7 a dla receptora δ poniżej 1,4

TyrDThrGlyTrpCyn – dla receptora μ poniżej 4,5 a dla receptora δ poniżej 56

Co świadczy o zdolności do wiązania się badanych związków do zastosowanych receptorów.

Zastrzeżenia patentowe

1. Związek wybrany spośród:
tyrozylo-D-alanylo-glicylo-fenyloalanylo-cynamylopiperydzyny (TyrDAlaGlyPheCyn),
tyrozylo-D-alanylo-glicylo-tryptofylo-cynamylopiperydzyny (TyrDAlaGlyTrpCyn),
tyrozylo-D-treonylo-glicylo-fenyloalanylo-cynamylopiperydzyny (TyrDThrGlyPheCyn),
tyrozylo-D-treonylo-glicylo-tryptofylo-cynamylopiperydzyny (TyrDThrGlyTrpCyn),
lub ich farmaceutycznie dopuszczalnych soli.
2. Związek określony w zastrz. 1 do stosowania w leczeniu lub zapobieganiu nowotworu jelita.
3. Związek do stosowania według zastrz. 2, **znamienny tym**, że jest stosowany w postaci przeznaczony do podawania doustnego, iniekcyjnego lub dożylnego.
4. Związek do stosowania według zastrz. 2, **znamienny tym**, że jest stosowany w postaci doustnej tabletki do podawania bezpośrednio do układu pokarmowego lub wlewu dożylnego do podawania obwodowego lub zastrzyku do iniekcji guza i jego okolic.
5. Związek do stosowania według zastrz. 2, **znamienny tym**, że jest stosowany w postaci wielolekowej kompozycji farmaceutycznej, korzystnie zawierającej dodatkowo opioid o działaniu przeciwbólowym lub/i lek przeciwnowotworowy.
6. Związek do stosowania według zastrz. 2, **znamienny tym**, że jest przeznaczony do stosowania w klasycznej chemioterapii raka jelita prowadzonej przedoperacyjnie (terapia neo-adiuwantowa) lub pooperacyjnie (terapia adiuwantowa) lub w chemioterapii nieoperacyjnego raka jelita lub w jej wspomaganiu lub jest przeznaczony do stosowania do zabezpieczania jelit przed przerzutem do nich nowotworu pochodzącego z innej tkanki.
7. Związek określony w zastrz. 1 do stosowania w terapii przeciwbólowej jako antagonist leków opioidowych.
8. Związek do stosowania według zastrz. 7, **znamienny tym**, że jest przeznaczony do podawania doustnego lub obwodowego w celu eliminowania zaparć wywołanych przez leki opioidowe.
9. Związek do stosowania według zastrz. 7, **znamienny tym**, że jest przeznaczony do oddziaływania na receptory opioidów.
10. Związek do stosowania według zastrz. 7, **znamienny tym**, że jest stosowany w postaci doustnej tabletki do podawania bezpośrednio do układu pokarmowego, lub wlewu dożylnego do podawania obwodowego.
11. Związek do stosowania według zastrz. 7, **znamienny tym**, że jest stosowany w postaci wielolekowej kompozycji farmaceutycznej, korzystnie zawierającej opioid stosowany w terapii przeciwbólowej.
12. Związek do stosowania według zastrz. 1 albo zastrz. 7, **znamienny tym**, że jest stosowany w postaci kompozycji zawierającej polimer stanowiący nośnik substancji aktywnej.