

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **241174**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **430348**

(22) Data zgłoszenia: **24.06.2019**

(51) Int.Cl.

C12Q 1/37 (2006.01)

C07K 5/10 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

(54)

**Związek chemiczny – marker diagnostyczny nowotworu trzustki
oraz sposób diagnozowania *in vitro* nowotworu trzustki**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

28.12.2020 BUP 27/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

16.08.2022 WUP 33/22

(73) Uprawniony z patentu:

URTESTE SPÓŁKA AKCYJNA, Gdańsk, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

ADAM LESNER, Gdańsk, PL

NATALIA GRUBA, Kęłowo, PL

(74) Pełnomocnik:

rzec. pat. Marta Kawczyńska

PL 241174 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest związek chemiczny, który znajduje zastosowanie jako marker diagnostyczny nowotworu trzustki, oraz sposób diagnozowania *in vitro* nowotworu trzustki z zastosowaniem takiego związku.

Nowotwór trzustki należy do grupy nowotworów, dla których współczesna medycyna wciąż poszukuje powszechnie dostępnych specyficznych metod diagnostycznych. Ze względu na dynamikę tego nowotworu pięcioletnie przypadki przeżycia chorego na tę chorobę należą do rzadkości. Na świecie nowotwór trzustki diagnozuje się u około 250 000 osób, zaś w Polsce u 3500 osób. Niestety zdecydowana większość przypadków kończy się śmiercią (powyżej 80%).

Związek chemiczny będący przedmiotem wynalazku należy do klasy peptydów chromogenicznych.

Znany jest sposób otrzymywania peptydów chromogenicznych polegający na prowadzeniu procesu na nośniku w postaci żywicy, posiadającej grupę Fmoc, którą usuwa się w trakcie prowadzenia reakcji. Używana żywica do prowadzenia tego procesu powinna zostać odpowiednio przygotowana. Przygotowanie tej żywicy polega na zwiększeniu jej objętości poprzez wielokrotne przemycanie rozpuszczalnikami hydrofobowymi. Z żywicy tej należy usunąć grupę ochronną Fmoc poprzez przemycanie 20% roztworem rozpuszczalnika.

Znane procesy otrzymywania peptydów chromogenicznych polegają na przyłączaniu 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 przemycane. Taki cykl powtarzany jest dla każdej reszty aminokwasowej. Otrzymany peptyd oddzielany jest od żywicy poprzez reakcję w warunkach kwasowych, po czym 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.

Znany jest sposób otrzymywania peptydów chromogenicznych polegający na prowadzeniu procesu na nośniku stałym i częściowo w buforze. Jako nośnik stały stosuje się żywicę amidową, a jako roztwór mieszaninę rozpuszczalników hydrofobowych.

Ze stanu techniki znane jest, że cząsteczki peptydów chromogenicznych rozpadają się pod wpływem enzymów proteolitycznych, powodując zmianę lub wzrost zabarwienia badanego roztworu. Efekt ten jest następstwem uwalniania chromoforu (4-nitroanilidu lub kwasu 5,2 amino nitro benzoowego).

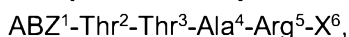
Zastosowanie tego typu pochodnych peptydów znane jest z publikacji:

1. 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.
2. 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.

Na podstawie tych publikacji opracowano budowę związku w taki sposób, aby obserwowany wzrost barwy w przedziale 380–440 nm następował w wyniku zmieszania/kontaktu z moczem osoby z nowotworem trzustki, a jednocześnie w taki sposób, aby efekt ten nie występował w reakcji z moczem osoby zdrowej lub z diagnozą innego typu nowotworu.

Proces inicjacji, wzrostu i przerzutowania komórek nowotworowych przebiega przy udziale wielu czynników, w tym szeregu enzymów proteolitycznych. Ta grupa białek wykazuje zdolność do hydrolizy (katalizowania rozpadu) białek i peptydów na mniejsze fragmenty. Proces ten umożliwia komórkom nowotworowym rozrost przez kolonizację nowych tkanek, wzmożenie procesu tworzenia naczyń krwionośnych (angiogenenzy), co umożliwia efektywne dostarczanie substancji odżywczych do guza. Enzymy te powstają także w wyniku obumierania komórek zdrowych na skutek procesu rozrostu nowotworu. Wszystkie te procesy tworzą charakterystyczny profil proteolityczny komórek nowotworowych.

Przedmiotem niniejszego wynalazku jest związek chemiczny o wzorze ogólnym 1:



gdzie:

ABZ oznacza kwas 2-aminobenzoowy,

X oznacza ANB-NH₂ lub pNA,

przy czym ANB-NH₂ oznacza amid kwasu 5-amino-2-benzoowego,

ANB oznacza kwas 5-amino-2-nitrobenzoesowy, a
pNA oznacza para-nitroanilinę.

Przedmiotem niniejszego wynalazku jest także sposób diagnozowania *in vitro* nowotworu trzustki, polegający na tym, że związek chemiczny o wzorze ogólnym 1, jak zdefiniowano powyżej, inkubuje się, w przedziale stężeń 0,1–10 mg/ml, korzystnie w stężeniu 1 mg/ml, w buforze pomiarowym o pH obojętnym lub zasadowym, korzystnie fizjologicznym, z niewielką ilością ludzkiego moczu, w zakresie proporcji 1 : 2 do 1 : 10, korzystnie 1 : 5, próbki moczu do buforu pomiarowego, i mierzy się intensywność absorbancji w zakresie 300–500 nm, korzystnie 380–430 nm, w czasie 40–60 minut, w temperaturze z przedziału 25–40°C, korzystnie 36–38°C, przy czym wzrost intensywności absorbancji w badanej próbce wskazuje na obecność nowotworu trzustki.

Zgodnie z wynalazkiem opracowano również sposób otrzymywania związku chemicznego o wzorze 2:



gdzie:

ABZ oznacza kwas 2-aminobenzoesowy, a

ANB-NH₂ oznacza amid kwasu 5-amino-2-nitrobenzoesowego.

Sposób ten 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 poprzez wielokrotne przemywanie rozpuszczalnikami hydrofobowymi, korzystnie dimetyloformamidem, chlorkiem metylenu lub N-metylopirolidonem, i usunięcie grupy ochronnej Fmoc, korzystnie poprzez przemywanie 10–30% roztworem piperydyny w rozpuszczalnikach, takich jak dimetyloformamid, chlorek metylenu lub N-metylopirolidon, po czym proces realizuje się w kolejnych etapach:

a) osadzenie kwasu 5-amino-2-nitrobenzoesowego (ANB) na żywicy poprzedza się przemyciem nośnika 3–6% roztworem N-metylmorfoliny (NMM) w DMF, a następnie DMF, po czym przygotowuje się roztwór ANB w DMF, do którego dodaje się kolejno TBTU, DMAP, a na koniec diizopropyletyloaminę (DIPEA), w następujących nadmiarach w stosunku do osadzenia polimeru: ANB/TBTU/DMAP/DIPEA, 3 : 3 : 2 : 6, po czym 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 izopropanol, 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-Arg(Pbf)-OH, przy czym co najmniej pięciokrotny nadmiar molowy pochodnej aminokwasowej w stosunku do żywicy rozpuszcza się w bezwodnej pirydynie 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;

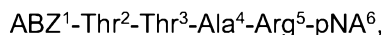
c) acylowanie uzyskanego związku przejściowego prowadzi się przy zastosowaniu pochodnej aminokwasowej, korzystnie Fmoc-Ala-OH, i kolejno Fmoc-Thr(tBu)-OH, następnie Fmoc-Thr(tBu)-OH i w końcowym etapie syntezy Boc-Abz-OH, przy czym acylowanie prowadzi się etapowo od reszty 6 do 1 z wykorzystaniem jako środka sprzęgającego diizopropylkarbodiimidu, który stosuje się w nadmiarze, a po zakończeniu każdego etapu żywicę przemywa się DMF, i korzystnie podaje testowi chlooranilowemu, w którym monitoruje się przyłączenia pochodnej aminokwasowej;

d) usunięcie grupy ochronnej Fmoc prowadzi się poprzez przemywanie roztworem 10–30% piperydyny 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 się liofilizacji.

Zgodnie z wynalazkiem opracowano również sposób otrzymywania związku chemicznego o wzorze 3:



gdzie:

ABZ oznacza kwas 2-aminobenzoesowy, a

pNA oznacza paranitroanilid.

Sposób ten 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 poprzez wielokrotne przemywanie rozpuszczalnikami hydrofobowymi, korzystnie dimetyloformamidem, chlorkiem metylenu lub N-metylopirolidonem, i usunięcie grupy ochronnej Fmoc, korzystnie poprzez przemywanie 10–30% roztworem piperydyny w rozpuszczalnikach, takich jak dimetyloformamid, chlorek metylenu lub N-metylopirolidon, po czym proces dalej realizuje się w kolejnych etapach:

a) przyłączenie trzeciej reszty aminokwasowej (Fmoc-Ala) do żywicy dokonuje się przy wykorzystaniu odpowiedniej pochodnej aminokwasowej przy 9-krotnym nadmiarze molowym w stosunku do osadzenia żywicy, którą rozpuszcza się w bezwodnym chlorku metylenu, po czym mieszaninę miesza się przez co najmniej dwie godziny w temperaturze pokojowej, zaś po zakończeniu reakcji żywicę odsącza się pod zmniejszonym ciśnieniem i przemywa się DMF oraz MeOH, po czym suszy się;

b) w kolejnych etapach wykonuje się przyłączania reszty aminokwasowej, nazywane dalej acylowaniem, przy czym stosuje się pochodną Fmoc-Thr(tBu)-OH i kolejno Fmoc-Thr(tBu)-OH oraz Boc-ABZ-OH, przy czym każdy z etapów poprzedza się przemywaniem żywicy za pomocą DMF, korzystnie przez 5 minut, w kolejnych przyłączeniach stosuje się środek sprzęgający, korzystnie w postaci diizopropylkarbodiimidu, który stosuje się w nadmiarze, przy czym procedurę tę powtarza się dwukrotnie, a po zakończeniu każdego etapu żywicę przemywa się DMF, i korzystnie podaje testowi chloroanilowemu, w którym monitoruje się przyłączenia pochodnej aminokwasowej;

c) usunięcie grupy ochronnej Fmoc prowadzi się poprzez przemywanie roztworem 10–30% piperydyny w DMF i kolejne przemywania każdym z rozpuszczalników: DMF, izopropanolem i chlorkiem metylenu.

d) powtarzanie etapów od b) do c), aż do momentu uzyskania związku ($\text{ABZ}^1\text{-Thr(tBu)}^2\text{-Thr(tBu)}^3\text{-Ala}^4\text{-OH}$), przy czym syntezę prowadzi się od reszty 6 do 3, a następnie odszczepia się otrzymany związek od nośnika, stosując mieszaninę TFA : fenol : woda : TIPS, w proporcjach odpowiednio 88 : 5 : 5 : 2, v/v/v/v, w trakcie mieszania, po czym po upływie co najmniej dwóch godzin zawartość kolby odsącza się pod zmniejszonym ciśnieniem, a osad przemywa się eterem dietylowym, po czym osad odwirowuje się, korzystnie w czasie 20 minut, a następnie osad rozpuszcza się w wodzie przy pomocy ultradźwięków, po czym poddaje się liofilizacji;

e) syntezę Fmoc-Arg(Pbf)-pNA przeprowadza się etapowo, przy czym w pierwszym etapie 2 mmole Fmoc-Arg(Pbf) rozpuszcza się w bezwodnym tetrahydrofuranie (THF) w obecności 2 mmoli N-metylmorfoliny (NMM) i aktywuje się grupę karboksylową pochodnej aminokwasowej 2 mmolami chlorku izobutyli, po czym po 10 minutach aktywacji dodaje się 3 mmole p-nitroaniliny, zaś reakcję korzystnie prowadzi się przez 2 godziny, korzystnie w temperaturze -15°C , a następnie dobę w temperaturze pokojowej, a po skończonej reakcji rozpuszczalnik odparowuje się, a suchą pozostałość rozpuszcza się w octanie etylu, po czym otrzymany roztwór przemywa się kolejno nasyconym wodnym roztworem NaCl, 10% kwasem cytrynowym, 5% wodorowęglanem sodu i suszy się nad bezwodnym siarczanem sodu, zaś octan etylu oddestylowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem, a suchą pozostałość suszy się;

f) łączenie chronionego peptydu $\text{ABZ}^1\text{-Thr(tBu)}^2\text{-Thr(tBu)}^3\text{-Ala}^4\text{-OH}$ z paranitroanilidem Arg(Pbf) polega na tym, że chroniony peptyd $\text{ABZ}^1\text{-Thr(tBu)}^2\text{-Thr(tBu)}^3\text{-Ala}^4\text{-OH}$ rozpuszcza się w niewielkiej ilości DCM, a następnie kolejno aktywuje się za pomocą TFFH (tetrametylofluoroformamid), korzystnie przez 30 minut, korzystnie w temperaturze 0°C , po czym dodaje się katalityczną ilość DMAP oraz Fmoc-Arg(Pbf)⁵-pNA⁶, przy czym korzystnie reakcję prowadzi się przez 24 godziny, korzystnie w temperaturze pokojowej, po czym odparowuje się rozpuszczalnik, zaś otrzymany roztwór zalewa się mieszaniną ściągającą osłony boczne: TFA : fenol : woda : TIPS (88 : 5 : 5 : 2, v/v/v/v), i miesza się, korzystnie przez 3 godziny.

g) przygotowanie gotowego produktu przeprowadza się poprzez rozpuszczenie peptydu w wodzie przy pomocy ultradźwięków, a następnie poddaje się liofilizacji.

Zastosowane w opisie i zastrzeżeniach patentowych określenia i skróty należy rozumieć następująco:

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-nitrobenzoowego,
 Boc – grupa tert-butyloksykarbonylowa
 Fmoc – grupa 9-fluorenylometoksykarbonylowa
 TFA – kwas trifluorooctowy.

Korzyści wynikające z wykorzystania niniejszego wynalazku polegają na stworzeniu szybkiego i bezinwazyjnego sposobu diagnostycznego, umożliwiającego wczesne wykrycie nowotworu trzustki. Ponadto niniejszy wynalazek z powodzeniem może służyć do wykonywania badań przesiewowych. Niniejszy wynalazek daje możliwość wykonania pełnej diagnostyki na wczesnym etapie rozwoju nowotworu i skuteczniejszego leczenia. Wczesne rozpoznanie daje możliwość leczenia operacyjnego, które znacząco wydłuża przeżycie pacjenta.

Wynalazek przedstawiono bliżej w przykładach wykonania na rysunku, na którym:

Fig. 1 przedstawia stopień hydrolizy substratu (1), tj. związku o wzorze 2: ABZ-Thr-Thr-Ala-Arg-ANB-NH₂ w próbkach moczu pochodzących od osób ze zdiagnozowanym nowotworem trzustki (próbki 1–10) i próbkach moczu pochodzących od osób zdrowych (11–25). Cyfry arabskie oznaczają numer wybranej próbki moczu.

Fig. 2 przedstawia stopień hydrolizy substratu (2), tj. związku o wzorze 3: ABZ-Thr-Thr-Ala-Arg-pNA w próbkach moczu pochodzących od osób ze zdiagnozowanym nowotworem trzustki (próbki 1–10) i próbkach moczu pochodzących od osób zdrowych (11–25). Cyfry arabskie oznaczają numer wybranej próbki moczu.

Fig. 3 przedstawia zależność stopnia hydrolizy substratu (1) ABZ-Thr-Thr-Ala-Arg-ANB NH₂ od środowiska pH. Wartości wskazane na osi X oznaczają pH środowiska.

Fig. 4 przedstawia wyniki analizy hydrolizy (rozpadu) substratu, tj. ABZ-Thr-Thr-Ala-Arg-ANB-NH₂ w próbce moczu od osobnika ze zdiagnozowanym nowotworem trzustki.

Wynalazek ilustrują następujące przykłady wykonania, które nie stanowią jego ograniczenia.

P r z y k ł a d 1

Synteza nowego związku o wzorze: ABZ¹-Thr²-Thr³-Ala⁴-Arg⁵-ANB-NH₂⁶(wzór 2)

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: ABZ¹-Thr²-Thr³-Ala⁴-Arg⁵-ANB-NH₂⁶, gdzie ABZ oznacza kwas 2-aminobenzoowy, a ANB-NH₂ oznacza amid kwasu 5-amino-2-benzoowego, zaś ANB oznacza kwas 5-amino-2-benzoowy, otrzymano na drodze syntezy chemicznej w fazie stałej z wykorzystaniem następujących pochodnych aminokwasowych:

Boc-ABZ, Fmoc-Thr(tBu), Fmoc-Ala, Fmoc-Arg(Pbf), ANB.

Syntezę związku, czyli markera diagnostycznego do wykrywania nowotworu trzustki, którego diagnostyka jest związana z hydrolizą tego związku pod wpływem enzymów proteolitycznych, prowadzono na nośniku stałym umożliwiającym przekształcenie kwasu 5-amino-2-benzoowego 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 o pojemności 25 ml, zakończona spiekami do syntezy w fazie stałej.

Wszystkie otrzymywane końcowe związki zawierały w swojej sekwencji w pozycji 1, czyli na N-końcu, kwas 2-aminobenzoowy (ABZ), a w pozycji 6, czyli na C-końcu, cząsteczkę kwasu 5-amino-2-nitrobenzoowego (ANB). ABZ pełni rolę donora fluorescencji, natomiast ANB pełni rolę wygaszacza fluorescencji i jednocześnie chromoforu. Peptydy w swojej sekwencji zawierały co najmniej i korzystnie

jedno miejsce reaktywne zlokalizowane pomiędzy resztami aminokwasowymi Arg-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 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 łopatkki, 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 dodano 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 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 (łaźnia 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 (alaninę).

Wszystkie przyłączania reszt aminokwasowych poprzedzono przemywaniem żywicy za pomocą DMF przez 5 minut. W kolejnych przyłączaniach jako środek sprzęgający stosowano diizopropylkarbodiimid. 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:

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

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-Thr(tBu)-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:

Podczas testu przeprowadzonego po drugim acylowaniu ziarna żywicy były bezbarwne, co pozwoliło na przejście do kolejnego etapu syntezy, jakim było wprowadzenie kolejnej chronionej pochodnej aminokwasowej – treoniny 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-Thr-Thr-Ala-Arg-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 z przemywaniem eterem dietylowym. Powstały osad odwirowano na wirówce

SIGMA 2K30 (Laboratory Centrifuges) w czasie 20 minut. Osad otrzymany po wirowaniu rozpuszczono w wodzie przy pomocy ultradźwięków, a następnie poddano liofilizacji.

Tożsamość/charakterystyka nowego związku – analiza HPLC, MS

Warunki HPLC: 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: $ABZ^1-Thr^2-Thr^3-Ala^4-Arg^5-pNA^6$ (wzór 3).

Proces prowadzono w podobny sposób jak opisano w przykładzie 1, z tym, że wykorzystano odpowiednie pochodne aminokwasowe i dodatkowe podstawniki, a proces przeprowadzano częściowo w roztworze, a częściowo na nośniku stałym.

Otrzymanie p-nitroanilidu Ala

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

Związek $ABZ^1-Thr(tBu)^2-Thr(tBu)^3-Ala^4-OH$, gdzie ABZ oznacza kwas 2-aminobenzoowy, otrzymano na drodze syntezy chemicznej w fazie stałej z wykorzystaniem następujących pochodnych aminokwasowych:

Boc-ABZ, Fmoc-Thr(tBu), Fmoc-Ala.

Syntezę związku prowadzono na nośniku stałym, żywicy 2-chloro-chlorotytywowej, np. firmy Iris 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 o pojemności 25 ml, zakończona spiekami do syntezy w fazie stałej.

Syntezę peptydów wykonano na nośniku, żywicy 2-chloro-chlorotytywowej, np. firmy Iris 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 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.

Test chloranilowy:

Test chloranilowy polegał na przeniesieniu, za pomocą łopatkki, kilku ziaren żywicy z reaktora, tj. 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 Fmoc-Ala.

b) Osadzenie Fmoc-Ala na nośniku stałym

Pierwszym etapem syntezy biblioteki peptydowej było osadzenie Fmoc-Ala 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-Ala w DMF i dodano kolejno TBTU, DMAP, a na koniec diizopropyletyloaminę (DIPEA) w następujących nadmiarach w stosunku do osadzenia polimeru: Fmoc-Pro/TBTU/DMAP/DEPEA, 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-Ala znajdującą się w reaktorku przemyto za pomocą DMF, a następnie przystąpiono do deprotekcji osłony Fmoc z grupy aminowej w celu przyłączenia chronionej pochodnej aminokwasowej treoniny.

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-Thr(tBu)-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 – treoniny 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-Thr(tBu)-Thr(tBu)-Ala-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 odsączono pod zmniejszonym ciśnieniem na lejkach ze spiekem Schotta z przemywaniem mieszaniną ściągającą. Roztwór przemyto heksanem (1 : 10 v/v), odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie poddano liofilizacji.

e) Chemiczna synteza pochodnych paranitroanilidu Arg

Do syntezy Fmoc-Arg(Pbf)-pNA wykorzystano metodę mieszanych bezwodników. W pierwszym etapie 2 mmole Fmoc-Arg(Pbf) 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 mmmole p-nitroaniliny. Reakcje

prowadzono przez 2 godziny w temperaturze -15°C , a następnie dobę 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 wysuszone nad bezwodnym siarczanem sodu, octan etylu oddestylowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a suchą pozostałość suszono w eksykatorze próżniowym nad P_2O_5 i KOH.

f) Sprzęganie chronionego peptydu z para-nitroanilidem Arg(Pbf)

Chroniony peptyd $\text{ABZ}^1\text{-Thr}(\text{tBu})^2\text{-Thr}(\text{tBu})^3\text{-Ala}^4\text{-OH}$ rozpuszczono w niewielkiej ilości DCM, po czym aktywowano za pomocą TFFH (tetrametylofluoroformamid) przez 30 minut w temperaturze 0°C . Następnie dodano katalityczną ilość DMAP oraz Arg(Pbf)-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 mieszało w kolbie okrągłodennej na mieszadle magnetycznym przez 3 godziny.

Po tym czasie do kolby dodano zimny eter dietylowy, a powstały osad odwirowano na wirówce wysokoobrotowej przy 5 tys. obrotów na minutę w czasie 20 minut. Osad otrzymany po wirowaniu rozpuszczono w wodzie przy pomocy ultradźwięków, a następnie poddano liofilizacji.

Tożsamość/charakterystyka nowego związku – analiza HPLC, MS

Warunki HPLC: 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 wykonano na grupie 10 chorych z diagnozą nowotworu trzustki. W tym celu związek o wzorze 2: $\text{ABZ-Thr-Thr-Ala-Arg-ANB-NH}_2$ lub o wzorze 3: $\text{ABZ-Thr-Thr-Ala-Arg-pNA}$ rozpuszczono w dimetylosuflotlenku (w stężeniu 0,5 mg/ml), a następnie 50 μl takiego roztworu mieszało z 120 μl buforu (200 mM Tris-HCl, pH 8,0) i 80 μl moczu osoby chorej na nowotwór (raka) trzustki. Pomiar wykonano w płytce 96 dołkowej przeznaczonej do pomiaru absorbancji, a każdą próbkę analizowano w temperaturze 37°C w trzech powtórzeniach. Czas trwania pomiaru wynosił 60 minut. W czasie pomiaru monitorowano długość fali charakterystyczną dla uwalniającego się chromoforu (ANB-NH_2 lub pNA) – przy długości fali 405 nm (zakres 380–430 nm).

W wyniku pomiaru zaobserwowano wzrost zabarwienia roztworu w czasie we wszystkich próbkach moczu pochodzących od osób z diagnozą nowotworu trzustki. Obserwowana wielkość wzrostu absorbancji w czasie jest różna dla każdej z badanych próbek. Odmienny efekt uzyskano dla 15 próbek osób zdrowych, gdyż w żadnej z tych 15 badanych próbek moczu nie zaobserwowano wzrostu absorbancji w zakresie diagnostycznym.

Jak pokazano na Figurze 4 analiza RP HPLC losowo wybranego systemu zawierającego mocz pochodzącego od osoby z diagnozą nowotworu trzustki wskazuje na to, że zarówno związek o wzorze 2, jak i o wzorze 3, rozpada się na fragment peptydowy $\text{ABZ-Thr-Thr-Ala-Arg}$ i grupy chromoforowe, w przypadku związku o wzorze 2 – ANB-NH_2 , a w przypadku związku o wzorze 3 – pNA. Analiza HPLC: Substrat $\text{ABZ-Thr-Thr-Ala-Arg-ANB-NH}_2$ w buforze o składzie 200 mM Tris-HCl, pH 8,0. Wyniki tej analizy badanego związku przedstawiono na Figurze 4.

Figura 1 wskazuje, że wszystkie próbki 1–10 uległy rozpadowi, lecz w przypadku próbek 3 i 10 rozpad substratu, tj. związku $\text{ABZ-Thr-Thr-Ala-Arg-ANB-NH}_2$, zachodzi wydajniej niż w przypadku materiałów 2 czy 9. Taki rezultat może być spowodowany różnicą w aktywności, jak i ilości enzymów odpowiedzialnych za proteolizę. Ponadto Figura 1 wskazuje, że inkubacja roztworu związku o wzorze 2 z próbkami moczu pochodzącymi od osób zdrowych (bez zdiagnozowanego nowotworu) nie prowadzi do wzrostu absorbancji, a zatem nie zachodzi hydroliza badanego związku. Rezultat wskazuje na brak obecności enzymów proteolitycznych charakterystycznych dla nowotworu trzustki.

Podobny obraz otrzymano przy zastosowaniu związku o wzorze 3: $\text{ABZ-Thr-Thr-Ala-Arg-pNA}$ – zobacz Figura 2.

Przeprowadzono pomiary zależności aktywności proteolitycznej 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. 3).

Podsumowanie

Analiza potwierdziła przydatność zastosowania związków według przykładów w diagnostyce nowotworu trzustki. Mechanizm działania nowego związku polega na jego hydrolizie enzymatycznej w takim miejscu, które prowadzi do uwolnienia wolnych cząsteczek chromoforów, odpowiednio ANB-NH₂ (amid kwasu 5-amino-2-nitrobenzoesowego) lub pNA (para-nitroaniliny), które wykazują absorpcję przy długości fali 320–480 nm, zwłaszcza 380–430 nm.

Zastrzeżenia patentowe

1. Związek chemiczny – marker diagnostyczny – o wzorze ogólnym 1:
ABZ¹-Thr²-Thr³-Ala⁴-Arg⁵-X⁶,

gdzie:

ABZ oznacza kwas 2-aminobenzoowy,

X oznacza ANB-NH₂ lub pNA.

przy czym ANB-NH₂ oznacza amid kwasu 5-amino-2-benzoesowego,

ANB oznacza kwas 5-amino-2-nitrobenzoesowy, a

pNA oznacza para-nitroanilinę.

2. Sposób diagnozowania *in vitro* nowotworu trzustki, **znamienny tym**, że związek chemiczny o wzorze ogólnym 1 jak zdefiniowano w zastrz. 1 inkubuje się, w przedziale stężeń 0,1–10 mg/ml, korzystnie w stężeniu 1 mg/ml, w buforze pomiarowym o pH obojętnym lub zasadowym, korzystnie fizjologicznym, z niewielką ilością ludzkiego moczu, w zakresie proporcji 1 : 2 do 1 : 10, korzystnie 1 : 5, próbki moczu do buforu pomiarowego, i mierzy się intensywność absorpcji w zakresie 300–500 nm, korzystnie 380–430 nm, w czasie 40–60 minut, w temperaturze z przedziału 25–40°C, korzystnie 36–38°C, przy czym wzrost intensywności absorpcji w badanej próbce wskazuje na obecność nowotworu trzustki.

Rysunki

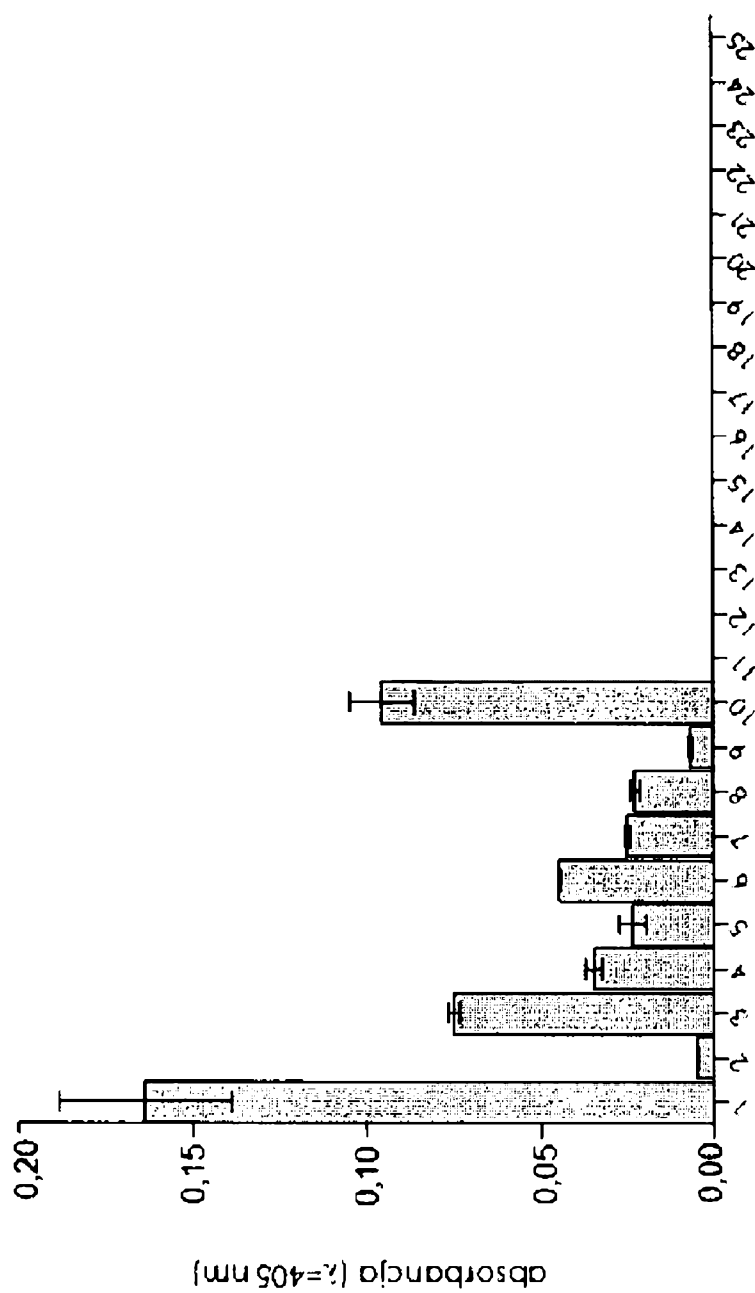


Fig. 1

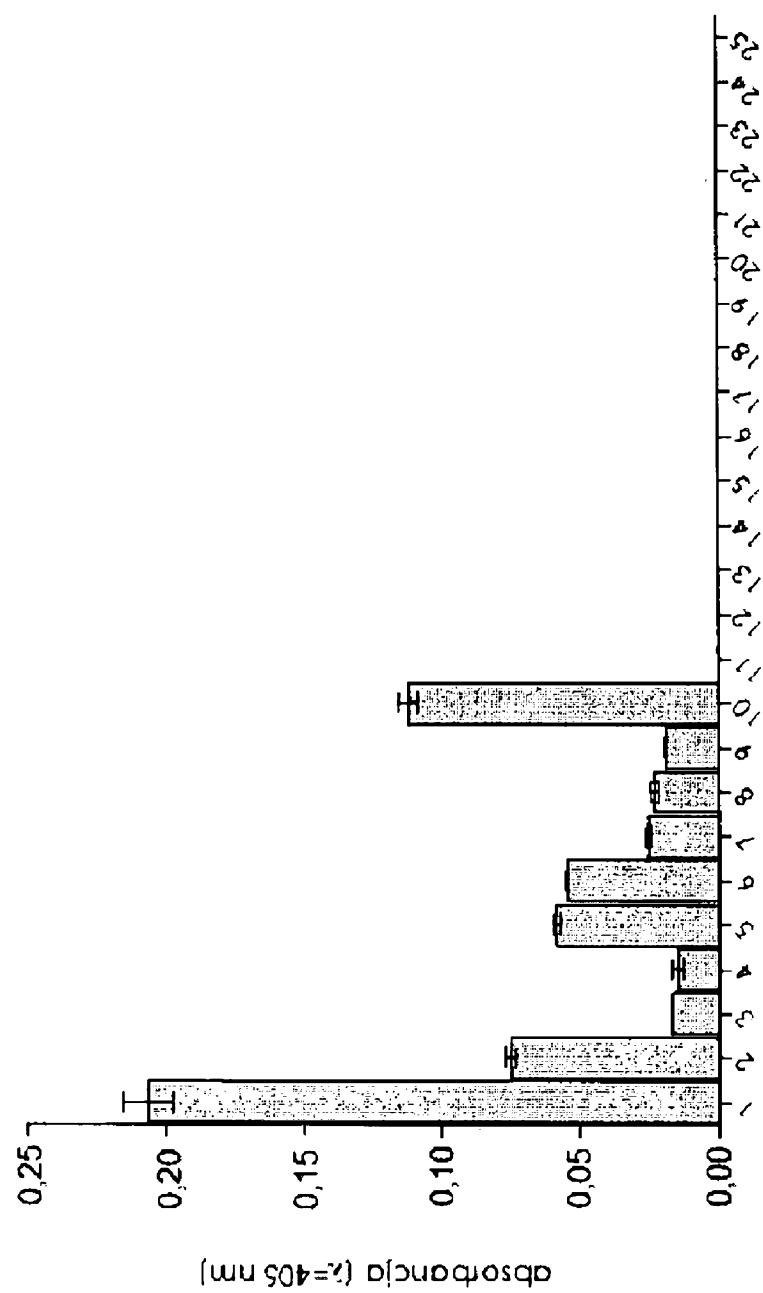


Fig. 2

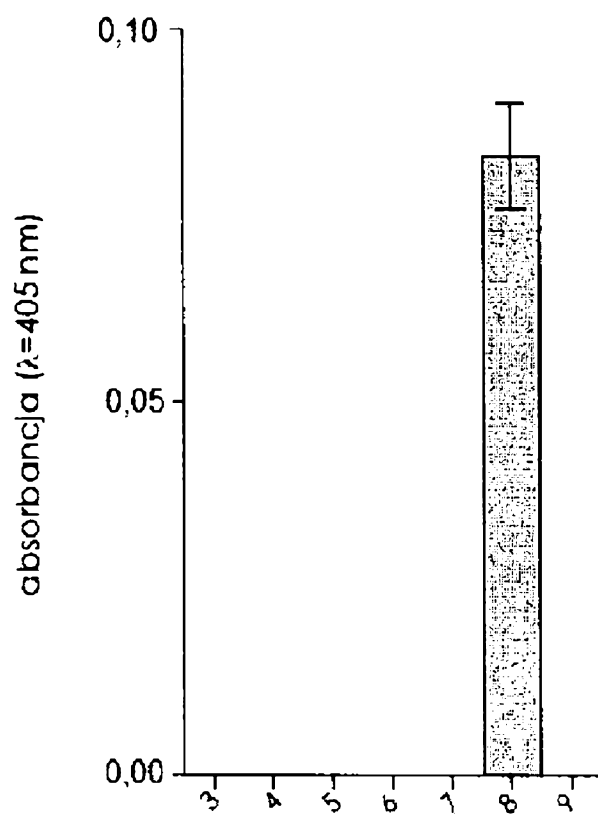


Fig. 3

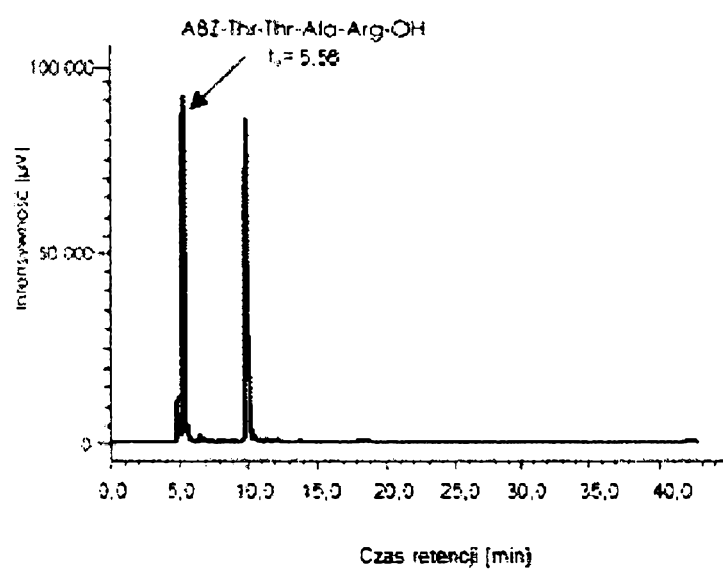
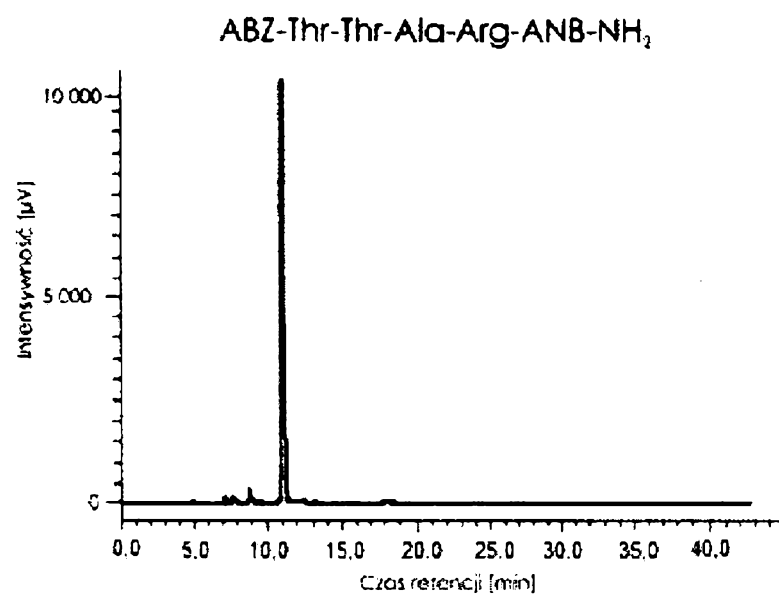


Fig. 4