

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 245425 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **441568**

(22) Data zgłoszenia: **2022.06.28**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2024.01.03 BUP 01/2024**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.07.29 WUP 31/2024**

(51) MKP:

G01N 33/574 (2006.01)

C12Q 1/37 (2006.01)

G01N 33/542 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

C07K 5/10 (2006.01)

- | | |
|--|---|
| | <p>(73) Uprawniony z patentu: URTESTE SPÓŁKA AKCYJNA, Gdańsk, PL</p> <p>(72) Twórca(-y) wynalazku: ADAM LESNER, Pępowo, PL NATALIA GRUBA, Kębłowo, PL</p> <p>(74) Pełnomocnik: rzecz. pat. Marta Kawczyńska, Warszawa, PL</p> |
|--|---|

(54) Tytuł:

Związek – marker diagnostyczny raka trzonu macicy, sposób wykrywania aktywności enzymatycznej, sposób diagnozowania raka trzonu macicy, zestaw zawierający taki związek oraz związek do zastosowania medycznego

PL 245425 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest nowy związek chemiczny – marker diagnostyczny – do zastosowania medycznego, dokładniej w diagnostyce nowotworowej, w szczególności w diagnostyce raka trzonu macicy. Przedmiotem wynalazku jest także sposób *in vitro* wykrywania aktywności enzymatycznej obecnej w płynie ustrojowym osobnika, w szczególności pochodzącej z komórek raka trzonu macicy, z użyciem takiego związku, sposób *in vitro* diagnozowania raka trzonu macicy, z użyciem takiego związku, zestaw zawierający taki związek, taki związek do zastosowania medycznego, dokładniej do zastosowania do wykrywania aktywności enzymatycznej swoistej dla raka trzonu macicy, taki związek do zastosowania do diagnozowania raka trzonu macicy oraz taki związek do zastosowania jako marker diagnostyczny raka trzonu macicy.

Stan techniki

W roku 2020 na raka trzonu macicy (inaczej raka błony śluzowej trzonu macicy lub raka endometrium) zachorowało na świecie 417 tys. pacjentek i był on szóstym najczęstszym nowotworem złośliwym kobiet. Rak błony śluzowej trzonu macicy w 75% przypadków występuje po menopauzie. Najważniejszy wpływ na rozwój raka trzonu macicy wywiera długotrwałe pobudzenie endometrium przez estrogeny, przy jednoczesnym niedoborze progestagenów.

Do czynników ryzyka raka trzonu macicy należą: otyłość, niepłodność, brak potomstwa, brak aktywności fizycznej, stosowanie leków o działaniu agonistycznym wobec receptora estrogenowego, wczesna pierwsza miesiączka, późna ostatnia miesiączka, występowanie cykli bezowulacyjnych, cukrzyca, przerost endometrium, obciążenia rodzinne, zespół Lyncha. Objawy raka trzonu są nie specyficzne i mają najczęściej charakter nieregularnych i obfitych ropnych upławów, plamień i krwawień. Krwawienie może być związane z rakiem trzonu macicy, ale również z patologicznym rozrostem endometrium. W badaniu ginekologicznym wraz z badaniem per rectum stwierdza się cechy krwawienia z dróg rodnych. Podstawowym badaniem obrazowym jest ultrasonografia przezpochwowa. Wskazaniem do zabiegu żyłeczki jest przekroczenie grubości endometrium 12 cm, ponieważ w takich przypadkach zachodzi podejrzenie nowotworu lub stanu przednowotworowego. Rozpoznanie zostaje potwierdzone przez wynik badania histopatologicznego materiału uzyskanego po wyłżeczowaniu jamy macicy.

Rak trzonu macicy cechuje się dość dobrym rokowaniem, które zależy przede wszystkim od stopnia zaawansowania choroby oraz wieku i ogólnego stanu zdrowia pacjentki. Im wcześniej wykryty jest ten nowotwór, tym większa szansa na jego trwałe wyleczenie. 5-letnie przeżycie w przypadku wcześniej wykrytych przypadków przekracza 90%, natomiast w zaawansowanych stadiach wynosi jedynie 20%.

Nie ma żadnego badania laboratoryjnego, w tym również „markera nowotworowego”, ani zestawu badań, które pozwalałyby na wczesne i pewne rozpoznanie raka trzonu macicy. Podejmowane są próby stosowania markerów CA-125 oraz HE4 jako markerów predykcyjnych, natomiast ze względu na niski poziom ich czułości i swoistości nie zaleca się stosowania tych markerów do testów diagnostycznych do wykrywania, w tym wczesnego, raka trzonu macicy.

Wiadomo, że proces inicjacji, wzrostu i przerzutowania komórek nowotworu złośliwego przebiega przy udziale wielu czynników, w tym wielu enzymów, w szczególności enzymów hydrolitycznych, zwłaszcza proteolitycznych. Takie enzymy katalizują rozpad enzymatyczny (hydrolityczny lub proteolityczny) białek i peptydów na mniejsze ich fragmenty. Proces ten umożliwia komórkom nowotworowym rozrost przez kolonizację nowych tkanek, wzmożenie procesu tworzenia naczyń krwionośnych (angiogenezy), co umożliwia efektywne dostarczanie substancji odżywczych do guza nowotworowego. Ponadto, enzymy te powstają także w wyniku obumierania komórek zdrowych na skutek procesu rozrostu guza. Wszystkie te procesy tworzą charakterystyczny i swoisty profil aktywności enzymatycznej (proteolitycznej) komórek nowotworowych, charakterystyczny dla guza nowotworowego.

Znane są w dziedzinie chromogeniczne cząsteczki peptydowe, które ulegają rozpadowi enzymatycznemu na mniejsze fragmenty z powstaniem zmiany lub wzrostu zabarwienia badanego roztworu, ten efekt chromogeniczny jest następstwem uwalniania chromoforu (np. 4-anilidu lub kwasu 2-amino-benzoowego) z chromogenicznej cząsteczki peptydowej.

Tego typu chromogeniczne cząsteczki peptydowe i ich zastosowania znane są, przykładowo, z publikacji autorstwa Erlanger BF, Kokowsky N, Cohen W., „The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin”, Arch Biochem Biophys., listopad 1961; 95: 271–8 oraz Hojo K,

Maeda M, Iguchi S, Smith T, Okamoto H, Kawasaki K. Amino acids and peptides, XXXV. "Facile preparation of p-nitroanilide analogs by the solid-phase method", Chem Pharm Bull (Tokyo), listopad 2000; 48(11): 1740-4.

Jak dotąd nie opisano jednak zastosowania tej klasy związków w diagnostyce raka trzonu macicy.

W stanie techniki znane są także sposoby otrzymywania peptydów chromogenicznych polegające na przyłączaniu poszczególnych elementów składowych w odpowiednich warunkach czasowych i stechiometrycznych. Taki proces przyłączania składa się z kolejnych etapów, w których poszczególne elementy (pochodne aminokwasowe) są przyłączane, pozostałości odmywane i kolejno grupy ochronne usuwane i ponownie przemywane. Taki cykl powtarzany jest dla każdej reszty aminokwasowej. Otrzymany peptyd oddzielany jest od żywicy poprzez reakcję w warunkach kwasowych. Kolejno roztwór oddzielany jest od żywicy w procesie sączenia, a następnie z otrzymanego roztworu peptyd wytrącany jest rozpuszczalnikiem niepolarnym.

W stanie techniki nie są znane jednakże ani chromogeniczne związki peptydowe odpowiednie do swoistego i wczesnego diagnozowania raka trzonu macicy, ani sposoby ich otrzymywania.

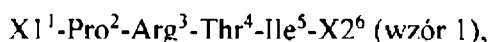
W dziedzinie istnieje zatem pilne zapotrzebowanie na „marker nowotworowy” raka trzonu macicy, który pozwalałby na wczesne, czułe i swoiste rozpoznanie raka trzonu macicy w sposób nieinwazyjny i wiarygodny oraz na sposoby diagnostyczne i sposoby leczenia wykorzystujące taki marker diagnostyczny.

Celem wynalazku jest zatem dostarczenie nowego, swoistego markera diagnostycznego raka trzonu macicy oraz sposobów diagnostycznych wykorzystujących taki marker do bezinwazyjnego, szybkiego, czułego, swoistego, wczesnego wykrywania raka trzonu macicy, który byłby odpowiedni także do badań przesiewowych, a także sposobów leczenia wykorzystujących taki marker.

Cele te zrealizowano dzięki wynalazkom zdefiniowanym w załączonych zastrzeżeniach patentowych, przy czym korzystne jego warianty zostały zdefiniowane w zastrzeżeniach zależnych.

Krótki opis wynalazku

Przedmiotem niniejszego wynalazku jest związek o wzorze 1:



przy czym X1 zawiera cząsteczkę C1 lub składa się z takiej cząsteczki, a X2 zawiera cząsteczkę C2 lub składa się z takiej cząsteczki,

przy czym parę cząsteczek C1 i C2 stanowi para donora fluorescencji i akceptora fluorescencji, i przy czym związek ten ulega rozpadowi enzymatycznemu na fragmenty X1-Pro-Arg-Thr-Ile-OH (fragment 1) oraz X2 (fragment 2) z powstawaniem mierzalnego sygnału optycznego poprzez separację przestrzenną cząsteczek C1 i C2.

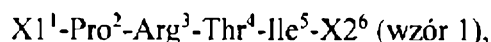
Taki związek według wynalazku ulega korzystnie rozpadowi hydrolitycznemu, korzystniej proteolitycznemu.

Korzystnie w związku według wynalazku para cząsteczek C1 i C2 jest wybrana jest z grupy składającej się z: kwasu 2-aminobezoesowego (ABZ)/kwasu 5-amino-2-nitrobenzoesowego (ANB), (ABZ)/pNA, ABZ/ANB-NH₂, ABZ/DNP, ABZ/EDDNP, EDANS/DABCYL, TAM/DANSYL, ABZ/Tyr(3-NO₂), korzystniej parę C1 i C2 stanowi (ABZ)/pNA lub ABZ/ANB-NH₂.

Korzystnie związek według wynalazku stanowi związek o wzorze 2: ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-ANB-NH₂ (wzór 2) lub związek o wzorze 3: ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-pNA (wzór 3). Korzystniej związek według wynalazku ulega rozpadowi hydrolitycznemu z powstaniem następującego fragmentu 1: ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-OH oraz fragmentu 2: ANB-NH₂.

Przedmiotem wynalazku jest ponadto sposób *in vitro* wykrywania aktywności enzymatycznej obecnej w płynie ustrojowym osobnika pochodzącej z komórek raka trzonu macicy, obejmujący:

a) kontaktowanie próbki płynu ustrojowego ze związkiem o wzorze 1:



przy czym X1 zawiera cząsteczkę C1 lub składa się z takiej cząsteczki, a X2 zawiera cząsteczkę C2 lub składa się z takiej cząsteczki,

przy czym parę cząsteczek C1 i C2 stanowi para donora fluorescencji i akceptora fluorescencji, i przy czym wspomniany związek ulega rozpadowi enzymatycznemu na fragmenty X1-Pro-Arg-Thr-Ile-OH (fragment 1) oraz X2 (fragment 2), i

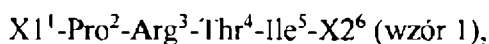
b) wykrywanie mierzalnego sygnału optycznego, który powstaje poprzez separację przestrzenną cząsteczek C1 i C2.

W takim sposobie wykrywania aktywności enzymatycznej według wynalazku aktywność enzymatyczną stanowi korzystnie aktywność hydrolityczna, korzystnie aktywność proteolityczna.

W takim sposobie wykrywania aktywności enzymatycznej według wynalazku jako wspomniany związek korzystnie stosuje się związek o wzorze 2: ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-ANB-NH₂ (wzór 2) lub związek o wzorze 3: ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-pNA (wzór 3).

W takim sposobie wykrywania aktywności enzymatycznej według wynalazku jako wspomniany płyn ustrojowy stosuje się mocz, korzystnie mocz ludzki.

Przedmiotem wynalazku jest także sposób *in vitro* diagnozowania raka trzonu macicy, w którym wykrywa się obecność lub nieobecność raka trzonu macicy u osobnika poprzez pomiar w próbce płynu ustrojowego od osobnika badanego aktywności enzymatycznej swoistej dla raka trzonu macicy, przy czym brak wspomnianej aktywności enzymatycznej wskazuje na nieobecność raka trzonu macicy, zaś obecność wspomnianej aktywności enzymatycznej wskazuje na obecność raka trzonu macicy, i przy czym do pomiaru wspomnianej aktywności enzymatycznej stosuje się związek o wzorze 1:



przy czym X1 zawiera cząsteczkę C1 lub składa się z takiej cząsteczki, a X2 zawiera cząsteczkę C2 lub składa się z takiej cząsteczki,

przy czym parę cząsteczek C1 i C2 stanowi para donora fluorescencji i akceptora fluorescencji, i przy czym wspomniany związek ulega rozpadowi enzymatycznemu na fragmenty X1-Pro-Arg-Thr-Ile-OH (fragment 1) oraz X2 (fragment 2) z powstawaniem mierzalnego sygnału optycznego poprzez separację przestrzenną cząsteczek C1 i C2

W takim sposobie wykrywania / diagnozowania raka trzonu macicy według wynalazku wykrywanie aktywności enzymatycznej przeprowadza się sposobem wykrywania aktywności enzymatycznej jak określono powyżej.

W takim sposobie wykrywania / diagnozowania raka trzonu macicy według wynalazku wspomnianą próbkę płynu ustrojowego korzystnie inkubuje się ze wspomnianym związkiem w buforze pomiarowym o pH obojętnym lub pH zasadowym, korzystnie fizjologicznym, w zakresie proporcji 1:2 do 1:10 korzystnie 1:5 próbki do buforu pomiarowego.

W takim sposobie wykrywania / diagnozowania raka trzonu macicy według wynalazku wspomniany związek korzystnie stosuje się w stężeniu 0,1–10 mg/ml, w szczególności 0,25–7,5 mg/ml.

W takim sposobie wykrywania / diagnozowania raka trzonu macicy według wynalazku jako wspomniany związek korzystnie stosuje się związek o wzorze 2: ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-ANB-NH₂ lub związek o wzorze 3: ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-pNA.

W takim sposobie wykrywania / diagnozowania raka trzonu macicy według wynalazku jako wspomnianą próbkę korzystnie stosuje się próbkę moczu, korzystnie moczu ludzkiego.

W takim sposobie wykrywania / diagnozowania raka trzonu macicy według wynalazku pomiar wspomnianej aktywności enzymatycznej korzystnie obejmuje pomiar intensywności absorbancji w zakresie 300–500 nm, korzystnie 380–430 nm, w szczególności 405 nm, w czasie 40–60 minut, w temperaturze z przedziału 25–40°C, korzystnie 36–38°C.

Przedmiotem wynalazku jest ponadto zestaw zawierający dowolny związek według wynalazku jak określono powyżej i bufor pomiarowy.

W takim zestawie według wynalazku związek korzystnie stanowi związek o wzorze 2: ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-ANB-NH₂ lub związek o wzorze 3: ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-pNA.

Przedmiotem wynalazku jest także dowolny związek według wynalazku jak określono powyżej do zastosowania do wykrywania aktywności enzymatycznej swoistej dla raka trzonu macicy.

Przedmiotem wynalazku jest również dowolny związek według wynalazku jak określono powyżej do zastosowania do diagnozowania raka trzonu macicy.

Korzystnie w takim zastosowaniu diagnozowanie raka trzonu macicy obejmuje wykrywanie pierwotnego raka trzonu macicy, wykrywanie choroby resztkowej po resekcji chirurgicznej raka trzonu macicy i/lub wykrywanie wznowy raka trzonu macicy.

Korzystnie związek w takich zastosowaniach według wynalazku stanowi związek o wzorze 2: ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-ANB-NH₂ lub związek o wzorze 3: ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-pNA.

Przedmiotem wynalazku jest ponadto dowolny związek według wynalazku jak określono powyżej do zastosowania jako marker diagnostyczny do wykrywania raka trzonu macicy. Korzystnie taki związek do zastosowania jako marker diagnostyczny według wynalazku stanowi związek o wzorze 2: ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-ANB-NH₂ lub związek o wzorze 3: ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-pNA.

Zgodnie z wynalazkiem opisano tu ponadto sposób leczenia raka trzonu macicy, w którym

- a) wykrywa się obecność aktywności enzymatycznej swoistej dla raka trzonu macicy dowolnym sposobem jak określono powyżej w próbce płynu ustrojowego od osobnika badanego, i
- b) gdy we wspomnianej próbce stwierdzi się występowanie wspomnianej aktywności enzymatycznej, podejmuje się leczenie raka trzonu macicy u osobnika.

W takim sposobie leczenia, po zakończeniu leczenia zgodnie z punktem b), można przeprowadzić monitorowanie wspomnianej aktywności enzymatycznej swoistej dla raka trzonu macicy w określonych odstępach czasu.

W takim sposobie leczenia jako próbkę można stosować próbkę moczu, na przykład moczu ludzkiego.

W takim sposobie leczenia jako wspomniany związek można stosować związek o wzorze 2: ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-ANB-NH₂ lub związek o wzorze 3: ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-pNA.

Szczegółowy opis wynalazku

Należy rozumieć, że niniejszy wynalazek jest zdefiniowany w załączonych zastrzeżeniach. Niniejszy opis ilustruje różne, nieograniczające, wykonania wynalazku i przykłady jego realizacji. Niniejszy wynalazek nie ogranicza się do jakiegokolwiek konkretnej metodologii, protokołu czy odczynników stosowanych do jego realizacji, o ile nie wskazano inaczej. Zastosowane pojęcia oraz określenia naukowe i techniczne mają znaczenia powszechnie znane i stosowane przez specjalistów w dziedzinie niniejszego wynalazku. Dla wyjaśnienia jednak następujące określenia i skróty zastosowane w opisie i zastrzeżeniach patentowych, należy rozumieć następująco:

Związek chromogeniczny lub inaczej cząsteczka chromogeniczna oznacza związek posiadający właściwości chromogeniczne. Właściwości chromogeniczne oznaczają zdolność związku do tworzenia produktu barwnego.

Związek fluorescencyjny lub inaczej cząsteczka fluorogeniczna oznacza związek posiadający właściwości fluorogeniczne. Właściwości fluorogeniczne oznaczają zdolność związku do tworzenia produktu emitującego fluorescencję.

NMP to *N*-metylopirolidon; DMF to dimetyloformamid; DCM to chlorek metylenu, inaczej dichlometan; pNA to 4-nitroanilina, inaczej para-nitroanilina; ABZ to kwas 2-aminobezoesowy, ANB-NH₂ to amid kwasu 5-amino-2-nitrobenzoowego; Boc to grupa tert-butyloksykarbonylowa; Fmoc to grupa 9-fluorenylometoksykarbonylowa; zaś TFA to kwas trifluorooctowy.

W kontekście niniejszego wynalazku pojęcie rak trzonu macicy należy rozumieć jako rak (nowotwór złośliwy) pierwotny trzonu macicy rozwijający się z tkanek znajdujących się w macicy. Rakiem trzonu macicy jest najczęściej gruczolak endometrialny (ok. 90%); rzadziej surowiczy jasnokomórkowy. Stosowane tu pojęcie rak trzonu macicy obejmuje zatem wszelkie nowotwory złośliwe trzonu macicy rozwijające się z tkanek znajdujących się w macicy, tj. z tkanek znajdujących się w trzonie macicy.

W kontekście niniejszego wynalazku pojęcie diagnozowanie raka trzonu macicy należy rozumieć jako rozpoznanie tej choroby, w szczególności na jej wczesnym etapie, na którym inne metody diagnostyczne są zbyt mało czułe i/lub swoiste. W stosowanym tu znaczeniu diagnozowanie raka trzonu macicy obejmuje także wykrywanie choroby resztkowej po chirurgicznym wycięciu raka trzonu macicy oraz wykrywanie wznowy raka trzonu macicy po wcześniej zakończonym leczeniu raka trzonu macicy.

W kontekście niniejszego wynalazku pojęcie leczenie raka trzonu macicy należy rozumieć jako leczenie na wczesnym etapie rozwoju choroby, pozwalające na istotne wydłużenie czasu przeżycia oraz poprawę jakości życia chorych.

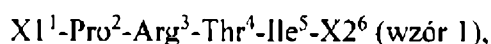
W kontekście niniejszego wynalazku pojęcie monitorowanie należy rozumieć jako diagnostykę choroby resztkowej (ang. Minimal Residual Disease (MRD)) – obecności małej liczby przetrwałych w organizmie (w trakcie leczenia lub w remisji) komórek nowotworowych, w ilościach niewykrywanych standardowo stosowanymi metodami diagnostycznymi.

W kontekście niniejszego wynalazku pojęcie osobnik należy rozumieć jako człowieka lub ssaka, u którego podejrzewa się występowanie raka trzonu macicy, ewentualnie jako człowieka lub ssaka należącego do grupy zwiększonego ryzyka wystąpienia raka trzonu macicy, albo człowieka lub ssaka po

resekcji raka trzonu macicy, lub po zakończonym leczeniu raka trzonu macicy. Osobnikiem jest korzystnie człowiek.

Związki według wynalazku mają właściwości chromogeniczne dzięki obecności chromofora oraz fluorogeniczne, tj. zawierają cząsteczki donora i akceptora fluorescencji. Dzięki swojej budowie, opracowanej w taki sposób, że obserwowany jest wzrost barwy w przedziale długości fali 380–440 nm swoiście w wyniku kontaktu badanej próbki płynu ustrojowego od osobnika badanego z rakiem trzonu macicy, a jednocześnie nie jest obserwowany taki efekt w reakcji z próbką płynu ustrojowego osobnika zdrowego lub z diagnozą innego typu nowotworu, związki te pozwalają na wykrywanie aktywności enzymatycznej swoistej dla raka trzonu macicy, a w szczególności diagnozowanie raka trzonu macicy w sposób swoisty i czuły, również na wczesnym etapie rozwoju tego raka. Osobnikiem badanym jest korzystnie człowiek. Płynem ustrojowym jest korzystnie mocz, korzystnie ludzki.

W pierwszym aspekcie niniejszego wynalazku dostarczony jest nowy związek chemiczny o wzorze 1:



przy czym X1 stanowi pochodna aminokwasowa lub fragment peptydowy zawierający cząsteczkę C1 lub X1 składa się z takiej cząsteczki C1, a X2 stanowi pochodna aminokwasowa lub fragment peptydowy zawierający cząsteczkę C2 lub X1 składa się z takiej cząsteczki C2, przy czym parę cząsteczek C1 i C2 stanowi para donora fluorescencji i akceptora fluorescencji. Cyfry w indeksie górnym oznaczają kolejne pozycje reszt w związku według wynalazku oraz kolejność ich dołączania podczas syntezy. Zgodnie z niniejszym wynalazkiem można w tym kontekście wymiennie stosować także zapis wzoru 1 bez podawania numeracji reszt. Rdzeń wszystkich związków według wynalazku stanowi tetrapeptyd o wskazanej sekwencji 4 aminokwasów (Pro-Arg-Thr-Ile), którą przedstawiono także w Wykazie sekwencji jako sekwencję nr 1.

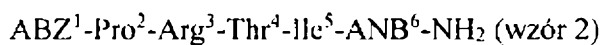
Związek według ulega rozpadowi enzymatycznemu na fragmenty X1-Pro-Arg-Thr-Ile-OH (fragment 1) oraz X2 (fragment 2) z powstawaniem mierzalnego sygnału optycznego poprzez separację przestrzenną cząsteczek C1 i C2. Taki mierzalny sygnał optyczny jest mierzony sposobem pomiaru zmiany absorpcji/fluorescencji po rozpadzie enzymatycznym związku. Korzystnie cząsteczki C1 i C2 są rozdzielone od siebie nie więcej niż 10 resztami aminokwasowymi, co zapewnia wydajne wygaszanie donora fluorescencji przez akceptor fluorescencji. Dla znawcy oczywistym jest, że kluczowym czynnikiem jest odległość pomiędzy donorem i akceptorem fluorescencji. Zatem, w przypadkach, gdy sekwencja aminokwasowa oddzielająca cząsteczkę C1 i C2 jest zwinięta w skręconą lub skondensowaną strukturę drugorzędową, skutkującą zbliżeniem cząsteczek C1 i C2 w stosunku do struktury pierwszorzędowej, odległość między cząsteczkami C1 i C2 może być większa niż 10 reszt aminokwasowych.

Taki związek, dzięki swoim właściwościom chromogenicznym oraz posiadaniu miejsca reaktywnego w pozycji 5 pozwalającego na rozpad enzymatyczny (korzystnie proteolityczny) na mniejsze fragmenty, jest szczególnie odpowiedni do stosowania go jako marker diagnostyczny, w szczególności swoisty marker diagnostyczny raka trzonu macicy, w szczególności do zastosowania we wczesnym wykrywaniu raka trzonu macicy.

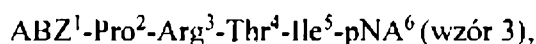
W korzystnych wykonaniach związek według wynalazku ulega rozpadowi hydrolitycznemu, korzystnie proteolitycznemu.

W korzystnych wykonaniach para cząsteczek C1 i C2 jest wybrana jest z grupy składającej się z: kwasu 2-aminobenzoesowego (ABZ)/kwasu 5-amino-2-nitrobenzoesowego (ANB), (ABZ)/pNA, ABZ/ANB-NH₂, ABZ/DNP, ABZ/EDDNP, EDANS/DABCYL, TAM/DANSYL, ABZ/TyrO-NO₂, przy czym korzystnie parę cząsteczek C1 i C2 stanowi ABZ/pNA lub ABZ/ANB-NH₂.

W korzystnych wykonaniach związek według wynalazku stanowi: związek o wzorze 2:



, lub związek o wzorze 3:



w których ABZ oznacza kwas 2-aminobenzoowy, ANB-NH₂ oznacza amid kwasu 5-amino-2-nitrobenzoowego, zaś pNA oznacza 4-anilinę.

Taki związek ulega korzystniej rozpadowi hydrolytycznemu z powstaniem następującego fragmentu 1: ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-OH oraz fragmentu 2: ANB-NH₂ w przypadku związku o wzorze 2, zaś w przypadku związku o wzorze 3 z powstaniem następującego fragmentu 1: ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-OH oraz fragmentu 2: pNA. Fragmenty 2 stanowią zatem chromofory w postaci wolnej.

Separacja przestrzenna cząsteczek C1 i C2 będąca następstwem rozpadu enzymatycznego związku według wynalazku powoduje powstanie mierzalnego sygnału optycznego, ponieważ fluorescencja emitowana z donora fluorescencji nie jest już wygaszana przez akceptor fluorescencji. Taki mierzalny sygnał optyczny można wykrywać korzystnie przy długości fali 300–500 nm, korzystnie 380–430 nm.

Związki według wynalazku można otrzymywać znanymi sposobami. Przykładowo można je otrzymać z zastosowaniem sposobu otrzymywania peptydów chromogenicznych polegającego na prowadzeniu procesu na nośniku w postaci żywicy, posiadającej grupę Fmoc, którą usuwa się w trakcie prowadzenia reakcji. Przykładowo może to być żywica amidowa, np. TentaGel S RAM lub RinkAmide, ale można także zastosować dowolną inną żywicę dostępną na rynku. Używana żywica do prowadzenia tego procesu powinna zostać odpowiednio przygotowana. Przygotowanie tej żywicy polega na zwiększeniu jej objętości poprzez wielokrotne przemywanie rozpuszczalnikami hydrofobowymi. Korzystnie stosuje się żywicę o osadzeniu 0,23 mmol/g. Z żywicy tej należy usunąć grupę ochronną Fmoc poprzez przemywanie 20% roztworem rozpuszczalnika.

Następnie, znane procesy otrzymywania peptydów chromogenicznych obejmują przyłączanie poszczególnych elementów składowych w odpowiednich warunkach czasowych i stechiometrycznych. Ten proces przyłączania składa się z kolejnych etapów, w których poszczególne elementy (pochodne aminokwasowe) są przyłączane, pozostałości odmywane i kolejno grupy ochronne usuwane i ponownie przemywane. Taki cykl powtarzany jest dla każdej reszty aminokwasowej. Otrzymany peptyd oddzielany jest od żywicy poprzez reakcję w warunkach kwasowych. Następnie roztwór oddzielany jest od żywicy w procesie sączenia, a następnie z otrzymanego roztworu peptyd wytrącany jest rozpuszczalnikiem niepolarnym. Uzyskany w ten sposób osad peptydu jest wirowany.

Przykładowy, szczegółowy ale nieograniczający, sposób syntezy związków według wynalazku opisano poniżej i w Przykładzie 1 poniżej.

Sposób syntezy związków według wynalazku polega na tym, że proces prowadzi się na nośniku w postaci żywicy, korzystnie posiadającej grupę Fmoc, przy czym nośnik przed rozpoczęciem procesu przygotowuje się poprzez zwiększenie jego objętości przez wielokrotne przemywanie rozpuszczalnikami hydrofobowymi, korzystnie dimetyloformamidem, chlorkiem metylenu lub N-metylopirolidone, i usunięcie grupy ochronnej Fmoc, korzystnie poprzez przemywanie 10–30% roztworem piperidyny, w rozpuszczalnikach, takich jak dimetyloformamid, chlorek metylenu lub N-metylopirolidon.

Następnie przeprowadza się sposób w kolejnych etapach:

- a) osadzenie kwasu 5-amino-2-nitrobenzoowego ANB (lub innego chromoforu odpowiedniego do zastosowania zgodnie z wynalazkiem jak zdefiniowano w zastrzeżeniach) na żywicy poprzedza się przemyciem nośnika 3–6% roztworem N-metylomorfoliny (NMM) w DMF, a następnie DMF, po czym przygotowuje się roztwór ANB w DMF, do którego dodaje się kolejno TBTU, DMAP, a na koniec diizopropylodietylaminę (DIPEA) w następujących nadmiarach w stosunku do osadzenia polimeru: ANB/TBTU/DMAP/DIPEA, 3:3:2:6, tak przygotowaną mieszaninę dodaje się do żywicy i miesza się do uzyskania jednorodności, po czym żywicę odsącza się pod zmniejszonym ciśnieniem i przemywa rozpuszczalnikami, takimi jak DMF, DCM i izopropanolem, a następnie kontynuuje się przyłączanie ANB do żywicy poprzez zastosowanie heksafluorofosforanu *O*-(7-azabenzotriazol-1-ilo)-*N,N,N',N'*-tetrametylouroniowego (HATU), a potem heksafluorofosforanu *O*-(benzotriazol-1-ilo)-*N,N,N',N'*-tetrametylouroniowego (HBTU) w ilościach nadmiarowych, a po zakończeniu przemywa się nośnik kolejno DMF, DCM oraz izopropanolem i łagodnie suszy się;
- b) przyłączanie reszty aminokwasowej do ANB prowadzi się poprzez reakcję z pochodną aminokwasową Fmoc-Ile-OH, przy czym co najmniej pięciokrotny nadmiar molowy pochodnej aminokwasowej w stosunku do żywicy rozpuszcza się w bezwodnej piperidynie i kontaktuje się z żywicą z osadzonym ANB, po czym całość chłodzi się do temperatury nie niższej niż -20°C, a następnie dodaje się POCl₃ w stosunku 1:1 do użytej ilości pochodnej aminokwasowej i całość miesza się, po czym proces mieszania prowadzi się w temperaturze pokojowej,

a następnie w podwyższonej temperaturze, zaś po zakończeniu reakcji żywicę odsącza się pod zmniejszonym ciśnieniem, przemywa się DMF oraz MeOH i łagodnie suszy się, po czym uzyskany związek przejściowy poddaje się procesowi acylowania przyłączając kolejno fragment Pro-Arg-Thr;

- c) acylowanie uzyskanego związku przejściowego prowadzi się przy zastosowaniu pochodnej aminokwasowej, korzystnie Fmoc-Thr(tBu)-OH, i kolejno Fmoc-Arg(Pbf)-OH, następnie Fmoc-Pro-OH i w końcowym etapie syntezy Boc-Abz-OH, przy czym acylowanie prowadzi się etapowo od reszty 6 do 1 z wykorzystaniem diizopropylkarbodiimidu jako środka sprzęgającego, który stosuje się w nadmiarze, a po zakończeniu każdego etapu żywicę przemywa się DMF, i korzystnie podaje testowi chloroanilowemu (test na obecność wolnych grup aminowych), w którym monitoruje się przyłączenia pochodnej aminokwasowej;
- d) usunięcie grupy ochronnej Fmoc prowadzi się poprzez przemywanie roztworem 10–30% piperidyny w DMF i kolejnymi przemywaniami każdym z rozpuszczalników: DMF, izopropanolem i chlorkiem metylenu,
- e) odszczepianie peptydu od żywicy przeprowadza się stosując mieszaninę TFA:fenol:woda:TIPS przy zachowaniu stosunków odpowiednio 88:5:5:2 v/v/v/v, przy czym mieszaninę miesza się przez okres co najmniej jednej godziny, korzystnie trzy godziny, a uzyskany osad odsącza się pod zmniejszonym ciśnieniem, po czym przemywa się eterem dietylowym i uzyskany peptyd odwirowuje się;
- f) przygotowanie gotowego produktu przeprowadza się poprzez rozpuszczenie peptydu w wodzie przy pomocy ultradźwięków, a następnie poddaje liofilizacji.

W drugim aspekcie niniejszego wynalazku dostarczony jest sposób *in vitro* wykrywania aktywności enzymatycznej, korzystnie proteolitycznej, obecnej w płynie ustrojowym osobnika, w szczególności pochodzącej z komórek raka trzonu macicy, obejmujący a) kontaktowanie próbki płynu ustrojowego ze związkiem według wynalazku i b) wykrywanie mierzalnego sygnału optycznego, który powstaje poprzez separację przestrzenną cząsteczek obecnych w związku według wynalazku C1 i C2. W korzystnym wykonaniu tego aspektu osobnikiem badanym jest w takim przypadku człowiek, W innym korzystnym wykonaniu tego aspektu płynem ustrojowym jest mocz, w szczególności ludzki.

W korzystnym wykonaniu tego aspektu stosuje się związek o wzorze 2: ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-ANB-NH₂ lub związek o wzorze 3: ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-pNA.

W trzecim aspekcie niniejszego wynalazku dostarczony jest sposób *in vitro* diagnozowania raka trzonu macicy, w którym wykrywa się obecność lub nieobecność raka trzonu macicy u osobnika poprzez pomiar w próbce płynu ustrojowego od osobnika badanego aktywności enzymatycznej, swoistej dla raka trzonu macicy, przy czym brak wspomnianej aktywności enzymatycznej wskazuje na nieobecność raka trzonu macicy, zaś obecność wspomnianej aktywności enzymatycznej wskazuje na obecność raka trzonu macicy, i przy czym do pomiaru w próbce płynu ustrojowego od osobnika badanego aktywności enzymatycznej jak określono powyżej stosuje się dowolny związek według wynalazku jak określono powyżej.

Takie wykrywanie aktywności enzymatycznej korzystnie przeprowadza się z zastosowaniem sposobów wykrywania aktywności enzymatycznej jak omówiono powyżej. W korzystnym wykonaniu tego aspektu osobnikiem jest człowiek. W korzystnym wykonaniu tego aspektu płynem ustrojowym jest mocz, w szczególności ludzki. W korzystnym wykonaniu tego aspektu aktywność enzymatyczną swoistą dla raka trzonu macicy stanowi aktywność proteolityczna. W korzystnym wykonaniu tego aspektu stosuje się związek o wzorze 2: ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-ANB-NH₂ lub związek o wzorze 3: ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-pNA.

Ponadto, w korzystnym wykonaniu tego aspektu pomiar wspomnianej aktywności enzymatycznej w sposobach według wynalazku obejmuje pomiar intensywności absorbancji w zakresie 300–500 nm, korzystnie 380–430 nm, zwłaszcza 405 nm, w czasie 40–60 minut, w temperaturze w zakresie 25–40°C, korzystnie 36–38°C. Dzięki, czemu otrzymuje się maksymalnie intensywny mierzalny sygnał optyczny wynikający ze wzrostu absorbancji lub fluorescencji.

Ponadto, w korzystnych wykonaniach wspomnianych sposobów według wynalazku prowadzi się pomiar wspomnianej aktywności enzymatycznej z zastosowaniem związku według wynalazku w zakresie stężeń 0,1–10 mg/ml, korzystnie w stężeniu 1 mg/ml. W korzystnych wykonaniach wspomnianych sposobów według wynalazku badaną próbkę inkubuje się ze związkiem według wynalazku w buforze pomiarowym o pH obojętnym lub zasadowym, korzystnie fizjologicznym,

z próbką płynu ustrojowego, korzystnie ludzkiego moczu, w zakresie proporcji 1:2 do 1:10, korzystnie 1:5 próbki (np. moczu) do buforu pomiarowego. Próbka korzystnie pochodzi od osoby skierowanej do diagnozy raka trzonu macicy. Korzystnie mierzy się intensywność absorbancji w zakresie 300–500 nm, korzystnie 380–430 nm, zwłaszcza 405 nm, w czasie 40–60 minut, w temperaturze w zakresie 25–40°C, korzystnie 36–38°C. W powyższych warunkach otrzymujemy maksymalnie intensywny mierzalny sygnał optyczny wynikający ze wzrostu absorbancji lub fluorescencji.

W czwartym aspekcie niniejszy wynalazek dostarcza zestaw zawierający dowolny związek według wynalazku i bufor pomiarowy. Bufory pomiarowe znane są w dziedzinie, przy czym odpowiedni do zastosowania w zestawie według wynalazku bufor to na przykład, ale nieograniczająco, bufor Tris-HCl. W korzystnym wykonaniu w takim zestawie według wynalazku wspomniany związek stanowi związek o wzorze 2: ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-ANB-NH₂ lub związek o wzorze 3: ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-pNA.

W piątym aspekcie niniejszy wynalazek dostarcza związek według wynalazku do zastosowania do wykrywania aktywności enzymatycznej swoistej dla raka trzonu macicy.

W szóstym aspekcie niniejszy wynalazek dostarcza związek według wynalazku do zastosowania do diagnozowania raka trzonu macicy. Korzystnie diagnozowanie raka trzonu macicy obejmuje zgodnie z wynalazkiem wykrywanie pierwotnego raka trzonu macicy, wykrywanie choroby resztkowej po resekcji chirurgicznej raka trzonu macicy i/lub wykrywanie wznowy raka trzonu macicy po zakończonym wcześniej leczeniu raka trzonu macicy.

W siódmym aspekcie niniejszy wynalazek dostarcza związek według wynalazku do zastosowania jako marker diagnostyczny do wykrywania raka trzonu macicy. W korzystnych wykonaniach tego aspektu takim związkiem jest związek o wzorze 2: ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-ANB-NH₂ lub związek o wzorze 3: ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-pNA.

Opisano tu również sposób leczenia raka trzonu macicy, w którym

- a) wykrywa się obecność aktywności enzymatycznej swoistej dla raka trzonu macicy dowolnym sposobem według wynalazku jak określono powyżej w próbce płynu ustrojowego od osobnika badanego, i
- b) gdy we wspomnianej próbce stwierdza się występowanie wspomnianej aktywności enzymatycznej, podejmuje się leczenie raka trzonu macicy u osobnika.

W jednym wariantcie takiego sposobu leczenia po zakończeniu leczenia zgodnie z punktem b), można przeprowadzać monitorowanie wspomnianej aktywności enzymatycznej swoistej dla raka trzonu macicy w określonych odstępach czasu jak wiadomo w dziedzinie, np. co tydzień, co kilka tygodni, co miesiąc, co kilka miesięcy, co rok lub w dowolnych innych odstępach uznanych przez specjalistę za stosowne, celem wykrywania choroby resztkowej po resekcji chirurgicznej raka trzonu macicy lub pojawienia się wznowy. Ponadto, w innym wariantcie takiego sposobu leczenia jako próbkę do badania można stosować próbkę moczu, korzystnie moczu ludzkiego. W innym wariantcie takiego sposobu leczenia jako wspomniany związek można stosować związek o wzorze 2: ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-ANB-NH₂ (wzór 2) lub związek o wzorze 3: ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-pNA (wzór 3).

Zalety niniejszego wynalazku polegają na dostarczeniu nowego związku chemicznego o właściwościach sprawiających, że nadaje się on do zastosowania do czułego i swoistego wykrywania aktywności enzymatycznej swoistej dla raka trzonu macicy, do zastosowania jako biomarker diagnostyczny do wykrywania raka trzonu macicy, do zastosowania do szybkiego, bezinwazyjnego diagnozowania raka trzonu macicy, pozwalającego przy tym na wykrywanie raka trzonu macicy na wczesnym etapie jego rozwoju. Kolejną zaletą jest to, że sposoby diagnostyczne według wynalazku mogą być z powodzeniem stosowane w badaniach przesiewowych. Daje to możliwość wykonania pełnej diagnostyki na wczesnym etapie rozwoju nowotworu i w konsekwencji skuteczniejszego leczenia. Wczesne rozpoznanie daje możliwość leczenia operacyjnego, które znacząco wydłuża przeżycie pacjenta. Jest to także istotne w przypadku monitorowania skuteczności przeprowadzonego leczenia chirurgicznego i/lub chemioterapeutycznego raka trzonu macicy, dzięki możliwości wykrywania choroby resztkowej lub ewentualnej wznowy.

Niniejszy wynalazek zostanie teraz zilustrowany na poniższych figurach i w poniższych przykładach, które jednak nie mają na celu ograniczenia w żaden sposób zakresu wynalazku zdefiniowanego w zastrzeżeniach patentowych.

Krótki opis figur

Fig. 1 przedstawia wyniki analizy chromatograficznej rozpadu substratu, tj. ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-ANB-NH₂, w próbce moczu od osobnika z rakiem trzonu macicy.

Fig. 2 przedstawia stopień hydrolizy substratu – ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-ANB-NH₂ – w próbkach moczu ze zdiagnozowanym rakiem trzonu macicy (próbki T1-T20) i moczu pochodzących od osób zdrowych (21–40). Cyfry arabskie oznaczają numer wybranej próbki moczu.

Fig. 3 przedstawia selektywność hydrolizy substratu – ABZ¹-Pro²-Arg³-Thr⁴-Ile⁵-ANB⁶-NH₂ (tj. związku o wzorze 2) w próbkach moczu ze zdiagnozowanym rakiem trzonu macicy (próbka 1) i moczu pochodzącym od osób z diagnozą innej choroby nowotworowej (próbki 2–9). Cyfry arabskie oznaczają numery poszczególnych rodzajów nowotworów. Badane próbki dla każdego rodzaju nowotworu pochodziły od 20 różnych pacjentów dla każdego z badanych nowotworów. Wyniki oznaczają średnie wartości dla poszczególnych rodzajów nowotworów. Wyniki te wykazują selektywność rozpadu substratu wobec moczu pacjentów z rakiem trzonu macicy względem próbek moczu od pacjentów chorych na inne nowotwory.

Fig. 4 przedstawia zależność stopnia hydrolizy substratu, tj. ABZ¹-Pro²-Arg³-Thr⁴-Ile⁵-ANB⁶-NH₂, od środowiska pH.

Przykłady

Wynalazek ilustrują następujące przykłady wykonania, niestanowiące jednak jego ograniczenia. O ile nie wskazano inaczej, w poniższych przykładach stosowano znane i/lub komercyjnie dostępne urządzenia, metody, warunki reakcji, odczynniki i zestawy, takie jakie powszechnie stosuje się w dziedzinie, do której należy niniejszy wynalazek i jakie są zalecane przez wytwórców odpowiednich odczynników i zestawów.

Przykład 1: Synteza związku według wynalazku

W przykładzie tym przedstawiono syntezę reprezentatywnego związku według niniejszego wynalazku, mianowicie związku: ABZ¹-Pro²-Arg³-Thr⁴-Ile⁵-ANB⁶-NH₂. Pozostałe peptydy według wynalazku można zsyntetyzować w analogiczny sposób. Cyfry w indeksie górnym oznaczają kolejne pozycje reszt w związku według wynalazku oraz kolejność ich dołączania podczas syntezy. Związki według wynalazku można zamiennie przedstawiać analogicznym wzorem bez podawania pozycji reszt, co nie zmienia kolejności reszt w związkach według wynalazku, gdyż pozostaje ona bez zmian.

I. 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 ABZ¹-Pro²-Arg³-Thr⁴-Ile⁵-ANB⁶-NH₂, gdzie ABZ oznacza kwas 2-aminobenzoowy, a ANB-NH₂ oznacza 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-Pro, Fmoc-Arg(Pbf), Fmoc-Thr(tBu) Fmoc-Ile.

Syntezę związku według wynalazku, który może być stosowany jako marker diagnostyczny do wykrywania raka trzonu macicy, prowadzono na nośniku stałym umożliwiającym przekształcenie kwasu 5-amino-2-benzoowego w amid ANB-NH₂, mianowicie żywicy amidowej TentaGel S RAM firmy RAPP Polymere (Niemcy) o osadzeniu 0,23 mmol/g. Można jednakże zastosować dowolną inną żywicę amidową, np. Rink Amide (Niemcy). Syntezę związku prowadzono w sposób manualny z zastosowaniem wytrząsarki laboratoryjnej. Przez większość etapów reaktorami była strzykawka zakończona spiekami 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-aminobenzoowy (ABZ), zaś w pozycji 6, czyli na C-końcu, cząsteczkę kwasu 5-amino-2-nitrobenzoowego (ANB). ABZ pełni tu rolę donora fluorescencji, natomiast ANB – kwas 5-amino-2-benzoowy pełni rolę wygaszacza fluorescencji i jednocześnie chromoforu. Peptydy w swojej sekwencji zawierały co najmniej i korzystnie jedno miejsce reaktywne zlokalizowane pomiędzy resztami aminokwasowymi Pro-ANB-NH₂, tj. 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 piperydiny 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; IsOU 1 x 10 minut; DCM 1 x 10 minut.

Usunięcie osłony Fmoc:

DMF 1 x 5 minut; 20% piperydina w NMP 1 x 3 minuty; 20% piperydina 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 łopatki, kilku ziaren żywicy z reaktora – strzykawką – 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 peptydu 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% piperydina w NMP 1 x 3 minuty; 20% piperydina w NMP 1 x 8 minut.

e) Przemycanie

DMF 3 x 2 minuty; IsOH 3 x 2 minuty; DCM 3 x 2 minuty.

f) Test chloranilowy:

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 dodano kolejno TBTU, DMAP, a na koniec diizopropylodietylaminy (DIPEA) w następujących nadmiarach w stosunku do osadzenia polimeru: ANB/TBTU/DMAP/DIPEA, 3:3:2:6 v/v/v/v. 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-ilo)-*N,N,N',N'*-tetrametylouroniowy (HATU), a potem heksafluorofosforan-*O*-(benzotriazol-1-ilo)-*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 (Fmoc-Ile-OH) 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(Fmoc-Thr(*t*Bu)).

Wszystkie przyłączania reszt aminokwasowych poprzedzono przemywaniem żywicy za pomocą DMF przez 5 minut. W kolejnych przyłączaniach stosowano diizopropylodietylaminy 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 przyłączonym fragmentem ANB-Ile – znajdującą się w reaktorku przemyto za pomocą DMF, a następnie przystąpiono do deprotekcji osłony Fmoc z grupy aminowej w celu przyłączenia chronionej pochodnej aminokwasowej Thr.

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-Arg(Pbf)-OH.

Przyłączanie pochodnej aminokwasowej:

Wykonywane sprzęgania poprzedzono przemywaniem żywicy w DMF. Podczas przyłączania chronionej reszty seryny skład mieszaniny sprzęgającej pozostawał bez zmian. Po zakończeniu każdego z acyloowań 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 acyloowaniu były bezbarwne, co pozwoliło na przejście do kolejnego etapu syntezy, jakim było wprowadzenie kolejnej chronionej pochodnej aminokwasowej – Fmoc-Pro 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 żywiej były bezbarwne.

2. Usuwanie peptydu z nośnika

Po zakończeniu syntezy amid peptydu ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-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 odsączono 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 rozpuszczano w wodzie przy pomocy ultradźwięków, a następnie poddano liofilizacji. W analogiczny sposób można przeprowadzić otrzymywanie pozostałych związków według niniejszego wynalazku.

Potwierdzenie tożsamości/charakterystykę nowego związku według wynalazku przeprowadzono z zastosowaniem analizy HPLC. Warunki tej analizy HPLC były następujące: 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.

Przeprowadzona analiza potwierdziła otrzymanie związku według wynalazku.

Przykład 2: Badanie właściwości związku według wynalazku jako markera nowotworowego

Badanie aktywności nowych związków według wynalazku wykonano na grupie 20 chorych z diagnozą raka trzonu macicy z wykorzystaniem reprezentatywnego związku według wynalazku. Mechanizm działania związków według wynalazku, w tym reprezentatywnego związku o wzorze 2, polega na swoistym rozpadzie enzymatycznym, dokładniej hydrolizie enzymatycznej, w takim miejscu, które prowadzi do uwolnienia wolnych cząsteczek chromoforów, odpowiednio, ANB-NH₂ (amidu kwasu 5-amino-2-nitrobenzoowego) w przypadku związku o wzorze 2 lub pNA (para nitro anilidu) w przypadku związku o wzorze 3, które wykazują absorbancję przy długości fali 320–480 nm, zwłaszcza 380–430 nm,

w szczególności 405 nm. Pozostałe związki według wynalazku cechują się analogicznym mechanizmem działania. W tym celu reprezentatywny związek według wynalazku, ABZ¹-Pro²-Arg³-Thr⁴-Ile⁵-ANB⁶-NH₂, rozpuszczono w dimetylosulfotlenku (w stężeniu 0,5 mg/ml), a następnie 50 µl takiego roztworu zmieszano z 120 µl buforu (200 mM Tris-HCl, pH 8,0) i 80 µl moczu osoby chorej na raka trzonu macicy. Pomiar wykonano w płytce 96 dołkowej przeznaczonej do pomiaru absorbancji, a każdą próbkę analizowano w trzech powtórzeniach w temperaturze 37°C. Czas trwania pomiaru wynosił 60 minut. W czasie pomiaru monitorowano długość fali charakterystyczną dla uwalniającego się chromoforu (ANB-NH₂) przy długości fali 405 nm (zakres 380–430 nm).

Jak pokazano na Fig. 1 analiza RP HPLC losowo wybranego systemu zawierającego mocz pochodzący od osoby z diagnozą raka trzonu macicy wskazuje na to, że związek według wynalazku rozpada się na fragment peptydowy ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-OH i grupę chromoforową związku (ANB-NH₂).

W wyniku pomiaru wzrost zabarwienia roztworu w czasie zaobserwowano we wszystkich próbkach moczu pochodzących od osób z diagnozą raka trzonu macicy. Obserwowana wielkość wzrostu absorbancji w czasie jest różna dla każdej z badanych próbek. Odmienny efekt uzyskano dla 20 próbek osób zdrowych, gdyż w żadnej z 20 badanych próbek moczu nie zaobserwowano wzrostu absorbancji w zakresie diagnostycznym.

Przeprowadzane badania wskazują, że wszystkie próbki T1-T20 od osób chorych na raka trzonu macicy uległy rozpadowi, lecz w przypadku próbek T1 i T15 rozpad substratu, tj. ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-ANB-NH₂, zachodził mniej wydajnie niż w przypadku próbek T2 czy T19 (Tabela 1, Fig. 2). Taki rezultat może być spowodowany różnicą w aktywności, jak i ilości enzymów odpowiedzialnych za rozpad enzymatyczny (proteolizę). Ponadto wyniki przedstawione w poniższej Tabeli 1 wskazują, że inkubacja roztworu substratu – związku według wynalazku – z próbkami moczu pochodzącymi od osób zdrowych (bez zdiagnozowanego nowotworu, oznaczone cyframi arabskimi kolejno od 21 do 40) nie prowadzi do wzrostu absorbancji, a zatem nie zachodzi hydroliza badanego związku. Wynik wskazuje na brak obecności enzymów proteolitycznych swoistych / charakterystycznych dla raka trzonu macicy.

Tabela 1. Wyniki analizy absorbancji

| | | | |
|-----|----------|----------|----------|
| T1 | 0,006600 | 0,006000 | 0,006500 |
| T2 | 0,052000 | 0,042000 | 0,051000 |
| T3 | 0,008700 | 0,008800 | 0,008600 |
| T4 | 0,006900 | 0,005100 | 0,006700 |
| T5 | 0,044000 | 0,038000 | 0,042000 |
| T6 | 0,037000 | 0,022000 | 0,028000 |
| T7 | 0,003000 | 0,007000 | 0,005200 |
| T8 | 0,014000 | 0,022000 | 0,015000 |
| T9 | 0,008800 | 0,010100 | 0,009200 |
| T10 | 0,009000 | 0,009300 | 0,008500 |
| T11 | 0,012300 | 0,011200 | 0,014500 |
| T12 | 0,021600 | 0,021000 | 0,019900 |
| T13 | 0,004500 | 0,005200 | 0,004800 |
| T14 | 0,005000 | 0,006100 | 0,005800 |
| T15 | 0,001700 | 0,001500 | 0,002100 |
| T16 | 0,007900 | 0,008400 | 0,007200 |

| | | | |
|-----|----------|----------|----------|
| T17 | 0,000550 | 0,006500 | 0,005900 |
| T18 | 0,007300 | 0,006800 | 0,007500 |
| T19 | 0,055000 | 0,051000 | 0,048000 |
| T20 | 0,007700 | 0,007500 | 0,008100 |
| 21 | 0,000000 | 0,000000 | 0,000000 |
| 22 | 0,000000 | 0,000000 | 0,000000 |
| 23 | 0,000000 | 0,000000 | 0,000000 |
| 24 | 0,000000 | 0,000000 | 0,000000 |
| 25 | 0,000000 | 0,000000 | 0,000000 |
| 26 | 0,000000 | 0,000000 | 0,000000 |
| 27 | 0,000000 | 0,000000 | 0,000000 |
| 28 | 0,000000 | 0,000000 | 0,000000 |
| 29 | 0,000000 | 0,000000 | 0,000000 |
| 30 | 0,000000 | 0,000000 | 0,000000 |
| 31 | 0,000000 | 0,000000 | 0,000000 |
| 32 | 0,000000 | 0,000000 | 0,000000 |
| 33 | 0,000000 | 0,000000 | 0,000000 |
| 34 | 0,000000 | 0,000000 | 0,000000 |
| 35 | 0,000000 | 0,000000 | 0,000000 |
| 36 | 0,000000 | 0,000000 | 0,000000 |
| 37 | 0,000000 | 0,000000 | 0,000000 |
| 38 | 0,000000 | 0,000000 | 0,000000 |
| 39 | 0,000000 | 0,000000 | 0,000000 |
| 40 | 0,000000 | 0,000000 | 0,000000 |

Ponadto, przeprowadzono badania selektywności rozpadu substratu, tj. związku według wynalazku, w zależności od badanego raka. Wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono na Fig. 3 i wskazują one, że badany substrat, tj. $ABZ^1-Pro^2-Arg^3-Thr^4-Ile^5-ANB^6-NH_2$, inkubowany z próbkami pochodzącymi od pacjentów z diagnozą poszczególnych nowotworów: raka żołądka, płuca, nerki, prostaty, pęcherza moczowego, trzustki, jajnika i wątroby nie rozpada się i nie powoduje wzrostu absorbancji we wskazanym zakresie. Badane próbki każdorazowo stanowiły mieszaninę 20 próbek otrzymanych dla każdego z badanych nowotworów. Wskazuje to na selektywność rozpadu związków według wynalazku, która sprawia, że nadają się one do swoistego wykrywania aktywności enzymatycznej swoistej wobec raka trzonu macicy oraz swoistego diagnozowania raka trzonu macicy.

W tabeli 2 poniżej przedstawiono wyniki pomiarów uzyskane dla trzech powtórzeń każdej z próbek.

Tabela 2. Wyniki analizy selektywności rozpadu

| | | | |
|----------------|---------|---------|--------|
| trzon macicy 1 | 0,05416 | 0,06476 | 0,0487 |
| nerka 2 | 0 | 0 | 0 |
| płuco 3 | 0 | 0 | 0 |
| jelito 4 | 0 | 0 | 0 |
| prostate 5 | 0 | 0 | 0 |
| żołądek 6 | 0 | 0 | 0 |
| trzustka 7 | 0 | 0 | 0 |
| jajnik 8 | 0 | 0 | 0 |
| wątroba 9 | 0 | 0 | 0 |

Ponadto przeprowadzono pomiary zależności aktywności proteolitycznej reprezentatywnego związku według wynalazku od odczynu środowiska reakcji. W wyniku tego eksperymentu stwierdzono, że w badanym materiale występuje co najmniej jeden enzym wykazujący maksimum aktywności w pH zasadowym (Fig. 4).

Przeprowadzone analizy potwierdziły przydatność związków według wynalazku w czułym i swoistym wykrywaniu aktywności enzymatycznej swoistej dla raka trzonu macicy, a tym samym ich przydatności także do swoistego diagnozowania raka trzonu macicy, jak również jako markera diagnostycznego raka trzonu macicy. Mechanizm działania związków według wynalazku polega na ich swoistym rozpadzie enzymatycznym w takiej pozycji, która prowadzi do uwolnienia wolnych cząsteczek chromoforów, co powoduje powstanie mierzalnego sygnału optycznego, który można wykorzystywać do celów diagnostycznych, w szczególności w diagnozowaniu raka trzonu macicy zgodnie z niniejszym wynalazkiem.

WYKAZ SEKWENCJI

<110> URTESTE S.A

<120> Nowy marker diagnostyczny raka trzonu macicy

<130> 17P50707PL00

<160> 1

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

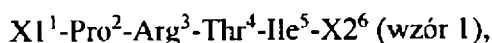
<400> 1

Pro Arg Thr Ile

1

Zastrzeżenia patentowe

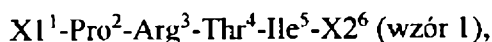
1. Związek o wzorze 1:



przy czym X1 zawiera cząsteczkę C1 lub składa się z takiej cząsteczki, a X2 zawiera cząsteczkę C2 lub składa się z takiej cząsteczki,

przy czym parę cząsteczek C1 i C2 stanowi para donora fluorescencji i akceptora fluorescencji, i przy czym związek ten ulega rozpadowi enzymatycznemu na fragmenty X1-Pro-Arg-Thr-Ile-OH (fragment 1) oraz X2 (fragment 2) z powstawaniem mierzalnego sygnału optycznego poprzez separację przestrzenną cząsteczek C1 i C2.

2. Związek według zastrzeżenia 1, który to związek ulega rozpadowi hydrolitycznemu, korzystnie proteolitycznemu.
3. Związek według zastrzeżenia 1 albo 2, w którym to związku para cząsteczek C1 i C2 jest wybrana z grupy składającej się z: kwasu 2-aminobezoesowego (ABZ)/kwasu 5-amino-2-nitrobenzoesowego (ANB), (ABZ)/pNA, ABZ/ANB-NH₂, ABZ/DNP, ABZ/EDDNP, EDANS/-/DABCYL, TAM/DANSYL, ABZ/Tyr(3-NO₂), korzystnie parę C1 i C2 stanowi ABZ/pNA lub ABZ/ANB-NH₂.
4. Związek według jednego z zastrzeżeń 1 do 3, który to związek stanowi związek o wzorze 2: ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-ANB-NH₂ (wzór 2) lub związek o wzorze 3: ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-pNA (wzór 3).
5. Związek według zastrzeżenia 4, który to związek ulega rozpadowi hydrolitycznemu z powstaniem następującego fragmentu 1: ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-OH oraz fragmentu 2: ANB-NH₂.
6. Sposób *in vitro* wykrywania aktywności enzymatycznej obecnej w płynie ustrojowym osobnika pochodzącej z komórek raka trzonu macicy, obejmujący:
- a) kontaktowanie próbki płynu ustrojowego ze związkiem o wzorze 1:

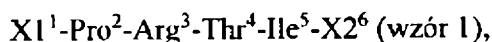


przy czym X1 zawiera cząsteczkę C1 lub składa się z takiej cząsteczki, a X2 zawiera cząsteczkę C2 lub składa się z takiej cząsteczki,

przy czym parę cząsteczek C1 i C2 stanowi para donora fluorescencji i akceptora fluorescencji, i przy czym wspomniany związek ulega rozpadowi enzymatycznemu na fragmenty X1-Pro-Arg-Thr-Ile-OH (fragment 1) oraz X2 (fragment 2), i

b) wykrywanie mierzalnego sygnału optycznego, który powstaje poprzez separację przestrzenną cząsteczek C1 i C2.

7. Sposób *in vitro* według zastrzeżenia 6, w którym aktywność enzymatyczną stanowi aktywność hydrolityczna, korzystnie aktywność proteolityczna.
8. Sposób *in vitro* według zastrzeżenia 6 albo 7, w którym jako wspomniany związek stosuje się związek o wzorze 2: ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-ANB-NH₂ (wzór 2) lub związek o wzorze 3: ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-pNA (wzór 3).
9. Sposób według jednego z zastrz. 6 do 8, w którym jako wspomniany płyn ustrojowy stosuje się mocz, korzystnie mocz ludzki.
10. Sposób *in vitro* diagnozowania raka trzonu macicy, w którym wykrywa się obecność lub nieobecność raka trzonu macicy u osobnika poprzez pomiar w próbce płynu ustrojowego od osobnika badanego aktywności enzymatycznej swoistej dla raka trzonu macicy, przy czym brak wspomnianej aktywności enzymatycznej wskazuje na nieobecność raka trzonu macicy, zaś obecność wspomnianej aktywności enzymatycznej wskazuje na obecność raka trzonu macicy, i przy czym do pomiaru wspomnianej aktywności enzymatycznej stosuje się związek o wzorze 1:



przy czym X1 zawiera cząsteczkę C1 lub składa się z takiej cząsteczki, a X2 zawiera cząsteczkę C2 lub składa się z takiej cząsteczki,

przy czym parę cząsteczek C1 i C2 stanowi para donora fluorescencji i akceptora fluorescencji,

i przy czym wspomniany związek ulega rozpadowi enzymatycznemu na fragmenty X1-Pro-Arg-Thr-Ile-OH (fragment 1) oraz X2 (fragment 2) z powstawaniem mierzalnego sygnału optycznego poprzez separację przestrzenną cząsteczek C1 i C2.

11. Sposób według zastrz. 10, w którym wykrywanie aktywności enzymatycznej przeprowadza się sposobem jak określono w jednym z zastrz. 6 do 9.
12. Sposób według jednego z zastrz. 10 do 11, w którym wspomnianą próbkę płynu ustrojowego inkubuje się ze wspomnianym związkiem w buforze pomiarowym o pH obojętnym lub pH zasadowym, korzystnie fizjologicznym, w zakresie proporcji 1:2 do 1:10 korzystnie 1:5 próbki do buforu pomiarowego.
13. Sposób według jednego z zastrz. 10 do 12, w którym wspomniany związek stosuje się w stężeniu 0,1–10 mg/ml, w szczególności 0,25–7,5 mg/ml.
14. Sposób według zastrz. 10 do 13, w którym jako wspomniany związek stosuje się związek o wzorze 2: ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-ANB-NH₂ (wzór 2) lub związek o wzorze 3: ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-pNA (wzór 3).
15. Sposób według jednego z zastrz. 10 do 14, w którym jako wspomnianą próbkę stosuje się próbkę moczu, korzystnie moczu ludzkiego.
16. Sposób według jednego z zastrz. 10 do 15, w którym pomiar wspomnianej aktywności enzymatycznej obejmuje pomiar intensywności absorbancji w zakresie 300–500 nm, korzystnie 380–430 nm, w szczególności 405 nm, w czasie 40–60 minut, w temperaturze z przedziału 25–40°C, korzystnie 36–38°C.
17. Zestaw zawierający związek jak określono w jednym z zastrz. 1 do 5 i bufor pomiarowy.
18. Zestaw według zastrz. 17, w którym związek stanowi związek o wzorze 2: ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-ANB-NH₂ (wzór 2) lub związek o wzorze 3: ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-pNA (wzór 3).
19. Związek jak określono w jednym z zastrz. 1 do 5 do zastosowania do wykrywania aktywności enzymatycznej swoistej dla raka trzonu macicy.
20. Związek jak określono w jednym z zastrz. 1 do 5 do zastosowania do diagnozowania raka trzonu macicy.
21. Związek do zastosowania według zastrzeżenia 20, w którym diagnozowanie raka trzonu macicy obejmuje wykrywanie pierwotnego raka trzonu macicy, wykrywanie choroby resztkowej po resekcji chirurgicznej raka trzonu macicy i/lub wykrywanie wznowy raka trzonu macicy.
22. Związek do zastosowania według jednego z zastrz. 19–21, w którym związek stanowi związek o wzorze 2: ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-ANB-NH₂ (wzór 2) lub związek o wzorze 3: ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-pNA (wzór 3).
23. Związek jak określono w jednym z zastrz. 1 do 5 do zastosowania jako marker diagnostyczny do wykrywania raka trzonu macicy.
24. Związek do zastosowania według zastrz. 23, który to związek stanowi związek o wzorze 2: ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-ANB-NH₂ (wzór 2) lub związek o wzorze 3: ABZ-Pro-Arg-Thr-Ile-pNA (wzór 3).

Rysunki

Fig. 1

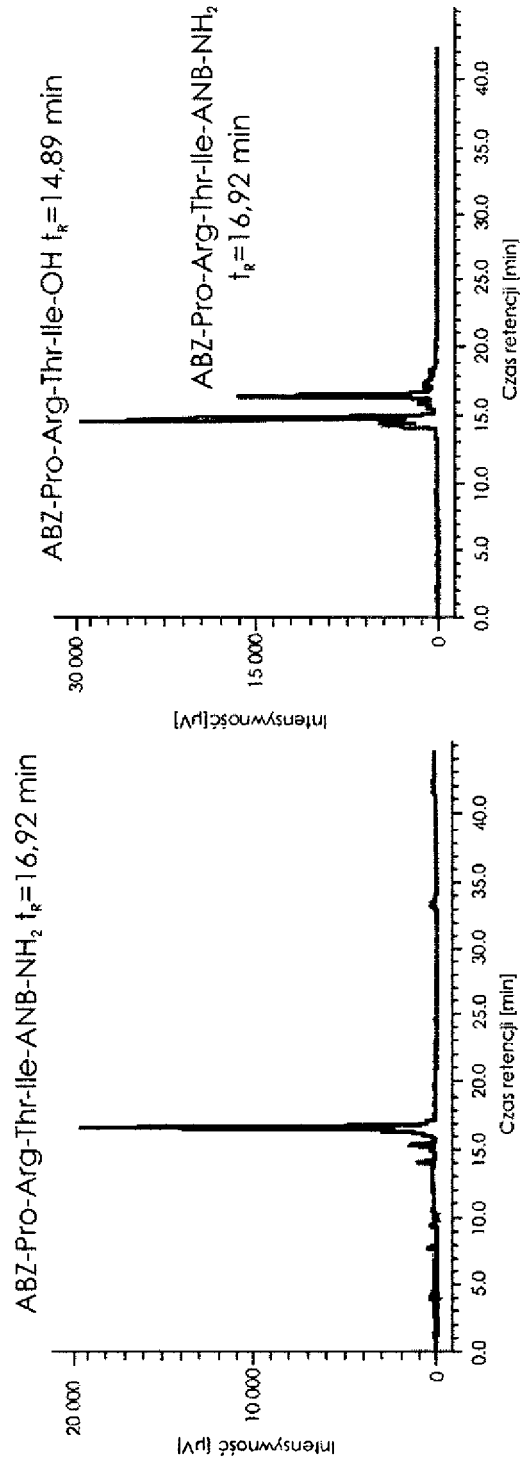


Fig. 2

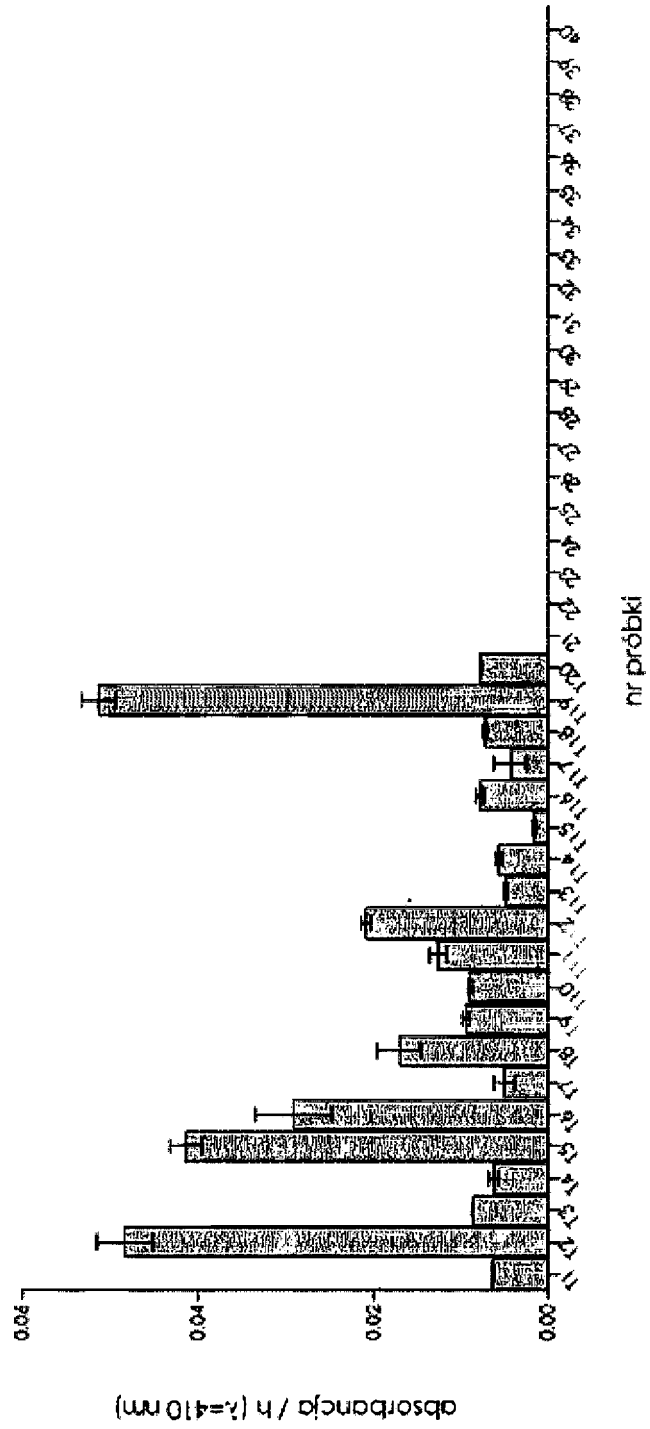


Fig. 3

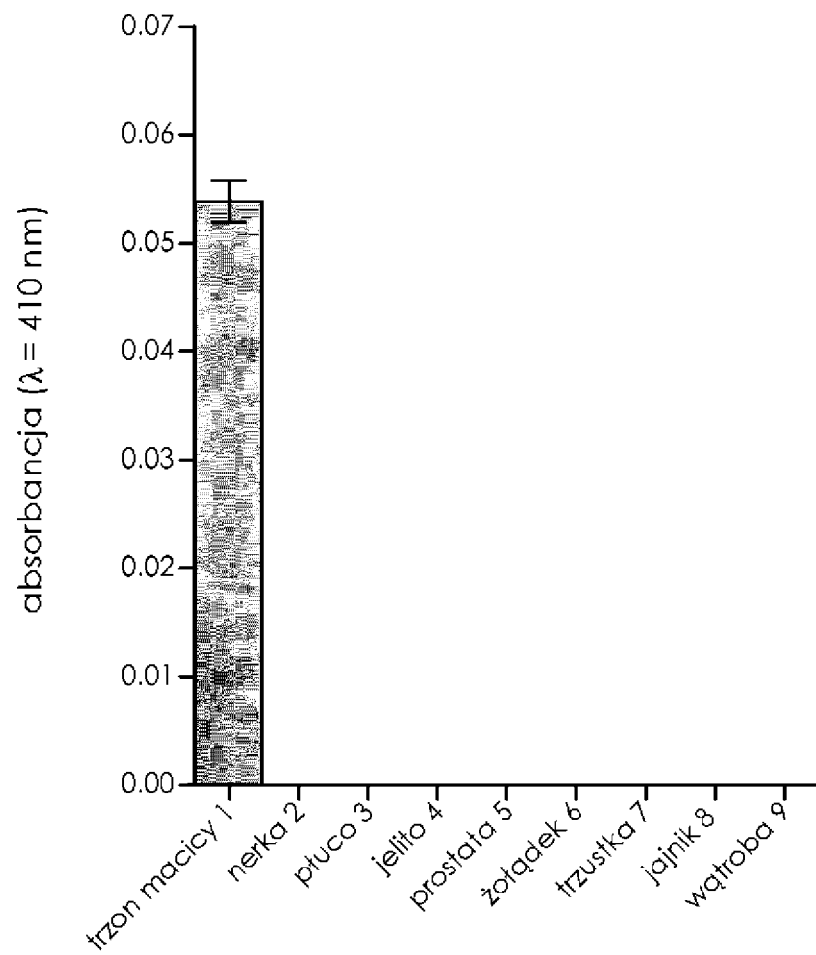


Fig. 4

