



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) 323757

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

A61K 51/08 (2006.01)

C07K 5/062 (2006.01)

C07K 5/065 (2006.01)

C07K 5/068 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

G01N 33/497 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19992727	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	
(22)	Inng.dag	1999.06.04	(85)	Videreføringsdag	
(24)	Løpedag	1999.06.04	(30)	Prioritet	1998.06.05, JP, 157855/98 1999.05.28, JP, 149496/99
(41)	Alm.tilgj	1999.12.06			
(45)	Meddelt	2007.07.02			
(73)	Innehaver	Tokyo Gas Co Ltd, 5-20, Kaigan 1-chome, Minato-ku, 105-8527 TOKYO, JP			
(72)	Oppfinner	Tadashi Kohno, Kawasaki-shi, Kanagawa, JP Isaburo Hosoi, Souka-shi, Saitama, JP Junko Ohshima, Yokohama-shi, Kanagawa, JP Kunihiko Shibata, Funabashi-shi, Chiba, JP Asuka Ito, Yokohama-shi, Kanagawa, JP			
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO			
(54)	Benevnelse	Diagnostiske midler for pankreaskokrin funksjon i en pustetest, samt ¹³C- eller ¹⁴C-merket forbindelse eller salt.			
(56)	Anførte publikasjoner	C. Yamato et al., Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, vol. 206, no. 2, 1978, s. 468-474 US 4676974			
(57)	Sammendrag				

Et diagnostisk middel for pankrease eksokrin funksjon omfattende en aminosyre eller et peptid inneholdene minst et ¹³C eller ¹⁴C atom, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav forskjellig fra Bz-Tyr-¹³C-PABA er beskrevet. En ¹³C- eller ¹⁴C-merket forbindelse representert ved følgende formel (II):
 $X_2-R_2-Y_2-Z_1$
eller et salt derav,
hvor X_2 er et hydrogenatom eller en beskyttelsesgruppe,
 R_2 er et peptid med 2 til 5 aminosyrer, en aminosyre eller en enkeltbinding, Y_2 er en aminosyre,
 Z_1 er en aminosyre eventuelt med en beskyttelsesgruppe, og
minst en av aminosyrene i R_2 , Y_2 og Z_1 , eller minst en av beskyttelsesgruppene i X_2 og Z_1 når beskyttelsesgruppene inneholder et karbonatom, er ¹³C eller ¹²C-merket.

Foreliggende oppfinnelse vedrører diagnostiske midler for pankreaskso-
k-
krin funksjon i en pustetest, samt ^{13}C - eller ^{14}C -merket forbindelse eller salt.

"Bukspyttkjertel-eksokrin-funksjonstester" er nyttige for diagnostikk av
bukspyttkjertelsykdommer så som kronisk og akutt pancreatitt og bukspyttkjertel-
cancer. Det er også nyttig å vurdere tilstanden og prognosen til pasienter og å
kontrollere medisinerings av proteasepreparatene: Generelle beskrivelser finnes i
Arvanitakis og Cooke, Gastroenterology, 74:932 (1978); Niederau og Grendell,
Gastroenterology, 88:1973 (1985); Goldberg, Bull. Mol. Biol. Med., 15:1 (1990);
Lankisch, Int. J. Pancreatology, 14:9 (1993); Bank og Chow, Gastroenterologist,
2:224 (1994); og Steer et al., Eng. J. Med., 332:1482 (1995).

Bukspyttkjertel-eksokrin-funksjonstester blir grovt klassifisert i intubasjons-
tester og tubeløse tester. Intubasjonstester innbefatter intubering av et rør gjennom
munnen til tolvfingertarmen for å samle tolvfingertarmsaft. Sekretintesten blir
vanligvis anvendt, idet sekretin blir administrert intravenøst for å stimulere sekresjon
av bukspyttkjertelsaft før oppsamlingen. Denne metoden er meget nøyaktig på grunn
av at mengdene og komponentene av bukspyttkjertelsaften blir analysert indirekte og
er "gullstandarden" av bukspyttkjertel eksokrin funksjonstest. Denne metoden kan
derimot ikke bli anvendt gjentatte ganger eller anvendt for screening på grunn av det
sterke stresset forårsaket på pasientene. Det er bare tilgjengelig ved et relativt lite
antall medisinske sentra på grunn av at legen må være meget kvalifisert. På grunn
av at denne metoden krever fluoroskopisk rørplassering i løpet av oppsamling av
tolvfingertarmsaft, er det problemer med røntgeneksponering.

Derimot er rørfrie tester lette å utføre for å beregne bukspyttkjertel-eksokrin
funksjon som ikke krever intubasjon, hvori den utskilte mengden av forbindelsene
produsert av bukspyttkjertel eksokrine systemer eller utskilt mengde av bukspytt-
kjertel eksokrine enzymer per se blir målt. For tiden blir hovedsakelig følgende fire
metoder anvendt:

1. PFD-test hvori et syntetisk substrat BT-PABA (N-benzoyl-L-tyrosyl-p-aminobenzosyre) for chymotrypsin utskilt fra bukspyttkjertelen blir administrert oralt og mengden av PABA (p-aminobenzosyre), et produkt degradert av chymotrypsin, utskilt i urinen blir målt;
2. PLT-test hvori et syntetisk substrat FDL (fluoreskein dilaurat) for kolesterol-esterhydrolase, esterase, utskilt fra bukspyttkjertelen blir administrert oralt og

mengden av degraderingsproduktet fluoreskein utskilt i urinen eller konsentrasjonen derav i blodet blir målt;

3. Fekal chymotrypsin-test hvori chymotrypsin i avføringen blir bestemt kvantitativt; og

4. Fekal elastase-test hvori elastase i avføringen blir bestemt kvantitativt.

Sensitiviteten ved disse testene er for lav for å detektere små reduksjoner i bukspyttkjertel eksokrin funksjon. De er derfor ikke blitt anvendt så ofte i de senere årene.

For å løse dette problemet, er det blitt lett etter mange lettere bukspyttkjertel-eksokrine-funksjonstester. ^{13}C -pustetester er også blitt anvendt hvori en ^{13}C -merket forbindelse blir administrert og en økning av konsentrasjonen til $^{13}\text{CO}_2$ i utåndingen blir målt. Eksempler på slike ^{13}C -pustetester er illustrert nedenfor:

1. ^{13}C -pustetest hvori et ^{13}C -merket lipid eller blandet triglycerid, som er et substrat for lipase, blir administrert; Chen et al., J. Nuclear Med., 15:1125 (1974); Watkins et al., J. Lab. Clin. Med., 90:422 (1977); Ghos et al., Digestion, 22:239 (1981); John, SG., Gastroenterology, 83:44 (1982); Watkins et al., Gastroenterology, 82:911 (1982); Benini et al., Digestion, 29:91 (1984); Jones et al., J. Lab. Clin. Med., 105:647 (1985); Knoblach et al., Monatsschr Kinderheilkd, 136:26 (1988); Vantrappen et al., Gastroenterology, 96:1126 (1989); Murphy et al., Arch. Disease in Childhood, 65:574 (1990); Kato et al., Am. J. Gastroenterol., 88:64 (1993); McClean et al., Arch. Disease in Childhood, 69:366 (1993); Jakobs et al., Eur. J. Pediatr., 156:S78 (1997); og Kalivianakis et al., Eur. J. Clin. Invest., 27:434 (1997);
2. ^{13}C -pustetest hvori en ^{13}C -merket kolesterolester, som er et substrat for kolesterolesterase, en lipase, blir administrert: Mundlos, et al., Pediatric Res., 22:257 (1987); Xcole et al., Gastroenterology, 93:1372 (1987); og Mundlos et al., Gut, 31:1324 (1990);
3. ^{13}C -pustetest hvori en ^{13}C -merket stivelse, som er et substrat for en amylase, blir administrert: Hiele et al., Gastroenterology, 96:503 (1989); Dewit et al., Pediatric Res., 32:45 (1992); og Z. Gastroenterol., 35:187 (1997); og
4. ^{13}C -pustetest hvor et ^{13}C -anrikt eggprotein, som er et protein med en ^{13}C -konsentrasjon forøket opp til 1,4 atm % i forhold til naturlig forekomst av 1,1 atm % ved foring av en kylling med ^{13}C -leucin, og som er et substrat for en protease, blir

administrert: Y. Ghoo, ¹³CO₂-Breath Tests ved laboratoriet "Digestion-Absorption", University Hospital Gasthuisberg, Leuven, Belgia (1996).

C. Yamato et al., Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, vol. 206, no. 2, 1978, s. 468-474 beskriver at eksokrin pankreatisk funksjon ble studert ved oral administrering av ¹⁴C-merket Bz-Tyr-PABA til dyr og deretter måling av de resulterende dekomponeringsproduktene (dvs. N-benzoyl-L-tyrosin og p-aminobenzosyre) utskilt i urinen. Det beskrives følgende et ¹⁴C-merket syntetisk peptid (dvs. ¹⁴C-merket Bz-Tyr-PABA), men verken beskriver eller foreslår bestemmelse av eksokrin pankreatisk funksjon i en pustetest.

US 4676974 beskriver at den eksokrine pankreatiske funksjonen ble bestemt i en pustetest på en pasient som svelget ¹⁴C-merket kolesterol oktanoat. Det beskrives følgende bestemmelse av eksokrin pankreatisk funksjon i en pustetest, men beskriver ikke aminosyrer eller peptider inneholdende minst et ¹³C eller ¹⁴C atom, eller farmasøytisk akseptable salter derav.

Alle disse fremgangsmåtene er derimot mindre sensitive enn de konvensjonelle og tidkrevende. Derfor er disse fremgangsmåtene ikke blitt etablert innenfor det kliniske området.

Det er følgende ønskelig at det blir utviklet en meget sensitiv bukspyttkjertel-eksokrin-funksjonstest som utviser lavt stress på individet, og som fort gir nøyaktige resultater.

En hensikt ifølge foreliggende oppfinnelse er følgende å tilveiebringe et diagnostisk middel for bukspyttkjertel eksokrin funksjon som fører til en meget sensitiv test på bukspyttkjertel eksokrin funksjon og som tilveiebringer lavt stress på individet og tilveiebringer hurtig nøyaktige resultater.

Det er en annen hensikt ifølge foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe en ny forbindelse for bukspyttkjertel-eksokrin-funksjonstest.

Foreliggende oppfinnere har oppdaget at bukspyttkjertel eksokrin funksjon kan bli beregnet med høy sensitivitet ved høy oral administrering av en ¹³C-merket peptidforbindelse til en normal rotte og en rotte med kronisk pancreatitt og måling av ¹³CO₂-konsentrasjonen i utåndet CO₂ etter administrering. Foreliggende oppfinnelse ble følgende fullført.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer følgende et diagnostisk middel for pankreas eksokrin funksjon i en pustetest, kjennetegnet ved at det omfatter ¹³C eller ¹⁴C-merket forbindelse representert ved følgende formel (II):



hvor X_2 er et hydrogenatom eller en beskyttelsesgruppe,

R_2 er et peptid med 2 til 5 aminosyrer, en aminosyre eller en enkeltbinding,

Y_2 er en aminosyre,

Z_1 er en aminosyre med eventuelt en beskyttelsesgruppe, og minst en av aminosyrene i R_2 , Y_2 og Z_1 , eller minst én av beskyttelsesgruppene i X_2 og Z_1 når beskyttelsesgruppene inneholder et karbonatom, er ^{13}C - eller ^{14}C -merket, og hvor

1) i tilfelle hvor X_2 er en beskyttelsesgruppe og R_2 er enkeltbinding,

1-i) når Z_1 er D-Ala, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra D-Ala,

1-ii) når Z_1 er Ala-OMe, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Leu,

1-iii) når Z_1 er Pro-OMe, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Gly,

2) i tilfelle hvor X_2 er en beskyttelsesgruppe og R_2 er en aminosyre,

2-i) når Z_1 er D-Ala, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Val,

2-ii) når Z_1 er Ala, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Leu,

2-iii) når Z_1 er Gly-Oet, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Pro,

3) i tilfelle hvor X_2 er en beskyttelsesgruppe, er R_2 et peptid med 2 aminosyrer

og Z_1 er Gln eventuelt med Set, Y_2 er en aminosyre forskjellig fra Ala,

4) i tilfelle hvor X_2 er et hydrogenatom og R_2 er en enkeltbinding,

4-i) når Z_1 er Pro, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Ala,

4-ii) når Z_1 er Leu, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Gly, Val, Leu og Tyr,

4-iii) når Z_1 er Phe, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Gly,

4-iv) når Z_1 er Gly-Oet, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Gly,

4-v) når Z_1 er Ala-OMe, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Leu,

5) i tilfelle hvor X_2 er et hydrogenatom og R_2 er en aminosyre,

5-i) når Z_1 er Leu, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Pro,

5-ii) når Z_1 er Phe, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Pro,

5-iii) når Z_1 er Gly, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Gly,

- 5-iv) når Z_1 er Pro, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Leu,
- 5-v) når Z_1 er Met, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Asp,
- 5-vi) når Z_1 er Asn-Bzl, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Leu,

6) i tilfelle hvor X_2 er et hydrogenatom og R_2 er et peptid med 2 aminosyrer,

- 6-i) når Z_1 er Leu, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Leu,
- 6-ii) når Z_1 er Ser, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Asp, og

7) i tilfelle hvor X_2 er et hydrogenatom og R_2 er et peptid med 3 aminosyrer,

- 7-i) når Z_1 er Leu, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Phe,
- 7-ii) når Z_1 er Met, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Phe;

forutsatt at følgende forbindelser er ekskluderte

Ala-Pro, Gly-Leu, Gly-Phe, Val-Leu, Leu-Leu, Tyr-Leu, Ac-D-Ala-D-Ala, Gly-Gly-OEt, Leu-Ala-OMe, Ac-Gly-Pro-OMe, Boc-Leu-Ala-OMe, Gly-Pro-Leu, Gly-Pro-Phe, Ala-Gly-Gly, Gly-Leu-Pro, Phe-Asp-Met, Gly-Leu-Pro, Dansyl-Tyr-Val-D-Ala, Cbz-Gly-Leu-Ala, Thr-Leu-Asn-Bzl, Z-Pro-Pro-Gly-OEt, Leu-Leu-Leu-Leu, Lys-Arg-Asp-Ser, Ac-Leu-Ala-Ala-Gln (NM_2), Ac-Leu-Ala-Ala-Gln (NMe_2) - SEt, Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu og Tyr-Gly-Gly-Phe-Met, hvor Ac er acetyl, Et er etyl, Me er metyl, Boc er t-butyloksykarbonyl, Dansyl er dansyl, Cbz er karbobenzylloksy, Bzl er benzoyl, Z er benzyloksykarbonyl, Set er etanetiol og NMe_2 er dimetylamino.

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre ^{13}C - eller ^{14}C -merket forbindelse eller salt derav ifølge krav 1, kjennetegnet ved at den blir valgt fra gruppen bestående av følgende forbindelser:

- (a) Phe- ^{13}C -Leu,
- (b) Arg- ^{13}C -Leu,
- (c) Bz-Ala- ^{13}C -Ala,
- (d) Bz-Gly- ^{13}C -Leu,
- (e) Bz-Phe- ^{13}C -Gly,
- (f) Bz-Tyr- ^{13}C -Leu,
- (g) Bz-Phe- ^{13}C -Leu,
- (h) Bz-(DL)Phe- ^{13}C -Leu,
- (j) Bz-Arg- ^{13}C -Leu,
- (k) Ac-Phe- ^{13}C -Leu,

- (l) Ac-Tyr- ^{13}C -Leu,
- (m) Bz-Ala- ^{13}C -Ala-OMe,
- (n) Bz-Gly- ^{13}C -Leu-OMe,
- (o) Bz-Phe- ^{13}C -Gly-OMe,
- 5 (p) Bz-Phe- ^{13}C -Leu-OMe,
- (q) Bz-(DL)Phe- ^{13}C -Leu-OMe,
- (r) Ac-Phe- ^{13}C -Leu-OMe,
- (s) Ac-Tyr- ^{13}C -Leu-OMe,
- (t) Bz-Ala-Ala-Ala-Ala-Gly-Phe- ^{13}C -Leu,
- 10 (u) Boc-Ala-Ala-Ala-Ala-Gly-Phe- ^{13}C -Leu, og
- (v) Bz-Ala-Ala-Ala-Ala- ^{13}C -Gly-Phe-Leu.

Fig. 1 viser chymotrypsinogen og amylaseinnhold i bukspyttkjertelen til en oljesyre-injisert gruppe og en kontrollgruppe. I oljesyre-injisert gruppe (●), ble 50 μ l oljesyre injisert inn i bukspyttkjertelkanalen til 17 Wistar hanrotter som var 5 uker gamle (n=17). I kontrollgruppen (○), ble bare laparotomi utført (n=11). Etter
15 behandlingen ble rotter fra begge gruppene oppbevart i 3 uker. Deretter ble bukspyttkjertelen fjernet, og chymotrypsinogen og amylaseinnholdene ble bestemt.

Fig. 2 viser tidsforløpet av grad av økning av ^{13}C -konsentrasjonen i utåndet $^{13}\text{CO}_2$ ($\Delta^{13}\text{C}$ (‰)) etter administrering av Bz-DL-Phe-(^{13}C -Leu)-Na. Ved 0 minutt ble
20 Bz-DL-Phe-(^{13}C -Leu) -Na (250 mg/kg) oralt administrert til kroniske pancreatittrotter (stiplet linje, n=8) og kontrollrotter (heltrukken linje, n=4).

Fig. 3 viser fordelingen av verdier for kroniske pancreatittrotter (●, n=8) og normale rotter (○, n=4) i PFD og Bz-DL-Phe-(^{13}C -Leu) (^{13}C -BPL)-pustetester. Hver rotte ble utsatt for PFD-test før Bz-DL-Phe-(^{13}C -Leu)-pustetesten. Sensitivitet
25 (forhold mellom sanne testpositive resultater og totalt sanne positive resultater) er vist nedenfor for hver fordeling når en cut-off verdi (bar) er innstilt slik at spesifisiteten (forholdet mellom sann testnegativ og total sann negativ) er 100%.

Fig. 4 viser fordeling av verdier for kroniske pancreatittrotter (●, n=8) og normale rotter (○, n=7) i PFD og Bz-Ala-(^{13}C -Ala) (^{13}C -BAA)-pustetester. Hver rotte
30 ble utsatt for PFD-test før Bz-Ala-(^{13}C -Ala)-pustetesten. Sensitiviteten (forholdet mellom sanne testpositive og totalt sanne positive) er vist nedenfor for hver fordelingsfremstilling når en cut-off verdi (bar) er innstilt slik at spesifisiteten (forholdet mellom sann testnegativ og total sann negativ) er 100%.

Fig. 5 viser fordelingen av verdier for kroniske pancreatittrotter (●, n=10) og normale rotter (○, n=10) i PFD og Bz-Gly-(^{13}C -Leu) (^{13}C -BGL)-pustetester. Hver rotte ble utsatt for PFD-testen før Bz-Gly-(^{13}C -Leu)-pustetesten. Sensitiviteten (forholdet mellom sanne positive testresultater og totalt sanne positive testresultater) er vist nedenfor for hver fordelingsfremstilling når en cut-off verdi (bar) er innstilt slik at spesifisiteten (forholdet mellom sant negativt testresultat og totalt sant negativt testresultat) er 100%.

Foreliggende oppfinnelse vil nedenfor bli beskrevet i detalj.

Peptider er indikert heri på en slik måte at den N-terminale enden er til venstre og den C-terminale enden er til høyre.

Aminosyreresidientene er vist i tre-bokstavforkortelser og når vist i tre-bokstavforkortelse er aminosyrene L-isomerer dersom intet annet er angitt.

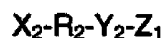
"Aminosyre" refererer heri en hvilken som helst forbindelse med karboksyl og aminogrupeer i molekylet og innbefatter iminosyrer så som prolin og hydroksyprolin og forbindelser med en laktamstruktur i molekylet.

"Peptid" refererer heri til en hvilken som helst forbindelse som blir dannet ved kobling av minst to aminosyrer via en peptidbinding og innbefatter homomere peptider bestående av aminosyrer, heteromere peptider omfattende en ikke-aminosyrekomponent(er), og derivater derav. Peptidet har mindre enn eller lik 100 aminosyreresidier.

"Aminosyre eller peptid inneholdende minst ett ^{13}C eller ^{14}C atom" refererer heri til en hvilken som helst aminosyre eller peptid hvor minst ett karbonatom er til stede i aminosyren, aminosyreresidier til peptidet, en modifierende gruppe eller en beskyttelsesgruppe derav er erstattet med et ^{13}C eller ^{14}C atom, resulterende i anrikete ^{13}C eller ^{14}C atomer i aminosyren eller peptidmolekylene i forhold til det som er i naturen.

Diagnostisk middel for bukspyttkjertel eksokrin funksjon ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter en aminosyre eller et peptid inneholdende minst et ^{13}C eller ^{14}C atom, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav forskjellig fra Bz-Tyr- ^{13}C -PABA. Aminosyremolekylet kan inneholde et ^{13}C eller ^{14}C atom. Alternativt, når aminosyren eller peptidet har en modifierende eller beskyttende gruppe, kan den modifierende eller beskyttende gruppe inneholde et ^{13}C eller ^{14}C atom.

Foreliggende oppfinnelse omfatter følgelig en ^{13}C - eller ^{14}C -merket forbindelse representert ved følgende formel (II):



(II)

eller et salt derav,

hvor X_2 er et hydrogenatom eller en beskyttelsesgruppe,

R_2 er et peptid med 2 til 5 aminosyrer, en aminosyre eller en enkeltbinding,

5 Y_2 er en aminosyre,

Z_1 er en aminosyre som eventuelt har en beskyttelsesgruppe, og

minst en av aminosyrene i R_2 , Y_2 og Z_1 , eller minst en av beskyttelsesgruppene i X_2 og

Z_1 når beskyttelsesgruppene inneholder et karbonatom, er ^{13}C - eller ^{14}C -merket.

I formel (II) er X_2 et hydrogenatom eller en beskyttelsesgruppe. Beskyttelses-

10 gruppen innbefatter hvilke som helst beskyttelsesgrupper som generelt blir anvendt innenfor området organisk kjemi, for eksempel, som beskrevet i "Textbook for Biochemical Experiments 1 - Protein Chemistry IV", utgitt av Japan Biochemical Society, publisert av Tokyo Kagaku Dojin (1977); "Textbook for Experimental Chemistry 22 - Organic Synthesis IV", utgitt av Japan Chemical Society, publisert av

15 Maruzen (1992); "Bases and Experiments of Peptide Synthesis", Nobuo Izumiya, Tetsuo Kato, Tohiko Aoyagi og Maichinori Waki, publisert av Maruzen (1985); "Modification of Proteins", utgitt av Robert E. Feeney, John R. Whitaker, the American Chemical Society (1982); M. Bodanszky, "Principles of Peptides Synthesis", Springer-Verlag, Berlin (1984); og E. Schroder, K. Lubke, "The

20 Peptides", Academic Press, N.Y. Vol. 1 (1965), Vol. 2 (1966). Eksempler derav innbefatter benzoyl, acetyl, benzyloksykarbonyl, subsituert benzyloksykarbonyl (slik som p-nitrobenzyloksykarbonyl, p-metoksybenzyloksykarbonyl, osv.), t-butyloksykarbonyl, 9-fluorenylmetoksykarbonyl, p-toluensulfonyl, ftalyl, formyl, trifluoracetyl, trifenylmetyl, cykloheksyloksykarbonyl, o-nitrofenylsulfenyl, t-acyloksykarbonyl,

25 isobornyloksykarbonyl, difenylfosfinyl, difenylfosfinotioyl, benzyl, alkyl, allyltiokarbonyl, o-nitrofenoksyacetyl, kloracetyl, benzensulfonyl, dibenzylfosfonyl, trialkylsilyl, allyliden og acetoacetyl-grupper.

R_2 er et peptid med 2 til 5 aminosyrer, en aminosyre eller en enkeltbinding.

Aminosyren innbefatter glycin, alanin, valin, leucin, isoleucin, serin, treonin, cystein,

30 metionin, fenylalanin, tyrosin, tryptofan, asparaginsyre, asparagin, glutaminsyre, glutamin, arginin, lysin, histidin, prolin og omitin.

Y_2 er en aminosyre og aminosyren innbefatter glucin, alanin, valin, leucin, isoleucin, serin, treonin, cystein, metionin, fenylalanin, tyrosin, tryptofan, asparaginsyre, asparagin, glutaminsyre, glutamin, arginin, lysin, histidin, prolin og omitin.

Z_1 er en aminosyre som eventuelt har en beskyttelsesgruppe. Beskyttelsesgruppen innbefatter hvilke som helst beskyttelsesgrupper som generelt blir anvendt innenfor området organisk kjemi, for eksempel som beskrevet i "Textbook for Biochemical Experiments 1 - Protein Chemistry IV", utgitt av Japan Biochemical Society, publisert av Tokyo Kagaku Dojin (1977); "Textbook for Experimental Chemistry 22 - Organic Synthesis IV", utgitt av Japan Chemical Society, publisert av Maruzen (1992); "Bases and Experiments of Peptide Synthesis", Nobuo Izumiya, Tetsuo Kato, Tohiko Aoyagi og Michinori Waki, publisert av Maruzen (1985); "Modification of Proteins", utgitt av Robert E. Feeney, John R. Whitaker, the American Chemical Society (1982); M. Bodanszky, "Principles of Peptides Synthesis", Springer-Verlag, Berlin (1984); og E. Schroder, K. Lubke, "The Peptides", Academic Press, N.Y. Vol. 1 (1965), Vol. 2 (1966). Eksempler derav innbefatter metylester, etylester, benzylester, t-butylester og p-nitrobenzylestergrupper og N'-substituert hydrazidgrupper for beskyttelse av karboksylgruppene; benzyloksykarbonyl, p-toluensulfonyl og 2-klorbenzyloksykarbonylgrupper for beskyttelse av α -aminogruppen i lysin og ornitinresidier; nitro, metoksybenzyloksykarbonyl og p-toluensulfonylgrupper for beskyttelse av guanidinogruppen i argininresidiet; benzyl og t-butylgrupper for beskyttelse av hydroksylgruppen i hydroksylgruppe-inneholdende aminosyreresidier så som serin og tyrosinresidier; benzyloksykarbonyl og benzyloksymetylgrupper for beskyttelse av imidazolgruppen i histidinresidiet; benzyl og tritylgrupper for beskyttelse av merkaptogruppen i cysteinresidiet; sulfoksidgruppe for beskyttelse av tioetergruppen i metioninresidiet; og formylgruppe for beskyttelse av indolgruppen i tryptofanresidiet. Aminosyren innbefatter glycine, alanin, valin, leucin, isoleucin, serin, treonin, cystein, metionin, fenylalanin, tyrosin, tryptofan, asparaginsyre, asparagin, gluaminsyre, glutamin, arginin, lysin, histidin, prolin og ornitin.

Aminosyrene representert ved R_2 , Y_2 og Z_1 og peptider representert ved R_2 kan bli modifisert på forskjellige måter. Slik modifikasjon innbefatter guanidylering, suksinylering og acetylering av aminogruppene; modifikasjon av guanidinogruppen i arginin med en dikarbonylforbindelse; forestring av karboksylgrupper; sulfenylsulfonering og alkylering av tiolgruppen i cystein; etoksykarbonylering av imidazolgruppen i histidin; dannelse av sullfoniumsalter av metionin; acetylering av serin og treonin; nitrering og iodinerings av tyrosin; og nitrofenylsulfonylering av tryptofan.

Minst en av aminosyrene i R_2 , Y_2 og Z_1 , eller minst en av beskyttelsesgruppene i X_2 og Z_1 når beskyttelsesgruppene inneholder et karbonatom, er ^{13}C eller ^{14}C -merket.

Det er foretrukket at Z_1 er en ^{13}C - eller ^{14}C -merket aminosyre som eventuelt har en beskyttelsesgruppe.

I en utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse er det diagnostiske midlet kjennetegnet ved at

1) i det tilfelle hvor X_2 er en beskyttelsesgruppe valgt fra gruppen bestående av Dansyl, Cbz, Ac og Z, og R_2 er en aminosyre eller et peptid med 2 aminosyrer,

- 1-i) når Z_1 er D-Ala, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Val,
- 1-ii) når Z_1 er Ala, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Leu,
- 1-iii) når Z_1 er Gly-Oet, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Pro,
- 1-iv) når Z_1 er Gln(NMe₂) eller Gln(NMe₂) –Set, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Ala,

2) i det tilfelle hvor X_2 er Ac eller Boc, og R_2 er en enkeltbinding,

- 2-i) når Z_1 er D-Ala, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra D-Ala,
- 2-ii) når Z_1 er Pro-OMe, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Gly,
- 2-iii) når Z_1 er Ala-OMe, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Leu,

3) i det tilfelle hvor X_2 er et hydrogenatom og R_2 en aminosyre eller et peptid med 2 eller 3 aminosyrer,

- 3-i) når Z_1 er Leu, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Pro, Leu og Phe,
- 3-ii) når Z_1 er Phe, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Pro,
- 3-iii) når Z_1 er Gly, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Gly,
- 3-iv) når Z_1 er Pro, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Leu,
- 3-v) når Z_1 er Met, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Asp og Phe,
- 3-vi) når Z_1 er Asn-Bzl, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Leu,
- 3-vii) når Z_1 er Ser, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Asp, og

4) i det tilfelle hvor X_2 er et hydrogenatom og R_2 er en enkeltbinding,

- 4-i) når Z_1 er Pro, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Ala,

4-ii) når Z_1 er Leu, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Gly, Val, Leu og Tyr,

4-iii) når Z_1 er Phe, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Gly,

4-iv) når Z_1 er Gly-OEt, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Gly,

4-v) når Z_1 er Ala-OMe, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Leu,

I en annen utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse er X_2 valgt fra gruppen bestående av Ac, Bz (benzoyl), Boc, Z og et hydrogenatom.

I en foretrukket utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse har forbindelsen eller saltet derav evne til å være et substrat av en protease eller protease slik at det deretter har evne til å bli dekarboksylert for å danne $^{13}\text{CO}_2$ - eller $^{14}\text{CO}_2$. Idet proteasen eller proteasene er pankreatiske eksokrine proteaser og den pankreatiske eksokrine proteasen eller proteaser er valgt fra gruppen bestående av chymotrypsin, trypsin, elastase og karboksypeptidaser.

I en mer foretrukket utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse er X_2 en beskyttelsesgruppe og R_2 er en enkeltbinding.

I en ytterligere mer foretrukket utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse er det diagnostiske midlet kjennetegnet ved at

- 1) minst en av aminosyrene i Y_2 og Z_1 er Arg eller Lys,
- 2) minst en av aminosyrene i Y_2 og Z_1 er en aromatisk aminosyre, Leu, His eller Met,
- 3) minst en av aminosyrene i Y_2 og Z_1 er en nøytral og ikke-aromatisk aminosyre,
- 4) aminosyre i Z_1 er en aminosyre forskjellig fra Arg, Lys og Pro, eller
- 5) aminosyren i Z_1 er Arg eller Lys.

^{13}C - eller ^{14}C -merkete forbindelser representert ved ovennevnte formel (I) og farmasøytisk akseptable salter derav og ^{13}C - eller ^{14}C -merkete forbindelser representert ved ovenfor angitte formel (II) og salter derav kan bli absorbert gjennom fordøyelseskanalen etter reaksjonen til en protease eller proteaser, og dekarboksylert ved metabolsk virkning til dannelsen av $^{13}\text{CO}_2$ eller $^{14}\text{CO}_2$. Protease eller proteaser kan være bukspyttkjertel eksokrin proteaser inkludert chymotrypsin, trypsin, elastase og karboksypeptidaser representert ved karboksypeptidase A og B.

Chymotrypsin spalter spesifikt karboksylterminal peptidbinding til tyrosin, tryptofan, fenylalanin, leucin, histidin eller metionin residie og virker også på estere og amider inneholdende disse residiene.

Trypsin katalyserer hydrolyse av peptidbindingene ved karboksylterminale enden til et arginin residie, et lysin residie og et S-aminoetylcystein residie produsert ved kunstige reaksjoner. Kjemiske syntetiske produkter inneholdende et (allyl)amid eller esterbinding istedenfor peptidbindingen, kan videre være substrater for trypsin dersom de er avledet fra de tre aminosyrene.

Elastase hydrolyserer peptidbindingen ved karboksylterminale enden til alanin, glycin, valin, luecin, isoleucin og metionin redisider, som er ikke lagde ikke-aromatiske aminosyrer. Det er kjent at suksinyl-(alanyl) 3-p-nitroanilid kan være et kunstig substrat derav.

Karboksyptidase B har en virkning ved at den sekvensielt spalter fra karboksylterminale basiske aminosyrer så som arginin og lysin.

Karboksyptidase A har en virkning slik at den sekvensielt spalter fra karboksylterminusen aromatiske hydrofobe aminosyrer så som tyrosin, fenylalanin, tryptofan, leucin, isoleucin, treonin, glutamin, histidin, alanin, valin, asparagin, serin, lysin, glycin, asparaginsyre og glutaminsyre.

For å betrakte slike substratspesifiteter til proteaser som beskrevet ovenfor, kan ^{13}C - eller ^{14}C -merkete forbindelser eller salter derav fortrinnsvis bli anvendt i diagnostiske midler for bukspyttkjertel ekskokrin funksjon kan bli konstruert.

^{13}C - eller ^{14}C -merkete forbindelser kan bli syntetisert på en kjent måte ved anvendelse av kommersielt tilgjengelige aminosyrer. For eksempel kan fremgangsmåter beskrevet i "Textbook for Experimental Chemistry 22 - Organic Syntethesis IV", utgitt av Japan Chemical Society, publisert av Maurzen (1992) bli anvendt. Et illustrerende eksempel derav vil bli beskrevet nedenfor.

En ^{13}C -merket aminosyre blir oppløst i hydrogenklorid/metanol og tilbakestrømmet. Resulterende metylester blir suspendert i diklormetan og trietylamin og blir deretter dråpevis tilsatt med is-avkjøling og omrørt. Videre blir en N-benzoylamino-syre, 1-hydroksy-1H-benzotriazol. H_2O (HOBt) og diklormetan tilsatt. Deretter blir en oppløsning av 1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl)-karbodiimid-HCl (WSC) oppløst i diklormetan tilsatt og blandingen blir omrørt. Etter konsentrering blir reaksjonsblandingen ekstrahert med etylacetat, vasket med 1N HCl, 5% NaHCO_3 og vann, tørket over magnesiumsulfat, og avdampet til tørrhet, eller videre forsåpet, for å tilveiebringe ønsket ^{13}C -merket forbindelse representert ved formel (I).

^{13}C - eller ^{14}C -merkete forbindelser kan bli oppnådd i form av et salt. Saltene kan innbefatte de med uorganiske syrer så som saltsyre, svovelsyre, salpetersyre og

fosforsyrer; med organiske syrer så som maursyre, eddiksyre, propionsyre, glykolsyre, ravsyre, maleinsyre, vinsyre, sitronsyre og trifluoreddiksyre; med alkali-metaller så som natrium og kalium; med jordalkaliske metaller så som kalsium; og med organiske aminer så som ammonium, etanolamin, trietylamin og dicykloheksylamin.

Testen som anvender midlene for bukspyttkjertel eksokrin funksjon ifølge foreliggende oppfinnelse, kan bli utført ved administrering til individet ^{13}C - eller ^{14}C -merket forbindelse representert ved formel (I) eller farmasøytisk akseptabelt salt derav. En test er mulig hvor konsentrasjon av ^{13}C - eller ^{14}C -merket forbindelse blir målt i serum, urin eller avføring etter administrering, men en pustetest er ønskelig hvor en økning i ^{13}C - eller ^{14}C -konsentrasjon blir målt i utåndet CO_2 etter administrering. Når ^{13}C - eller ^{14}C -merket forbindelse representert ved formel (I) eller farmasøytisk akseptabelt salt derav administreres til et individ, kan et testmåltid eller lignende bli inntatt av individet for å indusere sekresjon av bukspyttkjertelenzymer.

To eller flere ^{13}C - eller ^{14}C -merkete forbindelser representert ved formel (I) eller farmasøytisk akseptable salter derav kan bli kombinert for bruk. I tilfellet ^{13}C , blir ^{13}C -konsentrasjon bestemt i utåndet CO_2 etter administrering, og deretter blir bukspyttkjertel eksokrin funksjon diagnostisert fra enten data angående grad av økning ($\Delta ^{13}\text{C} (\text{‰})$) av ^{13}C -konsentrasjonen i utåndet $^{13}\text{CO}_2$ ved forutbestemte tidspunkter (f.eks. 5, 10 og 15 minutter) etter administrering, eller data assosiert med tidsforløp (begynnende helling, forandring i helling, topptid osv.) i grad av økning ($\Delta ^{13}\text{C} (\text{‰})$) av ^{13}C -konsentrasjonen i utåndet $^{13}\text{CO}_2$ i løpet av en forutbestemt periode etter administrering. Når det gjelder ^{14}C , blir ^{14}C -konsentrasjonen, dvs. radioaktiviteten, bestemt i utåndet CO_2 etter administrering; og bukspyttkjertel eksokrin funksjon blir diagnostisert fra enten data angående mengde av radioaktivitet i utåndet $^{13}\text{CO}_2$ ved forutbestemte tidspunkter (f.eks. 5, 10 og 15 minutter) etter administrering, eller data assosiert med tidsforløp (begynnende helling, forandring i helling, topptid, osv.) i rateøkning av radioaktivitet i utåndet $^{13}\text{CO}_2$ i løpet av en forutbestemt periode etter administrering. Disse testmetodene anvender fenomenet at når ^{13}C - eller ^{14}C -merket forbindelse representert ved formel (I) eller farmasøytisk akseptabelt salt derav blir administrert til et individ, blir forbindelsen absorbert gjennom fordøyelseskanalen etter reaksjonen til en protease eller proteaser, og dekarboksylert ved den metabolske virkningen i kroppen for å danne $^{13}\text{CO}_2$ eller $^{14}\text{CO}_2$.

^{13}C -konsentrasjonen i utåndet $^{13}\text{CO}_2$ kan bli bestemt ved gasskromatografi-masse spektrometri (GC-MS), infrarød spektroskopi, massespektrometri, fotoelektrisk akustisk spektroskopi, NMR (nukleær magnetisk resonans) og andre metoder.

5 ^{14}C -konsentrasjon eller radioaktivitet i utåndet CO_2 kan bli målt fra pusten til et individ, direkte eller etter inneslutning av CO_2 i et oppløsningsmiddel, med en GM-teller, en væske scintillasjonsteller, en fast scintillasjonsteller, autoradiografi, et ioniseringskammer eller lignende.

Det diagnostiske midlet for bukspyttkjertel eksokrin funksjon ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli formulert fra ^{13}C - eller ^{14}C -merket forbindelse representert ved formel (I) eller farmasøytisk akseptabelt salt derav alene eller i kombinasjon med en eksipient eller bærer inn i et oralt preparat så som en tablett, kapsel, pulver, granuler, væske osv. Eksipienten eller bæreren kan være en hvilken som helst som er farmasøytisk akseptabel og som vanligvis blir anvendt innenfor området og dets natur, og sammensetning kan hensiktsmessig bli valgt. For eksempel kan vann bli anvendt som en flytende bærer. Faste bærere innbefatter cellulosederivater så som hydroksypropylcellulose og organiske syresalter så som magnesiumstearat. Fryse-tørkede preparater kan også bli anvendt.

15 ^{13}C - eller ^{14}C -merket forbindelse representert ved formel (I) eller farmasøytisk akseptabelt salt derav er innbefattet i midlet i varierende mengder avhengig av naturen til midlet, men generelt i en mengde på 1 til 100 vekt-%, fortrinnsvis 50 til 100 vekt-%. I en kapsel, tablett, granul eller pulverpreparat kan ^{13}C - eller ^{14}C -merket forbindelse representert ved formel (I) eller farmasøytisk akseptabelt salt derav være innbefattet i preparatet i en mengde på omtrent 10 til 100 vekt-%, fortrinnsvis 50-100 vekt-%, idet likevekten utgjøres av en bærer.

25 Dosen til diagnostisk middel for bukspyttkjertel eksokrin funksjon ifølge foreliggende oppfinnelse bør være tilstrekkelig for å bestemme eller bekrefte en økning av $^{13}\text{CO}_2$ eller $^{14}\text{CO}_2$ i pusten etter administrering. Den vil bli variert avhengig av alder og kroppsvekt til et individ og formålet med testen. For eksempel kan enhetsdosen være omtrent 1 til 1000 mg/ kg kroppsvekt i voksne.

EKSEMPLER

Nedenfor er foreliggende oppfinnelse illustrert i større detalj i følgende
5 eksempler.

Eksempel 1: Fremstilling av Bz-DL-Phe-(^{13}C -Leu)-OMe

Etter at 1 g 1- ^{13}C -L-leucin (Masstrace) var blitt oppløst i hydrogenklorid/-
metanol og tilbakestrømmet, ble resulterende ^{13}C -L-leucinmetylester suspendert i
10 50 ml diklormetan, og 1,08 ml trietylamin ble dråpevis tilsatt med is-avkjøling og
omrørt. Videre ble 2,0 g N-benzoyl-DL-fenylalanin, 2,34 g HOBt (1-hydroksy-1H-
benzotriazol- H_2O) og 50 ml diklormetan tilsatt. Deretter ble en oppløsning av 1,49 g
WSC (1-etyl-3-(3-dimetylamino)propyl)-karbodiimid-HCl oppløst i 100 ml diklormetan
tilsatt og omrørt i 1 time med is-avkjøling og deretter over natt ved romtemperatur.
15 Endt reaksjon ble bekreftet ved silica gel tynnsjikt-kromatografi ved anvendelse av
kloroform:metanol (95:5) som et utviklende oppløsningsmiddel.
Reaksjonsblandingen ble konsentrert, ekstrahert med etylacetat, vasket med 1N-HCl,
5% NaHCO_2 og vann, tørket over magnesiumsulfat og konsentrert til tørrhet for
tilveiebringning av 2,32 g Bz-DL-Phe-(^{13}C -Leu)-OMe.

20

Eksempel 2: Fremstilling av Bz-DL-Phe-(^{13}C -Leu) og natriumsaltet derav (Bz-DL-Phe-(^{13}C -Leu)-Na)

Etter at 2,32 g av Bz-DL-Phe-(^{13}C -Leu)-OMe var oppløst i 100 ml metanol, ble
6,4 ml 1N NaOH dråpevis tilsatt under is-avkjøling og omrørt etterfulgt av oppvarming
25 og omrøring ved 70°C i 2,5 timer. Endt reaksjon ble bekreftet ved silica gel tynnsjikt-
kromatografi ved anvendelse av kloroform:metanol (95:5) som et utviklings-
oppløsningsmiddel. Etter at reaksjonen var fullført, ble reaksjonsblandingen
nøytralisert med 1N-HCl, konsentrert og oppløst i 5% NaHCO_3 . Etter vasking med
etylacetat ble 5% NaHCO_3 surgjort med 1N-HCl. Reaksjonsblandingen ble ekstahert
30 med etylacetat, vasket med vann, tørket over magnesiumsulfat og konsentrert til
tørrhet for tilveiebringning av 1,93 g Bz-DL-Phe-(^{13}C -Leu), som deretter ble
omkrystallisert med etylacetat.

Strukturen og ^{13}C -merket posisjon ble bekreftet ved ^{13}C -NMR og massespektrometri.

^{13}C -NMR (metanol -d₄, 300 MHz) : 175,8 ppm ($^{13}\text{COOH}$)

Massespektrometri (m/z): 383 (M^+), 365, 224, 131, 105, 77

5 LC-MS (m/z): 384 ($\text{M}^+ + \text{H}$), 252, 224, 105

Natriumsaltet av Bz-DL-Phe- (^{13}C -Leu) ble oppnådd ved nøytralisering av Bz-DL-Phe- (^{13}C -Leu) med en ekvivalent av en 1M natriumkarbonat etterfulgt av lyofilisering.

10 Eksempel 3: Degradering av Bz-DL-Phe- (^{13}C -Leu) ved chymotrypsin

Bz-DL-Phe- (^{13}C -Leu) ble omsatt med chymotrypsin og degraderingsproduktet, leucin, dannet etter virkning av chymotrypsin, ble kvantitativt bestemt ved ninhydridreaksjon. Reaksjonen ble utført i 20 mM HEPPS-Na (pH 8,0), 23 mM Bz-DL-Phe- (^{13}C -Leu), 0,16 mg/ml chymotrypsin (fra bovin bukspyttkjertel, Worthington

15 Biochemical Corporation, #1432, Lot 37A906) ved 37°C i 15 minutter. Etter reaksjonen ble 50 μl citratbuffer (sitronsyre monohydrat), 20 μl ninhydrin-oppløsning (50 mg/ml oppløsning i metylcellosolv) og 100 μl KCN-oppløsning (0,01 M vandig KCN-oppløsning fortynnet 50 ganger med metylcellosolv) tilsatt til 100 μl reaksjonsblanding og oppvarmet ved 100°C i 15 minutter. Etter avkjøling av ninhydrin-

20 reaksjonsblandingen til romtemperatur ble 150 μl 60 vekt-% etanol tilsatt til 100 μl ninhydrinreaksjonsblanding og omrørt etterfulgt av bestemmelse av absorbansen ved en bølgelengde på 570 nm. Et eksperiment hvor alle reaksjonene som ble utført uten tilsetning av Bz-DL-Phe- (^{13}C -Leu) ble angitt som en "blank" og leucin ble anvendt som en standard.

25 Bz-DL-Phe- (^{13}C -Leu) ble degradert ved omsetning med chymotrypsin for å fremstille leucine. Degraderingsraten var 1,72 nmol/mg chymotrypsin/min. Ut i fra disse resultatene ble det bekreftet at Bz-DL-Phe- (^{13}C -Leu) kunne være et substrat for chymotrypsin.

30 Eksempel 4: Fremstilling av Bz-Ala- (^{13}C -Ala)-OMe

Etter at 2 g 1- ^{13}C -L-alanin (Masstrace) var blitt oppløst i hydrogenklorid-/metanol og tilbakestrømmet, ble resulterende ^{13}C -L-alaninmetylester suspendert i 100 ml diklormetan, og 4,0 ml trietylamin ble dråpevis tilsatt med is-avkjøling og

omrørt. Videre ble 5,6 g N-benzoyl-L-alanin, 8,9 g HOBt og 100 ml diklormetan tilsatt. Deretter ble en oppløsning av 5,6 g WSC oppløst i 200 ml diklormetan tilsatt og omrørt i 1 time med is-avkjøling og deretter over natt ved romtemperatur. Endt reaksjon ble bekreftet ved silica gel tynnsjiktskromatografi ved anvendelse av kloroform:metanol (95:5) som et utviklende oppløsningsmiddel. Reaksjonsblandingen ble konsentrert, ekstrahert med etylacetat, vasket med 1N-HCl, 5% NaHCO₃ og vann, tørket over magnesiumsulfat og konsentrert til tørrhet for tilveiebringning av 4,38 g Bz-Ala- (¹³C-Ala)-OMe.

Eksempel 5: Fremstilling av Bz-Ala- (¹³C-Ala) og dets natriumsalt

Etter at 4,38 g Bz-Ala- (¹³C-Ala)-OMe var blitt oppløst i 100 ml metanol, ble 16 ml 1N NaOH dråpevis tilsatt med is-avkjøling og omrørt etterfulgt av oppvarming og omrøring ved 70°C i 2 timer. Endt reaksjon ble bekreftet ved silica gel tynnsjiktskromatografi ved anvendelse av kloroform:metanol (95:5) som et utviklende oppløsningsmiddel. Etter at reaksjonen var fullført, ble reaksjonsblandingen nøytralisert med 1N-HCl, konsentrert og oppløst i 5% NaHCO₃. Etter vasking med etylacetat ble 5% NaHCO₃ surgjort med 1N-HCl. Reaksjonsblandingen ble ekstrahert med etylacetat, vasket med vann, tørket over magnesiumsulfat og konsentrert til tørrhet for tilveiebringning av 2,85 g Bz-Ala- (¹³C-Ala), som deretter ble omkrystallisert med etylacetat.

Strukturen og ¹³C-merket posisjon ble bekreftet ved ¹³C-NMR og masse-spektrometri.

¹³C-NMR (metanol -d₄, 300 MHz): 175,9 ppm (¹³COOH)

LC-MS (m/z): 266 (M⁺+H), 176, 148, 105

Natriumsaltet av Bz-Ala- (¹³C-Ala) ble oppnådd ved nøytralisering av Bz-Ala- (¹³C-Ala) med en ekvivalent 1M natriumkarbonat etterfulgt av lyofilisering.

Eksempel 6: Fremstilling av Bz-Gly- (¹³C-Leu) -OMe

Etter at 2 g 1- ¹³C-L-leucin (Masstrace) var oppløst i hydrogenklorid/metanol og tilbakestrømmet, ble resulterende ¹³C-L-leucinmetylester suspendert i 100 ml diklormetan, og 2,4 ml trietylamin ble dråpevis tilsatt med is-avkjøling og omrørt. Videre ble 3,0 g N-benzoylglycin, 5,1 g HOBt og 100 ml diklormetan tilsatt. Deretter ble en oppløsning av 3,3 g WSC oppløst i 200 ml diklormetan tilsatt og omrørt i 1 time med is-avkjøling og deretter over natt ved romtemperatur. Endt reaksjon ble

bekreftet ved silica gel tynnsjiktskromatografi ved anvendelse av kloroform:metanol (95:5) som et utviklende oppløsningsmiddel. Reaksjonsblandingen ble konsentrert, ekstrahert med etylacetat, vasket med 1N-HCl, 5% NaHCO₃ og vann, tørket over magnesiumsulfat og konsentrert til tørrhet for tilveiebringning av Bz-Gly- (¹³C-Leu) - OMe.

Eksempel 7: Fremstilling av Bz-Gly- (¹³C-Leu) og dets natirumsalt

Etter at 4,38 g Bz-Gly- (¹³C-Leu) -OMe var oppløst i 100 ml metanol, ble 15 ml 1N NaOH dråpevis tilsatt med is-avkjøling og omrørt etterfulgt av oppvarming og omrøring ved 70°C i 2,5 timer. Endt reaksjon ble bekreftet ved silica gel tynnsjiktskromatografi ved anvendelse av kloroform:metanol (95:5) som et utviklende oppløsningsmiddel. Etter at reaksjonen var fullført, ble reaksjonsblandingen nøytralisert med 1N-HCl, konsentrert og oppløst i 5% NaHCO₃. Etter vasking med etylacetat ble 5% NaHCO₃ surgjort med 1N-HCl. Reaksjonsblandingen ble ekstrahert med etylacetat, vasket med vann, tørket over magnesiumsulfat og konsentrert til tørrhet for tilveiebringning av 3,83 g Bz-Gly- (¹³C-Leu), som deretter ble omkrystallisert med etylacetat.

Struktur og ¹³C-merket posisjon ble bekreftet ved ¹³C-NMR og masse-spektrometri.

¹³C-NMR (CDCl₃, 300 Mhz) : 175,5 ppm (¹³COOH)
 Massespektrometri (m/z) : 293 (M⁺), 275, 134, 105, 77
 LC-MS (m/z) : 294 (M⁺+H), 162, 134, 105

Natriumsaltet av Bz-Gly- (¹³C-Leu) ble oppnådd ved nøytralisering av Bz-Gly- (¹³C-Leu) med en ekvivalent 1M natriumkarbonat etterfulgt av lykofilisering.

Eksempel 8: Fremstilling av Bz-DL-Phe- (¹³C-Gly) - OMe

Etter at 570 mg 1-¹³C-glycin (Masstrace) ble oppløst i hydrogenklorid/metanol og tilbakestrømmet, ble resulterende ¹³C-glycinmetylester suspendert i 50 ml diklormetan, og 1 ml trietylamin ble dråpevis tilsatt med is-avkjøling og omrørt. Videre ble 2,0 g N-benzoyl-DL-fenylalanin, 2,3 g HOBt og 50 ml diklormetan tilsatt. Deretter ble en oppløsning av 1,41 g WSC oppløst i 100 ml diklormetan tilsatt og omrørt i 1 time med is-avkjøling og deretter over natt ved romtemperatur. Endt reaksjon ble bekreftet ved silica gel tynnsjiktskromatografi ved anvendelse av kloroform:metanol (95:5) som et utviklende oppløsningsmiddel. Reaksjonsblandingen ble konsentrert,

ekstrahert med etylacetat, vasket med 1N-HCl, 5% NaHCO₃ og vann, tørket over magnesiumsulfat, og konsentrert til tørrhet for tilveiebringning av 2,11 g Bz-DL-Phe- (¹³C-Gly) - OMe.

5 Eksempel 9: Fremstilling av Bz-DL-Phe- (¹³C-Gly) og natriumsaltet derav

Etter at 2,11 g Bz-DL-Phe- (¹³C-Gly) -OMe var blitt oppløst i 100 ml metanol, ble 6,9 ml 1N NaOH dråpevis tilsatt med is-avkjøling og omrørt etterfulgt av oppvarming og omrøring ved 70°C i 2,5 timer. Endt reaksjon ble bekreftet ved silica gel tynnsjiktskromatografi ved anvendelse av kloroform:metanol (95:5) som et
10 utviklende oppløsningsmiddel. Etter at reaksjonen var fullført, ble reaksjonsblandingens nøytralisert med 1N-HCl, konsentrert og oppløst i 5% NaHCO₃. Etter vasking med etylacetat ble 5% NaHCO₃ surgjort med en 1N-HCl. Reaksjonsblandingens ble ekstrahert med etylacetat, vasket med vann, tørket over magnesiumsulfat og konsentrert til tørrhet for tilveiebringning av 1,3 g Bz-DL-Phe- (¹³C-Gly).

15 Struktur og ¹³C-merket posisjon ble bekreftet ved ¹³C-NMR og masse-spektrometri.

¹³C-NMR (CDCl₃, 300 MHz): 179,2 ppm (¹³COOH)

Massespektrometri (m/z): 327 (M⁺), 309, 224, 161, 105, 77

LC-MS (m/z): 328 (M⁺+H), 252, 224, 105

20 Natriumsaltet av Bz-DL-Phe- (¹³C-Gly) ble oppnådd ved nøytralisering av Bz-DL-Phe- (¹³C-Gly) med en ekvivalent 1M natriumkarbonat etterfulgt av lyofilisering.

Eksempel 10: Fremstilling av Ac-Phe- (¹³C-Leu) -OMe

Etter at 1,16 g 1-¹³C-L-leucin (Masstrace) var oppløst i hydrogenklorid/metanol
25 og tilbakestrømmet, ble resulterende ¹³C-L-leucinmetylester suspendert i 50 ml diklormetan, og 1,2 ml trietylamin ble dråpevis tilsatt med is-avkjøling og omrørt. Videre ble 1,8 g N-actyl- L-fenylalanin, 2,7 g HOBt og 50 ml diklormetan tilsatt. Deretter ble en oppløsning av 1,7 g WSC oppløst i 100 ml diklormetan tilsatt og omrørt i 1 time med is-avkjøling og deretter over natt ved romtemperatur. Endt
30 reaksjon ble bekreftet ved silica gel tynnsjiktskromatografi ved anvendelse av kloroform:metanol (95:5) som et utviklende oppløsningsmiddel. Reaksjonsblandingens ble konsentrert, ekstrahert med etylacetat, vasket med 1N-HCl, 5% NaHCO₃ og vann, tørket over magnesiumsulfat og konsentrert til tørrhet for tilveiebringning av 2,62 g Ac-Phe- (¹³C-Leu) -OMe.

Eksempel 11: Fremstilling av Ac-Phe- (^{13}C -Leu) og natriumsaltet derav

Etter at 2,62 g Ac-Phe- (^{13}C -Leu) var oppløst i 100 ml metanol, ble 9,3 ml 1N NaOH dråpevis tilsatt med is-avkjøling og omrørt etterfulgt av oppvarming og omrøring ved 70°C i 2,5 timer. Endt reaksjon ble bekreftet ved silica gel tynnsjikt-kromatografi ved anvendelse av kloroform:metanol (95:5) som et utviklende oppløsningsmiddel. Etter at reaksjonen var fullført, ble reaksjonsblandingen nøytralisert med 1N-HCl, konsentrert og oppløst i 5% NaHCO_3 . Etter vasking med etylacetat ble 5% NaHCO_3 surgjort med 1N-HCl. Reaksjonsblandingen ble ekstrahert med etylacetat, vasket med vann, tørket over magnesiumsulfat og konsentrert til tørrhet for tilveiebringning av 2,44 g Ac-Phe- (^{13}C -Leu), som deretter ble omkrystallisert med etylacetat.

Struktur og ^{13}C -merket posisjon ble bekreftet ved ^{13}C -NMR og masse-spektrometri.

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 300 MHz) : 175,9 ppm ($^{13}\text{COOH}$)

LC-MS (m/z) : 322 ($\text{M}^+ + \text{H}$), 190, 162, 120

Natriumsaltet av Ac-Phe- (^{13}C -Leu) ble oppnådd ved nøytralisering av Ac-Phe- (^{13}C -Leu) med en ekvivalent av 1M natriumkarbonat etterfulgt av lyofilisering.

Eksempel 12: Fremstilling av Ac-Tyr- (^{13}C -Leu) -OMe

Etter at 0,98 g 1- ^{13}C -L-leucin (Masstrace) var blitt oppløst i hydrogenklorid-/metanol og tilbakestrømmet, ble resulterende ^{13}C -L-leucinmetylester suspendert i 50 ml diklormetan, og 1,0 ml trietylamin ble dråpevis tilsatt med is-avkjøling og omrørt. Videre ble 1,65 g N-acetyl-L-tyrosin, 2,26 g HOBt og 50 ml diklormetan tilsatt. Deretter ble en oppløsning av 1,42 g WSC oppløst i 100 ml diklormetan tilsatt og omrørt i 1 time med is-avkjøling og deretter over natt ved romtemperatur. Endt reaksjon ble bekreftet ved silica gel tynnsjikt-kromatografi ved anvendelse av kloroform:metanol (95:5) som et utviklende oppløsningsmiddel.

Reaksjonsblandingen ble konsentrert, ekstrahert med etylacetat, vasket med 1N-HCl, 5% NaHCO_3 og vann, tørket over magnesiumsulfat, og konsentrert til tørrhet for tilveiebringning av 2,14 g Ac-Tyr- (^{13}C -Leu) -OMe.

Eksempel 13: Fremstilling av Ac-Tyr- (^{13}C -Leu) og natriumsaltet derav

Etter at 2,14 g Ac-Tyr- (^{13}C -Leu) -OMe var blitt oppløst i 100 ml metanol, ble 7,3 ml 1N NaOH dråpevis tilsatt med is-avkjøling og omrørt etterfulgt av oppvarming og omrøring ved 70°C i 2,5 timer. Endt reaksjon ble bekreftet ved silical gel tynnsjiktskromatografi ved anvendelse av kloroform:metanol (95:5) som et utviklende oppløsningsmiddel. Etter at reaksjonen var fullført, ble reaksjonsblandingen nøytralisert med 1N-HCl, konsentrert og oppløst i 5% NaHCO_3 . Etter vasking med etylacetat, ble 5% NaHCO_3 surgjort med 1N-HCl. Reaksjonsblandingen ble ekstrahert med etylacetat, vasket med vann, tørket over magensiumsulfat og konsentrert til tørrhet for tilveiebringning av 1,36 g Ac-Tyr- (^{13}C -Leu), som deretter ble omkrystallisert med etylacetat.

Strukturen og ^{13}C -merket posisjon ble bekreftet ved ^{13}C -NMR og masse-spektrometri.

^{13}C -NMR (metanol -d₄), 300 MHz) : 175,8 ppm ($^{13}\text{COOH}$)

LC-MS (m/z) : 338 ($\text{M}^+ + \text{H}$), 206, 178, 136

Natriumsaltet av Ac-Tyr- (^{13}C -Leu) ble oppnådd ved nøytralisering av Ac-Tyr- (^{13}C -Leu) med en ekvivalent 1M natriumkarbonat etterfulgt av lyofilisering.

Eksempel 14: Fremstilling av en modell av kronisk pancreatitt i rotter

14-1 Fremgangsmåte for fremstilling

En modell på kronisk pancreatitt i rotter ble dannet ved injisering av oljesyre inn i bukspyttkjertelkanalen (Mundlos et al., *Pancreas* 1:29 (1986)). Etter faste over natt ble en Wistar hanrotte som var 5 uker gammel, bedøvd ved intraperitoneal administrering av Nembutal (50 mg/kg). Abdominalveggen ble barbert, og rotten ble holdt i ryggeleie på et operasjonsbord. En isodinoppløsning ble påført for å sterilisere, og et 3 til 4 cm midtlinje-innsnitt ble dannet på abdomen. Tolvfingertarmen og bukspyttkjertelen ble tatt ut og en 25G nål ble ført gjennom tolvfingertarmveggen. En polytlenkanyle (PE-10) ble satt inn gjennom hullet inn i tolvfingertarmen og videre ført inn i felles gallekanal omtrent 5 mm fra papilla. Innført kanyle ble holdt med en klype. Videre ble gallekanalen lukket med en klype for å forhindre at oljesyre strømmer inn i leveren. Oljesyre (50 μl) ble injisert i en rate på 20 $\mu\text{l/min}$ med en mikrosprøytepumpe. Etter at injeksjonen var fullført ble rotten latt stå i 2 minutter slik at oljesyren ble fordelt i bukspyttkjertelen. Klyper og kanyler ble fjernet, og

tolvfingerarmen ble returnert. Endotelet ble sydd med silkestråd (Nescosutur-silke sytråd 3-0, Nihon Shoji KK) og den ytre huden ble sydd med hudstift (Appose ULC, No. 8034-12, 5,7 x 3,8 mm). Som en kontroll ble bare laparotomi utført. Disse rottene utsatt for operasjon ble oppbevart ved fritt inntak av standard fôr og vann ved 23°C, relativ fuktighet på 55% frem til bruk.

14-2 Vurdering

Etter injisering av oljesyre inn i bukspyttkjertelkanalen og oppbevaring 3 uker, ble disse rottene (oljesyre-injiserte rotter) utsatt for måling av amylase i blodet; og for kvantitativ bestemmelse av chymotrypsinogen og amylaseinnhold i bukspyttkjertelen (fig. 1). En ekstraheringsbuffer (20 mM HEPPS+Na, pH 8,0, 100 mM KCl, 0,5 vekt-% Triton X-100) ble tilsatt til fjernet bukspyttkjertel til et totalt volum av 10 ml. Materialet ble utsatt for ultralyd-ødeleggelse (Bionic 7250, Seiko, Sonics & Materials) og sentrifugert ved 10.000 x g i 20 minutter for å tilveiebringe et bukspyttkjertel-ekstrakt som en supernatant. Til 200 µl av bukspyttkjertelekstraktet ble 200 µl 1 mg/ml trypsin (fra bukspyttkjertelen til gris, Biozyme, code TRY1, batch 0196), som var 5 mg/ml trypsin, 1 mM acetatbuffer, pH 3,2, fem ganger fortynnet med 20 mM Hepes-Na, pH 8,0, tilsatt og latt stå ved 4°C i 2 timer for å aktivere chymotrypsinogen til chymotrypsin (Lampel og Kern, Virchows Archiv A 373:97 (1977)). Etter tilsetning av 30 µl av aktivert bukspyttkjertelekstrakt og 20 µl 123,8 mM BT-PABA til 150 µl 20 mM HEPPS-Na, pH 8,0, ble chymotrypsinreaksjon utført ved 37°C i 15 minutter. Etter reaksjonen ble 10 µl 100% (W/V) TCA oppløsning tilsatt og sentrifugert ved 15.000 x g i 5 minutter, og PABA i supernatanten ble kvantitativt bestemt ved anvendelse av et PABA målesett (Eisai). Amylaseaktiviteten i bukspyttkjertel-ekstraktet ble målt ved anvendelse av Fuji Dri-Chem. Begge enhetene for aktivitet (U) viser µ-mol frigjøring/min.

Chymotrypsinogen-innholdet var $62,4 \text{ U} \pm 26,2$, $n=11$ i kontrollrottene og $8,1 \text{ U} \pm 10,7$, $n=17$ i oljesyre-injiserte rotter. Amylaseinnholdet var $8681 \text{ U} \pm 5622$, $n=11$ i kontrollrottene og $789 \text{ U} \pm 1842$, $n=17$ i oljesyre-injiserte rotter. Begge enzym-innholdene ble følgelig betydelig redusert i oljesyre-injiserte rotter (fig. 1). Spesielt ble chymotrypsinogen-innholdet betydelig redusert. Pancreatitt kan følgelig bli vurdert å ha oppstått i 12 rotter blant 17 oljesyre-injiserte rotter (70%), dersom normal nedre grense er gjennomsnittet -2SD av chymotrypsinogen-innholdet for kontrollen. På den andre siden var blodamylasekonsentrasjonene til begge rottene på samme nivå, og

som forøkes i den akutte perioden til pancreatitt, $1930 \text{ U} \pm 823$, $n=11$, i kontrollrottene og $2137 \text{ U} \pm 668$, $n=17$, i oljesyre-injiserte rotter. Oljesyre-injiserte rotter er derfor karakterisert som en modell for kronisk pancreatitt.

Eksempel 15: Bz-DL-Phe- (^{13}C -Leu)-pustetest

15-1 Fremgangsmåte

Rotter fra modellen på kronisk pancreatitt og kontrollrotter, som ble oppbevart i 3 til 4 uker etter operasjon, ble fastet fra kl. 9:00. Ved kl. 16:00 ble 3 mg/ml BT-PABA (PFD-oppløsning for innvortes bruk, Eisai) oralt administrert i en mengde på 15 mg/kg. Urin ble samlet i 16 timer helt til kl. 9:00 neste dag. Mengden av oppsamlet urin og PABA-konsentrasjonen i urinen ble bestemt ved anvendelse av et PABA målesett for å bestemme utskillelesraten i urinen (PFD-test).

Etter PFD-testen ble Bz-DL-Phe- (^{13}C -Leu) -Na oppløst i fortynnet vann (250 mg/kg, 6 ml/kg) administrert oralt til rottene, som fastet i 24 timer, for å utføre en ^{13}C -pustetest. 9 uker gammel rotte ble fiksert uten bedøvning i en rotteholder til en mikrobølgebestrålningsapparat. Pusten ble samlet i en rate på omtrent 100 til 300 ml/min ved anvendelse av en slagpumpe (Variable Stroke Pump VS-500, Shibata Kagaku Kohyo) og ført direkte til en strømningscelle til en $^{13}\text{CO}_2$ -analysator EX-130S (Nihon Bunko). En Perma Pure tørker (MD-050-12P, Perma Pure INC.) ble plassert mellom rotteholderen og slagpumpen for å fjerne vanndamp i pusten. CO_2 -konsentrasjonen ble stabilisert, rotten ble en gang tatt ut av rotteholderen og Bz-DL-Phe- (^{13}C -Leu) -Na oppløst i destillert vann ble administrert i maven ved anvendelse av en oral sonde.

Data for ytelse fra $^{13}\text{CO}_2$ -analysatoren ble AD-konvertert og plotet inn i en personlig datamaskin (Apple Power Macintosh 8500). Ved anvendelse av programvaren Lab VIEW (National Instruments), ble 10 datapunkter ved hver 100 msek integrert og tatt gjennomsnitt av i et intervall på 5 sekunder og omdannet til ^{13}C atom %, $\Delta^{13}\text{C}$ (‰), og CO_2 -konsentrasjonen (%). På denne måten ble ^{13}C -pustetesten kontinuerlig utført. Omdannede data ble vist i sann tid og lagret på en harddisk. CO_2 -konsentrasjonen i oppsamlet pust ble holdt ved $3 \pm 0,5\%$.

$\Delta^{13}\text{C}$ (‰) ble beregnet fra ^{13}C -konsentrasjonen i utåndet CO_2 ved hvert tidspunkt (^{13}C tmin) og ^{13}C -konsentrasjon i standard CO_2 (^{13}C std) ifølge denne ligningen:

$$\Delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = [(^{13}\text{C}_{\text{tmin}} - ^{13}\text{C}_{0\text{min}} / ^{13}\text{C}_{\text{std}}) \times 1000]$$

Etter pustetesten ble abdomen til rotten åpnet under bedøvelse ved intraperitoneal administrering av Nembutal (50 mg/kg), og hele bukspyttkjertelen ble fjernet og veid. Deretter ble chymotrypsinogennivået bestemt.

15-2 Resultater

Bz-DL-Phe- (^{13}C -Leu)-pustetesten ble utført (fig. 2), idet 250 mg/kg Bz-DL-Phe- (^{13}C -Leu) ·Na ble oralt administrert til kroniske pancreatitt- og kontrollrotter, og tidsforløpet til $^{13}\text{CO}_2$ -konsentrasjonen i utåndet CO_2 etter administreringen ble målt. Kontrollrottene hvor $\Delta^{13}\text{C}$ (‰)-verdien begynte å øke 2 til 3 minutter etter administrering, til tross for at det var visse forskjeller i økningsgraden blant de enkelte rottene. Verdien nådde en topp på 100 til 200 ‰ og ble deretter gradvis redusert. I 7 tilfeller med kroniske pancreatittrotter var derimot økningsgraden liten og fortsatte å øke sakte i 30 minutter. Den gjenværende ene rotten viste samme adferd som kontrollrottene, men topptidspunktet var senere. 10 minutter etter administrering var $\Delta^{13}\text{C}$ (‰)-verdiene til kroniske pancreatittrotter mindre enn den minste verdien av $\Delta^{13}\text{C}$ (‰) for kontrollrottene. Sensitiviteten blir 100% selv når avkuttverdien blir innstilt slik at spesifisiteten blir satt til å være 100% ved anvendelse av $\Delta^{13}\text{C}$ (‰)-verdien ved 10 minutter som en undersøkelsesverdi (fig. 3). Derimot var sensitiviteten i PFD-testen til den samme gruppen av rotter utført øyeblikkelig før pustetesten 50%, og dette indikerer at Bz-DL-Phe- (^{13}C -Leu)-pustetesten var mye mer overlegen (fig. 3). På grunn av at det er blitt rapportert at sensitiviteten til enkle tester for bukspyttkjertel eksokrin funksjon forskjellig fra PFD-testen er identisk med den til PFD-testen, kan Bz-DL-Phe- (^{13}C -Leu)-pustetesten sies å være den mest sensitive enkle testen for bukspyttkjertel eksokrin funksjon. I tillegg til pasientens stress på grunn av 6 timers oppsamling av urin og påtvunget drikking av en stor mengde vann, er denne PFD-testen ufordelaktig ved at påfølgende analyser er nødvendige slik at resultatene ikke alltid oppnås på samme dag. Derimot har Bz-DL-Phe- (^{13}C -Leu)-pustetesten en fordel ved at tvangsperioden bare er 10 minutter og at resultatene kan fåes like deretter på samme sted og tid.

Eksempel 16: Bz-Ala- (^{13}C -Ala)-pustetest

På en lignende måte som 15-1, ble Bz-Ala- (^{13}C -Ala)-pustetesten utført hvori 50 mg/kg Bz-Ala- (^{13}C -Ala)·Na ble oralt administrert, og tidsforløpet for $^{13}\text{CO}_2$ -

konsentrasjonen i utåndet CO₂ etter administrering ble målt. Sensitiviteten var 88% når $\Delta^{13}\text{C}$ (‰)-verdien ved 10 minutter ble anvent som en undersøkelsesverdi, og en avspaltningsverdi ble innstilt slik at spesifisiteten var 100% (fig. 4). Sensitiviteten i PFD-testen av samme gruppe med rotter utført øyeblikkelig før pustetesten var derimot 63%; Bz-Ala- (¹³C-Ala)-pustetesten hadde høyere sensitivitet (fig. 4). I tillegg til pasientens stress på grunn av 6 timers oppsamling av urin og påtvunget drikking av store mengder vann, er denne PFD-testen uheldig ved at påfølgende analyser er nødvendige slik at resultatene ofte ikke oppnås samme dag. Derimot kan Bz-Ala- (¹³C-Ala)-pustetesten sies å være bedre ved at tvangsperioden bare er på 10 minutter og at resultatene fåes med en gang på samme sted og tid.

Eksempel 17: Bz-Gly- (¹³C-Leu)-pustetest

På lignende måte som 15-1 ble Bz-Gly- (¹³C-Leu)-pustetesten utført, idet 50 mg/kg Bz-Gly- (¹³C-Leu)-Na ble administrert oralt og tidsforløpet til ¹³CO₂-konsentrasjonen i utåndet CO₂ etter administrering ble målt. Sensitiviteten var 80% når $\Delta^{13}\text{C}$ (‰)-verdien ved 18 minutter ble anvendt som en undersøkelsesverdi, og en avspaltningsverdi ble innstilt slik at spesifisiteten var 100% (fig. 5). Sensitiviteten i PFD-testen av samme gruppe av rotter utført rett før pustetesten var derimot 50%. Bz-Gly- (¹³C-Leu)-pustetesten hadde følgelig høyere sensitivitet (fig. 5). I tillegg til pasientens stress på grunn av 6 timers oppsamling av urin og påtvunget drikking av store mengder vann, er denne PFD-testen ufordelaktig ved at påfølgende analyser er nødvendige slik at resultatene ofte ikke oppnås på samme dag. I motsetning til dette har Bz-Gly- (¹³C-Leu)-pustetesten fordelen av at tvangsperioden bare er på 18 minutter, og at resultatene kan oppnås tidlig på samme sted og tid.

Eksempel 18: Fremstilling av Bz-L-Phe- (¹³C-Leu) -OMe

Eter at 3,02 g 1-¹³C-L-leucin (Masstrace) var oppløst i hydrogenklorid/metanol og tilbakestrømmet, ble resulterende ¹³C-L-leucinmetylester suspendert i 150 ml diklormetan, og 3,22 ml trietylamin ble dråpevis tilsatt med is-avkjøling og omrørt. Videre ble 6,16 g N-benzoyl- L-fenylalanin, 7,02 g HOBt og 100 ml diklormetan tilsatt. Deretter ble en oppløsning av 4,4 g WSC oppløst i 200 ml diklormetan tilsatt og omrørt i 1 time med is-avkjøling og deretter over natt ved romtemperatur. Endt reaksjon ble bekreftet ved silica gel tynnsjiktskromatografi ved anvendelse av

kloroform:metanol (95:5) som et utviklende oppløsningsmiddel.

Reaksjonsblandingen ble konsentrert, ekstrahert med etylacetat, vasket med 1N-HCl, 5% NaHCO₂ og vann, tørket over magnesiumsulfat og konsentrert til tørrhet for tilveiebringning av 8,36 g Bz-L-Phe- (¹³C-Leu) -OMe.

5

Eksempel 19: Fremstilling av Bz-L-Phe- (¹³C-Leu) og dets natriumsalt

Etter at 8,36 g Bz-L-Phe- (¹³C-Leu) -OMe var oppløst i 150 ml metanol, ble 23,2 ml 1N NaOH dråpevis tilsatt med is-avkjøling og omrørt etterfulgt av oppvarming og omrøring ved 70°C i 3,5 timer. Endt reaksjon ble bekreftet ved silica gel tynnsjikt-kromatografi ved anvendelse av kloroform:metanol (95:5) som et utviklende oppløsningsmiddel. Etter at reaksjonen var fullført, ble reaksjonsblandingen nøytralisert med 1N-HCl, konsentrert og oppløst i 5% NaHCO₃. Etter vasking med etylacetat, ble 5% NaHCO₃ surgjort med 1N-HCl. Reaksjonsblandingen ble ekstrahert med etylacetat, vasket med vann, tørket over magnesiumsulfat og konsentrert til tørrhet for tilveiebringning av 7,92 g Bz-L-Phe- (¹³C-Leu), som deretter ble omkrystallisert med etylacetat.

10

15

Strukturen og ¹³C-merket posisjon ble bekreftet ved ¹³C-NMR og masse-spektrometri.

¹³C-NMR (metanol -d₄, 300 MHz) : 175,9 ppm (¹³COOH)

20

Massespektrometri (m/z) : 383 (M⁺), 365, 224, 131, 105, 77

LC-MS (m/z) : 384 (M⁺+H), 252, 224, 105

Natriumsaltet av Bz-L-Phe- (¹³C-Leu) ble bekreftet ved nøytralisering av Bz-L-Phe- (¹³C-Leu) med en ekvivalent 1M natriumkarbonat etterfulgt av lyofilisering.

25

Eksempel 20: Fremstilling av Bz-Tyr- (¹³C-Leu) -OMe

Etter at 1,73 g 1-¹³C-L-leucin (Masstrace) var oppløst i hydrogenklorid/metanol og tilbakestrømmet, ble resulterende ¹³C-L-leucin metylester suspendert i 100 ml diklormetan, og 2,00 ml trietylamin ble dråpevis tilsatt med is-avkjøling og omrørt. Videre ble 4,05 g N-benzoyl-L-tyrosin, 4,35 g HOBt og 100 ml diklormetan tilsatt. Deretter ble en oppløsning av 2,73 g WSC oppløst i 150 ml diklormetan tilsatt, og omrørt i 1 time med is-avkjøling og deretter over natt ved romtemperatur. Endt reaksjon ble bekreftet ved silica gel tynnsjikt-kromatografi ved anvendelse av kloroform:metanol (95:5) som et utviklende oppløsningsmiddel. Reaksjonsblandingen ble konsentrert, ekstrahert med etylacetat, vasket med 1N-HCl, 5%

30

NaHCO₃ og vann, tørket over magnesiumsulfat og konsentrert til tørrhet for tilveiebringning av 5,5 g N-Bz-Tyr- (¹³C-Leu) -OMe.

Eksempel 21: Fremstilling av Bz-Tyr- (¹³C-Leu) og natriumsaltet derav

Etter at 5,5 g N-Bz-Tyr- (¹³C-Leu) -OMe var oppløst i 150 ml metanol, ble 14,6 ml 1N NaOH dråpevis tilsatt ved is-avkjøling og omrørt etterfulgt av oppvarming og omrøring ved 70°C i 3,5 timer. Endt reaksjon ble bekreftet ved silica gel tynnsjikt-kromatografi ved anvendelse av kloroform:metanol (95:5) som et utviklende oppløsningsmiddel. Etter at reaksjonen var fullført, ble reaksjonsblandingen nøytralisert med 1N-HCl, konsentrert og oppløst i 5% NaHCO₃. Etter vasking med etylacetat ble 5% NaHCO₃ surgjort med 1N-HCl. Reaksjonsblandingen ble ekstrahert med etylacetat, vasket med vann, tørket over magnesiumsulfat og konsentrert til tørrhet for tilveiebringning av 4,39 g N-Bz-Tyr- (¹³C-Leu), som deretter ble omkrystallisert med etylacetat.

Strukturen og ¹³C-merket posisjon ble bekreftet ved ¹³C-NMR og massespektrometri.

¹³C-NMR (metanol -d₄, 300 MHz) : 175,9 ppm (¹³COOH)

Massespektrometri (m/z) : 399 (M⁺), 381, 240, 147, 107, 105, 77

LC-MS (m/z) : 400 (M⁺+H), 268, 240

Natriumsaltet av N-Bz-Tyr- (¹³C-Leu) ble oppnådd ved nøytralisering av N-Bz-Tyr- (¹³C-Leu) med en ekvivalent 1M natriumkarbonat etterfulgt av lyofilisering.

Eksempel 22: Fremstilling av Arg- (¹³C-Leu)

Et (1) g 1-¹³C-L-leucin (Masstrace), 1,7 g p-toluensulfonsyre monohydrat (TosOH·H₂O) og 3,7 ml benzyl alkohol (BzOH) ble oppløst i 10 ml tørr benzen og oppvarmet og tilbakestrømmet i et oljebad (110°C) ved anvendelse av en Dean-Stark apparatur utstyrt med en tilbakeløpskondensator i en evapolasjonsflaske. Reaksjonen ble utført i 5 timer med separering av vann produsert etter som reaksjonen forløp. Etter at reaksjonen var over, ble 15 ml eter og 15 ml petroleumeter tilsatt for å krystallisere reaktanten, og dette ble omkrystallisert med etanoleter for tilveiebringning av ¹³C-Leu-OBzl.

N α -karbonbenzoksy Ng-tosyl arginin (Z-Arg (Tos)) og en ekvimolar mengde ¹³C-Leu-OBzl ble oppløst i tørr tetrahydrofuran (THF) og en ekvimolar mengde HOBt,

to molare mengder dimetylaminopyridin og 1,5 molar mengde WSC ble tilsatt for å reagere i 3 timer. Etter at reaksjonen var over og oppløsningsmidlet ble destillert ut under redusert trykk, ble materialet oppløst i kloroform, og kloroformlaget ble sekvensielt vasket med 10% sintrosyre, vann, 4% NaHCO₃ og vann. Kloroformlaget ble tørket over Na₂SO₄, og deretter ble oppløsningsmidlet destillert ut. Resten ble omkrystallisert fra etanoleter for tilveiebringning av Z-Arg(Tos)-¹³C-Leu-OBzl. Deretter ble 1 g Z-Arg(Tos)-¹³C-Leu-OBzl oppløst i 3,6 ml tioanisol, 1,5 ml trifluoreddiksyre (TFA) og 0,6 ml trifluormetyl-sulfonsyre (TFMSA) og omsatt ved romtemperatur i 2 timer. Etter utdestillering av oppløsningsmidlet ble resten oppløst i vann og behandlet med en anion-bytte-harpiks (AG-X8, eddiksyretype). Resulterende oppløsning ble konsentrert og renset på 1 LH20-kolonne (2,5 cm x 60 cm) ekvilibrert med metanol:vann (1:1) for tilveiebringning av 200 mg Arg-(¹³C-Leu).

Strukturen og ¹³C-merket posisjon ble bekreftet ved ¹H-NMR og ¹³C-NMR.

¹H-NMR (DMSO -d₆, 400 MHz) :

1,073-1,015 ppm 6H: CH - (CH₃)₂ Leu

1,868-1,690 ppm 7H: CH - (CH₃)₂ Leu, CH-CH₂-CH Leu

CH - CH₂ - CH₂ - CH₂ Arg

3,26 ppm 2H: CH₂ - NH - C = NH₂ Arg

3,477 ppm: H₂O

3,649 ppm ¹H: NH - CH - COOH Leu

4,2 ppm ¹H: NH₂ - CH - CONH Arg

7,3-6,8 ppm: guanidin-gruppe Arg

¹³C-NMR (DMSO -d₆, 400 MHz) :

173,3 ppm: NH-CH-(¹³C-COOH) Leu

Eksempel 23: Fremstilling av Phe- (¹³C-Leu)

Etter at 9,96 g 1-¹³C-L-leucin (Masstrace) var oppløst i 75 ml 1N NaOH, ble en oppløsning av di-t-butyl dikarbonat (Boc₂O) (18,0 g) i aceton (50 ml) tilsatt. Deretter ble 5,21 ml trietylamin dråpevis tilsatt og omrørt ved romtemperatur. Etter en time ble en oppløsning av Boc₂O (9,8 g) i aceton (40 ml) tilsatt og omrørt over natt ved romtemperatur. Etter at aceton var destillert ut under redusert trykk, ble 500 ml etylacetat tilsatt, presipitert med 6N HCl, vasket med vann og tørket over vannfri natriumsulfat. Etter at desikeringsmidlet ble filtrert ut, ble 10 ml cykloheksylamin (CHA) tilsatt. Etter vasking med 1N HCl, ble Boc-(¹³C-Leu) ekstrahert med mettet natrium hydrogen-

karbonatoppløsning, og det vandige laget ble surgjort med 6N HCl, ekstrahert med etylacetat, vasket med vann og tørket over vannfri natriumsulfat. Etter konsentrering under redusert trykk ble gjenværende oljeholdige produkt oppløst i heksan, og 1,2 ml vann ble tilsatt for å krystallisere for tilveiebringning av Boc-(^{13}C -Leu)-OH·H₂O. Til
 5 (10) g Boc- (^{13}C -Leu) -OH·H₂O ble oppløst i etanol (50 ml)-vann (20 ml) og 6,52 g cesiumkarbonat oppløst i 20 ml destillert vann ble tilsatt. Etter konsentrering under redusert trykk ble etanol og toluen tilsatt, og gjenværende vann ble fjernet azeotropisk for tilveiebringning av et gelprodukt som ble suspendert i 300 ml dimetylformamid (DMF). Til suspensjonen ble 5,2 ml benzylbromid dråpevis tilsatt
 10 ved romtemperatur under omrøring. Etter omrøring ved romtemperatur i 45 minutter ble oppløsningsmidlet destillert ut under redusert trykk. Etylacetat ble tilsatt og vasket med vann. Etter tørking over vannfri natriumsulfat ble etylacetat destillert ut under redusert trykk for tilveiebringning av et oljeholdig produkt. Til produktet ble det tilsatt 59 ml TFA og omrørt ved romtemperatur i 40 minutter. Etter tilsetning av 8,37 g p-
 15 toluensulfonsyremonohydrat, ble TFA destillert ut under redusert trykk. Diisopropyleter ble tilsatt til resten for å krystallisere for å tilveiebringe TosOH·H- (^{13}C -Leu) -OBzl. Etter oppløsning av 7,89 g TosOH·H- (^{13}C -leu) -OBzl, 5,57 g t-Boc-L-fenylalanin (Boc-Phe) og 2,97 g HOBt i 80 ml DMF, ble 4,03 ml vannoppløselig karbodiimid (WSCD: 1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl) -karbodiimid) dråpevis tilsatt med is-
 20 avkjøling og omrørt ved romtemperatur i 3 timer. Etylacetat og isvann ble tilsatt og separert i to lag. Det organiske laget ble vasket med mettet natriumhydrogenkarbonat, vann, 0,1N HCl og vann og tørket over vannfri natriumsulfat. Etter utdestillering av etylacetat under redusert trykk ble heksan tilsatt for å krystallisere og tilveiebringe Boc-Phe- (^{13}C -Leu) -OBzl. Boc-Phe- (^{13}C -Leu) -OBzl (5,2 g) ble oppløst i
 25 10 ml eddiksyre, og 500 mg 5% palladiumkarbon (Pd-C) ble tilsatt. Etter omrøring ved romtemperatur ble hydrogengass blåst deri i 1 time. Etter at katalysatoren var filtrert ut, ble morvæsken konsentrert under redusert trykk til omtrent 10 ml. Med is-avkjøling ble 7,23 ml 4,6N HCl/dioksan tilsatt og omrørt i 10 minutter etterfulgt av ytterligere omrøring ved romtemperatur i 1 time. Etter konsentrering under redusert
 30 trykk ble eter tilsatt for å stivne. Det resulterende faste stoffet ble filtrert ut, vasket med eter og oppløst i 100 ml destillert vann. Uoppløselig materiale ble filtrert ut med et membranfilter og lyofilisert. Dette produktet ble rensset i RP-HPLC (YMC-ODS (10 μ m), 30 mm x 250 mm, 20 ml/min, aq. CH₃CN (0,05% HCl)) (5%-5%-20%,

0-15-75 minutter), og hovedfraksjonen ble lyofilisert for tilveiebringning av 2,84 g Phe- (^{13}C -Leu).

Strukturen og ^{13}C -merket posisjon ble bekreftet ved ^{13}C -NMR, masse-spektrometri og aminosyreanalyse.

5 ^{13}C -NMR (DMSO -d₆, 270 MHz): 174,3 ppm ($^{13}\text{COOH}$)

MALD-MS (m/z): 280,20 ($\text{M}^+ + \text{H}$)

Aminosyreanalyse: Fenylalanin 1,00; Leucin 1,01 (hydrolytiske betingelser; 6N HCl, 110°C, 22 timer)

10 Eksempel 24: Fremstilling av Bz-Ala-Ala-Ala-Ala-Gly-Phe- (^{13}C -Leu) og natriumsaltet derav

Til 33,8 g N-t-Boc-fenacyl-L-alanin (Boc-Ala-OPac) ble 9,6 ml 4,6N HCl/dioksan-oppløsning tilsatt og omrørt ved romtemperatur i 40 minutter. Dietyleter ble tilsatt for å stivne dette, og det faste stoffet ble filtrert ut og tørket under redusert trykk. Dette materialet ble suspendert i 100 ml diklormetan og 18,9 g N-t-Boc-L-
15 alanin (Boc-Ala) ble tilsatt og avkjølt til 0°C. Etter tilsetning av 19,2 ml WSCD ble blandingen omrørt ved romtemperatur i 1,5 timer. Etter konsentrering under redusert trykk ble resten oppløst i etylacetat/vann, og det organiske laget ble vasket med vann, 1N HCl og vann og tørket over vannfri natriumsulfat. Etylacetat ble destillert ut
20 under redusert trykk og diisoproyleter ble tilsatt for å stivne dette. Det resulterende faste stoffet ble filtrert ut og omkrystallisert med aceton-eter-diisopropyl-eter for tilveiebringning av Boc-Ala-Ala-OPac.

Til 15,1 g Boc-Ala-Ala-OPac ble 88,8 ml TFA tilsatt og omrørt ved romtemperatur i 50 minutter. Etter konsentrering under redusert trykk ble 11,3 ml 4,6N
25 HCl/dioksan-oppløsning tilsatt. Dietyleter/diisoproyleter ble tilsatt for å stivne dette, og det resulterende faste stoffet ble filtrert ut og tørket under redusert trykk. Dette materialet ble oppløst i 100 ml DMF, og 7,95 g Boc-Ala og 5,95 g HOBt ble tilsatt. Etter avkjøling til 0°C og tilsetning av 8,1 ml WSCD ble blandingen omrørt ved romtemperatur i 4 timer. Reaksjonsblandingen ble avkjølt, og vann ble tilsatt for å
30 presipitere. Presipitert fast stoff ble filtrert ut og oppløst i kloroform/metanol (3:1). Det organiske laget ble vasket med vann og direkte konsentrert under redusert trykk. Eter ble tilsatt for å krystallisere for tilveiebringning av Boc-Ala-Ala-Ala-OPac.

Boc-Ala-Ala-Ala-OPac (8,99 g) ble oppløst i 50 ml diklormetan/trifluoretanol (TFE) (3:1), og til dette ble 100 ml eddiksyre tilsatt. Deretter ble 26,2 g sinkpulver tilsatt og omfattende omrørt ved 35°C i 1 time. Uoppløselige materialer ble filtrert ut, og det gjenværende ble konsentrert under redusert trykk. Etylacetat ble tilsatt, vasket med vann og tørket over vannfri natriumsulfat. Etylacetat ble destillert ut under redusert trykk, og eter ble tilsatt til resten for krystallisering for tilveiebringning av Boc-Ala-Ala-Ala-OH.

Etter at 9,96 g 1-¹³C-L-leucin (Masstrace) var oppløst i 75 ml 1N NaOH, ble en oppløsning av Boc₂O (18 g) i aceton (50 ml) tilsatt. Deretter ble 5,21 ml trietylamin dråpevis tilsatt og omrørt ved romtemperatur. Etter en time ble en oppløsning av Boc₂O (9,8 g) i aceton (40 ml) tilsatt og omrørt over natt ved romtemperatur. Etter at aceton var blitt destillert ut under redusert trykk, ble 500 ml etylacetat tilsatt, presipitert med 6N HCl, vasket med vann og tørket over vannfri natriumsulfat. Etter at desikeringsmidlet var blitt filtrert ut, ble 10 ml CHA tilsatt. Etter vasking med 1N HCl, ble Boc-(¹³C-Leu) ekstrahert med mettet natriumhydrogenkarbonatoppløsning, og det vandige laget ble surgjort med 6N HCl, ekstrahert med etylacetat, vasket med vann og tørket over vannfri natriumsulfat. Etter konsentrering under redusert trykk ble gjenværende oljeholdig produkt oppløst i heksan, og 1,2 ml vann ble tilsatt for krystallisering for tilveiebringning av Boc-(¹³C-Leu)-OH·H₂O.

Til 10 g Boc-(¹³C-Leu)-OH·H₂O ble oppløst i etanol (50 ml) - vann (20 ml), og 6,52 g cesiumkarbonat oppløst i 20 ml destillert vann ble tilsatt. Etter konsentrering under redusert trykk ble etanol og toluen tilsatt, og gjenværende vann ble fjernet azeotropisk for tilveiebringning av et gel-produkt som ble suspendert i 300 ml DMF. Til suspensjonen ble 5,2 ml benzylbromid dråpevis tilsatt ved romtemperatur med omrøring. Etter omrøring ved romtemperatur i 45 minutter, ble oppløsningsmidlet destillert ut under redusert trykk. Etylacetat ble tilsatt og vasket med vann. Etter tørking over vannfri natriumsulfat ble etylacetat destillert ut under redusert trykk for tilveiebringning av et oljeholdig produkt. Til produktet ble 59 ml TFA tilsatt og omrørt ved romtemperatur i 40 minutter. Etter tilsetning av 8,37 g p-toluensulfonsyre-monohydrat, ble TFA destillert ut under redusert trykk. Diisopropyleter ble tilsatt til resten for å krystallisere og tilveiebringe TosOH-H-(¹³C-Leu)-OBzl.

Etter oppløsning av 7,89 g TosOH-H- (^{13}C -Leu) -OBzl, 5,57 g Boc-Phe og 2,97 g HOBt i 80 ml DMF, ble 4,03 ml WSCD dråpevis tilsatt med is-avkjøling, og blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 3 timer. Etylacetat og isvann ble tilsatt, og resulterte i to separate lag. Det organiske laget ble vasket med mettet natrium-
5 hydrogenkarbonat, vann, 0,1N HCl og vann, og tørket og vannfri natriumsulfat. Etter utdestillering av etylacetat under redusert trykk ble heksan tilsatt for å krystallisere og tilveiebringe Boc-Phe- (^{13}C -Leu) -OBzl.

Til 3,71 g Boc-Phe- (^{13}C -Leu) -OBzl ble 17,5 ml TFA tilsatt, omrørt ved romtemperatur i 40 minutter og konsentrert under redusert trykk. Etter tilsetning av 2,2
10 ml 4,6N HCl/dioksan ble diisopropyleter tilsatt for å krystallisere. Krystallet ble filtrert ut, tørket under redusert trykk og oppløst i 50 ml DMF, og 2,13 g Boc-Ala-Gly-OH-H₂O og 1,15 g HOBt ble tilsatt. Med is-avkjøling ble 1,56 g WSCD dråpevis tilsatt, og blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 3 timer. Etter avkjøling av reaksjonsblandingen ble prisipitert fast stoff filtrert ut og vasket med vann. Dette
15 materialet ble oppløst i etylacetat og tørket over vannfri natriumsulfat. Etter konsentrering under redusert trykk ble materialet krystallisert med diisopropyleter for tilveiebringning av Boc-Ala-Gly-Phe- (^{13}C -OBzl).

Til 3,59 g Boc-Ala-Gly-Phe- (^{13}C -Leu) -OBzl ble 22,2 ml TFA tilsatt og omrørt ved romtemperatur i 45 minutter. Etter konsentrering under redusert trykk ble 1,7 ml
20 4,6N HCl/dioksan tilsatt og stivnet med diisopropyleter. Det faste stoffet ble filtrert ut og oppløst i 50 ml DMF, og 2,03 Boc-Ala-Ala-Ala-OH og 1,06 g 3-hydroksy-4-okso-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin (HOOBt) ble tilsatt. Mens dette ble is-avkjølt, ble 1,19 ml WSCD dråpevis tilsatt, og blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 4 timer. Etter avkjøling av reaksjonsblandingen ble vann tilsatt, og det presipiterte faste
25 stoffet ble filtrert ut og vasket med vann. Det faste stoffet ble suspendert i metanol, filtrert ut og tørket under redusert trykk. Materialet ble oppløst i 100 ml kloroform/trifluoretanol, og urenheter ble filtrert ut. Oppløsningsmidlet ble fjernet under redusert trykk, og eter ble tilsatt til resten etterfulgt av filtrering for tilveiebringning av Boc-Ala-Ala-Ala-Ala-Gly-Phe- (^{13}C -Leu) -OBzl.

30 Til 2,68 g Boc-Ala-Ala-Ala-Ala-Gly-Phe- (^{13}C -Leu) -OBzl ble 19 ml TFA tilsatt og omrørt ved romtemperatur i 45 minutter. Etter konsentrering under redusert trykk ble eter tilsatt for å stivne dette. Det faste stoffet ble filtrert ut og oppløst i 20 ml DMF, og 0,80 g benzoyl 1-hydroksysuksinimid (Bz-ONSu) ble tilsatt. Etter dråpevis

tilsetning av 0,5 ml trietylamin ble blandingen omrørt ved romtemperatur i 1 time. Deretter ble 20 ml DMF ytterligere tilsatt, og trietylamin ble tilsatt for å justere pH til 6. Blandingen ble omrørt ved romtemperatur i ytterligere 3 timer. Etter avkjøling av reaksjonsblandingen ble vann tilsatt, og det presipiterte faste stoffet ble filtrert ut og vasket med vann. Det faste stoffet ble suspendert i metanol og filtrert ut for tilveiebringning av Bz-Ala-Ala-Ala-Ala-Gly-Phe- (^{13}C -Leu) -OBzl.

Etter oppløsning av 1,63 g Bz-Ala-Ala-Ala-Ala-Gly-Phe- (^{13}C -Leu) -OBzl i 80 ml diklormetan/heksafluorisopropylalkohol (3:1) ble 0,32 g 5% palladium-karbon suspendert i vann/metanol tilatt. Reaksjonsblandingen ble omrørt ved 27°C i 4 timer med innføring av hydrogengass. Et pulveraktig filterpapir ble anvendt for å filtrere ut katalysatoren, og filtratet ble konsentrert under redusert trykk. Vann ble tilsatt for å stivne dette, og det faste stoffet ble filtrert ut og vasket med vann. Det faste stoffet ble suspendert i metanol, filtrert ut og tørket under redusert trykk. Dette materialet ble oppløst i 50 ml heksafluorisopropylalkohol og konsentrert under redusert trykk, og etylacetat ble tilsatt til resten for å krystallisere og tilveiebringe 1,19 g Bz-Ala-Ala-Ala-Ala-Gly-Phe- (^{13}C -Leu).

Strukturen og ^{13}C -merket posisjon ble bekreftet ved ^{13}C -NMR, masse-spektrometri og aminosyreanalyse.

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 270 MHz): 173,8 ppm ($^{13}\text{COOH}$)

PD-MS (m/z): 725,3 ($\text{M}^+ + \text{H}$), 748,2 ($\text{M}^+ + \text{Na}$), 764,4 ($\text{M}^+ + \text{K}$)

Aminosyreanalyse: Fenylalanin 1,00; Glycin 1,08; Alanin 4,09; Leucin 1,04 (hydrolytiske betingelser: 6N HCl, 110°C, 22 timer)

Natriumsaltet av Bz-Ala-Ala-Ala-Ala-Gly-Phe- (^{13}C -Leu) oppnådd ved nøytralisering av Bz-Ala-Ala-Ala-Ala-Gly-Phe- (^{13}C -Leu) med en ekvivalent 1M natriumkarbonat etterfulgt av lyofilisering.

Eksempel 25: Fremstilling av Boc-Ala-Ala-Ala-Ala-Gly-Phe- (^{13}C -Leu) og natriumsaltet derav

Som i eksempel 24, ble Boc-Ala-Ala-Ala-Ala-Gly-Phe- (^{13}C -Leu) -OBzl oppnådd. Etter oppløsning av Boc-Ala-Ala-Ala-Ala-Gly-Phe- (^{13}C -Leu) -OBzl i 40 ml diklormetan/heksafluorisopropylalkohol (3:1), ble 0,16 g 5% palladium-karbon suspendert i vann/metanol tilsatt. Hydrogengas ble innført i reaksjonsblandingen i

1,5 timer med omrøring ved 27°C. Et pulveraktig filterpapir ble anvendt for å filtrere ut katalysatoren, og filtratet ble konsentrert under redusert trykk. Acetonitril ble tilsatt for å stivne dette, og det faste stoffet ble filtrert ut. Det faste stoffet ble tørket under redusert trykk og oppløst i 30 ml heksafluorisopropylalkohol. Uoppløselig materiale ble filtrert ut, og gjenværende ble konsentrert under redusert trykk. Etylacetat ble tilsatt til resten, og presipitert gel-materiale ble filtrert for tilveiebringning av 1,56 g Boc-Ala-Ala-Ala-Ala-Gly-Phe- (^{13}C -Leu).

Strukturen og ^{13}C -merket posisjon ble bekreftet ved ^{13}C -NMR, massespektrometri og aminosyreanalyse.

^{13}C -NMR (DMSO - d_6 , 270 MHz): 173,7 ppm ($^{13}\text{COOH}$)

PD-MS (m/z): 721,7 ($\text{M}^+ + \text{H}$), 743,9 ($\text{M}^+ + \text{Na}$), 759,9 ($\text{M}^+ + \text{K}$)

Aminosyreanalyse: Fenylalanin 1,00; Glycin 1,09; Alanin 4,07; Leucin 1,04 (hydrolytiske betingelser: 6N HCl, 110°C, 22 timer)

Natriumsaltet av Boc-Ala-Ala-Ala-Ala-Gly-Phe- (^{13}C -Leu) ble oppnådd ved nøytralisering av Boc-Ala-Ala-Ala-Ala-Gly-Phe- (^{13}C -Leu) med en ekvivalent 1M natriumkarbonat etterfulgt av lyofilisering.

Eksempel 26: Fremstilling av Bz-Ala-Ala-Ala-Ala- (^{13}C -Gly) -Phe-Leu og natriumsaltet derav

Etter oppløsning av 5 g 1- ^{13}C -glycin (Masstrace) i vandig oppløsning av (17,5 ml) natriumhydroksid (2,56 g) og tilsetning av 3,65 ml trietylamin, ble en oppløsning av Boc_2O (15,1 ml) i aceton (8 ml) tilsatt og omrørt ved romtemperatur i 17 timer. Etter konsentrering under redusert trykk ble sitronsyre tilsatt til det vandige laget for å justere pH til 4, og natriumklorid ble tilsatt for å salte dette ut etterfulgt av ekstrahering med etylacetat. Ekstraktet ble direkte tørket over magnesiumsulfat, og desikeringsmidlet ble filtrert ut. Etter tisetning av 6,76 ml CHA ble filtratet latt stå over natt i en kjøler. Presipiterte krystaller ble filtrert ut for tilveiebringning av Boc- (^{13}C -Gly) -OH-CHA.

Åtte (8) g Boc- (^{13}C -Gly)-OH-CHA ble suspendert i 50 ml THF, og 6,12 ml 4,6N HCl/dioksan ble tilsatt. Blandingen ble fullstendig oppbrutt i en ultrasonisk vaskeinnretning, og eter ble tilsatt. Presipitert fast stoff ble filtrert ut, og filtratet ble konsentrert under redusert trykk. Eter ble tilsatt til resten, og det uoppløselige

materialet ble filtrert og konsentrert under redusert trykk. Resten ble vasket med heksan og filtrert ut for tilveiebringning av Boc- (^{13}C -Gly) -OH.

Etter oppløsning ble 5,31 g Boc-Phe, 7,87 g TosOH-H-Leu-OBzl og 2,84 g HOBt i 40 ml DMF, 3,72 ml WSCD tilsatt under is-avkjøling og omrørt i 30 minutter og ved romtemperatur i ytterligere 2,5 timer. Etter konsentrering under redusert trykk ble etylacetat tilsatt, vasket sekvensielt med mettet vandig natriumhydrogenkarbonatoppløsning, mettet vandig natriumkloridoppløsning, 10% vandig sitronsyreoppløsning og mettet vandig natriumkloridoppløsning, og tørket over magnesiumsulfat. Etter konsentrering under redusert trykk ble 43 ml 4,6N HCl/dioksan tilsatt og latt stå ved romtemperatur i 30 minutter. Etter konsentrering under redusert trykk ble eter tilsatt, og presipitert fast stoff ble filtrert ut for tilveiebringning av HCl-H-Phe-Leu-OBzl.

Etter oppløsning av 3,52 g Boc- (^{13}C -Gly) -OH, 8,88 g HCl-H-Phe-Leu-OBzl og 2,70 g HOBt i 40 ml DMF, ble 3,54 ml WSCD tilsatt under is-avkjøling og omrørt i 30 minutter og ved romtemperatur i ytterligere 14 timer. Etter konsentrering under redusert trykk ble materialet oppløst i etylacetat, vasket sekvensielt med mettet vandig natrium hydrogenkarbonatoppløsning, mettet vandig natriumkloridoppløsning, 10% vandig sitronsyreoppløsning og mettet vandig natriumkloridoppløsning og tørket over magnesiumsulfat. Etter konsentrering under redusert trykk ble Boc- (^{13}C -Gly) -Phe-Leu-OBzl oppnådd.

Til 10,4 g Boc- (^{13}C -Gly) -Phe-Leu-OBzl ble 43,8 ml 4,6N HCl/dioksan tilsatt og latt stå ved romtemperatur i 45 minutter. Etter konsentrering under redusert trykk ble et oljeholdig produkt oppnådd. Det oljeholdige produktet ble løst opp i 40 ml DMF, og 3,7 g Boc-Ala, og 2,66 g HOBt ble tilsatt etterfulgt av tilsetning av 3,49 ml WSCD med is-avkjøling, og dette ble omrørt i 30 minutter og i 16 timer ved romtemperatur. Etter konsentrering under redusert trykk ble materialet oppløst i etylacetat og vasket med mettet vandig natriumhydrogenkarbonatoppløsning, mettet vandig natriumkloridoppløsning, 10% vandig sitronsyreoppløsning og mettet vandig natriumkloridoppløsning. Det organiske laget ble konsentrert under redusert trykk, og resten ble vasket med diisopropyleter og filtrert ut for tilveiebringning av Boc-Ala- (^{13}C -Gly) -Phe-Leu-OBzl.

Som i eksempel 24 ble Boc-Ala-Ala-Ala-OH oppnådd.

Til 3,59 g Boc-Ala- (^{13}C -Gly) -Phe-Leu-OBzl ble 22,2 ml TFA tilsatt og latt stå ved romtemperatur i 45 minutter. Etter konsentrering under redusert trykk ble 1,7 ml

4,6N HCl/dioksan tilsatt, og diisopropyleter ble tilsatt for å stivne dette. Det faste stoffet ble filtrert ut og tørket. Dette materialet ble løst opp i 50 ml DMF, og 2,03 g Boc-Ala-Ala-Ala-OH og 1,06 g HOOt ble tilsatt. Med is-avkjøling ble 1,19 ml WSCD tilsatt, og dette ble omrørt i 30 minutter og i 14 timer ved romtemperatur. Etter

5 avkjøling av reaksjonsblandingen ble vann tilsatt, og presipitert gel ble filtrert ut for tilveiebringning av Boc-Ala-Ala-Ala-Ala- (^{13}C -Gly) -Phe-Leu-OBzl.

Til en suspensjon av 2,00 g Boc-Ala-Ala-Ala-Ala- (^{13}C -Gly) - Phe- Leu-OBzl og 1,34 ml anisol, ble 12 ml vannfri hydrogenfluorid innført med omrøring og avkjølt i et tørris-metanol-bad. Materialet ble omrørt i 1 time under avkjøling ved -5°C , og

10 hydrogenfluorid ble destillert ut ved denne temperaturen. Eter ble tilsatt til resten, og presipitert fast stoff ble filtrert ut. Det faste stoffet ble suspendert i 40 ml DMF-vann (9:1), og 704 mg Bz-ONSu, og 1,03 ml trietylamin ble tilsatt og omrørt ved romtemperatur i 6 timer. Deretter ble 40 ml DMF-vann (9:1) tilsatt og omrørt over natt ved romtemperatur. Videre ble 541 mg Bz-ONSu tilsatt og omrørt over natt ved rom-

15 temperatur. Etter konsentrering under redusert trykk ble etylacetat tilsatt til denne resten, fullstendig oppløst i en ultrasonisk vaskemaskin og filtrert ut for tilveiebringning av 1,53 g Bz-Ala-Ala-Ala-Ala- (^{13}C -Gly) -Phe-Leu.

Strukturen og ^{13}C -merket posisjon ble bekreftet ved ^{13}C -NMR, massespektrometri og aminosyreanalyse.

20 ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 270 MHz): 168,2 ppm ($^{13}\text{COOH}$)

PD-MS (m/z): 725,5 ($\text{M}^+ + \text{H}$), 747,8 ($\text{M}^+ + \text{Na}$), 764,3 ($\text{M}^+ + \text{K}$)

Aminosyreanalyse: Fenylalanin 1,00; Glycin 1,14; Alanin 4,25; Leucin 1,07

(hydrolytiske betingelser: 6N HCl, 110°C , 22 timer)

Natriumsaltet av Bz-Ala-Ala-Ala-Ala- (^{13}C -Gly) -Phe-Leu ble oppnådd ved

25 nøytralisering av Bz-Ala-Ala-Ala-Ala- (^{13}C -Gly) -Phe-Leu med en ekvivalent av en 1M natriumkarbonat etterfulgt av lyofilisering.

Eksempel 27: Fremstilling av Bz-Tyr-O- (^{13}C -Et)

Etter at 5,31 g N-t-Boc-O-benzyl-L-tyrosin og 3,5 g 1,2- ^{13}C -etanol (Masstrace)

30 var blitt oppløst i 30 ml DMF, ble 2,32 g HOBt tilsatt og 3,14 ml WSCD ble dråpevis tilsatt under is-avkjøling etterfulgt av omrøring ved romtemperatur i 4 timer.

Metylacetat ble tilsatt, og materialet ble vasket sekvensielt med vann, mettet vandig natrium hydrogenkarbonat-oppløsning, mettet vandig natriumklorid-oppløsning,

1N HCl og mettet vandig natriumklorid-oppløsning, og tørket over vannfri natrium-sulfat. Oppløsningsmidlet ble destillert ut under redusert trykk. Mens avkjølt ved -10°C ble 20 ml TFA tilsatt til det resulterende farveløse oljeholdige produktet etterfulgt av omrøring i 10 minutter og i 50 minutter ved romtemperatur. Etter konsentrering under redusert trykk ble 3,73 ml 4,6N HCl/dioksan tilsatt, og diisopropyleter ble tilsatt for å stivne dette. Resten ble filtrert ut og ytterligere vasket med diisopropyleter. Denne resten ble oppløst i 50 ml DMF og 1,99 ml benzoylklorid, og 4,00 ml trietylamin ble tilsatt mens avkjølt ved -10°C. Etter omrøring i 30 minutter og ytterligere ved romtemperatur i 3 timer ble etylacetat tilsatt og vasket sekvensielt med mettet vandig natriumklorid-oppløsning, mettet vandig natriumhydrogenkarbonat-oppløsning, mettet vandig natriumklorid-oppløsning, 1N HCl og mettet vandig natriumklorid-oppløsning, og tørket over vannfri natriumsulfat. Oppløsningsmidlet ble destillert ut under redusert trykk og resten ble vasket med eter og tørket under redusert trykk. Dette materialet ble omkrystallisert fra metanol for tilveiebringning av Bz-Tyr (Bzl) -O- (¹³C-Et). Deretter ble 800 mg Bz-Tyr(Bzl) -O- (¹³C-Et) oppløst i 30 ml eddiksyre, og 1600 mg palladium svart ble tilsatt. Hydrogengass ble introdusert i 6 timer med omfattende omrøring ved romtemperatur. Hydrogengassen ble stoppet, og reaksjonsblandingen ble omrørt over natt ved romtemperatur. Et pulverformig filterpapir ble anvendt for å filtrere ut katalysatoren, og deretter ble eddiksyre destillert ut under redusert trykk. Heksan ble tilsatt og konsentrering under redusert trykk ga en farveløst fast stoff. Vann ble tilsatt, og supernatanten ble gjentatte ganger fjernet ved dekantering. Materialet ble oppløst i 20% vandig acetonitril-oppløsning etterfulgt av lyofilisering. Dette materialet ble utsatt for RP-HPLC (YMC A-323 ODS, 30 x 250 mm, 20-50% aq. CH₃CN inneholdende 0,1% TFA (70 minutter), strømningsrate 20 ml/min) for å danne en hovedfraksjon som deretter ble lyofilisert for tilveiebringning av 350 mg Bz-Tyr-O- (¹³C-Et).

Strukturen og ¹³C-merket posisjon ble bekreftet ved ¹³C-NMR og masse-spektrometri.

¹³C-NMR (CDCl₃, 270 MHz) : 14,2 ppm (¹³CH₃), 61,6 ppm (¹³CH₂)

FD-MS (m/z) : 316,2 (M⁺+H)

Eksempel 28: Fremstilling av Bz-Arg- (^{13}C -Leu) $\cdot\text{HCl}$

Som i eksempel 24, ble TosOH $\cdot\text{H}$ - (^{13}C -Leu) -OBzl oppnådd. Etter at 18,1 g TosOH $\cdot\text{H}$ - (^{13}C -Leu) -OBzl, og 14,5 g N-t-Boc-argininhydrokloridmonohydrat (Boc-Arg $\cdot\text{HCl}\cdot\text{H}_2\text{O}$) og 5,95 g HOBt var blitt oppløst i 130 ml DMF, ble 8,4 ml WSCD tilsatt mens is-avkjølt ved -20°C , og blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 3,5 timer. Etter at DMF var blitt destillert ut, ble materialet oppløst i etylacetat og vasket med mettet vandig natriumhydrogenkarbonat-oppløsning, mettet vandig natriumklorid-oppløsning, 0,1 N HCl og mettet vandig natriumklorid-oppløsning. Materialet ble tørket over vannfri natriumsulfat. Etter at etylacetat var destillert ut under redusert trykk, ble heksan tilsatt for å tilveiebringe et krystall. Krystallet ble filtrert ut, vasket med heksan og tørket under redusert trykk. Resulterende råkrystall ble oppløst i 50 ml acetonitril. Til denne oppløsningen ble diisopropyleter tilsatt for tilveiebringning av et krystall av Boc-Arg- (^{13}C -Leu) -OBzl-TosOH.

Til 24,8 g Boc-Arg- (^{13}C -Leu) -OBzl-TosOH ble 50 ml TFA tilsatt, og blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 30 minutter og konsentrert under redusert trykk. Etter at 20 ml 4,6N HCl/dioksan var blitt tilsatt, ble eter tilsatt for tilveiebringning av et krystall av et hydroklorid. Hydrokloridet ble filtrert ut og tørket under redusert trykk. Til resulterende hydroklorid ble 5,12 g benzosyre og 5,67 g HOBt tilsatt, og blandingen ble oppløst i 110 ml DMF. Til denne oppløsningen ble det tilsatt 7,7 ml WSCD med is-avkjøling ved -20°C , og blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 15 timer. Reaksjonsoppløsningen ble konsentrert, oppløst i etylacetat og vasket med 0,1 N HCl, mettet vandig natriumklorid-oppløsning og mettet vandig natriumhydrogenkarbonat-oppløsning for tilveiebringning av et krystall. Krystallet ble filtrert ut, vasket med etylacetat og vann, og oppløst i eddiksyre. Til denne oppløsningen ble eter tilsatt for tilveiebringning av et farveløst oljeholdig produkt. Produktet ble oppløst i 250 ml eddiksyre. Til denne oppløsningen ble 3 g palladium-karbon tilsatt. Blandingen ble omrørt ved romtemperatur med innføring av hydrogengass i 2 timer. Katalysatoren ble filtrert ut, og eddiksyre ble destillert ut. Resten ble oppløst i 9 ml 4,6 N HCl/dioksan. Diisopropyleter ble tilsatt for tilveiebringning av et krystall av 16,4 g Bz-Arg- (^{13}C -Leu)-HCl.

Strukturen og ^{13}C -merket posisjon ble bekreftet ved ^{13}C -NMR, masse-spektrometri og aminosyreanalyse.

^{13}C -NMR (D_2O , 270 MHz): 177,5 ppm ($^{13}\text{COOH}$)

ESI-MS (m/z): 393,2 ($M^+ + H$)

Aminosyreanalyse: Arginin; 1,00; Leucin 1,02 (hydrolytiske betingelser: 6N HCl, 110° C, 22 timer)

5 Eksempel 29: Bz-L-Phe- (^{13}C -Leu)-pustetest

Som i eksempel 15-1, ble Bz-L-Phe- (^{13}C -Leu)-pustetesten utført hvori 250 mg/kg Bz-L-Phe- (^{13}C -Leu) ·Na ble oralt administrert til kroniske pancreatittrotter (n=4) og normale rotter (n=4), og økningsgraden ($\Delta^{13}\text{C} (‰)$) av $^{13}\text{CO}_2$ -konsentrasjonen i CO_2 i pusten etter administrering ble målt. $\Delta^{13}\text{C} (‰)$ -verdien 10 minutter etter administrering var $6,97 \pm 6,09 ‰$ i kroniske pancreatittrotter og $115,02 \pm 71,26 ‰$ i normale rotter. Verdien til kroniske pancreatittrotter var betydelig mindre enn normale rotter ($p < 0,05$ (ANOVA med Fischer LSD)) (Tabell 1).

Tabell 1
Bz-L-Phe- (^{13}C -Leu)-pustetest

	$\Delta^{13}\text{C} (‰)$ ved 10 min
Kronisk pancreatitt #1	1,61
Kronisk pancreatitt #2	3,28
Kronisk pancreatitt #3	17,21
20 Kronisk pancreatitt #4	5,77
Normal #1	31,29
Normal #2	60,25
Normal #3	165,37
Normal #4	203,16

25 Bz-L-Phe- (^{13}C -Leu)·Na ble administrert oralt i en mengde på 250 mg/kg til kroniske pankreatittrotter (n=4) og normale rotter (n=4).

Eksempel 30: Bz-Tyr- (^{13}C -Leu)-pustetest

30 Som i eksempel 15-1, ble Bz-Tyr- (^{13}C -Leu)-pustetesten utført hvori 250 mg/kg Bz-Tyr- (^{13}C -Leu)·Na ble administrert oralt til kroniske pancreatittrotter (n=4) og normale rotter (n=4), og økningsgraden ($\Delta^{13}\text{C} (‰)$) av $^{13}\text{CO}_2$ -konsentrasjonen i utåndet CO_2 etter administrering ble målt. $\Delta^{13}\text{C} (‰)$ -verdien 20 minutter etter

administrering var $3,66 \pm 3,24$ ‰ i kroniske pancreatittrotter og $69,53 \pm 32,50$ ‰ i normale rotter. Verdien til kroniske pancreatittrotter var følgelig betydelig mindre enn i normale rotter ($p < 0,05$ (ANOVA med Fischer LSD)) (Tabell 2).

Tabell 2
Bz-Tyr- (^{13}C -Leu)-pustetest
 $\Delta^{13}\text{C}$ (‰) ved 20 min

Kronisk pancreatitt #1	8,76
Kronisk pancreatitt #2	3,58
Kronisk pancreatitt #3	2,44
Kronisk pancreatitt #4	-0,15
Normal #1	111,32
Normal #2	65,76
Normal #3	21,02
Normal #4	80,02

Bz-Tyr- (^{13}C -Leu)-Na ble administrert oralt i en mengde på 250 mg/kg til kroniske pancreatittrotter ($n=4$) og normale rotter ($n=4$).

Eksempel 31: Arg- (^{13}C -Leu)-pustetest

Som i eksempel 15-1, ble Arg- (^{13}C -Leu)-pustetesten utført hvori 30 mg/kg Arg- (^{13}C -Leu) ble administrert oralt til kroniske pancreatittrotter ($n=4$) og til normale rotter ($n=4$), og økningsgraden ($\Delta^{13}\text{C}$ (‰)) av $^{13}\text{CO}_2$ -konsentrasjonen i utåndet CO_2 etter administrering ble målt. $\Delta^{13}\text{C}$ (‰)-verdien 30 minutter etter administrering var $4,37 \pm 1,83$ ‰ i kroniske pancreatittrotter og $12,37 \pm 2,26$ ‰ i normale rotter. Verdien til kroniske pancreatittrotter var følgelig betydelig mindre enn i normale rotter ($p < 0,01$ (ANOVA) med Fischer LDS)) (Tabell 3).

Tabell 3
Arg- (¹³C-Leu)-pustetest

	$\Delta^{13}\text{C} (\text{‰})$ ved 30 min
Kronisk pancreatitt #1	3,74
5 Kronisk pancreatitt #2	6,97
Kronisk pancreatitt #3	4,87
Kronisk pancreatitt #4	1,92
Normal #1	10,30
Normal #2	13,74
10 Normal #3	15,37
Normal #4	10,08

Arg- (¹³C-Leu) ble administrert oralt i en mengde på 30 mg/kg til kroniske pancreatittrotter (n=4) og normale rotter (n=4).

Eksempel 32: Bz-Ala-Ala-Ala-Ala- (¹³C-Gly) -Phe-Leu-pustetest

Som i eksempel 15-1, ble Bz-Ala-Ala-Ala-Ala- (¹³C-Gly) -Phe-Leu-pustetesten utført, idet 420 mg/kg Bz-Ala-Ala-Ala-Ala- (¹³C-Gly) -Phe-Leu-Na ble administrert oralt til kroniske pancreatittrotter (n=2) og normale (n=2), og økningsgraden av ($\Delta^{13}\text{C}$ (‰))

20 av ¹³CO₂-konsentrasjonen i utåndet CO₂ etter administrering ble målt. $\Delta^{13}\text{C}$ (‰) (gjennomsnitt)-verdi ved 15 minutter etter administrering var 0,61 ‰ i kroniske pancreatittrotter og 33,32 ‰ i normale rotter; verdien av kroniske pancreatittrotter var følgelig mindre enn i normale rotter (Tabell 4).

Tabell 4
Bz-Ala-Ala-Ala-Ala- (¹³C-Gly) -Phe-Leu-pustetest

	$\Delta^{13}\text{C} (\text{‰})$ ved 15 min
Kronisk pancreatitt #1	-1,90
30 Kronisk pancreatitt #2	3,12
Normal #1	23,47
Normal #2	43,16

Ba-Ala-Ala-Ala-Ala- (^{13}C -Gly) -Phe-eu-Na ble administrert oralt i en mengde på 420 mg/kg til kroniske pancreatittrotter (n=2) og normale rotter (n=2).

Eksempel 33: Bz-Arg- (^{13}C -Leu)-pustetest

Som i eksempel 15-1, ble Bz-Arg- (^{13}C -Leu)-pustetesten utført, idet 100 mg/kg Bz-Arg- (^{13}C -Leu) · HCl ble administrert oralt til kroniske pancreatittrotter (n=3) og normale rotter (n=3), og økningsgraden ($\Delta^{13}\text{C}$ (‰)) av $^{13}\text{CO}_2$ -konsentrasjonen i utåndet CO_2 etter administrering ble målt. $\Delta^{13}\text{C}$ (‰)-verdien 20 minutter etter administrering var $3,05 \pm 6,97$ ‰ i kroniske pancreatittrotter og $68,77 \pm 12,01$ ‰ i normale rotter. Verdien av kroniske pancreatittrotter var følgelig betydelig mindre enn i normale rotter ($p < 0,01$ (ANOVA med Fischer LSD)) (Tabell 5).

Tabell 5
Bz-Arg- (^{13}C -Leu)-pustetest

	$\Delta^{13}\text{C}$ (‰) ved 20 min
Kronisk pancreatitt #1	3,69
Kronisk pancreatitt #2	11,25
Kronisk pancreatitt #3	- 5,79
Normal #1	51,94
Normal #2	74,46
Normal #3	79,01

Formulering eksempel 1: (Flytende for innvortes bruk)

Renset vann ble tilsatt til 5 vekt-deler Bz-DL-Phe- (^{13}C -Leu)-Na for å danne totalt 100 vekt-deler av denne totale mengden, ble oppløst og sterilisert gjennom et Millipore filter. Filtratet ble plassert inn i en beholder og forseglet for å tilveiebringe en væske for innvortes bruk.

Fordeler ifølge oppfinnelsen:

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en meget sensitiv pankreas eksokrin funksjonstest-fremgangsmåte som utviser lav stress på et individ og som gir hurtig nøyaktige resultater.

Konvensjonelle enkle tester for pankreas eksokrin funksjon er mindre sensitive og er derfor blitt anvendt i mindre grad som diagnostiske tester for pancreatitt, og er for tiden blitt anvendt generelt for oppfølging av prognoser på pancreatitt som alltid nødvendiggjør gjentatte tester. En meget sensitiv enkel test for pankreas eksokrin funksjon blir ofte anvendt for diagnostisering av pancreatitt i en fysisk undersøkelse. Den kan også bli anvendt for å vurdere alvorligheten ved kronisk pancreatitt, for undersøkelse for begynnende alvorlig fulminant pancreatitt med en fortsatt høy dødelighet (30%), diagnostikk av årsakene til pancreatitt og tidlig diagnostikk av bukspyttkjertelcanser. Den er også nyttig som en diagnostisk fremgangsmåte for å utelukke pancreatitt i medisinsk undersøkelse av generelle pasienter som ikke er innlagt.

P a t e n t k r a v

1. Diagnostisk middel for pankreas eksokrin funksjon i en pustetest, karakterisert ved at det omfatter ^{13}C eller ^{14}C -merket forbindelse representert ved følgende formel (II):



hvor X_2 er et hydrogenatom eller en beskyttelsesgruppe,

R_2 er et peptid med 2 til 5 aminosyrer, en aminosyre eller en enkeltbinding,

Y_2 er en aminosyre,

Z_1 er en aminosyre med eventuelt en beskyttelsesgruppe, og minst en av aminosyrene i R_2 , Y_2 og Z_1 , eller minst én av beskyttelsesgruppene i X_2 og Z_1 når beskyttelsesgruppene inneholder et karbonatom, er ^{13}C - eller ^{14}C -merket, og hvor

1) i tilfelle hvor X_2 er en beskyttelsesgruppe og R_2 er enkeltbinding,

1-i) når Z_1 er D-Ala, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra D-Ala,

1-ii) når Z_1 er Ala-OMe, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Leu,

1-iii) når Z_1 er Pro-OMe, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Gly,

2) i tilfelle hvor X_2 er en beskyttelsesgruppe og R_2 er en aminosyre,

2-i) når Z_1 er D-Ala, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Val,

2-ii) når Z_1 er Ala, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Leu,

2-iii) når Z_1 er Gly-Oet, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Pro,

3) i tilfelle hvor X_2 er en beskyttelsesgruppe, er R_2 et peptid med 2 aminosyrer og Z_1 er Gln eventuelt med Set, Y_2 er en aminosyre forskjellig fra Ala,

4) i tilfelle hvor X_2 er et hydrogenatom og R_2 er en enkeltbinding,

4-i) når Z_1 er Pro, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Ala,

4-ii) når Z_1 er Leu, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Gly, Val, Leu og Tyr,

4-iii) når Z_1 er Phe, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Gly,

4-iv) når Z_1 er Gly-Oet, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Gly,

4-v) når Z_1 er Ala-OMe, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Leu,

- 5) i tilfelle hvor X_2 er et hydrogenatom og R_2 er en aminosyre,
- 5-i) når Z_1 er Leu, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Pro,
 - 5-ii) når Z_1 er Phe, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Pro,
 - 5-iii) når Z_1 er Gly, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Gly,
 - 5-iv) når Z_1 er Pro, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Leu,
 - 5-v) når Z_1 er Met, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Asp,
 - 5-vi) når Z_1 er Asn-Bzl, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Leu,
- 6) i tilfelle hvor X_2 er et hydrogenatom og R_2 er et peptid med 2 aminosyrer,
- 6-i) når Z_1 er Leu, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Leu,
 - 6-ii) når Z_1 er Ser, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Asp, og
- 7) i tilfelle hvor X_2 er et hydrogenatom og R_2 er et peptid med 3 aminosyrer,
- 7-i) når Z_1 er Leu, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Phe,
 - 7-ii) når Z_1 er Met, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Phe;

forutsatt at følgende forbindelser er ekskluderte

Ala-Pro, Gly-Leu, Gly-Phe, Val-Leu, Leu-Leu, Tyr-Leu, Ac-D-Ala-D-Ala, Gly-Gly-OEt, Leu-Ala-OMe, Ac-Gly-Pro-OMe, Boc-Leu-Ala-OMe, Gly-Pro-Leu, Gly-Pro-Phe, Ala-Gly-Gly, Gly-Leu-Pro, Phe-Asp-Met, Gly-Leu-Pro, Dansyl-Tyr-Val-D-Ala, Cbz-Gly-Leu-Ala, Thr-Leu-Asn-Bzl, Z-Pro-Pro-Gly-OEt, Leu-Leu-Leu-Leu, Lys-Arg-Asp-Ser, Ac-Leu-Ala-Ala-Gln (NMe_2), Ac-Leu-Ala-Ala-Gln (NMe_2) - SEt, Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu og Tyr-Gly-Gly-Phe-Met, hvor Ac er acetyl, Et er etyl, Me er metyl, Boc er t-butylloksykarbonyl, Dansyl er dansyl, Cbz er karbobenzylloksy, Bzl er benzoyl, Z er benzyloksykarbonyl, SEt er etanetiol og NMe_2 er dimetylamino.

2. Diagnostisk middel ifølge krav 1, karakterisert ved at

- 1) i det tilfelle hvor X_2 er en beskyttelsesgruppe valgt fra gruppen bestående av Dansyl, Cbz, Ac og Z, og R_2 er en aminosyre eller et peptid med 2 aminosyrer,

- 1-i) når Z_1 er D-Ala, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Val,
- 1-ii) når Z_1 er Ala, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Leu,
- 1-iii) når Z_1 er Gly-Oet, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Pro,
- 1-iv) når Z_1 er Gln(NMe₂) eller Gln(NMe₂) –Set, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Ala,

2) i det tilfelle hvor X_2 er Ac eller Boc, og R_2 er en enkeltbinding,

- 2-i) når Z_1 er D-Ala, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra D-Ala,
- 2-ii) når Z_1 er Pro-OMe, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Gly,
- 2-iii) når Z_1 er Ala-OMe, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Leu,

3) i det tilfelle hvor X_2 er et hydrogenatom og R_2 en aminosyre eller et peptid med 2 eller 3 aminosyrer,

- 3-i) når Z_1 er Leu, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Pro, Leu og Phe,
- 3-ii) når Z_1 er Phe, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Pro,
- 3-iii) når Z_1 er Gly, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Gly,
- 3-iv) når Z_1 er Pro, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Leu,
- 3-v) når Z_1 er Met, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Asp og Phe,
- 3-vi) når Z_1 er Asn-Bzl, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Leu,
- 3-vii) når Z_1 er Ser, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Asp, og

4) i det tilfelle hvor X_2 er et hydrogenatom og R_2 er en enkeltbinding,

- 4-i) når Z_1 er Pro, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Ala,
- 4-ii) når Z_1 er Leu, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Gly, Val, Leu og Tyr,
- 4-iii) når Z_1 er Phe, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Gly,
- 4-iv) når Z_1 er Gly-OEt, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Gly,
- 4-v) når Z_1 er Ala-OMe, er Y_2 en aminosyre forskjellig fra Leu,

3. Diagnostisk middel ifølge krav 1 eller 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at X_2 er valgt fra gruppen bestående av Ac, Bz (benzoyl), Boc, Z og et hydrogenatom.

4. Diagnostisk middel ifølge et hvilket som helst av kravene 1-3,

karakterisert ved at forbindelsen, eller saltet derav har evne til å være et substrat av en protease eller protease slik at det deretter har evne til å bli dekarboksylert for å danne $^{13}\text{CO}_2$ - eller $^{14}\text{CO}_2$.

5. Diagnostisk middel ifølge krav 4, karakterisert ved proteasen eller proteasene er pankreatiske eksokrine proteaser.

6. Diagnostisk middel ifølge krav 4, karakterisert ved at pankreatisk eksokrin protease eller proteaser er valgt fra gruppen bestående av chymotrypsin, trypsin, elastase og karboksypeptidaser.

7. Diagnostisk middel ifølge et hvilket som helst av kravene 1-6, karakterisert ved at X_2 er en beskyttelsesgruppe og R_2 er en enkeltbinding.

8. Diagnostisk middel ifølge et hvilket som helst av kravene 1-7, karakterisert ved at

- 1) minst en av aminosyrene i Y_2 og Z_1 er Arg eller Lys,
- 2) minst en av aminosyrene i Y_2 og Z_1 er en aromatisk aminosyre, Leu, His eller Met,
- 3) minst en av aminosyrene i Y_2 og Z_1 er en nøytral og ikke-aromatisk aminosyre,
- 4) aminosyre i Z_1 er en aminosyre forskjellig fra Arg, Lys og Pro, eller
- 5) aminosyren i Z_1 er Arg eller Lys.

9. Diagnostisk middel ifølge et hvilket som helst av kravene 1-8, karakterisert ved at X_2 er valgt fra gruppen bestående av et hydrogenatom, Bz, Ac og Boc, Y_2 er valgt fra gruppen bestående av Phe, Ala, Gly, Tyr og Arg, Z_1 er valgt fra gruppen bestående av Leu eventuelt med en beskyttelsesgruppe, Ala eventuelt med en beskyttelsesgruppe og Gly eventuelt med en beskyttelsesgruppe.

10. Diagnostisk middel ifølge krav 9, karakteriseret ved at Z_1 er valgt fra gruppen bestående av Leu, Ala, Gly, Leu-OMe, Leu-OEt, Ala-OMe, Ala-OEt, Gly-OMe og Gly-OEt.

11. Diagnostisk middel ifølge et hvilket som helst av kravene 1-10, karakteriseret ved at Z_1 er en ^{13}C - eller ^{14}C -merket aminosyre med eventuelt en beskyttelsesgruppe.

12. ^{13}C - eller ^{14}C -merket forbindelse eller salt derav ifølge krav 1, karakteriseret ved at den blir valgt fra gruppen bestående av følgende forbindelser:

- (a) Phe- ^{13}C -Leu,
- (b) Arg- ^{13}C -Leu,
- (c) Bz-Ala- ^{13}C -Ala,
- (d) Bz-Gly- ^{13}C -Leu,
- (e) Bz-Phe- ^{13}C -Gly,
- (f) Bz-Tyr- ^{13}C -Leu,
- (g) Bz-Phe- ^{13}C -Leu,
- (h) Bz-(DL)Phe- ^{13}C -Leu,
- (i) Bz-Arg- ^{13}C -Leu,
- (k) Ac-Phe- ^{13}C -Leu,
- (l) Ac-Tyr- ^{13}C -Leu,
- (m) Bz-Ala- ^{13}C -Ala-OMe,
- (n) Bz-Gly- ^{13}C -Leu-OMe,
- (o) Bz-Phe- ^{13}C -Gly-OMe,
- (p) Bz-Phe- ^{13}C -Leu-OMe,
- (q) Bz-(DL)Phe- ^{13}C -Leu-OMe,
- (r) Ac-Phe- ^{13}C -Leu-OMe,
- (s) Ac-Tyr- ^{13}C -Leu-OMe,
- (t) Bz-Ala-Ala-Ala-Ala-Gly-Phe- ^{13}C -Leu,
- (u) Boc-Ala-Ala-Ala-Ala-Gly-Phe- ^{13}C -Leu, og
- (v) Bz-Ala-Ala-Ala-Ala- ^{13}C -Gly-Phe-Leu.

FIG. 1

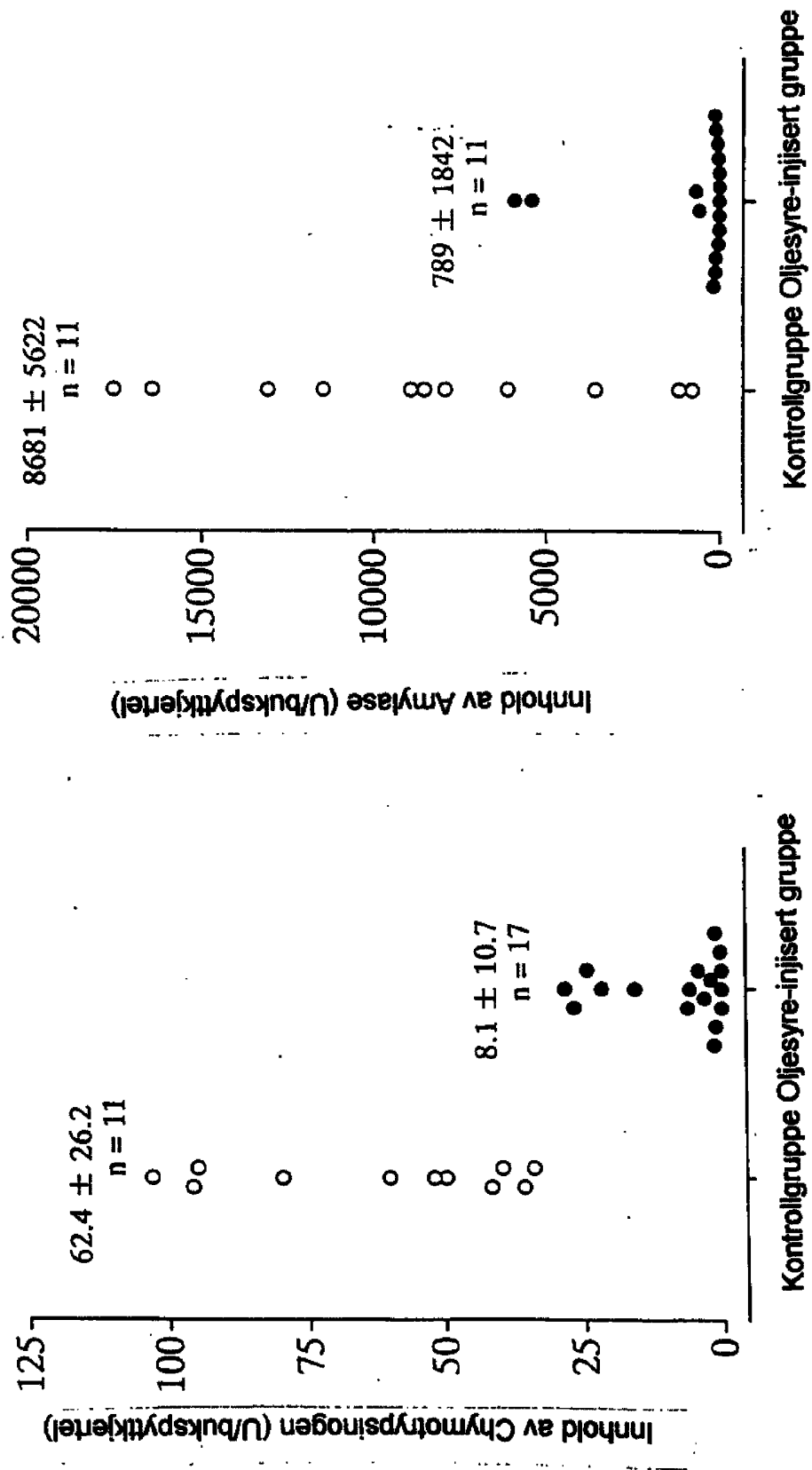


FIG. 2

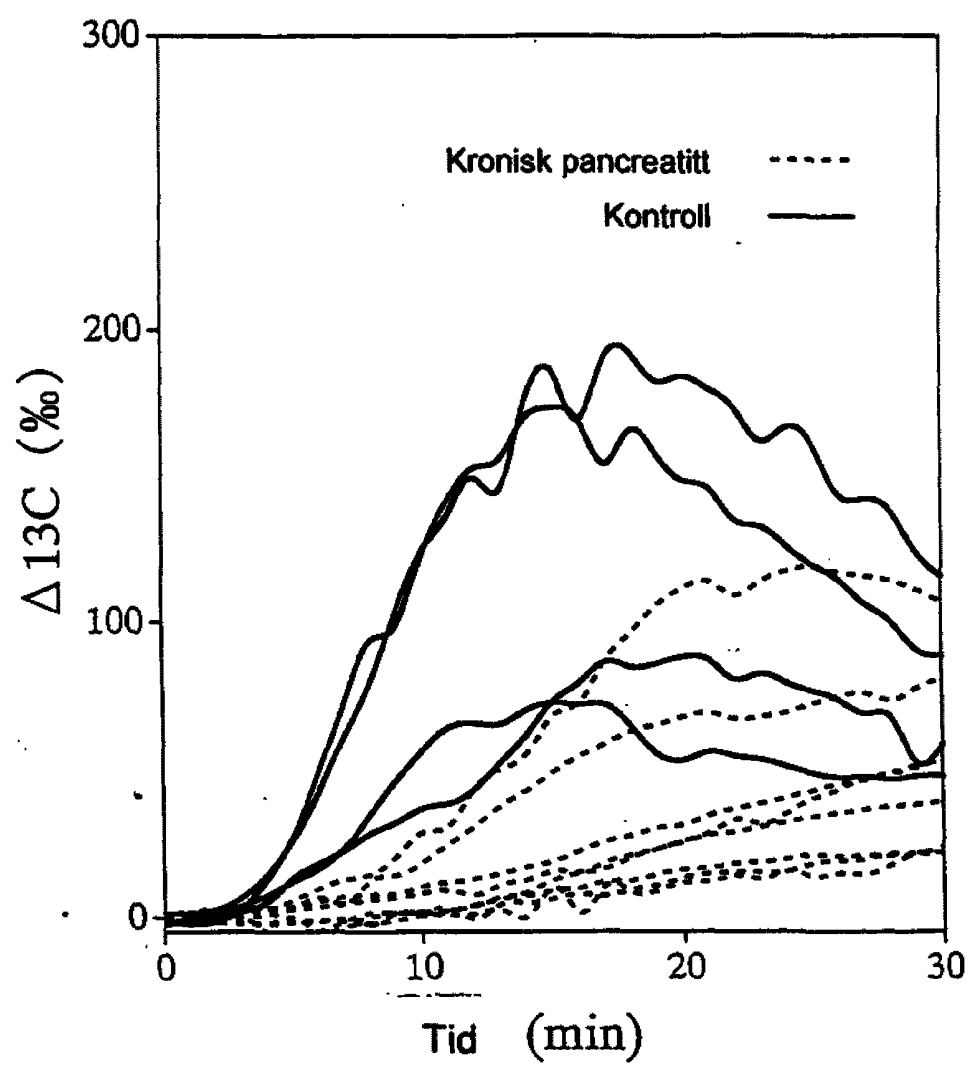


FIG. 3

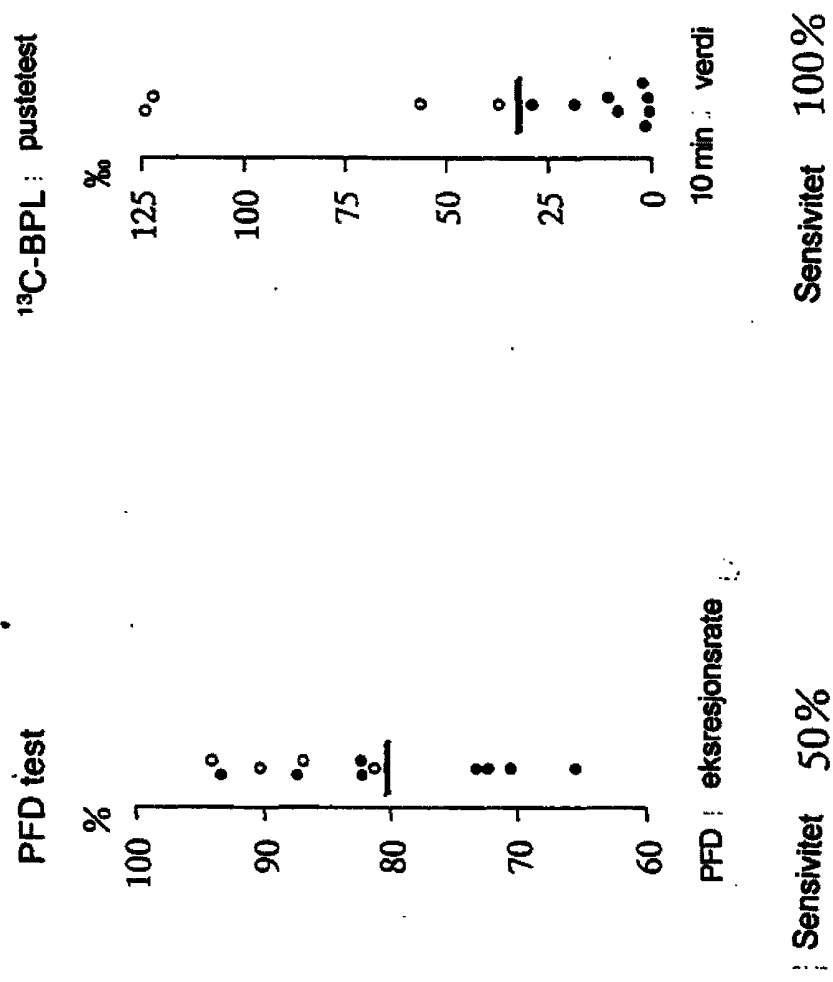


FIG. 4

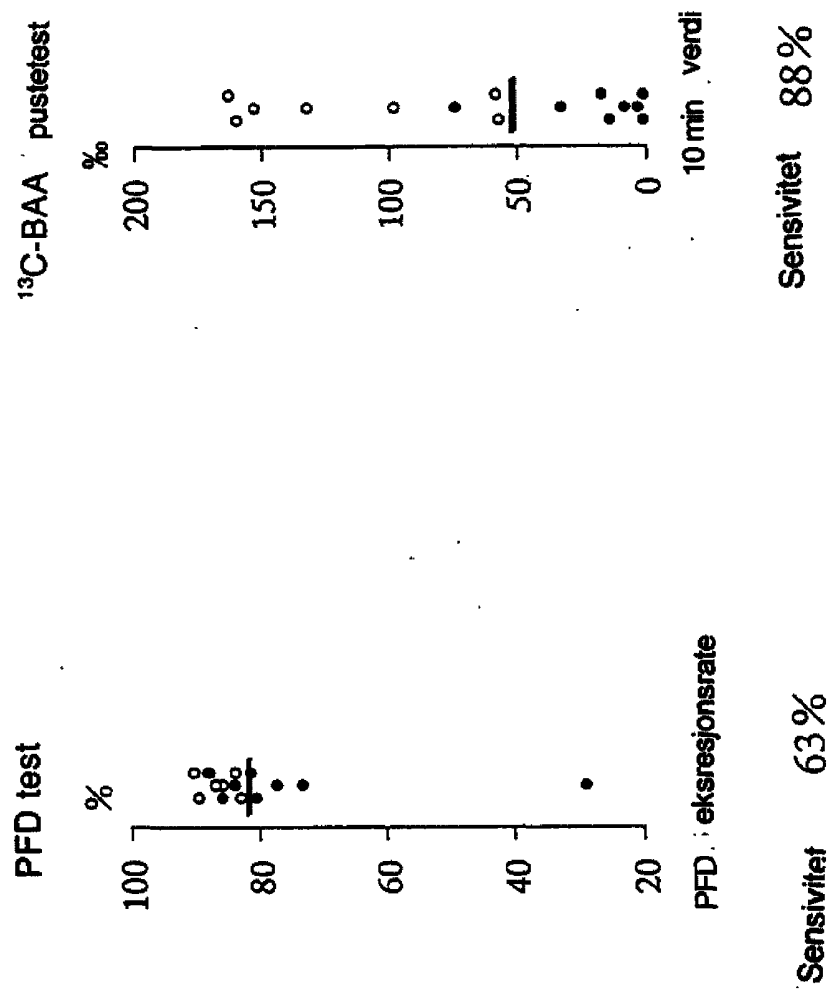


FIG. 5

