



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 831**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

C12Q 1/34 (2006.01)

C12Q 1/37 (2006.01)

C12Q 1/40 (2006.01)

C12Q 1/527 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03705358 .4**

96 Fecha de presentación : **20.02.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1486785**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.12.2004**

54

Título: **Agentes de prueba para evaluar el efecto farmacológico de fármacos, y procedimiento y reactivos para el cribado de fármacos que presentan un efecto de administración excelente y/o poco efecto secundario de entre fármacos que comprenden enzimas, inhibidores enzimáticos o ligandos de receptores y/o profármacos de los mismos.**

30

Prioridad: **21.02.2002 JP 2002-44526**
21.02.2002 JP 2002-44791

73

Titular/es: **Tokyo Gas Company Limited**
5-20 Kaigan 1-chome
Minato-ku, Tokyo 105-8527, JP

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.06.2011

72

Inventor/es: **Ito, Asuka;**
Kohno, Tadashi;
Hosoi, Isaburo;
Hirayama, Junko y
Maeda, Kenji

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.06.2011

74

Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 361 831 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Agentes de prueba para evaluar el efecto farmacológico de fármacos, y procedimiento y reactivos para el cribado de fármacos que presentan un efecto de administración excelente y/o poco efecto secundario de entre fármacos que comprenden enzimas, inhibidores enzimáticos o ligandos de receptores y/o profármacos de los mismos.

Campo técnico

La presente invención se refiere a un reactivo de diagnóstico para evaluar el efecto farmacológico de un medicamento, y a un procedimiento y a un reactivo para seleccionar agentes farmacéuticos que comprenden cada uno una enzima, un inhibidor enzimático o un ligando de receptor y/o profármacos de los agentes farmacéuticos para seleccionar uno o unos que presentan una eficacia medicamentosa elevada y/o poco efecto secundario.

Antecedentes de la invención

Se ha determinado el efecto farmacológico de un medicamento basándose en el cambio en las condiciones clínicas (mejora o aparición de un efecto secundario).

La determinación basada en las condiciones clínicas sólo es posible tras administrarse un medicamento durante un determinado periodo de tiempo.

También se ha utilizado la monitorización del nivel en sangre en la que se evalúa indirectamente el efecto farmacológico de un medicamento determinando si el nivel en sangre de un agente farmacéutico derivado del medicamento se encuentra dentro del intervalo terapéutico o el intervalo de seguridad que se obtiene de manera empírica. Sin embargo, este procedimiento sólo tiene efecto con la condición previa de que exista una buena correlación entre el efecto farmacológico y el nivel en sangre en cierta medida y que esté definido claramente el intervalo terapéutico o el intervalo de seguridad ("Hyojunyakurigaku" (Standard Textbook of Pharmacology) 5ª edición, editado por Akio Ebihara (1997) pág. 31), y además el procedimiento es únicamente indirecto como el procedimiento para evaluar un efecto farmacológico.

Un objetivo de la presente invención consiste en evaluar el efecto farmacológico de un medicamento proporcionando un reactivo de diagnóstico para determinar de manera precisa en un plazo de tiempo corto el grado de potenciación o inhibición de la función de una diana (por ejemplo, una bioenzima o receptor) para el medicamento tras la administración del medicamento.

En el cribado de compuestos terapéuticos, se selecciona un compuesto que presenta un efecto terapéutico tan alto y un efecto secundario tan bajo como sea posible. La mayoría de los medicamentos ejercen los efectos farmacológicos inhibiendo o potenciando la función de sus dianas (por ejemplo, bioenzimas o receptores). Por lo tanto, el efecto farmacológico de un medicamento puede evaluarse determinando el grado de inhibición o potenciación de la función de una diana para el medicamento.

En la actualidad, el grado de inhibición o potenciación de la función de una diana se evalúa *in vitro*. En los últimos años, lo más común ha sido un sistema de ensayo *in vitro* denominado "HTS" (cribado de alto rendimiento) que permite el tratamiento de un gran número de muestras. Este procedimiento utiliza una placa de alta densidad tal como una placa de 96 pocillos, 384 pocillos o 1.536 pocillos, utiliza técnicas tales como la automatización ventajosa, y puede evaluar el efecto farmacológico en un gran número de muestras de hasta cientos de miles a una velocidad elevada.

Sin embargo, un resultado proporcionado en una evaluación *in vitro* no siempre coincide con un resultado proporcionado cuando se administra un medicamento a un individuo. La patente US nº 5.625.125 se refiere a la evaluación de inhibidores de PLA₂ en ratones transgénicos que presentan un fenotipo patogénico.

La única forma para conocer el resultado de administrar un medicamento a un individuo consiste en observar el cambio en las condiciones clínicas (mejora o aparición de un efecto secundario) en el individuo.

Por lo tanto, un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un procedimiento y un reactivo para el cribado de agentes farmacéuticos y/o profármacos de los mismos para seleccionar uno o unos que presentan alta eficacia medicamentosa y/o poco efecto secundario evaluando el grado de inhibición de una diana en todo un organismo y en tiempo real lo que es imposible de llevar a cabo mediante cualquier técnica de la técnica anterior.

Descripción de la invención

La mayoría de los medicamentos ejercen los efectos farmacológicos inhibiendo o potenciando la función de sus dianas (por ejemplo, bioenzimas o receptores). Por ejemplo, un medicamento que contiene una enzima ejerce el efecto farmacológico potenciando una reacción enzimática *in vivo*, un medicamento que contiene un inhibidor enzimático ejerce el efecto farmacológico inhibiendo una reacción enzimática *in vivo*, y un medicamento que

contiene un ligando de receptor ejerce el efecto farmacológico potenciando o inhibiendo la función de un receptor mediante la unión al receptor, potenciando o inhibiendo así una reacción enzimática *in vivo* relacionada. Por lo tanto, el efecto farmacológico de un medicamento puede evaluarse determinando el grado de potenciación o inhibición de la función de una diana para el medicamento tras la administración del medicamento.

5 La presente invención proporciona la utilización de cualquiera de [1-¹³C]DOPA o benzoil-arginil-[1-¹³C]alanina para evaluar el efecto farmacológico de un medicamento que contiene un agente farmacéutico que comprende una enzima, un inhibidor enzimático o un ligando de receptor o un profármaco del agente farmacéutico.

10 El reactivo de diagnóstico de la presente invención puede utilizarse para evaluar el efecto farmacológico de un medicamento, comprendiendo el procedimiento las etapas que consisten en:

administrar a un sujeto no humano el medicamento y el reactivo de diagnóstico;

15 recoger una muestra biológica del sujeto por lo menos una vez;

medir la cantidad de [1-¹³C]DOPA o benzoil-arginil[1-¹³C]alanina o un metabolito del mismo en la muestra biológica; y

20 evaluar el efecto farmacológico del medicamento basándose en el valor obtenido en la etapa de medición.

El medicamento puede administrarse al sujeto una o más veces simultáneamente con o antes de la administración del reactivo de diagnóstico de la presente invención.

25 En el procedimiento anterior, puede medirse el nivel de ¹³C en el CO₂ exhalado en el sujeto.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “medicamento que contiene una enzima” se refiere a una preparación farmacéutica que puede producir la eficacia farmacéutica potenciando una reacción enzimática *in vivo* tras la administración de la enzima. Los ejemplos del medicamento que contiene una enzima incluyen las preparaciones que contienen cada una estreptocinasa, estreptodornasa, hialuronidasa, urocinasa, lisozima, amilasa, pepsina azucarada, diastasa, pancreatina o similares.

30 La expresión “inhibidor enzimático” se refiere a una sustancia que puede unirse a una bioenzima (es decir, una enzima en un organismo vivo) para retardar o detener la velocidad de reacción (véase “Yakubutsu Taisha Jiten” (Dictionary of Drug Metabolisms), editado por Ikuo Yamamoto, (1996) pág. 241). Los ejemplos de inhibidor enzimático incluyen acarbosa (inhibidor de α -glucosidasa) que se utiliza como agente anti-diabético; un inhibidor de HMG-CoA reductasa tal como simvastatina, atorvastatina, pravastatina, fluvastatina y cerivastatina que se utilizan como agentes contra la hiperlipidemia; un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina tal como enalapril maleato, alacepril, imidapril clorhidrato, quinapril clorhidrato, captopril y cilazapril que se utilizan como agentes antihipertensores; metotrexato (inhibidor de la folato reductasa) y fradozol clorhidrato (inhibidor de la aromataza) que se utilizan como agentes antineoplásicos; un inhibidor de la proteasa de VIH tal como saquinavir mesilato, zidovudina (un inhibidor de la transcriptasa inversa viral); foscarnet (inhibidor de la ADN polimerasa) que se utilizan como agentes anti-SIDA; y un inhibidor de neuraminidasa tal como hidrato de zanamivir que se utiliza como agente antigripal.

45 La expresión “ligando de receptor” se refiere a una sustancia que puede unirse específicamente a una proteína receptora en la membrana celular o en una célula. Tras la unión de un ligando de receptor a un receptor, se produce una reacción biológica específica para la combinación del receptor y el ligando de receptor. Los ligandos de receptor que se producen de manera natural en un organismo vivo incluyen una hormona, un neurotransmisor y similares. En el caso en que se administra el ligando de receptor que se produce de manera natural en un organismo vivo como agente farmacéutico, se utiliza como estimulante o agonista para potenciar una reacción biológica provocada por la unión del ligando de receptor a su receptor. Alternativamente, también puede utilizarse el ligando de receptor como antagonista o bloqueante para inhibir o bloquear una reacción biológica de este tipo. Ejemplos específicos de ligando del receptor incluyen bloqueantes del receptor H₂ de histamina que incluyen lafutidina, famotidina, cimetidina y ranitidina clorhidrato y que se utilizan como agentes terapéuticos para la úlcera péptica; agentes hormonales que incluyen estradiol y derivados del mismo, estriol y derivados del mismo, progesterona y derivados de la misma y testosterona y derivados de la misma; inhibidores del receptor α que incluyen tolazolina, ifenprodil y nicergolina que se utilizan como vasodilatadores; y bloqueantes del receptor β que incluyen alprenolol clorhidrato y bufetolol clorhidrato que se utilizan como agentes terapéuticos para la angina de pecho.

60 El término “profármaco” se refiere a una sustancia que es farmacológicamente inactiva en la naturaleza pero que puede convertirse en una sustancia que presenta un efecto farmacológico mediante una reacción enzimática o no enzimática *in vivo* (véase “Yakubutsu Taisha Jiten” (the Dictionary of Drug Metabolisms), editado por Ikuo Yamamoto, (1996) pág. 377). Ejemplos de profármaco incluyen sulindaco que puede convertirse por reducción en una forma de sulfuro que presenta efectos antiflogísticos y analgésicos; loxoprofeno que puede convertirse en una forma de trans-OH que presenta efectos antiflogísticos y analgésicos; nabumetona que puede convertirse en ácido

6-metoxi-2-naftilacético que presenta efectos antiflogísticos y analgésicos; y indometacina que puede convertirse en indometacina que presenta efectos antiflogísticos y analgésicos.

5 La expresión “efecto farmacológico de un medicamento” se refiere a un efecto que se produce potenciando o inhibiendo la función de una diana (una bioenzima o un receptor), incluyendo la eficacia medicamentosa y un efecto secundario. Eficacia medicamentosa se refiere a una mejora en el estado patológico producido por la potenciación o inhibición prolongada de la función de una diana (una bioenzima o un receptor), y un efecto secundario significa un efecto perjudicial producido por tal potenciación o inhibición prolongada.

10 Por lo tanto, “evaluación de un efecto farmacológico de un medicamento” se refiere a la evaluación de si se logra suficientemente una potenciación o inhibición de la función de una diana para un medicamento para mejorar el estado patológico, o la evaluación de si se provoca una potenciación o inhibición de la función de una diana para un medicamento que puede producir un efecto secundario.

15 La expresión “sustrato para una enzima” se refiere a una sustancia que puede experimentar un cambio mediante la unión directa a la enzima. Ejemplos de la enzima y su sustrato incluyen diastasa y ciclodextrina; α -glucosidasa y maltosa; pancreatina y una proteína; HMG-CoA reductasa y HMG-CoA; y aromatasas y andrógeno.

20 La expresión “enzima diferente que puede presentar una alteración en la actividad por el acoplamiento al efecto de una enzima” se refiere a una enzima diferente que puede constituir un sistema de reacción de acoplamiento con la enzima, una enzima diferente que puede activarse por la enzima, o similar.

25 Los ejemplos de la enzima, la enzima diferente que puede presentar una alteración en la actividad por el acoplamiento al efecto de la enzima y el sustrato para la enzima diferente se muestran en la tabla a continuación.

Tabla 1:

(1) Enzimas	(2) Enzimas diferentes que pueden presentar una alteración en la actividad por el acoplamiento al efecto de (1)	(3) Sustratos para (2)
Enterocinasas	Tripsina	Péptido
Tripsina	Carboxipeptidasa A	Péptido

30 La expresión “enzima que puede presentar una alteración en la actividad por el acoplamiento al efecto de un inhibidor enzimático para la otra enzima” se refiere a una enzima que puede constituir un sistema de reacción de acoplamiento con la otra enzima que se inhibe directamente por el inhibidor enzimático de modo que la propia enzima no se inhiba por el inhibidor enzimático sino que provoque la alteración en su actividad, o similar.

35 Los ejemplos del inhibidor enzimático, la enzima que se inhibe directamente por el inhibidor enzimático y su sustrato, y la enzima que puede presentar una alteración en la actividad por el acoplamiento al efecto del inhibidor enzimático y su sustrato se muestran en la tabla a continuación.

Tabla 2:

(1) Inhibidores enzimáticos	(2) Enzimas inhibidas directamente por (1)	(3) Sustratos para (2)	(4) Enzimas que pueden presentar una alteración en la actividad por el acoplamiento al efecto de (1) pero que no está inhibida directamente por (1)	(5) Sustratos para (4)
Metotrexato	Folato reductasa	Folato	Timidilato sintasa	dUMP
Ozagrel de sodio	Tromboxano sintetasa	Prostaglandina I ₂	Prostaglandina I sintetasa	Prostaglandina H ₂

40 Los ejemplos de la enzima que pueden presentar una alteración en la actividad por la unión de un ligando a un receptor y el sustrato para la enzima incluyen los representados en la tabla a continuación.

Tabla 3:

(1) Receptores	(2) Ligandos para (1)	(3) Enzimas que pueden presentar una alteración en la actividad mediante la unión entre (1) y (2)	(4) Sustratos para (3)
Receptor de dopamina	Bromocriptina, cabergolina	Adenilato ciclasa	ATP
Receptor de acetilcolina	Acetilcolina cloruro, betanechol cloruro	Adenilato ciclasa	ATP
Receptor adrenérgico	Norepinefrina, isoproterenol, fentolamina	Adenilato ciclasa	ATP

La expresión “forma marcada” hace referencia a un estado en el que un compuesto o su metabolito presentan una propiedad detectable. Los ejemplos del procedimiento de marcaje incluyen procedimientos que utilizan un isótopo tal como un isótopo estable (por ejemplo, ¹³C, ¹⁵N, ²H y ¹⁸O) y un isótopo radioactivo (por ejemplo, ¹⁴C, ³H, ³⁵S, ³²P y ¹²⁵I), un sustituyente luminiscente o fluorescente (por ejemplo, fluoresceína, metilcoumarilamida, calceína y rodamina), o similares.

La expresión “forma marcada con ¹³C” se refiere a una sustancia que presenta un aumento del nivel de ¹³C en comparación con la abundancia natural. Particularmente, es deseable una sustancia que presenta un aumento del nivel de ¹³C en una posición específica. Ejemplos de la forma marcada con ¹³C comprenden de manera no limitativa ácidos orgánicos tales como NaHCO₃ marcado con ¹³C, ácido fórmico marcado con ¹³C, ácido acético marcado con ¹³C, ácido propiónico marcado con ¹³C, ácido láctico marcado con ¹³C, ácido butírico marcado con ¹³C, ácido pirúvico marcado con ¹³C y ácido benzoico marcado con ¹³C comercializados; aminoácidos marcados con ¹³C tales como alanina marcada con ¹³C; sacáridos marcados con ¹³C tales como glucosa marcada con ¹³C; y alcoholes marcados con ¹³C tales como etanol marcado con ¹³C.

El término “sujeto” se refiere a un organismo vivo al que va a administrarse el reactivo de diagnóstico de la presente invención, en el que “organismo vivo” significa un organismo individual vivo. Ejemplos de sujeto incluyen: (1) ser humano; (2) animales domésticos tales como perros y gatos; (3) animales de laboratorio tales como ratas, ratones, cobayas, conejos y monos; u (4) otros mamíferos.

La muestra biológica que va a recogerse del sujeto es, por ejemplo, aliento, sangre u orina.

El término “metabolito” se refiere a una sustancia que se produce en el proceso metabólico de una sustancia que se administra a un organismo vivo. Ejemplos de los metabolitos de las sustancias (a) a (f) anteriores son las sustancias representadas en la tabla a continuación.

Tabla 4:

(1) Sustancias correspondientes a de (a) a (e)	(2) Medicamentos que van a evaluarse mediante los reactivos de diagnóstico (1)	(3) Metabolitos de (1)
Maltosa	Acarbosa	Glucosa, CO ₂
Hemiacetal de CoA mevalítica	Inhibidor de HMG-CoA reductasa	Acido mevalónico, CO ₂
Andrógeno	Inhibidor de aromatasa	Estrógeno
dUMP	Metotrexato	dTMP

La mayoría de medicamentos ejercen los efectos farmacológicos potenciando o inhibiendo la función de sus dianas (por ejemplo, bioenzimas o receptores). Por ejemplo, un medicamento que contiene una enzima ejerce el efecto farmacológico potenciando una reacción enzimática *in vivo*, un medicamento que contiene un inhibidor enzimático ejerce el efecto farmacológico inhibiendo una reacción enzimática *in vivo*, y un medicamento que contiene un ligando de receptor ejerce el efecto farmacológico potenciando o inhibiendo la función de un receptor mediante la unión al receptor, potenciando o inhibiendo así una reacción enzimática *in vivo* relacionada. Por lo tanto, el efecto farmacológico de un medicamento puede evaluarse determinando el grado de potenciación o inhibición de la función de una diana para el medicamento tras la administración del medicamento. El reactivo de diagnóstico de la presente invención es uno para evaluar el efecto farmacológico de un medicamento determinando el grado de potenciación o inhibición de la función de una diana.

El principio del procedimiento de evaluación se expone a continuación.

1. Un caso en el que la diana es una enzima (para un medicamento que contiene una enzima, un inhibidor enzimático o un profármaco del mismo)

El grado de potenciación o inhibición de la función de una diana por un medicamento se evalúa administrando a un sujeto un sustrato para la diana, un sustrato para una segunda enzima implicada en una reacción enzimática que puede experimentar un cambio por la potenciación o inhibición de la función de la diana (por ejemplo, una reacción de acoplamiento con la diana) o una forma marcada de cualquier sustrato como reactivo de diagnóstico, y determinando a continuación el aumento o la disminución en la cantidad de un metabolito derivado del reactivo de diagnóstico o del reactivo de diagnóstico *per se* provocado por la potenciación o inhibición de la función de la diana. Por ejemplo, en el caso de un medicamento que contiene una enzima, se administra un sustrato para una bioenzima (una diana para el medicamento) o una forma marcada del sustrato a un sujeto no humano como reactivo de diagnóstico. Si la cantidad de un metabolito derivado del reactivo de diagnóstico aumenta tras la administración, entonces se consideraría que el medicamento potencia la función de la diana. Por tanto, puede confirmarse que el medicamento presenta una eficacia suficiente. En el caso de un medicamento que contiene un inhibidor enzimático, por ejemplo, se administra un sustrato para una enzima (una diana para el medicamento) o una forma marcada del sustrato a un sujeto como reactivo de diagnóstico. Si se detecta poco metabolito derivado del reactivo de

diagnóstico, entonces se consideraría que el medicamento inhibe la función de la diana satisfactoriamente. Por tanto, puede confirmarse que el medicamento presenta una eficacia medicamentosa suficiente.

5 2. Un caso en el que la diana es un receptor (para un medicamento que contiene un ligando de receptor o un profármaco del mismo)

10 Se evalúa el grado de potenciación o inhibición de la función de una diana por un medicamento administrando a un sujeto un sustrato para una reacción enzimática que puede experimentar un cambio mediante la unión del medicamento a la diana o una forma marcada del sustrato como reactivo de diagnóstico, y determinando luego el aumento o la disminución en la cantidad de un metabolito derivado del reactivo de diagnóstico o el reactivo de diagnóstico *per se* provocado por la reacción enzimática. Por ejemplo, en el caso en que se administra un sustrato para una reacción enzimática *in vivo* que puede potenciarse mediante la unión del medicamento a la diana o una forma marcada del sustrato a un sujeto como reactivo de diagnóstico, si se aumenta la cantidad de un metabolito derivado del reactivo de diagnóstico, entonces se consideraría que el medicamento potencia la función de la diana. Por tanto, puede confirmarse que el medicamento presenta una eficacia suficiente. En el caso en que se administra un sustrato para una reacción enzimática *in vivo* que puede inhibirse mediante la unión del medicamento a la diana o una forma marcada del sustrato a un sujeto como reactivo de diagnóstico, por ejemplo, si se detecta poco metabolito derivado del reactivo de diagnóstico, entonces se consideraría que el medicamento inhibe la función de la diana completamente. Por tanto, puede confirmarse que el medicamento presenta una eficacia medicamentosa suficiente.

20 El reactivo de diagnóstico puede formularse en una preparación oral (por ejemplo, comprimido, cápsula, polvo, gránulo, disolución) o en una preparación inyectable que depende de la vía de administración, utilizando una cualquiera de las sustancias siguientes (a) a (f) solas o en combinación con un excipiente o vehículo:

25 (a) un compuesto que sirve como sustrato para la enzima contenida en el medicamento que va a evaluarse o para una enzima generada a partir del profármaco contenido en el medicamento que va a evaluarse, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

30 (b) un compuesto que sirve como sustrato para una enzima diferente que puede presentar una alteración en la actividad por el acoplamiento al efecto de la enzima contenida en el medicamento que va a evaluarse, o al efecto de una enzima generada a partir del profármaco contenido en el medicamento que va a evaluarse, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

35 (c) un compuesto que sirve como sustrato para una enzima que se inhibe directamente por el inhibidor enzimático contenido en el medicamento que va a evaluarse o por un inhibidor enzimático generado a partir del profármaco contenido en el medicamento que va a evaluarse, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

40 (d) un compuesto que sirve como sustrato para una enzima que puede presentar una alteración en la actividad por el acoplamiento al efecto del inhibidor enzimático para la otra enzima, contenido en el medicamento que va a evaluarse, o al efecto de un inhibidor enzimático generado a partir del profármaco contenido en el medicamento que va a evaluarse, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

45 (e) un compuesto que sirve como sustrato para una enzima que puede presentar una alteración en la actividad mediante la unión entre un receptor y el ligando de receptor contenido en el medicamento que va a evaluarse o un ligando de receptor generado a partir del profármaco contenido en el medicamento que va a evaluarse, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o

(f) una forma marcada de una cualquiera de las sustancias (a) a (e).

50 Con respecto a las sustancias (a) a (f), los ejemplos de la sal farmacéuticamente aceptable incluyen sales con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico y ácido fosfórico; sales con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido succínico, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico y ácido maleico, sales con metales alcalinos tales como sodio y potasio; y sales con metales alcalinotérreos tales como calcio.

55 Las sustancias (a) a (f) pueden ser productos comercializados o pueden producirse a partir de materiales de partida comercializados según procedimientos conocidos.

60 Por ejemplo, DOPA marcada con ^{13}C puede producirse tal como se describe en el ejemplo de producción 1 a continuación. De la misma manera, también puede producirse DOPA marcada con ^{14}C .

65 Puede sintetizarse un péptido marcado con ^{13}C o ^{14}C o una sal del mismo utilizando un aminoácido marcado con ^{13}C o ^{14}C comercializado según procedimientos conocidos, por ejemplo según el procedimiento descrito en "Jikkenkagakukouza 22" (volumen 22 de A Course in Experimental Chemistry), Organic Synthesis IV, editado por la Chemical Society of Japan, publicado por Maruzen (1992). A continuación se ilustra un ejemplo del procedimiento de producción.

Se disuelve un aminoácido marcado con ^{13}C en cloruro de hidrógeno/metanol y entonces se somete a reflujo. Se suspende el éster metílico resultante en diclorometano, y entonces se añade al mismo trietilamina gota a gota mientras que se agita en condiciones de enfriamiento en hielo. A la disolución se le añaden N-benzoil-aminoácido, HOBT (1-hidroxí-1H-benzotriazol·H₂O) y diclorometano. Se añade una disolución de WSC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida-HCl) en diclorometano a la disolución mezclada y entonces se agita. Tras la concentración, se extrae la disolución con acetato de etilo, se lava con ácido clorhídrico 1 N, NaHCO₃ al 5% y agua, se seca sobre sulfato de magnesio, se concentra hasta sequedad se saponifica a continuación opcionalmente, proporcionando así un péptido marcado con ^{13}C .

Puede sintetizarse un oligosacárido o polisacárido marcado con ^{13}C o ^{14}C o una sal del mismo según cualquier procedimiento descrito en la bibliografía (Carbohydrate Research, 176(1988), 107-115; publicación de solicitud de patente japonesa n.º 3-91496; patente US n.º 4649108; Journal of Chromatography, 336(1984), 368-373; publicación de solicitud de patente japonesa n.º 8-291). En este caso, pueden sintetizarse formas marcadas con ^{13}C o ^{14}C de los compuestos anteriores partiendo de, por ejemplo, un maltooligosacárido marcado con ^{13}C o ^{14}C comercializado o un maltooligosacárido marcado con ^{13}C o ^{14}C producido mediante procedimientos conocidos.

Por ejemplo, puede producirse galactosiloligosacárido, que es uno de los oligosacáridos que presentan un extremo terminal no reductor modificado, añadiendo lactosa a un oligosacárido, tratando la mezcla resultante con lactasa y separando el producto deseado de la mezcla de reacción mediante cromatografía en columna (publicaciones de solicitud de patente japonesa n.º 4-209277, n.º 8-196289 y n.º 10-316697). En este caso, puede producirse galactosiloligosacárido marcado con ^{13}C o ^{14}C utilizando un oligosacárido marcado con ^{13}C o ^{14}C , y puede producirse galactosiloligosacárido que presenta un grupo galactosilo marcado con ^{13}C o ^{14}C utilizando un ácido láctico marcado con ^{13}C - o ^{14}C -galactosilo, por ejemplo.

El excipiente o vehículo puede ser uno cualquiera que se utilice convencionalmente en la técnica y que sea farmacéuticamente aceptable. El tipo y la composición del excipiente o vehículo pueden variarse apropiadamente dependiendo de la vía y el procedimiento de administración. Por ejemplo, puede utilizarse agua como vehículo líquido. Como vehículo sólido, puede utilizarse un derivado de celulosa tal como hidroxipropilcelulosa, una sal con un ácido orgánico tal como estearato de magnesio. Para una preparación inyectable, resultan preferidos generalmente agua estéril, solución salina fisiológica y diversos tipos de tampones. También puede ser posible una preparación liofilizada, que puede utilizarse como preparación oral o puede administrarse disolviendo en un disolvente apropiado para inyección tal como una disolución para administración intravenosa (por ejemplo, agua estéril, solución salina fisiológica y una disolución de electrolitos) antes de su utilización.

El contenido de una cualquiera de las sustancias (a) a (f) anteriores (a continuación en la presente memoria, denominada "un componente principal") en la preparación farmacéutica puede variar dependiendo del tipo de la preparación farmacéutica, pero generalmente es del 1 al 100% en peso, preferentemente del 50 al 100% en peso. Por ejemplo, en una preparación inyectable, el componente principal puede añadirse generalmente en un contenido del 1 al 40% en peso. En una cápsula, comprimido, gránulo o preparación en polvo, el contenido del componente principal en la preparación es aproximadamente del 10 al 100% en peso, preferentemente del 50 al 100% en peso, siendo el resto un vehículo.

La cantidad de dosis del reactivo de diagnóstico de la presente invención debe ser una cantidad suficiente para permitir la detección del componente principal o su metabolito en una muestra biológica de un sujeto, y puede variarse dependiendo de la edad y el peso corporal del sujeto y del fin pretendido de la prueba. Por ejemplo, la cantidad de dosis unitaria es aproximadamente de 1 a 1.000 mg/kg de peso corporal para un ser humano adulto.

En la prueba con el reactivo de diagnóstico de la presente invención, puede administrarse el reactivo de diagnóstico de la presente invención (por ejemplo, por vía oral) a un sujeto tras o simultáneamente con la administración (por ejemplo, oral) de un medicamento. Se mide la cantidad de migración en la sangre o la cantidad de excreción fuera del organismo (por ejemplo, la cantidad de excreción en la orina o el aliento) tras un periodo de tiempo predeterminado, o la integral o transcurso de tiempo (pendiente de comienzo, cambio de la pendiente, tiempo de pico, etc.) de la cantidad de migración en la sangre o la cantidad de excreción fuera del organismo durante un periodo de tiempo predeterminado tras la administración con respecto al componente principal o su metabolito. Basándose en el dato de medición, puede determinarse el efecto farmacológico del medicamento.

El procedimiento para la medición se selecciona apropiadamente dependiendo de la naturaleza o el tipo del material que va someterse a prueba (por ejemplo, sangre, orina, aliento) y de la sustancia que va a administrarse (componente principal), e incluye colorimetría, fluorimetría, espectrometría de masas, RMN (resonancia magnética nuclear), HPLC, cromatografía de gases, cromatografía de gases - espectrometría de masas (GC-MS), espectroscopia acústica fotoeléctrica, procedimiento en contador de GM, centelleo líquido, centelleo sólido, autorradiografía, procedimiento con cámara de ionización y similares.

Específicamente, para determinar la cantidad de migración en la sangre, puede utilizarse la sangre extraída para la medición sin ningún tratamiento o puede someterse a algún tratamiento (por ejemplo, aislamiento, pretratamiento)

antes de la medición. Por ejemplo, la determinación puede llevarse a cabo administrando un compuesto marcado con un residuo fluorescente como reactivo de diagnóstico, extrayendo la sangre tras un periodo de tiempo predeterminado, preparando el suero o plasma de la sangre, y comparando luego la intensidad de fluorescencia en el suero y plasma. En el caso en que se administra un compuesto marcado con un sustituyente que presenta una absorción en alguna parte en la región ultravioleta o visible como reactivo de diagnóstico, la determinación puede llevarse a cabo extrayendo la sangre tras un periodo de tiempo predeterminado, y midiendo luego la absorción en la región ultravioleta o visible de una muestra de suero o plasma de la sangre con un absorciómetro o similar. Alternativamente, la absorción en la región ultravioleta o visible de la sangre puede medirse externamente en la piel sin extraer sangre.

En el caso en el que se utiliza la orina como muestra, puede utilizarse la orina extraída para la medición sin ningún tratamiento o puede someterse a algún tratamiento (por ejemplo, aislamiento, pretratamiento) antes de la medición. Por ejemplo, la determinación puede llevarse a cabo administrando un compuesto marcado con un residuo fluorescente como reactivo de diagnóstico, extrayendo la orina tras un periodo de tiempo predeterminado, y comparando luego la intensidad de fluorescencia en la orina. En el caso en que se administra un compuesto marcado con un sustituyente que presenta una absorción en alguna parte de la región ultravioleta o visible como reactivo de diagnóstico, la determinación puede llevarse a cabo extrayendo la orina tras un periodo de tiempo predeterminado, y midiendo la absorción en la región ultravioleta o visible de la orina con un absorciómetro o similar.

Para determinar la cantidad de excreción en el aliento utilizando, por ejemplo, un compuesto marcado con ^{13}C como reactivo de diagnóstico, la determinación puede llevarse a cabo mediante cromatografía de gases - espectrometría de masas (GC-MS), espectroscopia infrarroja, espectrometría de masas, espectroscopia acústica fotoeléctrica, RMN (resonancia magnética nuclear) o similares en $^{13}\text{CO}_2$. En el caso en que se utilice un compuesto marcado con ^{14}C como reactivo de diagnóstico, el aliento, o bien sin ningún tratamiento o bien tras atrapamiento de CO_2 en un disolvente, puede someterse a medición con un contador de GM, un contador de centelleo líquido o un contador de centelleo sólido o mediante autorradiografía, procedimiento con cámara de ionización o similar.

Tal como se estableció anteriormente, la mayoría de medicamentos ejercen los efectos farmacológicos potenciando o inhibiendo la función de sus dianas (bioenzimas o receptores). Por ejemplo, un agente farmacéutico que comprende una enzima puede ejercer el efecto farmacológico potenciando una reacción enzimática *in vivo*, un agente farmacéutico que comprende un inhibidor enzimático o un profármaco del agente farmacéutico puede ejercer el efecto farmacológico inhibiendo una reacción enzimática *in vivo*, y un agente farmacéutico que comprende un ligando de receptor o un profármaco del agente farmacéutico puede ejercer el efecto farmacológico potenciando o inhibiendo la función de un receptor mediante la unión del ligando al receptor, potenciando o inhibiendo así una reacción enzimática *in vivo* relacionada. Por lo tanto, el efecto farmacológico de un medicamento puede evaluarse determinando el grado de potenciación o inhibición de una función de una diana para un agente farmacéutico o su profármaco tras la administración del agente farmacéutico o profármaco. Aplicando este principio, se hace posible el cribado para la alta eficacia medicamentosa y/o el poco efecto secundario entre agentes farmacéuticos y/o profármacos de los mismos.

La presente invención proporciona un procedimiento para el cribado de agentes farmacéuticos que comprenden cada uno una enzima, un inhibidor enzimático o un ligando de receptor y/o profármacos de los agentes farmacéuticos para seleccionar uno o unos que presentan alta eficacia medicamentosa y/o poco efecto secundario, comprendiendo el procedimiento las etapas que consisten en:

seleccionar un agente farmacéutico o profármaco que va a evaluarse de agentes farmacéuticos que comprenden cada uno una enzima, un inhibidor enzimático o un ligando de receptor y/o profármacos de los agentes farmacéuticos

administrar a un sujeto no humano el agente farmacéutico o profármaco que va a evaluarse y un reactivo que comprende una cualquiera de las siguientes sustancias (a) a (f):

(a) un compuesto que sirve como sustrato para la enzima que está incluida en el agente farmacéutico que va a evaluarse o para una enzima generada a partir del profármaco que va a evaluarse, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

(b) un compuesto que sirve como sustrato para una enzima diferente que puede presentar una alteración en la actividad por el acoplamiento al efecto de la enzima que está incluida en el agente farmacéutico que va a evaluarse, o al efecto de una enzima generada a partir del profármaco que va a evaluarse, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

(c) un compuesto que sirve como sustrato para una enzima que se inhibe directamente por el inhibidor enzimático que está incluido en el agente farmacéutico que va a evaluarse o por un inhibidor enzimático generado a partir del profármaco que va a evaluarse, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

(d) un compuesto que sirve como sustrato para una enzima que puede presentar una alteración en la actividad por el

acoplamiento al efecto del inhibidor enzimático para la otra enzima, que está incluido en el agente farmacéutico que va a evaluarse, o al efecto de un inhibidor enzimático generado a partir del profármaco que va a evaluarse, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

5 (e) un compuesto que sirve como sustrato para una enzima que puede presentar una alteración en la actividad mediante la unión entre un receptor y el ligando de receptor que está incluido en el agente farmacéutico que va a evaluarse o un ligando de receptor generado a partir del profármaco que va a evaluarse, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o

10 (f) una forma marcada de una cualquiera de las sustancias (a) a (e);

recoger una muestra biológica del sujeto por lo menos una vez;

15 medir la cantidad de una cualquiera de las sustancias (a) a (f) anteriores o un metabolito del mismo en la muestra biológica; y

20 evaluar el efecto farmacológico del agente farmacéutico o profármaco que va a evaluarse basándose en el valor obtenido en la etapa de medición. El agente farmacéutico y/o profármaco que va a cribarse según este procedimiento presenta preferentemente una eficacia medicamentosa tan superior, un efecto secundario tan menor, o una eficacia medicamentosa tan superior y un efecto secundario tan menor, como sea posible.

25 El agente farmacéutico y/o profármaco que va a evaluarse puede administrarse al sujeto una o más veces simultáneamente con o antes de la administración del reactivo que comprende una cualquiera de las sustancias (a) a (f).

30 La presente invención también proporciona un reactivo para su utilización en el cribado de agentes farmacéuticos que comprenden cada uno una enzima, un inhibidor enzimático o un ligando de receptor y/o profármacos de los agentes farmacéuticos para uno o unos que presentan una eficacia medicamentosa elevada y/o un efecto secundario pequeño, en el que el reactivo comprende [1-¹³C]DOPA para cribar un agente farmacéutico dirigido a la DOPA descarboxilasa que presenta un efecto de medicación elevado y/o un profármaco del mismo.

35 El reactivo de la presente invención puede utilizarse en el procedimiento de cribado de agentes farmacéuticos que comprenden cada uno una enzima, un inhibidor enzimático o un ligando de receptor y/o profármacos de los agentes farmacéuticos para seleccionar uno o unos que presentan alta eficacia medicamentosa y/o poco efecto secundario, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

40 seleccionar un agente farmacéutico o profármaco que va a evaluarse de agentes farmacéuticos que comprenden cada uno una enzima, un inhibidor enzimático o un ligando de receptor y/o profármacos de los agentes farmacéuticos;

45 administrar a un sujeto no humano el agente farmacéutico o profármaco que va a evaluarse y el reactivo;

recoger una muestra biológica del sujeto por lo menos una vez;

50 medir la cantidad de [1-¹³C] DOPA o benzoil-arginil-[1-¹³C]alanina o un metabolito del mismo en la muestra biológica; y

55 evaluar el efecto farmacológico del agente farmacéutico o profármaco que va a evaluarse basándose en el valor obtenido en la etapa de medición. El agente farmacéutico y/o profármaco que va a cribarse según este procedimiento presenta preferentemente una eficacia medicamentosa tan superior, un efecto secundario tan menor, o una eficacia medicamentosa tan superior y un efecto secundario tan menor como sea posible.

60 El agente farmacéutico y/o profármaco que va a evaluarse puede administrarse al sujeto una o más veces simultáneamente con o antes de la administración del reactivo de la presente invención.

65 En el procedimiento de cribado y el reactivo de la presente invención, en el caso en que el reactivo comprende una forma marcada con ¹³C de una cualquiera de las sustancias (a) a (e), puede medirse el nivel de ¹³C de CO₂ exhalado del sujeto.

70 En la presente memoria descriptiva, la expresión “agente farmacéutico que comprende una enzima” se refiere a una preparación farmacéutica que puede ejercer el efecto farmacológico potenciando una reacción enzimática *in vivo* tras la administración de la enzima. Ejemplos de agente farmacéutico que comprende una enzima incluyen aquellas preparaciones que comprenden cada una estreptocinasa, estreptodornasa, hialuronidasa, urocinasa, lisozima, amilasa, pepsina azucarada, diastasa, pancreatina o similares.

La expresión “inhibidor enzimático” es tal como se definió anteriormente.

La expresión “ligando de receptor” es tal como se definió anteriormente.

El término “profármaco” es tal como se definió anteriormente.

La expresión “efecto farmacológico de un agente farmacéutico o un profármaco del mismo” se refiere a un efecto que se produce potenciando o inhibiendo la función de una diana (una bioenzima o un receptor), incluyendo la eficacia medicamentosa y un efecto secundario. La eficacia medicamentosa significa una mejora en el estado patológico producido por la potenciación o inhibición prolongada de la función de una diana (una bioenzima o un receptor), y un efecto secundario significa un efecto perjudicial producido por tal potenciación o inhibición prolongada.

Por lo tanto, “evaluación de un efecto farmacológico de un agente farmacéutico o un profármaco del mismo” se refiere a la evaluación de si se logra suficientemente la potenciación o inhibición de la función de una diana para que el agente farmacéutico o profármaco mejore el estado patológico, o la evaluación de si se impide la potenciación o inhibición de la función de una diana para un medicamento que puede producir un efecto secundario.

La expresión “sustrato para una enzima” es tal como se definió anteriormente.

La “enzima diferente que puede presentar una alteración en la actividad por el acoplamiento al efecto de una enzima” es tal como se definió anteriormente.

Los ejemplos de la enzima, la enzima diferente que puede presentar una alteración en la actividad por el acoplamiento al efecto de la enzima y el sustrato para la enzima diferente se muestran en la tabla 1 anterior.

La expresión “enzima que puede presentar una alteración en la actividad por el acoplamiento al efecto de un inhibidor enzimático” es tal como se definió anteriormente.

Los ejemplos del inhibidor enzimático, la enzima inhibida directamente por el inhibidor enzimático y su sustrato, y la enzima que puede presentar una alteración en la actividad por el acoplamiento al efecto del inhibidor enzimático y su sustrato son los mostrados en la tabla 2 anterior.

Los ejemplos de la enzima que puede presentar una alteración en la actividad mediante la unión del ligando al receptor y el sustrato para la enzima son los mostrados en la tabla 3 anterior.

La expresión “forma marcada” es tal como se definió anteriormente.

La expresión “forma marcada con ¹³C” es tal como se definió anteriormente.

El término “sujeto” es tal como se definió anteriormente.

El término “metabolito” se refiere a una sustancia que se produce en el proceso metabólico de una sustancia que se administra a un organismo vivo. Los ejemplos de los metabolitos de las sustancias (a) a (f) anteriores incluyen las sustancias representadas en la tabla 5 a continuación.

Tabla 5:

(1) Sustancias correspondientes a de (a) a (e)	(2) Agentes farmacéuticos cribados con (1)	(3) Metabolitos de (1)
Maltosa	Acarbosa	Glucosa, CO ₂
Hemiacetal de CoA mevalónica	Inhibidor de HMG-CoA reductasa	Ácido mevalónico, CO ₂
Andrógeno	Inhibidor de aromatasa	Estrógeno
dUMP	Metotrexato	dTMP

La mayoría de los agentes farmacéuticos y sus profármacos producen los efectos farmacológicos potenciando o inhibiendo la función de sus dianas (bioenzimas o receptores). Por ejemplo, un agente farmacéutico que comprende una enzima puede presentar el efecto farmacológico potenciando una reacción enzimática *in vivo*, un agente farmacéutico que comprende un inhibidor enzimático o un inhibidor enzimático generado a partir de un profármaco puede presentar el efecto farmacológico inhibiendo una reacción enzimática *in vivo*, y un agente farmacéutico que comprende un ligando de receptor o un ligando de receptor generado a partir de un profármaco puede presentar el efecto farmacológico potenciando o inhibiendo la función de un receptor mediante la unión al receptor, potenciando o inhibiendo así una reacción enzimática *in vivo* relacionada. Por lo tanto, el efecto farmacológico de un agente farmacéutico puede evaluarse determinando el grado de potenciación o inhibición de la función de una diana para el agente farmacéutico o su profármaco tras la administración del agente farmacéutico o profármaco. El procedimiento de cribado y el reactivo de la presente invención son para el cribado de agentes farmacéuticos y/o profármacos de

los mismos para seleccionar uno o unos que presentan alta eficacia medicamentosa y/o poco efecto secundario mediante la evaluación del efecto farmacológico de un medicamento determinando el grado de potenciación o inhibición de la función de una diana.

5 El principio de los procedimientos de evaluación es tal como sigue.

1. Un caso en el que la diana es una enzima (para la evaluación de una enzima, un inhibidor enzimático o un profármaco del mismo)

10 El grado de potenciación o inhibición de la función de una diana para una enzima, un inhibidor enzimático o un profármaco del mismo se evalúa administrando a un sujeto un sustrato para la diana, un sustrato para una segunda enzima implicada en una reacción enzimática que puede experimentar un cambio por la potenciación o inhibición de la función de la diana (por ejemplo, una reacción de acoplamiento con la diana) o una forma marcada de cualquier sustrato como reactivo de cribado, y determinando a continuación el aumento o la disminución en la cantidad de un metabolito derivado del reactivo de diagnóstico o del reactivo de diagnóstico *per se* provocado por la potenciación o inhibición de la función de la diana. Por ejemplo, en el caso en que se va a evaluar una enzima, se administra un sustrato para una bioenzima (una diana) o una forma marcada del sustrato a un sujeto como reactivo de cribado. Si la cantidad de un metabolito derivado del reactivo de cribado aumenta, entonces se consideraría que se potencia la función de la bioenzima. Por tanto, puede confirmarse que la enzima que va a evaluarse presenta eficacia medicamentosa suficiente. En el caso en que va a evaluarse un inhibidor enzimático, por ejemplo, se administra un sustrato para una enzima (una diana) o una forma marcada del sustrato a un sujeto como reactivo de cribado. Si se detecta poco metabolito derivado del reactivo de cribado, entonces se consideraría que el inhibidor enzimático inhibe la función de la diana satisfactoriamente. Por tanto, puede confirmarse que el inhibidor enzimático presenta eficacia medicamentosa suficiente.

25 2. Un caso en el que la diana es un receptor (para la evaluación de un ligando de receptor o un profármaco del mismo)

30 Se evalúa el grado de potenciación o inhibición de la función de una diana por un ligando de receptor o su profármaco administrando a un sujeto un sustrato para una reacción enzimática que pueda experimentar un cambio mediante la unión del ligando de receptor o su profármaco a la diana o una forma marcada del sustrato como reactivo de cribado, y determinando luego el aumento o la disminución en la cantidad de un metabolito derivado del reactivo de cribado o el reactivo de cribado *per se* provocado por la reacción enzimática. Por ejemplo, en el caso en que se administra un sustrato para una reacción enzimática *in vivo* que puede potenciarse mediante la unión del ligando de receptor o su profármaco a la diana o una forma marcada del sustrato a un sujeto como reactivo de cribado, si se aumenta la cantidad de un metabolito derivado del reactivo de cribado, entonces se consideraría que el ligando de receptor o su profármaco potencia la función de la diana. Por tanto, puede confirmarse que el ligando de receptor o su profármaco presenta una eficacia suficiente. En el caso en que se administra un sustrato para una reacción enzimática *in vivo* que puede inhibirse mediante la unión del ligando de receptor o su profármaco a la diana o una forma marcada del sustrato a un sujeto como reactivo de cribado, por ejemplo, si se detecta poco metabolito derivado del reactivo de cribado, entonces se consideraría que el ligando de receptor o su profármaco inhibe la función de la diana completamente. Por tanto, puede confirmarse que el ligando de receptor o su profármaco presenta suficiente eficacia medicamentosa.

45 El reactivo de cribado puede formularse en una preparación oral (por ejemplo, comprimido, cápsula, polvo, gránulo, disolución) o en una preparación inyectable dependiendo de la vía de administración, utilizando una cualquiera de las siguientes sustancias (a) a (f) solas o en combinación con un excipiente o vehículo:

50 (a) un compuesto que sirve como sustrato para la enzima que está incluida en el agente farmacéutico que va a evaluarse o para una enzima generada a partir del profármaco que va a evaluarse, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

55 (b) un compuesto que sirve como sustrato para una enzima diferente que puede presentar una alteración en la actividad por el acoplamiento al efecto de la enzima que está incluida en el agente farmacéutico que va a evaluarse, o al efecto de una enzima generada a partir del profármaco que va a evaluarse, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

60 (c) un compuesto que sirve como sustrato para una enzima que se inhibe directamente por el inhibidor enzimático que está incluido en el agente farmacéutico que va a evaluarse o por un inhibidor enzimático generado a partir del profármaco que va a evaluarse, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

65 (d) un compuesto que sirve como sustrato para una enzima que puede presentar una alteración en la actividad por el acoplamiento al efecto del inhibidor enzimático para la otra enzima, que está incluido en el agente farmacéutico que va a evaluarse, o al efecto de un inhibidor enzimático generado a partir del profármaco que va a evaluarse, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

(e) un compuesto que sirve como sustrato para una enzima que puede presentar una alteración en la actividad mediante la unión entre un receptor y el ligando de receptor que está incluido en el agente farmacéutico que va a evaluarse o un ligando de receptor generado a partir del profármaco que va a evaluarse, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o

(f) una forma marcada de una cualquiera de las sustancias (a) a (e).

Con respecto a las sustancias (a) a (f), los ejemplos de la sal farmacéuticamente aceptable incluyen sales con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico y ácido fosfórico; sales con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido succínico, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico y ácido maleico; sales con metales alcalinos tales como sodio y potasio; y sales con metales alcalinotérreos tales como calcio.

Las sustancias (a) a (f) pueden ser productos comercializados o pueden producirse a partir de materiales de partida disponibles comercialmente según procedimientos conocidos. Los procedimientos son tal como se describió anteriormente.

El excipiente o vehículo puede ser uno cualquiera que se utilice convencionalmente en la técnica y que sea farmacéuticamente aceptable. El tipo y la composición del excipiente o vehículo pueden variarse apropiadamente dependiendo de la vía y el procedimiento de administración. Por ejemplo, puede utilizarse agua como vehículo líquido. Como vehículo sólido, puede utilizarse un derivado de celulosa tal como hidroxipropilcelulosa, una sal con un ácido orgánico tal como estearato de magnesio. Para una preparación inyectable, se prefieren generalmente agua estéril, solución salina fisiológica y diversos tipos de tampones. También puede ser posible una preparación liofilizada, que puede utilizarse como preparación oral o puede administrarse disolviendo en un disolvente apropiado para inyección tal como una disolución para administración intravenosa (por ejemplo, agua estéril, solución salina fisiológica y una disolución de electrolitos) antes de su utilización.

El contenido de una cualquiera de las sustancias (a) a (f) anteriores (a continuación en la presente memoria, denominada "un componente principal") en la preparación farmacéutica puede variar dependiendo del tipo de la preparación farmacéutica, pero es generalmente del 1 al 100% en peso, preferentemente del 50 al 100% en peso. Por ejemplo, en una preparación inyectable, el componente principal puede añadirse generalmente en un contenido del 1 al 40% en peso. En una cápsula, comprimido, gránulo o preparación en polvo, el contenido del componente principal en la preparación es aproximadamente del 10 al 100% en peso, preferentemente del 50 al 100% en peso, siendo el resto un vehículo.

La cantidad de dosis del reactivo de cribado de la presente invención debe ser una cantidad suficiente para permitir la detección del componente principal o su metabolito en una muestra biológica de un sujeto, y puede variarse dependiendo de la edad y del peso corporal del sujeto y del fin pretendido de la prueba. Por ejemplo, la cantidad de dosis unitaria es aproximadamente de 1 a 1.000 mg/kg de peso corporal para un ser humano adulto.

En el cribado con el reactivo de la presente invención, puede administrarse el reactivo de la presente invención (por ejemplo, por vía oral) a un sujeto no humano tras o simultáneamente con la administración (por ejemplo, oral) del agente farmacéutico o su profármaco que va a evaluarse. Se mide la cantidad de migración en la sangre o la cantidad de excreción fuera del organismo (por ejemplo, la cantidad de excreción en la orina o el aliento) tras un periodo de tiempo predeterminado, o la integral o el transcurso de tiempo (pendiente de comienzo, cambio de pendiente, tiempo de pico, etc.) en la cantidad de migración en la sangre o la cantidad de excreción fuera del organismo durante un periodo de tiempo predeterminado tras la administración con respecto al componente principal o su metabolito. El efecto farmacológico del agente farmacéutico o su profármaco que va a evaluarse puede determinarse basándose en los datos de medición.

El procedimiento para la medición se selecciona apropiadamente dependiendo de la naturaleza o el tipo del material que va a someterse a prueba (por ejemplo, sangre, orina, aliento) y de la sustancia que va a administrarse (componente principal), e incluye colorimetría, fluorimetría, espectrometría de masas, RMN (resonancia magnética nuclear), HPLC, cromatografía de gases, cromatografía de gases - espectrometría de masas (GC-MS), espectroscopia acústica fotoeléctrica, procedimiento en contador de GM, centelleo líquido, centelleo sólido, autorradiografía, procedimiento en cámara de ionización y similares.

Específicamente, para determinar la cantidad de migración en la sangre, puede utilizarse la sangre extraída para la medición sin ningún tratamiento o puede someterse a algún tratamiento (por ejemplo, aislamiento, pretratamiento) antes de la medición. Por ejemplo, la determinación puede llevarse a cabo administrando un compuesto marcado con un residuo fluorescente como reactivo, extrayendo la sangre tras un periodo de tiempo predeterminado, preparando el suero o plasma de la sangre, y comparando luego la intensidad de fluorescencia en el suero o plasma. En el caso en que se administra un compuesto marcado con un sustituyente que presenta una absorción en alguna parte de la región ultravioleta o visible como reactivo, la determinación puede llevarse a cabo extrayendo la sangre tras un periodo de tiempo predeterminado, y midiendo luego la absorción en la región ultravioleta o visible de una muestra de suero o plasma de la sangre con un absorciómetro o similar. Alternativamente, la absorción en la

región ultravioleta o visible de la sangre puede medirse externamente en la piel sin extraer sangre.

En el caso en que se utiliza la orina como muestra, puede utilizarse la orina extraída para la medición sin ningún tratamiento o puede someterse a algún tratamiento (por ejemplo, aislamiento, pretratamiento) antes de la medición. Por ejemplo, la determinación puede llevarse a cabo administrando un compuesto marcado con un residuo fluorescente como reactivo, extrayendo la orina tras un periodo de tiempo predeterminado, y comparando luego la intensidad de fluorescencia en la orina. En el caso en que se administra un compuesto marcado con un sustituyente que presenta una absorción en alguna parte de la región ultravioleta o visible como reactivo, la determinación puede llevarse a cabo extrayendo la orina tras un periodo de tiempo predeterminado, y midiendo la absorción en la región ultravioleta o visible de la orina con un espectrofotómetro o similar.

Para determinar la cantidad de excreción en el aliento utilizando, por ejemplo, un compuesto marcado con ^{13}C como reactivo, la determinación puede llevarse a cabo mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), espectroscopia infrarroja, espectroscopia de masas, espectroscopia acústica fotoeléctrica, RMN (resonancia magnética nuclear) o similares en $^{13}\text{CO}_2$. En el caso en que se utiliza un compuesto marcado con ^{14}C como reactivo, el aliento, o bien sin ningún tratamiento o tras atrapamiento de CO_2 en un disolvente, puede someterse a medición con un contador de GM, un contador de centelleo líquido o un contador de centelleo sólido o mediante autorradiografía, un procedimiento en cámara de ionización o similar.

Esta memoria descriptiva incluye parte o todo el contenido que se dan a conocer en las memorias descriptivas y/o dibujos de las solicitudes de patente japonesa nº 2002-44526 y nº 2002-44791 que son documentos de prioridad de la presente solicitud.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra los resultados de análisis espectrométricos de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN para L-[1- ^{13}C]DOPA;

la figura 2 muestra los espectros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y ESI-MS para Glc-[U- ^{13}C]Glc;

la figura 3 muestra los resultados de análisis de HPLC y espectrométricos de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN para Bz-Arg-[1- ^{13}C]Ala;

la figura 4 muestra los espectros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y ESI-MS para [U- ^{13}C] γ -ciclodextrina;

la figura 5 muestra el transcurso del tiempo de la prueba en aliento de [1- ^{13}C]DOPA;

la figura 6 muestra la comparación de los valores en el punto de tiempo de 20 minutos en la prueba en aliento de glucosil-[U- ^{13}C]glucosa;

la figura 7 muestra la comparación de los valores en el punto de tiempo de 20 minutos en la prueba en aliento de Bz-Arg-[1- ^{13}C]Ala;

la figura 8 muestra la comparación de los valores en el punto de tiempo de 20 minutos en la prueba en aliento de [U- ^{13}C] γ -ciclodextrina; y

la figura 9 muestra la comparación de los valores en el punto de tiempo de 10 minutos en la prueba en aliento de [1,2- ^{13}C]ornitina.

Mejor modo de poner en práctica la invención

A continuación en la presente memoria, se describirá la presente invención más específicamente haciendo referencia a los ejemplos. Sin embargo, los ejemplos se proporcionan a título ilustrativo y no limitativo del alcance de la invención. Se adquirieron las ratas utilizadas en los experimentos (macho Wistar, 7 semanas de edad) de Nippon Charles River.

[Ejemplo de producción 1] Producción de L-[1- ^{13}C]DOPA

Se añadieron H_2O (10 ml) y Ac_2O (6,88 g, 64 mmol) a [1- ^{13}C]glicina (MassTrace; 2,44 g, 32 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se dejó reposar la mezcla en un refrigerador durante la noche, y se eliminaron por filtración los cristales precipitados y se lavaron con agua fría (3 ml). Se concentró el filtrado a presión reducida y luego se añadió H_2O (2,5 ml), y se disolvió la mezcla resultante calentando a reflujo. Se dejó reposar la disolución en un refrigerador durante la noche, se eliminaron por filtración los cristales precipitados, se lavaron con agua fría (1 ml) y luego se secaron a presión reducida a 100°C dando $\text{AcNHCH}_2^{13}\text{CO}_2\text{H}$ como cristales de tipo aguja finos incoloros.

Se mezclaron completamente 3,4-dihidroxibenzaldehído (1,5 g, 10,8 mmol), $\text{AcNHCH}_2^{13}\text{CO}_2\text{H}$ (1,18 g, 10 mmol) y

AcONa (2,46 g, 30 mmol) y se añadieron a continuación a AcO₂ (10 ml). Se agitó la disolución resultante a 120°C durante 5 horas, y luego se dejó reposar a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió la disolución de reacción a agua helada (500 ml). Se eliminó por filtración el polvo amarillo precipitado, se lavó con agua (100 ml) y agua caliente (20 ml) y luego se secó al aire. La purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice (hexano-EtOH = 1:1) dio [carbonil-¹³C]2-metil-4-(3,4-diacetoxibenzal)-5-oxzolona (1,76 g, 58%) como cristales amarillos.

Se añadieron [carbonil-¹³C]2-metil-4-(3,4-diacetoxibenzal)-5-oxzolona (1,31 g, 4,3 mmol) y AcONa (1,6 g, 19,5 mmol) a MeOH (12 ml) y se sometió a reflujo durante 5 horas. Se purificó la disolución de reacción mediante cromatografía en columna de gel de sílice (CHCl₃-MeOH = 10:1, AcOEt-MeOH = 40:1) proporciona un sólido amorfo amarillo pálido (1,02 g, 64%). Se trituró el sólido amorfo amarillo pálido con una disolución mezclada de acetona-CHCl₃ y se recristalizó a continuación proporcionando α -acetoamida-3,4-dihidroxicinamato de [carbonil-¹³C]metilo.

A una disolución de α -acetoamida-3,4-dihidroxicinamato de [carbonil-¹³C]metilo (0,618 g, 2,45 mmol) en una disolución mezclada de EtOH:PhH (4:1) (12 ml) en una corriente de hidrógeno se le añadió una disolución que se había preparado disolviendo *s,s*-DIOP (249 mg, 0,5 mmol) y [RhCl(cicloocteno)₂]₂ (123 mg, 0,25 mmol) en PhH (2 ml) y agitando la disolución a temperatura ambiente durante 15 minutos en una corriente de nitrógeno. Se agitó la disolución resultante a temperatura ambiente durante 24 horas, se eliminó por destilación el disolvente a presión reducida. La purificación mediante cromatografía en columna de gel de sílice (CHCl₃-MeOH = 10:1) dio éster metílico de [carbonil-¹³C]N-acetil-3,4-dihidroxifenilalanina como un sólido amorfo marrón rojizo (0,5 g, 80%).

Se añadió éster metílico de [carbonil-¹³C]N-acetil-3,4-dihidroxifenilalanina (0,435 g, 1,71 mmol) a HCl al 10% (4 ml) y se agitó a 120°C durante 3 horas. Tras destilar a presión reducida el HCl al 10%, se añadió al residuo H₂O (5 ml), se secó a presión reducida, se le añadió adicionalmente H₂O (5 ml) y luego se secó a presión reducida dado un sólido amorfo. Al sólido amorfo se añadió EtOH (6 ml) y se disolvió en el mismo, se añadió gota a gota NH₃ acuoso al 25% con enfriamiento en hielo para el ajuste del pH hasta 6,5. Se dejó reposar la disolución en un refrigerador durante la noche. Se eliminaron por filtración los cristales precipitados, se lavaron con EtOH y Et₂O y luego se secaron a presión reducida dando un polvo marrón pálido (316 mg, 93%). Se añadió el polvo marrón pálido a H₂O (7 ml) que contenía carbón activado y una cantidad traza de NaHSO₃, se calentó a reflujo y luego se decoloró. Se dejó reposar el filtrado en un refrigerador durante 3 días dando cristales prismáticos incoloros (238 mg, 70%).

Los datos de identificación (espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN) para L-[1-¹³C]DOPA se muestran en las figuras 1(a) y 1(b).

[Ejemplo de producción 2] Producción de glucosil-[U-¹³C]glucosa (a continuación en la presente memoria, denominado "Glc-[U-¹³C]Glc")

Se añadieron alcohol bencílico (66,7 ml, 645 mmol) y cloruro de hidrógeno 4,5 N/dioxano (9,6 ml, 43,0 mmol) a D-glucosa-U-¹³C₆ (5,00 g, 26,87 mmol, SHOKO) y se calentó a continuación a 80°C mientras se agitaba. Tras 50 minutos, se retiró la disolución del baño de aceite, se dejó enfriar hasta temperatura ambiente, se le añadió éter (1,0 l) y luego se enfrió con hielo. Se eliminó por filtración el precipitado producido, se lavó con éter y luego se secó a presión reducida (cantidad producida: 4,52 g, % rendimiento: 60,9%).

Se añadieron acetonitrilo seco (35,0 ml) y DMF seco (7,0 ml) a U-¹³C-Glc-OBzl (4,49 g, 16,26 mmol) en una atmósfera de argón y se disolvió en el mismo. Se añadieron benzaldehído-dimetilacetal (3,17 ml, 21,14 mmol) y ácido p-toluenosulfónico monohidratado (618 mg, 3,25 mmol) a la disolución y luego se agitó a temperatura ambiente. Tras 2,5 horas, se añadió otra parte del benzaldehído-dimetilacetal (245 μ l, 1,63 mmol). Tras 4,5 horas, se añadió bicarbonato de sodio acuoso saturado para neutralizar la disolución y luego se concentró a presión reducida para eliminar el acetonitrilo. Se extrajo la solución con acetato de etilo, se combinaron las fases orgánicas, y se lavaron a continuación sucesivamente con agua y solución salina saturada. Se secó la disolución sobre sulfato de magnesio anhidro y se filtró, y se concentró el filtrado a presión reducida. Se disolvió el residuo en piridina (100 ml) y se enfrió en hielo. Se añadió ácido acético anhidro (50 ml, 530 mmol) a la disolución. Tras 30 minutos, se retiró la disolución del baño de hielo, y luego se agitó a temperatura ambiente. Tras 14 horas, se concentró la disolución a presión reducida, se añadió el residuo con tolueno y luego se destiló de manera azeotrópica. Se repitió este procedimiento tres veces. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna de gel de sílice dando 4,6-O-benciliden-2,3-di-O-acetil-U-¹³C-Glc-Obzl (cantidad producida: 3,31 g, % de rendimiento: 45,4%).

Se disolvió 4,6-O-benciliden-2,3-di-O-acetil-U-¹³C-Glc-OBzl (1,65 g, 3,68 mmol) en acetonitrilo seco (33,0 ml), y se añadió al mismo dimetilaminaborano (1,08 g, 18,4 mmol) se disolvieron en una atmósfera de argón. Se enfrió la mezcla de reacción hasta -40°C, y se añadió a la misma eterato de trifluoruro de boro (2,33 ml, 18,4 mmol). Se calentó gradualmente la mezcla de reacción hasta -15°C durante 6 horas y se vertió en bicarbonato de sodio acuoso saturado para neutralizar la disolución. Tras la concentración a presión reducida para eliminar el acetonitrilo, se extrajo la disolución con acetato de etilo, se combinaron las fases orgánicas y se lavaron sucesivamente con agua y solución salina saturada. Se secó la disolución sobre sulfato de magnesio anhidro y se filtró, y se concentró el filtrado a presión reducida. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna de gel de sílice dando 2,3-di-O-acetil-6-O-bencil-U-¹³C-Glc-Obzl (cantidad producida: 973 mg, % de rendimiento: 58,7%).

Se disolvieron 2,3-di-O-acetil-6-O-bencil-U-¹³C-Glc-OBzl (191 mg, 0,424 mmol) y 2,3,4,6-tetra-O-bencil-Glc-OC(=NH)-CCl₃ (290 mg, 0,424 mmol) en cloroformo seco (10,0 ml) y se agitaron juntos a continuación con tamiz molecular 4A (500 mg) a temperatura ambiente durante 15 minutos en una atmósfera de argón. Se enfrió la mezcla de reacción hasta -60°C, se añadió a la misma eterato de trifluoruro de boro (107 µl, 0,848 mmol), y se calentó gradualmente la mezcla hasta -10°C durante 3 horas. Se diluyó la mezcla de reacción con acetato de etilo y se filtró para eliminar el tamiz molecular 4A. Se lavó la disolución resultante con acetato de etilo, se combinaron el filtrado y los lavados y entonces se lavaron sucesivamente con bicarbonato de sodio acuoso saturado, agua y solución salina saturada. Se secó la disolución sobre sulfato de magnesio anhidro y se filtró, y se concentró el filtrado a presión reducida. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna de gel de sílice (cantidad producida: 254 mg, % de rendimiento: 61,5%). Siguiendo este procedimiento, se llevaron a cabo dos reacciones de condensación más, dando 1,01 g de 2',3',4',6'-tetra-O-bencil-Glc-(α1-4)-2,3-di-O-acetil-6-O-bencil-U-¹³C-Glc-OBzl de un total de 967 mg de 2,3-di-O-acetil-6-O-bencil-U-¹³C-Glc-OBzl.

Se disolvió 2',3',4',6'-tetra-O-bencil-Glc-(α1-4)-2,3-di-O-acetil-6-O-bencil-U-¹³C-Glc-OBzl (229 mg, 0,235 mmol) en metanol seco (10,0 ml), se añadió al mismo una disolución 5,18 M de metóxido de sodio en metanol (9,1 µl, 47,0 µmol) y se agitó a temperatura ambiente. Tras 4 horas, se añadió otra parte de una disolución 5,18 M de metóxido de sodio en metanol (4,6 µl, 23,8 µmol) y se agitó a temperatura ambiente durante una hora adicional. Se añadió la disolución de reacción con Amberlyst 15 para su neutralización y luego se filtró. Se lavó la resina con metanol, se combinaron el filtrado y los lavados y luego se concentraron a presión reducida. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna de gel de sílice (cantidad producida: 182 mg, % de rendimiento: 87,2%). Se llevó a cabo la reacción de desacetilación de nuevo según este procedimiento dando 852 mg de 2',3',4',6'-tetra-O-bencil-Glc-(α1-4)-6-O-bencil-U-¹³C-Glc-OBzl de un total de 1,01 g de 2',3',4',6'-tetra-O-bencil-Glc-(α1-4)-2,3-di-O-acetil-6-O-bencil-U-¹³C-Glc-OBzl.

Se disolvió 2',3',4',6'-tetra-O-bencil-Glc-(α1-4)-6-O-bencil-U-¹³C-Glc-OBzl (180 mg, 0,202 mmol) en metanol (30,0 ml)-agua (6,0 ml), se añadió al mismo negro de paladio (20 mg), y luego se purgó con hidrógeno. Tras 1 hora, se calentó la disolución hasta 35°C y se purgó con hidrógeno. Se añadió agua (4,0 ml) tras 2 horas, y se añadió otra parte de agua (20,0 ml) tras 4 horas. Tras 6 horas, se filtró la disolución, y se lavó el catalizador con agua. Se combinaron el filtrado y los lavados, se concentraron a presión reducida para eliminar el metanol y luego se liofilizaron. Se disolvió el residuo en agua (30 ml), se añadió al mismo negro de paladio (20 mg), y se calentó la disolución hasta 35°C y se purgó con hidrógeno. Tras 6 horas, se filtró la disolución, y se lavó el catalizador con agua. Se combinaron el filtrado y los lavados, se concentraron a presión reducida para reducir el volumen de líquido, y luego se liofilizaron. Se purificó el residuo mediante HPLC (TSK-Gel Amide-80) (cantidad producida: 61,5 mg, % de rendimiento: 87,6%). Se llevó a cabo la reacción de reducción de nuevo según este procedimiento dando 290 mg de Glc-[U-¹³C]Glc de un total de 850 mg de 2',3',4',6'-tetra-O-bencil-Glc-(α1-4)-6-O-bencil-U-¹³C-Glc-OBzl. Los datos de identificación (espectros ¹H-RMN y ¹³C-RMN) para Glc-[U-¹³C]Glc se muestran en las figuras 2(a), 2(b) y 2(c).

[Ejemplo de producción 3] Producción de benzoil-arginil-[1-¹³C]alanina (a continuación en la presente memoria, denominado "Bz-Arg-[1-¹³C]Ala")

Se disolvió [1-¹³C]Alanina (Masstrace, Inc.) (10,0 g, 0,111 mol) en hidróxido de sodio acuoso (111 ml), se añadieron a la misma una disolución de Boc₂O (28,0 ml, 0,122 mol) en acetona (110 ml) y trietilamina (7,71 ml, 55,5 mmol), y entonces se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se concentró la disolución a presión reducida y se le añadió solución salina saturada hasta un volumen total de 200 ml. Se añadió la disolución con ácido cítrico para el ajuste de pH a 4, se saturó con sal común, y entonces se extrajo con acetato de etilo cuatro veces. Se lavaron las fases orgánicas con solución salina saturada dos veces y se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro. Se concentró la disolución resultante a presión reducida, se disolvió el residuo en dietil éter (150 ml), se le añadió ciclohexilamina (12,7 ml, 0,111 mol), y entonces se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 horas. Se eliminaron por filtración los cristales precipitados, se lavaron con dietil éter, y luego se secaron a presión reducida dando Boc-[1-¹³C]Ala-OH-CHA.

Se añadió ácido cítrico acuoso al 10% (100 ml) a una suspensión de Boc-[1-¹³C]Ala-OH-CHA (32,08 g, 0,111 mol) en acetato de etilo (400 ml), se agitó a temperatura ambiente en una disolución y se saturó con sal común, y se separó la fase orgánica de la disolución. Se extrajo la disolución resultante con acetato de etilo dos veces, se combinaron las fases orgánicas, y luego se lavaron con solución salina saturada dos veces. Se secó la disolución sobre sulfato de magnesio anhidro y se concentró a presión reducida dando un extracto incoloro. Se disolvió el extracto en etanol-agua (9:1) (200 ml) y se le añadió carbonato de cesio (19,0 g, 58,3 mmol). Tras cesar el espumado, se concentró la disolución a presión reducida, se le añadió tolueno al residuo y entonces se destiló de manera azeotrópica para eliminar el agua, proporcionando así un gel. Se suspendió el gel en DMF (200 ml), se le añadió bromuro de bencilo (13,2 ml, 0,111 mol), y se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. Se concentró la disolución a presión reducida, se le añadió acetato de etilo al residuo, se lavó sucesivamente con agua, ácido cítrico acuoso al 10%, solución salina saturada, bicarbonato de sodio acuoso saturado y solución salina saturada, y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. Se retiró el acetato de etilo por destilación de la disolución a presión reducida dando Boc-[1-¹³C]Ala-OBzl.

Se añadió cloruro de hidrógeno 4,5 N/dioxano (250 ml) a Boc-[1-¹³C]Ala-OBzl (31,27 g, 0,111 mol) y luego se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Tras la concentración a presión reducida, se añadió dietil éter (200 ml), y se eliminaron por filtración los cristales precipitados y se secaron a presión reducida dando HCl·H-[1-¹³C]Ala-OBzl (22,48 g).

Se disolvieron HCl·H-[1-¹³C]Ala-OBzl (700 mg, 3,23 mmol), Boc-Arg(Tos).4/5AcOEt.1/4H₂O (1,63 g, 3,23 mmol) y HOBt (459 mg, 3,39 mmol) en DMF (8 ml), se le añadió gota a gota WSCD (602 µl, 3,39 mmol) mientras se agitaba con enfriamiento en hielo, y se agitó con enfriamiento en hielo durante 30 minutos y luego a temperatura ambiente durante 3 horas. Se le añadió acetato de etilo a la disolución, se lavó sucesivamente con bicarbonato de sodio acuoso saturado, agua, ácido cítrico acuoso al 10% y agua y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. Se eliminó por destilación el acetato de etilo de la disolución a presión reducida, se le añadió al residuo diisopropil éter-hexano, se filtró el sólido precipitado y se secó a presión reducida dando Boc-Arg(Tos)-[1-¹³C]Ala-OBzl (1,78 g, 91%).

Se añadió cloruro de hidrógeno 6 N/dioxano (30 ml) a Boc-Arg(Tos)-[1-¹³C]Ala-OBzl (1,78 g, 2,94 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió acetato de etilo a la disolución, y se lavó sucesivamente la disolución con bicarbonato de sodio acuoso saturado, agua, ácido cítrico acuoso al 10% y agua y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. Se eliminó por destilación el acetato de etilo de la disolución a presión reducida, se le añadió al residuo dietil éter-hexano, y se eliminó por filtración el sólido precipitado y se secó a presión reducida dando Bz-Arg (Tos)-[1-¹³C]Ala-OBzl (1,63 g, 91%).

Se cargó fluoruro de hidrógeno anhidro (8,5 ml) en una mezcla de Bz-Arg(Tos)-[1-¹³C]Ala-OBzl (1,63 g, 2,74 mmol) y anisol (1,5 ml, 13,9 mmol) mientras que se agitaba con enfriamiento en baño de metanol-hielo seco, y luego se agitó durante 1 hora con enfriamiento en hielo. Se eliminó por destilación el fluoruro de hidrógeno de la disolución con enfriamiento en hielo, se le añadió a la disolución agua (20 ml) y dietil éter (10 ml) y se agitó, y se retiró la fase acuosa y se concentró a presión reducida. Se disolvió el residuo en agua (30 ml), se eliminó por filtración una cantidad traza de la sustancia insoluble, y se purificó el filtrado mediante RP-HPLC (YMC-PAK ODS 10 µm, 30 x 250 mm, MeCN al 1-60% (conteniendo TFA al 0,1%), 80 min., 20 ml/min.). Tras recogerse y liofilizarse las fracciones principales, se disolvió el residuo en agua (30 ml), se intercambió en acetato con una resina de intercambio de aniones iónica fuerte (Muromac 1x2, forma de AcO-20 ml), y entonces se liofilizó dando Bz-Arg-[1-¹³C]Ala como polvo incoloro (774 mg, 81%).

Los datos de identificación (espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN, gráfica de análisis de HPLC) para Bz-Arg-[1-¹³C]Ala se muestran en las figuras 3(a), 3(b) y 3(c).

[Ejemplo de producción 4] Producción de [U-¹³C]γ-ciclodextrina

Se disolvió [U-¹³C]almidón (Chlorella Kogyo Co., Ltd.; Algal Starch (soluble en agua), n.º de lote 8031,S, U-¹³C:98,6% en átomos, contenido de almidón: 93,5%, 4,65 g) en tampón acetato 50 mM (pH 5,4), se añadió al mismo una concentración de glucanotransferasa de ciclomaltoedextrina al 0,5% (p/v), (Hayashibara Biochemical Laboratories Inc.) (186 unidades). Se dejó reaccionar la disolución a 40°C durante 2 horas y 20 minutos y entonces se trató a 95°C durante 15 minutos para desactivar la enzima. Se repitió este procedimiento cuatro veces, y se aplicó la disolución de reacción resultante en Sephadex G-25 para separar las fracciones que contenían [U-¹³C]γ-ciclodextrina. Se purificó sustancia liofilizada (1,4 g) en 6 partes mediante HPLC (columna TSK-Gel Amide-80). Se liofilizaron las fracciones de [U-¹³C]γ-ciclodextrina dando el producto (398 mg). Los datos de identificación (espectros de ¹H-RMN, ¹³C-RMN y ESI-MS) para [U-¹³C]γ-ciclodextrina se muestran en las figuras 4(a), 4(b) y 4(c).

[Ejemplo 1] Reactivo de diagnóstico del efecto farmacológico para un componente del agente antiparkinsoniano benserazida ([1-¹³C] DOPA) y reactivo de cribado para evaluar el grado de inhibición o potenciación de DOPA descarboxilasa: [1-¹³C] DOPA (sustancia que va a evaluarse: un componente del agente antiparkinsoniano benserazida)

El efecto farmacológico de benserazida es la inhibición de DOPA descarboxilasa. Se facilita [1-¹³C]DOPA (véase el ejemplo de producción 1) que es un sustrato para la DOPA descarboxilasa como reactivo de diagnóstico del efecto farmacológico y reactivo de cribado. Se realizó la comparación en la prueba en aliento de [1-¹³C]DOPA en ratas a las que se administró por vía intraperitoneal benserazida clorhidrato (Sigma) a una dosis de 50 mg/kg tres veces (es decir, por la mañana y la noche del día antes de la prueba en aliento de [1-¹³C]DOPA y 30 minutos antes de iniciar la prueba en aliento en el día de la prueba) (grupo de administración) y ratas sin administración (grupo control). Se llevó a cabo la prueba en aliento de [1-¹³C]DOPA bajo anestesia y se administró [1-¹³C]DOPA a una dosis de 50 mg/kg a través de la vena femoral, y se midió el transcurso del tiempo del grado de aumento del nivel de ¹³C en el CO₂ exhalado (Δ¹³C (‰)).

Se fijaron en posición supina las ratas del grupo de administración y del grupo control que habían estado en ayunas durante la noche bajo anestesia. Se recogió el aliento a una tasa de 100 a 300 ml/min. utilizando una bomba de pulsaciones (bomba de caudal variable VS-500, Shibata Kagaku Kogyo) y se introdujo directamente en la celda de flujo de un analizador de ¹³CO₂ EX-130S (Nihon Bunko). Se colocó una secadora Perma Pure (MD-050-12P, Perma

Pure INC.) entre el soporte para ratas y la bomba de caudal para eliminar vapor de agua vapor del aliento. Cuando se estabilizó la concentración de CO₂, se determinó [1-¹³C]DOPA a una dosis de 50 mg/kg a través de la vena femoral. Se mantuvo la concentración de CO₂ en el aliento recogido a 3 ± 0,5%.

5 Se convirtieron en AD los datos de salida del analizador de ¹³CO₂ y se introdujeron en un ordenador personal (Apple Power Macintosh 8500). Utilizando el software de procesamiento de datos Lab VIEW (National Instruments), se integraron 10 piezas de datos y se promediaron cada 100 ms. a intervalos de 5 segundos y se convirtieron en % de átomos de ¹³C, Δ¹³C (‰) y concentración de CO₂ (%). De esta manera, se llevó a cabo continuamente la prueba en aliento de ¹³C. Se presentaron los datos convertidos en tiempo real y se almacenaron en un disco duro.

10 Se calculó el Δ¹³C (‰) a partir a partir del nivel de ¹³C en el CO₂ exhalado en cada punto de tiempo (¹³C_{min}) y el nivel de ¹³C en el CO₂ patrón (¹³C_{std}) según la siguiente ecuación:

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

15 Los resultados de la prueba en aliento de [1-¹³C]DOPA fueron tal como sigue: en el grupo control, el Δ¹³C aumentó rápidamente tras la administración, alcanzó el 100‰ en el valor pico dos minutos tras la administración y luego disminuyó gradualmente con el transcurso del tiempo; en el grupo de administración, el Δ¹³C (‰) mostró poco aumento tras la administración y era fue de tan solo el 5‰ incluso 20 minutos tras la administración (figura 5). A partir de resultados, se confirmó que la función de la enzima diana para benserazida se inhibía casi al 100% en las condiciones de administración de benserazida del presente ejemplo. Por lo tanto, utilizando [1-¹³C]DOPA como reactivo de diagnóstico del efecto farmacológico, es posible evaluar el efecto farmacológico de benserazida. Además, utilizando [1-¹³C]DOPA como reactivo de cribado, es posible proporcionar el procedimiento y el reactivo para cribar un agente farmacéutico dirigido a la DOPA descarboxilasa que presenta un efecto más fuerte y/o un profármaco del mismo.

[Ejemplo 2] Reactivo de diagnóstico del efecto farmacológico para el agente antidiabético acarbosa (Glc-[U-¹³C]Glc) y reactivo de cribado para evaluar el grado de inhibición o potenciación de α-glucosidasa: Glc-[U-¹³C]Glc (sustancia que va a evaluarse: agente antidiabético acarbosa)

30 El efecto farmacológico de la acarbosa es la inhibición de la α-glucosidasa. Se facilita Glc-[U-¹³C]Glc (véase el ejemplo de producción) que es un sustrato para la α-glucosidasa como reactivo de diagnóstico del efecto farmacológico y reactivo de cribado. Se midió el transcurso de tiempo del grado de aumento del nivel de ¹³C en el CO₂ exhalado (Δ¹³C (‰)) tras la administración de Glc-[U-¹³C]Glc y se comparó en ratas a las que se les administró por vía oral acarbosa (nombre comercial: Glucobay, Bayer Corporation) (2 mg/kg, 4 mg/kg o 10 mg/kg) simultáneamente con la administración oral de Glc-[U-¹³C]Glc (25 mg/kg) y ratas a las que se les administró Glc-[U-¹³C]Glc solo (grupo de acarbosa 0 mg/kg).

40 Se fijaron las ratas (machos Wistar, 8 semanas de edad) en ayunas durante la noche en un soporte para ratas para el sistema de irradiación de microondas sin anestesia. Se recogió el aliento a una tasa de aproximadamente 100 a 300 ml/min. utilizando una bomba de caudal (bomba de caudal variable VS-500, Shibata Kagaku Kogyo), y se mantuvo la concentración de CO₂ en el aliento recogido en aproximadamente el 3%. Se colocó una secadora Perma Pure (MD-050-12P, Perma Pure INC.) entre el soporte para ratas y la bomba de caudal para eliminar el vapor de agua del aliento. Cuando se estabilizó la concentración de CO₂, se retiraron las ratas del soporte para ratas y se administró a las ratas Glc-[U-¹³C]Glc disuelto en agua destilada a través del estómago utilizando un tubo adaptado para la administración oral (cantidad de dosis: 35 μmol/kg (5 ml/kg)). Se tomaron muestras de aliento con una jeringa hasta el punto de tiempo de 20 minutos a intervalos de 5 minutos. Se tomó una muestra de quince ml de aliento mediante una jeringa en un vial a vacío (10 ml) y se selló, y entonces se sometió a análisis automatizado mediante GC-MS (Breath MAT) [FinniganMAT]. Se calculó el Δ¹³C (‰) a partir del δ¹³C que es el valor de ¹³C para la muestra de aliento (una diferencia del valor de ¹³C para la sustancia patrón PDB) según la siguiente ecuación:

$$\Delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = (\delta^{13}\text{C})_{\text{min}} - (\delta^{13}\text{C})_{\text{min}}$$

<Condiciones de medición para Breath MAT>

55 Aparato: Breath MAT plus (Finnigan)

Gas portador: He

60 Ión de medición: m/z = 44, 45, 46

Los resultados de la prueba en aliento de Glc-[U-¹³C]Glc son como se expone a continuación: en todos los grupos, el Δ¹³C aumentó de manera lineal; en el grupo de 0 mg/kg (n=2), el Δ¹³C alcanzó el 72,60 ± 9,47‰ en 20 minutos, en

cambio, el $\Delta^{13}\text{C}$ alcanzó el $37,06 \pm 0,16\%$ en el grupo de 2 mg/kg (n=2), alcanzó el $26,01 \pm 0,38\%$ en el grupo de 4 mg/kg (n=2) y alcanzó el $9,86 \pm 0,66\%$ en el grupo de 10 mg/kg (n=2); por tanto, el $\Delta^{13}\text{C}$ disminuyó con cantidad de dosis creciente (figura 6). A partir de los resultados se confirmó que la función de la enzima diana para la acarbosa se inhibió de una manera dependiente de la dosis en las condiciones de administración de acarbosa del presente ejemplo. Por lo tanto, utilizando Glc-[U- ^{13}C]Glc como reactivo de diagnóstico del efecto farmacológico, es posible evaluar el efecto farmacológico de acarbosa. Además, utilizando Glc-[U- ^{13}C]Glc como reactivo de cribado, es posible proporcionar el procedimiento y el reactivo para el cribado de un agente farmacéutico dirigido a la α -glucosidasa que presenta un efecto más fuerte y/o un profármaco del mismo.

[Ejemplo 3] Reactivo de diagnóstico del efecto farmacológico para el agente antipancreatitis mesilato de camostat (Bz-Arg-[1- ^{13}C]Ala) y reactivo de cribado para evaluar el grado de inhibición o potenciación de la proteasa pancreática: Bz-Arg-[1- ^{13}C] Ala (sustancia que va a evaluarse: agente antipancreatitis mesilato de camostat)

El efecto farmacológico del mesilato de camostat es la inhibición de la proteasa pancreática. Se facilita Bz-Arg-[1- ^{13}C]Ala (véase el ejemplo de producción 3) que es un sustrato para la proteasa pancreática como reactivo de diagnóstico del efecto farmacológico y reactivo de cribado. Se midió el transcurso del tiempo del grado de aumento del nivel de ^{13}C en el CO_2 exhalado ($\Delta^{13}\text{C}$ (%)) tras la administración de Bz-Arg-[1- ^{13}C]Ala y se comparó de la misma manera que en el ejemplo 2 en ratas a las que se les administró por vía oral mesilato de camostat (nombre comercial: Foipan, Ono Pharmaceutical Co., Ltd.) (20 mg/kg) simultáneamente con la administración oral de Bz-Arg-[1- ^{13}C]Ala (12,2 mg/kg) (grupo de administración) y ratas a las que se les administró Bz-Arg-[1- ^{13}C]Ala solo (grupo control). Los resultados de la prueba en aliento de Bz-Arg-[1- ^{13}C]Ala fueron tal como sigue: en ambos grupos, el $\Delta^{13}\text{C}$ aumentó de manera lineal hasta en el punto de tiempo de 15 minutos tras la administración; veinte minutos tras la administración, el $\Delta^{13}\text{C}$ alcanzó el $41,29 \pm 7,49\%$ en el grupo control (n=3), mientras que el $\Delta^{13}\text{C}$ alcanzó el $27,64 \pm 4,86\%$ en el grupo de administración (n=3); por tanto, el $\Delta^{13}\text{C}$ disminuyó en el grupo de administración (figura 7). A partir de los resultados, se confirmó que se inhibió la función de la enzima diana para el mesilato de camostat en las condiciones de administración de mesilato de camostat del presente ejemplo. Por lo tanto, utilizando Bz-Arg-[1- ^{13}C]Ala como reactivo de diagnóstico del efecto farmacológico, es posible evaluar el efecto farmacológico de mesilato de camostat. Además, utilizando Bz-Arg-[1- ^{13}C]Ala como reactivo de cribado, es posible proporcionar el procedimiento y el reactivo para cribar un agente farmacéutico dirigido a la proteasa pancreática que presenta un efecto mayor y/o un profármaco del mismo.

[Ejemplo 4] Reactivo de diagnóstico del efecto farmacológico para el agente digestivo Taka-diestasa ([U- ^{13}C]γ-ciclodextrina) y reactivo de cribado para evaluar el grado de inhibición o potenciación de amilasa: [U- ^{13}C]γ-ciclodextrina (sustancia que va a evaluarse: agente digestivo Taka-diestasa)

Taka-diestasa es una de las amilasas y corresponde a un medicamento que comprende una enzima. Se ha utilizado como agente digestivo para apoyar la función de una amilasa en un organismo vivo (enzima diana). Por lo tanto, el efecto farmacológico de Taka-diestasa es la potenciación de amilasa. Se facilita [U- ^{13}C]γ-ciclodextrina (véase el ejemplo de producción 4) que es un sustrato para Taka-diestasa y la amilasa en un organismo vivo como reactivo de diagnóstico del efecto farmacológico y reactivo de cribado. Se midió el transcurso de tiempo del grado de aumento del nivel de ^{13}C en el CO_2 exhalado ($\Delta^{13}\text{C}$ (%)) tras la administración de [U- ^{13}C]γ-ciclodextrina y se comparó de la misma manera que en el ejemplo 2 en ratas a las que se les administró por vía oral [U- ^{13}C]γ-ciclodextrina (40 mg/kg) 5 minutos tras la administración oral de Taka-diestasa (nombre comercial: Takadiastasa, Sankyo Co., Ltd.) (6 mg/kg) (grupo de administración) y ratas a las que se les administró [U- ^{13}C]γ-ciclodextrina sola (grupo control). Los resultados de la prueba en aliento de [U- ^{13}C]γ-ciclodextrina fueron tal como sigue: en ambos grupos, el $\Delta^{13}\text{C}$ aumentó de manera lineal hasta en el punto de tiempo de 30 minutos tras la administración; veinte minutos tras la administración, el $\Delta^{13}\text{C}$ alcanzó el $45,46 \pm 15,57\%$ en el grupo control (n=2), mientras que el $\Delta^{13}\text{C}$ alcanzó el $83,66 \pm 13,87\%$ en el grupo de administración (n=2); por tanto, el $\Delta^{13}\text{C}$ aumentó en el grupo de administración (figura 8). A partir de los resultados, se confirmó que Taka-diestasa potenció la función de la enzima diana amilasa en las condiciones de administración de Taka-diestasa del presente ejemplo. Por lo tanto, utilizando [U- ^{13}C]γ-ciclodextrina como reactivo de diagnóstico del efecto farmacológico, es posible evaluar el efecto farmacológico de Taka-diestasa. Además, utilizando [U- ^{13}C]γ-ciclodextrina como reactivo de cribado, es posible proporcionar el procedimiento y el reactivo para cribar un agente farmacéutico dirigido a la amilasa que presenta un efecto más fuerte y/o un profármaco del mismo.

[Ejemplo 5] Reactivo de diagnóstico del efecto farmacológico para el agente antagonista del receptor H1 ([1,2- ^{13}C]ornitina) y reactivo de cribado para evaluar el grado de inhibición o potenciación del receptor H1: [1,2- ^{13}C]ornitina (sustancia que va a evaluarse: clorfeniramina maleato)

El efecto farmacológico del clorfeniramina maleato es la inhibición del receptor H1. Se midió el transcurso de tiempo del grado de aumento del nivel de ^{13}C en el CO_2 exhalado ($\Delta^{13}\text{C}$ (%)) tras la administración de [1,2- ^{13}C]ornitina y se comparó de la misma manera que en el ejemplo 2 en ratas a las que se les administró clorfeniramina maleato (Sigma) por vía intraperitoneal una vez en el día antes del experimento y una vez en el día del experimento (40 mg/kg cada uno) y se les administró adicionalmente [1,2- ^{13}C]ornitina (10 mg/kg) a través de la vena femoral 1

5 hora y 30 minutos tras la última administración (grupo de administración) y ratas a las que se les administró [1,2-¹³C]ornitina sola a través de la vena femoral (grupo control). Los resultados de la prueba en aliento de [1,2-¹³C] fueron tal como sigue: en el grupo control (n=2), el $\Delta^{13}\text{C}$ aumentó rápidamente hasta el punto de tiempo de 5 minutos tras la administración, luego aumentó muy lentamente, y alcanzó el $73,1 \pm 0,4\%$ 10 minutos tras la administración; en el grupo de administración (n=2), el $\Delta^{13}\text{C}$ aumentó rápidamente hasta el punto de tiempo de 5 minutos tras la administración, y alcanzó el $84,7 \pm 1,9\%$ 10 minutos tras la administración; por tanto, el $\Delta^{13}\text{C}$ aumentó en el grupo de administración (figura 9). A partir de los resultados, pudo determinarse la presencia o ausencia de administración de clorfeniramina maleato en las condiciones de administración de [1,2-¹³C]ornitina del presente ejemplo. Por lo tanto, utilizando [1,2-¹³C]ornitina como reactivo de diagnóstico del efecto farmacológico, es posible evaluar el efecto farmacológico de clorfeniramina maleato. Además, utilizando [1,2-¹³C]ornitina como reactivo de cribado, es posible proporcionar el procedimiento y el reactivo para cribar un agente farmacéutico dirigido al receptor H1 que presenta un efecto más fuerte y un efecto mucho más fuerte, eficacia medicamentosa y/o un profármaco del mismo.

15 **Aplicabilidad industrial**

Es posible evaluar el efecto farmacológico de un medicamento sobre su diana independientemente del tiempo real; esto ha sido imposible de llevar a cabo por cualquier técnica de la técnica anterior.

20 También es posible evaluar el grado de inhibición de una diana en un organismo completo y en tiempo real; esto ha sido imposible de llevar a cabo por cualquier técnica de la técnica anterior. Utilizando los resultados de esta evaluación, es posible seleccionar una alta eficacia medicamentosa y/o poco efecto secundario entre agentes farmacéuticos y/o profármacos de los mismos.

25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de cualquiera de [1-¹³C]DOPA o benzoil-arginil-[1-¹³C]alanina para evaluar el efecto farmacológico de un medicamento que contiene un agente farmacéutico que comprende una enzima, un inhibidor enzimático o un ligando de receptor o un profármaco del agente farmacéutico.
- 10 2. Utilización según la reivindicación 1, en la que:
- (i) se utiliza [1-¹³C]DOPA para evaluar los efectos farmacológicos de los inhibidores de la DOPA descarboxilasa;
- (ii) se utiliza benzoil-arginil-[1-¹³C]alanina para evaluar los efectos farmacológicos de los inhibidores de proteasas.
- 15 3. Procedimiento de cribado de agentes farmacéuticos que comprenden cada uno una enzima, un inhibidor enzimático o un ligando de receptor y/o profármacos de los agentes farmacéuticos para uno o unos que presentan una eficacia medicamentosa elevada y/o un efecto secundario escaso, comprendiendo el procedimiento las etapas que consisten en:
- 20 seleccionar un agente farmacéutico o profármaco que va a evaluarse de agentes farmacéuticos que comprenden cada uno una enzima, un inhibidor enzimático o un ligando de receptor y/o profármacos de los agentes farmacéuticos;
- 25 administrar a un sujeto no humano el agente farmacéutico o profármaco que va evaluarse y un reactivo que comprende cualquiera de las sustancias (a) a (f) siguientes:
- (a) un compuesto que sirve como sustrato para la enzima que está incluida en el agente farmacéutico que va a evaluarse o para una enzima generada a partir del profármaco que va a evaluarse, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
- 30 (b) un compuesto que sirve como sustrato para una enzima diferente que puede presentar una alteración en la actividad por el acoplamiento al efecto de la enzima que está incluida en el agente farmacéutico que va a evaluarse, o al efecto de una enzima generada a partir del profármaco que va a evaluarse, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
- 35 (c) un compuesto que sirve como sustrato para una enzima que se inhibe directamente por el inhibidor enzimático que está incluido en el agente farmacéutico que va a evaluarse o por un inhibidor enzimático generado a partir del profármaco que va a evaluarse, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
- 40 (d) un compuesto que sirve como sustrato para una enzima que puede presentar una alteración en la actividad por el acoplamiento al efecto del inhibidor enzimático para la otra enzima, que está incluido en el agente farmacéutico que va a evaluarse, o al efecto de un inhibidor enzimático generado a partir del profármaco que va a evaluarse, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
- 45 (e) un compuesto que sirve como sustrato para una enzima que puede presentar una alteración en la actividad mediante la unión entre un receptor y el ligando de receptor que está incluido en el agente farmacéutico que va a evaluarse o un ligando de receptor generado a partir del profármaco que va a evaluarse, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o
- 50 (f) una forma marcada de cualquiera de las sustancias (a) a (e);
- recoger una muestra biológica del sujeto por lo menos una vez;
- 55 medir la cantidad de cualquiera de las sustancias (a) a (f) o su metabolito en la muestra biológica; y
- evaluar el efecto farmacológico del agente farmacéutico o profármaco que va a evaluarse basándose en el valor obtenido en la etapa de medición.
- 60 4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que el reactivo comprende un forma marcada con ¹³C de cualquiera de las sustancias (a) a (e) y se mide el nivel de ¹³C en el CO₂ exhalado en el sujeto.
- 65 5. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que se utiliza [1-¹³C] DOPA como reactivo para cribar un agente farmacéutico dirigido a la DOPA descarboxilasa que presenta un efecto de medicación elevado y/o un profármaco del mismo.
6. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que se utiliza la glucosil-[U-¹³C]glucosa como reactivo para cribar

un agente farmacéutico dirigido a la α -glucosidasa que presenta un efecto de medicación elevado y/o un profármaco del mismo.

5 7. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que se utiliza la benzoil-arginil-[1-¹³C]alanina como reactivo para cribar un agente farmacéutico dirigido a la proteasa que presenta un efecto de medicación elevado y/o un profármaco del mismo.

10 8. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que se utiliza la [U-¹³C] γ -ciclodextrina como reactivo para cribar un agente farmacéutico dirigido a la amilasa que presenta un efecto de medicación elevado y/o un profármaco del mismo.

15 9. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que se utiliza la [1,2-¹³C]ornitina como reactivo para cribar un agente farmacéutico dirigido al receptor H1 que presenta un efecto de medicación elevado y/o un profármaco del mismo.

10. Reactivo para su utilización en el cribado de agentes farmacéuticos que comprenden cada uno una enzima, un inhibidor enzimático o un ligando de receptor y/o profármacos de los agentes farmacéuticos para uno o unos que presentan una eficacia medicamentosa elevada y/o un efecto secundario pequeño,

20 en el que el reactivo comprende [1-¹³C]DOPA para cribar un agente farmacéutico dirigido a la DOPA descarboxilasa que presenta un efecto de medicación elevado y/o un profármaco del mismo.

25 11. Reactivo según la reivindicación 10, en el que se utiliza el reactivo en un procedimiento de cribado de agentes farmacéuticos que comprenden cada uno una enzima, un inhibidor enzimático o un ligando de receptor y/o profármacos de los agentes farmacéuticos para uno o unos que presentan una eficacia medicamentosa elevada y/o poco efecto secundario y comprendiendo el procedimiento las etapas que consisten en:

30 seleccionar un agente farmacéutico o profármaco que va a evaluarse a partir de agentes farmacéuticos que comprenden cada uno una enzima, un inhibidor enzimático o un ligando de receptor y/o profármacos de los agentes farmacéuticos;

administrar a un sujeto no humano el agente farmacéutico o profármaco que va a evaluarse y el reactivo:

35 recoger una muestra biológica del sujeto por lo menos una vez;

medir la cantidad de [1-¹³C]DOPA o un metabolito del mismo en la muestra biológica; y

evaluar el efecto farmacológico del medicamento basándose en el valor obtenido en la etapa de medición.

40 12. Reactivo de diagnóstico según la reivindicación 11, en el que se mide el nivel de ¹³C en el CO₂ exhalado en el sujeto en la etapa de medición.

FIG. 1 (a)

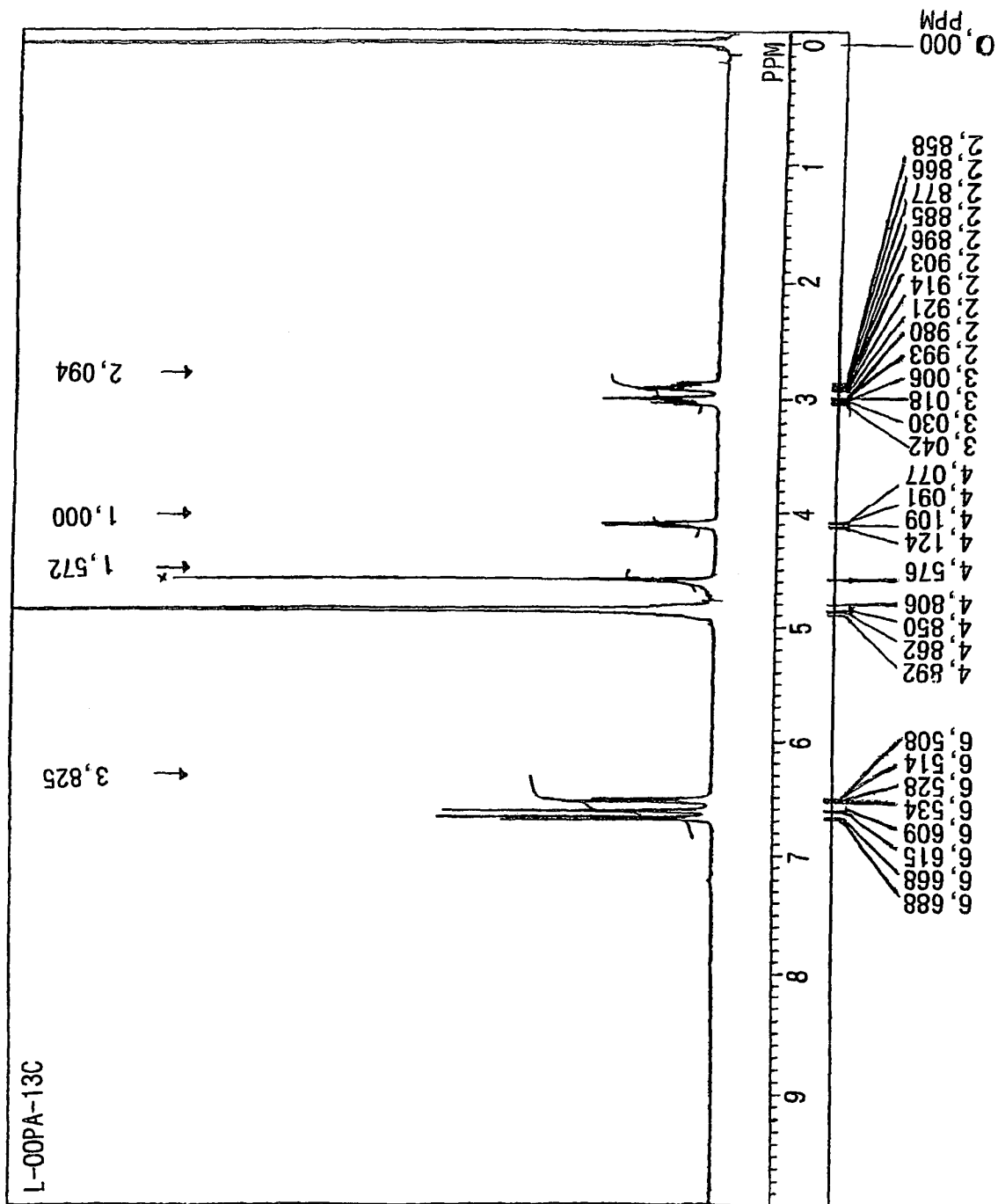


FIG. 1(b)

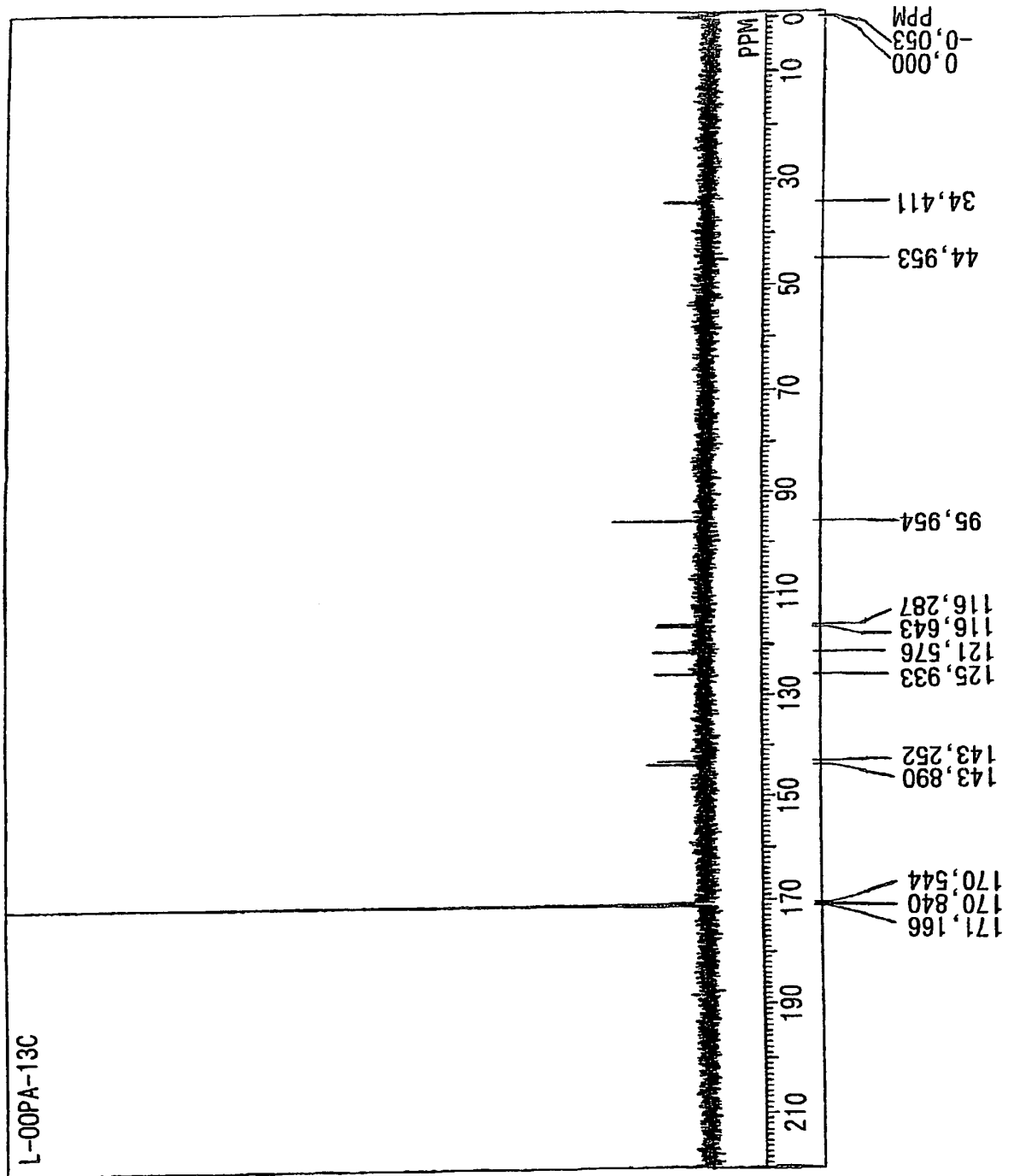


FIG. 2 (a)

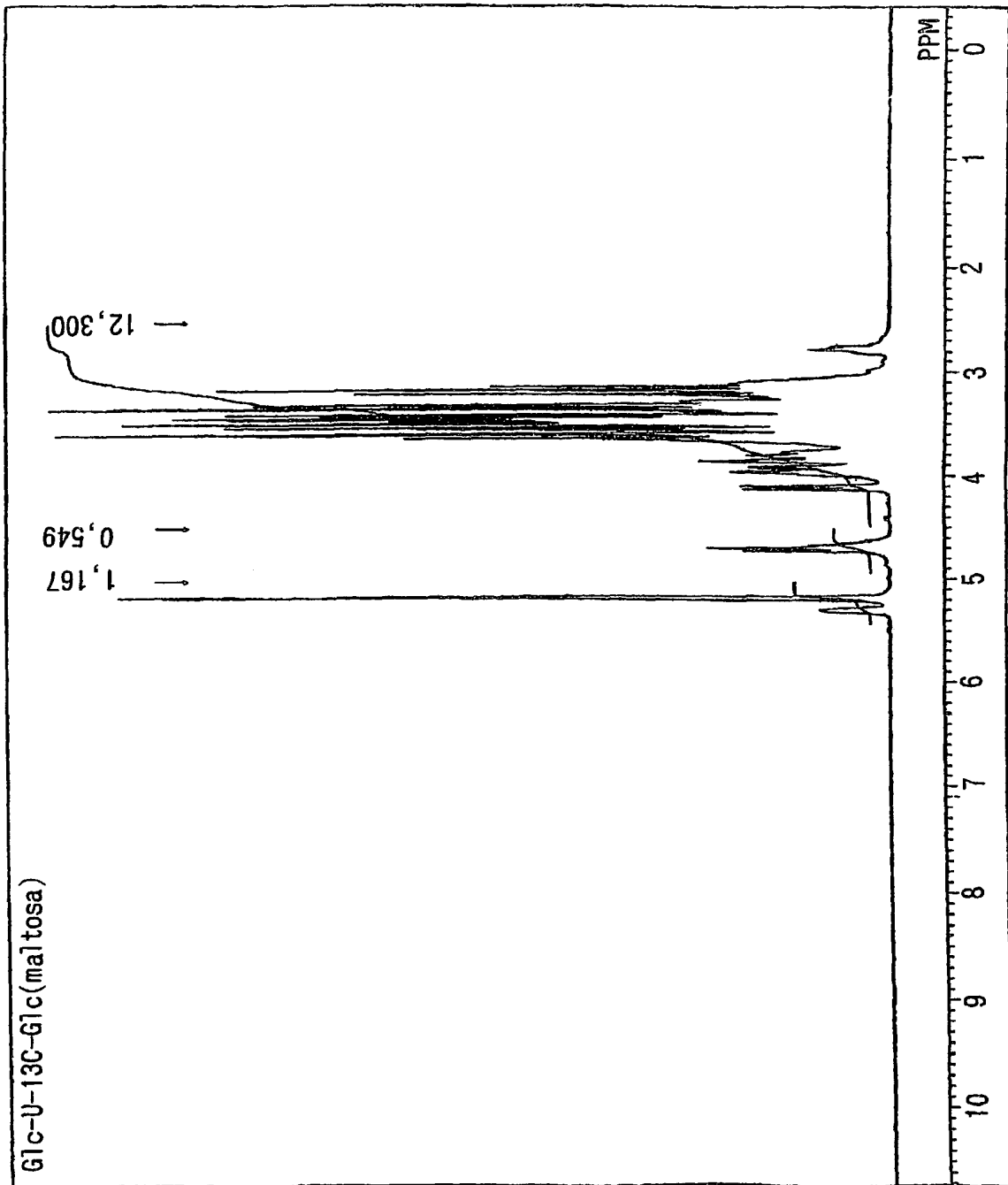


FIG. 2 (b)

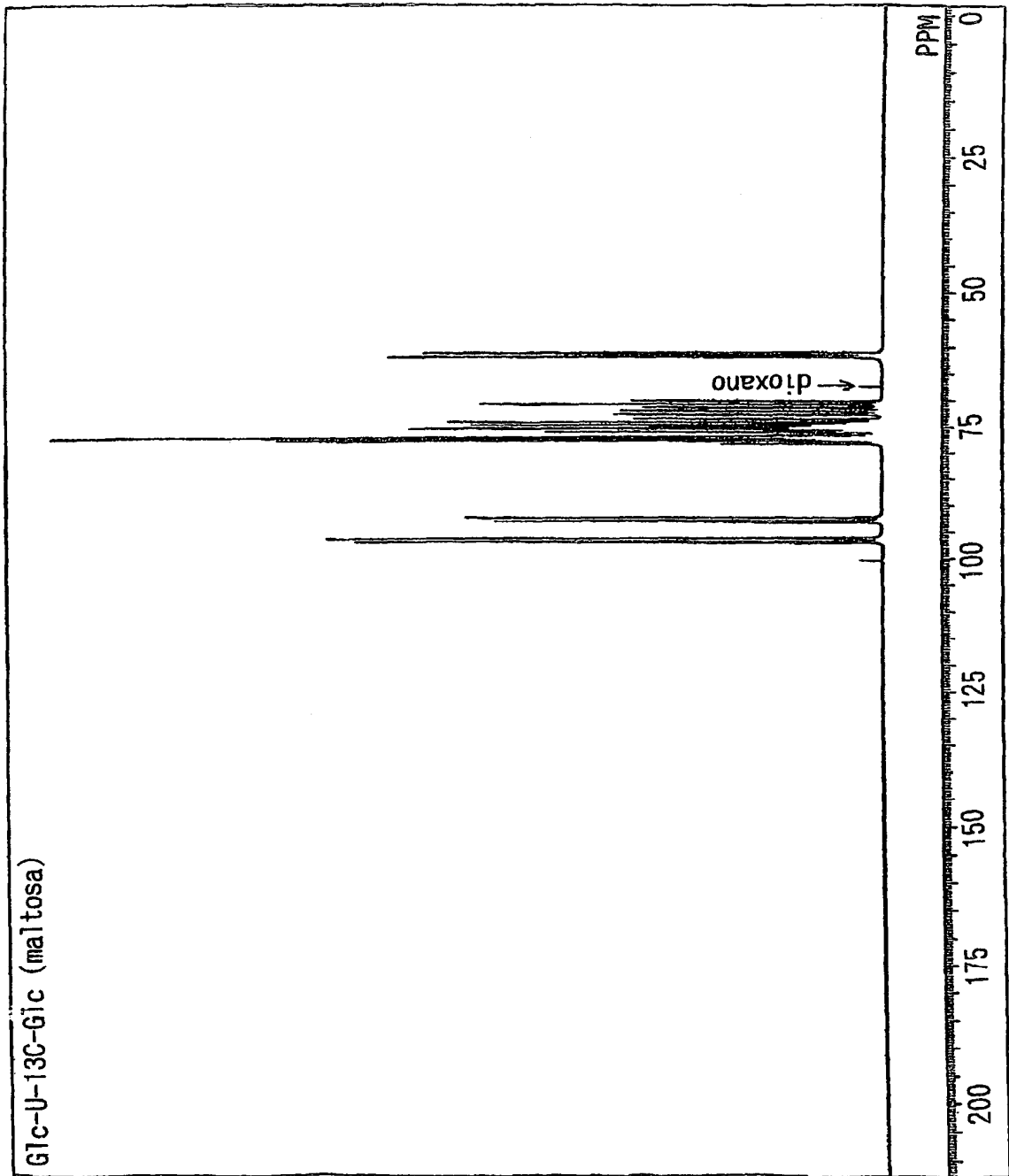


FIG. 2 (c)

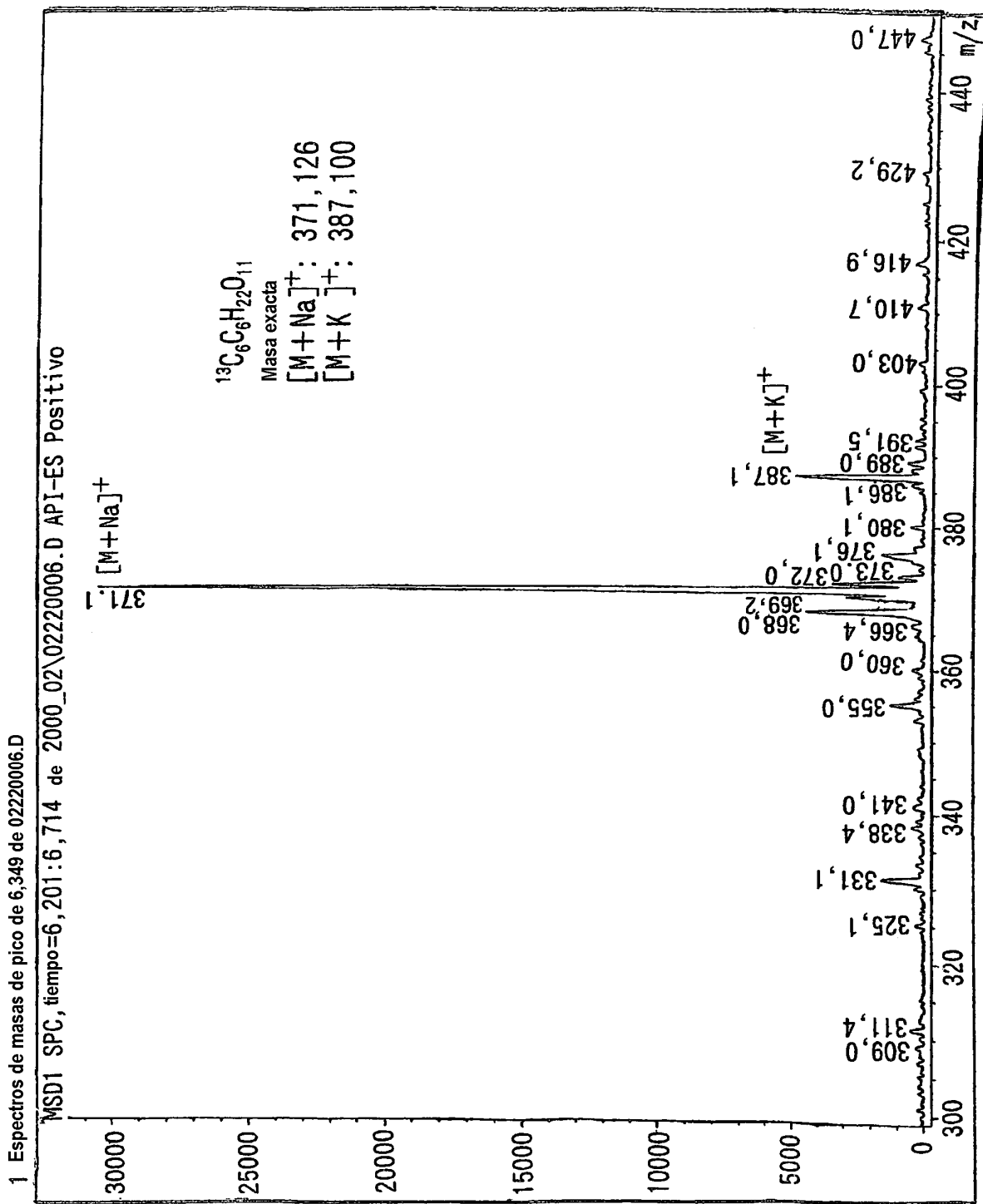


FIG. 3 (a)

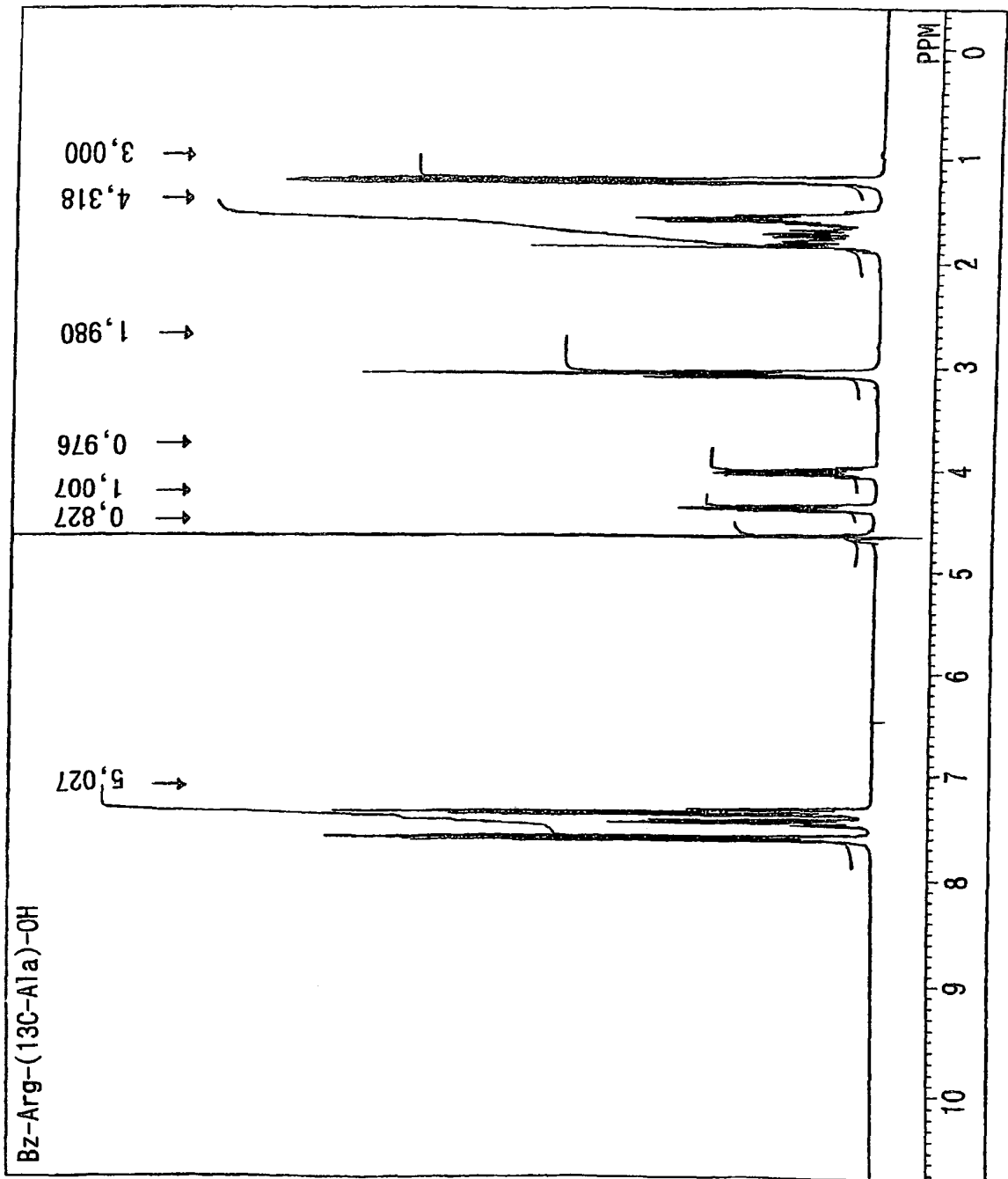


FIG. 3 (b)

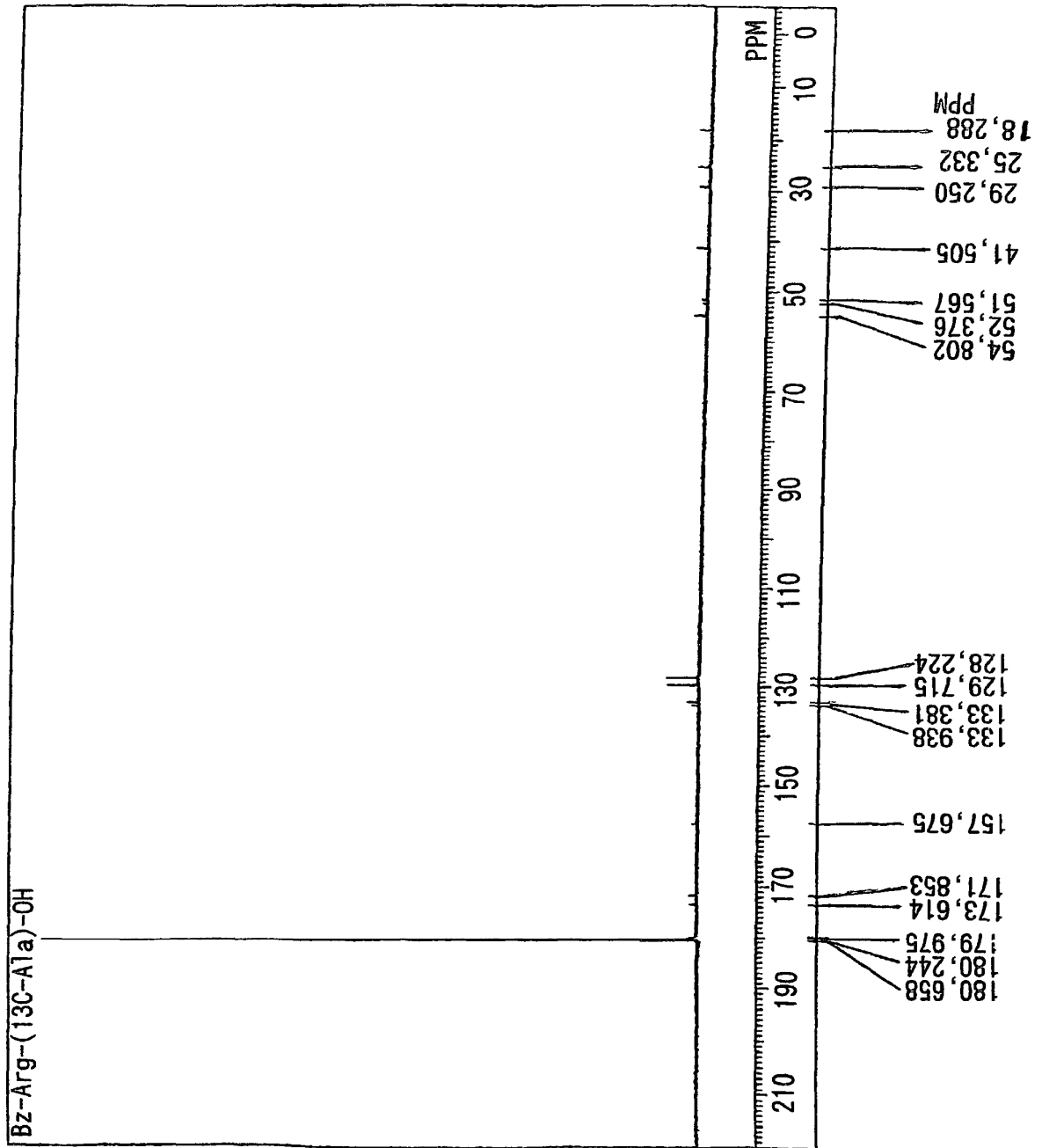


FIG. 3 (c)

CHROMATOPAC C-R4ACH=1INFORME No.=4 CHROMATO=1:@CHRM1.CO2 00/02/01 11:58:26

ARCHIVO DE ANÁLISIS: 2:A2000

MUESTRA: Bz-Arg-(¹³C-Ala)TAMAÑO DE MUESTRA: 0,2 µl (1,45mg/ 145 µl-H₂O)

COLUMNA: YMC Pack ODS A302 (4,6 mm I.D. X 150 mm)+G(3,2x15);#4159679B

ELUYENTE: 0,1% TFA

GRADIENTE: Acetonitrilo 1 % a 60 % [25min.]

VELOCIDAD DE FLUJO: 1,0 ml/min. , PRESIÓN: 101-102 kg/cm²; TEMP.: Ambiente

DETECCION: CH.1 220 nm 0,64 a.u.f.s.

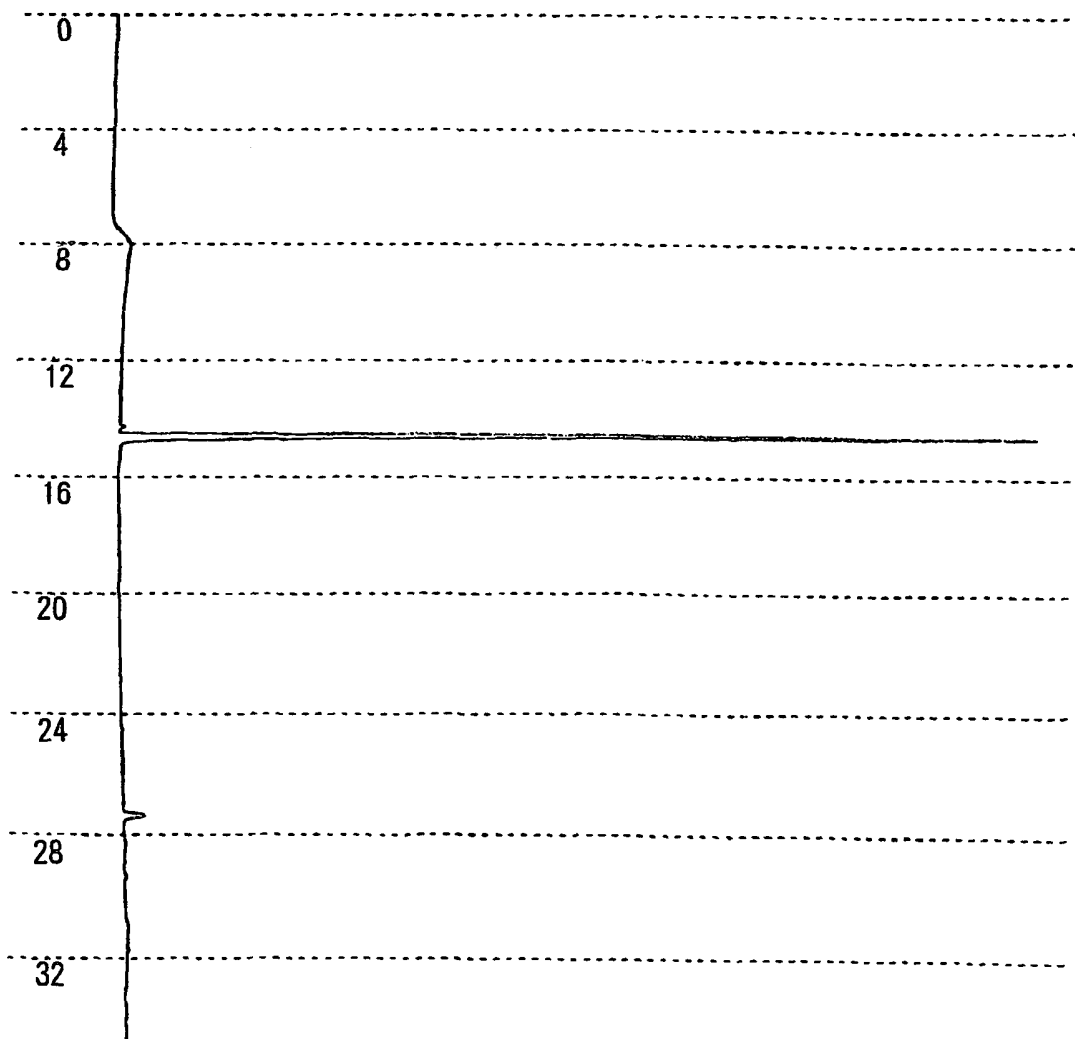


FIG. 4 (a)

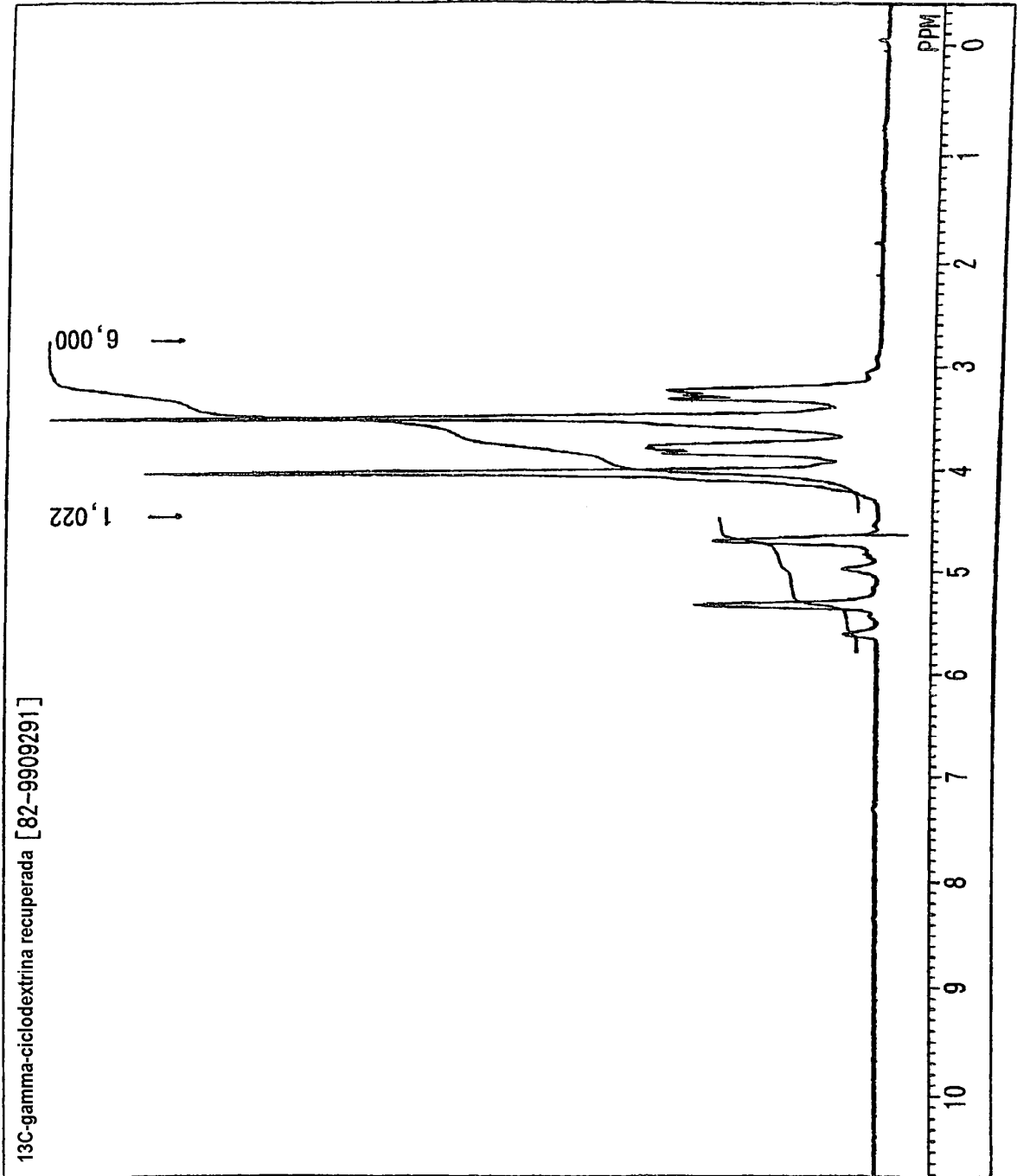


FIG. 4 (b)

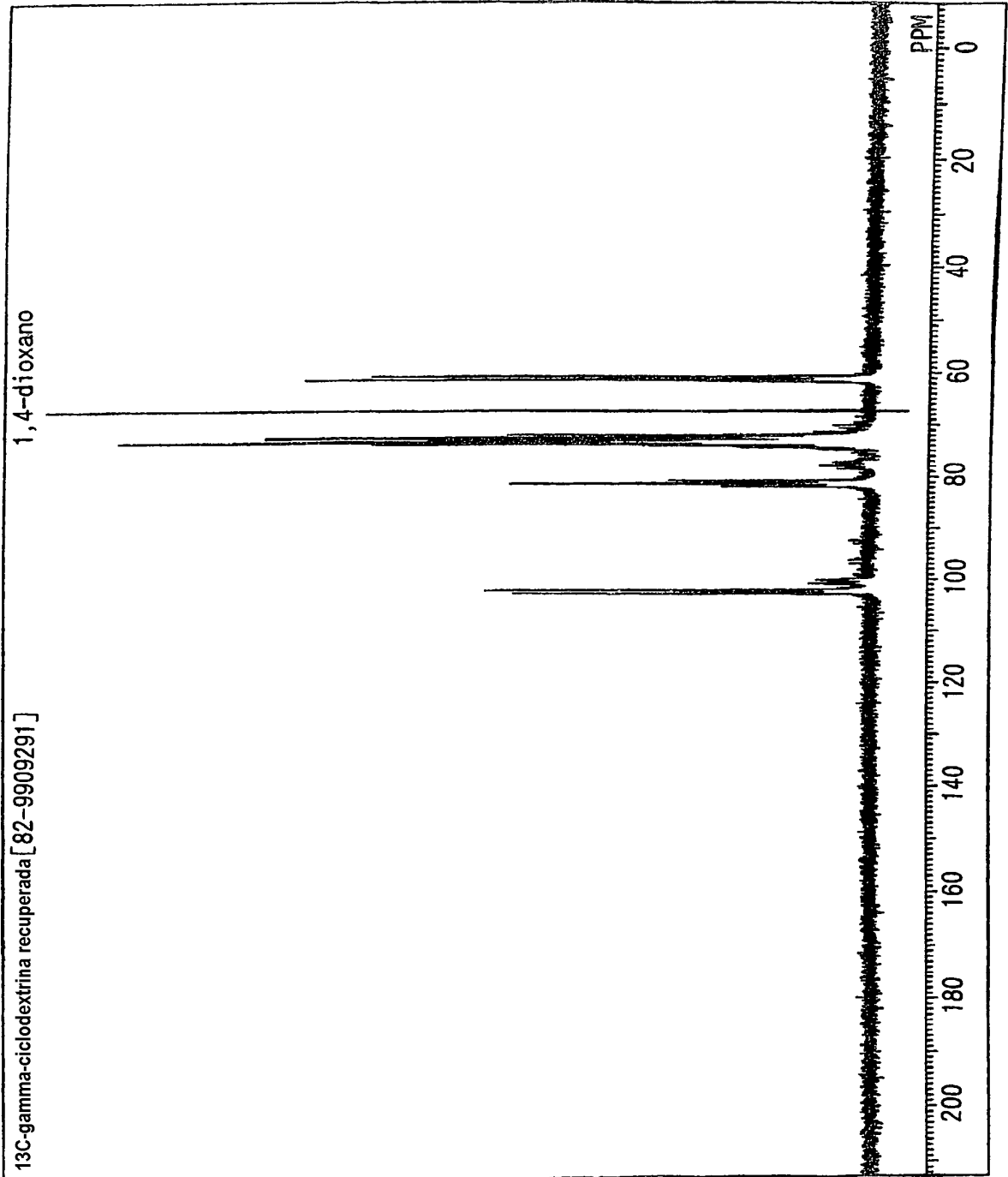


FIG. 4 (c)

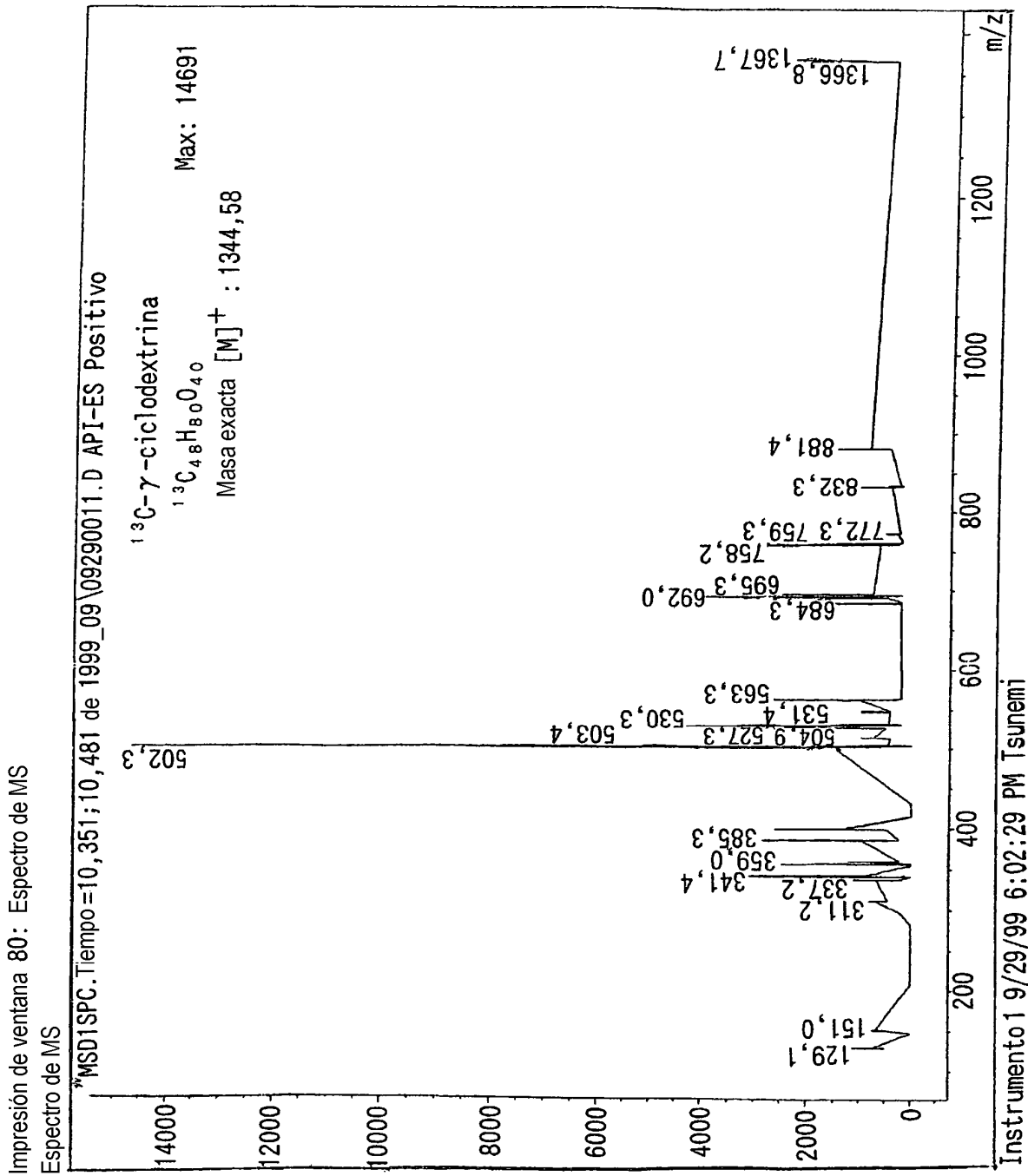


FIG. 5

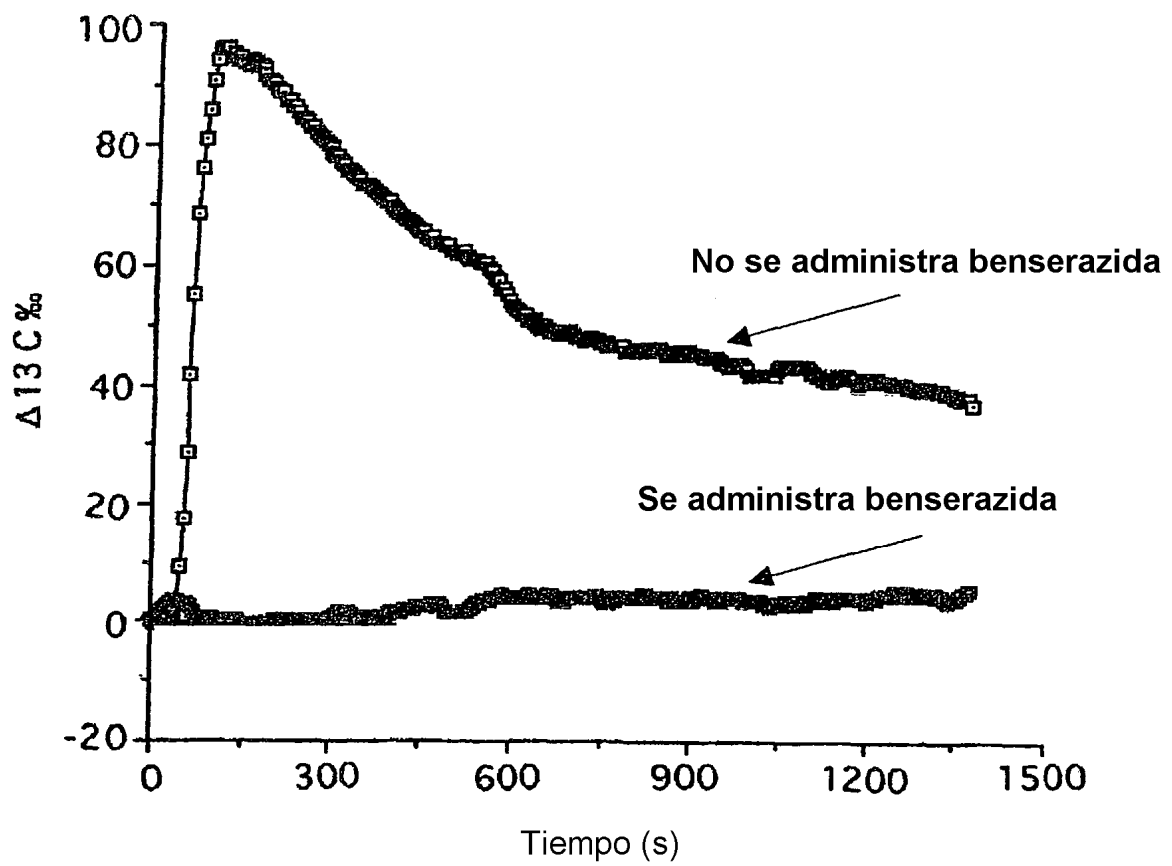


FIG. 6

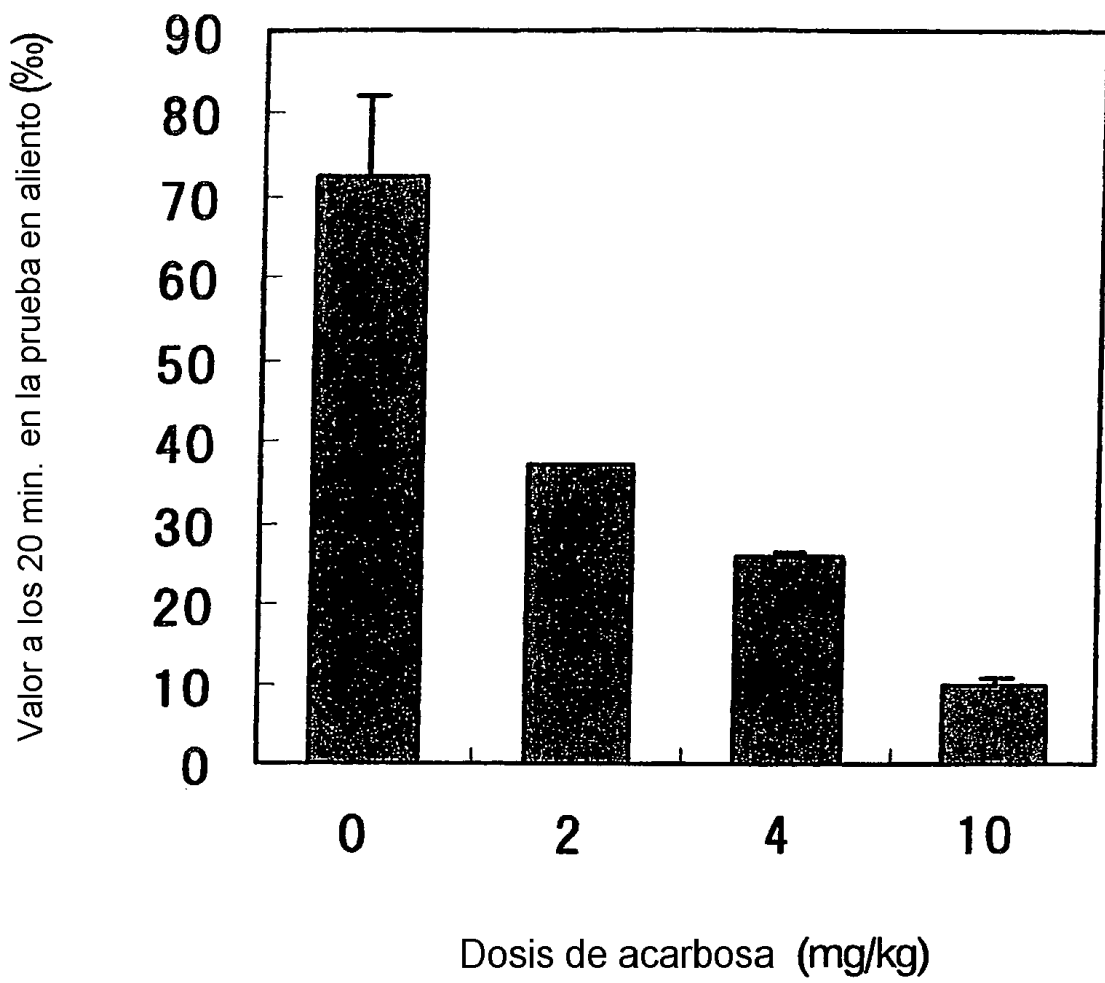


FIG. 7

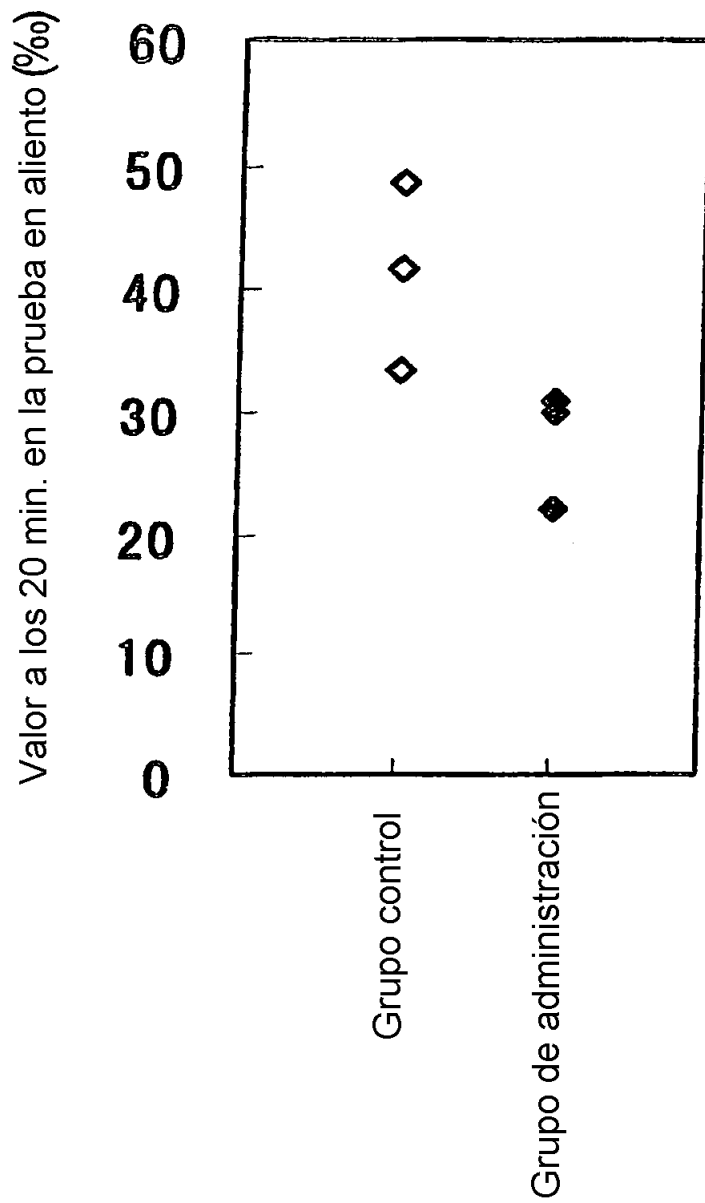


FIG. 8

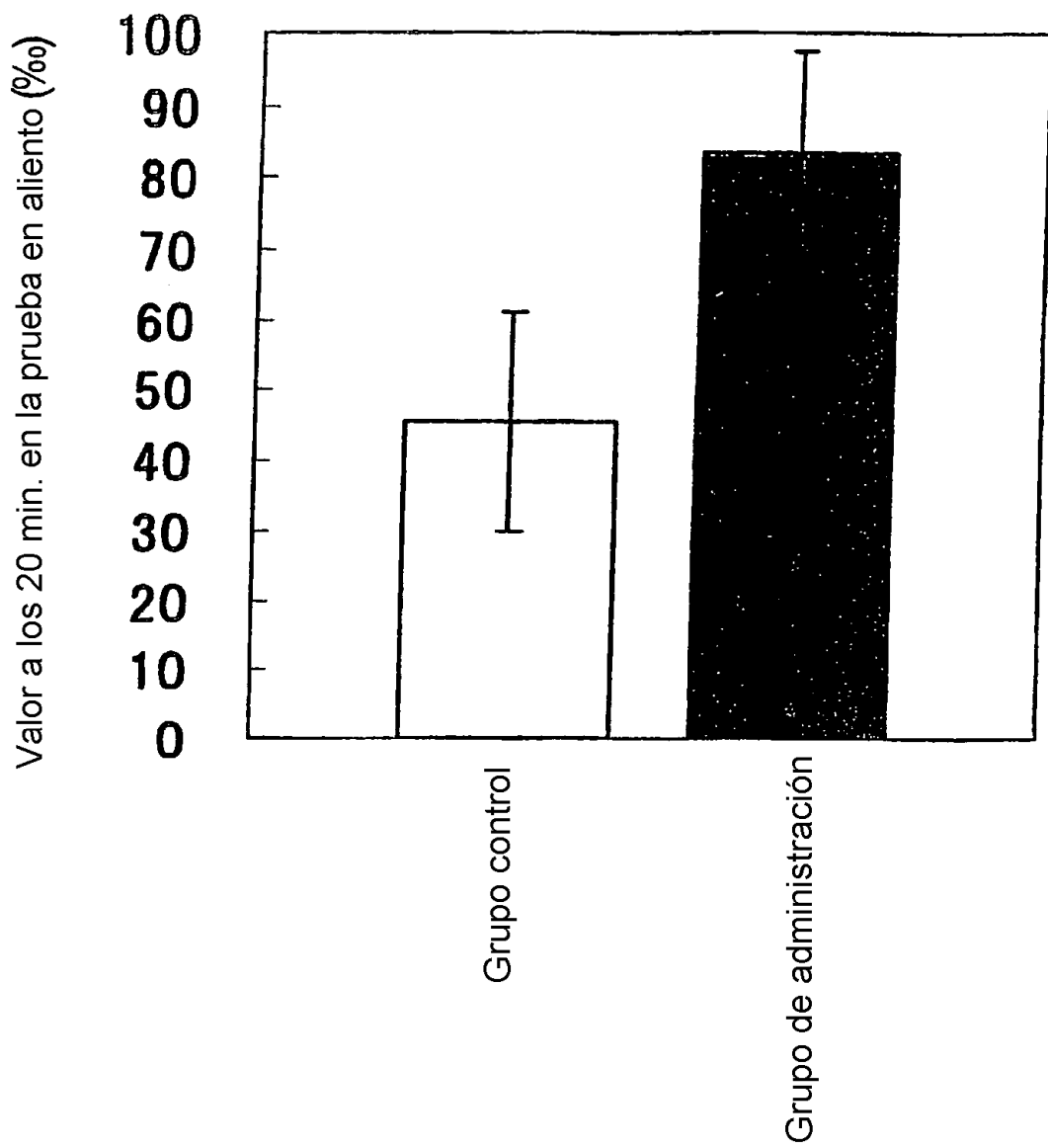


FIG. 9

