

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **236125**
(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **426332**

(22) Data zgłoszenia: **14.07.2018**

(51) Int.Cl.
A61K 38/08 (2019.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C07K 1/04 (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(54) **Związki chemiczne mające zastosowanie jako markery diagnostyczne stanu zapalnego i nowotworów, sposób ich otrzymywania, marker diagnostyczny i metoda diagnozowania procesów zapalnych i nowotworów nabłonkowych**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

27.01.2020 BUP 03/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

14.12.2020 WUP 20/20

(73) Uprawniony z patentu:

UNIwersytet Gdański, Gdańsk, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

ADAM LESNER, Gdańsk, PL

NATALIA GRUBA, Gościcino, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Justyna Pawłowska

PL 236125 B1

Opis wynalazku

Przedmiot wynalazku mieści się w dziedzinie diagnostyki stanów zapalnych toczących się *in vivo* w wyniku reakcji komórek immunologicznych w ognisku zapalnym oraz diagnostyki nowotworów, zwłaszcza nabłonkowych, jak i markerów diagnostycznych procesów zapalnych i markerów diagnostycznych umożliwiających wykrywanie, na wczesnym etapie, rozwój nowotworów nabłonkowych. Wynalazek dotyczy związków do zastosowania medycznego – diagnostycznego – w diagnostyce stanów zapalnych oraz we wczesnej diagnostyce nowotworów nabłonkowych, przy czym związki te używane są jako odczynnik diagnostyczny – marker diagnostyczny – do wykrywania procesu patofizjologicznego w materiale biologicznym ssaków, zwłaszcza krwi i moczu człowieka. Wynalazek dotyczy markerów diagnostycznych – odczynnik diagnostyczny do wykrywania zmian immunologicznych w tym do predykcji rozwoju procesu nowotworzenia z komórek nabłonkowych na bardzo wczesnym etapie rozwoju choroby, nawet przed procesem nowotworzenia, i diagnozowania procesu zapalnego, czy też wykrywania już rozpoczętego procesu nowotworzenia z jednoczesną reakcją zapalną, oraz odczynnik do wykrywania dodatkowych procesów zapalnych przy obecności nowotworu nabłonkowego np. zakażenia bakteryjnego lub wirusowego. Wynalazek dotyczy również sposobu otrzymywania nowych związków na bazie łańcucha aminokwasów, które znajdują zastosowanie w diagnostyce procesów zapalnych i/lub nowotworów nabłonkowych.

Znane są związki i markery diagnostyczne do wykrywania stanu zapalnego jak i procesu nowotworzenia.

Ze względu na fakt, że późno wykryty stan zapalny zmierzający do powstania nowotworu wiąże się ze zmniejszeniem szans na wyleczenie lub wiąże się z trudnościami terapeutycznymi, wciąż poszukuje się nowych związków diagnostycznych mogących w sposób jak najbardziej czuły i specyficzny wykryć procesy chorobowe jak w najwcześniejszym etapie procesu patofizjologicznego.

Przedmiotem wynalazku było opracowanie czułego i specyficznego markera diagnostycznego, który umożliwi zdiagnozowanie nowotworu, zwłaszcza nabłonkowego, zwłaszcza raka pęcherza, raka przewodów moczowych, raka cewki moczowej, czy też innych nowotworów, którym towarzyszy podwyższeniem aktywności enzymów proteolitycznych, i których to proces chorobowy może być obserwowany w materiale biologicznym, zwłaszcza moczu pacjenta, na bardzo wczesnym etapie chorobotwórczym, czyli nawet na etapie reakcji zapalnej. Nieoczekiwanie okazało się, że opracowane nowe związki zawierające aminokwasy stanowią markery diagnostyczne, które jedynie w obecności enzymów proteolitycznych, które są wynikiem reakcji zapalnej i/lub nowotworu nabłonkowego, i które to enzymy uwalniane są i obecne w materiale biologicznym, wykazują właściwości chromogeniczne i/lub fluorogeniczne mierzone w zakresie fal 300–500 nm, zwłaszcza 380–430. Właściwości barwne są obserwowane podczas hydrolizy enzymatycznej tych związków w materiale biologicznym, zwłaszcza moczu i krwi pacjenta, u którego rozwija się lub już rozwinął się nowotwór nabłonkowy, w tym z towarzyszącym procesem zapalnym czy też rozwinęła się sama odpowiedź zapalna lub odpowiedź zapalna towarzysząca dodatkowo chorobie nowotworowej. W przypadku nowotworów, proces ten wiąże się ze skutkami choroby nowotworowej czyli podwyższeniem aktywności enzymów proteolitycznych guza i okolicznych tkanek wynikających z wielu procesów, do których zalicza się podwyższoną angiogenezę, remodeling tkanek, nekrozę tkanek zdrowych wskutek nacieku nowotworu a także apoptozę komórek nowotworowych. Część związków według wynalazku umożliwia wykrywanie nawet już procesu zapalnego, poprzez również ich hydrolizę, w tym za pomocą uwalnianych enzymów z ogniska zapalnego w trakcie procesu immunologicznego, co wiąże się z wywołaniem reakcji barwnej wykrywanej poprzez pomiar absorbancji w zakresie fal 300–500 nm, zwłaszcza 380–430.

W trakcie badań prowadzonych w Pracowni Analityki i Nanodiagnostyki Biochemicznej Uniwersytetu Gdańskiego przeprowadzono identyfikację związków, które byłyby podatne na zwiększoną aktywność proteolityczną w materiale biologicznym, zwłaszcza ludzkim moczu mających zastosowanie jako markery diagnostyczne nowotworów nabłonkowych i markery diagnostyczne procesów zapalnych, w tym zwłaszcza nowotworu nabłonka układu moczowego. W trakcie badań przeprowadzono badanie eksperymentalne na materiale biologicznym człowieka, w tym moczu osób chorych, u których potwierdzono reakcję zapalną i/lub nowotwory nabłonkowe na różnym etapie rozwoju, jak i moczu osób z wykluczonym stanem zapalnym – grupie kontrolnej.

W wyniku tych badań zostały opracowane związki o sekwencji ABZ-Leu-Glu-Pro-Val-ANB-NH₂, gdzie ABZ to kwas 2-aminobenzoesowy a ANB-NH₂ to amid kwasu 5-amino-2-benzoesowego, ANB to kwas 5-amino-2-benzoesowy, oraz ABZ-Leu-Glu-Pro-Val-pNA, gdzie pNA to para-nitroanilina. Związki

te znajdują zastosowanie jako markery już do wykrywania procesu immunologicznego – odpowiedzi immunologicznej jak również markery diagnostyczne nowotworów nabłonkowych. Wykrywany proces zapalny przez wymienione związki, może być skorelowany również w chwili pojawienia się nowotworu, wokół którego pojawia się stan zapalny. Wykrycie stanu zapalnego może być również przydatne w przypadku zakażenia bakteriami lub wirusami w obecności lub bez obecności nowotworu nabłonkowego. W obu diagnozowanych przez zaproponowane związki procesach towarzyszy hydroliza enzymatyczna tych markerów – w wyniku uwalniania enzymów w trakcie procesów immunologicznych zachodzących in vivo i/lub enzymów proteolitycznych uwalnianych w wyniku rozwoju nowotworu nabłonkowego. Proces ten obserwuje się poprzez odpowiednio monitoring uwalnianej cząsteczki ANB-NH₂ (amid kwasu 5-amino-2-benzoesowego) lub pNA (p-nitroanilina) przy długości fali 300–400, korzystnie 380–430 nm, czyli hydroliza następuje w pozycji 5 związku – po 5-tym w kolejności aminokwasie.

Przedmiotem wynalazku jest związek o wzorze ogólnym: ABZ¹-Leu²-Glu³-Pro⁴-Val⁵-X⁶, gdzie: ABZ oznacza kwas 2-aminobenzoesowy, X to oznacza ANB-NH₂ lub pNA, przy czym ANB-NH₂ oznacza amid kwasu 5-amino-2-benzoesowego, ANB – kwas 5-amino-2-benzoesowy, a pNA oznacza 4-nitroanilinę.

Przedmiotem wynalazku jest również sposób otrzymywania związku ABZ¹-Leu²-Glu³-Pro⁴-Val⁵-ANB-NH₂⁶, gdzie: ABZ oznacza kwas 2-aminobenzoesowy, ANB-NH₂ oznacza amid kwasu 5-amino-2-benzoesowego, zaś związek ten otrzymuje się w syntezie na nośniku stałym i sposób prowadzi się w następujących etapach:

- a) przygotowanie żywicy umożliwiającej przekształcenie kwasu w amid,
- b) deprotekcja – usunięcie grupy ochronnej,
- c) osadzenie kwasu 5-amino-2-nitrobenzoesowego ANB,
- d) powtarzanie etapów od b) do c) aż do momentu uzyskania związku, przy czym syntezę prowadzi się od reszty 6 do 1, a następnie odszczepia się otrzymany peptyd od żywicy.

Wynalazek dotyczy również sposobu otrzymywania związku ABZ¹-Leu²-Glu³-Pro⁴-Val⁵-pNA⁶, gdzie: ABZ oznacza kwas 2-aminobenzoesowy, pNA oznacza 4-nitroanilinę, a związek otrzymuje się w syntezie częściowo na nośniku stałym i częściowo w buforze lub tylko na nośniku stałym, zaś sposób prowadzi się w następujących etapach:

- a) przygotowanie żywicy 2-chlorochlorotrylowej,
- b) deprotekcja grupy ochronnej,
- c) osadzenie Pro⁴ na żywicy,
- d) powtarzanie etapów od b) do c) aż do momentu uzyskania ABZ-Leu-Glu-Pro,
- e) odszczepienie otrzymanego peptydu od żywicy,
- f) otrzymanie paranitroanilidu aminokwasu (Val-pNA),
- g) sprzęganie paranitroanilidu z chronionym peptydem (ABZ-Leu-Glu-Pro + Val-pNA),
- h) usunięcie osłon grup bocznych aminokwasów.

Przedmiotem wynalazku jest sposób diagnozowania nowotworu nabłonkowego i/lub procesu zapalnego w materiale biologicznym ssaka, który charakteryzuje się tym, że jako marker diagnostyczny stosuje się co najmniej jeden związek o wzorze ogólnym ABZ¹-Leu²-Glu³-Pro⁴-Val⁵-X⁶, który stanowi marker odpowiedzi immunologicznej i dodatkowo nowotworu, gdzie: ABZ oznacza kwas 2-aminobenzoesowy, X oznacza ANB-NH₂ lub pNA, przy czym ANB-NH₂ oznacza amid kwasu 5-amino-2-benzoesowego, pNA oznacza 4-nitroanilinę. Związek ten dodaje się i inkubuje w materiale biologicznym ssaka, zwłaszcza moczu lub krwi człowieka, a następnie dokonuje się pomiaru absorbancji przy długości fali w zakresie od 300 do 500 nm. Wykazanie zabarwienia, wzrostu absorbancji, wskazuje na wynik pozytywny. Zabarwienie jest wynikiem hydrolizy enzymatycznej związku zwłaszcza w pozycji 5 – po piątym z kolei aminokwasie, pod wpływem enzymów proteolitycznych obecnych w materiale biologicznym in vitro w wyniku odpowiedzi immunologicznej i/lub nowotworu in vivo. Czas odczytu absorbancji ustala się w zależności od ilości dodanego związku. Odczyt może nastąpić po około 60 minutach.

Korzystnie, pomiaru absorbancji dokonuje się przy długości fali 380–430 nm.

Sposób otrzymywania związku ABZ¹-Leu²-Glu³-Pro⁴-Val⁵-ANB-NH₂⁶, gdzie: ABZ oznacza kwas 2-aminobenzoesowy, ANB-NH₂ oznacza amid kwasu 5-amino-2-benzoesowego, w wariantcie wykonania, prowadzi się sposób w następujących etapach:

- pęcnienia żywicy amidowej;
- a) deprotekcja – usunięcie osłony Fmoc,
 - b) przemywanie żywicy,
 - c) osadzenie kwasu 5-amino-2-nitrobenzoesowego,

- d) przemywanie żywicy,
- e) powtarzanie etapów od b) do d) aż do momentu uzyskania związku/peptydu; syntezę prowadzi się od C do N-końca (od reszty 6 do 1),
- f) odszczepienie otrzymanego peptydu od żywicy.

Sposób otrzymywania związku $ABZ^1\text{-Leu}^2\text{-Glu}^3\text{-Pro}^4\text{-Val}^5\text{-pNA}^6$, gdzie: ABZ oznacza kwas 2-aminobenzoowy, pNA oznacza para-nitroanilinę według wariantu wykonania prowadzi się w sposób w następujących etapach:

- a) proces pęcznienia żywicy 2-chlorochlorotrytylowej,
- b) deprotekcja – usunięcie osłony Fmoc,
- c) przemywanie żywicy,
- d) osadzenie Pro^4 na żywicy,
- e) przemywanie żywicy,
- f) powtarzanie etapów od b) do e) aż do momentu uzyskania $ABZ\text{-Leu-Glu-Pro}$,
- g) odszczepienie otrzymanego peptydu od żywicy,
- h) otrzymanie paranitroanilidu aminokwasu ($Val\text{-pNA}$),
- i) sprzęganie paranitroanilidu z chronionym peptydem ($ABZ\text{-Leu-Glu-Pro} + Val\text{-pNA}$),
- j) usunięcie osłon grup bocznych aminokwasów ($Glu(tBu)$).

Część określić stosowanych powyżej oraz w opisie i zastrzeżeniach patentowych, mają następujące znaczenie:

Nowotwór nabłonkowy – czyli taki, którego komórki wywodzą się z nabłonka gruczołów wydzielania zewnętrznego i wewnętrznego oraz z przewodów tych gruczołów, np. nowotwór nabłonka układu moczowego.

Właściwości chromogeniczne – oznaczają powstawanie produktu barwnego,

Właściwości fluorogeniczne – oznaczają powstawanie produktu emitującego fluorescencję,

NMP – N-metylopirolidon,

DMF – dimetyloformamid,

DCM – chlorek metylenu,

pNA – 4-nitroanilina, para-nitroanilina,

ABZ – kwas 2-aminobenzoowy,

ANB-NH₂ – amid kwasu 5-amino-2-benzoowego.

Wynalazek przedstawiono bliżej w przykładach wykonania na rysunku.

Fig. 1 – przedstawia szybkość hydrolizy substratu $ABZ\text{-Leu-Glu-Pro-Val-ANB-NH}_2$ w próbkach moczu ze zdiagnozowanym nowotworem. Cyfry arabskie oznaczają numer losowo wybranej próbki moczu.

Fig. 2 – przedstawia szybkość hydrolizy substratu $ABZ\text{-Leu-Glu-Pro-Val-pNA}$ w próbkach moczu ze zdiagnozowanym nowotworem. Cyfry arabskie oznaczają numer losowo wybranej próbki moczu.

Fig. 3 – przedstawia szybkości hydrolizy substratu $ABZ\text{-Leu-Glu-Pro-Val-ANB-NH}_2$ w zależności od obecności inhibitora ludzkiej elastazy neutrofilnej, który to enzym jest markerem stanu zapalnego, w próbce ludzkiego moczu ze stwierdzonym stanem zapalnym i/lub nowotworem nabłonka układu moczowego.

Fig. 4 – przedstawia zależność stopnia hydrolizy substratu $ABZ\text{-Leu-Glu-Pro-Val-ANB-NH}_2$ od środowiska pH.

Fig. 5 – przedstawia wydajności hydrolizy substratu $ABZ\text{-Leu-Glu-Pro-Val-ANB-NH}_2$ w zależności od stopnia zagęszczenia ludzkiego moczu ze stwierdzonym nowotworem nabłonka układu moczowego.

Wynalazek ilustrują następujące przykłady wykonania, nie stanowiące jego ograniczenia.

P r z y k ł a d 1

Synteza nowego związku $ABZ^1\text{-Leu}^2\text{-Glu}^3\text{-Pro}^4\text{-Val}^5\text{-ANB-NH}_2^6$

1. Otrzymanie peptydu chromogenicznego

a) Pierwszym etapem syntezy było otrzymanie peptydu chromogenicznego który otrzymano metodą syntezy w fazie stałej – na nośniku stałym – z wykorzystaniem chemii Fmoc/tBu, czyli z użyciem osłon.

Związek o sekwencji $ABZ^1\text{-Leu}^2\text{-Glu}^3\text{-Pro}^4\text{-Val}^5\text{-ANB-NH}_2^6$, gdzie ABZ – oznacza kwas 2-aminobenzoowy, a ANB-NH₂ to amid kwasu 5-amino-2-benzoowego, zaś ANB to kwas 5-amino-2-benzoowy, otrzymano na drodze syntezy chemicznej w fazie stałej z wykorzystaniem następujących pochodnych aminokwasowych.

Boc-ABZ, Fmoc-Leu, Fmoc-Glu(Trt), Fmoc-Pro, Fmoc-Val, ANB

Syntezę związku, czyli markera diagnostycznego do wykrywania nowotworów nabłonkowych, których diagnostyka jest związana z hydrolizą tego związku pod wpływem enzymów proteolitycznych prowadzono na nośniku stałym umożliwiającym przekształcenie kwasu 5-amino-2-benzoesowego w amid ANB-NH₂:

– np. żywicy amidowej np. TentaGel S RAM firmy RAPP Polymere (Niemcy) np. o osadzeniu 0,23 mmol/g.

Możliwe jest zastosowanie innej dostępnej handlowo żywicy amidowej, w tym Rink Amide (Niemcy).

Syntezę związku prowadzono w sposób manualny z zastosowaniem wytrząsarki laboratoryjnej. Przez większość etapów reaktorami była strzykawka zakończona spiekem do syntezy w fazie stałej o pojemności 25 ml.

Wszystkie otrzymywane końcowe związki zawierały w swojej sekwencji w pozycji 1 czyli na N-końcu kwas 2-aminobenzoesowy – ABZ i w pozycji 6: cząsteczkę kwasu 5-amino-2-nitrobenzoesowego ANB na C-końcu. ABZ pełni rolę donora fluorescencji, natomiast ANB – kwas 5-amino-2-benzoesowy pełni rolę wygaszacza fluorescencji i jednocześnie chromoforu. Peptydy w swojej sekwencji zawierały co najmniej i korzystnie jedno miejsce reaktywne zlokalizowane pomiędzy resztami aminokwasowymi Val-ANB-NH₂: w pozycji 5 związku. Syntezę polegającą na przyłączaniu pochodnych aminokwasowych prowadzi się od reszty 6 do 1, czyli od końca C do N.

b) Osadzenie ANB na żywicy TentaGel S RAM:

Syntezę peptydów wykonano na żywicy TentaGel S RAM firmy Rapp Polymere o osadzeniu 0,23 mmol/g. W pierwszym etapie przygotowano żywicę, w tym dokonano spulchnienia żywicy poprzez cykl przemywań. Kolejno przystąpiono do usunięcia z nośnika osłony grupy aminowej Fmoc – za pomocą 20% roztworu piperydyny w NMP. Następnie przeprowadzono cykl przemywań rozpuszczalnikami. W celu potwierdzenia obecności wolnych grup aminowych wykonano test chloranilowy.

Cykl przemywań rozpuszczalnikami:

DMF 1 x 10 minut

IsOH 1 x 10 minut

DCM 1 x 10 minut

Usunięcie osłony Fmoc:

DMF 1 x 5 minut

20% piperydyna w NMP 1 x 3 minuty

20% piperydyna w NMP 1 x 8 minut

Cykl przemywań rozpuszczalnikami:

DMF 3 x 2 minuty

IsOH 3 x 2 minuty

DCM 3 x 2 minuty

c) Test chloranilowy:

Test chloranilowy polegał na przeniesieniu za pomocą łopatką, kilku ziaren żywicy z reaktora – strzykawki do szklanej ampułki, do której następnie dodano 100 µl nasyconego roztworu p-chloranilu w toluenie i 50 µl świeżego aldehydu octowego. Po upływie 10 minut przeprowadzono kontrolę zabarwienia ziaren.

Na tym etapie po przeprowadzeniu testu otrzymano zielone zabarwienie ziaren, które świadczyło o obecności wolnych grup aminowych. Po potwierdzeniu usunięcia osłon 9-fluorenylometoksykarbonylowych z żywicy można było przystąpić do kolejnego etapu, przyłączania pochodnej ANB (kwasu 5-amino-2-nitrobenzoesowego).

d) Osadzenie kwasu 5-amino-2-nitrobenzoesowego na nośniku stałym

Pierwszym etapem syntezy biblioteki peptydowej – mieszaniny peptydów, było osadzenie ANB na 1 g żywicy. Przed przyłączeniem chromoforu przemyto żywicę używaną do reakcji następującymi rozpuszczalnikami: DMF, DCM i ponownie DMF, po czym usunięto osłonę Fmoc- z grupy funkcyjnej nośnika. Jeden cykl usuwania osłony Fmoc- obejmował następujące etapy:

Usunięcie osłony Fmoc-:

20% piperydyna w NMP 1 x 3 minuty

20% piperydyna w NMP 1 x 8 minut

e) Przemywanie DMF 3 x 2 minuty

IsOH 3 x 2 minuty

DCM 3 x 2 minuty

f) Test chloranilowy na obecność wolnych grup aminowych.

Żywicę z wolną grupą aminową przemyto 5% roztworem N-metylomorfoliny (NMM) w DMF, a następnie DMF. Procedurę usuwania osłony Fmoc- oraz cykl przemywań przeprowadzono w naczynku Merrifielda. W osobnej kolbie rozpuszczono ANB w DMF i dodałam kolejno TBTU, DMAP, a na koniec diizopropyletyloaminę (DIPEA) w następujących nadmiarach w stosunku do osadzenia polimeru: ANB/TBTU/DMAP/DIPEA, 3:3:2:6. Tak przygotowaną mieszaninę dodano do żywicy i mieszano przez 3 godziny. Żywicę odsączono pod zmniejszonym ciśnieniem, przemyto DMF, DCM i izopropanolem, a całą procedurę acylowania powtórzono dwa razy. Do przeprowadzenia kolejnych reakcji przyłączania ANB do żywicy zastosowano heksafluorofosforan-O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetrametylouroniowy (HATU), a potem heksafluorofosforan-O-(benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetrametylouroniowy (HBTU). W ostatnim etapie żywicę przemyto kolejno DMF, DCM oraz izopropanolem i suszono na powietrzu.

g) Przyłączenie C-końcowej reszty aminokwasowej do ANB

Odpowiednią pochodną aminokwasową (9-krotny nadmiar molowy w stosunku do osadzenia żywicy) rozpuszczono w pirydynie i przeniesiono do kolby zawierającej żywicę z osadzonym ANB. Całość chłodzono do uzyskania temperatury -15°C (łaznia lodowa: 1 cz. wagowa NH₄Cl, 1 cz. wagowa NaNO₃, 1 cz. wagowa lodu). Po osiągnięciu żądanej temperatury dodano POCl₃ (w stosunku 1:1 do użytej ilości pochodnej aminokwasowej) i całość mieszano na mieszadle magnetycznym: 20 minut w -15°C, 30 minut w temperaturze pokojowej oraz 6 godzin w 40°C (łaznia olejowa). Po zakończeniu reakcji żywicę odsączono pod zmniejszonym ciśnieniem, przemyto DMF oraz MeOH i zostawiono do wysuszenia.

W kolejnym etapie przyłączono resztę w pozycji P2 (prolinę).

Wszystkie przyłączania reszt aminokwasowych poprzedzono przemywaniem żywicy za pomocą DMF przez 5 minut. W kolejnych przyłączaniach stosowano diisopropylkarbodiimid jako środek sprzęgający. Procedurę powtarzano dwukrotnie.

Po każdym z acylowań rozpoczynano cykl przemywań żywicy, a następnie wykonywano test chloranilowy, w celu monitorowania przyłączania pochodnej aminokwasowej do wolnych grup aminowych żywicy.

Cykl przemywań rozpuszczalnikami:

DMF 3 x 2 minuty

IsOH 3 x 2 minuty

DCM 3 x 2 minuty

Test chloranilowy:

W wyniku przeprowadzonych testów po dwóch pierwszych sprzęganiach zabarwienie ziaren najpierw było zielone, a następnie szare, więc konieczne było przeprowadzenie kolejnego acylowania, w wyniku, którego ziarna żywicy badanej testem chloranilowym były bezbarwne. Świadczyło to o przyłączeniu ANB do żywicy TentaGel S RAM, co pozwoliło przejść do następnego etapu syntezy peptydu.

h) Przyłączanie kolejnych chronionych reszt aminokwasowych:

Żywicę wraz z przyłączoną resztą ANB znajdującą się w reaktorku przemyto za pomocą DMF, a następnie przystąpiono do deprotekcji osłony Fmoc z grupy aminowej w celu przyłączenia chronionej pochodnej aminokwasowej glicyny.

Usunięcie osłony Fmoc:

DMF 1 x 5 minut

20% piperydyna w NMP 1 x 3 minuty

20% piperydyna w NMP 1 x 8 minut

Cykl przemywań rozpuszczalnikami:

DMF 3 x 2 minuty

IsOH 3 x 2 minuty

DCM 3 x 2 minuty

Test chloranilowy:

W wyniku przeprowadzenia testu chloranilowego otrzymano wynik pozytywny, o czym świadczyło zielone zabarwienie ziaren żywicy. Pozwoliło to na rozpoczęcie kolejnego etapu – przyłączania reszty aminokwasowej Fmoc-Glu(Trt)-OH.

Przyłączanie pochodnej aminokwasowej:

Wykonywane sprzęgania poprzedzono przemywaniem żywicy w DMF. Podczas przyłączania chronionej reszty kwasu glutaminowego skład mieszaniny sprzęgającej pozostawał bez zmian.

Po zakończeniu każdego z acylowań stosowano cykl przemywań rozpuszczalnikami według podanej procedury, a następnie przeprowadzono test chloranilowy na obecność wolnych grup aminowych w roztworze.

Cykl przemywań rozpuszczalnikami:

DMF 3 x 2 minuty

IsOH 3 x 2 minuty

DCM 3 x 2 minuty

Test chloranilowy:

Ziarna żywicy podczas testu przeprowadzonego po drugim acylowaniu były bezbarwne, co pozwoliło na przejście do kolejnego etapu syntezy, jakim było wprowadzenie kolejnej chronionej pochodnej aminokwasowej – leucyny i cząsteczki kwasu 2-aminobenzoowego. Procesy sprzęgania odbyły się zgodnie z procedurą omówioną wcześniej.

Testy przeprowadzone po przyłączeniu wyżej wymienionych reszt wykazały wyniki pozytywne, ziarna żywicy były bezbarwne.

2. Usuwanie peptydu z nośnika

Po zakończeniu syntezy amid peptydu ABZ-Leu-Glu-Pro-Val-ANB-NH₂ usunięto z nośnika wraz z jednoczesnym usunięciem osłon bocznych za pomocą mieszaniny: TFA : fenol : woda : TIPS (88:5:5:2, v/v/v/v) w kolbie okrągłodennej na mieszadle magnetycznym.

Po upływie 3 godzin zawartość kolby odsączyło się pod zmniejszonym ciśnieniem na lejkach ze spiekem Schotta przemywając eterem dietylowym. Powstały osad odwirowano na wirówce SIGMA 2K30 (Laboratory Centrifuges) w czasie 20 minut. Osad otrzymany po wirowaniu rozpuszcza się w wodzie przy pomocy ultradźwięków, a następnie poddano liofilizacji.

Tożsamość/charakterystyka nowego związku – analiza HPLC, MS

HPLC warunki: kolumna RP Bio Wide Pore Supelco C8 250 mm 4 mm, układ faz A 0,1% TFA w wodzie, B: 80% acetonitrylu w A), przepływ 1 ml/min, detekcja UV przy 226 nm. Potwierdzono otrzymanie związku.

Przykład 2

Otrzymywanie związku o wzorze związku ABZ¹-Leu²-Glu³-Pro⁴-Val⁵-pNA⁶.

Proces prowadzi się w podobny sposób jak opisano w przykładzie 1 z tym, że wykorzystuje się odpowiednie pochodne aminokwasowe i dodatkowe podstawniki i proces przeprowadza się częściowo w roztworze częściowo na nośniku stałym.

Otrzymanie p-nitroanilidu Val

a. Pierwszym etapem syntezy było otrzymanie chronionego peptydu, który otrzymano metodą syntezy w fazie stałej z wykorzystaniem chemii Fmoc/tBu.

Związek ABZ¹-Leu²-Glu(OtBu)³-Pro⁴-OH, gdzie ABZ – oznacza kwas 2-aminobenzoowy, otrzymano na drodze syntezy chemicznej w fazie stałej z wykorzystaniem następujących pochodnych aminokwasowych:

Boc-ABZ, Fmoc-Leu, Fmoc-Glu(OtBu), Fmoc-Pro.

Syntezę związku prowadzono na nośniku stałym:

– żywica 2-chloro-chlorotytylowa np. firmy Ms BIOTECH GMBH (Niemcy) o osadzeniu grup 1,6 mmol Cl/g.

Syntezę związku prowadzono manualnie z zastosowaniem wytrząsarki laboratoryjnej. Przez wszystkie etapy reaktor stanowiła strzykawka zakończona spiekem do syntezy w fazie stałej o pojemności 25 ml.

Syntezę peptydów wykonano na nośniku: żywicy 2-chloro-chlorotytylowa np. firmy Ms BIOTECH GMBH (Niemcy) o osadzeniu grup 1,6 mmol Cl/g. W pierwszym etapie dokonano spulchnienia żywicy poprzez cykl przemywań. Kolejno przystąpiono do usunięcia z nośnika osłony grupy aminowej Fmoc – za pomocą 20% roztworu piperidyny w NMP. Następnie przeprowadzono cykl przemywań rozpuszczalnikami. W celu potwierdzenia obecności wolnych grup aminowych wykonano test chloranilowy.

Cykl przemywań rozpuszczalnikami:

DMF 1 x 10 minut

IsOH 1 x 10 minut

DCM 1 x 10 minut

Usunięcie osłony Fmoc:

DMF 1 x 5 minut

20% piperidyna w NMP 1 x 3 minuty

20% piperydyna w NMP 1 x 8 minut

Cykl przemywań rozpuszczalnikami:

DMF 3 x 2 minuty

IsOH 3 x 2 minuty

DCM 3 x 2 minuty

b) Test chloranilowy:

Test chloranilowy polegał na przeniesieniu za pomocą łopatki, kilku ziaren żywicy z reaktora – strzykawki do szklanej ampułki, do której następnie dodano 100 μ l nasyconego roztworu p-chloranilu w toluenie i 50 μ l świeżego aldehydu octowego. Po upływie 10 minut przeprowadzono kontrolę zabarwienia ziaren.

Na tym etapie po przeprowadzeniu testu otrzymano zielone zabarwienie ziaren, które świadczyło o obecności wolnych grup aminowych. Po potwierdzeniu usunięcia osłon 9-fluorenylometoksykarbonylowych z żywicy można było przystąpić do kolejnego etapu, przyłączania pochodnej Fmoc-Pro.

b. Osadzenie Fmoc-Pro na nośniku stałym

Pierwszym etapem syntezy biblioteki peptydowej było osadzenie Fmoc-Pro na 1 g żywicy. Przed przyłączeniem pochodnej aminokwasowej przemyto żywicę używaną do reakcji następującymi rozpuszczalnikami: DMF (dimetyloformamid), DCM (chlorek metylenu) i ponownie DMF, po czym usunięto osłonę Fmoc- z grupy funkcyjnej nośnika. Jeden cykl usuwania osłony Fmoc- obejmował następujące etapy:

Usunięcie osłony Fmoc-:

20% piperydyna w NMP 1 x 3 minuty

20% piperydyna w NMP 1 x 8 minut

Przemywanie:

DMF 3 x 2 minuty

IsOH 3 x 2 minuty

DCM 3 x 2 minuty

Test chloranilowy na obecność wolnych grup aminowych.

Żywicę z wolną grupą aminową przemyto DMF. W osobnej kolbie rozpuszczono Fmoc-Pro w DMF i dodano kolejno TBTU, DMAP, a na koniec diizopropyletyloaminę (DIPEA) w następujących nadmiarach w stosunku do osadzenia polimeru: Fmoc-Pro/TBTU/DMAP/DIPEA, 3:3:2:6. Tak przygotowaną mieszaninę dodano do żywicy i mieszano przez 3 godziny. Żywicę odsączono pod zmniejszonym ciśnieniem, przemyto DMF, DCM i izopropanolem, a całą procedurę acylowania powtórzono dwa razy. Do przeprowadzenia kolejnych reakcji przyłączania Fmoc-Pro do żywicy zastosowano heksafluorofosforan-O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetrametylouroniowy (HATU), a potem heksafluorofosforan-O-(benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetrametylouroniowy (HBTU). W ostatnim etapie żywicę przemyto kolejno DMF, DCM oraz izopropanolem i suszono na powietrzu.

c. Przyłączanie kolejnych chronionych reszt aminokwasowych:

Żywicę wraz z przyłączoną resztą Fmoc-Pro znajdującą się w reaktorku przemyto za pomocą DMF, a następnie przystąpiono do deprotekcji osłony Fmoc z grupy aminowej w celu przyłączenia chronionej pochodnej aminokwasowej kwasu glutaminowego.

Usunięcie osłony Fmoc:

DMF 1 x 5 minut

20% piperydyna w NMP 1 x 3 minuty

20% piperydyna w NMP 1 x 8 minut

Cykl przemywań rozpuszczalnikami:

DMF 3 x 2 minuty

IsOH 3 x 2 minuty

DCM 3 x 2 minuty

Test chloranilowy:

W wyniku przeprowadzenia testu chloranilowego otrzymano wynik pozytywny, o czym świadczyło zielone zabarwienie ziaren żywicy. Pozwoliło to na rozpoczęcie kolejnego etapu – przyłączania reszty aminokwasowej Fmoc-Glu(OtBu)-OH.

Przyłączanie pochodnej aminokwasowej:

Wykonywane sprzęgania poprzedzono przemywaniem żywicy w DMF. Podczas przyłączania chronionej reszty kwasu glutaminowego skład mieszaniny sprzęgającej pozostawał bez zmian.

Po zakończeniu każdego z acylowań stosowano cykl przemywań rozpuszczalnikami według podanej procedury, a następnie przeprowadzono test chloranilowy na obecność wolnych grup aminowych w roztworze.

Cykl przemywań rozpuszczalnikami:

DMF 3 x 2 minuty

IsOH 3 x 2 minuty

DCM 3 x 2 minuty

Test chloranilowy:

Ziarna żywicy podczas testu przeprowadzonego po drugim acylowaniu były bezbarwne, co pozwoliło na przejście do kolejnego etapu syntezy, jakim było wprowadzenie kolejnej chronionej pochodnej aminokwasowej – leucyny i cząsteczki kwasu 2-aminobenzoowego. Procesy sprzęgania odbyły się zgodnie z procedurą omówioną wcześniej.

Testy przeprowadzone po przyłączeniu wyżej wymienionych reszt wykazały wyniki pozytywne, ziarna żywicy były bezbarwne.

d. Usuwanie peptydu z nośnika z zachowaniem osłon grup bocznych

Po zakończeniu syntezy chroniony peptyd ABZ-Leu-Glu(OtBu)-Pro-OH usunięto z nośnika wraz z zachowaniem osłon bocznych za pomocą mieszaniny: kwas octowy : TFE (trifluoroetanol) : DCM (2:2:6, v/v/v) w kolbie okrągłodennej na mieszadle magnetycznym.

Po upływie 2 godzin zawartość kolby odsączyło się pod zmniejszonym ciśnieniem na lejkach ze spiekim Schotta przemywając mieszaniną ściągającą. Roztwór przemyto heksanem (1:10 v/v), odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie poddano liofilizacji.

e. Chemiczna synteza pochodnych paranitroanilidu Val

Do syntezy Fmoc-Val-pNA wykorzystano metodę mieszanych bezwodników. W pierwszym etapie 2 mmole Fmoc-Val rozpuszczono w bezwodnym tetrahydrofuranie (THF) w obecności 2 mmoli N-metylomorfoliny (NMM). Grupa karboksylowa pochodnej aminokwasowej była aktywowana 2 mmolami chlorku izobutyli. Po 10 minutach aktywacji dodano 3 mmole p-nitroaniliny. Reakcje prowadzono przez 2 godziny w temperaturze -15°C, a następnie dobie w temperaturze pokojowej. Po skończonej reakcji rozpuszczalnik odparowano, a suchą pozostałość rozpuszczono w octanie etylu. Otrzymany roztwór przemywano kolejno nasyconym wodnym roztworem NaCl, 10% kwasem cytrynowym, 5% wodorowęglanem sodu. Otrzymany roztwór wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu, octan etylu oddestylowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a suchą pozostałość suszono w eksykatorze próżniowym nad P₂O₅ i KOH.

f. Sprzęganie chronionego peptydu z paranitroanilidem Val

Chroniony peptyd ABZ¹-Leu²-Glu(OtBu)³-Pro⁴-OH rozpuszczono w niewielkiej ilości DCM, kolejno aktywowano za pomocą TFFH (tetrametylofluoroformamid) przez 30 minut w temperaturze 0°C. Następnie dodano katalityczną ilość DMAP oraz Fmoc-Val-pNA.

Reakcję prowadzono przez 24 godziny w temperaturze pokojowej, po czym odparowano rozpuszczalnik. Otrzymany roztwór zalano mieszaniną ściągającą osłony boczne: TFA : fenol : woda : TIPS (88:5:5:2, v/v/v/v) i mieszano w kolbie okrągłodennej na mieszadle magnetycznym przez 3 godziny.

Po tym czasie do kolby dodano zimny eter dietylowy, a powstały osad odwirowano na wirówce SIGMA 2K30 (Laboratory Centrifuges) w czasie 20 minut. Osad otrzymany po wirowaniu rozpuszcza się w wodzie przy pomocy ultradźwięków, a następnie poddano liofilizacji.

Tożsamość/charakterystyka nowego związku – analiza HPLC, MS

HPLC warunki: kolumna RP Bio Wide Pore Supelco C8 250 mm 4 mm, układ faz A 0,1% TFA w wodzie, B: 80% acetonitrylu w A), przepływ 1 ml/min, detekcja UV przy 226 nm. Potwierdzono otrzymanie związku.

P r z y k ł a d 3

Badanie zastosowania nowych związków otrzymanych według przykładu 1 i 2 w diagnostyce stanów zapalnych i diagnostyce nowotworów nabłonkowych.

Badanie wykonano na grupie 130 chorych – nowotwory nabłonkowe/stan zapalny, 430 osób bez choroby nowotworowej w postaci kontroli.

Inkubacja związku o strukturze ABZ-Leu-Glu-Pro-Val-ANB-NH₂/ABZ-Leu-Glu-Pro-Val-pNA w niżej opisanych warunkach.

- 80 µl moczu pacjentów z diagnozą nowotworu nabłonka układu moczowego lub moczu od grupy kontrolnej
- 100 µl buforu (50 mM Tris-HCl, pH 8.3)

- 20 μ l substratu ABZ-Leu-Glu-Pro-Val-ANB NH_2 - NH_2 (0,5 mg/ml DMSO – dimetylosulfotlenek) lub ABZ-Leu-Glu-Pro-Val-pNA (0,5 mg/ml DMSO – dimetylosulfotlenek)
- Czas inkubacji 60 minut
- Temperatura 37°C

Przeprowadzono również badanie zastosowania markera diagnostycznego otrzymanego według przykładu 1 lub 2 do wykrywania stanu zapalnego. W tym celu marker dodawano do moczu ze zdiagnozowanym stanem zapalnym, potwierdzonym wykryciem markera stanu zapalnego jakim jest elastaza neutrofilna. W wyniku badań wykazano, że marker ten może zostać zastosowany jako marker stanu zapalnego, jak również marker stanu zapalnego i nowotworu nabłonkowego, w przypadku obecności i nowotworu i potwierdzonego stanu zapalenia. W obu przypadkach obserwowano zabarwienie – odczyt absorbancji przy długości fali około 410 nm – w zakresie 380–430 nm.

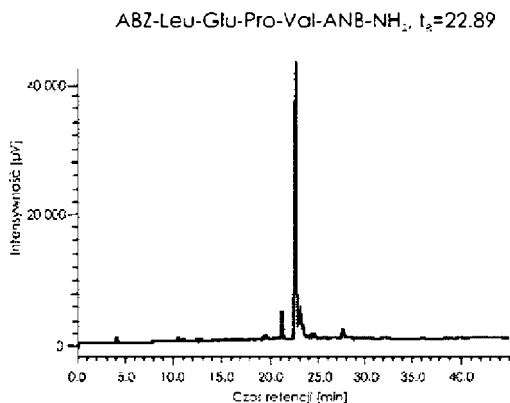
W wyniku inkubacji otrzymano następujące wyniki, których przykłady przedstawiono i opisano poniżej.

Przeprowadzono również badania użycia tych związków do wykrywania stanu zapalnego i nowotworu nabłonkowego w próbkach krwi pacjentów z rozpoznanym stanem zapalnym/nowotworem nabłonkowym. Proces pomiaru absorbancji przeprowadza się w analogiczny sposób jak opisano dla próbek moczu. Wstępne wyniki badań potwierdzają ich zastosowanie diagnostyczne również dla tego materiału biologicznego – osocza lub surowicy.

Analiza HPLC:

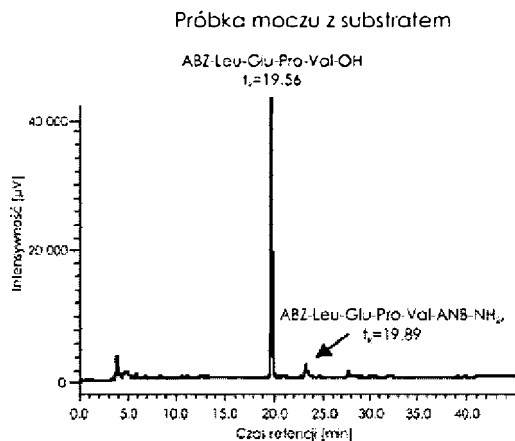
Substrat ABZ-Leu-Glu-Pro-Val-ANB NH_2

w buforze o składzie 50 mM Tris-HCl, pH 8.3



Hydroliza substratu ABZ-Leu-Glu-Pro-Val-ANB NH_2

w moczu ze zdiagnozowanym nowotworem nabłonka układu moczowego



Aktywność proteolityczna enzymów obecnych w badanym materiale biologicznym (próbki moczu ze zdiagnozowanym nowotworem) jest proporcjonalna do intensywności obserwowanego sygnału absorbancji, uwalnianego w wyniku hydrolizy wiązania peptydowego ANB. Analiza potwierdziła, że w przypadku badanych próbek hydroliza substratu $ABZ^1\text{-Leu}^2\text{-Glu}^3\text{-Pro}^4\text{-Val}^5\text{-ANB-NH}_2^6$ następuje w pozycji 5, gdzie otrzymujemy $ABZ^1\text{-Leu}^2\text{-Glu}^3\text{-Pro}^4\text{-Val}^5$ oraz $ANB\text{-NH}_2^6$. Analogicznemu procesowi ulega związek $ABZ^1\text{-Leu}^2\text{-Glu}^3\text{-Pro}^4\text{-Val}^5\text{-pNA}^6$ który uwalnia wolną cząsteczkę pNA i fragment $ABZ^1\text{-Leu}^2\text{-Glu}^3\text{-Pro}^4\text{-Val}^5\text{-OH}$.

Z wykresu – Fig. 1 odczytać możemy, że w przypadku próbek 148, 305, i 233 rozpad substratu $ABZ\text{-Leu-Glu-Pro-Val-ANB-NH}_2$ zachodzi wydajniej niż w przypadku materiałów 89, 42 czy 117. Taki rezultat może być spowodowany różnicą w aktywności, jak i ilości enzymów odpowiedzialnych za proteolizę. Identyczny obraz otrzymujemy przy zastosowaniu substratu $ABZ\text{-Leu-Glu-Pro-Val-pNA}$ – Fig. 2.

T a b e l a 1. Rodzaje inhibitorów, mechanizm ich działania oraz zastosowane stężenie efektywne

Inhibitor	Rodzaj inhibitora	Klasa hamowanych enzymów	Stężenie [M]
Carfilzomib	Nieodwracalny	proteiny treoninowe (aktywność chymotrypsynowa ludzkiego proteasomu 20S)	$1,000 \times 10^{-8}$
AHX-VYDnV ^P (C ₄ H ₂ Cl) ₂	nieodwracalny	proteiny serynowe	$4,625 \times 10^{-4}$
Bt-NI(OBzl)YDA ^P (C ₄ H ₂ Cl) ₂	nieodwracalny	proteiny serynowe	$3,215 \times 10^{-4}$
E-64	nieodwracalny	proteiny cysteinowe	$3,495 \times 10^{-4}$

Aktywność proteolityczna jest zależna od obecności określonych związków nazywanych inhibitorami (enzymów proteolitycznych). Ich inkubacja z danym materiałem biologicznym pozwala nam wstępnie określić klasę enzymów obecnych w badanych próbkach. W tym celu do połączonych próbek moczu osób chorych (nowotwór nabłonka układu moczowego) dodaliśmy efektywne stężenia hamujące określone klasy enzymów proteolitycznych.

Na aktywność enzymatyczną wpływa wiele czynników, spośród których jednym jest pH środowiska reakcji. Przeprowadzony eksperyment może wskazywać, że w badanym moczu znajdują się enzymy preferujące odmienne warunki. Obserwujemy jedno maksimum aktywności proteolitycznej, co sugeruje na obecność proteinaz przeprowadzających hydrolizę w warunkach zasadowych (fig. 3).

Użycie inhibitorów różnych klas enzymów nie spowodowało spadku aktywności proteolitycznej. Jedynie inkubacja moczu z AHX-VYDnV^P(C₄H₂Cl)₂ skutkowała całkowitym wyhamowaniem hydrolizy (fig. 4). Taki wynik mógłby sugerować obecność proteinaz serynowych, a dokładniej tych o specyficzności elastazowej. Wykonaliśmy dodatkowy eksperyment, który potwierdził, że stosowany przez nas związek $ABZ\text{-Leu-Glu-Pro-Val-ANB-NH}_2$ jest hydrolizowany przez elastazę, podczas gdy proteinaza 3 nie powoduje proteolizy. Obserwowana aktywność może świadczyć o stanie zapalnym towarzyszącym chorobie nowotworowej, jako że elastaza jest uwalniana przez neutrofile jako odpowiedź immunologiczna na stan zapalny. Carfilzomib także w pewnym stopniu hamuje proteolizę, stąd nasuwa się wniosek, że za aktywność enzymatyczną w moczu osób ze zdiagnozowaną chorobą nowotworową pęcherza moczowego odpowiada(ją) enzym(y) należący(e) do innego rodzaju niż wymienione w powyższej tabeli.

Aby zwiększyć czułość metody detekcji otrzymany materiał biologiczny (ludzki mocz ze stwierdzonym nowotworem nabłonka układu moczowego) został zagęszczony. W tym celu użyto kolumn filtracyjnych Amicon. W wyniku tego procesu otrzymaliśmy czterokrotnie zagęszczony materiał o aktywności około 2 krotnie wyższej niż materiał wyjściowy (fig. 5). Fakt liniowej odpowiedzi na wzrastające stężenie enzymu potwierdza selektywność otrzymanego przez nas związku.

Podsumowanie

Analiza potwierdziła zastosowanie związków według przykładu 1 i 2 w diagnostyce stanów zapalnych i w diagnostyce nowotworu nabłonkowego. Wstępne wyniki wskazują, że związki te mogą mieć zastosowanie do rozpoznania stanu zapalnego – odpowiedzi immunologicznej, który towarzyszy nowotworowi nabłonkowego jak również do rozpoznania dodatkowego stanu zapalnego np. wywołanego zakażeniem które towarzyszy nowotworowi lub przy braku obecności nowotworu, czyli rozpoznania samej odpowiedzi immunologicznej, która np. może prowadzić do procesu chorobowego w tym nowotworzenia.

Mechanizm działania nowych związków – markerów diagnostycznych według wynalazku polega na hydrolizie enzymatycznej w takim miejscu peptydu, w wyniku czego uwalnia się ANB-NH₂ – amid kwasu 5-amino-2-nitrobenzoesowego lub pNA, który wykazuje absorbancję przy długości fali 300–500 nm, zwłaszcza 380–430 nm.

Zastrzeżenia patentowe

1. Związek o wzorze ogólnym:
ABZ¹-Leu²-Glu³-Pro⁴-Val⁵-X⁶,
gdzie: ABZ oznacza kwas 2-aminobenzoesowy, X to oznacza ANB-NH₂ lub pNA, przy czym ANB-NH₂ oznacza amid kwasu 5-amino-2-benzoesowego, pNA oznacza 4-nitroanilinę.
2. Sposób otrzymywania związku
ABZ¹-Leu²-Glu³-Pro⁴-Val⁵-ANB-NH₂⁶
gdzie: ABZ oznacza kwas 2-aminobenzoesowy, ANB-NH₂ oznacza amid kwasu 5-amino-2-benzoesowego, **znamienny tym**, że związek otrzymuje się w syntezie na nośniku stałym i sposób prowadzi się w następujących etapach:
 - a) przygotowanie żywicy umożliwiającej przekształcenie kwasu w amid,
 - b) deprotekcja grupy ochronnej,
 - c) osadzenie kwasu 5-amino-2-nitrobenzoesowego ANB,
 - d) powtarzanie etapów od b) do c) aż do momentu uzyskania związku, przy czym syntezę prowadzi się od reszty 6 do 1, a następnie odszczepia się otrzymany peptyd od żywicy.
3. Sposób otrzymywania związku
ABZ¹-Leu²-Glu³-Pro⁴-Val⁵-pNA⁶
gdzie: ABZ oznacza kwas 2-aminobenzoesowy, pNA oznacza 4-nitroanilinę, **znamienny tym**, że związek otrzymuje się w syntezie na nośniku stałym i sposób prowadzi się w następujących etapach:
 - a) przygotowanie żywicy 2-chlorochlorotrylowej,
 - b) deprotekcja grupy ochronnej,
 - c) osadzenie Pro⁴ na żywicy,
 - d) powtarzanie etapów od b) do c) aż do momentu uzyskania ABZ-Leu-Glu-Pro,
 - e) odszczepienie otrzymanego peptydu od żywicy,
 - f) otrzymanie paranitroanilidu aminokwasu (Val-pNA),
 - g) sprzęganie paranitroanilidu z chronionym peptydem (ABZ-Leu-Glu-Pro + Val- pNA),
 - h) usunięcie osłon grup bocznych aminokwasów.
4. Marker diagnostyczny o wzorze ogólnym
ABZ¹-Leu²-Glu³-Pro⁴-Val⁵-X⁶
gdzie: ABZ oznacza kwas 2-aminobenzoesowy, X to oznacza ANB-NH₂ lub pNA, przy czym ANB-NH₂ oznacza amid kwasu 5-amino-2-benzoesowego, pNA oznacza 4-nitroanilinę do zastosowania w diagnostyce stanu zapalnego i/lub nowotworu.
5. Sposób diagnozowania nowotworu nabłonkowego i/lub procesu zapalnego w materiale biologicznym ssaka, **znamienny tym**, że jako marker diagnostyczny stosuje się co najmniej jeden związek według zastrzeżenia 1, przy czym co najmniej jeden związek dodaje się do materiału biologicznego, a następnie dokonuje się pomiaru absorbancji przy długości fali w zakresie od 300 do 500 nm.
6. Sposób według zastrz. 5, **znamienny tym**, że pomiaru absorbancji dokonuje się przy długości fali 380–430 nm.

Rysunki

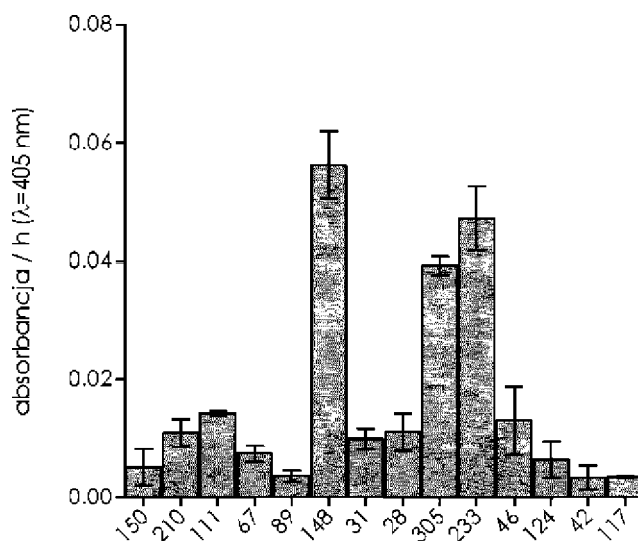


Fig.1 – przedstawia szybkość hydrolizy substratu ABZ-Leu-Glu-Pro-Val-ANB-NH₂ w próbkach moczu ze zdiagnozowanym nowotworem. Cyfry arabskie oznaczają numer losowo wybranej próbki moczu.

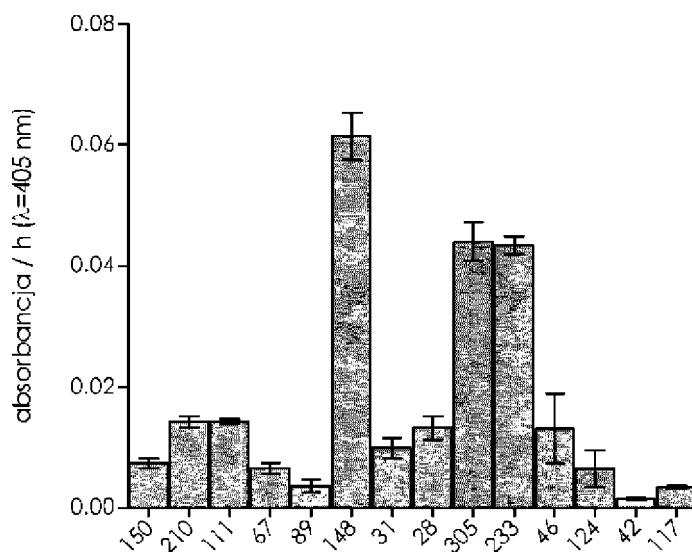


Fig.2 - przedstawia szybkość hydrolizy substratu ABZ-Leu-Glu-Pro-Val-pNA w próbkach moczu ze zdiagnozowanym nowotworem. Cyfry arabskie oznaczają numer losowo wybranej próbki moczu.

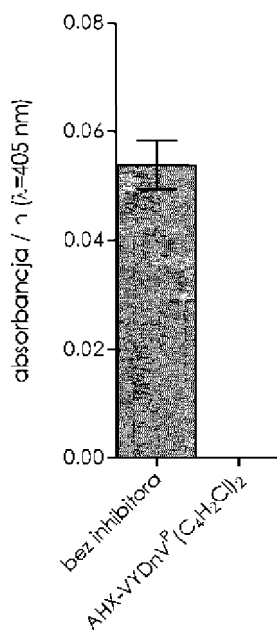


Fig.3 – przedstawia szybkości hydrolizy substratu ABZ-Leu-Glu-Pro-Val-ANB-NH₂ w zależności od obecności inhibitora ludzkiej elastazy neutrofilnej, który to enzym jest markerem stanu zapalnego, w próbce ludzkiego moczu ze stwierdzonym stanem zapalnym i/lub nowotworem nabłonka układu moczowego.

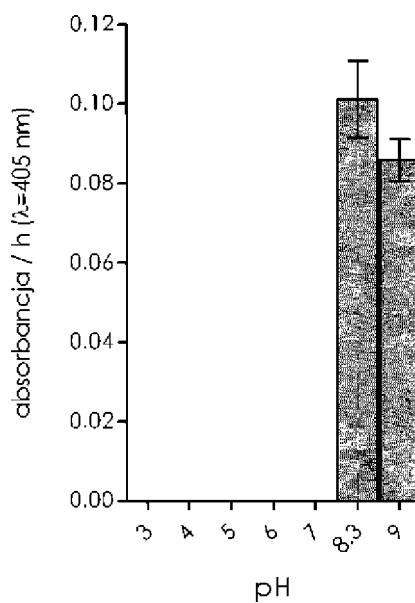


Fig.4 – przedstawia zależność stopnia hydrolizy substratu ABZ-Leu-Glu-Pro-Val-ANB NH₂ od środowiska pH

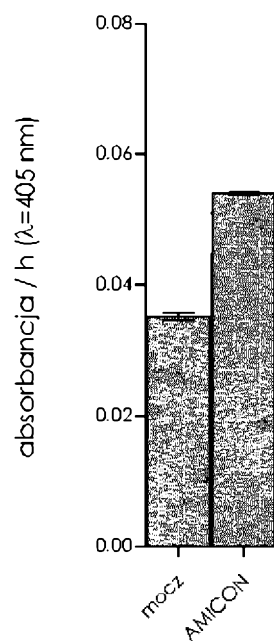


Fig.5 – przedstawia wydajności hydrolizy substratu ABZ-Leu-Glu-Pro-Val-ANB NH₂ w zależności od stopnia zagęszczenia ludzkiego moczu ze stwierdzonym nowotworem nabłonka układu moczowego.