(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 27 089 T2** 2006.05.18

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 966 975 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 27 089.8**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 304 388.4**
(96) Europäischer Anmeldetag: **04.06.1999**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **29.12.1999**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **07.09.2005**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **18.05.2006**

(51) Int Cl.[8]: ***A61K 51/08*** (2006.01)
A61K 51/12 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

15785598	**05.06.1998**	**JP**
14949699	**28.05.1999**	**JP**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
DE, DK, ES, FR, GB, IE, IT, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Tokyo Gas Co. Ltd., Tokio/Tokyo, JP

(74) Vertreter:
Dr. Weber, Dipl.-Phys. Seiffert, Dr. Lieke, 65183 Wiesbaden

(72) Erfinder:
Kohno, Tadashi, Kanagawa 214-0011, JP; Hosoi, Isaburo, Saitama 340-0033, JP; Ohshima, Junko, Kanagawa 224-0006, JP; Shibata, Kunihiko, Chiba 274-0075, JP; Ito, Asuka, Kanagawa 222-0035, JP

(54) Bezeichnung: **Verwendung von 13C oder 14C-markierten Aminosäuren oder Peptiden als Diagnosemittel für die exokrin Pankreasfunktion**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

Gebiet der Erfindung:

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Diagnosemittel für die Pankreasexokrinfunktion und neuartige Verbindungen.

Hintergrund der Erfindung:

[0002] „Tests der Pankreasexokrinfunktion" sind nützlich für die Diagnose von Pankreaserkrankungen, wie etwa chronischer und akuter Pankreatitis und Pankreaskrebs. Sie sind außerdem nützlich für die Bestimmung des Zustands und der Prognose von Patienten und zur Kontrolle der medizinischen Verabreichung von Proteasepräparationen: Entsprechende allgemeine Beschreibungen finden sich in Arvanitakis und Cooke, Gastroenterology, 74:932 (1978); Niederau und Grendell, Gastroenterology, 88:1973 (1985); Goldberg, Bull. Mol. Biol. Med., 15:1 (1990); Lankisch, Int. J. Pancreatology, 14:9 (1993); Bank und Chow, Gastroenterologist, 2:224 (1994); und Steer et al., Eng. J. Med., 332:1482 (1995).

[0003] Die Tests der Pankreasexokrinfunktion werden grob in Intubationstests und „röhrchenfreie Tests" unterteilt. Die Intubationstests beinhalten das Einführen eines Röhrchens durch den Mund bis zum Zwölffingerdarm, um das Sekret des Zwölffingerdarms zu sammeln. Der Sekretintest wird üblicherweise so verwendet, dass Sekretin intravenös verabreicht wird, um die Abgabe von Pankreassekret vor dem Sammeln anzuregen. Dieses Verfahren ist hochgenau, da die Mengen und Komponenten des Pankreassekrets direkt analysiert werden, weshalb es der „Goldstandard" für die Tests der Pankreasexokrinfunktion ist. Aufgrund der sehr starken Belastung der Patienten kann dieses Verfahren jedoch nicht wiederholt oder für Screening-Tests verwendet werden. Es ist nur an einer relativ kleinen Anzahl medizinischer Zentren verfügbar, da der Arzt hierfür hochqualifiziert sein muss. Da dieses Verfahren die Platzierung eines fluoroskopischen Röhrchens während des Sammelns des Zwölffingerdarmsekrets erfordert, besteht das Problem der Belastung mit Röntgenstrahlen.

[0004] Auf der anderen Seite sind röhrchenfreie Tests zur Bestimmung der Pankreasexokrinfunktion, die keine Intubation erfordern, leicht durchzuführen; bei diesen wird die exkretierte Menge an Verbindungen, die durch exokrine Pankreasenzyme produziert werden oder die exkretierte Menge der exokrinen Pankreasenzyme selbst gemessen. Derzeit werden hauptsächlich die folgenden vier Verfahren verwendet:

1. Der PFD-Test, bei dem ein synthetisches Substrat für von der Pankreas sekretiertes Chymotrypsin, BT-PABA (N-Benzoyl-L-tyrosyl-p-aminobenzoesäure), oral verabreicht wird, und die Menge an PABA (p-Aminobenzoesäure), ein von Chymotrypsin erzeugtes Abbauprodukt, das in den Urin exkretiert wird, gemessen wird. Yamato C. et. al. „Hydrolysis and Metabolism of N-benzoyl-L-tyrosyl-p-aminobenzoic acid in normal and pancreatic ductligated animals", Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, (1978) 206/2 (468-474) beschreibt eine Studie über die Hydrolyse und den Metabolismus von N-Benzoyl-L-tyrosyl-p-aminobenzoesäure (Bz-ty-PABA).
2. Der PLT-Test, bei dem ein synthetisches Substrat für die von der Pankreas sekretierte Cholesterolesterhydrolase, eine Esterase, FDL (Fluoresceindilaurat), oral verabreicht wird und die Menge des Abbauprodukts Fluorescein, das in den Urin exkretiert wird, oder dessen Konzentration im Blut gemessen wird;
3. Der fäkale Chymotrypsintest, bei dem Chymotrypsin in den Fäzes quantitativ bestimmt wird; und
4. Der fäkale Elastasetest, bei dem Elastase in den Fäzes quantitativ bestimmt wird.

[0005] Jedoch ist die Empfindlichkeit aller dieser Tests zu gering, um geringfügige Abnahmen der Pankreasexokrinfunktion zu detektieren. Daher sind sie in jüngerer Zeit nicht so oft verwendet worden.

[0006] Um dieses Problem zu lösen, wurde zahlreich nach einfacheren Tests der Pankreasexokrinfunktion gesucht. Dabei sind auch ^{13}C-Atemtests angewendet worden, bei denen eine ^{13}C-markierte Verbindung verabreicht wird, und eine Zunahme der Konzentration an $^{13}CO_2$ in der ausgeatmeten Luft gemessen wird. Beispiele solcher ^{13}C-Atemtests sind unten dargestellt:

1. Der ^{13}C-Atemtest, bei dem ein ^{13}C-markiertes Lipid oder gemischtes Triglycerid, das ein Substrat für Lipase ist, verabreicht wird: Chen et al., J. Nuclear Med., 15:1125 (1974); Watkins et al., J. Lab. Clin. Med., 90:422 (1977); Ghoos 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); und Kalivianakis et al., Eur. J. Clin. Invest., 27:434 (1997);
2. Der ^{13}C-Atemtest, bei dem ein ^{13}C-markierter Cholesterolester, der ein Substrat für Cholesterolesterase, eine Lipase, darstellt, verabreicht wird: Mundlos et al., Pediatric Res., 22:257 (1987); Cole et al., Gastroenterology, 93:1372 (1987); und Mundlos et al., Gut, 31:1324 (1990). Die US 4,676,974 (Hofmann et al.) lehrt die Bestimmung der Pankreasexokrinfunktion durch ein Atemtestverfahren, bei dem ein radioaktiv markierter Ester, wie etwa Cholesteroloctanoat in den Körper aufgenommen und durch Pankreasenzyme hydrolysiert und zu markiertem CO_2 oxidiert wird, das in den Atem abgegeben wird.
3. Der ^{13}C-Atemtest, bei dem eine ^{13}C-markierte Stärke, die ein Substrat für eine Amylase darstellt, verabreicht wird: Hiele et al., Gastroenterology, 96:503 (1989); Dewit et al., Pediatric Res., 32:45 (1992); und Z. Gastroenterol., 35: 187 (1997); und
4. Der ^{13}C-Atemtest, bei dem ein ^{13}C-angereichertes Eiprotein, das ein Protein ist, bei dem die ^{13}C-Konzentration, ausgehend von einem natürlichen Anteil von 1,1 Atm-%, durch Füttern eines Huhns mit ^{13}C-Leucin auf 1,4 Atm-% erhöht wird, und das ein Substrat für eine Protease ist, verabreicht wird: Y. Ghoos, $^{13}CO_2$-Breath Tests at the laboratory „Digestion-Absorption", University Hospital Gasthuisberg, Leuven, Belgien (1996).

[0007] Jedoch sind alle diese Verfahren weniger empfindlich als die konventionellen Verfahren und zeitaufwändig. Daher haben sich diese Verfahren in klinischen Gebieten nicht etabliert.

[0008] Es ist somit erstrebenswert, dass ein hochempfindlicher Test der Pankreasexokrinfunktion entwickelt wird, der dem Patienten wenig Stress bereitet und rasch genaue Resultate erbringt.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0009] Dementsprechend ist es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Diagnosemittel für die Pankreasexokrinfunktion bereitzustellen, das zu einem hochempfindlichen Test der Pankreasexokrinfunktion führt, dem Patienten wenig Stress bereitet und rasch genaue Ergebnisse liefert.

[0010] Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine neue Verbindung für den Test der Pankreasexokrinfunktion bereitzustellen.

[0011] Die vorliegenden Erfinder haben herausgefunden, dass die Pankreasexokrinfunktion mit hoher Empfindlichkeit ermittelt werden kann, indem man eine ^{13}C-markierte Peptidverbindung an eine normale Ratte und an eine Ratte mit chronischer Pankreatitis oral verabreicht und die Konzentration an $^{13}CO_2$ im ausgeatmeten CO_2 nach der Verabreichung misst. Somit war die vorliegende Erfindung vollständig.

[0012] In einem ersten Aspekt stellt die vorliegende Erfindung die Verwendung einer Aminosäure oder eines Peptids, die/das wenigstens ein ^{13}C- oder ^{14}C-Atom enthält, oder eines pharmazeutisch verträglichen Salzes davon, welches nicht Bz-Tyr-^{13}C-PABA ist, bei der Herstellung eines Diagnosemittels für die Pankreasexokrinfunktion bereit, wobei das Diagnosemittel in einem Atemtest verwendet wird.

[0013] In einem bevorzugten Aspekt enthält das Aminosäuremolekül ein ^{13}C- oder ^{14}C-Atom.

[0014] In einem bevorzugten Aspekt weist die Aminosäure oder das Peptid eine modifizierende oder schützende Gruppe auf, und die modifizierende oder schützende Gruppe enthält ein ^{13}C- oder ^{14}C-Atom.

[0015] In einem bevorzugten Aspekt wird die Aminosäure oder das Peptid durch die folgende Formel (I) wiedergegeben:

$$X_1\text{-}R_1\text{-}Y_1 \qquad (I),$$

worin X_1 ein Wasserstoffatom oder eine Schutzgruppe ist,
R_1 ein Peptid mit 2 bis 50 Aminosäuren, eine Aminosäure oder eine Einfachbindung ist, und
Y_1 eine Aminosäure ist, die optional eine Schutzgruppe aufweist.

[0016] Vorzugsweise ist wenigstens eine der Aminosäuren in R_1 und Y_1 oder wenigstens eine Estergruppe in Y_1, wenn die Aminosäure in Y_1 mit der Estergruppe geschützt ist, mit ^{13}C oder ^{14}C markiert.

[0017] In einem bevorzugten Aspekt kann die Aminosäure oder das Peptid oder das pharmazeutisch verträg-

liche Salz davon als ein Substrat für eine Protease oder für Proteasen fungieren, so dass sie/es anschließend unter Erzeugung von $^{13}CO_2$ oder $^{14}CO_2$ decarboxyliert werden kann. Bevorzugt sind die Protease oder die Proteasen Pankreasexokrinproteasen. Bevorzugt ist/sind die Pankreasexokrinprotease oder die -proteasen aus der Gruppe ausgewählt, bestehend aus Chymotrypsin, Trypsin, Elastase und Carboxypeptidasen.

[0018] In einem zweiten Aspekt stellt die vorliegende Erfindung eine mit ^{13}C oder ^{14}C markierte Verbindung oder ein Salz davon für die Verwendung in der Diagnose bereit, wobei die mit ^{13}C oder ^{14}C markierte Verbindung durch die folgende Formel (II) wiedergegeben wird:

$$X_2\text{-}R_2\text{-}Y_2\text{-}Z_1 \qquad \text{(II)},$$

worin X_2 ein Wasserstoffatom oder eine Schutzgruppe ist,
R_2 ein Peptid mit 2 bis 5 Aminosäuren, eine Aminosäure oder eine Einfachbindung ist,
Y_2 eine Aminosäure ist,
Z_1 eine Aminosäure ist, die optional eine Schutzgruppe aufweist, und wobei wenigstens eine der Aminosäuren in R_2, Y_2 und Z_1 oder wenigstens eine der Schutzgruppen in X_2 und Z_1, wenn die Schutzgruppen ein Kohlenstoffatom enthalten, mit ^{13}C oder ^{14}C markiert ist,
und worin

1) in dem Fall, dass X_2 eine Schutzgruppe und R_2 eine Einfachbindung ist,
1-i) Y_2 eine andere Aminosäure als D-Ala ist, wenn Z_1 D-Ala ist,
1-ii) Y_2 eine andere Aminosäure als Leu ist, wenn Z_1 Ala-OMe ist,
1-iii) Y_2 eine andere Aminosäure als Gly ist, wenn Z_1 Pro-OMe ist,
2) in dem Fall, dass X_2 eine Schutzgruppe und R_2 eine Aminosäure ist,
2-i) Y_2 eine andere Aminosäure als Val ist, wenn Z_1 D-Ala ist,
2-ii) Y_2 eine andere Aminosäure als Leu ist, wenn Z_1 Ala ist,
2-iii) Y_2 eine andere Aminosäure als Pro ist, wenn Z_1 Gly-OEt ist,
3) in dem Fall, dass X_2 eine Schutzgruppe, R_2 ein Peptid mit zwei Aminosäuren und Z_1 Gln, welches optional SEt aufweist, ist, Y_2 eine andere Aminosäure als Ala ist,
4) in dem Fall, dass X_2 ein Wasserstoffatom und R_2 eine Einfachbindung ist,
4-i) Y_2 eine andere Aminosäure als Ala ist, wenn Z_1 Pro ist,
4-ii) Y_2 eine andere Aminosäure als Gly, Val, Leu und Tyr ist, wenn Z_1 Leu ist,
4-iii) Y_2 eine andere Aminosäure als Gly ist, wenn Z_1 Phe ist,
4-iv) Y_2 eine andere Aminosäure als Gly ist, wenn Z_1 Gly-OEt ist,
4-v) Y_2 eine andere Aminosäure als Leu ist, wenn Z_1 Ala-OMe ist,
5) in dem Fall, dass X_2 ein Wasserstoffatom und R_2 eine Aminosäure ist,
5-i) Y_2 eine andere Aminosäure als Pro ist, wenn Z_1 Leu ist,
5-ii) Y_2 eine andere Aminosäure als Pro ist, wenn Z_1 Phe ist,
5-iii) Y_2 eine andere Aminosäure als Gly ist, wenn Z_1 Gly ist,
5-iv) Y_2 eine andere Aminosäure als Leu ist, wenn Z_1 Pro ist,
5-v) Y_2 eine andere Aminosäure als Asp ist, wenn Z_1 Met ist,
5-vi) Y_2 eine andere Aminosäure als Leu ist, wenn Z_1 Asn-Bzl ist,
6) in dem Fall, dass X_2 ein Wasserstoffatom und R_2 ein Peptid aus 2 Aminosäuren ist,
6-i) Y_2 eine andere Aminosäure als Leu ist, wenn Z_1 Leu ist,
6-ii) Y_2 eine andere Aminosäure als Asp ist, wenn Z_1 Ser ist, und
7) in dem Fall, dass X_2 ein Wasserstoffatom und R_2 ein Peptid aus 3 Aminosäuren ist,
7-i) Y_2 eine andere Aminosäure als Phe ist, wenn Z_1 Leu ist,
7-ii) Y_2 eine andere Aminosäure als Phe ist, wenn Z_1 Met ist,

unter der Bedingung, dass die folgenden Verbindungen ausgeschlossen sind:
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 und Tyr-Gly-Gly-Phe-Met, worin Ac Acetyl ist, Et Ethyl ist, Me Methyl ist, Boc t-Butyloxycarbonyl ist, Dansyl Dansyl ist, Cbz Carbobenzyloxy ist, Bzl Benzoyl ist, Z Benzyloxycarbonyl ist, SEt Ethanthiol ist und NMe_2 Dimethylamino ist.

[0019] Ein bevorzugter Aspekt betrifft die mit ^{13}C oder ^{14}C markierte Verbindung oder ein Salz davon für die Verwendung gemäß dem zweiten Aspekt der vorliegenden Erfindung, wobei

1) in dem Fall, dass X_2 eine Schutzgruppe ist, die aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus Dansyl,

Cbz, Ac und Z, und R_2 eine Aminosäure oder ein Peptid mit 2 Aminosäuren ist,
1-i) Y_2 eine andere Aminosäure als Val ist, wenn Z_1 D-Ala ist,
1-ii) Y_2 eine andere Aminosäure als Leu ist, wenn Z_1 Ala ist,
1-iii) Y_2 eine andere Aminosäure als Pro ist, wenn Z_1 Gly-OEt ist,
1-iv) Y_2 eine andere Aminosäure als Ala ist, wenn Z_1 Gln(NMe_2) oder Gln(NMe_2)-SEt ist,
2) in dem Fall, dass X_2 Ac oder Boc und R_2 eine Einfachbindung ist,
2-i) Y_2 eine andere Aminosäure als D-Ala ist, wenn Z_1 D-Ala ist,
2-ii) Y_2 eine andere Aminosäure als Gly ist, wenn Z_1 Pro-OMe ist,
2-iii) Y_2 eine andere Aminosäure als Leu ist, wenn Z_1 Ala-OMe ist,
3) in dem Fall, dass X_2 ein Wasserstoffatom und R_2 eine Aminosäure oder ein Peptid aus 2 oder 3 Aminosäuren ist,
3-i) Y_2 eine andere Aminosäure als Pro, Leu und Phe ist, wenn Z_1 Leu ist,
3-ii) Y_2 eine andere Aminosäure als Pro ist, wenn Z_1 Phe ist,
3-iii) Y_2 eine andere Aminosäure als Gly ist, wenn Z_1 Gly ist,
3-iv) Y_2 eine andere Aminosäure als Leu ist, wenn Z_1 Pro ist,
3-v) Y_2 eine andere Aminosäure als Asp und Phe ist, wenn Z_1 Met ist,
3-vi) Y_2 eine andere Aminosäure als Leu ist, wenn Z_1 Asn-Bzl ist,
3-vii) Y_2 eine andere Aminosäure als Asp ist, wenn Z_1 Ser ist,
4) in dem Fall, dass X_2 ein Wasserstoffatom und R_2 eine Einfachbindung ist,
4-i) Y_2 eine andere Aminosäure als Ala ist, wenn Z_1 Pro ist,
4-ii) Y_2 eine andere Aminosäure als Gly, Val, Leu und Tyr ist, wenn Z_1 Leu ist,
4-iii) Y_2 eine andere Aminosäure als Gly ist, wenn Z_1 Phe ist,
4-iv) Y_2 eine andere Aminosäure als Gly ist, wenn Z_1 Gly-OEt ist,
4-v) Y_2 eine andere Aminosäure als Leu ist, wenn Z_1 Ala-OMe ist.

[0020] In einem bevorzugten Aspekt der mit ^{13}C oder ^{14}C markierten Verbindung oder einem Salz davon für die Verwendung gemäß dem zweiten Aspekt der vorliegenden Erfindung ist X_2 aus der Gruppe ausgewählt, bestehend aus Ac, Bz (Benzoyl), Boc, Z und einem Wasserstoffatom.

[0021] In einem bevorzugten Aspekt kann die mit ^{13}C oder ^{14}C markierte Verbindung oder ein Salz davon für die Verwendung gemäß dem zweiten Aspekt der vorliegenden Erfindung als Substrat für eine Protease oder für Proteasen fungieren, so dass sie/es anschließend unter Erzeugung von $^{13}CO_2$ oder $^{14}CO_2$ decarboxyliert werden kann. Bevorzugt ist/sind die Protease oder die Proteasen Pankreasexokrinproteasen. Bevorzugt ist/sind die Pankreasexokrinprotease oder die -proteasen aus der Gruppe ausgewählt, bestehend aus Chymotrypsin, Trypsin, Elastase und Carboxypeptidasen.

[0022] In einem bevorzugten Aspekt der mit ^{13}C oder ^{14}C markierten Verbindung oder einem Salz davon für die Verwendung gemäß dem zweiten Aspekt der vorliegenden Erfindung ist X_2 eine Schutzgruppe und R_2 ist eine Einfachbindung.

[0023] In einem bevorzugten Aspekt der mit ^{13}C oder ^{14}C markierten Verbindung oder einem Salz davon für die Verwendung gemäß dem zweiten Aspekt der vorliegenden Erfindung ist
(1) wenigstens eine der Aminosäuren in Y_2 und Z_1 Arg oder Lys,
(2) wenigstens eine der Aminosäuren in Y_2 und Z_1 eine aromatische Aminosäure, Leu, His oder Met,
(3) wenigstens eine der Aminosäuren in Y_2 und Z_1 eine neutrale und nicht-aromatische Aminosäure,
(4) die Aminosäure in Z_1 eine andere Aminosäure als Arg, Lys und Pro oder
(5) die Aminosäure in Z_1 Arg oder Lys.

[0024] In einem bevorzugten Aspekt der mit ^{13}C oder ^{14}C markierten Verbindung oder einem Salz davon für die Verwendung gemäß dem zweiten Aspekt der vorliegenden Erfindung ist X_2 aus der Gruppe ausgewählt, bestehend aus einem Wasserstoffatom, Bz, Ac und Boc, ist Y_2 aus der Gruppe ausgewählt, bestehend aus Phe, Ala, Gly, Tyr und Arg, ist Z_1 aus der Gruppe ausgewählt, bestehend aus Leu, welches optional eine Schutzgruppe aufweist, Ala, welches optional eine Schutzgruppe aufweist, und Gly, welches optional eine Schutzgruppe aufweist. Bevorzugt ist Z_1 aus der Gruppe ausgewählt, bestehend aus Leu, Ala, Gly, Leu-OMe, Leu-OEt, Ala-OMe, Ala-OEt, Gly-OMe und Gly-OEt.

[0025] In einem bevorzugten Aspekt der mit ^{13}C oder ^{14}C markierten Verbindung oder einem Salz davon für die Verwendung gemäß dem zweiten Aspekt der vorliegenden Erfindung ist Z_1 eine mit ^{13}C oder ^{14}C markierte Aminosäure, die optional eine Schutzgruppe aufweist.

[0026] In einem bevorzugten Aspekt ist die mit ^{13}C oder ^{14}C markierte Verbindung oder das Salz davon für die Verwendung gemäß dem zweiten Aspekt der vorliegenden Erfindung aus der Gruppe ausgewählt, die aus den folgenden Verbindungen besteht:

(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,
(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 und
(v) Bz-Ala-Ala-Ala-Ala-^{13}C-Gly-Phe-Leu.

[0027] In einem dritten Aspekt stellt die vorliegende Erfindung die Verwendung einer mit ^{13}C oder ^{14}C markierten Verbindung gemäß der Definition im zweiten Aspekt der Erfindung oder eines pharmazeutisch verträglichen Salzes davon bei der Herstellung eines Diagnosemittels für die Pankreasexokrinfunktion bereit, wobei das Diagnosemittel in einem Atemtest verwendet wird.

[0028] In einem vierten Aspekt stellt die vorliegende Erfindung die Verwendung einer mit ^{13}C oder ^{14}C markierten Verbindung gemäß der Definition im zweiten Aspekt der Erfindung oder eines pharmazeutisch verträglichen Salzes davon bei der Herstellung eines Diagnosemittels für chronische Pankreatitis oder akute Pankreatitis bereit.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0029] Fig. 1 zeigt den Gehalt von Chymotrypsinogen und Amylase in der Pankreas einer Gruppe mit Ölsäure-Injektion und bei einer Kontrollgruppe. Bei der Gruppe mit Ölsäure-Injektion (•) wurden 50µl Ölsäure in den Ductus pancreticus von 17 5-Wochen-alten, männlichen Wistar-Ratten (n=17) injiziert. Bei der Kontrollgruppe (o) wurde nur eine Laparotomie durchgeführt (n = 11). Nach der Behandlung wurden die Ratten beider Gruppen für 3 Wochen gehalten. Dann wurde die Pankreas entnommen, und die Gehalte an Chymotrypsinogen und Amylase wurden bestimmt.

[0030] Fig. 2 zeigt den Zeitverlauf des Ausmaßes des Anstiegs der ^{13}C-Konzentration im ausgeatmeten $^{13}CO_2$ ($\Delta^{13}C(‰)$) nach der Verabreichung von Bz-DL-Phe-(^{13}C-Leu)-Na. Bei 0 Minuten wurde Bz-DL-Phe-(^{13}C-Leu)-Na (250 mg/kg) an Ratten mit chronischer Pankreatitis (gepunktete Linie, n = 8) und an Kontrollratten (durchgezogene Linie, n = 4) oral verabreicht.

[0031] Fig. 3 zeigt die Verteilung der Werte für die Ratten mit chronischer Pankreatitis (•, n = 8) und normale Ratten (o, n = 4) bei den PFD- und Bz-DL-Phe-(^{13}C-Leu) (^{13}C-BPL)-Atemtests. Jede Ratte wurde vor dem Bz-DL-Phe-(^{13}C-Leu)-Atemtest dem PFD-Test unterzogen. Die Empfindlichkeit (Verhältnis der wahren Test-Positiven zur Gesamtzahl der wahren Positiven) ist unterhalb für jede Verteilungsauftragung angezeigt, wenn der Ausschlusswert (Balken) so angesetzt wird, dass die Spezifität (Verhältnis der wahren Testnegativen zur Gesamtzahl der wahren Negativen) 100% beträgt.

[0032] Fig. 4 zeigt die Verteilung der Werte für Ratten mit chronischer Pankreatitis (•, n = 8) und normale Ratten (o, n = 7) bei den PFD- und Bz-Ala-(^{13}C-Ala) (^{13}C-BAA)-Atemtests. Jede Ratte wurde vor dem Bz-Ala-(^{13}C-Ala)-Atemtest dem PFD-Test unterzogen. Die Empfindlichkeit (Verhältnis der wahren Test-Positiven zur Gesamtzahl der wahren Positiven) ist unterhalb für jede Verteilungsauftragung angezeigt, wenn der

Ausschlusswert (Balken) so angesetzt wird, dass die Spezifität (Verhältnis der wahren Testnegativen zur Gesamtzahl der wahren Negativen) 100% beträgt.

[0033] Fig. 5 zeigt die Verteilung der Werte für Ratten mit chronischer Pankreatitis (•, n = 10) und normale Ratten (o, n = 10) bei den PFD- und Bz-Gly-(^{13}C-Leu) (^{13}C-BGL)-Atemtests. Jede Ratte wurde vor dem Bz-Gly-(^{13}C-Leu)-Atemtest dem PFD-Test unterzogen. Die Empfindlichkeit (Verhältnis der wahren Test-Positiven zur Gesamtzahl der wahren Positiven) ist unterhalb für jede Verteilungsauftragung angezeigt, wenn der Ausschlusswert (Balken) so angesetzt wird, dass die Spezifität (Verhältnis der wahren Testnegativen zur Gesamtzahl der wahren Negativen) 100% beträgt.

BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0034] Im Folgenden wird die vorliegende Erfindung im Detail beschrieben.

[0035] Peptide sind hierin in einer solchen Weise angegeben, dass die N-Termini zu Linken und die C-Termini zur Rechten sind.

[0036] Aminosäurereste sind mit den Dreibuchstabenkürzeln angegeben. Solange nicht anders angegeben, sind die Aminosäuren L-Isomere.

[0037] Die „Aminosäure" bezieht sich hierin auf jedwede Verbindung, die Carboxyl- und Aminogruppen im Molekül aufweist und beinhaltet auch Iminosäuren, wie etwa Prolin und Hydroxyprolin, sowie Verbindungen mit einer Lactamstruktur im Molekül.

[0038] Das „Peptid" bezieht sich hierin auf jedwede Verbindung, die dadurch gebildet wird, dass wenigstens zwei Aminosäuren über eine Peptidbindung miteinander verbunden werden und beinhaltet homomere Peptide, die aus Aminosäuren bestehen, heteromere Peptide, die (einen) Nicht-Aminosäurebestandteil(e) enthalten, sowie deren Derivate. Das Peptid besitzt 100 Aminosäurereste oder weniger.

[0039] Die „Aminosäure oder das Peptid mit wenigstens einem ^{13}C- oder ^{14}C-Atom" bezieht sich hierin auf jedwede Aminosäure oder jedwedes Peptid, bei der/dem wenigstens ein Kohlenstoffatom, das in der Aminosäure, den Aminosäureresten des Peptids, einer modifizierenden Gruppe oder einer Schutzgruppe hiervon vorkommt, durch ein ^{13}C- oder ^{14}C-Atom ersetzt ist, was gegenüber den in der Natur zu findenden Molekülen zu einer Anreicherung der ^{13}C- oder ^{14}C-Atome in dem Aminosäure- oder Peptid-Molekül führt.

[0040] Das Diagnosemittel für die Pankreasexokrinfunktion gemäß der vorliegenden Erfindung umfasst eine Aminosäure oder ein Peptid, die/das wenigstens ein ^{13}C- oder ^{14}C-Atom enthält, oder ein pharmazeutisch verträgliches Salz hiervon, das nicht Bz-Tyr-^{13}C-PABA ist. Das Aminosäuremolekül kann ein ^{13}C- oder ^{14}C-Atom enthalten. Alternativ, wenn die Aminosäure oder das Peptid eine modifizierende Gruppe oder eine Schutzgruppe aufweisen, kann die modifizierende Gruppe oder die Schutzgruppe ein ^{13}C- oder ^{14}C-Atom enthalten.

[0041] Beispielsweise kann die Aminosäure oder das Peptid durch die folgende Formel (I) dargestellt sein:

$$X_1\text{-}R_1\text{-}Y_1 \qquad (I)$$

worin X_1 ein Wasserstoffatom oder eine Schutzgruppe ist,
R_1 ein Peptid mit 2 bis 50 Aminosäuren, eine Aminosäure oder eine Einfachbindung ist, und
Y_1 eine Aminosäure, die optional eine Schutzgruppe aufweist, ist.

[0042] In der Formel (I) ist X_1 ein Wasserstoffatom oder eine Schutzgruppe. Die „Schutzgruppe" beinhaltet alle Schutzgruppen, die auf dem Gebiet der organischen Chemie allgemein verwendet werden, z.B. diejenigen, die beschrieben sind in: "Textbook for Biochemical Experiments 1 – Protein Chemistry IV", herausgegeben von der Japan Biochemical Society, veröffentlicht durch Tokyo Kagaku Dojin (1977); "Textbook for Experimental Chemistry 22 – Organic Synthesis IV", herausgegeben von der Japan Chemical Society, veröffentlicht durch Maruzen (1992); "Bases and Experiments of Peptide Synthesis", Nobuo Izumiya, Tetsuo Kato, Tohiko Aoyagi und Michinori Waki, veröffentlicht durch Maruzen (1985); "Modification of Proteins", herausgegeben von Robert E. Feeney, John R. Whitaker, The American Chemical Society (1982); M. Bodanszky, "Principles of Peptides Synthesis", Springer-Verlag, Berlin (1984); und E. Schroder, K. Lubke, The Peptides", Academic Press, N.Y. Band 1 (1965), Band 2 (1966). Konkret beinhalten Beispiele hierfür Benzoyl, Acetyl, Benzyloxycarbonyl, substituiertes Benzyloxycarbonyl (wie etwa p-Nitrobenzyloxycarbonyl, p-Methoxybenzyloxycarbonyl,

etc.), t-Butyloxycarbonyl, 9-Fluorenylmethoxycarbonyl, p-Toluolsulfonyl, Phthalyl, Formyl, Trifluoracetyl, Triphenylmethyl, Cyclohexyloxycarbonyl, o-Nitrophenylsulfenyl, t-Acyloxycarbonyl, Isobornyloxycarbonyl, Diphenylphosphinyl, Diphenylphosphinothioyl, Benzyl, Alkyl, Allylthiocarbonyl, o-Nitrophenoxyacetyl, Chloracetyl, Benzolsulfonyl, Dibenzylphosphoryl, Trialkylsilyl, Allyliden, und Acetoacetylgruppen.

[0043] R_1 ist ein Peptid mit 2 bis 50 Aminosäuren, eine Aminosäure oder eine Einfachbindung. Die Aminosäuren beinhalten Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, Asparaginsäure, Asparagin, Glutaminsäure, Glutamin, Arginin, Lysin, Histidin, Prolin und Ornithin.

[0044] Y_1 ist eine Aminosäure, die optional eine Schutzgruppe aufweist. Die Schutzgruppe beinhaltet jedwede Schutzgruppe, die auf dem Gebiet der organischen Chemie allgemein verwendet wird, z.B. diejenigen, die beschrieben sind in: "Textbook for Biochemical Experiments 1 – Protein Chemistry IV", herausgegeben von der Japan Biochemical Society, veröffentlicht durch Tokyo Kagaku Dojin (1977); "Textbook for Experimental Chemistry 22 – Organic Synthesis IV", herausgegeben von der Japan Chemical Society, veröffentlicht durch Maruzen (1992); "Bases and Experiments of Peptide Synthesis", Nobuo Izumiya, Tetsuo Kato, Tohiko Aoyagi und Michinori Waki, veröffentlicht durch Maruzen (1985); "Modification of Proteins", herausgegeben von Robert E. Feeney, John R. Whitaker, The American Chemical Society (1982); M. Bodanszky, "Principles of Peptides Synthesis", Springer-Verlag, Berlin (1984); und E. Schroder, K. Lubke, The Peptides", Academic Press, N.Y. Band 1 (1965), Band 2 (1966). Konkret beinhalten Beispiele hierfür Methylester-, Ethylester-, Benzylester-, t-Butylester- und p-Nitrobenzylester-Gruppen und N'-substituierte Hydrazidgruppen für den Schutz von Carboxylgruppen; Benzyloxycarbonyl-, p-Toluolsulfonyl- und 2-Chlorbenzyloxycarbonyl-Gruppen für den Schutz der ω-Aminogruppe in Lysin- und Ornithinresten; Nitro-, Methoxybenzyloxycarbonyl- und p-Toluolsulfonyl-Gruppen für den Schutz der Guanidinogruppe in Argininresten; Benzyl- und t-Butylgruppen für den Schutz der Hydroxylgruppe in Hydroxylgruppen-enthaltenden Aminosäureresten, wie etwa Serin- und Tyrosinresten; Benzyloxycarbonyl- und Benzyloxymethyl-Gruppen für den Schutz der Imidazolgruppe in Histidinresten; Benzyl- und Tritylgruppen für den Schutz der Mercaptogruppe in Cysteinresten; Sulfoxidgruppen für den Schutz der Thioethergruppe in Methioninresten; und Formylgruppen für den Schutz der Indolgruppe in Tryptophanresten. Die Aminosäuren beinhalten Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, Asparaginsäure, Asparagin, Glutaminsäure, Glutamin, Arginin, Lysin, Histidin, Prolin und Ornithin.

[0045] Die von R_1 und Y_1 repräsentierten Aminosäuren und die von R_1 repräsentierten Peptide können in vielfältiger Weise modifiziert werden. Derartige Modifikationen beinhalten die Guanidylierung, Succinylierung und Acetylierung von Aminogruppen, die Modifikation der Guanidinogruppe in Arginin mit einer Dicarbonylverbindung, die Veresterung von Carboxylgruppen, die Sulfenylsulfonierung und Alkylierung der Thiolgruppe in Cystein, die Ethoxycarbonylierung der Imidazolgruppe in Histidin, die Bildung von Sulfoniumsalzen von Methionin, die Acetylierung von Serin und Threonin, die Nitrierung und Iodierung von Tyrosin, und die Nitrophenylsulfonylierung von Tryptophan.

[0046] Wenigstens eine der Aminosäuren in R_1 oder wenigstens eine Estergruppe in Y_1, wenn die Aminosäure in Y_1 mit der Estergruppe geschützt ist, kann mit ^{13}C oder ^{14}C markiert sein. Bevorzugt werden Aminosäurereste, an denen eine Reaktion mit Pankreasexokrinproteasen stattfindet, mit ^{13}C oder ^{14}C markiert. Der hier verwendete Begriff „mit ^{13}C oder ^{14}C markiert" bedeutet, dass ein Molekül markiert wird, indem man ^{13}C oder ^{14}C darin einführt, und beinhaltet den Austausch eines aufbauenden Kohlenstoffatoms eines Moleküls durch ^{13}C oder ^{14}C oder das kovalente Binden eines Moleküls an eine ^{13}C oder ^{14}C enthaltende atomare Gruppe oder an ein ^{13}C oder ^{14}C enthaltendes Molekül.

[0047] Die vorliegende Erfindung umfasst auch eine mit ^{13}C oder ^{14}C markierte Verbindung, die durch die folgende Formel (II) wiedergegeben wird:

$$X_2\text{-}R_2\text{-}Y_2\text{-}Z_1 \qquad \text{(II)},$$

oder ein Salz davon, zur Verwendung bei der Diagnose,
wobei X_2 ein Wasserstoffatom oder eine Schutzgruppe ist,
R_2 ein Peptid mit 2 bis 5 Aminosäuren, eine Aminosäure oder eine Einfachbindung ist,
Y_2 eine Aminosäure ist,
Z_1 eine Aminosäure ist, die optional eine Schutzgruppe aufweist,
und wobei wenigstens eine der Aminosäuren in R2, Y_2 und Z_1 oder wenigstens eine der Schutzgruppen in X_2 und Z_1, wenn die Schutzgruppen ein Kohlenstoffatom enthalten, mit ^{13}C oder ^{14}C markiert ist,

unter der Bedingung, dass die folgenden Verbindungen ausgeschlossen sind:
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 und Tyr-Gly-Gly-Phe-Met, worin Ac Acetyl ist, Et Ethyl ist, Me Methyl ist, Boc t-Butyloxycarbonyl ist, Cbz Carbobenzyloxy ist, Bzl Benzoyl ist, Z Benzyloxycarbonyl ist, SEt Ethanthiol ist und NMe_2 Dimethylamino ist.

[0048] In der Formel (II) ist X_2 ein Wasserstoffatom oder eine Schutzgruppe. Die „Schutzgruppe" beinhaltet alle Schutzgruppen, die auf dem Gebiet der organischen Chemie allgemein verwendet werden, z.B. diejenigen, die beschrieben sind in: "Textbook for Biochemical Experiments 1 – Protein Chemistry IV", herausgegeben von der Japan Biochemical Society, veröffentlicht durch Tokyo Kagaku Dojin (1977); "Textbook for Experimental Chemistry 22 – Organic Synthesis IV", herausgegeben von der Japan Chemical Society, veröffentlicht durch Maruzen (1992); "Bases and Experiments of Peptide Synthesis", Nobuo Izumiya, Tetsuo Kato, Tohiko Aoyagi und Michinori Waki, veröffentlicht durch Maruzen (1985); "Modification of Proteins", herausgegeben von Robert E. Feeney, John R. Whitaker, The American Chemical Society (1982); M. Bodanszky, "Principles of Peptides Synthesis", Springer-Verlag, Berlin (1984); und E. Schroder, K. Lubke, The Peptides", Academic Press, N.Y. Band 1 (1965), Band 2 (1966). Konkret beinhalten Beispiele hierfür Benzoyl, Acetyl, Benzyloxycarbonyl, substituiertes Benzyloxycarbonyl (wie etwa p-Nitrobenzyloxycarbonyl, p-Methoxybenzyloxycarbonyl, etc.), t-Butyloxycarbonyl, 9-Fluorenylmethoxycarbonyl, p-Toluolsulfonyl, Phthalyl, Formyl, Trifluoracetyl, Triphenylmethyl, Cyclohexyloxycarbonyl, o-Nitrophenylsulfenyl, t-Acyloxycarbonyl, Isobornyloxycarbonyl, Diphenylphosphinyl, Diphenylphosphinothioyl, Benzyl, Alkyl, Allylthiocarbonyl, o-Nitrophenoxyacetyl, Chloracetyl, Benzolsulfonyl, Dibenzylphosphoryl, Trialkylsilyl, Allyliden, und Acetoacetylgruppen.

[0049] R_2 ist ein Peptid mit 2 bis 5 Aminosäuren, eine Aminosäure oder eine Einfachbindung. Die Aminosäuren beinhalten Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, Asparaginsäure, Asparagin, Glutaminsäure, Glutamin, Arginin, Lysin, Histidin, Prolin und Ornithin.

[0050] Y_2 ist eine Aminosäure und die Aminosäuren beinhalten Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, Asparaginsäure, Asparagin, Glutaminsäure, Glutamin, Arginin, Lysin, Histidin, Prolin und Ornithin.

[0051] Z_1 ist eine Aminosäure, die optional eine Schutzgruppe aufweist. Die Schutzgruppe beinhaltet jedwede Schutzgruppe, die auf dem Gebiet der organischen Chemie allgemein verwendet wird, z.B. diejenigen, die beschrieben sind in: "Textbook for Biochemical Experiments 1 – Protein Chemistry IV", herausgegeben von der Japan Biochemical Society, veröffentlicht durch Tokyo Kagaku Dojin (1977); "Textbook for Experimental Chemistry 22 – Organic Synthesis IV", herausgegeben von der Japan Chemical Society, veröffentlicht durch Maruzen (1992); "Bases and Experiments of Peptide Synthesis", Nobuo Izumiya, Tetsuo Kato, Tohiko Aoyagi und Michinori Waki, veröffentlicht durch Maruzen (1985); "Modification of Proteins", herausgegeben von Robert E. Feeney, John R. Whitaker, The American Chemical Society (1982); M. Bodanszky, "Principles of Peptides Synthesis", Springer-Verlag, Berlin (1984); und E. Schroder, K. Lubke, The Peptides", Academic Press, N.Y. Band 1 (1965), Band 2 (1966). Konkret beinhalten Beispiele hierfür Methylester-, Ethylester-, Benzylester-, t-Butylester- und p-Nitrobenzylester-Gruppen und N'-substituierte Hydrazidgruppen für den Schutz von Carboxylgruppen; Benzyloxycarbonyl-, p-Toluolsulfonyl- und 2-Chlorbenzyloxycarbonyl-Gruppen für den Schutz der ω-Aminogruppe in Lysin- und Ornithinresten; Nitro-, Methoxybenzyloxycarbonyl- und p-Toluolsulfonyl-Gruppen für den Schutz der Guanidinogruppe in Argininresten; Benzyl- und t-Butylgruppen für den Schutz der Hydroxylgruppe in Hydroxylgruppen-enthaltenden Aminosäureresten, wie etwa Serin- und Tyrosinresten; Benzyloxycarbonyl- und Benzyloxymethyl-Gruppen für den Schutz der Imidazolgruppe in Histidinresten; Benzyl- und Tritylgruppen für den Schutz der Mercaptogruppe in Cysteinresten; Sulfoxidgruppen für den Schutz der Thioethergruppe in Methioninresten; und Formylgruppen für den Schutz der Indolgruppe in Tryptophanresten. Die Aminosäuren beinhalten Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Serin, Threonin, Cystein, Methionin, Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, Asparaginsäure, Asparagin, Glutaminsäure, Glutamin, Arginin, Lysin, Histidin, Prolin und Ornithin.

[0052] Die von R_2, Y_2 und Z_1 repräsentierten Aminosäuren und die von R_2 repräsentierten Peptide können in vielfältiger Weise modifiziert werden. Derartige Modifikationen beinhalten die Guanidylierung, Succinylierung und Acetylierung von Aminogruppen, die Modifikation der Guanidinogruppe in Arginin mit einer Dicarbonylverbindung, die Veresterung von Carboxylgruppen, die Sulfenylsulfonierung und Alkylierung der Thiolgruppe in Cystein, die Ethoxycarbonylierung der Imidazolgruppe in Histidin, die Bildung von Sulfoniumsalzen von Methi-

onin, die Acetylierung von Serin und Threonin, die Nitrierung und Iodierung von Tyrosin, und die Nitrophenylsulfonylierung von Tryptophan.

[0053] Wenigstens eine der Aminosäuren in R_2, Y_2 und Z_1 oder wenigstens eine der Schutzgruppen in X_2 und Z_1, wenn die Schutzgruppen ein Kohlenstoffatom enthalten, ist mit ^{13}C oder ^{14}C markiert.

[0054] Bevorzugt ist Z_1 eine mit ^{13}C oder ^{14}C markierte Aminosäure, die optional eine Schutzgruppe aufweist.

[0055] Bei einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann die mit ^{13}C oder ^{14}C markierte Verbindung oder das Salz hiervon dergestalt sein, dass

1) in dem Fall, dass X_2 eine Schutzgruppe und R_2 eine Einfachbindung ist,
1-i) Y_2 eine andere Aminosäure als D-Ala ist, wenn Z_1 D-Ala ist,
1-ii) Y_2 eine andere Aminosäure als Leu ist, wenn Z_1 Ala-OMe ist,
1-iii) Y_2 eine andere Aminosäure als Gly ist, wenn Z_1 Pro-OMe ist,
2) in dem Fall, dass X_2 eine Schutzgruppe und R_2 eine Aminosäure ist,
2-i) Y_2 eine andere Aminosäure als Val ist, wenn Z_1 D-Ala ist,
2-ii) Y_2 eine andere Aminosäure als Leu ist, wenn Z_1 Ala ist,
2-iii) Y_2 eine andere Aminosäure als Pro ist, wenn Z_1 Gly-OEt ist,
3) in dem Fall, dass X_2 eine Schutzgruppe, R_2 ein Peptid mit zwei Aminosäuren und Z_1 Gln, welches optional SEt aufweist, ist, Y_2 eine andere Aminosäure als Ala ist,
4) in dem Fall, dass X_2 ein Wasserstoffatom und R_2 eine Einfachbindung ist,
4-i) Y_2 eine andere Aminosäure als Ala ist, wenn Z_1 Pro ist,
4-ii) Y_2 eine andere Aminosäure als Gly, Val, Leu und Tyr ist, wenn Z_1 Leu ist,
4-iii) Y_2 eine andere Aminosäure als Gly ist, wenn Z_1 Phe ist,
4-iv) Y_2 eine andere Aminosäure als Gly ist, wenn Z_1 Gly-OEt ist,
4-v) Y_2 eine andere Aminosäure als Leu ist, wenn Z_1 Ala-OMe ist,
5) in dem Fall, dass X_2 ein Wasserstoffatom und R_2 eine Aminosäure ist,
5-i) Y_2 eine andere Aminosäure als Pro ist, wenn Z_1 Leu ist,
5-ii) Y_2 eine andere Aminosäure als Pro ist, wenn Z_1 Phe ist,
5-iii) Y_2 eine andere Aminosäure als Gly ist, wenn Z_1 Gly ist,
5-iv) Y_2 eine andere Aminosäure als Leu ist, wenn Z_1 Pro ist,
5-v) Y_2 eine andere Aminosäure als Asp ist, wenn Z_1 Met ist,
5-vi) Y_2 eine andere Aminosäure als Leu ist, wenn Z_1 Asn-Bzl ist,
6) in dem Fall, dass X_2 ein Wasserstoffatom und R_2 ein Peptid aus 2 Aminosäuren ist,
6-i) Y_2 eine andere Aminosäure als Leu ist, wenn Z_1 Leu ist,
6-ii) Y_2 eine andere Aminosäure als Asp ist, wenn Z_1 Ser ist, und
7) in dem Fall, dass X_2 ein Wasserstoffatom und R_2 ein Peptid aus 3 Aminosäuren ist,
7-i) Y_2 eine andere Aminosäure als Phe ist, wenn Z_1 Leu ist,
7-ii) Y_2 eine andere Aminosäure als Phe ist, wenn Z_1 Met ist.

[0056] Bei einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann die mit ^{13}C oder ^{14}C markierte Verbindung oder das Salz hiervon dergestalt sein, dass

1) in dem Fall, dass X_2 eine Schutzgruppe ist, die aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus Dansyl, Cbz, Ac und Z, und R_2 eine Aminosäure oder ein Peptid mit 2 Aminosäuren ist,
1-i) Y_2 eine andere Aminosäure als Val ist, wenn Z_1 D-Ala ist,
1-ii) Y_2 eine andere Aminosäure als Leu ist, wenn Z_1 Ala ist,
1-iii) Y_2 eine andere Aminosäure als Pro ist, wenn Z_1 Gly-OEt ist,
1-iv) Y_2 eine andere Aminosäure als Ala ist, wenn Z_1 Gln(NMe_2) oder Gln(NMe_2)-SEt ist,
2) in dem Fall, dass X_2 Ac oder Boc und R_2 eine Einfachbindung ist,
2-i) Y_2 eine andere Aminosäure als D-Ala ist, wenn Z_1 D-Ala ist,
2-ii) Y_2 eine andere Aminosäure als Gly ist, wenn Z_1 Pro-OMe ist,
2-iii) Y_2 eine andere Aminosäure als Leu ist, wenn Z_1 Ala-OMe ist,
3) in dem Fall, dass X_2 ein Wasserstoffatom und R_2 eine Aminosäure oder ein Peptid aus 2 oder 3 Aminosäuren ist,
3-i) Y_2 eine andere Aminosäure als Pro, Leu und Phe ist, wenn Z_1 Leu ist,
3-ii) Y_2 eine andere Aminosäure als Pro ist, wenn Z_1 Phe ist,
3-iii) Y_2 eine andere Aminosäure als Gly ist, wenn Z_1 Gly ist,
3-iv) Y_2 eine andere Aminosäure als Leu ist, wenn Z_1 Pro ist,
3-v) Y_2 eine andere Aminosäure als Asp und Phe ist, wenn Z_1 Met ist,
3-vi) Y_2 eine andere Aminosäure als Leu ist, wenn Z_1 Asn-Bzl ist,

3-vii) Y_2 eine andere Aminosäure als Asp ist, wenn Z_1 Ser ist,
4) in dem Fall, dass X_2 ein Wasserstoffatom und R_2 eine Einfachbindung ist,
4-i) Y_2 eine andere Aminosäure als Ala ist, wenn Z_1 Pro ist,
4-ii) Y_2 eine andere Aminosäure als Gly, Val, Leu und Tyr ist, wenn Z_1 Leu ist,
4-iii) Y_2 eine andere Aminosäure als Gly ist, wenn Z_1 Phe ist,
4-iv) Y_2 eine andere Aminosäure als Gly ist, wenn Z_1 Gly-OEt ist,
4-v) Y_2 eine andere Aminosäure als Leu ist, wenn Z_1 Ala-OMe ist.

[0057] Bei Formel (II) ist es bevorzugt, dass X_2 aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus Ac, Bz (Benzoyl), Boc, Z und einem Wasserstoffatom.

[0058] Bei Formel (II) ist es außerdem bevorzugt, dass X_2 eine Schutzgruppe und R_2 eine Einfachbindung ist.

[0059] Bei einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist
(1) wenigstens eine der Aminosäuren in Y_2 und Z_1 Arg oder Lys (dies ist ein geeignetes Substrat für Trypsin),
(2) wenigstens eine der Aminosäuren in Y_2 und Z_1 eine aromatische Aminosäure, Leu, His oder Met (dies ist ein geeignetes Substrat für Chymotrypsin),
(3) wenigstens eine der Aminosäuren in Y_2 und Z_1 eine neutrale und nicht-aromatische Aminosäure (dies ist ein geeignetes Substrat für Elastase),
(4) die Aminosäure in Z_1 eine andere Aminosäure als Arg, Lys und Pro (dies ist ein geeignetes Substrat für Carboxypeptidase A), oder
(5) die Aminosäure in Z_1 Arg oder Lys (dies ist ein geeignetes Substrat für Carboxypeptidase B).

[0060] Bei einer bevorzugteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist X_2 aus der Gruppe ausgewählt, bestehend aus einem Wasserstoffatom, Bz, Ac und Boc, ist Y_2 aus der Gruppe ausgewählt, bestehend aus Phe, Ala, Gly, Tyr und Arg, und ist Z_1 aus der Gruppe ausgewählt, bestehend aus Leu, welches optional eine Schutzgruppe aufweist, Ala, welches optional eine Schutzgruppe aufweist, und Gly, welches optional eine Schutzgruppe aufweist, z.B. aus der Gruppe, bestehend aus Leu, Ala, Gly, Leu-OMe, Leu-OEt, Ala-OMe, Ala-OEt, Gly-OMe und Gly-OEt und, noch stärker spezifiziert, aus der Gruppe, bestehend aus ^{13}C- oder ^{14}C-Leu,^{13}C- oder ^{14}C-Ala,^{13}C- oder ^{14}C-Gly, ^{13}C- oder ^{14}C-Leu-OMe, ^{13}C- oder ^{14}C-Leu-OEt, ^{13}C- oder ^{14}C-Ala-OMe, ^{13}C- oder ^{14}C-Ala-OEt, ^{13}C- oder ^{14}C-Gly-OMe, ^{13}C- oder ^{14}C-Gly-OEt.

[0061] Bei einer noch bevorzugteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die mit ^{13}C oder ^{14}C markierte Verbindung, die durch die Formel (II) dargestellt ist, oder das Salz davon aus der Gruppe ausgewählt, die aus den folgenden Verbindungen besteht:
(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,
(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 und
(v) Bz-Ala-Ala-Ala-Ala-^{13}C-Gly-Phe-Leu.

[0062] Die durch die obige Formel (I) dargestellten, mit ^{13}C oder ^{14}C markierten Verbindungen und deren pharmazeutisch verträgliche Salze, sowie die durch die obige Formel (II) dargestellten, mit ^{13}C oder ^{14}C markierten

Verbindungen und deren Salze können nach der Umsetzung durch eine Protease oder Proteasen über den Verdauungstrakt aufgenommen werden und durch Stoffwechselaktivität decarboxyliert werden, um $^{13}CO_2$ oder $^{14}CO_2$ zu erzeugen. Die Protease oder Proteasen können Pankreasexokrinproteasen sein, einschließlich Chymotrypsin, Trypsin, Elastase und Carboxypeptidasen, die durch die Carboxypeptidasen A und B vertreten sind.

[0063] Chymotrypsin spaltet spezifisch die Carboxy-terminale Peptidbindung von Tyrosin-, Tryptophan-, Phenylalanin-, Leucin-, Histidin- oder Methioninresten und wirkt auch auf Ester und Amide, die diese Reste enthalten.

[0064] Trypsin katalysiert die Hydrolyse von Peptidbindungen am Carboxy-Terminus eines Arginin- und Lysinrests, sowie eines S-Aminoethylcysteinrests, der durch künstliche Reaktionen erzeugt wird. Weiterhin können chemisch-synthetische Produkte, die eine (Allyl)amid- oder Esterverknüpfung anstelle der Peptidbindung enthalten, Substrate für Trypsin sein, solange sie von diesen drei Aminosäuren abgeleitet sind.

[0065] Elastase hydrolysiert die Peptidbindung am Carboxy-Terminus von Alanin-, Glycin-, Valin-, Leucin-, Isoleucin- und Methioninresten, die ungeladene, nicht-aromatische Aminosäuren darstellen. Es ist bekannt, dass Succinyl-(alanyl)3-p-nitroanilid ein künstliches Substrat hierfür sein kann.

[0066] Carboxypeptidase B hat die Wirkung, sequentiell vom Carboxy-Terminus aus an basischen Aminosäuren, wie etwa Arginin und Lysin, zu spalten.

[0067] Carboxypeptidase A hat die Wirkung, sequentiell vom Carboxy-Terminus aus an aromatischen, bzw. hydrophoben Aminosäuren zu spalten, wie etwa an Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan, Leucin, Isoleucin, Threonin, Glutamin, Histidin, Alanin, Valin, Asparagin, Serin, Lysin, Glycin, Asparaginsäure und Glutaminsäure.

[0068] Unter Berücksichtigung dieser Substratspezifitäten der Proteasen gemäß obiger Beschreibung können mit ^{13}C oder ^{14}C markierte Verbindungen oder Salze hiervon, die geeignet zur Verwendung in Diagnosemitteln für die Pankreasexokrinfunktion sind, entworfen werden.

[0069] Die mit ^{13}C oder ^{14}C markierten Verbindungen können in einer bekannten Weise unter Verwendung kommerziell erhältlicher Aminosäuren synthetisiert werden. Beispielsweise können die Verfahren verwendet werden, die im Textbook for Experimental Chemistry 22 – Organic Synthesis IV", herausgegeben von der Japan Chemical Society, veröffentlicht durch Maruzen (1992), beschrieben sind. Ein veranschaulichendes Beispiel hierfür wird unten beschrieben.

[0070] Eine mit ^{13}C markierte Aminosäure wird in Chlorwasserstoff/Methanol gelöst und am Rückfluss erhitzt. Der resultierende Methylester wird in Dichlormethan suspendiert, und Triethylamin wird dann tropfenweise unter Eis-Kühlung und Rühren hinzugegeben. Weiterhin werden eine N-Benzoylaminosäure, 1-Hydroxy-1H-benzotriazol·H_2O (HOBt) und Dichlormethan hinzugegeben. Dann wird eine Lösung von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-HCl (WSC), gelöst in Dichlormethan, hinzugegeben, und das Gemisch wird gerührt. Nach der Konzentrierung wird das Reaktionsgemisch mit Ethylacetat extrahiert, mit 1N HCl, 5% $NaHCO_3$ und Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und bis zur Trockenheit eingedampft oder weiter verseift, um die gewünschte ^{13}C-markierte Verbindung, die durch Formel (I) dargestellt ist, zu erhalten.

[0071] Die mit ^{13}C oder ^{14}C markierten Verbindungen können in Form eines Salzes erhalten werden. Die Salze können solche mit anorganischen Säuren, wie etwa Salzsäure, Schwefelsäure, Salpetersäure und Phosphorsäure; mit organischen Säuren, wie etwa Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure, Glykolsäure, Bernsteinsäure, Apfelsäure, Weinsäure, Zitronensäure und Trifluoressigsäure; mit Alkalimetallen, wie etwa Natrium und Kalium; mit Erdalkalimetallen, wie etwa Calcium; und mit organischen Aminen, wie etwa Ammonium, Ethanolamin, Triethylamin und Dicyclohexylamin beinhalten.

[0072] Der Test, der die Mittel für die Pankreasexokrinfunktion gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet, kann durchgeführt werden, indem man dem Patienten die mit ^{13}C oder ^{14}C markierte Verbindung, die durch die Formel (I) dargestellt ist, oder ein pharmazeutisch verträgliches Salz hiervon, verabreicht. Es ist auch ein Test möglich, bei dem die Konzentration der mit ^{13}C oder ^{14}C markierten Verbindung nach der Verabreichung im Serum, Urin oder Stuhl gemessen wird, jedoch ist ein Atemtest erstrebenswert, bei dem eine Zunahme der ^{13}C- oder ^{14}C-Konzentration nach der Verabreichung im ausgeatmeten CO_2 gemessen wird. Wenn die mit ^{13}C oder ^{14}C markierte Verbindung, die durch Formel (I) dargestellt ist, oder ein pharmazeutisch verträgliches Salz hiervon einem Patienten verabreicht wird, so kann von dem Patienten eine Testmahlzeit oder dergleichen verzehrt werden, um die Sekretion der Pankreasenzyme anzuregen. Ebenso können zwei oder mehr mit ^{13}C oder ^{14}C

markierte Verbindungen, die durch die Formel (I) dargestellt sind, oder pharmazeutisch verträgliche Salze hiervon für die Verwendung kombiniert werden. Genauer gesagt, wird im Falle von ^{13}C die ^{13}C-Konzentration nach der Verabreichung im ausgeatmeten CO_2 bestimmt, und die Diagnose der Pankreasexokrinfunktion erfolgt dann entweder anhand der Daten über das Ausmaß der ^{13}C-Konzentrationszunahme ($\Delta^{13}C(‰)$) im ausgeatmeten $^{13}CO_2$ zu festgelegten Zeitpunkten (z.B. 5, 10 und 15 Minuten) nach der Verabreichung oder anhand der mit dem Zeitverlauf assoziierten Daten (Anfangssteigung, Änderung der Steigung, Peakzeit, etc.) bezüglich des Ausmaßes der ^{13}C-Konzentrationszunahme ($\Delta^{13}C(‰)$) im ausgeatmeten $^{13}CO_2$ während einer festgelegten Zeitspanne nach der Verabreichung. Im Falle von ^{14}C wird die ^{14}C-Konzentration, d.h. die Radioaktivität, im ausgeatmeten CO_2 nach der Verabreichung bestimmt, und die Diagnose der Pankreasexokrinfunktion erfolgt entweder anhand der Daten über die Menge an Radioaktivität im ausgeatmeten $^{14}CO_2$ zu festgelegten Zeitpunkten (z.B. 5, 10 und 15 Minuten) nach der Verabreichung oder anhand der mit dem Zeitverlauf assoziierten Daten (Anfangssteigung, Änderung der Steigung, Peakzeit, etc.) bezüglich des Ausmaßes des Radioaktivitätsanstiegs im ausgeatmeten $^{14}CO_2$ während einer festgelegten Zeitspanne nach der Verabreichung. Diese Testverfahren nutzen das Phänomen, dass bei der Verabreichung einer mit ^{13}C oder ^{14}C markierten Verbindung, wie sie durch Formel (I) dargestellt wird, oder eines pharmazeutisch verträglichen Salzes hiervon an einen Patienten nach der Umsetzung durch eine Protease oder Proteasen eine Absorption der Verbindung über den Verdauungstrakt erfolgt und die Verbindung durch Stoffwechselaktivität im Körper decarboxyliert wird, um $^{13}CO_2$ oder $^{14}CO_2$ zu erzeugen.

[0073] Die ^{13}C-Konzentration im ausgeatmeten $^{13}CO_2$ kann mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS), Infrarot-Spektroskopie, Massenspektrometrie, photoelektrische akustische Spektroskopie, NMR (Kernmagnetischer Resonanz) und anderer Verfahren bestimmt werden.

[0074] Die ^{14}C-Konzentration oder Radioaktivität im ausgeatmeten CO_2 kann aus dem Atem eines Patienten gemessen werden, und zwar direkt oder nach Einfangen des CO_2 in einem Lösungsmittel, mittels eines GM-Zählers, eines Flüssigkeits-Szintillationszählers, eines Feststoff-Szintillationszählers, mittels Autoradiographie, einer Ionisationskammer oder dergleichen.

[0075] Das Diagnosemittel für die Pankreasexokrinfunktion gemäß der vorliegenden Erfindung kann aus der mit ^{13}C oder ^{14}C markierten Verbindung formuliert werden, die durch die Formel (I) dargestellt ist, oder aus einem pharmazeutisch verträglichen Salz hiervon, alleine oder in Kombination mit einem Hilfsstoff oder Träger, wobei die Formulierung eine orale Präparation, wie etwa eine Tablette, Kapsel, ein Pulver, Granulat, eine Flüssigkeit, etc. sein kann. Der Hilfsstoff oder Träger kann jeder pharmazeutisch verträgliche Hilfsstoff oder Träger sein, der gewöhnlich auf diesem Gebiet verwendet wird, und seine Natur und Zusammensetzung kann in geeigneter Weise ausgewählt werden. Beispielsweise kann Wasser als flüssiger Träger verwendet werden. Feste Träger beinhalten Cellulose-Derivate, wie etwa Hydroxypropylcellulose und Salze organischer Säuren, wie etwa Magnesiumstearat. Ebenso können gefriergetrocknete Präparationen verwendet werden.

[0076] Die mit ^{13}C oder ^{14}C markierte Verbindung, die durch die Formel (I) dargestellt ist, oder ein pharmazeutisch verträgliches Salz hiervon ist in Abhängigkeit von der Natur des Mittels in variablen Mengen in diesem enthalten, jedoch allgemein in einer Menge von 1 bis 100 Gewichts-%, bevorzugt von 50 bis 100 Gewichts-%. In einer Kapsel-, Tabletten-, Granulat- oder Pulverpräparation ist die mit ^{13}C oder ^{14}C markierte Verbindung, die durch die Formel (I) dargestellt ist, oder ein pharmazeutisch akzeptables Salz hiervon in einer Menge von etwa 10 bis 100 Gewichts-%, bevorzugt von 50 bis 100 Gewichts-%, bezogen auf die Präparation, enthalten, wobei ein Träger die Restmenge ausmacht.

[0077] Die Dosis des Diagnosemittels für die Pankreasexokrinfunktion gemäß der vorliegenden Erfindung sollte ausreichend sein, um nach der Verabreichung einen Anstieg von $^{13}CO_2$ oder $^{14}CO_2$ im Atem zu bestimmen oder zu bestätigen. Sie wird in Abhängigkeit vom Alter und Körpergewicht eines Patienten und dem Zweck des Tests variiert werden. Beispielsweise kann die Einheitsdosis etwa 1 bis 1000 mg/kg Körpergewicht für einen Erwachsenen betragen.

BEISPIELE

[0078] Hier im Folgenden wird die vorliegende Erfindung durch die folgenden Beispiele in größerem Detail veranschaulicht.

Beispiel 1: Herstellung von Bz-DL-Phe-(^{13}C-Leu)-OMe

[0079] Nachdem 1 g an 1-^{13}C-L-Leucin (MassTrace) in Chlorwasserstoff/Methanol gelöst und am Rückfluss

erhitzt worden war, wurde der resultierende ^{13}C-L-Leucin-Methylester in 50 ml Dichlormethan suspendiert, und es wurden 1,08 ml an Triethylamin tropfenweise unter Eiskühlung und Rühren hinzugegeben. Im Weiteren wurden 2,0 g an N-Benzoyl-DL-phenylalanin, 2,34 g an HOBt (1-Hydroxy-1H-Benzotriazol·H_2O) und 50 ml an Dichlormethan hinzugegeben. Dann wurde eine Lösung von 1,49 g an WSC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-HCl), gelöst in 100 ml Dichlormethan, hinzugegeben, und es wurde für 1 Stunde unter Eiskühlung und dann über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der Abschluss der Reaktion wurde mittels Kieselgel-Dünnschichtchromatographie unter Verwendung von Chloroform:Methanol (95:5) als Laufmittel bestätigt. Das Reaktionsgemisch wurde konzentriert, mit Ethylacetat extrahiert, mit 1N HCl, 5% $NaHCO_3$ und Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, und bis zur Trockenheit konzentriert, um 2,32 g an Bz-DL-Phe-(^{13}C-Leu)-OMe zu erhalten.

Beispiel 2: Herstellung von Bz-DL-Phe-(^{13}C-Leu) und dessen Natriumsalz (Bz-DL-Phe-(^{13}C-Leu)·Na)

[0080] Nachdem 2,32 g an Bz-DL-Phe-(^{13}C-Leu)-OMe in 100 ml Methanol gelöst worden waren, wurden 6,4 ml an 1N NaOH tropfenweise unter Eiskühlung und Rühren hinzugegeben, gefolgt von Erhitzen und Rühren bei 70°C für 2,5 Stunden. Der Abschluss der Reaktion wurde mittels Kieselgel-Dünnschichtchromatographie unter Verwendung von Chloroform:Methanol (95:5) als Laufmittel bestätigt. Nachdem die Reaktion abgeschlossen war, wurde das Reaktionsgemisch mit 1N HCl neutralisiert, konzentriert und in 5% $NaHCO_3$ gelöst. Nach dem Waschen mit Ethylacetat wurde die 5% $NaHCO_3$-Lösung mit 1N HCl angesäuert. Das Reaktionsgemisch wurde mit Ethylacetat extrahiert, mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, und bis zur Trockenheit konzentriert, um 1,93 g an Bz-DL-Phe-(^{13}C-Leu) zu erhalten, das dann mit Ethylacetat umkristallisiert wurde.

[0081] Die Struktur und die mit ^{13}C markierte Position wurden mittels ^{13}C-NMR und Massenspektrometrie bestätigt.
^{13}C-NMR (Methanol-d4, 300 MHz): 175,8 ppm (^{13}COOH)
Massenspektrometrie (m/z): 383 (M^+), 365, 224, 131, 105, 77
LC-MS (m/z): 384 (M^+ + H), 252, 224, 105

[0082] Das Natriumsalz von Bz-DL-Phe-(^{13}C-Leu) wurde erhalten, indem man Bz-DL-Phe-(^{13}C-Leu) mit einem Äquivalent an 1M Natriumcarbonat-Lösung neutralisierte, gefolgt von Lyophilisierung.

Beispiel 3: Abbau von Bz-DL-Phe-(^{13}C-Leu) durch Chymotrypsin.

[0083] Bz-DL-Phe-(^{13}C-Leu) wurde mit Chymotrypsin umgesetzt und das Abbauprodukt, Leucin, das bei der Aktivierung von Chymotrypsin erzeugt wurde, wurde quantitativ mittels Ninhydrin-Reaktion bestimmt. Die Reaktion erfolgte in 20 mM HEPPS-Na (pH 8,0) mit 23 mM Bz-DL-Phe-(^{13}C-Leu), 0,16 mg/ml Chymotrypsin (aus Rinder-Pankreas), Worthington Biochemical Corporation, #1432, Charge 37A906) für 15 Minuten bei 37°C. Nach der Reaktion wurden 50 µl Citratpuffer (Citronensäure-Monohydrat), 20 µl Ninhydrin-Lösung (50 mg/ml Lösung in „methyl cellosolve") und 100 µl an KCN-Lösung (0,01 M wässrige KCN-Lösung, 50fach verdünnt mit methyl cellosolve) zu 100 µl des Reaktionsgemischs hinzugegeben, wonach für 15 Minuten auf 100°C erhitzt wurde. Nach dem Abkühlen des Ninhydrin-Reaktionsgemischs auf Raumtemperatur wurden 150 µl an 60 Vol-% Ethanol zu 100 µl des Ninhydrin-Reaktionsgemischs hinzugegeben und gerührt, gefolgt von der Bestimmung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 570 nm. Ein Versuch, bei dem alle Schritte ohne die Zugabe von Bz-DL-Phe-(^{13}C-Leu) durchgeführt wurden, wurde als Blindwert verwendet, und als Standard wurde Leucin verwendet.

[0084] Bz-DL-Phe-(^{13}C-Leu) wurde bei der Reaktion mit Chymotrypsin abgebaut, um Leucin zu produzieren. Die Abbaugeschwindigkeit betrug 1,72 nmol/mg Chymotrypsin/min. Anhand dieser Ergebnisse wurde bestätigt, dass Bz-DL-Phe-(^{13}C-Leu) als Substrat für Chymotrypsin dienen kann.

Beispiel 4: Herstellung von Bz-Ala-(^{13}C-Ala)-OMe

[0085] Nachdem 2 g an 1-^{13}C-L-Alanin (MassTrace) in Chlorwasserstoff/Methanol gelöst und am Rückfluss erhitzt worden waren, wurde der resultierende ^{13}C-L-Alanin-Methylester in 100 ml Dichlormethan suspendiert, und es wurden 4,0 ml an Triethylamin tropfenweise unter Eiskühlung und Rühren hinzugegeben. Im Weiteren wurden 5,6 g an N-Benzoyl-L-alanin, 8,9 g an HOBt und 100 ml an Dichlormethan hinzugegeben. Dann wurde eine Lösung von 5,6 g an WSC, gelöst in 200 ml Dichlormethan, hinzugegeben, und es wurde für 1 Stunde unter Eiskühlung und dann über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der Abschluss der Reaktion wurde mittels Kieselgel-Dünnschichtchromatographie unter Verwendung von Chloroform:Methanol (95:5) als Laufmittel be-

stätigt. Das Reaktionsgemisch wurde konzentriert, mit Ethylacetat extrahiert, mit 1N HCl, 5% $NaHCO_3$ und Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, und bis zur Trockenheit konzentriert, um 4,38 g an Bz-Ala-(^{13}C-Ala)-OMe zu erhalten.

Beispiel 5: Herstellung von Bz-Ala-(^{13}C-Ala) und dessen Natriumsalz

[0086] Nachdem 4,38 g an Bz-Ala-(^{13}C-Ala)-OMe in 100 ml Methanol gelöst worden waren, wurden 16 ml an 1N NaOH tropfenweise unter Eiskühlung und Rühren hinzugegeben, gefolgt von Erhitzen und Rühren bei 70°C für 2 Stunden. Der Abschluss der Reaktion wurde mittels Kieselgel-Dünnschichtchromatographie unter Verwendung von Chloroform:Methanol (95:5) als Laufmittel bestätigt. Nachdem die Reaktion abgeschlossen war, wurde das Reaktionsgemisch mit 1N HCl neutralisiert, konzentriert und in 5% $NaHCO_3$ gelöst. Nach dem Waschen mit Ethylacetat wurde die 5% $NaHCO_3$-Lösung mit 1N HCl angesäuert. Das Reaktionsgemisch wurde mit Ethylacetat extrahiert, mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, und bis zur Trockenheit konzentriert, um 2,85 g an Bz-Ala-(^{13}C-Ala) zu erhalten, das dann mit Ethylacetat umkristallisiert wurde.

[0087] Die Struktur und die mit ^{13}C markierte Position wurden mittels ^{13}C-NMR und Massenspektrometrie bestätigt.
^{13}C-NMR (Methanol-d4, 300 MHz): 175,9 ppm (^{13}COOH)
LC-MS (m/z): 266 (M^+ + H), 176, 148, 105

[0088] Das Natriumsalz von Bz-Ala-(^{13}C-Ala) wurde erhalten, indem man Bz-Ala-(^{13}C-Ala) mit einem Äquivalent an 1M Natriumcarbonat-Lösung neutralisierte, gefolgt von Lyophilisierung.

Beispiel 6: Herstellung von Bz-Gly-(^{13}C-Leu)-OMe

[0089] Nachdem 2 g an 1-^{13}C-L-Leucin (MassTrace) in Chlorwasserstoff/Methanol gelöst und am Rückfluss erhitzt worden waren, wurde der resultierende ^{13}C-L-Leucin-Methylester in 100 ml Dichlormethan suspendiert, und es wurden 2,4 ml an Triethylamin tropfenweise unter Eiskühlung und Rühren hinzugegeben. Im Weiteren wurden 3,0 g an N-Benzoylglycin, 5,1 g an HOBt und 100 ml an Dichlormethan hinzugegeben. Dann wurde eine Lösung von 3,3 g an WSC, gelöst in 200 ml Dichlormethan, hinzugegeben, und es wurde für 1 Stunde unter Eiskühlung und dann über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der Abschluss der Reaktion wurde mittels Kieselgel-Dünnschichtchromatographie unter Verwendung von Chloroform:Methanol (95:5) als Laufmittel bestätigt. Das Reaktionsgemisch wurde konzentriert, mit Ethylacetat extrahiert, mit 1N HCl, 5% $NaHCO_3$ und Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, und bis zur Trockenheit konzentriert, um 4,38 g an Bz-Gly-(^{13}C-Leu)-OMe zu erhalten.

Beispiel 7: Herstellung von Bz-Gly-(^{13}C-Leu) und dessen Natriumsalz

[0090] Nachdem 4,38 g an Bz-Gly-(^{13}C-Leu)-OMe in 100 ml Methanol gelöst worden waren, wurden 15 ml an 1N NaOH tropfenweise unter Eiskühlung und Rühren hinzugegeben, gefolgt von Erhitzen und Rühren bei 70°C für 2,5 Stunden. Der Abschluss der Reaktion wurde mittels Kieselgel-Dünnschichtchromatographie unter Verwendung von Chloroform:Methanol (95:5) als Laufmittel bestätigt. Nachdem die Reaktion abgeschlossen war, wurde das Reaktionsgemisch mit 1N HCl neutralisiert, konzentriert und in 5% $NaHCO_3$ gelöst. Nach dem Waschen mit Ethylacetat wurde die 5% $NaHCO_3$-Lösung mit 1N HCl angesäuert. Das Reaktionsgemisch wurde mit Ethylacetat extrahiert, mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, und bis zur Trockenheit konzentriert, um 3,83 g an Bz-Gly-(^{13}C-Leu) zu erhalten, das dann mit Ethylacetat umkristallisiert wurde.

[0091] Die Struktur und die mit ^{13}C markierte Position wurden mittels ^{13}C-NMR und Massenspektrometrie bestätigt.
^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): 175,5 ppm (^{13}COOH)
Massenspektrometrie (m/z): 293 (M^+), 275, 134, 105, 77
LC-MS (m/z): 294 (M^- + H), 162, 134, 105

[0092] Das Natriumsalz von Bz-Gly-(^{13}C-Leu) wurde erhalten, indem man Bz-Gly-(^{13}C-Leu) mit einem Äquivalent an 1M Natriumcarbonat-Lösung neutralisierte, gefolgt von Lyophilisierung.

Beispiel 8: Herstellung von Bz-DL-Phe-(^{13}C-Gly)-OMe

[0093] Nachdem 570 mg an 1-^{13}C-Glycin (MassTrace) in Chlorwasserstoff/Methanol gelöst und am Rückfluss erhitzt worden waren, wurde der resultierende ^{13}C-Glycin-Methylester in 50 ml Dichlormethan suspendiert, und

es wurde 1 ml an Triethylamin tropfenweise unter Eiskühlung und Rühren hinzugegeben. Im Weiteren wurden 2,0 g an N-Benzoyl-DL-phenylalanin, 2,3 g an HOBt und 50 ml an Dichlormethan hinzugegeben. Dann wurde eine Lösung von 1,41 g an WSC, gelöst in 100 ml Dichlormethan, hinzugegeben, und es wurde für 1 Stunde unter Eiskühlung und dann über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der Abschluss der Reaktion wurde mittels Kieselgel-Dünnschichtchromatographie unter Verwendung von Chloroform:Methanol (95:5) als Laufmittel bestätigt. Das Reaktionsgemisch wurde konzentriert, mit Ethylacetat extrahiert, mit 1N HCl, 5% $NaHCO_3$ und Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, und bis zur Trockenheit konzentriert, um 2,11 g an Bz-DL-Phe-(^{13}C-Gly)-OMe zu erhalten.

Beispiel 9: Herstellung von Bz-DL-Phe-(^{13}C-Gly) und dessen Natriumsalz

[0094] Nachdem 2,11 g an Bz-DL-Phe-(^{13}C-Gly)-OMe in 100 ml Methanol gelöst worden waren, wurden 6,9 ml an 1N NaOH tropfenweise unter Eiskühlung und Rühren hinzugegeben, gefolgt von Erhitzen und Rühren bei 70°C für 2,5 Stunden. Der Abschluss der Reaktion wurde mittels Kieselgel-Dünnschichtchromatographie unter Verwendung von Chloroform:Methanol (95:5) als Laufmittel bestätigt. Nachdem die Reaktion abgeschlossen war, wurde das Reaktionsgemisch mit 1N HCl neutralisiert, konzentriert und in 5% $NaHCO_3$ gelöst. Nach dem Waschen mit Ethylacetat wurde die 5% $NaHCO_3$-Lösung mit 1N HCl angesäuert. Das Reaktionsgemisch wurde mit Ethylacetat extrahiert, mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, und bis zur Trockenheit konzentriert, um 1,3 g an Bz-DL-Phe-(^{13}C-Gly) zu erhalten.

[0095] Die Struktur und die mit ^{13}C markierte Position wurden mittels ^{13}C-NMR und Massenspektrometrie bestätigt.
^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): 179,2 ppm (^{13}COOH)
Massenspektrometrie (m/z): 327 (M^+), 309, 224, 161, 105, 77
LC-MS (m/z): 328 (M^+ + H), 252, 224, 105

[0096] Das Natriumsalz von Bz-DL-Phe-(^{13}C-Gly) wurde erhalten, indem man Bz-DL-Phe-(^{13}C-Gly) mit einem Äquivalent an 1M Natriumcarbonat-Lösung neutralisierte, gefolgt von Lyophilisierung.

Beispiel 10: Herstellung von Ac-Phe-(^{13}C-Leu)-OMe

[0097] Nachdem 1,16 g an 1-^{13}C-L-Leucin (MassTrace) in Chlorwasserstoff/Methanol gelöst und am Rückfluss erhitzt worden waren, wurde der resultierende ^{13}C-L-Leucin-Methylester in 50 ml Dichlormethan suspendiert, und es wurden 1,2 ml an Triethylamin tropfenweise unter Eiskühlung und Rühren hinzugegeben. Im Weiteren wurden 1,8 g an N-Acetyl-L-phenylalanin, 2,7 g an HOBt und 50 ml an Dichlormethan hinzugegeben. Dann wurde eine Lösung von 1,7 g an WSC, gelöst in 100 ml Dichlormethan, hinzugegeben, und es wurde für 1 Stunde unter Eiskühlung und dann über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der Abschluss der Reaktion wurde mittels Kieselgel-Dünnschichtchromatographie unter Verwendung von Chloroform:Methanol (95:5) als Laufmittel bestätigt. Das Reaktionsgemisch wurde konzentriert, mit Ethylacetat extrahiert, mit 1N HCl, 5% $NaHCO_3$ und Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, und bis zur Trockenheit konzentriert, um 2,62 g an Ac-Phe-(^{13}C-Leu)-OMe zu erhalten.

Beispiel 11: Herstellung von Ac-Phe-(^{13}C-Leu) und dessen Natriumsalz

[0098] Nachdem 2,62 g an Ac-Phe-(^{13}C-Leu)-OMe in 100 ml Methanol gelöst worden waren, wurden 9,3 ml an 1N NaOH tropfenweise unter Eiskühlung und Rühren hinzugegeben, gefolgt von Erhitzen und Rühren bei 70°C für 2,5 Stunden. Der Abschluss der Reaktion wurde mittels Kieselgel-Dünnschichtchromatographie unter Verwendung von Chloroform:Methanol (95:5) als Laufmittel bestätigt. Nachdem die Reaktion abgeschlossen war, wurde das Reaktionsgemisch mit 1N HCl neutralisiert, konzentriert und in 5% $NaHCO_3$ gelöst. Nach dem Waschen mit Ethylacetat wurde die 5% $NaHCO_3$-Lösung mit 1N HCl angesäuert. Das Reaktionsgemisch wurde mit Ethylacetat extrahiert, mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, und bis zur Trockenheit konzentriert, um 2,44 g an Ac-Phe-(^{13}C-Leu) zu erhalten, das dann mit Ethylacetat umkristallisiert wurde.

[0099] Die Struktur und die mit ^{13}C markierte Position wurden mittels ^{13}C-NMR und Massenspektrometrie bestätigt.
^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): 175,9 ppm (^{13}COOH)
LC-MS (m/z): 322 (M^++H), 190, 162, 120

[0100] Das Natriumsalz von Ac-Phe-(^{13}C-Leu) wurde erhalten, indem man Ac-Phe-(^{13}C-Leu) mit einem Äquivalent an 1M Natriumcarbonat-Lösung neutralisierte, gefolgt von Lyophilisierung.

Beispiel 12: Herstellung von Ac-Tyr-(^{13}C-Leu)-OMe

[0101] Nachdem 0,98 g an 1-^{13}C-L-Leucin (MassTrace) in Chlorwasserstoff/Methanol gelöst und am Rückfluss erhitzt worden waren, wurde der resultierende ^{13}C-L-Leucin-Methylester in 50 ml Dichlormethan suspendiert, und es wurde 1,0 ml an Triethylamin tropfenweise unter Eiskühlung und Rühren hinzugegeben. Im Weiteren wurden 1,65 g an N-Acetyl-L-tyrosin, 2,26 g an HOBt und 50 ml an Dichlormethan hinzugegeben. Dann wurde eine Lösung von 1,42 g an WSC, gelöst in 100 ml Dichlormethan, hinzugegeben, und es wurde für 1 Stunde unter Eiskühlung und dann über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der Abschluss der Reaktion wurde mittels Kieselgel-Dünnschichtchromatographie unter Verwendung von Chloroform:Methanol (95:5) als Laufmittel bestätigt. Das Reaktionsgemisch wurde konzentriert, mit Ethylacetat extrahiert, mit 1N HCl, 5% $NaHCO_3$ und Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, und bis zur Trockenheit konzentriert, um 2,14 g an Ac-Tyr-(^{13}C-Leu)-OMe zu erhalten.

Beispiel 13: Herstellung von Ac-Tyr-(^{13}C-Leu) und dessen Natriumsalz

[0102] Nachdem 2,14 g an Ac-Tyr-(^{13}C-Leu)-OMe in 100 ml Methanol gelöst worden waren, wurden 7,3 ml an 1N NaOH tropfenweise unter Eiskühlung und Rühren hinzugegeben, gefolgt von Erhitzen und Rühren bei 70°C für 2,5 Stunden. Der Abschluss der Reaktion wurde mittels Kieselgel-Dünnschichtchromatographie unter Verwendung von Chloroform:Methanol (95:5) als Laufmittel bestätigt. Nachdem die Reaktion abgeschlossen war, wurde das Reaktionsgemisch mit 1N HCl neutralisiert, konzentriert und in 5% $NaHCO_3$ gelöst. Nach dem Waschen mit Ethylacetat wurde die 5% $NaHCO_3$-Lösung mit 1N HCl angesäuert. Das Reaktionsgemisch wurde mit Ethylacetat extrahiert, mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, und bis zur Trockenheit konzentriert, um 1,36 g an Ac-Tyr-(^{13}C-Leu) zu erhalten, das dann mit Ethylacetat umkristallisiert wurde.

[0103] Die Struktur und die mit ^{13}C markierte Position wurden mittels ^{13}C-NMR und Massenspektrometrie bestätigt.
^{13}C-NMR (Methanol-d4, 300 MHz): 175,8 ppm (^{13}COOH)
LC-MS (m/z): 338 (M^+ + H), 206, 178, 136

[0104] Das Natriumsalz von Ac-Tyr-(^{13}C-Leu) wurde erhalten, indem man Ac-Tyr-(^{13}C-Leu) mit einem Äquivalent an 1M Natriumcarbonat-Lösung neutralisierte, gefolgt von Lyophilisierung.

Beispiel 14: Erzeugen eines Modells der chronischen Pankreatitis in Ratten

14-1: Verfahren der Herstellung

[0105] Es wurde ein Modell der chronischen Pankreatitis in Ratten hergestellt, indem man Ölsäure in den Ductus pancreticus injizierte (siehe Mundlos et al., Pancreas 1:29 (1986)). Nach nächtlichem Fasten wurde eine 5 Wochen alte männliche Wistar-Ratte durch intraperitoneale Verabreichung von Nembutal (50 mg/kg) betäubt. Die Abdominaldecke wurde rasiert, und die Ratte wurde auf dem Rücken liegend auf einem Operationstisch fixiert. Es wurde eine Isodine-Lösung zur Sterilisierung appliziert, und ein 3 bis 4 cm großer Mittellinien-Einschnitt wurde am Abdomen vorgenommen. Der Zwölffingerdarm und die Pankreas wurden herausgezogen, und eine 25G-Nadel wurde durch die Zwölffingerdarm-Wand gestochen. Durch das erzeugte Loch wurde eine Polyethylen-Kanüle (PE-10) in den Zwölffingerdarm eingeführt und weiter bis zu dem gemeinsamen Gallengang, etwa um 5 mm von der Papille, vorgeschoben. Die eingeführte Kanüle wurde über einen Mikroclip befestigt. Außerdem wurde der Gallengang durch einen Mikroclip geschlossen, um zu verhindern, dass Ölsäure in die Leber fließt. Die Ölsäure (50 µl) wurde mit einer Geschwindigkeit von 20 µl/min über eine Mikrospritzen-Pumpe injiziert. Nachdem die Injektion abgeschlossen war, ließ man die Ratte für 2 min stehen, sodass sich die Ölsäure über die Pankreas verteilte. Die Mikroclips und die Kanüle wurden entfernt, und der Zwölffingerdarm wurde wieder eingelegt. Das Endothel wurde mit einem Seidenfaden (Nescosuture silk suture-Faden 3-0, Nihon Shoji KK) vernäht, und die äußere Haut wurde mit einem Hauttacker (Appose ULC, No. 8034-12, 5,7 × 3,8 mm) verschlossen. Bei einer Kontrolle wurde nur eine Laparotomie durchgeführt. Die der Operation unterzogenen Ratten wurden bis zur Verwendung unter freiem Zugang zu Standardfutter und Wasser bei 23°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55% gehalten.

14-2 Bewertung

[0106] Nach Injektion der Ölsäure in den Ductus pancreticus und einer Haltung von 3 Wochen wurden diese Ratten (mit Ölsäure-Injektion) einer Messung der Amylase im Blut und einer quantitativen Bestimmung der Gehalte von Chymotrypsinogen und Amylase in der Pankreas unterzogen (**Fig. 1**). Zu der entnommenen Pank-

reas wurde ein Extraktionspuffer (20 mM HEPPS + Na, pH 8,0, 100 mM KCl, 0,5 % (Gewicht/Volumen) an Triton X-100) bis auf ein Gesamtvolumen von 10 ml hinzugegeben. Das Material wurde durch Ultraschall (Bionic 7250, Seiko, Sonics & Materials) aufgeschlossen und bei 10.000 g für 20 Minuten zentrifugiert, um einen Pankreasextrakt als Überstand zu gewinnen. Zu 200 µl des Pankreas-Extrakts wurden 200 µl an 1 mg/ml Trypsin (aus Schweinepankreas, Biozyme, Code TRY1, Charge 0196) hinzugegeben, wobei diese Präparation 5 mg/ml Trypsin, 1 mM Acetatpuffer, pH 3,2, enthielt und fünffach mit 20 mM Hepes-Na, pH 8,0, verdünnt wurde; nach der Zugabe ließ man den Ansatz für 2 Stunden bei 4°C stehen, um das Chymotrypsinogen zu Chymotrypsin zu aktivieren (Lampel und Kern, Virchows Archiv A 373:97 (1977)). Nach Zugabe von 30 µl des aktivierten Pankreasextrakts und 20 µl an 123,8 mM BT-PABA zu 150 µl an 20 mM HEPPS-Na, pH 8,0, wurde die Chymotrypsin-Reaktion für 15 Minuten bei 37°C durchgeführt. Nach der Reaktion wurden 10 µl an 100% (Gewicht/Volumen) TCA-Lösung hinzugegeben, und es wurde für 5 Minuten bei 15.000 × g zentrifugiert, und das PABA im Überstand wurde unter Verwendung eines PABA-Messkits (Eisai) quantitativ bestimmt. Die Amylaseaktivität im Pankreasextrakt wurde unter Verwendung von Fuji Dri-Chem gemessen. Beide Einheiten der Aktivität (Units, U) zeigen die µmol der Freisetzung/min.

[0107] Der Chymotrypsinogen-Gehalt betrug 62,4 U ± 26,2, n=11 bei den Kontrollratten und 8,1 U ± 10,7, n=17 bei den Ratten mit Ölsäure-Injektion. Der Amylasegehalt betrug 8681 U ± 5622, n=11 bei den Kontrollratten und 789 U ± 1842, n=17 bei den Ratten mit Ölsäureinjektion. Somit waren beide Enzymgehalte bei den Ratten mit Ölsäure-Injektion signifikant vermindert (**Fig. 1**). Insbesondere war der Chymotrypsinogen-Gehalt merklich reduziert. Somit ergibt die Bewertung, dass unter den 17 mit Ölsäure injizierten Ratten 12 Ratten (70%) eine Pankreatitis entwickelt hatten, wenn der Mittelwert – 2 Standardabweichungen des Chymotrypsinogengehalts der Kontrolle die normale Untergrenze ist. Auf der anderen Seite lagen die Blutamylasegehalte beider Ratten auf demselben Niveau, steigen jedoch in der akuten Phase der Pankreatitis an: 1930 U ± 823, n=11 bei den Kontrollratten und 2137 U ± 668, n=17 bei den mit Ölsäure injizierten Ratten; somit sind die mit Ölsäure injizierten Ratten als Modell der chronischen Pankreatitis charakterisiert.

Beispiel 15: Bz-DL-Phe-(^{13}C-Leu)-Atemtest

15-1 Verfahren

[0108] Man ließ die Ratten, die das Modellsystem für chronische Pankreatitis darstellen, und die Kontrollratten, die für 3 bis 4 Wochen nach der Operation gehalten wurden, ab 9:00 morgens fasten. Um 16:00 nachmittags wurden 3 mg/ml an BT-PABA (PFD-Lösung für innere Anwendung, Eisai) in einer Menge von 15 mg/kg oral verabreicht. Der Urin wurde für 16 Stunden bis 9:00 morgens am nächsten Tag gesammelt. Die Menge des gesammelten Urins und die PABA-Konzentration im Urin wurden unter Verwendung eines PABA-Messkits gemessen, um die Exkretionsrate in den Urin zu bestimmen (PFD-Test).

[0109] Nach dem PFD-Test wurde Bz-DL-Phe-(^{13}C-Leu)-Na, das in destilliertem Wasser (250 mg/kg, 6 ml/kg) gelöst war, den Ratten, die für 24 Stunden gefastet hatten, oral verabreicht, um einen ^{13}C-Atemtest durchzuführen. Die 9 Wochen alte Ratte wurde ohne Betäubung in einer Rattenhaltevorrichtung für ein Mikrowellenbestrahlungsgerät fixiert. Der Atem wurde unter Verwendung einer Stoßpumpe (Variable Stroke Pump VS-500, Shibata Kagaku Kogyo) mit einer Geschwindigkeit von etwa 100 bis 300 ml/min gesammelt und direkt in die Fließzelle eines $^{13}CO_2$-Analysators ($^{13}CO_2$ Analyzer EX-130S, Nihon Bunko) eingeführt. Ein Perma Pure Trockner (Perma Pure drier, MD-050-12P, Perma Pure INC.) war zwischen der Haltevorrichtung der Ratte und der Stoßpumpe eingesetzt, um Wasserdampf aus dem Atem zu entfernen. Die CO_2-Konzentration wurde stabilisiert, die Ratte wurde aus dem Rattenhalter entfernt, und Bz-DL-Phe-(^{13}C-Leu)-Na, gelöst in destilliertem Wasser, wurde unter Verwendung einer oralen Sonde in den Magen eingeführt.

[0110] Die Ausgabedaten des $^{13}CO_2$-Analysators wurden einer Analog-Digitalumwandlung unterzogen und in einen Personal Computer (Apple Power Macintosh 8500) eingespeist. Unter Verwendung einer Datenverarbeitungssoftware, Lab VIEW (National Instruments), wurden alle 100 Millisekunden 10 Datenpunkte integriert, der Durchschnitt über ein Intervall von 5 Sekunden berechnet und dies in den Wert für das ^{13}C-Atom, Δ^{13}C(‰), und die CO_2-Konzentration (%) umgewandelt. Auf diese Weise wurde der ^{13}C-Atemtest kontinuierlich durchgeführt. Die umgesetzten Daten wurden in Echtzeit angezeigt und auf einer Diskette gespeichert. Die CO_2-Konzentration im gesammelten Atem wurde auf 3 ± 0,5% gehalten.

[0111] Der Δ^{13}C(‰)-Wert wurde berechnet aus der ^{13}C-Konzentration im ausgeatmeten CO_2 zu jedem der Zeitpunkte (^{13}C tmin) und aus der ^{13}C-Konzentration im Standard-CO_2 (^{13}C std), wobei die folgende Formel verwendet wurde:

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

[0112] Nach dem Atemtest wurde das Abdomen der Ratte unter Betäubung mittels intraperitonealer Applikation von Nembutal (50 mg/kg) aufgeschnitten, und die gesamte Pankreas wurde entnommen und gewogen. Dann wurde der Chymotrypsinogen-Gehalt bestimmt.

15-2 Ergebnisse

[0113] Die Durchführung des Bz-DL-Phe-(^{13}C-Leu)-Atemtests (Fig. 2) erfolgte so, dass 250 mg/kg an Bz-DL-Phe-(^{13}C-Leu)-Na an die Ratten mit chronischer Pankreatitis und an die Kontrollratten oral verabreicht wurden, und der Zeitverlauf der $^{13}CO_2$-Konzentration im ausgeatmeten CO_2 nach der Verabreichung gemessen wurde. Bei den Kontrollratten begann der $\Delta^{13}C(‰)$-Wert 2 bis 3 Minuten nach der Verabreichung anzusteigen, obwohl es unter den Individuen gewisse Unterschiede hinsichtlich des Ausmaßes des Anstiegs gab. Der Wert erreichte bei 15 bis 20 Minuten einen Spitzenwert (Peak) von 100 bis 200 ‰ und nahm dann allmählich ab. Im Gegensatz dazu war das Ausmaß der Zunahme bei 7 Fällen der Ratten mit chronischer Pankreatitis gering und nahm über 30 Minuten weiterhin langsam zu. Die eine verbleibende Ratte zeigte dasselbe Verhalten wie die Kontrollratten, jedoch lag die Peakzeit später. Zehn Minuten nach der Verabreichung waren die $\Delta^{13}C(‰)$-Werte für die Ratten mit chronischer Pankreatitis kleiner als der kleinste $\Delta^{13}C(‰)$-Wert bei den Kontrollratten. Demzufolge erreichte die Empfindlichkeit 100%, auch wenn der Ausschlusswert so gesetzt wird, dass die Spezifität 100% erreichte, indem man den $\Delta^{13}C(‰)$-Wert bei 10 Minuten als Testwert verwendete (Fig. 3). Auf der anderen Seite betrug die Empfindlichkeit des PFD-Tests, der unmittelbar vor dem Atemtest bei derselben Gruppe von Ratten durchgeführt wurde, 50%, was anzeigt, dass der Bz-DL-Phe-(^{13}C-Leu)-Atemtest im Vergleich mit diesem weit überlegen war (Fig. 3). Da berichtet wurde, dass die Empfindlichkeit einfacher Tests für die Pankreasexokrinfunktion, die von dem PFD-Test verschieden sind, hinsichtlich der Empfindlichkeit mit dem PFD-Test identisch sind, kann gesagt werden, dass der Bz-DL-Phe-(^{13}C-Leu)-Atemtest der am höchsten sensitive einfache Test für die Pankreasexokrinfunktion ist. Zusätzlich zu der Patientenbelastung dadurch, dass 6 Stunden lang Urin gesammelt wird, und dadurch, dass große Mengen an Wasser getrunken werden müssen, ist der PFD-Test insofern unvorteilhaft, als nachfolgende Analysen notwendig sind, sodass die Ergebnisse oft nicht am selben Tag ermittelt werden. Im Gegensatz dazu hat der Bz-DL-Phe-(^{13}C-Leu)-Atemtest den Vorteil, dass die einschränkende Zeitspanne nur 10 Minuten beträgt, und dass die Ergebnisse bald und am vorliegenden Ort und zur vorliegenden Zeit erhalten werden können.

Beispiel 16: Bz-Ala-(^{13}C-Ala)-Atemtest

[0114] In einer ähnlichen Weise wie bei 15-1 wurde der Bz-Ala-(^{13}C-Ala)-Atemtest durchgeführt, wobei 50 mg/kg an Bz-Ala-(^{13}C-Ala)-Na oral verabreicht wurden und der Zeitverlauf der $^{13}CO_2$-Konzentration im ausgeatmeten CO_2 nach der Verabreichung gemessen wurde. Die Empfindlichkeit betrug 88%, wenn der $\Delta^{13}C(‰)$-Wert bei 10 Minuten als Kontrollwert verwendet wurde und der Ausschlusswert so eingestellt wurde, dass die Spezifität 100% betrug (Fig. 4). Auf der anderen Seite war die Empfindlichkeit bei dem PFD-Test, der unmittelbar vor dem Atemtest an derselben Gruppe von Ratten durchgeführt wurde, 63%; somit besaß der Bz-Ala-(^{13}C-Ala)-Atemtest eine höhere Sensitivität (Fig. 4). Zusätzlich zu der Patientenbelastung dadurch, dass 6 Stunden lang Urin gesammelt wird, und dadurch, dass große Mengen an Wasser getrunken werden müssen, ist dieser PFD-Test insofern unvorteilhaft, als nachfolgende Analysen notwendig sind, sodass die Ergebnisse oft nicht am selben Tag ermittelt werden. Im Gegensatz dazu kann der Bz-Ala-(^{13}C-Ala)-Atemtest insofern als überlegen bezeichnet werden, als die einschränkende Zeitspanne nur 10 Minuten beträgt, und die Ergebnisse bald und am vorliegenden Ort und zur vorliegenden Zeit erhalten werden können.

Beispiel 17: Bz-Gly-(^{13}C-Leu)-Atemtest

[0115] In einer ähnlichen Weise wie bei 15-1 wurde der Bz-Gly-(^{13}C-Leu)-Atemtest durchgeführt, wobei 50 mg/kg an Bz-Gly-(^{13}C-Leu)-Na oral verabreicht wurden und der Zeitverlauf der $^{13}CO_2$-Konzentration im ausgeatmeten CO_2 nach der Verabreichung gemessen wurde. Die Empfindlichkeit betrug 80%, wenn der $\Delta^{13}C(‰)$-Wert bei 18 Minuten als Kontrollwert verwendet wurde und der Ausschlusswert so eingestellt wurde, dass die Spezifität 100% betrug (Fig. 5). Auf der anderen Seite war die Empfindlichkeit bei dem PFD-Test, der unmittelbar vor dem Atemtest an derselben Gruppe von Ratten durchgeführt wurde, 50%; somit besaß der Bz-Gly-(^{13}C-Leu)-Atemtest eine höhere Sensitivität (Fig. 5). Zusätzlich zu der Patientenbelastung dadurch, dass 6 Stunden lang Urin gesammelt wird, und dadurch, dass große Mengen an Wasser getrunken werden müssen, ist dieser PFD-Test insofern unvorteilhaft, als nachfolgende Analysen notwendig sind, sodass die Ergebnisse oft nicht am selben Tag ermittelt werden. Im Gegensatz dazu hat der Bz-Gly-(^{13}C-Leu)-Atemtest den Vorteil, dass die einschränkende Zeitspanne nur 18 Minuten beträgt, und dass die Ergebnisse bald und am

vorliegenden Ort und zur vorliegenden Zeit erhalten werden können.

Beispiel 18: Herstellung von Bz-L-Phe-(^{13}C-Leu)-OMe

[0116] Nachdem 3,02 g an 1-^{13}C-L-Leucin (MassTrace) in Chlorwasserstoff/Methanol gelöst und am Rückfluss erhitzt worden waren, wurde der resultierende ^{13}C-L-Leucin-Methylester in 150 ml Dichlormethan suspendiert, und es wurden 3,22 ml an Triethylamin tropfenweise unter Eiskühlung und Rühren hinzugegeben. Im Weiteren wurden 6,16 g an N-Benzoyl-L-phenylalanin, 7,02 g an HOBt und 100 ml an Dichlormethan hinzugegeben. Dann wurde eine Lösung von 4,4 g an WSC, gelöst in 200 ml Dichlormethan, hinzugegeben, und es wurde für 1 Stunde unter Eiskühlung und dann über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der Abschluss der Reaktion wurde mittels Kieselgel-Dünnschichtchromatographie unter Verwendung von Chloroform:Methanol (95:5) als Laufmittel bestätigt. Das Reaktionsgemisch wurde konzentriert, mit Ethylacetat extrahiert, mit 1N HCl, 5% $NaHCO_3$ und Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, und bis zur Trockenheit konzentriert, um 8,36 g an Bz-L-Phe-(^{13}C-Leu)-OMe zu erhalten.

Beispiel 19: Herstellung von Bz-L-Phe-(^{13}C-Leu) und dessen Natriumsalz

[0117] Nachdem 8,36 g an Bz-L-Phe-(^{13}C-Leu)-OMe in 150 ml Methanol gelöst worden waren, wurden 23,2 ml an 1N NaOH tropfenweise unter Eiskühlung und Rühren hinzugegeben, gefolgt von Erhitzen und Rühren bei 70°C für 3,5 Stunden. Der Abschluss der Reaktion wurde mittels Kieselgel-Dünnschichtchromatographie unter Verwendung von Chloroform:Methanol (95:5) als Laufmittel bestätigt. Nachdem die Reaktion abgeschlossen war, wurde das Reaktionsgemisch mit 1N HCl neutralisiert, konzentriert und in 5% $NaHCO_3$ gelöst. Nach dem Waschen mit Ethylacetat wurde die 5% $NaHCO_3$-Lösung mit 1N HCl angesäuert. Das Reaktionsgemisch wurde mit Ethylacetat extrahiert, mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, und bis zur Trockenheit konzentriert, um 7,92 g an Bz-L-Phe-(^{13}C-Leu) zu erhalten, das dann mit Ethylacetat umkristallisiert wurde.

[0118] Die Struktur und die mit ^{13}C markierte Position wurden mittels ^{13}C-NMR und Massenspektrometrie bestätigt.
^{13}C-NMR (Methanol-d4, 300 MHz): 175,9 ppm (^{13}COOH)
Massenspektrometrie (m/z): 383 (M^+), 365, 224, 131, 105, 77
LC-MS (m/z): 384 (M^+ + H), 252, 224, 105

[0119] Das Natriumsalz von Bz-L-Phe-(^{13}C-Leu) wurde erhalten, indem man Bz-L-Phe-(^{13}C-Leu) mit einem Äquivalent an 1M Natriumcarbonat-Lösung neutralisierte, gefolgt von Lyophilisierung.

Beispiel 20: Herstellung von Bz-Tyr-(^{13}C-Leu)-OMe

[0120] Nachdem 1,73 g an 1-^{13}C-L-Leucin (MassTrace) in Chlorwasserstoff/Methanol gelöst und am Rückfluss erhitzt worden waren, wurde der resultierende ^{13}C-L-Leucin-Methylester in 100 ml Dichlormethan suspendiert, und es wurden 2,00 ml an Triethylamin tropfenweise unter Eiskühlung und Rühren hinzugegeben. Im Weiteren wurden 4,05 g an N-Benzoyl-L-tyrosin, 4,35 g an HOBt und 100 ml an Dichlormethan hinzugegeben. Dann wurde eine Lösung von 2,73 g an WSC, gelöst in 150 ml Dichlormethan, hinzugegeben, und es wurde für 1 Stunde unter Eiskühlung und dann über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der Abschluss der Reaktion wurde mittels Kieselgel-Dünnschichtchromatographie unter Verwendung von Chloroform:Methanol (95:5) als Laufmittel bestätigt. Das Reaktionsgemisch wurde konzentriert, mit Ethylacetat extrahiert, mit 1N HCl, 5% $NaHCO_3$ und Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, und bis zur Trockenheit konzentriert, um 5,5 g an N-Bz-Tyr-(^{13}C-Leu)-OMe zu erhalten.

Beispiel 21: Herstellung von Bz-Tyr-(^{13}C-Leu) und dessen Natriumsalz

[0121] Nachdem 5,5 g an N-Bz-Tyr-(^{13}C-Leu)-OMe in 150 ml Methanol gelöst worden waren, wurden 14,6 ml an 1N NaOH tropfenweise unter Eiskühlung und Rühren hinzugegeben, gefolgt von Erhitzen und Rühren bei 70°C für 3,5 Stunden. Der Abschluss der Reaktion wurde mittels Kieselgel-Dünnschichtchromatographie unter Verwendung von Chloroform:Methanol (95:5) als Laufmittel bestätigt. Nachdem die Reaktion abgeschlossen war, wurde das Reaktionsgemisch mit 1N HCl neutralisiert, konzentriert und in 5% $NaHCO_3$ gelöst. Nach dem Waschen mit Ethylacetat wurde die 5% $NaHCO_3$-Lösung mit 1N HCl angesäuert. Das Reaktionsgemisch wurde mit Ethylacetat extrahiert, mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, und bis zur Trockenheit konzentriert, um 4,39 g an N-Bz-Tyr-(^{13}C-Leu) zu erhalten, das dann mit Ethylacetat umkristallisiert wurde.

[0122] Die Struktur und die mit ^{13}C markierte Position wurden mittels ^{13}C-NMR und Massenspektrometrie bestätigt.
^{13}C-NMR (Methanol-d4, 300 MHz): 175,9 ppm ($^{13}COOH$)
Massenspektrometrie (m/z): 399 (M^+), 381, 240, 147, 107, 105, 77
LC-MS (m/z): 400 ($M^+ + H$), 268, 240

[0123] Das Natriumsalz von N-Bz-Tyr-(^{13}C-Leu) wurde erhalten, indem man N-Bz-Tyr-(^{13}C-Leu) mit einem Äquivalent an 1M Natriumcarbonat-Lösung neutralisierte, gefolgt von Lyophilisierung.

Beispiel 22: Herstellung von Arg-(^{13}C-Leu)

[0124] Es wurden 1 g an 1-^{13}C-L-Leucin (MassTrace), 1,7 g an p-Toluolsulfonsäure-Monohydrat ($TosOH \cdot H_2O$) und 3,7 ml an Benzylalkohol (BzlOH) in 10 ml trockenem Benzol gelöst und in einem Ölbad (110°C) erhitzt und am Rückfluss gekocht, wobei eine Dean-Stark Apparatur verwendet wurde, die mit einem Rückflusskondensator in einem Verdampfungskolben ausgestattet war. Die Reaktion wurde für 5 Stunden durchgeführt, wobei das Wasser, das beim Fortschreiten der Reaktion erzeugt wird, abgetrennt wurde. Nachdem die Reaktion abgeschlossen war, wurden 15 ml Ether und 15 ml Petroleumether hinzugegeben, um den Reaktanten zu kristallisieren, und dieser wurde mit Ethanol-Ether umkristallisiert, um ^{13}C-Leu-OBzl zu erhalten.

[0125] N-α-Carbobenzoxy-Ng-tosyl-arginin (Z-Arg (Tos)) und eine äquimolare Menge an ^{13}C-Leu-OBzl wurden in trockenem Tetrahydrofuran (THF) gelöst, und es wurde eine äquimolare Menge an HOBt, zwei molare Mengen an Dimethylaminopyridin und 1,5 molare Mengen an WSC hinzugegeben, um für 3 Stunden zu reagieren. Nachdem die Reaktion abgeschlossen und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck abdestilliert worden war, wurde das Material in Chloroform gelöst, und die Chloroformschicht wurde nacheinander mit 10% Citronensäure, Wasser, 4% $NaHCO_3$-Lösung und Wasser gewaschen. Die Chloroformschicht wurde über Na_2SO_4 getrocknet, und das Lösungsmittel wurde dann abdestilliert. Der Rückstand wurde aus Ethanol-Ether umkristallisiert, um Z-Arg(Tos)-^{13}C-Leu-OBzl zu erhalten. Dann wurde 1 g an Z-Arg(Tos)-^{13}C-Leu-OBzl in 3,6 ml Thioanisol, 1,5 ml Trifluoressigsäure (TFA) und 0,6 ml Trifluormethylsulfonsäure (TFMSA) gelöst und darin bei Raumtemperatur für 2 Stunden umgesetzt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels wurde der Rückstand in Wasser gelöst und mit einem anionischen Austauscherharz (AG-X8, Essigsäuretyp) behandelt. Die resultierende Lösung wurde konzentriert und mittels einer LH20-Säule (2,5 cm × 60 cm), äquilibriert mit Methanol:Wasser (1:1), gereinigt, um 200 mg an Arg-(^{13}C-Leu) zu erhalten.

[0126] Die Struktur und die mit ^{13}C markierte Position wurden mittels ^{1}H-NMR und ^{13}C-NMR bestätigt.
^{1}H-NMR (DMSO-d6, 400 MHz):
1,073-1,015 ppm 6H: CH-$(CH_3)_2$ Leu
1,868-1,690 ppm 7H: CH-$(CH_3)_2$ Leu, CH-CH_2-CH
Leu CH-CH_2-CH_2-CH_2Arg
3,26 ppm 2H: CH_2-NH-C=NH_2Arg
3,477 ppm: H_2O
3,649 ppm 1H: NH-CH-COOH Leu
4,2 ppm: 1H: NH_2-CH-CONH Arg
7,3-6,8 ppm: Guanidin-Gruppe Arg
^{13}C-NMR (DMSO-d6, 400 MHz):
173,3 ppm: NH-CH-(^{13}C-COOH) Leu

Beispiel 23: Herstellung von Phe-(^{13}C-Leu)

[0127] Nachdem 9,96 g an 1-^{13}C-L-Leucin (MassTrace) in 75 ml 1N NaOH gelöst worden waren, wurde eine Lösung von Di-t-Butyldicarbonat (Boc_2O) (18,0 g) in Aceton (50 ml) hinzugegeben. Dann wurden 5,21 ml an Triethylamin tropfenweise hinzugegeben, und es wurde bei Raumtemperatur gerührt. Nach einer Stunde wurde eine Lösung von Boc_2O (9,8 g) in Aceton {40 ml) hinzugegeben, und es wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem das Aceton unter reduziertem Druck abdestilliert worden war, wurden 500 ml Ethylacetat hinzugegeben, der Ansatz wurde mit 6 N HCl gefällt, mit Wasser gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Nachdem das Trocknungsmittel abfiltriert war, wurden 10 ml Cyclohexylamin (CHA) hinzugegeben. Nach dem Waschen mit 1N HCl wurde Boc-(^{13}C-Leu) mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung extrahiert, und die wässrige Schicht wurde mit 6N HCl angesäuert, mit Ethylacetat extrahiert, mit Wasser gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Nach Konzentrieren unter reduziertem Druck wurde das zurückbleibende ölige Produkt in Hexan gelöst, und es wurden 1,2 ml an Wasser zum Auskristallisieren hinzugegeben, um Boc-(^{13}C-Leu)-$OH \cdot H_2O$ zu gewinnen. Es wurden 10 Gramm an

Boc-(^{13}C-Leu)-OH·H_2O in Ethanol (50 ml)-Wasser (20 ml) gelöst, und es wurden 6,52 g an Cäsiumcarbonat, gelöst in 20 ml destilliertem Wasser, hinzugegeben. Nach Konzentrieren unter reduziertem Druck wurden Ethanol und Toluol hinzugegeben, und das verbleibende Wasser wurde azeotropisch entfernt, um ein Gelprodukt zu erhalten, das in 300 ml Dimethylformamid (DMF) suspendiert wurde. Zu der Suspension wurden 5,2 ml Benzylbromid tropfenweise bei Raumtemperatur und unter Rühren hinzugegeben. Nach Rühren bei Raumtemperatur für 45 Minuten wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck abdestilliert. Es wurde Ethylacetat hinzugegeben und mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen über wasserfreiem Natriumsulfat wurde das Ethylacetat unter reduziertem Druck abdestilliert, um ein öliges Produkt zu erhalten. Zu dem Produkt wurden 59 ml TFA hinzugegeben, und es wurde bei Raumtemperatur für 40 Minuten gerührt. Nachdem 8,37 g an p-Toluolsulfonsäure-Monohydrat zugegeben worden waren, wurde das TFA unter reduziertem Druck abdestilliert. Zum Kristallisieren wurde Diisopropylether zu dem Rückstand hinzugegeben, um TosOH·H-(^{13}C-Leu)-OBzl zu gewinnen. Nach Lösen von 7,89 g an TosOH·H-(^{13}C-Leu)-OBzl, 5,57 g an t-Boc-L-Phenylalanin (Boc-Phe) und 2,97 g an HOBt in 80 ml DMF, wurden 4,03 ml eines wasserlöslichen Carbodiimids (WSCD: 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid) tropfenweise unter Eiskühlung hinzugegeben, wonach für 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt wurde. Es wurden Ethylacetat und Eiswasser hinzugegeben, wonach eine Trennung in zwei Schichten erfolgte. Die organische Schicht wurde mit gesättigtem Natriumhydrogencarbonat, Wasser, 0,1 N HCl und Wasser gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Nach Abdestillieren des Ethylacetats unter reduziertem Druck wurde Hexan zum Kristallisieren zugegeben, um Boc-Phe-(^{13}C-Leu)-OBzl zu erhalten. Das Boc-Phe-(^{13}C-Leu)-OBzl (5,2 g) wurde in 10 ml Essigsäure gelöst, und es wurden 500 mg an 5% Palladium-Kohlenstoff (Pd-C) hinzugegeben. Während bei Raumtemperatur gerührt wurde, wurde für 1 Stunde Wasserstoffgas eingeblasen. Nachdem der Katalysator abfiltriert war, wurde die Mutterlösung unter reduziertem Druck auf etwa 10 ml konzentriert. Unter Eiskühlung wurden 7,23 ml an 4,6 N HCl/Dioxan hinzugegeben, und es wurde für 10 Minuten gerührt, gefolgt von weiterem Rühren bei Raumtemperatur für 1 Stunde. Nach Konzentrieren unter reduziertem Druck wurde Ether zur Feststoffbildung hinzugegeben. Der resultierende Feststoff wurde abfiltriert, mit Ether gewaschen und in 100 ml destilliertem Wasser gelöst. Die unlöslichen Bestandteile wurden mittels eines Membranfilters abfiltriert, gefolgt von Lyophilisierung. Dieses Produkt wurde mittels RP-HPLC/YMC-ODS (10 µm), 30 mm × 250 mm, 20 ml/min, aq. CH_3CN (0,05% HCl)) (5%-5%-20%, 0-15-75 min) gereinigt, und die Hauptfraktion wurde lyophilisiert, um 2,84 g an Phe-(^{13}C-Leu) zu gewinnen.

[0128] Die Struktur und die mit ^{13}C markierte Position wurden mittels ^{13}C-NMR, Massenspektrometrie und Aminosäureanalyse bestätigt.
^{13}C-NMR (DMSO-d6, 270 MHz): 174,3 ppm (^{13}COOH)
MALD-MS (m/z): 280,20 (M^+ + H)
Aminosäureanalyse: Phenylalanin 1,00; Leucin 1,01
(Hydrolysebedingungen: 6N HCl, 110°C, 22 Stunden)

Beispiel 24: Herstellung von Bz-Ala-Ala-Ala-Ala-Gly-Phe-(^{13}C-Leu) und dessen Natriumsalz

[0129] Zu 33,8 g an N-t-Boc-phenacyl-L-alanin (Boc-Ala-OPac) wurden 9,6 ml an 4,6 N HCl/Dioxanlösung hinzugegeben, und es wurde bei Raumtemperatur für 40 Minuten gerührt. Diethylether wurde zur Feststoffbildung hinzugegeben, und der Feststoff wurde abfiltriert und unter reduziertem Druck getrocknet. Dieses Material wurde in 100 ml Dichlormethan suspendiert, und es wurden 18,9 g an N-t-Boc-L-alanin (Boc-Ala) hinzugegeben, wonach auf 0°C abgekühlt wurde. Nach Zugabe von 19,2 ml WSCD wurde das Gemisch für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Konzentrieren unter reduziertem Druck wurde der Rückstand in Ethylacetat/Wasser gelöst, und die organische Schicht wurde mit Wasser, 1N HCl und Wasser gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Das Ethylacetat wurde unter reduziertem Druck abdestilliert, und Diisopropylether wurde zur Feststoffbildung hinzugegeben. Der resultierende Feststoff wurde abfiltriert und mit Aceton-Ether-Diisopropylether umkristallisiert, um Boc-Ala-Ala-OPac zu erhalten.

[0130] Zu 15,1 g an Boc-Ala-Ala-OPac wurden 88,8 ml an TFA hinzugegeben, wonach für 50 Minuten bei Raumtemperatur gerührt wurde. Nach Konzentrieren unter reduziertem Druck wurden 11,3 ml an 4,6 N HCl/Dioxanlösung hinzugegeben. Diethylether/Diisopropylether wurde zur Feststoffbildung hinzugegeben, und der resultierende Feststoff wurde abfiltriert und unter reduziertem Druck getrocknet. Dieses Material wurde in 100 ml DMF gelöst, und es wurden 7,95 g an Boc-Ala und 5,95 g an HOBt hinzugegeben. Nach Abkühlung auf 0°C und Zugabe von 8,1 ml WSCD wurde das Gemisch für 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde abgekühlt, und es wurde Wasser zur Fällung hinzugegeben. Der präzipitierte Feststoff wurde abfiltriert und in Chloroform/Methanol (3:1) gelöst. Die organische Schicht wurde mit Wasser gewaschen und direkt unter reduziertem Druck konzentriert. Es wurde Ether zur Kristallisation hinzugegeben, um Boc-Ala-Ala-Ala-OPac zu erhalten.

[0131] Boc-Ala-Ala-Ala-OPac (8,99 g) wurde in 50 ml Dichlormethan/Trifluorethanol (TFE) (3:1) gelöst, und es wurden 100 ml Essigsäure hinzugegeben. Dann wurden 26,2 g an Zinkpulver hinzugegeben, und es wurde für 1 Stunde bei 35°C heftig gerührt. Die unlöslichen Bestandteile wurden abfiltriert, und der verbleibende Ansatz wurde unter reduziertem Druck konzentriert. Es wurde Ethylacetat hinzugegeben, der Ansatz wurde mit Wasser gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Das Ethylacetat wurde unter reduziertem Druck abdestilliert, und es wurde Ether zur Kristallisation zu dem Rückstand hinzugegeben, um Boc-Ala-Ala-Ala-OH zu erhalten.

[0132] Nachdem 9,96 g an 1-^{13}C-L-Leucin (MassTrace) in 75 ml 1N NaOH gelöst worden waren, wurde eine Lösung von Boc_2O (18 g) in Aceton (50 ml) hinzugegeben. Dann wurden 5,21 ml an Triethylamin tropfenweise hinzugegeben, und es wurde bei Raumtemperatur gerührt. Nach einer Stunde wurde eine Lösung von Boc_2O (9,8 g) in Aceton (40 ml) hinzugefügt, und es wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem das Aceton unter reduziertem Druck abdestilliert worden war, wurden 500 ml an Ethylacetat hinzugegeben und der Ansatz wurde mit 6N HCl gefällt, mit Wasser gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Nachdem das Trocknungsmittel abfiltriert war, wurden 10 ml an CHA hinzugegeben. Nach dem Waschen mit 1N HCl wurde Boc-(^{13}C-Leu) mittels gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung extrahiert, und die wässrige Schicht wurde mit 6N HCl angesäuert, mit Ethylacetat extrahiert, mit Wasser gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Nach Konzentrieren unter reduziertem Druck wurde das zurückbleibende ölige Produkt in Hexan gelöst, und es wurden 1,2 ml Wasser zur Kristallisation hinzugegeben, um Boc-(^{13}C-Leu)-OH·H_2O zu erhalten.

[0133] Es wurden 10 g an Boc-(^{13}C-Leu)-OH·H_2O in Ethanol (50 ml)-Wasser (20 ml) gelöst und 6,52 g an Cäsiumcarbonat, gelöst in 20 ml destilliertem Wasser, hinzugegeben. Nach Konzentrieren unter reduziertem Druck wurden Ethanol und Toluol hinzugegeben, und das verbleibende Wasser wurde azeotropisch entfernt, um ein Gelprodukt zu erhalten, das in 300 ml DMF suspendiert wurde. Zu der Suspension wurden 5,2 ml Benzylbromid tropfenweise bei Raumtemperatur und unter Rühren hinzugegeben. Nach Rühren bei Raumtemperatur für 45 Minuten wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck abdestilliert. Es wurde Ethylacetat hinzugegeben und mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen über wasserfreiem Natriumsulfat wurde das Ethylacetat unter reduziertem Druck abdestilliert, um ein öliges Produkt zu erhalten. Zu dem Produkt wurden 59 ml TFA hinzugegeben, und es wurde bei Raumtemperatur für 40 Minuten gerührt. Nachdem 8,37 g an p-Toluolsulfonsäure-Monohydrat zugegeben worden waren, wurde das TFA unter reduziertem Druck abdestilliert. Zum Kristallisieren wurde Diisopropylether zu dem Rückstand hinzugegeben, um TosOH·H-(^{13}C-Leu)-OBzl zu gewinnen.

[0134] Nach Lösen von 7,89 g an TosOH·H-(^{13}C-Leu)-OBzl, 5,57 g an Boc-Phe und 2,97 g an HOBt in 80 ml DMF wurden 4,03 ml an WSCD tropfenweise unter Eiskühlung hinzugegeben, wonach das Gemisch für 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt wurde. Es wurden Ethylacetat und Eiswasser hinzugegeben, was zu zwei getrennten Schichten führte. Die organische Schicht wurde mit gesättigtem Natriumhydrogencarbonat, Wasser, 0,1 N HCl und Wasser gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Nach Abdestillieren des Ethylacetats unter reduziertem Druck wurde Hexan zum Kristallisieren zugegeben, um Boc-Phe-(^{13}C-Leu)-OBzl zu erhalten.

[0135] Zu 3,71 g an Boc-Phe-(^{13}C-Leu)-OBzl wurden 17,5 ml an TFA hinzugegeben, gefolgt von 40-minütigem Rühren bei Raumtemperatur und Konzentrieren unter reduziertem Druck. Nach Zugabe von 2,2 ml an 4,6 N HCl/Dioxan, wurde Diisopropylether zur Kristallisation hinzugegeben. Die Kristalle wurden abfiltriert, unter reduziertem Druck getrocknet und in 50 ml DMF gelöst, wonach 2,13 g an Boc-Ala-Gly-OH·H_20 und 1,15 g an HOBt hinzugegeben wurden. Unter Eiskühlung wurden 1,56 ml an WSCD tropfenweise hinzugegeben, und das Gemisch wurde bei Raumtemperatur für 3 Stunden gerührt. Nach Abkühlen des Reaktionsgemischs wurde der präzipitierte Feststoff abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Dieses Material wurde in Ethylacetat gelöst und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Nach Konzentrieren unter reduziertem Druck wurde das Material mit Diisopropylether kristallisiert, um Boc-Ala-Gly-Phe-(^{13}C-Leu)-OBzl zu erhalten.

[0136] Zu 3,59 g an Boc-Ala-Gly-Phe-(^{13}C-Leu)-OBzl wurden 22,2 ml an TFA hinzugegeben, und es wurde bei Raumtemperatur für 45 Minuten gerührt. Nach Konzentrieren unter reduziertem Druck wurden 1,7 ml an 4,6 N HCl/Dioxan hinzugegeben, und es erfolgte eine Feststoffbildung mittels Diisopropylether. Der Feststoff wurde abfiltriert, in 50 ml DMF gelöst, und es wurden 2,03 g an Boc-Ala-Ala-Ala-OH und 1,06 g an 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin (HOObt) hinzugegeben. Unter Eiskühlung wurden 1,19 ml an WSCD tropfenweise hinzugefügt, und das Gemisch wurde bei Raumtemperatur für 4 Stunden gerührt. Nach Abkühlen des Reaktionsgemischs wurde Wasser hinzugefügt, und der präzipitierte Feststoff wurde abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Der Feststoff wurde in Methanol suspendiert, abfiltriert und unter reduziertem Druck ge-

trocknet. Das Material wurde in 100 ml Chloroform/Trifluorethanol gelöst, und Verunreinigungen wurden abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt, und es wurde Ether zu dem Rückstand hinzugegeben, gefolgt von Filtration, um Boc-Ala-Ala-Ala-Ala-Gly-Phe-(^{13}C-Leu)-OBzl zu erhalten.

[0137] Zu 2,68 g an Boc-Ala-Ala-Ala-Ala-Gly-Phe-(^{13}C-Leu)-OBzl wurden 19 ml an TFA hinzugefügt, wonach für 45 Minuten bei Raumtemperatur gerührt wurde. Nach Konzentrierung unter reduziertem Druck wurde Ether zur Feststoffbildung hinzugegeben. Der Feststoff wurde abfiltriert und in 20 ml DMF gelöst, und es wurden 0,80 g an Benzoyl-1-hydroxysuccinimid (Bz-ONSu) hinzugefügt. Nach tropfenweiser Zugabe von 0,5 ml Triethylamin wurde das Gemisch bei Raumtemperatur für 1 Stunde gerührt. Dann wurden weitere 20 ml DMF hinzugegeben und Triethylamin zugegeben, um den pH auf 6 einzustellen. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur für weitere 3 Stunden gerührt. Nach Abkühlen des Reaktionsgemischs wurde Wasser hinzugegeben, und der präzipitierte Feststoff wurde abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Der Feststoff wurde in Methanol suspendiert und abfiltriert, um Bz-Ala-Ala-Ala-Ala-Gly-Phe-(^{13}C-Leu)-OBzl zu erhalten.

[0138] Nach Lösen von 1,63 g an Bz-Ala-Ala-Ala-Ala-G1y-Phe-(^{13}C-Leu)-OBzl in 80 ml Dichlormethan/Hexafluorisopropylalkohol (3:1) wurden 0,32 g an 5% Palladium-Kohlenstoff, suspendiert in Wasser/Methanol, hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 4 Stunden bei 27°C gerührt, während Wasserstoffgas darin eingeleitet wurde. Ein Pulver-Filterpapier wurde verwendet, um den Katalysator abzufiltrieren, und das Filtrat wurde unter reduziertem Druck konzentriert. Es wurde Wasser zur Feststoffbildung hinzu gegeben, und der Feststoff wurde abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Der Feststoff wurde in Methanol suspendiert, abfiltriert und unter reduziertem Druck getrocknet. Dieses Material wurde in 50 ml Hexafluorisopropylalkohol gelöst und unter reduziertem Druck konzentriert. Zur Kristallisation wurde Ethylacetat zu dem Rückstand gegeben, um 1,19 g an Bz-Ala-Ala-Ala-Ala-Gly-Phe-(^{13}C-Leu) zu gewinnen.

[0139] Die Struktur und die mit ^{13}C markierte Position wurden mittels ^{13}C-NMR, Massenspektrometrie und Aminosäureanalyse bestätigt.
^{13}C-NMR (DMSO-d6, 270 MHz): 173,8 ppm (^{13}COOH)
PD-MS (m/z): 725,3 (M^+ + H), 748,2 (M^+ + Na), 764,4 (M^+ + K)
Aminosäureanalyse: Phenylalanin 1,00; Glycin 1,08; Alanin 4,09; Leucin 1,04 (hydrolytische Bedingungen: 6N HCl, 110°C, 22 Stunden)

[0140] Das Natriumsalz von Bz-Ala-Ala-Ala-Ala-Gly-Phe-(^{13}C-Leu) wurde erhalten, indem man Bz-Ala-Ala-Ala-Ala-Gly-Phe-(^{13}C-Leu) mit einem Äquivalent an 1M Natriumcarbonat-Lösung neutralisierte, gefolgt von Lyophilisierung.

Beispiel 25: Herstellung von Boc-Ala-Ala-Ala-Ala-Gly-Phe-(^{13}C-Leu) und dessen Natriumsalz

[0141] Boc-Ala-Ala-Ala-Ala-Gly-Phe-(^{13}C-Leu)-OBzl wurde wie in Beispiel 24 gewonnen. Nach Lösen von 1,62 g an Boc-Ala-Ala-Ala-Ala-G1y-Phe-(^{13}C-Leu)-OBzl in 40 ml an Dichlormethan/Hexafluorisopropylalkohol (3:1) wurden 0,16 g an 5% Palladium-Kohlenstoff, suspendiert in Wasser/Methanol, hinzugegeben. Es wurde für 1,5 Stunden Wasserstoffgas in das Reaktionsgemisch eingeleitet, während dieses bei 27°C gerührt wurde. Ein Pulver-Filterpapier wurde verwendet, um den Katalysator abzufiltrieren, und das Filtrat wurde unter reduziertem Druck konzentriert. Es wurde Acetonitril zur Feststoffbildung hinzu gegeben, und der Feststoff wurde abfiltriert. Der Feststoff wurde unter reduziertem Druck getrocknet und in 30 ml Hexafluorisopropylalkohol gelöst. Die unlöslichen Bestandteile wurden abfiltriert, und der verbleibende Ansatz wurde unter reduziertem Druck konzentriert. Es wurde Ethylacetat zu dem Rückstand gegeben, und das präzipitierte Gelmaterial wurde abfiltriert, um 1,56 g an Boc-Ala-Ala-Ala-Ala-Gly-Phe-(^{13}C-Leu) zu gewinnen.

[0142] Die Struktur und die mit ^{13}C markierte Position wurden mittels ^{13}C-NMR, Massenspektrometrie und Aminosäureanalyse bestätigt.
^{13}C-NMR (DMSO-d6, 270 MHz): 173,7 ppm (^{13}COOH)
PD-MS (m/z): 721,7 (M^+ + H), 743,9 (M^+ + Na), 759,9 (M^+ + K)
Aminosäureanalyse: Phenylalanin 1,00; Glycin 1,09; Alanin 4,07; Leucin 1,04 (hydrolytische Bedingungen: 6N HCl, 110°C, 22 Stunden)

[0143] Das Natriumsalz von Boc-Ala-Ala-Ala-Ala-Gly-Phe-(^{13}C-Leu) wurde erhalten, indem man Boc-Ala-Ala-Ala-Ala-Gly-Phe-(^{13}C-Leu) mit einem Äquivalent an 1M Natriumcarbonat-Lösung neutralisierte, gefolgt von Lyophilisierung.

Beispiel 26: Herstellung von Bz-Ala-Ala-Ala-Ala-(^{13}C-Gly)-Phe-Leu und dessen Natriumsalz

[0144] Nachdem 5 g an 1-^{13}C-Glycin (MassTrace) in einer wässrigen Lösung (17,5 ml) von Natriumhydroxid (2,56 g) gelöst worden waren und 3,65 ml an Triethylamin hinzugegeben worden waren, wurde eine Lösung von Boc_2O (15,1 ml) in Aceton (8 ml) hinzugegeben, und es wurde bei Raumtemperatur für 17 Stunden gerührt. Nach dem Konzentrieren unter reduziertem Druck wurde Citronensäure zu der wässrigen Schicht hinzugegeben, um den pH auf 4 einzustellen, und es wurde Natriumchlorid zum Aussalzen hinzugegeben, gefolgt von einer Extraktion mit Ethylacetat. Der Extrakt wurde direkt über Magnesiumsulfat getrocknet, und das Trocknungsmittel wurde abfiltriert. Nach Zugabe von 6,76 ml an CHA ließ man das Filtrat über Nacht im Kühlschrank stehen. Die präzipitierten Kristalle wurden abfiltriert, um Boc-(^{13}C-Gly)-OH·CHA zu gewinnen.

[0145] Es wurden 8 g an Boc-(^{13}C-Gly)-OH·CHA in 50 ml THF suspendiert, wonach 6,32 ml an 4,6 N HCl/Dioxan hinzugefügt wurden. Das Gemisch wurde in einem Ultraschallwaschgerät vollständig aufgeschlossen, und Ether wurde hinzugefügt. Der präzipitierte Feststoff wurde abfiltriert, und das Filtrat wurde unter reduziertem Druck konzentriert. Ether wurde zu dem Rückstand hinzugegeben, gefolgt von dem Abfiltern der unlöslichen Bestandteile und Konzentrieren unter reduziertem Druck. Der Rückstand wurde mit Hexan gewaschen und filtriert, um Boc-(^{13}C-Gly)-OH zu gewinnen.

[0146] Nach Lösen von 5,31 g an Boc-Phe, 7,87 g an TosOH·H-Leu-OBzl und 2,84 g an HOBt in 40 ml DMF wurden 3,72 ml an WSCD unter Eiskühlung hinzugegeben, wobei für 30 Minuten gerührt wurde, gefolgt von weiteren 2,5 Stunden Rührens bei Raumtemperatur. Nach Konzentrieren unter reduziertem Druck wurde Ethylacetat hinzugegeben, und es wurde nacheinander mit gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung, gesättigter wässriger Natriumchloridlösung, 10%iger wässriger Citronensäure-Lösung und gesättigter wässriger Natriumchloridlösung gewaschen, gefolgt von einer Trocknung über Magnesiumsulfat. Nach dem Konzentrieren unter reduziertem Druck wurden 43 ml an 4,6 N HCl/Dioxan hinzugegeben, und man ließ den Ansatz bei Raumtemperatur für 30 Minuten stehen. Nach der Konzentrierung unter reduziertem Druck wurde Ether hinzugegeben, und der präzipitierte Feststoff wurde abfiltriert, um HCl·H-Phe-Leu-OBzl zu erhalten.

[0147] Nach Lösen von 3,52 g an Boc-(^{13}C-Gly)-OH, 8,88 g an HCl·H-Phe-Leu-OBzl und 2,70 g an HOBt in 40 ml DMF wurden 3,54 ml an WSCD unter Eiskühlung und 30-minütigem Rühren hinzugegeben, gefolgt von weiteren 14 Stunden des Rührens bei Raumtemperatur. Nach der Konzentrierung unter reduziertem Druck wurde das Material in Ethylacetat gelöst, nacheinander mit gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung, gesättigter wässriger Natriumchloridlösung, 10%iger wässriger Citronensäure-Lösung und gesättigter wässriger Natriumchloridlösung gewaschen und anschließend über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach dem Konzentrieren unter reduziertem Druck wurde Boc-(^{13}C-Gly)-Phe-Leu-OBzl erhalten.

[0148] Zu 10,4 g an Boc-(^{13}C-Gly)-Phe-Leu-OBzl wurden 42,8 ml an 4,6 N HCl/Dioxan hinzugegeben, wonach man den Ansatz für 45 Minuten bei Raumtemperatur stehen ließ. Nach Konzentrieren unter reduziertem Druck wurde ein öliges Produkt erhalten. Das ölige Produkt wurde in 40 ml DMF gelöst, und es wurden 3,7 g an Boc-Ala und 2,66 g HOBt hinzugegeben, gefolgt von einer Zugabe von 3,49 ml an WSCD unter Eiskühlung; dieser eisgekühlte Ansatz wurde für 30 Minuten und dann für weitere 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Konzentrierung unter reduziertem Druck wurde das Material in Ethylacetat gelöst und mit gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung, gesättigter wässriger Natriumchloridlösung, 10%iger wässriger Citronensäure-Lösung und gesättigter wässriger Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Schicht wurde unter reduziertem Druck konzentriert, und der Rückstand wurde mit Diisopropylether gewaschen und abfiltriert, um Boc-Ala-(^{13}C-Gly)-Phe-Leu-OBzl zu erhalten.

[0149] Boc-Ala-Ala-Ala-OH wurde wie in Beispiel 24 erhalten.

[0150] Zu 3,59 g an Boc-Ala-(^{13}C-Gly)-Phe-Leu-OBzl wurden 22,2 ml an TFA hinzugegeben, wonach man den Ansatz bei Raumtemperatur für 45 Minuten stehen ließ. Nach dem Konzentrieren unter reduziertem Druck wurden 1,7 ml an 4,6 N HCl/Dioxan zugegeben, weiterhin erfolgte die Zugabe von Diisopropylether zur Feststoffbildung. Der Feststoff wurde abfiltriert und getrocknet. Dieses Material wurde in 50 ml DMF gelöst, und es wurden 2,03 g an Boc-Ala-Ala-Ala-OH und 1,06 g an HOObt hinzugegeben. Unter Eiskühlen wurden 1,19 ml an WSCD hinzugegeben, und der Ansatz wurde für 30 Minuten gerührt, wonach für weitere 14 Stunden bei Raumtemperatur gerührt wurde. Nach Abkühlen des Reaktionsgemischs wurde Wasser hinzugegeben, und das präzipitierte Gel wurde abfiltriert, um Boc-Ala-Ala-Ala-Ala-(^{13}C-Gly)-Phe-Leu-OBzl zu erhalten.

[0151] In eine Suspension von 2,00 g an Boc-Ala-Ala-Ala-Ala-(^{13}C-Gly)-Phe-Leu-OBzl und 1,34 ml Anisol

wurden 12 ml an wasserfreiem Fluorwasserstoff eingeleitet, während gerührt und auf einem Trockeneis-Methanolbad gekühlt wurde. Das Material wurde für 1 Stunde unter Kühlung bei –5°C gerührt, und der Fluorwasserstoff wurde bei dieser Temperatur abdestilliert. Es wurde Ether zu dem Rückstand hinzugegeben, und der präzipitierte Feststoff wurde abfiltriert. Der Feststoff wurde in 40 ml DMF-Wasser (9:1) suspendiert, und es wurden 704 mg an Bz-ONSu und 1,03 ml an Triethylamin hinzugegeben, gefolgt von Rühren bei Raumtemperatur für 6 Stunden. Dann wurden 40 ml an DMF-Wasser (9:1) hinzugegeben, und es wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es wurden weitere 541 mg an Bz-ONSu hinzugefügt, und es wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Konzentrieren unter reduziertem Druck wurde Ethylacetat zu dem Rückstand hinzugegeben, es erfolgte ein vollständiger Aufschluss in einem Ultraschallwaschgerät und schließlich eine Filtration, um 1,53 g an Bz-Ala-Ala-Ala-Ala-(^{13}C-Gly)-Phe-Leu zu gewinnen.

[0152] Die Struktur und die mit ^{13}C markierte Position wurden mittels ^{13}C-NMR, Massenspektrometrie und Aminosäureanalyse bestätigt.
^{13}C-NMR (DMSO-d6, 270 MHz): 168,2 ppm (^{13}COOH)
PD-MS (m/z): 725,5 (M^+ + H), 747,8 (M^+ + Na), 764,3 (M^+ + K)
Aminosäureanalyse: Phenylalanin 1,00; Glycin 1,14; Alanin 4,25; Leucin 1,07 (hydrolytische Bedingungen: 6N HCl, 110°C, 22 Stunden)

[0153] Das Natriumsalz von Bz-Ala-Ala-Ala-Ala-(^{13}C-Gly)-Phe-Leu wurde erhalten, indem man Bz-Ala-Ala-Ala-Ala-(^{13}C-Gly)-Phe-Leu mit einem Äquivalent an 1M Natriumcarbonatlösung neutralisierte, gefolgt von Lyophilisierung.

Beispiel 27: Herstellung von Bz-Tyr-O-(^{13}C-Et)

[0154] Nachdem 5,31 g an N-t-Boc-O-benzyl-L-tyrosin und 3,5 g an 1,2-^{13}C-Ethanol (MassTrace) in 30 ml an DMF gelöst worden waren, wurden 2,32 g an HOBt hinzugegeben, und es wurden 3,14 ml an WSCD tropfenweise unter Eiskühlung hinzugegeben, gefolgt von Rühren bei Raumtemperatur für 4 Stunden. Es wurde Ethylacetat hinzugegeben, und das Material wurde nacheinander mit Wasser, gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung, gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung, 1N HCl und gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung gewaschen, wonach eine Trocknung über wasserfreiem Natriumsulfat erfolgte. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck abdestilliert. Unter Kühlung bei –10°C wurden 20 ml an TFA zu dem resultierenden farblosen öligen Produkt hinzugegeben, gefolgt von Rühren für 10 Minuten und von weiteren 50 Minuten Rührens bei Raumtemperatur. Nach Konzentrieren unter reduziertem Druck wurden 3,73 ml an 4,6 N HCl/Dioxan hinzugegeben, und es wurde Diisopropylether zur Feststoffbildung hinzugegeben. Der Rückstand wurde abfiltriert und weiter mit Diisopropylether gewaschen. Dieser Rückstand wurde in 50 ml DMF gelöst, und es wurden 1,99 ml an Benzoylchlorid und 4,00 ml an Triethylamin hinzugegeben, wobei bei –10°C gekühlt wurde. Nach 30-minütigem Rühren und weiteren 3 Stunden Rührens bei Raumtemperatur wurde Ethylacetat hinzugegeben, und es wurde nacheinander mit gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung, gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung, gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung, 1N HCl und gesättigter wässriger Natriumchlorid-Lösung gewaschen, wonach eine Trocknung über wasserfreiem Natriumsulfat erfolgte. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck abdestilliert, und der Rückstand wurde mit Ether gewaschen und unter reduziertem Druck getrocknet. Dieses Material wurde aus Methanol umkristallisiert, um Bz-Tyr(Bzl)-O-(^{13}C-Et) zu erhalten. Dann wurden 800 mg an Bz-Tyr(Bzl)-O-(^{13}C-Et) in 30 ml Essigsäure gelöst, und es wurden 1600 mg an Palladium-Ruß hinzugegeben. Es wurde 6 Stunden lang Wasserstoffgas unter heftigem Rühren bei Raumtemperatur eingeleitet. Das Wasserstoffgas wurde abgestellt, und das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde ein Pulver-Filterpapier verwendet, um den Katalysator abzufiltrieren, und die Essigsäure wurde dann unter reduziertem Druck abdestilliert. Es wurde Hexan zugegeben, und die Konzentrierung unter reduziertem Druck ergab einen farblosen Feststoff. Es wurde Wasser hinzugegeben, und der Überstand wurde wiederholt durch Dekantieren entfernt. Das Material wurde in 20% wässriger Acetonitril-Lösung gelöst, gefolgt von Lyophilisierung. Dieses Material wurde einer RP-HPLC (YMC A-323 ODS, 30 × 250 mm, 20-50% wässr. CH_3CN mit 0,1% TFA (60 Minuten), Fließgeschwindigkeit 20 ml/min) unterzogen, um eine Hauptfraktion zu erhalten, die dann lyophilisiert wurde, um 350 mg an Bz-Tyr-O-(^{13}C-Et) zu erhalten.

[0155] Die Struktur und die mit ^{13}C markierte Position wurden mittels ^{13}C-NMR und Massenspektrometrie bestätigt.
^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 270 MHz): 14,2 ppm ($^{13}CH_3$), 61,6 ppm ($^{13}CH_2$)
PD-MS (m/z): 316,2 (M^+ + H)

Beispiel 28: Herstellung von Bz-Arg-(^{13}C-Leu)·HCl

[0156] TosOH-H-(^{13}C-Leu)-OBzl wurde wie in Beispiel 24 erhalten. Nachdem 18,1 g an TosOH-H-(^{13}C-Leu)-OBzl, 14,5 g an N-t-Boc-Argininhydrochlorid-Monohydrat (Boc-Arg·HCl·H_2O) und 5,95 g an HOBt in 130 ml DMF gelöst worden waren, wurden 8,4 ml an WSCD unter Kühlung bei –20°C hinzugegeben, wonach das Gemisch bei Raumtemperatur für 3,5 Stunden gerührt wurde. Nachdem das DMF abdestilliert worden war, wurde das Material in Ethylacetat gelöst und mit gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung, gesättigter wässriger Natriumchloridlösung, 0,1 N HCl und gesättigter wässriger Natriumchloridlösung gewaschen. Das Material wurde dann über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Nachdem das Ethylacetat unter reduziertem Druck abdestilliert worden war, wurde Hexan hinzugegeben, um Kristalle zu erhalten. Die Kristalle wurden abfiltriert, mit Hexan gewaschen und unter reduziertem Druck getrocknet. Der resultierende Rohkristall wurde in 50 ml Acetonitril gelöst. Zu dieser Lösung wurde Diisopropylether hinzugegeben, um Kristalle von Boc-Arg-(^{13}C-Leu)-OBzl·TosOH zu erhalten.

[0157] Zu 24,8 g an Boc-Arg-(^{13}C-Leu)-OBzl·TosOH wurden 50 ml an TFA hinzugegeben und das Gemisch wurde bei Raumtemperatur für 30 Minuten gerührt und unter reduziertem Druck konzentriert. Nachdem 20 ml an 4,6N HCl/Dioxan hinzugegeben worden waren, wurde Ether hinzugegeben, um Kristalle eines Hydrochlorids zu erhalten. Das Hydrochlorid wurde abfiltriert und unter reduziertem Druck getrocknet. Zu dem resultierenden Hydrochlorid wurden 5,12 g an Benzoesäure und 5,67 g an HOBt hinzugegeben, und das Gemisch wurde in 110 ml DMF gelöst. Zu dieser Lösung wurden 7,7 ml an WSCD unter Kühlung bei –20°C hinzugegeben, und das Gemisch wurde bei Raumtemperatur für 15 Stunden gerührt. Die Reaktionslösung wurde konzentriert, in Ethylacetat gelöst und mit 0,1N HCl, gesättigter wässriger Natriumchloridlösung und gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, um Kristalle zu erhalten. Die Kristalle wurden abfiltriert, mit Ethylacetat und Wasser gewaschen und in Essigsäure gelöst. Zu dieser Lösung wurde Ether hinzugegeben, um ein farbloses öliges Produkt zu erhalten. Dieses Produkt wurde in 250 ml Essigsäure gelöst. Zu dieser Lösung wurden 3 g an Palladium-Kohlenstoff hinzugefügt. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur gerührt, wobei für 2 Stunden Wasserstoffgas darin eingeleitet wurde. Der Katalysator wurde abfiltriert, und die Essigsäure wurde abdestilliert. Der Rückstand wurde in 9 ml an 4,6 N HCl/Dioxan gelöst. Es wurde Diisopropylether hinzugegeben, um Kristalle von 16,4 g an Bz-Arg-(^{13}C-Leu)·HCl zu erhalten.

[0158] Die Struktur und die mit ^{13}C markierte Position wurden mittels ^{13}C-NMR, Massenspektrometrie und Aminosäureanalyse bestätigt.
^{13}C-NMR (D_2O, 270 MHz): 177,5 ppm (^{13}COOH)
ESI-MS (m/z): 393,2 (M^+ + H)
Aminosäureanalyse: Arginin: 1,00; Leucin 1,02 (hydrolytische Bedingungen: 6N HCl, 110°C, 22 Stunden)

Beispiel 29: Bz-L-Phe-(^{13}C-Leu)-Atemtest

[0159] Der Bz-L-Phe-(^{13}C-Leu)-Atemtest wurde durchgeführt wie in Beispiel 15-1, wobei 250 mg/kg an Bz-L-Phe-(^{13}C-Leu)·Na bei den Ratten mit chronischer Pankreatitis (n=4) und bei den normalen Ratten (n=4) oral verabreicht und das Ausmaß der Zunahme der $^{13}CO_2$-Konzentration ($\Delta^{13}C$(‰)) im CO_2 des Atems nach der Verabreichung gemessen wurde. Der $\Delta^{13}C$(‰)-Wert betrug 10 Minuten nach der Verabreichung 6,97 ± 6,09 ‰ bei den Ratten mit chronischer Pankreatitis und 115,02 ± 71,26 ‰ bei den normalen Ratten; somit war der Wert bei den Ratten mit chronischer Pankreatitis signifikant niedriger als bei den normalen Ratten ($p<0,05$ (ANOVA mit Fischer LSD) (Tabelle 1)).

Tabelle 1

Bz-L-Phe-(^{13}C-Leu)-Atemtest	
	$\Delta^{13}C$ (‰) bei 10 min
Chronische Pankreatitis #1	1,61
Chronische Pankreatitis #2	3,28
Chronische Pankreatitis #3	17,21
Chronische Pankreatitis #4	5,77
Normal #1	31,29
Normal #2	60,25
Normal #3	165,37
Normal #4	203,16

[0160] Bz-L-Phe-(^{13}C-Leu)·Na wurde den Ratten mit chronischer Pankreatitis (n=4) und den normalen Ratten

(n=4) in einer Menge von 250 mg/kg oral verabreicht.

Beispiel 30: Bz-Tyr-(^{13}C-Leu)-Atemtest

[0161] Der Bz-Tyr-(^{13}C-Leu)-Atemtest wurde durchgeführt wie in Beispiel 15-1, wobei 250 mg/kg an Bz-Tyr-(^{13}C-Leu)·Na bei den Ratten mit chronischer Pankreatitis (n=4) und bei den normalen Ratten (n=4) oral verabreicht und das Ausmaß der Zunahme der $^{13}CO_2$-Konzentration ($\Delta^{13}C$(‰)) im ausgeatmeten CO_2 nach der Verabreichung gemessen wurde. Der $\Delta^{13}C$(‰)-Wert betrug 20 Minuten nach der Verabreichung 3,66 ± 3,24 ‰ bei den Ratten mit chronischer Pankreatitis und 69,53 ± 32,50 ‰ bei den normalen Ratten; somit war der Wert bei den Ratten mit chronischer Pankreatitis signifikant niedriger als bei den normalen Ratten ($p<0,05$ (ANOVA mit Fischer LSD) (Tabelle 2)).

Tabelle 2

Bz-Tyr-(^{13}C-Leu)-Atemtest	
	$\Delta^{13}C$ (‰) bei 20 min
Chronische Pankreatitis #1	8,76
Chronische Pankreatitis #2	3,58
Chronische Pankreatitis #3	2,44
Chronische Pankreatitis #4	-0,15
Normal #1	111,32
Normal #2	65,76
Normal #3	21,02
Normal #4	80,02

[0162] Bz-Tyr-(^{13}C-Leu)·Na wurde den Ratten mit chronischer Pankreatitis (n=4) und den normalen Ratten (n=4) in einer Menge von 250 mg/kg oral verabreicht.

Beispiel 31: Arg-(^{13}C-Leu)-Atemtest

[0163] Der Arg-(^{13}C-Leu)-Atemtest wurde durchgeführt wie in Beispiel 15-1, wobei 30 mg/kg an Arg-(^{13}C-Leu) bei den Ratten mit chronischer Pankreatitis (n=4) und bei den normalen Ratten (n=4) oral verabreicht und das Ausmaß der Zunahme der $^{13}CO_2$-Konzentration ($\Delta^{13}C$(‰)) im ausgeatmeten CO_2 nach der Verabreichung gemessen wurde. Der $\Delta^{13}C$(‰)-Wert betrug 30 Minuten nach der Verabreichung 4,37 ± 1,83 ‰ bei den Ratten mit chronischer Pankreatitis und 12,37 ± 2,26 ‰ bei den normalen Ratten; somit war der Wert bei den Ratten mit chronischer Pankreatitis signifikant niedriger als bei den normalen Ratten ($p<0,01$ (ANOVA mit Fischer LSD) (Tabelle 3)).

Tabelle 3

Arg-(^{13}C-Leu)-Atemtest	
	$\Delta^{13}C$ (‰) bei 30 min
Chronische Pankreatitis #1	3,74
Chronische Pankreatitis #2	6,97
Chronische Pankreatitis #3	4,87
Chronische Pankreatitis #4	1,92
Normal #1	10,30
Normal #2	13,74
Normal #3	15,37
Normal #4	10,08

[0164] Arg-(^{13}C-Leu) wurde den Ratten mit chronischer Pankreatitis (n=4) und den normalen Ratten (n=4) in einer Menge von 30 mg/kg oral verabreicht.

Beispiel 32: Bz-Ala-Ala-Ala-Ala-(^{13}C-Gly)-Phe-Leu-Atemtest

[0165] Der Bz-Ala-Ala-Ala-Ala-(^{13}C-Gly)-Phe-Leu-Atemtest wurde durchgeführt wie in Beispiel 15-1, wobei 420 mg/kg an Bz-Ala-Ala-Ala-Ala-(^{13}C-Gly)-Phe-Leu·Na bei den Ratten mit chronischer Pankreatitis (n=2) und bei den normalen Ratten (n=2) oral verabreicht und das Ausmaß der Zunahme der $^{13}CO_2$-Konzentration

($\Delta^{13}C$(‰)) im ausgeatmeten CO_2 nach der Verabreichung gemessen wurde. Der $\Delta^{13}C$(‰)-(Mittel-)Wert betrug 15 Minuten nach der Verabreichung 0,61 ‰ bei den Ratten mit chronischer Pankreatitis und 33,32 ‰ bei den normalen Ratten; somit war der Wert bei den Ratten mit chronischer Pankreatitis niedriger als bei den normalen Ratten (Tabelle 4).

Tabelle 4

Bz-Ala-Ala-Ala-Ala-(^{13}C-Gly)-Phe-Leu-Atemtest	
	$\Delta^{13}C$ (‰) bei 15 min
Chronische Pankreatitis #1	-1,90
Chronische Pankreatitis #2	3,12
Normal #1	23,47
Normal #2	43,16

[0166] Bz-Ala-Ala-Ala-Ala-(^{13}C-Gly)-Phe-Leu·Na wurde den Ratten mit chronischer Pankreatitis (n=2) und den normalen Ratten (n=2) in einer Menge von 420 mg/kg oral verabreicht.

Beispiel 33: Bz-Arg-(^{13}C-Leu)-Atemtest

[0167] Der Bz-Arg-(^{13}C-Leu)-Atemtest wurde durchgeführt wie in Beispiel 15-1, wobei 100 mg/kg an Bz-Arg-(^{13}C-Leu)·HCl bei den Ratten mit chronischer Pankreatitis (n=3) und bei den normalen Ratten (n=3) oral verabreicht und das Ausmaß der Zunahme der $^{13}CO_2$-Konzentration ($\Delta^{13}C$(‰)) im ausgeatmeten CO_2 nach der Verabreichung gemessen wurde. Der $\Delta^{13}C$(‰)-Wert betrug 20 Minuten nach der Verabreichung 3,05 ± 6,97 ‰ bei den Ratten mit chronischer Pankreatitis und 68,77 ± 12,01 ‰ bei den normalen Ratten; somit war der Wert bei den Ratten mit chronischer Pankreatitis signifikant niedriger als bei den normalen Ratten ($p<0,01$ (ANOVA mit Fischer LSD) (Tabelle 5)).

Tabelle 5

Bz-Arg-(^{13}C-Leu)-Atemtest	
	$\Delta^{13}C$ (‰) bei 20 min
Chronische Pankreatitis #1	3,69
Chronische Pankreatitis #2	11,25
Chronische Pankreatitis #3	-5,79
Normal #1	51,94
Normal #2	74,46
Normal #3	79,91

Formulierung Beispiel 1 : Flüssigkeit für die innere Anwendung

[0168] Zu 5 Gewichtsanteilen an Bz-DL-Phe-(^{13}C-Leu)·Na wurde gereinigtes Wasser hinzugegeben, um eine Gesamtheit von 100 Gewichtsanteilen herzustellen, und diese Gesamtmenge wurde gelöst und über einen Millipore-Filter sterilisiert. Das Filtrat wurde in eine Phiolenflasche eingebracht und darin verschlossen, um eine Flüssigkeit für die innere Anwendung zu erhalten.

Vorteile der Erfindung:

[0169] Die vorliegende Erfindung stellt ein hochempfindliches Testverfahren für die Pankreasexokrinfunktion bereit, das wenig Stress bei einem Patienten erzeugt und rasch genaue Ergebnisse liefert.

[0170] Konventionelle einfache Tests für die Pankreasexokrinfunktion sind weniger empfindlich und sind daher zu weniger gebräuchlichen Diagnosetests für Pankreatitis geworden; sie werden derzeit allgemein dafür verwendet, die Prognose der Pankreatitis weiterzuverfolgen, was stets wiederholte Tests erforderlich macht. Demgegenüber würde ein hochempfindlicher einfacher Test für die Pankreasexokrinfunktion häufig für die Diagnose der Pankreatitis bei einer physischen Untersuchung eingesetzt werden. Weiterhin könnte dieser Test dazu verwendet werden, um den Schweregrad chronischer Pankreatitis zu bestimmen, um das Einsetzen der schweren, fulminanten Pankreatitis vorherzubestimmen, die nach wie vor mit hoher Mortalität (30%) verbunden ist, um Ursachen der Pankreatitis festzustellen, und um Pankreaskrebs frühzeitig zu diagnostizieren. Er wäre außerdem nützlich als Diagnoseverfahren, um bei ambulanten Patienten Pankreatitis bei der medizini-

schen Untersuchung auszuschließen.

Patentansprüche

1. Verwendung einer Aminosäure oder eines Peptids, die/das wenigstens ein ^{13}C- oder ^{14}C-Atom enthält, oder eines pharmazeutisch verträgliches Salzes davon, welches nicht Bz-Tyr-^{13}C-PABA ist, bei der Herstellung eines Diagnosemittels für Pankreasexokrinfunktion, wobei das Diagnosemittel in einem Atemtest verwendet wird.

2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Aminosäuremolekül ein ^{13}C- oder ^{13}C-Atom enthält.

3. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Aminosäure oder das Peptid eine modifizierende oder schützende Gruppe aufweist und die modifizierende oder schützende Gruppe ein ^{13}C- oder ^{14}C-Atom enthält.

4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Aminosäure oder das Peptid durch die folgende Formel (I) wiedergegeben wird:

$$X_1\text{-}R_1\text{-}Y_1 \qquad (I),$$

worin X_1 ein Wasserstoffatom oder eine Schutzgruppe ist,
R_1 ein Peptid mit 2 bis 50 Aminosäuren, eine Aminosäure oder eine Einfachbindung ist,
Y_1 eine Aminosäure ist, die optional eine Schutzgruppe aufweist.

5. Verwendung nach Anspruch 4, wobei wenigstens eine der Aminosäuren in R_1 und Y_1 oder wenigstens eine Estergruppe in Y_1, wenn die Aminosäure in Y_1 mit der Estergruppe geschützt ist, mit ^{13}C oder ^{14}C markiert ist.

6. Verwendung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die Aminosäure oder das Peptid oder das pharmazeutisch verträgliche Salz davon ein Substrat für eine Protease oder für Proteasen sein kann, so daß sie/es anschließend unter Erzeugung von $^{13}CO_2$ oder $^{14}CO_2$ decarboxyliert werden kann.

7. Verwendung nach Anspruch 6, wobei die Protease oder die Proteasen Pankreasexokrinproteasen sind.

8. Verwendung nach Anspruch 7, wobei die Pankreasexokrinprotease oder die -proteasen aus der Gruppe ausgewählt ist/sind, bestehend aus Chymotrypsin, Trypsin, Elastase und Carboxypeptidasen.

9. Eine mit ^{13}C oder ^{14}C markierte Verbindung oder ein Salz davon für die Verwendung in der Diagnose, wobei die mit ^{13}C oder ^{14}C markierte Verbindung durch die folgende Formel (II) wiedergegeben wird:

$$X_2\text{-}R_2\text{-}Y_2\text{-}Z_1 \qquad (II),$$

worin X_2 ein Wasserstoffatom oder eine Schutzgruppe ist,
R_2 ein Peptid mit 2 bis 5 Aminosäuren, eine Aminosäure oder eine Einfachbindung ist,
Y_2 eine Aminosäure ist,
Z_1 eine Aminosäure ist, die optional eine Schutzgruppe aufweist, und wobei wenigstens eine der Aminosäuren in R_2, Y_2 und Z_1 oder wenigstens eine der Schutzgruppen in X_2 und Z_1, wenn die Schutzgruppen ein Kohlenstoffatom enthalten, mit ^{13}C oder ^{14}C markiert ist,
und worin
1) in dem Fall, daß X_2 eine Schutzgruppe und R_2 eine Einfachbindung ist,
1-i) Y_2 eine andere Aminosäure als D-Ala ist, wenn Z_1 D-Ala ist,
1-ii) Y_2 eine andere Aminosäure als Leu ist, wenn Z_1 Ala-OMe ist,
1-iii) Y_2 eine andere Aminosäure als Gly ist, wenn Z_1 Pro-OMe ist,
2) in dem Fall, daß X_2 eine Schutzgruppe und R_2 eine Aminosäure ist,
2-i) Y_2 eine andere Aminosäure als Val ist, wenn Z_1 D-Ala ist,
2-ii) Y_2 eine andere Aminosäure als Leu ist, wenn Z_1 Ala ist,
2-iii) Y_2 eine andere Aminosäure als Pro ist, wenn Z_1 Gly-OEt ist,
3) in dem Fall, daß X_2 eine Schutzgruppe, R_2 ein Peptid mit zwei Aminosäuren und Z_1 Gln, welches optional SEt aufweist, ist, Y_2 eine andere Aminosäure als Ala ist,
4) in dem Fall, daß X_2 ein Wasserstoffatom und R_2 eine Einfachbindung ist,
4-i) Y_2 eine andere Aminosäure als Ala ist, wenn Z_1 Pro ist,

4-ii) Y_2 eine andere Aminosäure als Gly, Val, Leu und Tyr ist, wenn Z_1 Leu ist,
4-iii) Y_2 eine andere Aminosäure als Gly ist, wenn Z_1 Phe ist,
4-iv) Y_2 eine andere Aminosäure als Gly ist, wenn Z_1 Gly-OEt ist,
4-v) Y_2 eine andere Aminosäure als Leu ist, wenn Z_1 Ala-OMe ist,
5) in dem Fall, daß X_2 ein Wasserstoffatom und R_2 eine Aminosäure ist,
5-i) Y_2 eine andere Aminosäure als Pro ist, wenn Z_1 Leu ist,
5-ii) Y_2 eine andere Aminosäure als Pro ist, wenn Z_1 Phe ist,
5-iii) Y_2 eine andere Aminosäure als Gly ist, wenn Z_1 Gly ist,
5-iv) Y_2 eine andere Aminosäure als Leu ist, wenn Z_1 Pro ist,
5-v) Y_2 eine andere Aminosäure als Asp ist, wenn Z_1 Met ist,
5-vi) Y_2 eine andere Aminosäure als Leu ist, wenn Z_1 Asn-Bzl ist,
6) in dem Fall, daß X_2 ein Wasserstoffatom und R_2 ein Peptid aus 2 Aminosäuren ist,
6-i) Y_2 eine andere Aminosäure als Leu ist, wenn Z_1 Leu ist,
6-ii) Y_2 eine andere Aminosäure als Asp ist, wenn Z_1 Ser ist, und
7) in dem Fall, daß X_2 ein Wasserstoffatom und R_2 ein Peptid aus 3 Aminosäuren ist,
7-i) Y_2 eine andere Aminosäure als Phe ist, wenn Z_1 Leu ist,
7-ii) Y_2 eine andere Aminosäure als Phe ist, wenn Z_1 Met ist,
unter der Bedingung, daß die folgenden Verbindungen ausgeschlossen sind: 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 und Tyr-Gly-Gly-Phe-Met, worin Ac Acetyl ist, Et Ethyl ist, Me Methyl ist, Boc t-Butyloxycarbonyl ist, Dansyl Dansyl ist, Cbz Carbobenzyloxy ist, Bzl Benzoyl ist, Z Benzyloxycarbonyl ist, SEt Ethanthiol ist und NMe_2 Dimethylamino ist.

10. Mit ^{13}C oder ^{14}C markierte Verbindung oder Salz davon für die Verwendung in der Diagnose gemäß Anspruch 9, worin
1) in dem Fall, daß X_2 eine Schutzgruppe ist, die aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus Dansyl, Cbz, Ac und Z, und R_2 eine Aminosäure oder ein Peptid mit 2 Aminosäuren ist,
1-i) Y_2 eine andere Aminosäure als Val ist, wenn Z_1 D-Ala ist,
1-ii) Y_2 eine andere Aminosäure als Leu ist, wenn Z_1 Ala ist,
1-iii) Y_2 eine andere Aminosäure als Pro ist, wenn Z_1 Gly-OEt ist,
1-iv) Y_2 eine andere Aminosäure als Ala ist, wenn Z_1 Gln(NMe_2) oder Gln(NMe_2)-SEt ist,
2) in dem Fall, daß X_2 Ac oder Boc und R_2 eine Einfachbindung ist,
2-i) Y_2 eine andere Aminosäure als D-Ala ist, wenn Z_1 D-Ala ist,
2-ii) Y_2 eine andere Aminosäure als Gly ist, wenn Z_1 Pro-OMe ist,
2-iii) Y_2 eine andere Aminosäure als Leu ist, wenn Z_1 Ala-OMe ist,
3) in dem Fall, daß X_2 ein Wasserstoffatom und R_2 eine Aminosäure oder ein Peptid aus 2 oder 3 Aminosäuren ist,
3-i) Y_2 eine andere Aminosäure als Pro, Leu und Phe ist, wenn Z_1 Leu ist,
3-ii) Y_2 eine andere Aminosäure als Pro ist, wenn Z_1 Phe ist,
3-iii) Y_2 eine andere Aminosäure als Gly ist, wenn Z_1 Gly ist,
3-iv) Y_2 eine andere Aminosäure als Leu ist, wenn Z_1 Pro ist,
3-v) Y_2 eine andere Aminosäure als Asp und Phe ist, wenn Z_1 Met ist,
3-vi) Y_2 eine andere Aminosäure als Leu ist, wenn Z_1 Asn-Bzl ist,
3-vii) Y_2 eine andere Aminosäure als Asp ist, wenn Z_1 Ser ist,
4) in dem Fall, daß X_2 ein Wasserstoffatom und R_2 eine Einfachbindung ist,
4-i) Y_2 eine andere Aminosäure als Ala ist, wenn Z_1 Pro ist,
4-ii) Y_2 eine andere Aminosäure als Gly, Val, Leu und Tyr ist, wenn Z_1 Leu ist,
4-iii) Y_2 eine andere Aminosäure als Gly ist, wenn Z_1 Phe ist,
4-iv) Y_2 eine andere Aminosäure als Gly ist, wenn Z_1 Gly-OEt ist,
4-v) Y_2 eine andere Aminosäure als Leu ist, wenn Z_1 Ala-OMe ist.

11. Mit ^{13}C oder ^{14}C markierte Verbindung oder Salz davon für die Verwendung in der Diagnose gemäß Anspruch 9 oder 10, worin X_2 aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus Ac, Bz (Benzoyl), Boc, Z und einem Wasserstoffatom.

12. Mit ^{13}C oder ^{14}C markierte Verbindung oder Salz davon für die Verwendung in der Diagnose nach einem der Ansprüche 9 bis 11, wobei die Verbindung oder das Salz davon ein Substrat für eine Protease oder für Proteasen sein kann, so daß sie/es anschließend unter Erzeugung von $^{13}CO_2$ oder $^{14}CO_2$ decarboxyliert werden

kann.

13. Mit ^{13}C oder ^{14}C markierte Verbindung oder Salz davon für die Verwendung in der Diagnose gemäß Anspruch 12, wobei die Protease oder die Proteasen Pankreasexokrinproteasen sind.

14. Mit ^{13}C oder ^{14}C markierte Verbindung oder Salz davon für die Verwendung in der Diagnose gemäß Anspruch 13, wobei die Pankreasexokrinprotease oder die -proteasen aus der Gruppe ausgewählt sind, bestehend aus Chymotrypsin, Trypsin, Elastase und Carboxypeptidasen.

15. Mit ^{13}C oder ^{14}C markierte Verbindung oder Salz davon für die Verwendung in der Diagnose gemäß einem der Ansprüche 9 bis 14, wobei X_2 eine Schutzgruppe und R_2 eine Einfachbindung ist.

16. Mit ^{13}C oder ^{14}C markierte Verbindung oder Salz davon für die Verwendung in der Diagnose gemäß einem der Ansprüche 9 bis 15, worin
(1) wenigstens eine der Aminosäuren in Y_2 und Z_1 Arg oder Lys ist,
(2) wenigstens eine der Aminosäuren in Y_2 und Z_1 eine aromatische Aminosäure, Leu, His oder Met ist,
(3) wenigstens eine der Aminosäuren in Y_2 und Z_1 eine neutrale und nicht-aromatische Aminosäure ist,
(4) die Aminosäure in Z_1 eine andere Aminosäure als Arg, Lys und Pro ist oder
(5) die Aminosäure in Z_1 Arg oder Lys ist.

17. Mit ^{13}C oder ^{14}C markierte Verbindung oder Salz davon für die Verwendung in der Diagnose gemäß einem der Ansprüche 9 bis 16, worin X_2 aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus einem Wasserstoffatom, Bz, Ac und Boc, Y_2 aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus Phe, Ala, Gly, Tyr und Arg, Z_1 aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus Leu, welches optional eine Schutzgruppe aufweist, Ala, welches optional eine Schutzgruppe aufweist, und Gly, welches optional eine Schutzgruppe aufweist.

18. Mit ^{13}C oder ^{14}C markierte Verbindung oder Salz davon für die Verwendung in der Diagnose gemäß Anspruch 17, worin Z_1 aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus Leu, Ala, Gly, Leu-OMe, Leu-OEt, Ala-OMe, Ala-OEt, Gly-OMe und Gly-OEt.

19. Mit ^{13}C oder ^{14}C markierte Verbindung oder Salz davon für die Verwendung in der Diagnose gemäß einem der Ansprüche 9 bis 18, worin Z_1 eine mit ^{13}C oder ^{14}C markierte Aminosäure ist, die optional eine Schutzgruppe aufweist.

20. Mit ^{13}C oder ^{14}C markierte Verbindung oder Salz davon für die Verwendung in der Diagnose gemäß Anspruch 9, welche aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus den folgenden Verbindungen besteht:
(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,
(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 und
(v) Bz-Ala-Ala-Ala-Ala-^{13}C-Gly-Phe-Leu.

21. Verwendung einer mit ^{13}C oder ^{14}C markierten Verbindung nach einem der Ansprüche 9 bis 20 oder eines pharmazeutisch verträglichen Salzes davon bei der Herstellung eines Diagnosemittels für Pankreasexo-

krinfunktion, wobei das Diagnosemittel in einem Atemtest verwendet wird.

22. Verwendung einer mit ^{13}C oder ^{14}C markierten Verbindung nach einem der Ansprüche 9 bis 20 oder eines pharmazeutisch verträglichen Salzes davon bei der Herstellung eines Diagnosemittels für chronische Pankreatitis oder akute Pankreatitis.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1

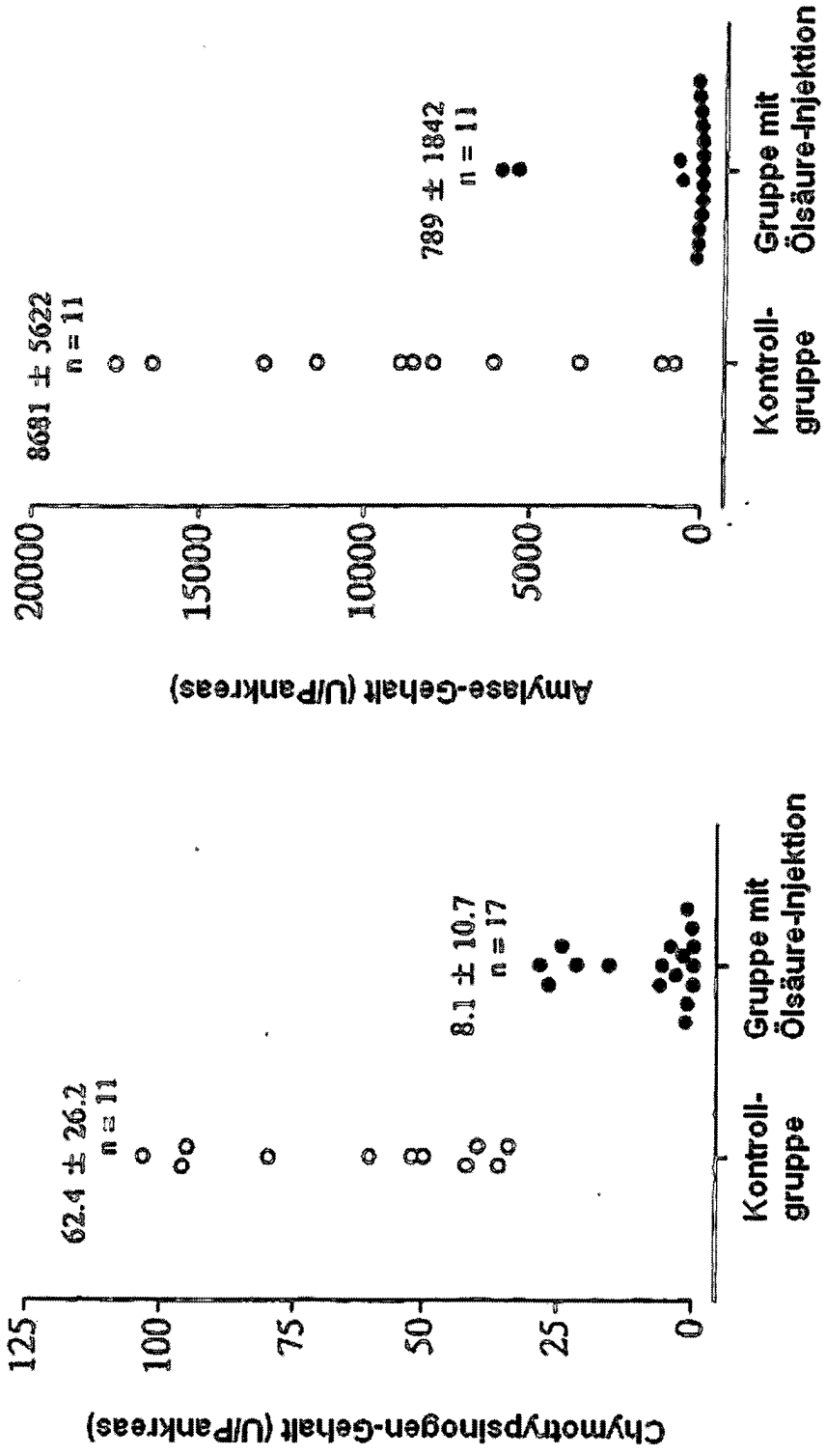


FIG. 2

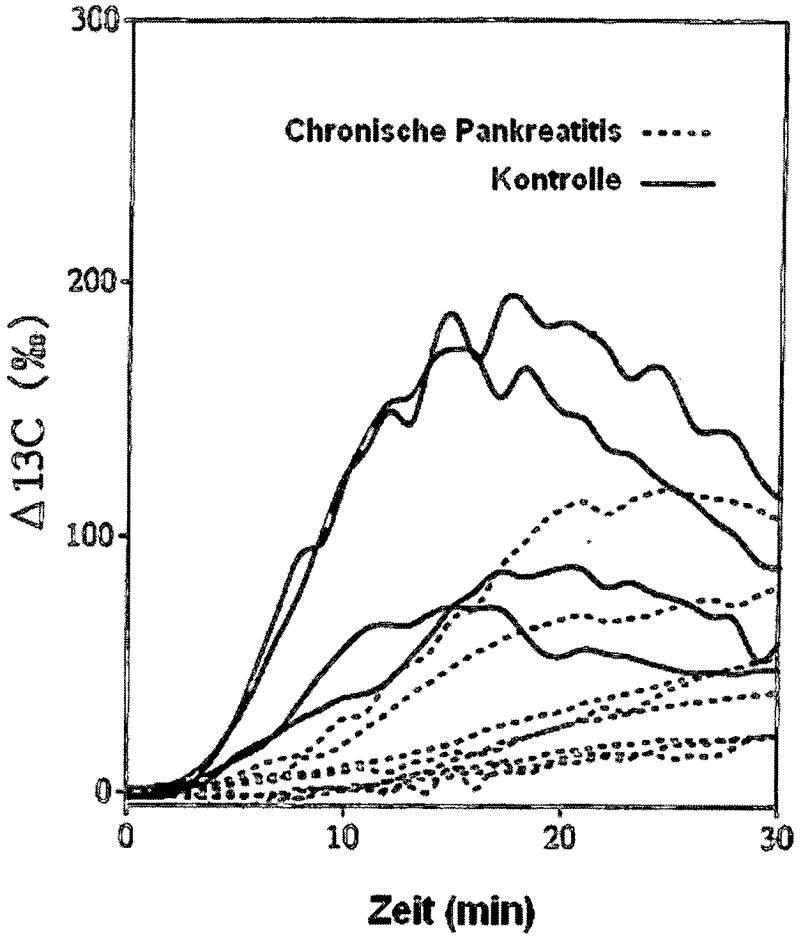

300
200
100
0
Chronische Pankreatitis
Kontrolle
Δ 13C (‰)
0
10
20
30
Zeit (min)

FIG. 3

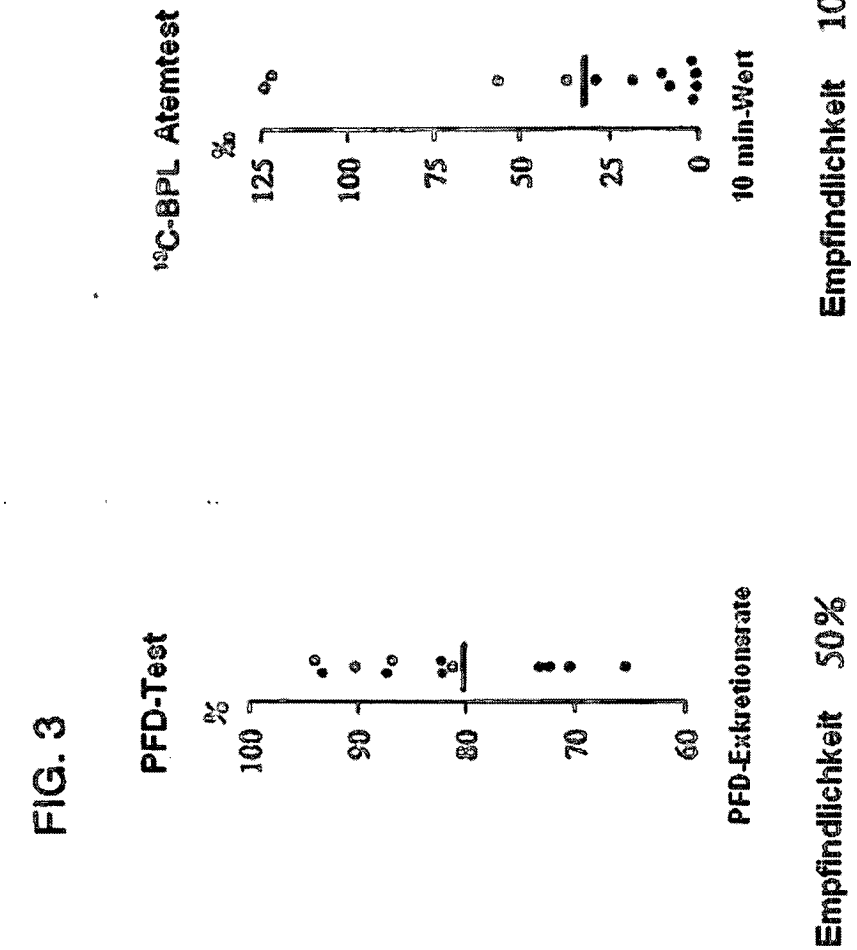

PFD-Test
%
100
90
80
70
60
PFD-Exkretionsrate
Empfindlichkeit 50%
^{13}C-BPL Atemtest
‰
125
100
75
50
25
0
10 min-Wert
Empfindlichkeit 100%

FIG. 4

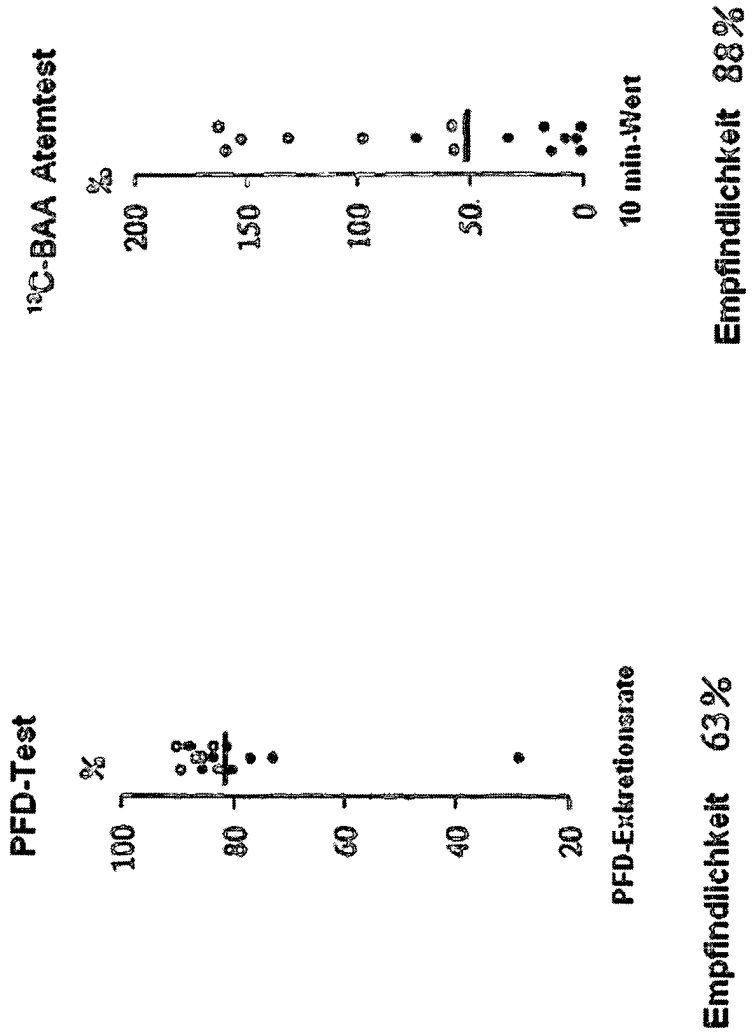
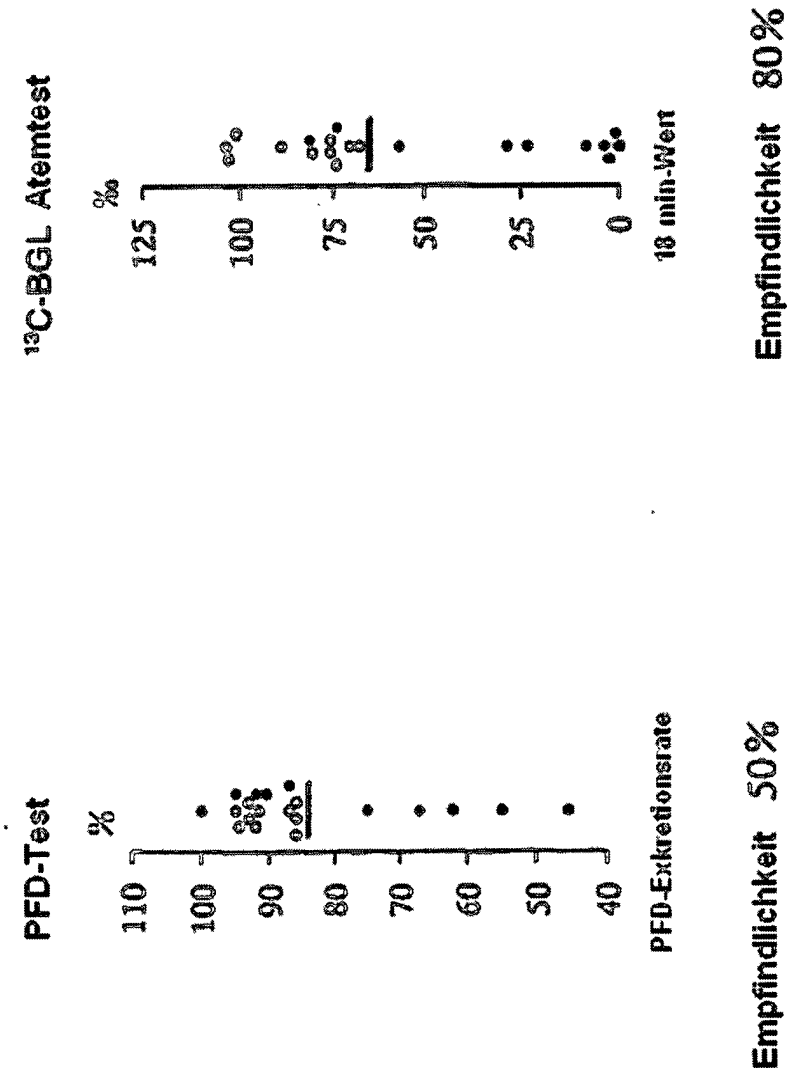

PFD-Test
%
100
80
60
40
20
PFD-Exkretionsrate
Empfindlichkeit 63 %
^{13}C-BAA Atemtest
‰
200
150
100
50
0
10 min-Wert
Empfindlichkeit 88 %

FIG. 5


PFD-Test
%
110
100
90
80
70
60
50
40
PFD-Extretionsrate
Empfindlichkeit 50%
13C-BGL Atemtest
‰
125
100
75
50
25
0
18 min-Wert
Empfindlichkeit 80%