



(11) Número de Publicação: PT 989137 E

(51) Classificação Internacional:

C08B 30/00 (2006.01) C08B 37/16 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01) A61K 51/00 (2006.01)

A61K 47/26 (2006.01) A61K 51/12 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 1999.09.24	(73) Titular(es): TOKYO GAS CO., LTD. 5-20, KAIGAN 1-CHOME, MINATO-KU TOKYO 105-8527 JP
(30) Prioridade(s): 1998.09.25 JP 2712529 1998.09.25 JP 2712539 1999.09.16 JP 2619799 1999.09.17 JP 2633009	(72) Inventor(es): ISABURO HOSOI KUNIHICO SHIBATA ASUKA ITO TADASHI KOHNO JUNKO HIRAYAMA JP JP JP JP
(43) Data de publicação do pedido: 2000.03.29	
(45) Data e BPI da concessão: 2006.11.02 012/2006	(74) Mandatário: PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1350-232 LISBOA PT

(54) Epígrafe: AGENTES DE DIAGNÓSTICO DA FUNÇÃO EXÓCRINA PANCREÁTICA

(57) Resumo:

RESUMO

"AGENTES DE DIAGNÓSTICO DA FUNÇÃO EXÓCRINA PANCREÁTICA"

A presente invenção proporciona um oligossacárido ou polissacárido marcado com ^{13}C ou um seu sal excluindo U- ^{13}C -maltose, ^{13}C -amido, 1- ^{13}C -maltotetrose e 1- ^{13}C -amilose; um derivado do oligossacárido ou polissacárido marcado com ^{13}C ou um seu sal; um complexo de inclusão marcado com ^{13}C ou um seu sal, que compreende uma ciclodextrina ou um seu derivado modificado como uma molécula hospedeira; um composto éster de fluoresceína marcado com ^{13}C ou ^{14}C ou um seu sal; e agentes de diagnóstico da função exócrina pancreática compreendendo estes compostos marcados com ^{13}C ou ^{14}C .

DESCRIÇÃO

"AGENTES DE DIAGNÓSTICO DA FUNÇÃO EXÓCRINA PANCREÁTICA"

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a compostos novos úteis como agentes de diagnóstico da função exócrina pancreática e com a sua utilização.

Antecedentes da Invenção

Os "testes da função exócrina pancreática" são úteis para o diagnóstico de doenças pancreáticas tais como pancreatite crónica e aguda e cancro do pâncreas. Também são úteis para avaliar o estado e prognóstico dos doentes e para controlar a medicação: descrições gerais são encontradas em Arvanitakis e Cooke, *Gastroenterology*, **74**:932 (1978); Niederau e Grendell, *Gastroenterology*, **88**:1973 (1985); Goldberg, *Bull. Mol. Biol. Med.*, **15**:1 (1990); Lankisch, *Int. J. Pancreatology*, **14**:9 (1993); Bank e Chow, *Gastroenterologist*, **2**:224 (1994); e Steer et al., *New Eng. J. Med.*, **332**:1482 (1995).

Presentemente, o "padrão de eleição" da função exócrina pancreática envolve a inserção de um tubo pela boca até ao duodeno para recolher o suco duodenal. Actualmente, é geralmente utilizado o teste da secretina, em que a secretina é administrada

intravenosamente para estimular a secreção do suco pancreático antes da recolha. Este método é altamente exacto uma vez que a quantidade e componentes do suco pancreático são analisados directamente. Contudo, este método não pode ser utilizado repetidamente ou utilizado para rastreio devido ao stress muito forte causado aos indivíduos. Só está disponível num número relativamente pequeno de centros médicos com médicos altamente especializados. Além disso, uma vez que este método requer a colocação de um tubo fluoroscópico durante a colheita do suco duodenal, há o problema da exposição aos raios X.

Por outro lado, é utilizado clinicamente um teste para quantificação de enzimas exócrinas pancreáticas do pâncreas para o sangue para rastreio de doenças pancreáticas (*The Merck Manual* 16ª edição). Contudo, o aumento das enzimas exócrinas pancreáticas no sangue só é observado no estágio inicial da pancreatite aguda ou no estágio recrudescente da pancreatite crónica e não reflecte sempre a capacidade do pâncreas para segregar enzimas exócrinas pancreáticas. Além disso, o aumento de enzimas exócrinas pancreáticas no sangue por vezes pode não ser detectado devido a turbidez do plasma na pancreatite acompanhada por hiperlipemia.

Em conformidade, utiliza-se métodos simples que não requerem a inserção de um tubo para testes de repetição e rastreio. Um deles é o "Pancreolauryl-test" (PLT) em que um substrato sintético FDL (dilaurato de fluoresceína, dilaurilfluoresceína) para éster de colesterol hidrolase, esterase, segregada pelo pâncreas, é administrado oralmente e é colhida a urina de 10 horas seguida por determinação da quantidade de um produto de degradação da fluoresceína excretado na urina: patente US N° 3917812; Barry *et al.*, *Lancet* (1982) Oct. 2, p. 742; Scharpe e Iliano, *Clin. Chem.*, **33**:5 (1987). Contudo, este método

é de realização muito demorada e, portanto, não pode ser realizado frequentemente em doentes em regime de ambulatório e não é adequado em exames físicos.

Nestas circunstâncias há necessidade do desenvolvimento de um método simples para testar a função exócrina pancreática que provoque pouco stresse nos indivíduos e produza resultados exactos com rapidez.

O documento US 5640014 descreve um espectrómetro de díodos laser melhorado e métodos e aparelhos para análise de razões isotópicas. Este documento descreve o doseamento de compostos marcados com ^{13}C , tais como ^{13}C -Hioleína, ^{13}C -Neolate, ^{13}C -xilose, ^{13}C -glucose, ^{13}C -amido, ^{13}C -lactose e outros.

Rating *et al.*, *Eur. J. Pediatr.* (1977), **156**, Suppl. 1, páginas 18-23, descrevem a utilização de vários compostos marcados com ^{13}C em "testes respiratórios", incluindo a utilização de ^{13}C -lactose e ^{13}C -sacarose para determinar a malabsorção.

Por um lado, o teste respiratório com ^{13}C , em que é administrado um amido marcado com ^{13}C , foi recentemente considerado para ser utilizado no teste da função exócrina pancreática: Hiele *et al.*, *Gastroenterology*, **96**:503 (1989); Dewit *et al.*, *Pediatric Res.*, **32**:45 (1992); e Z. *Gastroenterol.*, **35**:187 (1997). No tracto entérico, o amido é degradado eficientemente a glucose pela clivagem de qualquer ligação α -1,4-glucosídica interna com α -amilase segregada pelo pâncreas e pela acção de enzimas tais como α -glucosidase (maltase) de células epiteliais da mucosa do intestino delgado e absorvido: *Essentials of Human Metabolism*, 2^a ed., W.C. McMurray, Harper & Row Publishers, NY. O

teste respiratório com ^{13}C , em que é administrado um amido marcado com ^{13}C utiliza o fenómeno de que após o amido marcado com ^{13}C , ser degradado no tracto digestivo, é absorvido e descarboxilado por acção metabólica no organismo para produzir $^{13}\text{CO}_2$ que é excretado na respiração, e é um método seguro e simples. Contudo, não foi ainda estudado qualquer outro oligossacárido ou polissacárido marcado com ^{13}C que não amido marcado com ^{13}C .

Uma vez que há uma α -glucosidase (maltase) nas células epiteliais da mucosa do intestino delgado, que cliva uma ligação α -1,4-glucosídica terminal não redutora (*Enzyme Handbook*, Springer-Verlag, Berlim), o amido é degradado em glucose sequencialmente a partir do terminal não redutor e absorvido só pela acção de enzimas tais como a α -glucosidase (maltase), mesmo sem a acção de α -amilase. Assim, o amido fica sujeito à acção de uma enzima exócrina não pancreática α -glucosidase (maltase) das células epiteliais da mucosa do intestino delgado e, portanto, o teste respiratório do amido marcado com ^{13}C não reflecte só a função exócrina pancreática. Em conformidade, seria mais preferido se fosse seleccionado um composto como substrato específico para α -amilase no tracto digestivo.

Em conformidade, um objectivo da presente invenção é proporcionar um agente de diagnóstico para a função exócrina pancreática que conduza a um teste da função exócrina pancreática que provoque pouco stresse nos indivíduos e produza os resultados num período de tempo curto.

Outro objecto da presente invenção é proporcionar um agente de diagnóstico da função exócrina pancreática que seja específico da capacidade de secreção de α -amilase.

Ainda outro objecto da presente invenção é proporcionar um novo composto que possa ser utilizado no teste da função exócrina pancreática.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Os presentes requerentes verificaram que o teste da função exócrina pancreática pode ser realizado por administração oral de um oligossacárido marcado com ^{13}C ou com um complexo de inclusão marcado com ^{13}C ou com um éster de fluoresceína marcado com ^{13}C a um rato com pancreatite crónica e determinação da concentração de ^{13}C no CO_2 exalado após a administração. Foi assim completada a presente invenção.

Em conformidade, a presente invenção proporciona um oligossacárido ou polissacárido marcado com ^{13}C , ou um seu sal, em que pelo menos uma molécula de açúcar constituinte do oligossacárido ou polissacárido está modificada no terminal não redutor com, pelo menos, um grupo modificador, caracterizado por o referido grupo modificador ser seleccionado de um grupo consistindo num grupo galactosilo, num grupo digalactosilo, num grupo carbamoilo, num grupo piridilamino, num grupo etilideno e num grupo benzilideno

A presente invenção também proporciona um complexo de inclusão marcado com ^{13}C ou um seu sal, que compreende uma ciclodextrina ou um seu derivado modificado como molécula hospedeira, e uma molécula hóspede em que a molécula hóspede está marcada com ^{13}C .

Além disso, a presente invenção proporciona a utilização de um oligossacárido ou polissacárido marcado com ^{13}C ou ^{14}C ou um seu sal ou um seu derivado que não ^{13}C -amido no fabrico de um agente de diagnóstico para funções exócrinas pancreáticas.

Além disso, a presente invenção proporciona ainda a utilização de um complexo de inclusão marcado com ^{13}C ou ^{14}C ou um seu sal tendo uma ciclodextrina ou um seu derivado modificado como uma molécula hospedeira no fabrico de um agente de diagnóstico para a função exócrina pancreática.

São as seguintes as matérias da presente invenção:

(1) Um oligossacárido ou polissacárido marcado com ^{13}C , ou um seu sal em que, pelo menos, uma molécula de açúcar constituinte do oligossacárido ou polissacárido está modificada no terminal não redutor com, pelo menos, um grupo modificador, caracterizado por o referido grupo modificador ser seleccionado de um grupo que consiste num grupo galactosilo, num grupo digalactosilo, num grupo carbamoílo, num grupo piridilamino, num grupo etilideno e num grupo benzilideno.

(2) Um oligossacárido ou polissacárido marcado com ^{13}C ou um seu sal de acordo com (1), em que o oligossacárido ou polissacárido é hidrolisável com α -amilase.

(3) Um oligossacárido ou polissacárido marcado com ^{13}C ou um seu sal de acordo com (2), em que o oligossacárido ou polissacárido não é hidrolisável com α -glucosidase.

(4) Um oligossacárido ou polissacárido marcado com ^{13}C ou um seu sal de acordo com qualquer um de (1) a (3), em que pelo menos

uma molécula de açúcar constituinte do oligossacárido ou polissacárido está marcada com ^{13}C .

(5) Um oligossacárido ou polissacárido marcado com ^{13}C ou um seu sal de acordo com qualquer um de (1) a (3), em que o referido grupo modificador é um grupo modificador marcado com ^{13}C .

(6) Um oligossacárido ou polissacárido marcado com ^{13}C ou um seu sal de acordo com qualquer um de (1) a (5), em que o oligossacárido ou polissacárido é um oligossacárido ou polissacárido linear ou ramificado.

(7) Um oligossacárido ou polissacárido marcado com ^{13}C ou um seu sal de acordo com qualquer um de (1) a (5), em que o oligossacárido ou polissacárido é um oligossacárido ou polissacárido cíclico.

(8) Um oligossacárido ou polissacárido marcado com ^{13}C ou um seu sal de acordo com qualquer um de (1) a (3), em que o oligossacárido ou polissacárido é selecionado de um grupo consistindo em paranitrofenil-6-o-benzilmaltopentósido, 4-nitrofenilmalto-hexósido, 4,6-etilidenoglucósido, 4,6-benzilideno- α -o-nitrofenil-maltopentósido, o-6-desoxipiridilamino- α -maltopentósido e paranitrofenil-4,6-di-o-(N-etil)-4-carbamoilmaltopentósido.

(9) Um oligossacárido ou polissacárido marcado com ^{13}C ou um seu sal de acordo com qualquer um de (1) a (3), em que o oligossacárido ou polissacárido é β -galactosil- ^{13}C -maltooligossacárido.

(10) Um oligossacárido ou polissacárido marcado com ^{13}C ou um seu sal de acordo com (1), em que a referida molécula de açúcar está marcada com ^{13}C e o referido grupo modificador é um grupo galactosilo.

(11) Um complexo de inclusão marcado com ^{13}C ou um seu sal, que compreende ciclodextrina ou um seu derivado modificado como molécula hospedeira, e uma molécula hóspede em que a molécula hóspede está marcada com ^{13}C .

(12) O complexo de inclusão ou um seu sal de acordo com (11), em que a molécula hóspede é seleccionada do grupo que consiste em oligossacáridos, aminoácidos, péptidos, ácidos orgânicos, ácidos gordos, glicéridos de ácidos gordos, vitaminas, catequinas, carotenóides, flavonóides e colesterol.

(13) O complexo de inclusão ou um seu sal de acordo com (12), em que a molécula hóspede é seleccionada do grupo que consiste em ^{13}C -fenilalanina, benzoilfenilalanil- ^{13}C -leucina e éster metílico de benzoilfenilalanil- ^{13}C -leucina.

(14) Utilização de um oligossacárido ou polissacárido marcado com ^{13}C ou ^{14}C ou um seu sal ou um seu derivado que não ^{13}C -amido no fabrico de um agente de diagnóstico para funções exócrinas pancreáticas.

(15) Utilização de acordo com (14), em que o oligossacárido ou polissacárido marcado com ^{13}C ou ^{14}C ou um seu sal ou um seu derivado é hidrolisável com α -amilase.

(16) Utilização de acordo com (15), em que o oligossacárido ou polissacárido marcado com ^{13}C ou ^{14}C ou um seu sal ou um seu derivado não é hidrolisável com α -glucosidase.

(17) Utilização de acordo com qualquer um de (14) a (16), em que o oligossacárido ou polissacárido marcado com ^{13}C ou ^{14}C é um oligossacárido ou polissacárido linear ou ramificado.

(18) Utilização de acordo com (17), em que o oligossacárido ou polissacárido marcado com ^{13}C ou ^{14}C está modificado no terminal não redutor.

(19) Utilização de acordo com qualquer um de (14) a (16), em que o oligossacárido ou polissacárido marcado com ^{13}C ou ^{14}C é um oligossacárido ou polissacárido cíclico.

(20) Utilização de acordo com qualquer um de (14) a (19), em que a função exócrina pancreática a ser diagnosticada é a capacidade do pâncreas para segregar α -amilase.

(21) Utilização de um complexo de inclusão marcado com ^{13}C ou ^{14}C ou um seu sal tendo uma ciclodextrina ou um seu derivado modificado como molécula hospedeira no fabrico de um agente de diagnóstico para a função exócrina pancreática.

(22) Utilização de acordo com (21), em que a função exócrina pancreática a ser diagnosticada é a capacidade do pâncreas para segregar α -amilase e pelo menos uma enzima exócrina pancreática que não α -amilase.

O termo "oligossacárido" refere-se a um açúcar que tem dois a dez ou mais monossacáridos polimerizados. Estes monossacáridos podem estar modificados.

O termo "polissacárido" refere-se a um açúcar com monossacáridos polimerizados com um grau de polimerização de, pelo menos, 10. Estes monossacáridos podem estar modificados.

O termo "oligossacárido ou polissacárido linear" refere-se a um oligossacárido ou polissacárido com uma estrutura de cadeia linear tal como maltooligossacáridos (e. g., maltotriose, maltotetose, etc.) e polissacáridos (e. g., amilose, etc.).

O termo "oligossacárido ou polissacárido ramificado" refere-se a um oligossacárido ou polissacárido com uma estrutura ramificada, tais como amilopectina e glicogénio.

O termo "oligossacárido ou polissacárido cíclico" refere-se a um oligossacárido ou polissacárido com uma estrutura cíclica, tal como ciclodextrina.

O termo "terminal não redutor" refere-se ao terminal do lado em que o átomo de carbono na posição 1 de um resíduo de açúcar está envolvido na ligação da cadeia do açúcar.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Fig. 1 apresenta um espectro de RMN de ^{13}C de ^{13}C -ciclodextrina.

A Fig. 2 mostra a evolução no tempo do grau de aumento da concentração de ^{13}C no CO_2 exalado ($\Delta^{13}\text{C}$ (‰)) após a administração de ciclodextrina marcada com ^{13}C . Ao minuto 0, a ciclodextrina marcada com ^{13}C foi administrada oralmente

(75 mg/kg) a ratos com pancreatite crónica (n=2, ●) e ratos de controlo (n=4, ○). A barra indica o desvio padrão.

A Fig. 3 mostra um espectro de RMN de ^{13}C de galactosil ^{13}C -maltohexose.

A Fig. 4 mostra a evolução no tempo do grau de aumento da concentração de ^{13}C no CO_2 exalado ($\Delta^{13}\text{C}$ ‰) após a administração de ^{13}C -galactosilmalto-hexose. Ao minuto 0, a ^{13}C -galactosilmaltohexose foi administrada oralmente (75 mg/kg) a ratos com pancreatite crónica (n=3, ●) e a ratos de controlo (n=4, ○). A barra indica o desvio padrão.

A Fig. 5 mostra a evolução no tempo do grau de aumento da concentração de ^{13}C no CO_2 exalado ($\Delta^{13}\text{C}$ ‰) após a administração de complexo de inclusão de fenilalanina marcada com ^{13}C /hidroxipropil- β -ciclodextrina ($1\text{-}^{13}\text{C}$ -Phe/hp- β -CD). Ao minuto 0, o complexo de inclusão $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Phe/hp- β -CD foi administrado oralmente (59,76 mg/kg de $1\text{-}^{13}\text{C}$ -Phe) a ratos com pancreatite crónica (n=4, ○) e ratos de controlo (n=4, ●). A barra indica o desvio padrão.

A Fig. 6 é um espectro de difracção de raios X de pós de complexo de inclusão benzoilfenilalanil[$1\text{-}^{13}\text{C}$]-leucina/ γ -ciclodextrina (Bz-Phe-(^{13}C -Leu)/ γ -CD).

A Fig. 7 mostra a evolução no tempo do grau de aumento da concentração de ^{13}C no CO_2 exalado ($\Delta^{13}\text{C}$ ‰) após a

administração de complexo de inclusão de benzoilfenilalanil[1- ^{13}C]-leucina/ γ -ciclodextrina (Bz-Phe-(^{13}C -Leu)/ γ -CD). Ao minuto 0, o complexo de inclusão Bz-Phe-(^{13}C -Leu)/ γ -CD foi administrado oralmente (100 mg/kg de Bz-Phe-(^{13}C -Leu)) a ratos com pancreatite crónica (n=2, ●) e ratos de controlo (n=2, ○). A barra indica o desvio padrão.

A Fig. 8 é um espectro de difracção de raios X de pós do complexo de inclusão de éster metílico de benzoilfenilalanil[1- ^{13}C]-leucina/ γ -ciclodextrina (Bz-Phe-(^{13}C -Leu)Me/ γ -CD).

A Fig. 9 mostra a evolução no tempo do grau de aumento da concentração de ^{13}C no CO_2 exalado ($\Delta^{13}\text{C}$ ‰) após a administração de complexo de inclusão de éster metílico de benzoilfenilalanil[1- ^{13}C]-leucina/ γ -ciclodextrina (Bz-Phe-(^{13}C -Leu)Me/ γ -CD). Ao minuto 0, o complexo de inclusão Bz-Phe-(^{13}C -Leu)Me/ γ -CD foi administrado oralmente (70 mg/kg de Bz-Phe-(^{13}C -Leu)Me) a ratos com pancreatite crónica (n=4, ●) e ratos de controlo (n=4, ○). A barra indica o desvio padrão.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

Daqui em diante, a presente invenção será descrita em pormenor.

Os compostos marcados com ^{13}C ou ^{14}C da presente invenção podem ser farmacologicamente aceitáveis.

O termo "marcado com ^{13}C ou ^{14}C " significa aqui que qualquer átomo de carbono no composto está substituído por um átomo de ^{13}C ou ^{14}C , resultando numa razão de abundância maior de ^{13}C ou ^{14}C do que a razão de abundância de ocorrência natural independentemente do seu método de preparação.

O "oligossacárido ou polissacáridos modificados nos seus terminais não redutores" refere-se a oligossacárido ou polissacáridos em que o átomo de carbono no seu grupo glucosilo terminal não redutor está modificado. Os grupos modificadores incluem grupos modificadores compreendendo oligossacáridos tais como grupos galactosilo e digalactosilo, grupo carbamoílo, grupo piridilamino, e grupos etilideno e benzilideno que estão ligados a dois átomos de carbono no grupo glucosilo terminal não redutor.

Exemplos do oligossacárido ou polissacárido ou um seu sal, ou um seu derivado incluem paranitrofenil-6-o-benzil maltopentósido, 4-nitrofenilmalto-hexósido 4,6-etilideno glucósido, 4,6-benzilideno- α -o-4-nitrofenil-maltopentósido, o-6-desoxipiridilamino- α -maltopentósido e paranitrofenil-4,6-di-o-(N-etil)4-carbamoilmaltopentósido e assim por diante.

Estes compostos podem ser preparados por métodos descritos na seguinte literatura: *Carbohydrate Research*, **176** (1988), 107-115; pedido de patente Japonesa aberta N° 3-91496; patente US N° 4649108; *Journal of Chromatography*, **336** (1984), 368-373; e pedido de patente Japonesa aberta N° 8-291. Na preparação, um maltooligossacárido marcado com ^{13}C ou ^{14}C (que pode estar disponível comercialmente ou ser preparado por um método conhecido) pode ser utilizado como um material de partida para dar um marcado com ^{13}C ou ^{14}C .

Por exemplo, o galactosil oligossacárido, que é um oligossacárido modificado no terminal não redutor, pode ser obtido por adição de lactose a um oligossacárido para levar lactase a actuar sobre ele, e recolha da mistura reaccional por cromatografia em coluna (pedidos de patente Japonesa aberta Nº 4-209277, 8-196289 e 10-316697). Na preparação, pode ser utilizado um oligossacárido marcado com ^{13}C ou ^{14}C para dar um galactosil oligossacárido marcado com ^{13}C ou ^{14}C . Quando se utiliza lactose marcada com ^{13}C ou ^{14}C -galactosilo, obtém-se um galactosil oligossacárido em que o grupo galactosilo está marcado com ^{13}C ou ^{14}C .

"Ciclodextrinas" significa aqui oligossacáridos cíclicos constituídos por unidades de glucopiranosose ligadas por ligações α -1,4. O número de glucoses que formam o anel não está de todo limitado e estão disponíveis comercialmente α -, β - e γ -ciclodextrinas com 6 a 8 glucoses. A ciclodextrina pode ter uma ramificação. O(s) grupo(s) hidroxilo na ciclodextrina podem estar modificados; as ciclodextrinas com um desses grupo modificadores estão incluídos nos "derivados modificados de ciclodextrina". A título ilustrativo, a modificação inclui alquilação tal como metilação, hidroxialquilação tal como hidroxipropilação, esterificação tal como acetilação ou succinilação, glucosilação, eterificação carboximética, eterificação fosfórica, eterificação sulfobutílica e carboximetilação. Estes derivados modificados estão descritos em Loftsson *et al.*, *J. Pharmaceu. Sci.*, **85**:1017 (1996); Stella *et al.*, *Pharmaceutical Res.*, **14**:556 (1997); e "Cyclodextrins" editado por Fujio Toda, supervisionado por Sangyo Tosho.

Por exemplo, uma ciclodextrina marcada com ^{13}C ou ^{14}C pode ser obtida por acção de uma ciclomaltodextrina glucanotransferase

sobre amido enriquecido em ^{13}C de ocorrência natural derivado de plantas C4 tais como milho ou um amido marcado com ^{13}C ou ^{14}C disponível comercialmente e recolha da mistura reaccional por cromatografia em coluna.

Além disso, uma precipitação de β - e γ -ciclodextrina marcada com ^{13}C ou ^{14}C pode ser obtida por adição de bromobenzeno a uma solução mista de ciclodextrina marcada com ^{13}C ou ^{14}C , agitação da mistura a 10 °C de um dia para o outro e submetendo-a a centrifugação. Esta precipitação é lavada com água gelada saturada com bromobenzeno, concentrada por evaporação com vapor e deixada em repouso, resultando em β -ciclodextrina marcada com ^{13}C ou ^{14}C . As águas mães são tratadas com glucoamilase e misturadas com ciclo-hexano. O sobrenadante é concentrado e misturado com n-propanol para dar ciclodextrina marcada com ^{13}C ou ^{14}C .

Um derivado modificado de uma ciclodextrina pode ser preparado do modo seguinte. Por exemplo, adiciona-se hidróxido de potássio a uma solução aquosa de β -ciclodextrina para a tornar alcalina e a solução é aquecida a 70 a 80 °C, e adiciona-se depois 2-cloroetanol ou 3-cloropropanol. A mistura é então arrefecida até à temperatura ambiente e neutralizada e adiciona-se carvão activado e filtra-se. O filtrado é concentrado e seco. Adiciona-se DMF ao resíduo e remove-se os insolúveis. A adição de acetona dá hidroxietil- ou hidroxipropilciclodextrina: Irie et al., *Pharmaceutical Res.*, **5**:713 (1988). Na preparação, pode utilizar-se uma ciclodextrina marcada com ^{13}C ou ^{14}C para dar uma hidroxietil ciclodextrina ou hidroxipropil ciclodextrina marcada com ^{13}C ou ^{14}C .

O "complexo de inclusão de ciclodextrina" refere-se a uma ciclodextrina ou a um seu derivado modificado que tem qualquer composto incluído na cavidade na molécula cíclica. O composto incluído pode ser aminoácidos, ácidos gordos, ácidos orgânicos, catequinas, vitaminas, carotenóides, flavonóides, colesterolis e os seus derivados modificados. Exemplos adicionais do composto incluído são oligossacáridos, péptidos, glicéridos de ácidos gordos e os seus derivados modificados.

O complexo de inclusão de ciclodextrina marcado com ^{13}C ou ^{14}C pode ser um em que qualquer átomo de carbono no composto incluído está substituído por um átomo de ^{13}C ou ^{14}C , resultando numa maior razão de abundância de ^{13}C ou ^{14}C no complexo de inclusão da ciclodextrina do que a razão de abundância de ocorrência natural. Contudo, a ciclodextrina ou o seu derivado modificado *per se* podem estar marcados com ^{13}C ou ^{14}C . Os métodos para a sua preparação não estão limitados.

Exemplos de complexos de inclusão de ciclodextrina descritos até agora incluem os seguintes (as moléculas hóspedes não estão limitadas às indicadas nos complexos):

Complexo de inclusão de fenilalanina/ β -ciclodextrina

Complexo de inclusão de triptofano/ α -ciclodextrina

Complexo de inclusão de histidina/ α -ciclodextrina

Complexo de inclusão de cinalidina/ β -ciclodextrina

Complexo de inclusão de ácido ferúlico/ β -ciclodextrina

Complexo de inclusão de fenilalanil leucina/ β -ciclodextrina

Outras moléculas hóspedes incluem fenol, ácido hidroxibenzóico, benzaldeído, sulfóxido de metilo, ácido benzóico, anilina, ácido amino benzóico, ácido metil benzóico, nitrofenol,

piridina, ácido acético, álcoois (e. g., etanol, propanol, butanodiol, etc.), prostandina, cloridrato de benexato, nitroglicerina, limaprost e semelhantes, que estão descritos em "*Cyclodextrin*" editado por Fujio Toda, Sangyo Tosho. O complexo de inclusão de ciclodextrina pode ser obtido por mistura de água purificada com uma mistura de um composto hospedeiro e um composto hóspede numa proporção igual à do hospedeiro para hóspede no complexo de inclusão (e.g., numa proporção de equivalentes molares no caso em que a proporção do hospedeiro para o hóspede é de 1:1), agitação da mistura resultante durante cerca de 12 horas e submetendo-a a tratamento por secagem com atomização.

O oligossacárido ou polissacárido ou complexo de inclusão de ciclodextrina marcado com ^{13}C ou ^{14}C também pode ser obtido na forma de um sal. Esses sais incluem os de ácidos inorgânicos tais como os ácidos clorídrico, sulfúrico e fosfórico; os de ácidos orgânicos tais como os ácidos fórmico, acético, propiônico, glicólico, succínico, málico, tartárico, cítrico e trifluoroacético; os de metais alcalinos tais como sódio e potássio; os de metais alcalino-terrosos tais como cálcio; e os de amónio ou aminas orgânicas tais como etanolamina, trietilamina e diciclo-hexilamina.

Um agente de diagnóstico para a função exócrina pancreática pode ser formulado a partir do composto marcado com ^{13}C ou ^{14}C só ou em associação com um excipiente ou veículo numa preparação oral tal como um comprimido, cápsula, pó, granulado ou líquido. O excipiente ou veículo pode ser qualquer um farmacologicamente aceitável correntemente utilizado neste campo e a sua natureza e composição pode ser escolhida apropriadamente. Por exemplo, pode utilizar-se água como um veículo líquido. Os veículos sólidos incluem derivados de celulose tais como hidroxipropilcelulose, e

sais de ácidos orgânicos tais como estearato de magnésio. Além disso, pode utilizar-se preparações liofilizadas.

O composto marcado com ^{13}C ou ^{14}C está contido na preparação em quantidades variáveis dependendo da natureza da preparação, mas geralmente numa quantidade de 1 a 100% em peso, de um modo preferido 50 a 100% em peso. Numa cápsula, comprimido, preparação em granulado ou em pó, o composto marcado com ^{13}C ou ^{14}C está contido na preparação numa quantidade de cerca de 10 a 100% em peso, de um modo preferido 50 a 100% em peso, sendo o balanço um veículo.

A dose do agente de diagnóstico para a função exócrina pancreática deve ser suficiente para confirmar um aumento de $^{13}\text{CO}_2$ ou $^{14}\text{CO}_2$ na respiração após a administração. Variará dependendo da idade e peso corporal de um indivíduo e do objectivo do teste. Por exemplo, uma dose unitária pode ser 1 a 2000 mg/kg de peso corporal para um adulto.

O teste utilizando o agente para a função exócrina pancreática é realizado com administração a um indivíduo do composto marcado com ^{13}C ou ^{14}C . É possível um teste em que a concentração de um composto marcado com ^{13}C ou ^{14}C é determinada no soro, urina ou fezes após a administração, contudo, é desejável um teste respiratório em que é determinado um aumento da concentração de ^{13}C ou ^{14}C no CO_2 exalado após a administração. Quando o composto marcado com ^{13}C ou ^{14}C é administrado a um indivíduo, o indivíduo pode ingerir previamente uma refeição de teste ou semelhante para induzir a secreção de enzimas pancreáticas. O composto marcado com ^{13}C ou ^{14}C pode ser administrado conjuntamente com a refeição de teste ou semelhante.

Além disso, pode combinar-se uma pluralidade do composto marcado com ^{13}C ou ^{14}C para utilização. Concretamente, no caso de ^{13}C , a concentração de ^{13}C é determinada no CO_2 exalado após a administração, sendo a função exócrina pancreática diagnosticada ou a partir dos dados do grau de aumento ($\Delta^{13}\text{C}$ (%)) da concentração de ^{13}C no CO_2 exalado em tempos predeterminados (e. g., 5, 10 e 15 minutos) após a administração, ou dos dados integrados ou associados à evolução temporal (declive de instalação, alteração do declive, momento de pico, etc.) no degrau de aumento ($\Delta^{13}\text{C}$ (%)) da concentração de ^{13}C no CO_2 exalado durante um período predeterminado após a administração. No caso de ^{14}C , a concentração de ^{14}C , i. e., radioactividade, é determinada no CO_2 exalado após administração; e a função exócrina pancreática é diagnosticada a partir dos dados da quantidade de radioactividade no CO_2 exalado em tempos predeterminados (e. g., 5, 10 e 15 minutos) após a administração, ou dos dados integrados ou associados à evolução temporal (declive de instalação, alteração do declive, momento de pico, etc.) na taxa de aumento de radioactividade no CO_2 exalado durante um período predeterminado após a administração.

Estes métodos de teste utilizam o fenómeno que quando o composto marcado com ^{13}C ou ^{14}C é administrado a um indivíduo, o composto é absorvido através do tracto digestivo após o que é degradado pela acção de α -amilase e/ou esterase exócrina pancreática, e descarboxilado por acção metabólica no organismo para produzir $^{13}\text{CO}_2$ ou $^{14}\text{CO}_2$ que é excretado na respiração.

Quando se utiliza um complexo de inclusão de ciclodextrina, em que está incluído um oligossacárido, péptido, glicérido de ácido gordo ou um seu derivado modificado, a primeira reacção de

degradação é a clivagem da ciclodextrina por α -amilase e o oligossacárido, péptido, glicérido de ácido gordo ou o seu derivado modificado libertado em associação com a clivagem é então degradado pela acção de α -amilase exócrina pancreática, protease, lipase ou semelhantes sendo absorvido através do tracto digestivo e descarboxilado por acção metabólica no organismo com produção de $^{13}\text{CO}_2$ ou $^{14}\text{CO}_2$ que é excretado na respiração.

A concentração de ^{13}C no CO_2 exalado pode ser determinada por cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS), espectroscopia no infravermelho, espectrometria de massa, espectroscopia acústica fotoelétrica, RMN (ressonância magnética nuclear) e outros métodos.

A concentração de ^{14}C ou radioactividade no CO_2 exalado pode ser determinada na respiração de um indivíduo, directamente ou após captura do CO_2 num solvente, com um contador GM, um contador de cintilações líquidas, um contador de cintilações sólidas, autorradiografia, uma câmara de ionização, ou semelhantes.

O agente de diagnóstico da função exócrina pancreática é particularmente eficaz no diagnóstico da capacidade do pâncreas para secreção de α -amilase e/ou esterase.

A seguir, a presente invenção é aqui ilustrada em mais pormenor pelos exemplos seguintes; contudo, o âmbito da presente invenção não ficará limitado pelo exemplo.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Preparação ciclodextrina marcada com ^{13}C

Amido marcado com ^{13}C (Chlorella Industry, Algal Starch (solúvel em água), Lote N° 8031,S, U- ^{13}C :98,6% de átomos, Teor de Amido: 93,5%) foi dissolvido em tampão acetato 50 mM (pH 5,4) a uma concentração de 5% (p/v) e adicionou-se 100 Unidades de ciclomaltodextrina glucanotransferase (Hayashibara) e reagiu a 40 °C durante 24 horas. Depois de a enzima ficar inactivada com o tratamento a 100 °C durante 15 minutos, adicionou-se glucoamilase e reagiu a 40 °C durante 1 hora para decompor componentes que não a ciclodextrina marcada com ^{13}C em glucose. Depois de completada a reacção, a mistura reaccional foi tratada a 100 °C durante 15 minutos para inactivar a glucoamilase.

A solução foi aplicada numa coluna de carvão (2,5 cm x 25 cm) e a coluna foi lavada com 500 mL de água. Aplicou-se sequencialmente uma solução de etanol a 15% e uma solução de etanol a 40% para recuperar a ciclodextrina marcada com ^{13}C nas fracções eluídas com solução de etanol a 40%. A solução de ciclodextrina marcada com ^{13}C foi destilada para remover o solvente, dissolvida numa pequena quantidade de água e liofilizada.

O produto foi misturado com para-nitrofenol para confirmar ser a ciclodextrina por um aumento de absorvência ao comprimento de onda de 450 nm.

A posição marcada com ^{13}C foi confirmada por RMN de ^{13}C (Fig.1).

RMN de ^{13}C (DMSO-d₆, 300 MHz)

38,5-40,2 ppm Sulfóxido de dimetilo
59,5-60,1 ppm Posição 6 do resíduo de glucose
71,4-73,1 ppm Posições 3, 4 e 5 do resíduo de glucose
80,9-82,5 ppm Posição 2 do resíduo de glucose
101,5-102,1 ppm Posição 1 do resíduo de glucose

A análise por HPLC (Shodex Asahipak GS-220 HQ) da ciclodextrina marcada com ^{13}C resultante mostrou que era uma mistura de 45% de α -ciclodextrina, 45% de β -ciclodextrina e 10% de γ -ciclodextrina.

Exemplo 2: Teste respiratório com ciclodextrina marcada com ^{13}C

Realizou-se o teste respiratório com ciclodextrina marcada com ^{13}C em que a ciclodextrina marcada com ^{13}C preparada no Exemplo 1 foi administrada oralmente a ratos com pancreatite crónica e de controlo, e se determinou a evolução temporal da concentração de ^{13}C no CO_2 exalado após a administração.

De acordo com Mundlos *et al.* (Mundlos *et al.*, *Pancreas*, **1**:29 (1986)), os ratos com pancreatite crónica foram preparados por injeção de ácido oleico no canal pancreático de ratos Wistar machos com 5 semanas de idade e mantidos durante 3 semanas. Ratos em que foi feita uma incisão na linha média do abdómen foram utilizados como o controlo.

Os ratos com pancreatite crónica e os de controlo com 8 semanas de idade, que fizeram jejum de um dia para o outro, foram fixos sem anestesia a um suporte para ratos para um aparelho de

irradiação com microondas. A respiração foi recolhida a uma taxa de cerca de 100 a 300 mL/min utilizando uma bomba peristáltica (Variable Stroke Pump VS-500, Shibata Kagaku Kogyo) e introduzida directamente numa célula de fluxo de um analisador de $^{13}\text{CO}_2$ EX-130S (Nihon Bunko) para determinar a % de átomos de ^{13}C e a concentração de dióxido de carbono gasoso continuamente. Colocou-se um secador Perma Pure (MD 050-12P, Perma Pure Inc.) entre o suporte para ratos e a bomba peristáltica para remover vapor de água da respiração. Depois de estabilizada a concentração de CO_2 , o rato foi retirado uma vez do suporte para ratos e administrou-se no estômago uma solução aquosa de ciclodextrina marcada com ^{13}C (75 mg/kg, 5 mL/kg) utilizando uma sonda oral.

Calculou-se $\Delta^{13}\text{C}$ (‰) a partir da concentração de ^{13}C no CO_2 exalado em cada ponto de tempo (^{13}C tmin) e a concentração de ^{13}C em CO_2 padrão (^{13}C std) de acordo com a seguinte equação:

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

Tanto nos ratos de controlo como com pancreatite crónica, os valores de $\Delta^{13}\text{C}$ (‰) continuaram a aumentar durante 30 minutos. Contudo, o aumento do valor de $\Delta^{13}\text{C}$ (‰) dos ratos com pancreatite crónica era mais pequeno do que o dos ratos de controlo (Fig. 2). Aos 15 minutos, o valor de $\Delta^{13}\text{C}$ (‰) de $12,88 \pm 4,25$ nos ratos com pancreatite crónica era significativamente menor do que o valor de $30,39 \pm 5,29$ nos ratos de controlo ($p < 0,05$, ANOVA com LSD de Fischer).

Exemplo 3: Preparação de galactosilmalto-hexose marcada com ^{13}C

Dissolveu-se amido marcado com ^{13}C (Chlorella Industry, 4,65 g) em tampão acetato 50 mM (pH 5,4) a uma concentração de 0,5% (p/v) e adicionou-se 186 Unidades de ciclomaltodextrina glucanotransferase (Hayashibara) e reagiu a 40 °C durante 2 horas e 20 minutos. A enzima foi inactivada com o tratamento a 95 °C durante 15 minutos e o produto foi purificado por Sephadex G-25. Este processo foi repetido 4 vezes para dar 4,39 g de ^{13}C - α -ciclodextrina (rendimento de 23,6%).

Adicionou-se piridina (200 mL) a 4,39 g da ^{13}C - α -ciclodextrina resultante e arrefeceu-se em gelo. Adicionou-se anidrido acético (100 mL). Após 30 minutos, a mistura reaccional foi retirada do banho de gelo e, depois, foi agitada à temperatura ambiente durante 36 horas. Ao resíduo obtido por concentração a pressão reduzida, adicionou-se tolueno e destilou-se azeotropicamente. Este processo foi repetido três vezes. Adicionou-se acetato de etilo e água ao resíduo para extrair. As camadas orgânicas foram combinadas, secas sobre sulfato de magnésio anidro, filtradas e o filtrado foi concentrado a pressão reduzida. O resíduo resultante foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel para dar 5,1 g de ^{13}C - α -ciclodextrina peracetilada.

A ^{13}C - α -ciclodextrina peracetilada (3,25 g) foi dissolvida em anidrido acético (49,8 mL) e ácido sulfúrico (1,02 mL) e agitada com aquecimento a 55 °C. Após 5 horas, a mistura reaccional foi arrefecida em gelo e adicionou-se piridina (5,1 mL). A mistura reaccional foi concentrada a pressão reduzida e adicionou-se tolueno ao resíduo resultante. Este processo foi repetido três vezes. Adicionou-se clorofórmio e água ao resíduo para extrair. As camadas orgânicas foram combinadas, secas sobre

sulfato de magnésio anidro, filtradas e o filtrado foi concentrado a pressão reduzida. O resíduo resultante foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel. Este processo foi repetido duas vezes e o material de partida recolhido foi utilizado de novo na reacção de abertura do anel para dar 4,80 g de ^{13}C -malto-hexose peracetilada a partir de um total de 6,50 g de material de partida.

A ^{13}C -malto-hexose peracetilada (3,76 g) foi dissolvida em 1500 mL de metanol seco e gelado. Adicionou-se uma solução de metóxido de sódio 5,18 M em metanol (776 μL). Após 30 minutos, a mistura reaccional foi novamente levada à temperatura ambiente e agitada. Após 20 horas, adicionou-se uma solução de metóxido de sódio 5,18 M em metanol (388 μL). Após 3,5 horas, adicionou-se Amberlyst 15 (16 g) para neutralizar e filtrou-se. A resina foi lavada com metanol e água e o filtrado e lavagens foram combinados e concentrados a pressão reduzida. O resíduo resultante foi purificado por HPLC (coluna TSK-Gel Amide-80) para dar 1,78 g de ^{13}C -malto-hexose. O mesmo processo foi repetido duas vezes para dar um total de 2,03 g de ^{13}C -malto-hexose.

A 2,03 g de ^{13}C -malto-hexose e 710 mg de mono-hidrato de lactose, adicionou-se tampão fosfato de potássio 20 mM (pH 7,0, 6,50 mL) e dissolveu-se a 40 °C. Adicionou-se uma solução de Biolacta (lactase) (Daiwa Kasei, 0,87 mg) em tampão fosfato de potássio 20 mM (20 μL) e deixou-se em repouso a 40 °C. Após 9,5 horas, a mistura reaccional foi aquecida a 95 °C durante 15 minutos. A solução da reacção enzimática foi purificada por HPLC (coluna TSK-Gel Amide-80) para dar 239 mg de galactosil ^{13}C -malto-hexose. A análise por HPLC (coluna TSK-Gel Amide-80) da galactosil ^{13}C -malto-hexose piridilaminada mostrou que a galactosil ^{13}C -malto-hexose resultante compreendia β -1,4-

galactosil ^{13}C -malto-hexose como o componente principal e não mais do que 9% de β -1,6-galactosil- ^{13}C -malto-hexose.

A estrutura foi confirmada por RMN de ^{13}C (Fig. 3) e espectrometria de massa.

^{13}C de RMN (D_2O , 270 MHz)

60,3-61,6 ppm Posição 6 de 6 resíduos de glucose

67,4 ppm 1,4-Dioxano

70,7-79,6 ppm Posições 2, 3, 4 e 5 de 6 resíduos de glucose

92,4-96,9 ppm Posição 1 da glucose do terminal redutor

100,1-101,5 ppm Posição 1 de 5 resíduos de glucose

Espectrometria de massa (ESI-MS) m/z: 1211,3 (M^+ + Na)

Exemplo 4: Teste respiratório com galactosil maltohexose marcada com ^{13}C

Como no Exemplo 2, realizou-se um teste respiratório com galactosil malto-hexose marcada com ^{13}C em que galactosil malto-hexose marcada com ^{13}C obtida no Exemplo 3 foi administrada oralmente (75 mg/kg) a ratos com pancreatite crónica e de controlo e determinada a evolução temporal da concentração de ^{13}C no CO_2 exalado após a administração.

Tanto nos ratos de controlo e nos com pancreatite crónica, os valores de $\Delta^{13}\text{C}$ (‰) continuaram a aumentar durante 30 minutos. Contudo, o aumento do valor de $\Delta^{13}\text{C}$ (‰) dos ratos com pancreatite crónica foi mais pequeno do que o dos ratos de controlo (Fig. 4).

Aos 10 minutos após a administração, o valor de $\Delta^{13}\text{C}$ (%) ($18,89 \pm 17,01\%$) nos ratos com pancreatite crónica era significativamente mais pequeno do que o valor ($95,57 \pm 42,40\%$) nos ratos de controlo ($p < 0,05$, ANOVA com LSD de Fischer).

Exemplo 5: Preparação de complexo de inclusão de $[1-^{13}\text{C}]$ -fenilalanina/hidroxipropil- β -ciclodextrina

A 5 mL de água destilada, adicionou-se 299 mg de $[1-^{13}\text{C}]$ -fenilalanina e 1818 mg de hidroxipropil- β -ciclodextrina (numa proporção molar de 1:1) e aqueceu-se a 85°C para preparar uma solução. Assim, foi preparada uma solução de complexo de inclusão de $[1-^{13}\text{C}]$ -fenilalanina/hidroxipropil- β -ciclodextrina em que quando esta solução foi deixada arrefecer até 25°C , não se observou precipitação de fenilalanina embora a solubilidade da fenilalanina seja de 148 mg/5 mL a 25°C . Por outro lado, se se adicionasse só 299 mg de $[1-^{13}\text{C}]$ -fenilalanina a 5 mL de água destilada e aquecesse a 85°C para dissolver, a fenilalanina precipitava quando esta solução fosse deixada arrefecer a 25°C . O aumento de solubilidade da fenilalanina na presença de hidroxipropil- β -ciclodextrina confirmou a formação do complexo de inclusão de $[1-^{13}\text{C}]$ -fenilalanina/hidroxipropil- β -ciclodextrina.

Exemplo 6: Teste respiratório com complexo de inclusão de $[1-^{13}\text{C}]$ -fenilalanina/hidroxipropil- β -ciclodextrina

Como no Exemplo 2, realizou-se um teste respiratório com complexo de inclusão de $[1-^{13}\text{C}]$ -fenilalanina/hidroxipropil- β -

ciclodextrina em que o complexo de inclusão de [1-¹³C]-fenilalanina/hidroxipropil-β-ciclodextrina obtido no Exemplo 5 foi administrado oralmente (59,76 mg/kg de [1-¹³C]-fenilalanina) a ratos com pancreatite crónica e de controlo e determinada a evolução temporal da concentração de ¹³C no CO₂ exalado após a administração.

Os ratos com pancreatite crónica eram ratos WBN/kob machos (Japan SLC, Inc.) com 19 semanas de idade. Os ratos de controlo eram ratos Wistar machos com 19 semanas de idade.

Os valores de Δ¹³C (‰) dos ratos com pancreatite crónica eram menores do que os do ratos de controlo durante 30 minutos (Fig. 5). Aos 5 minutos após a administração, o valor de Δ¹³C (‰) de 38,18 ± 17,46 nos ratos com pancreatite crónica era significativamente mais pequeno do que o valor de 132,60 ± 26,79 nos ratos de controlo (p < 0,005, ANOVA com LSD de Fischer).

Exemplo 7: Preparação de complexo de inclusão de benzoílfenilalanil[1-¹³C]-leucina/γ-ciclodextrina

Após a dissolução de 1 g de 1-¹³C-L-leucina (Masstrace) em cloreto de hidrogénio/metanol e aquecimento a refluxo, o éster metílico de ¹³C-L-leucina resultante foi suspenso em 50 mL de diclorometano e adicionou-se gota a gota 1,08 mL de trietilamina enquanto se arrefecida com gelo e agitava. Em seguida adicionou-se 2,0 g de N-benzoíl-DL-fenilalanina, 2,34 g de HOBt (1-hidroxil-1H-benzotriazole-H₂O) e 50 mL de diclorometano. Depois adicionou-se uma solução de 1,49 g de WSC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida.HCl) dissolvidos em 100 mL de

diclorometano e agitou-se durante 1 hora com arrefecimento em gelo e depois de um dia para o outro à temperatura ambiente. O completar da reacção foi confirmado por cromatografia em camada fina de sílica gel utilizando clorofórmio:metanol (95:5) como o solvente de desenvolvimento. A mistura reaccional foi concentrada, extraída com acetato de etilo, lavada com HCl 1 N, NaHCO₃ a 5% e água, seca sobre sulfato de magnésio e concentrada até à secura para dar 2,32 g de éster metílico de benzoílfenilalanil-[1-¹³C]-leucina.

Depois de se dissolver 2,32 g de éster metílico de benzoílfenilalanil-[1-¹³C]-leucina em 100 mL de metanol, adicionou-se 6,4 mL de NaOH 1 N gota a gota com arrefecimento com gelo e agitação seguida por aquecimento e agitação a 70 °C durante 2,5 horas. O completar da reacção foi confirmado por cromatografia em camada fina de sílica gel utilizando clorofórmio:metanol (95:5) como o solvente de desenvolvimento. Depois de completada a reacção, a mistura reaccional foi neutralizada com HCl 1 N, concentrada e dissolvida em NaHCO₃ a 5%. Após lavagem com acetato de etilo, o NaHCO₃ a 5% foi acidificado com HCl 1 N. A mistura reaccional foi extraída com acetato de etilo, lavada com água, seca sobre sulfato de magnésio e concentrada até à secura para dar 1,93 g de benzoílfenilalanil-[1-¹³C]-leucina, que foi então recristalizada com acetato de etilo.

A estrutura e posição da marcação com ¹³C foram confirmadas por RMN de ¹³C e espectrometria de massa.

RMN de ¹³C (metanol-d₄, 300 MHz): 175,8 ppm (¹³COOH)

Espectrometria de massa (m/z): 383 (M⁺), 365, 224, 131, 105,
77

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

Preparou-se benzoílfenilalanil[1-¹³C]-leucina de modo a que a sua proporção em peso para γ -ciclodextrina fosse 1:4 (1:1 em proporção molar). γ -Ciclodextrina e benzoílfenilalanil[1-¹³C]-leucina foram dissolvidas numa pequena quantidade de água purificada e etanol, respectivamente, e ambas as soluções foram misturadas, agitadas com um agitador (500 rpm) durante 12 horas, e depois secas por atomização utilizando um "mini pulverizador" Pulvis GA-31 (Yamato Kagaku) sob as condições: uma temperatura de entrada de 100 °C, uma temperatura de saída de 50 °C, um caudal de ar seco de 0,45 m³/min, uma pressão de pulverização de 1,5 kg/cm² e um caudal de 5 mL/min. A amostra resultante foi adicionalmente seca a pressão reduzida durante 24 horas e passada através de crivos N°18 (850 μ m). Obteve-se assim complexo de inclusão de benzoílfenilalanil[1-¹³C]-leucina/ γ -ciclodextrina como um pó retido num crivo de N°50 (300 μ m).

A estrutura foi confirmada por difracção de raios X de pós utilizando um difractómetro Geigerflex Modelo 2013 (Rigaku Denki) sob as condições: filtro de Ni, risca Cu-K α (30 kV, 20 mA), uma velocidade de varrimento de 1°/min. No complexo de inclusão de benzoílfenilalanil[1-¹³C]-leucina/ γ -ciclodextrina, não se observou pico de difracção inerente a benzoílfenilalanil [1-¹³C]-leucina ou γ -ciclodextrina mas sim uma curva halo (Fig. 6).

Exemplo 8: Teste respiratório com complexo de inclusão de benzoílfenilalanil[1-¹³C]-leucina/ γ -ciclodextrina

Como no Exemplo 2, realizou-se um teste respiratório com complexo de inclusão de benzoilfenilalanil[1-¹³C]-leucina/γ-ciclodextrina em que o complexo de inclusão de benzoilfenilalanil[1-¹³C]-leucina/γ-ciclodextrina obtido no Exemplo 7 foi administrado oralmente (suspensão em solução de carboximetil celulose de sódio a 0,5% (CMC-Na), 100 mg/kg de benzoilfenilalanil[1-¹³C]-leucina) a ratos com pancreatite crónica e de controlo e determinada a evolução temporal da concentração de ¹³C no CO₂ exalado após a administração.

Os valores de $\Delta^{13}\text{C}$ (‰) dos ratos com pancreatite crónica eram menores do que os dos ratos de controlo durante 40 minutos (Fig. 7). Aos 10 minutos após a administração, o valor de $\Delta^{13}\text{C}$ (‰) de $0,03 \pm 1,73$ nos ratos com pancreatite crónica eram menores do que o valor de $7,43 \pm 4,42$ nos ratos de controlo.

Exemplo 9: Preparação de complexo de inclusão de éster metílico de benzoilfenilalanil [1-¹³C]-leucina/γ-ciclodextrina

O éster metílico de benzoilfenilalanil[1-¹³C]-leucina (preparado no Exemplo 7) foi preparado de modo que a sua proporção em peso para γ-ciclodextrina fosse de 1:4 (1:1 em proporção molar). A γ-ciclodextrina e éster metílico de benzoilfenilalanil[1-¹³C]-leucina foram dissolvidos numa pequena quantidade de água purificada e etanol, respectivamente, e ambas as soluções foram misturadas e agitadas com um agitador (500 rpm) durante 12 horas. Em seguida, repetiu-se os processos do Exemplo 7 para se obter complexo de inclusão de éster metílico de benzoilfenilalanil[1-¹³C]-leucina/γ-ciclodextrina.

A estrutura foi confirmada do mesmo modo que no Exemplo 7. No complexo de inclusão de éster metílico de benzoílfenilalanil[1-¹³C]-leucina/ γ -ciclodextrina, não se observou pico de difracção inerente ao éster metílico de benzoílfenilalanil[1-¹³C]-leucina ou γ -ciclodextrina mas sim uma curva halo (Fig. 8).

Exemplo 10: Teste respiratório com complexo de inclusão de éster metílico de benzoílfenilalanil[1-¹³C]-leucina/ γ -ciclodextrina

Como no Exemplo 2, realizou-se um teste respiratório com complexo de inclusão de éster metílico de benzoílfenilalanil[1-¹³C]-leucina/ γ -ciclodextrina em que o complexo de inclusão de éster metílico de benzoílfenilalanil[1-¹³C]-leucina/ γ -ciclodextrina obtido no Exemplo 9 foi administrado oralmente (suspensão em solução de CMC-Na a 0,5%, 70 mg/kg de éster metílico de benzoílfenilalanil[1-¹³C]-leucina, 5 mL/kg) a ratos com pancreatite crónica e de controlo e determinou-se a evolução temporal da concentração de ¹³C no CO₂ exalado após a administração.

Os valores de $\Delta^{13}\text{C}$ (‰) dos ratos com pancreatite crónica eram mais pequenos do que os dos ratos de controlo durante 40 minutos (Fig. 9). Aos 10 minutos após a administração, o valor de $\Delta^{13}\text{C}$ (‰) de $2,24 \pm 1,32$ nos ratos com pancreatite crónica era significativamente mais pequeno do que o valor de $6,73 \pm 2,06$ nos ratos de controlo ($p < 0,05$, ANOVA com LSD de Fischer).

Exemplo de Formulação 1: (Líquido para uso interno)

Adicionou-se água purificada a 1,5 partes em peso de ciclodextrina marcada com ^{13}C para produzir um total de 100 partes em peso e este total foi dissolvido e esterilizado por um filtro Millipore. O filtrado foi colocado num frasco e selado para dar um líquido para uso interno.

Exemplo de Formulação 2: (Líquido para uso interno)

Misturou-se ciclodextrina marcada com ^{13}C com uma quantidade igual de ciclodextrina não marcada. Adicionou-se água purificada a 3 partes em peso da mistura para produzir um total de 100 partes em peso e este total foi dissolvido e esterilizado por um filtro Millipore. O filtrado foi colocado num frasco e selado para dar um líquido para uso interno.

Exemplo de Formulação 3: (Líquido para uso interno)

Adicionou-se azeite a 4 partes em peso de ^{13}C -FDL para dar um total de 100 partes em peso e este total foi dissolvido, colocado num frasco e selado para dar um líquido para uso interno.

Vantagens da Invenção

A presente invenção proporciona um teste para a função exócrina pancreática que provoca pouco stresse nos indivíduos e dá os resultados num período de tempo curto.

No teste, utiliza-se um oligossacárido ou polissacárido marcado com ^{13}C ou ^{14}C ou um seu sal ou um seu derivado, ou um complexo de inclusão de ciclodextrina ou um seu sal. Entre estes materiais, as ciclodextrinas e oligossacáridos ou polissacáridos modificados no terminal não redutor são úteis como substratos para avaliação da capacidade para segregar α -amilase uma vez que são específicos para α -amilase no tracto digestivo e não são degradados por α -glucosidase (maltase). Estas propriedades são diferentes das do amido. Além disso, os complexos de inclusão utilizando ciclodextrina que é um substrato específico para α -amilase no tracto digestivo proporcionam substratos para realização universal de um teste específico para os estados patológicos por selecção das moléculas aqui incluídas. Estes métodos provocam muito menos stresse nos indivíduos e requerem menos aptidões por parte dos executantes em comparação com o teste com entubação convencional.

Este método de teste pode ser utilizado no diagnóstico de pancreatite num exame físico colectivo, avaliação da gravidade de pancreatite crónica, previsão da instalação de pancreatite fulminante grave com uma mortalidade ainda elevada (30%), diagnóstico de causas da pancreatite, e diagnóstico precoce de cancro do pâncreas. Além disso, pode ser útil como método de diagnóstico para excluir a pancreatite no exame médico de doentes externos em geral.

Lisboa, 6 de Novembro de 2006

REIVINDICAÇÕES

1. Oligossacárido ou polissacárido marcado com ^{13}C ou um seu sal, em que, pelo menos, uma molécula de açúcar constituinte do oligossacárido ou polissacárido está modificada no terminal não redutor com, pelo menos, um grupo modificador, caracterizado por o referido grupo modificador ser seleccionado de um grupo que consiste num grupo galactosilo, num grupo digalactosilo, num grupo carbamoílo, num grupo piridilamino, num grupo etilideno e num grupo benzilideno.
2. Oligossacárido ou polissacárido marcado com ^{13}C ou um seu sal de acordo com a reivindicação 1, em que o oligossacárido ou polissacárido é hidrolisável com α -amilase.
3. Oligossacárido ou polissacárido marcado com ^{13}C ou um seu sal de acordo com a reivindicação 2, em que o oligossacárido ou polissacárido não é hidrolisável com α -glucosidase.
4. Oligossacárido ou polissacárido marcado com ^{13}C ou um seu sal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que pelo menos uma molécula de açúcar constituinte do oligossacárido ou polissacárido está marcada com ^{13}C .
5. Oligossacárido ou polissacárido marcado com ^{13}C ou um seu sal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que o referido grupo modificador é um grupo modificador marcado com ^{13}C .

6. Oligossacárido ou polissacárido marcado com ^{13}C ou um seu sal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que o oligossacárido ou polissacárido é um oligossacárido ou polissacárido linear ou ramificado.
7. Oligossacárido ou polissacárido marcado com ^{13}C ou um seu sal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que o oligossacárido ou polissacárido é um oligossacárido ou polissacárido cíclico.
8. Oligossacárido ou polissacárido marcado com ^{13}C ou um seu sal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que o oligossacárido ou polissacárido é seleccionado de um grupo consistindo em paranitrofenil-6-*o*-benzil-maltopentósido, 4-nitrofenil-malto-hexosido 4,6-etilideno-glucósido, 4,6-benzilideno- α -*o*-nitrofenil-maltopentósido, *o*-6-desoxipiridilamino- α -maltopentósido e paranitrofenil-4,6-di-*o*-(*N*-etil)-4-carbamoil-maltopentósido.
9. Oligossacárido ou polissacárido marcado com ^{13}C ou um seu sal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que o oligossacárido ou polissacárido é β -galactosil- ^{13}C -maltooligossacárido.
10. Oligossacárido ou polissacárido marcado com ^{13}C ou um seu sal de acordo com a reivindicação 1, em que a referida molécula de açúcar está marcada com ^{13}C e o referido grupo modificador é um grupo galactosilo.
11. Complexo de inclusão marcado com ^{13}C ou um seu sal, que compreende uma ciclodextrina ou um seu derivado modificado

como molécula hospedeira, e uma molécula hóspede em que a molécula hóspede está marcada com ^{13}C .

12. Complexo de inclusão ou um seu sal de acordo com a reivindicação 11, em que a molécula hóspede é seleccionada do grupo que consiste em oligossacáridos, aminoácidos, péptidos, ácidos orgânicos, ácidos gordos, glicéridos de ácidos gordos, vitaminas, catequinas, carotenóides, flavonóides e colesterol.
13. Complexo de inclusão ou um seu sal de acordo com a reivindicação 12, em que a molécula hóspede é seleccionada do grupo que consiste em ^{13}C -fenilalanina, benzoílfenilalanil- ^{13}C -leucina e éster metílico de benzoílfenilalanil- ^{13}C -leucina.
14. Utilização de um oligossacárido ou polissacárido marcado com ^{13}C ou ^{14}C ou um seu sal ou um seu derivado que não ^{13}C -amido no fabrico de um agente de diagnóstico para funções exócrinas pancreáticas.
15. Utilização de acordo com a reivindicação 14, em que o oligossacárido ou polissacárido marcado com ^{13}C ou ^{14}C ou um seu sal ou um seu derivado é hidrolisável com α -amilase.
16. Utilização de acordo com a reivindicação 15, em que o oligossacárido ou polissacárido marcado com ^{13}C ou ^{14}C ou um seu sal ou um seu derivado não é hidrolisável com α -glucosidase.
17. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 a 16, em que o oligossacárido ou polissacárido marcado com

^{13}C ou ^{14}C é um oligossacárido ou polissacárido linear ou ramificado.

18. Utilização de acordo com a reivindicação 17, em que o oligossacárido ou polissacárido marcado com ^{13}C ou ^{14}C está modificado no terminal não redutor.
19. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 a 16, em que o oligossacárido ou polissacárido marcado com ^{13}C ou ^{14}C é um oligossacárido ou polissacárido cíclico.
20. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 a 19, em que a função exócrina pancreática a ser diagnosticada é a capacidade do pâncreas para segregar α -amilase.
21. Utilização de um complexo de inclusão marcado com ^{13}C ou ^{14}C ou um seu sal tendo uma ciclodextrina ou um seu derivado modificado como uma molécula hospedeira no fabrico de um agente de diagnóstico para a função exócrina pancreática.
22. Utilização de acordo com a reivindicação 21, em que a função exócrina pancreática a ser diagnosticada é a capacidade do pâncreas para segregar α -amilase e pelo menos uma enzima exócrina pancreática que não α -amilase.

Lisboa, 6 de Novembro de 2006

FIG. 1

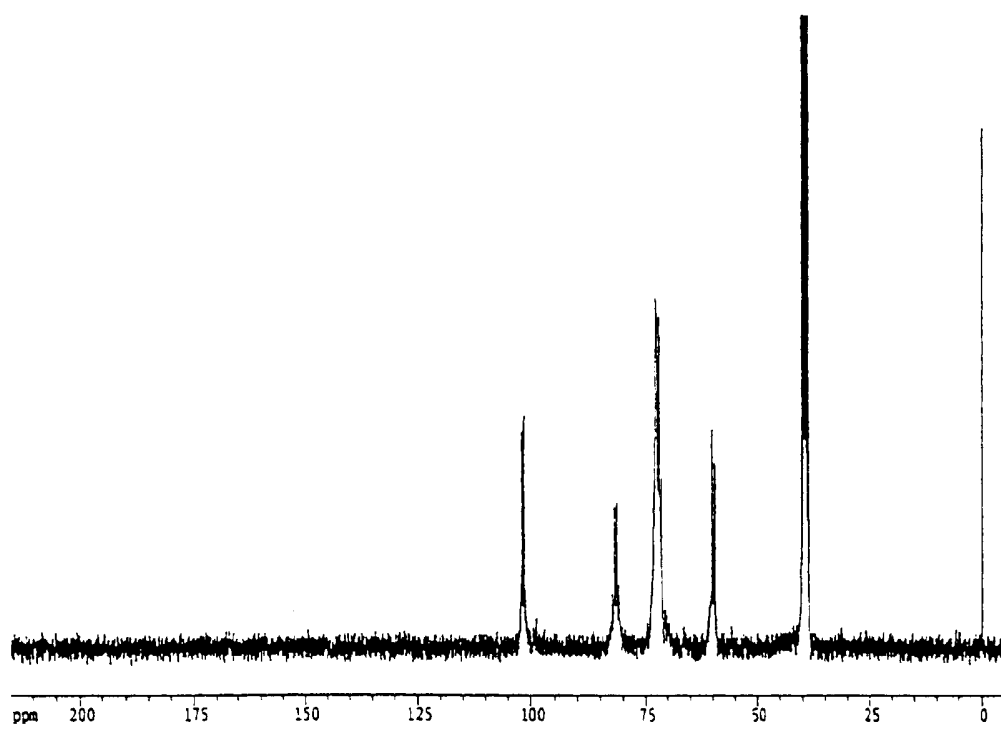
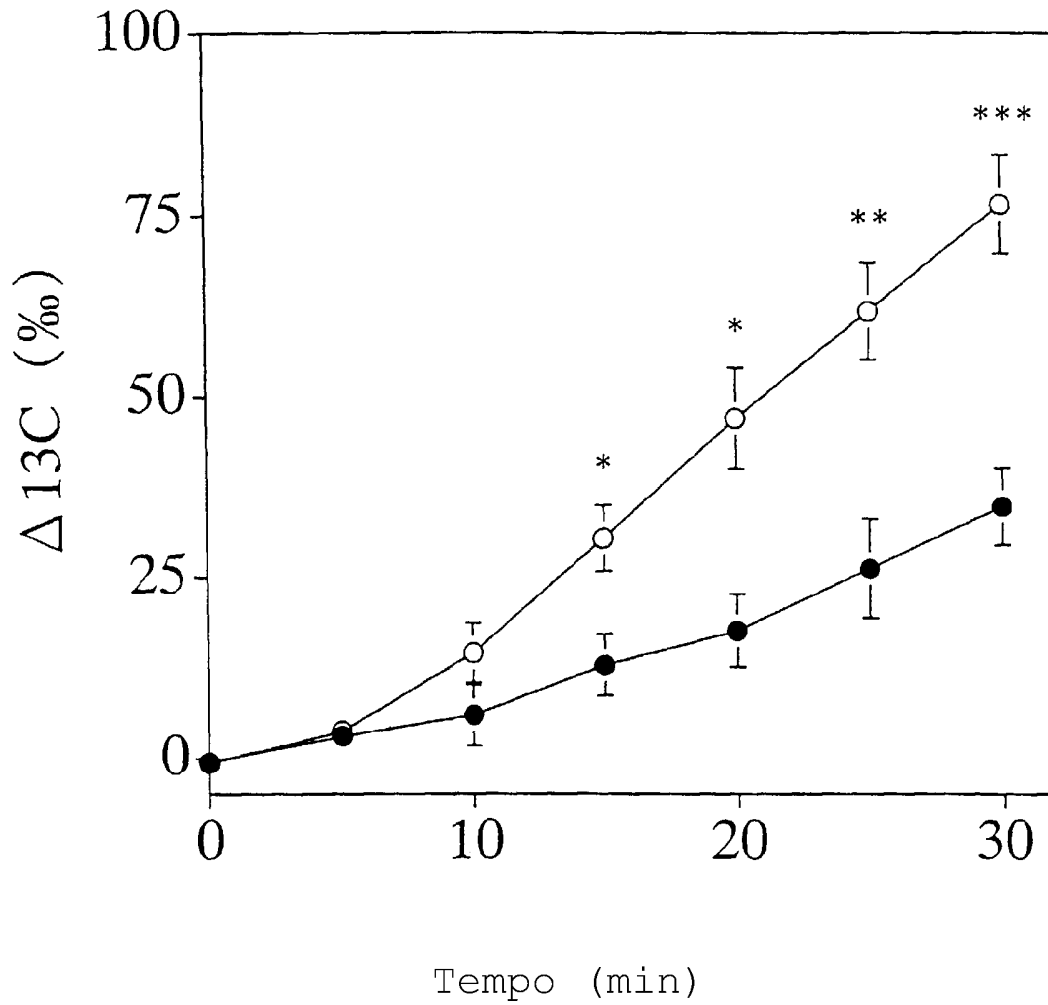


FIG.2



—●— RATOS COM PANCREATITE (n=2)

—○— RATOS DE CONTROLO (n=4)

* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.005

(ANOVA COM LSD DE FISCHER)

FIG.3

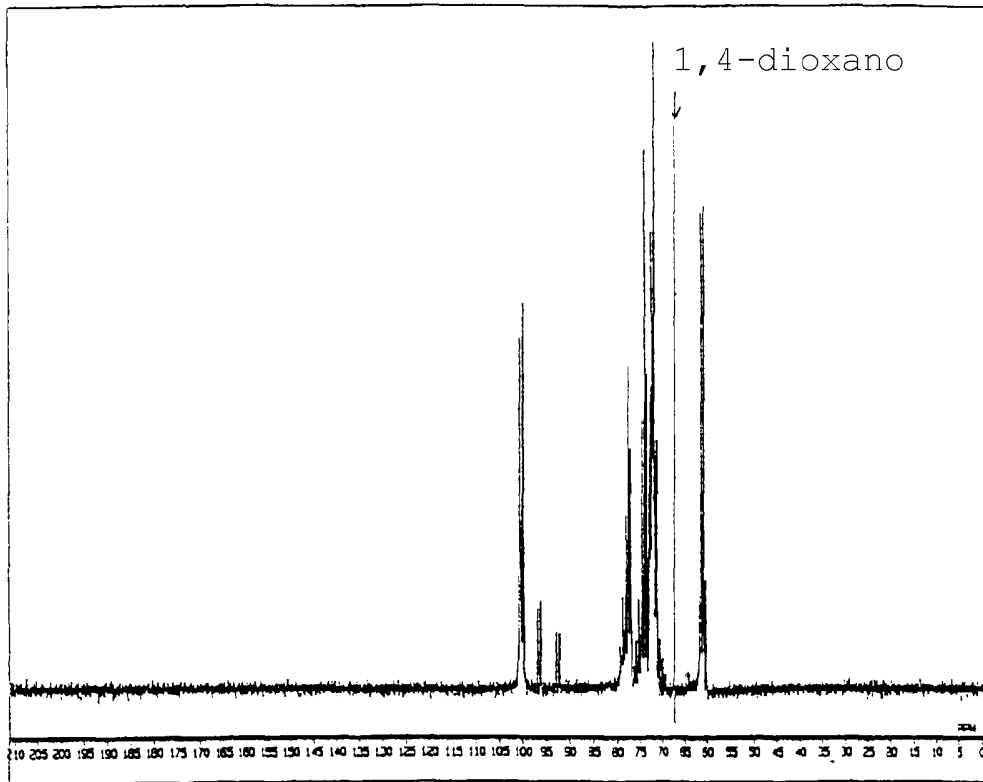
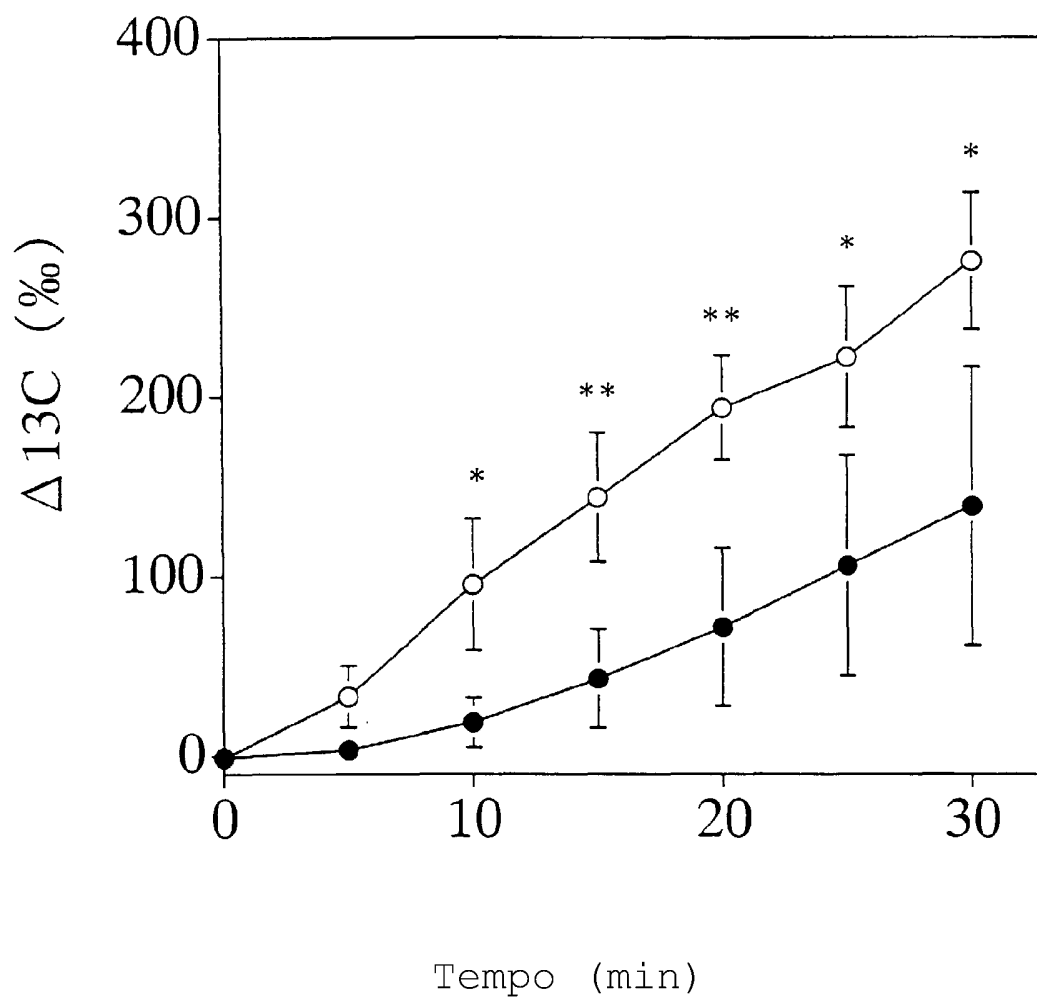


FIG.4

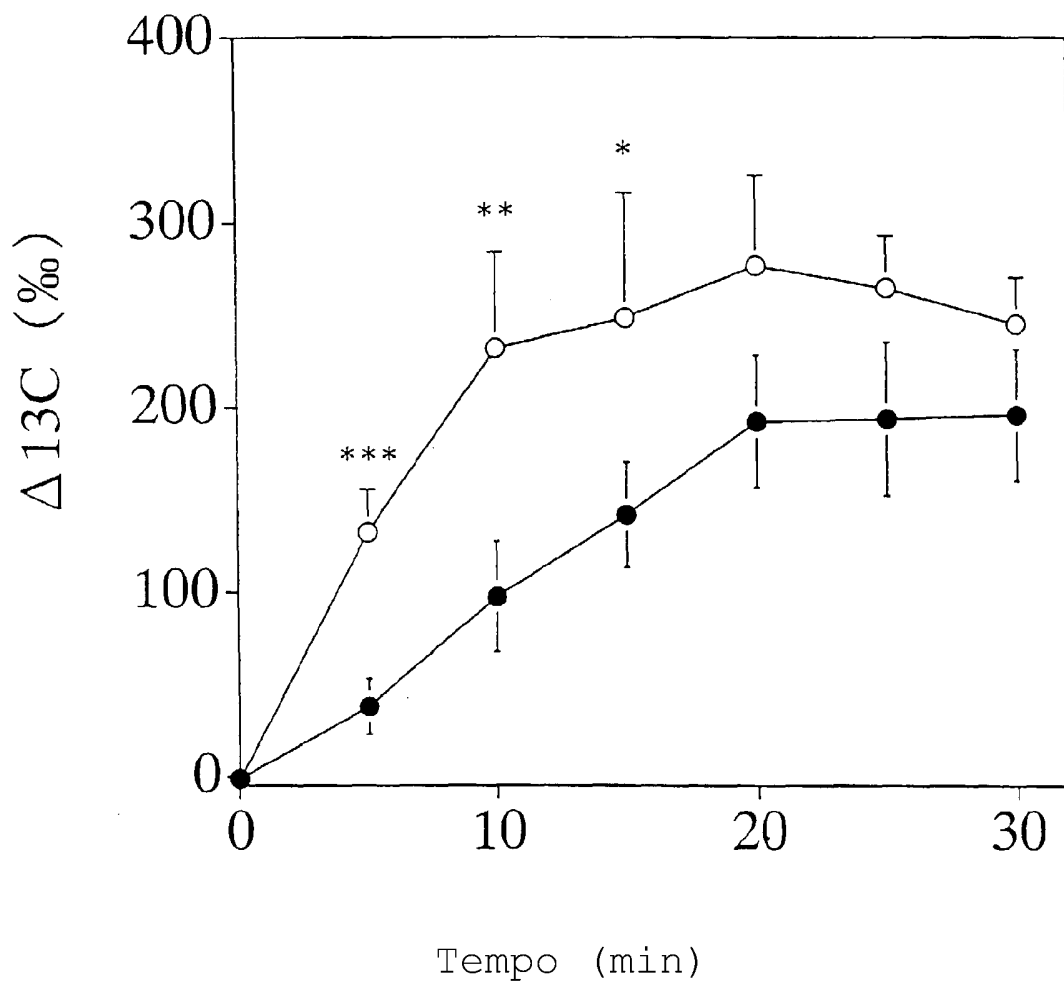


—●— RATOS COM PANCREATITE (n=3)

—○— RATOS DE CONTROLO (n=4)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$,

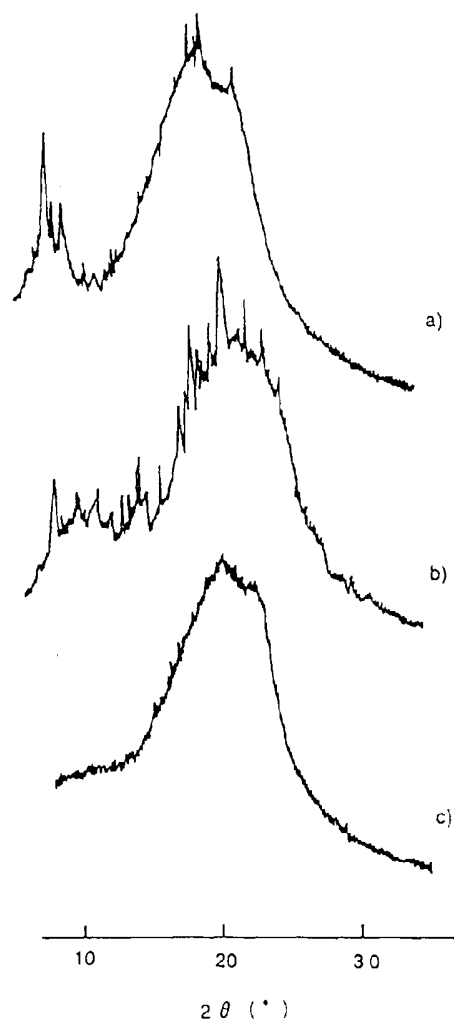
(ANOVA COM LSD DE FISCHER)



—●— RATOS COM PANCREATITE (n=4)
 —○— RATOS DE CONTROLO (n=4)

* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.005
 (ANOVA COM LSD DE FISCHER)

FIG.6



Espectros de difracção de raios X de pós do sistema
BPL/ γ -CD (1:4)

(a) BPL; (b) mistura física; (c) sistema em dispersão sólida
O espectro de difracção de γ -CD é o mesmo da Fig.

FIG.7

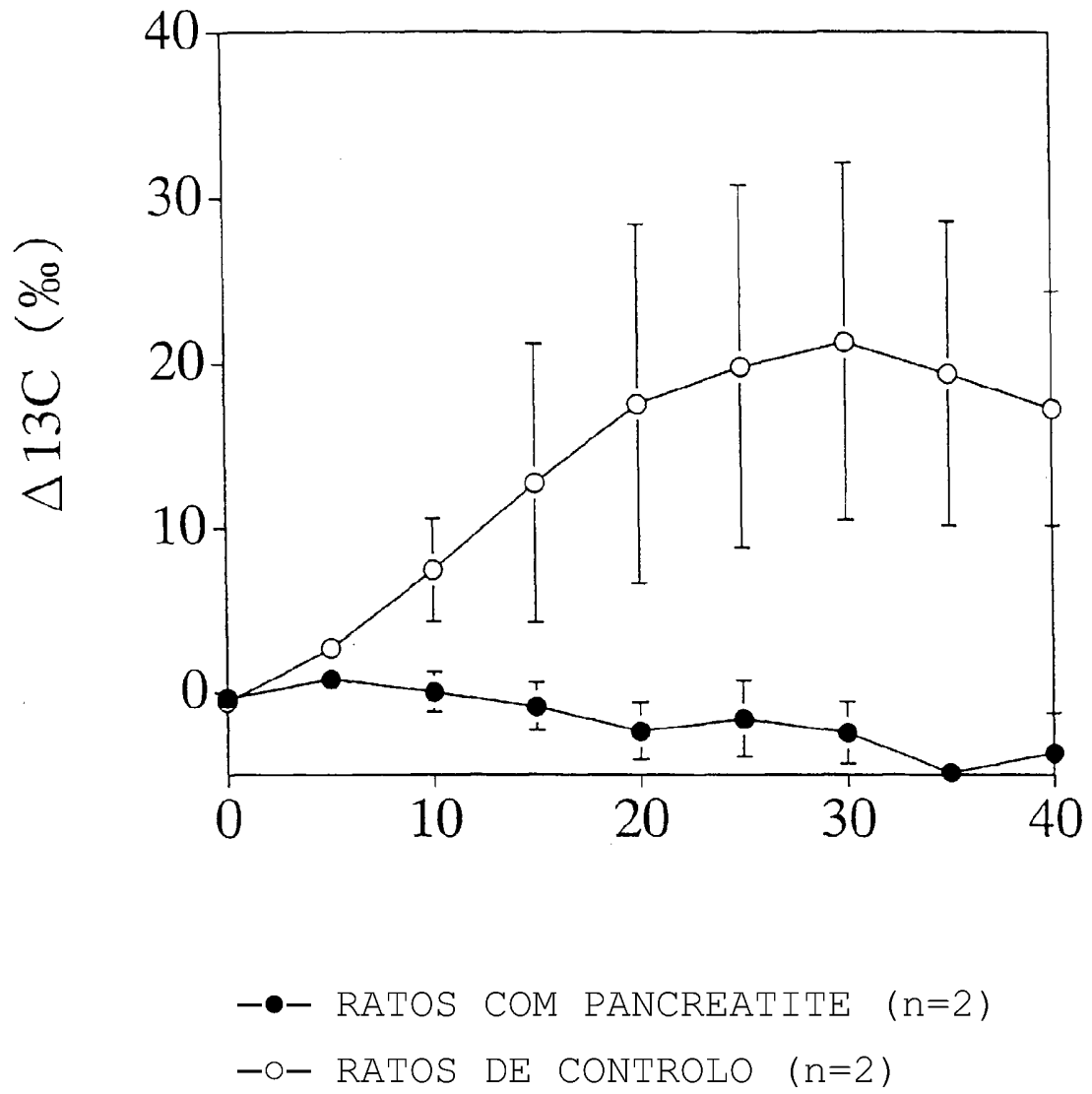
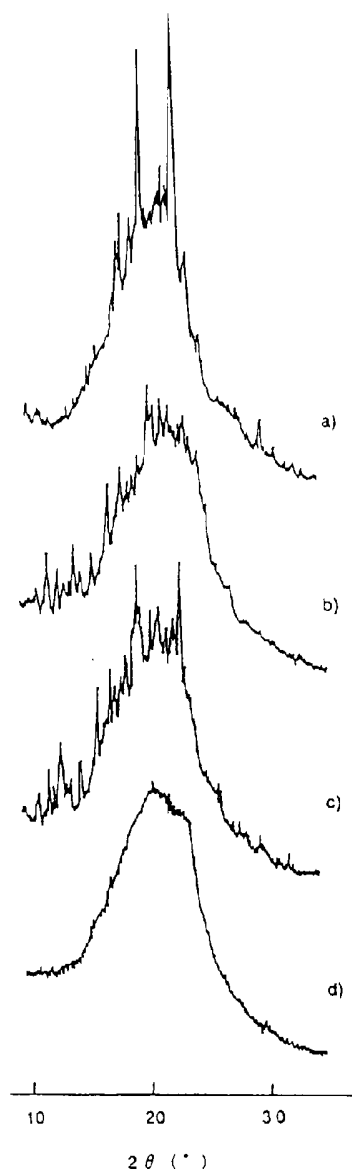


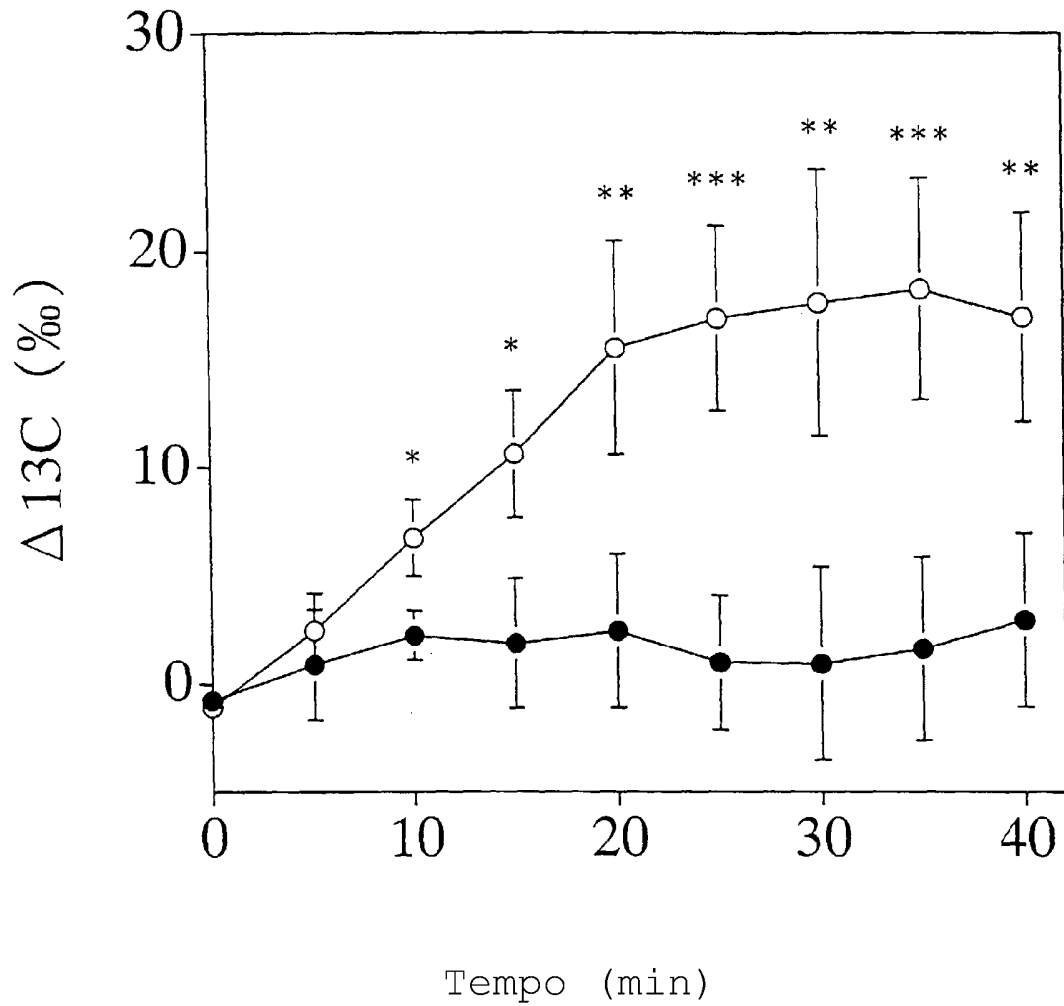
FIG.8



Espectros de difracção de raios X de pós do sistema
BPLM/ γ -CD (1:4)

(a) BPLM; (b) γ -CD; (c) mistura física; (d) sistema em dispersão sólida

FIG.9



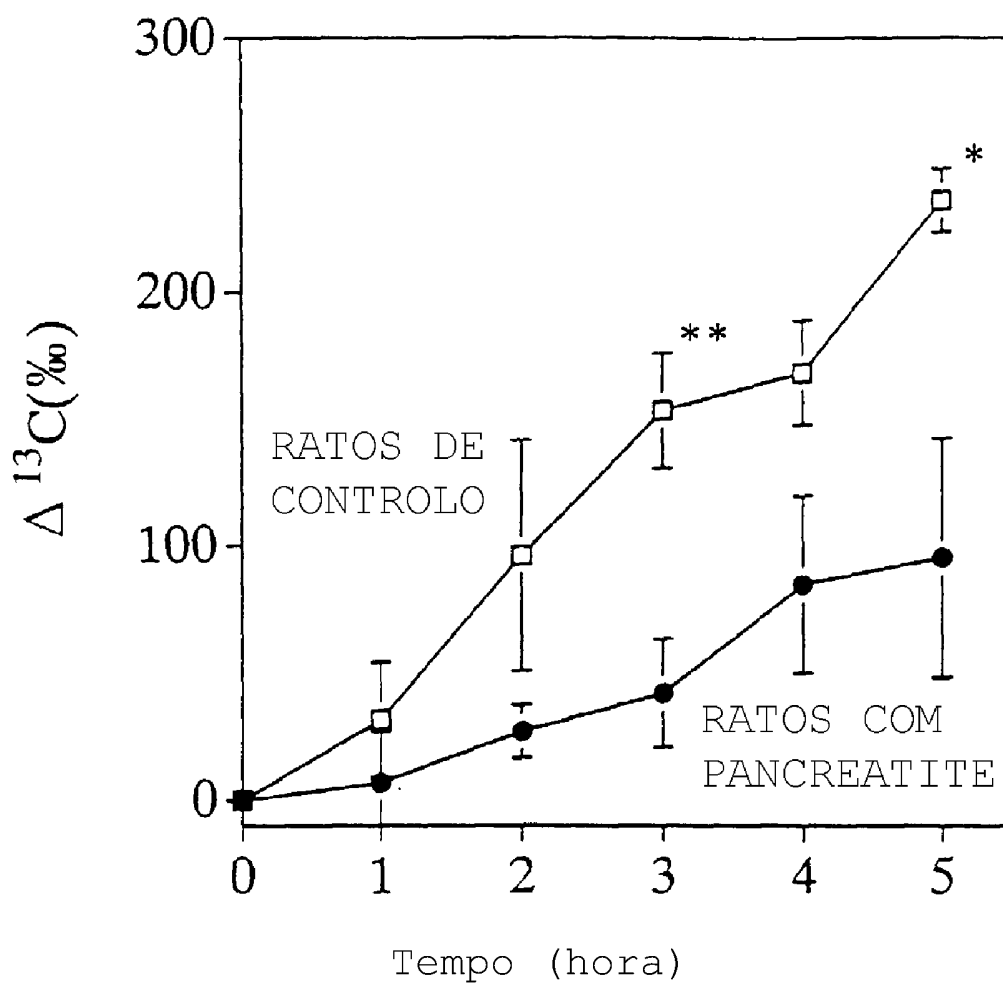
—●— RATOS COM PANCREATITE (n=4)

—○— RATOS DE CONTROLO (n=4)

* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.005

(ANOVA COM LSD DE FISCHER)

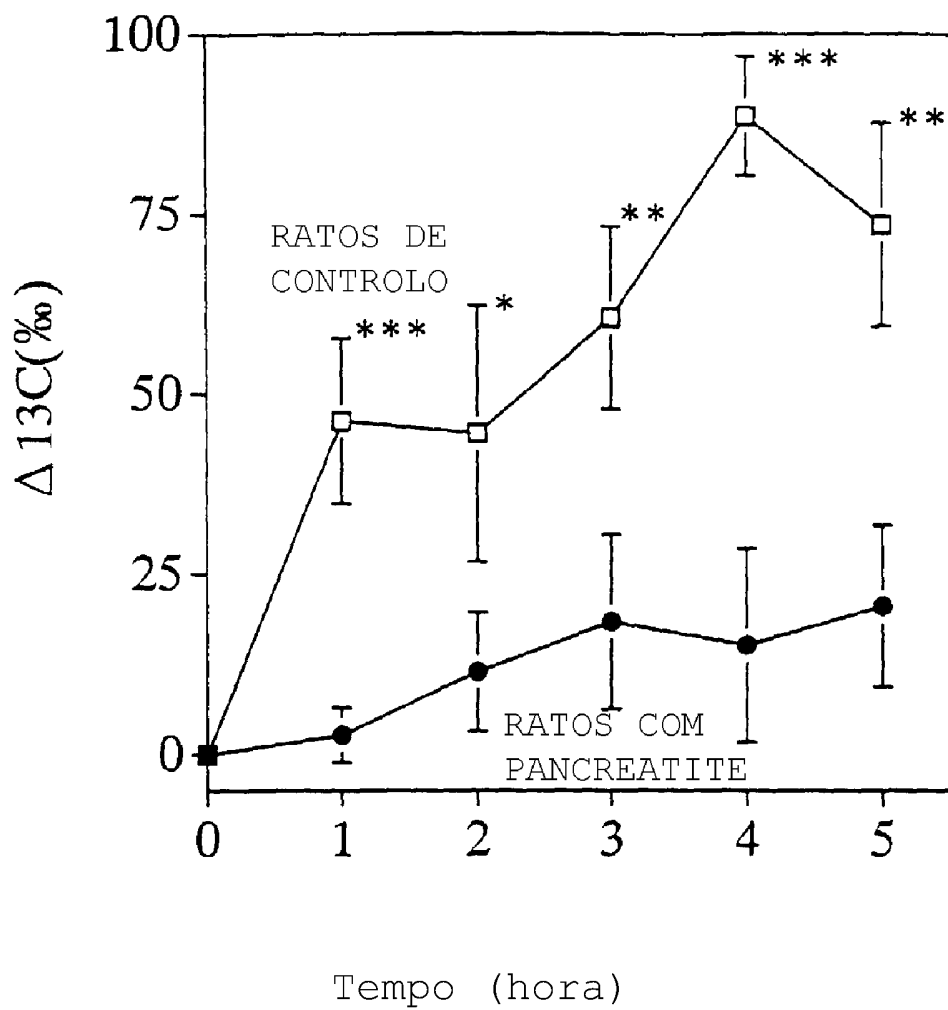
FIG.10



* P < 0.05 (ANOVA COM LSD DE FISHER)

** P < 0.01 (ANOVA COM LSD DE FISHER)

FIG 11



* P < 0.05 (ANOVA COM LSD DE FISHER)

** P < 0.01 (ANOVA COM LSD DE FISHER)

*** P < 0.001 (ANOVA COM LSD DE FISHER)