

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 360 727**

21 Número de solicitud: 200901222

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **14.05.2009**

30 Prioridad: **15.05.2008 GB 0808777.7**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **08.06.2011**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
08.06.2011

71 Solicitante/s: **NORGINE BV.**
Hogehilweg, 7
1101 Amsterdam Zuid-Oost, NL

72 Inventor/es: **Gruss, Hans-Jürgen;**
Elferink, Ronald Oude;
Stieger, Bruno y
Waart, Dirk de

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

54 Título: **Método prognóstico.**

57 Resumen:

Método prognóstico.

Método para la determinación de la actividad funcional de la ruta de evacuación de MRP2 y/o MRP3 de un humano o un animal, cuyo método comprende:

(i) determinación del nivel del derivado del ácido bílico en la sangre de dicho humano o animal en un intervalo de tiempo predeterminado después de una introducción de una cierta cantidad de un derivado de ácido bílico en dicho sujeto, y

(ii) utilizar la determinación obtenida en la etapa (i) para indicar la actividad funcional de la ruta de evacuación de MRP2 y/o MRP3 de dicho sujeto.

ES 2 360 727 A1

DESCRIPCIÓN

Método prognóstico.

5 Objeto de la invención

La presente invención se refiere a un nuevo método para la determinación de la actividad funcional de la ruta de evacuación MRP2 y/o MRP3 de un humano o un animal y a la utilización de un derivado de ácido bílico en dicho método.

10

Antecedentes de la invención

La MRP2/Mrp2 (ABCC2/Abcc2), conocida también como proteína 2 de resistencia a fármacos múltiples, es un miembro de la subfamilia ABCC de la superfamilia del transportador de casete de unión a ATP. Se facilita un resumen de la familia del transportador de casete de unión a ATP en "Superfamilia del transportador (ABC) de casete de unión a ATP humana" por Michael Dean del National Cancer Institute de Frederick, Maryland, publicado por el US National Center for Biotechnology Information. La MRP2 se expresa en el dominio apical de hepatocitos, enterocitos del intestino delgado próximo y de las células tubulares renales próximas, así como en el cerebro y en la placenta.

20

La MRP2 es importante clínicamente dado que modula la farmacocinética de muchos fármacos y su expresión y actividad son también alterados por una serie de fármacos y de enfermedades. Por ejemplo, la expresión de MRP2 es alterada en pacientes con enfermedades de hígado tales como cirrosis biliar primaria, colestasis (por ejemplo, colestasis inducida por fármacos), enfermedades del hígado por grasas, enfermedades del hígado de tipo alcohólico, colangitis esclerosante primaria o hepatitis vírica. En el riñón, la MRP2 funciona en la eliminación renal de sustratos de la sangre hacia la orina. En el hígado, la MRP2 es la exportadora principal de aniones orgánicos desde el hígado a la bilis. La MRP2 puede transportar sales bílicas sulfatadas y glucoronidadas, así como otros aniones orgánicos y/o sus conjugados con glucuronato, glutatión y sulfato [Gerk y otros J pharmacol Exp Ther 2002 Aug; 302 (2): 407-415]. Además del transporte de conjugados la MRP2 transporta una serie de moléculas incluyendo quimioterapéuticos del cáncer, uricosúricos, antibióticos, leucotrienos, glutatión, toxinas y metales pesados. La MRP2 juega también un importante papel en la eliminación de glucuronósidos de bilirrubina de hepatocitos hacia la bilis. El gen de la MRP2 es mutado en pacientes con el síndrome de Dubin-Johnson, una enfermedad humana del transporte de iones orgánicos. La ausencia de MRP2 funcional de la membrana canalicular provoca hiperbilirrubinemia conjugada, observado por la enfermedad hereditaria del síndrome de Dubin-Johnson.

30

La pérdida de función del MRP2 es frecuentemente bien tolerada y compensada por la sobreexpresión de otros transportadores de membrana, particularmente la proteína 3 de resistencia a fármacos múltiples (MRP3, conocida también como ABCC3) en el miembro basolateral de hepatocitos [Nies y otros Pflugers Arch (2007) 453:643-659]. Lo mismo que la MRP2, MRP3 es un miembro de la subfamilia ABCC de la superfamilia de transportador de casete de unión a ATP. La MRP3 se encuentra presente en el intestino, riñón y en el hígado.

40

El conocimiento del estado de la actividad de MRP2/3 de un sujeto podría ser utilizado por lo tanto para indicar una amplia gama de estados posibles.

45

Descripción de la invención

Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención dar a conocer un método para la determinación de la actividad funcional de la ruta de eliminación de MRP2 y/o MRP3 de un humano o un animal.

50

Los inventores han descubierto de manera inesperada que la MRP2 es el transportador más destacado responsable de la secreción biliar de colil lisil fluoresceína (CLF), conocida también como fluoresceína lisicol, y que la MRP3 es responsable de la excreción basolateral de CLF. De acuerdo con ello, la CLF y otros ácidos bílicos que tienen una ruta similar de eliminación/metabólica pueden ser utilizados en la determinación de la actividad funcional de la ruta de evacuación MRP2/3.

55

La presente invención es particularmente sorprendente teniendo en cuenta la materia dada a conocer por Mills y otros en Biochim Biophys Acta 1991 Dec 6; 1115(2): 151-156. Dichos investigadores mostraron que en ratas la proporción de excreción biliar de CLF después de inyección en la vena yugular tiene una cinética similar a la del glicocolato, cuyo transporte es conocido que es mediado por ABCB11. El ABCB11 es un miembro de la subfamilia ABCB de la superfamilia de transportador (ABC) de casete de unión a ATP.

60

Otras pruebas que condujeron a la creencia de que el CLF es transportado con intermedio de ABCB11 fueron proporcionadas por Baxter y otros [Biochim Biophys Acta 1995 Jun 6; 1256 (3) : 374-380]. Baxter y otros administraron glicocolato y CLF a hígados de ratas perfundidos y aislados en condiciones de reciclado y observaron que el CLF era capaz de incrementar la producción de fosfolípidos y colesterol de manera similar a la que se había encontrado para el glicocolato. Se mostró en el mismo estudio que el hígado de rata tiene una capacidad mucho mayor de transferen-

65

ES 2 360 727 A1

cia de glicocolato (GC) desde el perfundido a la bilis que el CLF y de forma concomitante que el incremento en la producción de fosfolípidos y colesterol era menor con CLF en comparación con GC.

5 En un estudio posterior [Mills y otros en J Hepatol 1999 Oct; 31(4): 678-684], Mills y otros investigaron ABCC2/Abcc2 como transportador posible para CLF. Sin embargo, llegaron a una conclusión de un estudio con ratas Wistar normales y TR (con deficiencia de Abcc2) que Abcc2 no estaba involucrada en la excreción biliar de CLF, basándose en la observación de excreción biliar similar en ambas cepas.

10 Como resumen, antes de las presentes investigaciones, la totalidad de la técnica anterior sobre este tema llegaba unánimemente a la conclusión de que la CLF era transportada desde el hígado a la bilis por la ruta ABCB11/Abcb11, en vez de la ruta ABCC2/Abcc2, y por lo tanto no se habría considerado como agente para su utilización en un método para la determinación de la actividad de MRP2/3.

15 De acuerdo con la presente invención se da a conocer un método para la determinación de la actividad funcional de la ruta de eliminación de MRP2 y/o MRP3 de un humano o un animal, cuyo método comprende:

(i) determinación del nivel del derivado del ácido bílico en la sangre de dicho humano o animal en un intervalo de tiempo predeterminado después de una introducción de una cierta cantidad de un derivado de ácido bílico en dicho sujeto, y

20 (ii) utilizar la determinación obtenida en la etapa (i) para indicar la actividad funcional de la ruta de evacuación de MRP2 y/o MRP3 de dicho sujeto.

25 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se da a conocer un método para llevar a cabo la prognosis o diagnosis en un humano o animal, cuyo método comprende:

determinación del nivel de un derivado de ácido bílico en la sangre de dicho humano o animal en un intervalo de tiempo predeterminado después de la introducción de una cantidad del derivado de ácido bílico en dicho sujeto.

30 Caracterizado porque la determinación obtenida es utilizada para indicar la actividad funcional de la ruta de evacuación de MRP2 y/o MRP3 del sujeto.

El término “determinación” tiene en este contexto un significado amplio. Comprende tanto el análisis cuantitativo para cuantificar el nivel o cantidad de derivado de ácido bílico en la muestra como análisis cualitativo para detectar si el ácido bílico se encuentra presente o no, y en caso apropiado el grado al cual se encuentra presente. Por lo tanto, no es esencial para este método la obtención de un valor numérico para el nivel del derivado de ácido bílico en la sangre. Por ejemplo, la determinación de que el nivel del derivado de ácido bílico en la sangre se encuentra dentro de un cierto intervalo puede ser utilizado para evaluar la actividad funcional de la ruta de MRP2 y/o MRP3. Por analogía, las palabras “determinar” y “determinación” reciben un significado similar.

40 La determinación del nivel de ácido bílico puede ser llevada a cabo tal como se describe en la descripción de la patente europea EP 1 003 458 (la totalidad de su texto es aportada como referencia y está destinado a formar parte integral de la materia que se da a conocer). Dicha descripción da a conocer la utilización de derivados de ácido bílico dotados de color o fluorescentes en sujetos humanos para determinar la función del hígado del sujeto. Un ejemplo de este derivado del ácido bílico indicado en EP 1 003 458 es derivado fluorescente de fluoresceína, colil lisil fluoresceína (CLF). El documento EP 1 003 458 da a conocer la utilización de CLF como potencial prueba funcional del hígado.

50 El objetivo de utilizar un compuesto derivado de ácido bílico, tal como CLF en una prueba de función del hígado era proporcionar un compuesto que sería transportado desde los hepatocitos a la bilis de la misma manera que los ácidos bilícos naturales. Los ácidos bilícos son llevados a las células del hígado por lo menos por dos sistemas de transporte: un sistema dependiente de Na⁺ que involucra un polipéptido contransportador de Na⁺/taurocolato (conocido como NTCP) y un sistema independiente de Na⁺, que involucra transportadores en la familia del transportador de anión orgánico (conocida como familia OATP). Los ácidos bilícos son excretados a los conductos bilícos por la bomba de exportación de la sal biliar, conocida también como BSEP o ABCB11, que se expresa en el lado del conducto biliar de las células del hígado. Tal como se ha descrito en lo anterior, antes de la presente invención se creía que la CLF era excretada a la bilis a través de ABCB11.

60 En vez de ello, los inventores han descubierto que el método anterior puede ser utilizado para indicar la actividad funcional de la ruta de evacuación MRP2 y/o MRP3 de un sujeto. La expresión y actividad de MRP2/MRP3 son alteradas por una amplia gama de fármacos y estados de enfermedad, por lo que el conocimiento de la actividad funcional de la ruta de eliminación de MRP2 y/o MRP3 del sujeto se puede utilizar para indicar una amplia gama de estados incluyendo los que se mencionan en esta descripción. Este método es, por lo tanto, útil en la diagnosis o prognosis de una serie de estados seleccionados entre aquellos en los que está modificada la expresión de MRP2 y/o MRP3, tales como sobrerregulados o subregulados, o en los que el gen MRP2 y/o MRP3 se encuentra mutado. Preferentemente el método de la presente invención es utilizado para la diagnosis o prognosis de un estado o enfermedad especificado.

ES 2 360 727 A1

Los términos “actividad funcional de la ruta de evacuación de MRP2 y/o MRP3” o “actividad funcional de la ruta de eliminación de MRP2 y/o MRP3” tal como se utilizan en esta descripción se refieren a la actividad de transporte de la proteína transportadora MRP2 y/o la proteína transportadora MRP3 en el transporte de sustratos a través de membranas celulares.

La determinación del nivel de un derivado de ácido bílico en la sangre se puede procesar o analizar en una serie de formas. El nivel de un derivado de ácido bílico en la sangre puede ser comparado, como mínimo, con una medición estándar. Resultados similares tomados en diferentes intervalos predeterminados de tiempo pueden ser comparados con estas mediciones estándar.

No obstante, no es necesario realizar una comparación con un estándar. Es posible utilizar la determinación obtenida para facilitar una indicación directa de la actividad funcional de la ruta de eliminación de MRP2 y/o MRP3 de un sujeto sin necesidad de comparación alguna con resultados de un sujeto sano o de un sujeto con una función MRP2/3 conocida.

Preferentemente el método comprende una etapa adicional de utilización de la determinación del nivel del derivado de ácido bílico para llegar a un valor numérico, en el que el valor numérico indica la actividad funcional de la ruta de evacuación de MRP2 y/o MRP3 del sujeto. Un único valor numérico indicativo de la actividad funcional de la ruta de evacuación de MRP2 y/o MRP3 del sujeto proporciona ventajosamente un medio útil para los médicos para evaluar funciones de un paciente afectado por actividad MRP2/3, tal como función del hígado, función del riñón o función intestinal. Este valor numérico puede ser obtenido utilizando la determinación del nivel del derivado de ácido bílico para conseguir una medición directa de la actividad funcional de la ruta de evacuación de MRP2 y/o MRP3 del sujeto.

Preferentemente, la determinación obtenida es comparada como mínimo con un estándar para indicar la actividad funcional de la ruta de evacuación de MRP2 y/o MRP3 del sujeto.

Preferentemente, el nivel del derivado de ácido bílico en la sangre del sujeto es determinado en 2 o más intervalos de tiempo predeterminados después de la introducción de una cierta cantidad del derivado de ácido bílico en el sujeto. Tomando una serie de muestras de sangre a lo largo del tiempo, se puede construir una curva de eliminación del plasma y se puede comparar con las curvas de eliminación del plasma obtenidas de sujetos que tienen una actividad MRP2/3 conocida. Dos o más determinaciones de nivel del derivado de ácido bílico en la sangre del sujeto tomadas a diferentes intervalos pueden ser utilizadas para obtener dicho valor numérico indicador de la actividad funcional de la ruta de evacuación de MRP2 y/o MRP3 del sujeto.

Por ejemplo, cuando el nivel del derivado de ácido bílico en la sangre del sujeto es determinado en dos o más intervalos de tiempo predeterminados, la determinación obtenida en un primer intervalo de tiempo después de la administración y la determinación obtenida en un segundo intervalo de tiempo después de la administración, se pueden expresar como proporción o como porcentaje. De este modo, una proporción de la determinación después de 30 minutos o después de 60 minutos se puede expresar como proporción de la determinación después de 10 minutos. Esta proporción indica un valor numérico, generalmente menor que la unidad, que facilita una indicación de la actividad funcional de la ruta de MRP2 y/o MRP3 del sujeto.

De manera alternativa, la determinación en un intervalo de tiempo más tardío, por ejemplo, a los 30, 60 ó 90 minutos, se puede expresar como porcentaje de la determinación en el intervalo de tiempo anterior, por ejemplo 10 minutos, después de la administración del derivado de ácido bílico. Esta cifra de porcentaje proporciona igualmente una indicación de la actividad funcional de la ruta de MRP2 y/o MRP3 del sujeto.

De manera alternativa, el valor numérico indicativo de la actividad funcional de la ruta MRP2/3 del sujeto se puede obtener determinando la pendiente de una curva de eliminación de plasma logarítmica-lineal derivada de las determinaciones obtenidas. De manera alternativa, se puede obtener un valor numérico determinando el área situada debajo de la curva de eliminación del plasma derivada de los resultados. Además, la diferencia entre las pendientes de un gráfico logarítmico-lineal derivado de una curva de eliminación estándar se puede calcular para proporcionar dicho valor numérico que indica la actividad funcional de la ruta MRP2 y/o MRP3. De manera similar, la diferencia entre las áreas situadas por debajo de la curva de eliminación del plasma derivadas de resultados de prueba y una curva de eliminación estándar se pueden calcular para proporcionar dicho valor numérico.

El término “estándar” en este contexto tiene un significado amplio. Está destinado a comprender cualquier medición individual o serie de mediciones (dos o más) tomadas de un humano o sujeto animal. Esto comprende mediciones tomadas de sujetos sanos, sujetos con función MRP2/3 conocida y puede incluir una medición o mediciones tomadas del sujeto cuya función MRP2/3 está siendo investigada. Es decir, cuando existe la preocupación del avance o manifestación de una enfermedad, se pueden comparar las mediciones tomadas a lo largo del tiempo, actuando el propio sujeto como control.

Preferentemente, el derivado de ácido bílico comprende un marcador tal como un color o una fluorescencia.

ES 2 360 727 A1

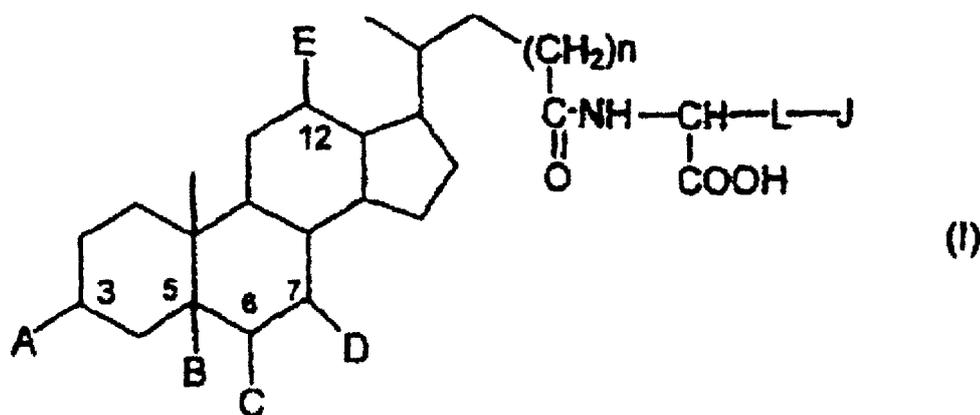
Preferentemente, el método comprende además la etapa de proporcionar como mínimo una muestra de sangre que ha sido pasada por el hígado del sujeto y cuya muestra ha sido recogida en un intervalo de tiempo predeterminado después de la administración del derivado de ácido bílico al y sujeto, en el que la muestra o muestras de sangre son procesadas para obtener plasma o suero de la sangre. Por lo tanto, se puede facilitar un método *in vitro* para determinar la actividad funcional de la ruta de evacuación de MRP2 y/o MRP3 del sujeto.

Preferentemente, la muestra o muestras de sangre son procesadas por centrifugación. Preferentemente las proteínas de la sangre son separadas de plasma/suero de la sangre.

Preferentemente, el derivado de ácido bílico es suministrado al sujeto por vía intravenosa.

Preferentemente, el derivado de ácido bílico comprende (a) una fracción esteroide que tiene (i) como mínimo un sustituyente seleccionado entre el grupo que consiste en un sustituyente 3-hidróxilo, un sustituyente 7-hidróxilo y un sustituyente 12-hidróxilo, y (ii) un grupo carboxilo fijado por medio de una unión amida a una cadena lateral de la fracción esteroide; y (b) una fracción activa que se tiene que direccionar al hígado, siendo fijada dicha fracción activa a un átomo de carbono α relativo al grupo carboxilo.

De manera especialmente preferente, el derivado de ácido bílico tiene la siguiente fórmula general (I):



en la que A se ha seleccionado entre el grupo que consiste en α -OH y β -OH; B se ha seleccionado entre el grupo que consiste en α -H y β -H; C se ha seleccionado entre el grupo que consiste en -H, α -OH y β -OH; o B y C junto con un doble enlace; D se ha seleccionado del grupo que consiste en -H, α -OH y β -OH; E se ha seleccionado del grupo que consiste en -H, α -OH y β -OH; L es una fracción de unión; J es una fracción con color o fluorescencia; y n es 0 ó 1.

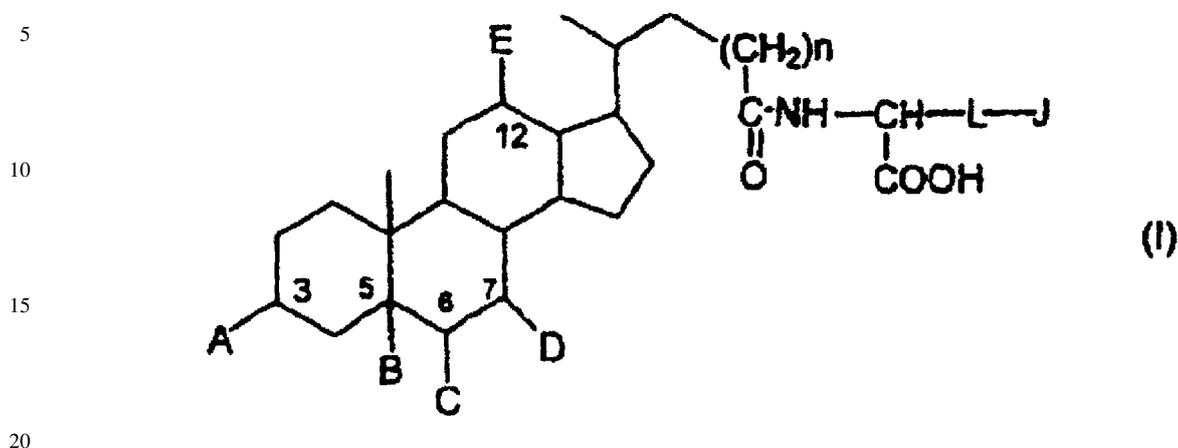
En la fórmula anterior, la fracción de unión, L, tiene preferentemente terminal N en su extremo fijado a la fracción con color o fluorescencia, J, y es preferentemente $-(CH_2)_nNH$, en la que n es 3 ó 4, $-(CH_2)_4NH-(CH_2)_3NHC(=NH)NH-$, ó $-(CH_2)_2-CH(OH)CH_2NH-$.

De manera alternativa, la fracción $-NH-CH(COOH)-L-$ puede ser derivada de S-adenosilhomocisteína, S-adenosilmetionina, S-amino-imadazol-4-carboxamida, asparagina, cadaverina, cistamina, citrullina, ácido diaminopimélico, ácido 2,4-diaminobutírico, cisteamina, glutamina, 3-hidroxiquinurenina, quinurenina, putrescina o negamicina. De manera alternativa se pueden utilizar aminoácidos ácidos en vez de los anteriores en los que la fracción activa J tiene un grupo amino y/o es hidrofóbica.

En la fórmula anterior preferentemente J es o comprende una fluoresceína, rodamina u otra fracción de fluorescencia.

Preferentemente, la fracción esteroide del derivado de ácido bílico se basa en un ácido seleccionado entre el grupo que consiste en ácido cólico, ácido quenodesoxicólico, ácido desoxicólico, ácido hiodesoxicólico, ácido hiocólico, ácido α -, β - u ω -muricólico, ácidos no bílicos, ácido litocólico, ácido 3 β -hidroxicolenoico, ácido ursodesoxicólico y ácido alocólico (ácido 5 α -colan-24-oico).

Preferentemente, dicho derivado de ácido bílico es un compuesto de fórmula (I)



25 en la que A se selecciona entre el grupo que consiste en α -OH y β -OH; B se selecciona entre el grupo que consiste en α -H y β -H; C se selecciona del grupo que consiste en -H, α -OH y β -OH; o B y C conjuntamente forman un enlace doble; D es seleccionado del grupo que consiste en -H, α -OH y β -OH; E es seleccionado del grupo que consiste en -H, α -OH y β -OH; L es una fracción de enlace; J es una fracción dotada de color o fluorescencia; y n es 0 ó 1.

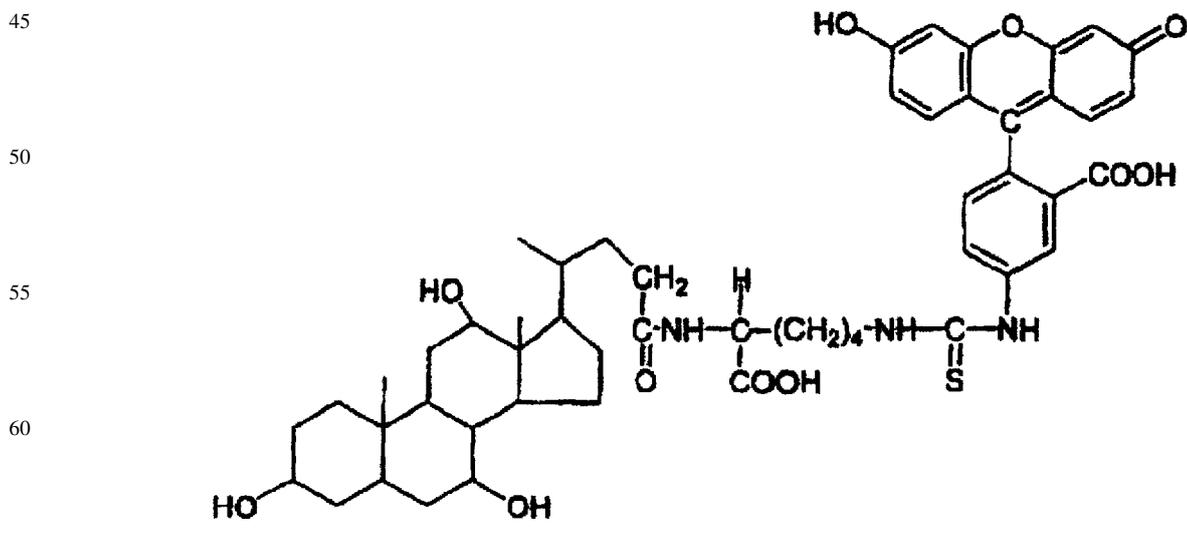
Preferentemente J es o incluye una fracción de fluoresceína, rodamina u otra fracción fluorescente.

30 Preferentemente la fracción de enlace tiene terminal N en su extremo fijado a la fracción activa J, y L se selecciona del grupo que consiste en $-(C_2)_nNH$, en la que n es 3 ó 4, $-(C_2)_4NH-(C_2)_3NHC(=NH)NH-$, y $-(C_2)_2-C(OH)C_2NH-$.

35 Preferentemente, la fracción $-NH-C(COOH)-L-$ en la fórmula general (I) es derivada de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en S-adenosilhomocisteína, S-adenosilmetiodina, S-aminoimidazol-4-carboxamida, asparagina, cadaverina, cistamina, citrulina, ácido diaminopimélico, ácido 2,4-diaminobutírico, cisteamina, glutamina, 3-hidroxiquinurenina, quinurenina, putrescina y negamicina.

40 Preferentemente, la fracción esteroide del derivado de ácido bílico se basa en un ácido seleccionado del grupo que consiste en ácido cólico, ácido quenodesoxicólico, ácido desoxicólico, ácido hiodesoxicólico, ácido hiocólico, ácido α -, β - u ω -muricólico, ácidos no bílicos, ácido litocólico, ácido 3 β -hidroxicolenoico, ácido ursodesoxicólico y ácido alocólico (ácido 5 α -colan-24-oico).

Preferentemente, el derivado de ácido bílico es una colil-lisil-fluoresceína (CLF) que tiene la fórmula:



o sus sales. Preferentemente el derivado de ácido bílico es una sal trisódica. Preferentemente el derivado de ácido bílico es la sal trisódica de fluoresceína lisicol.

ES 2 360 727 A1

El solicitante ha descubierto de manera inesperada que, contrariamente a lo que indica la técnica anterior, MRP2 y MRP3 transportan compuestos de fórmula general (I) Un compuesto de dicha fórmula puede ser utilizado, por lo tanto, para la determinación de la actividad funcional de la ruta de MRP2 y/o MRP3 de un humano o un animal.

5 Los compuestos de fórmula (I) pueden ser utilizados en la diagnosis o prognosis del síndrome de Dubin-Johnson o en la fabricación de un agente de diagnóstico o pronóstico a utilizar en la diagnosis o prognosis del síndrome de Dubin-Johnson. El síndrome de Dubin-Johnson está relacionado con mutaciones en el gen MRP2. De acuerdo con ello la determinación de la ruta de actividad MRP2 y/o MRP3 de un sujeto puede proporcionar información para su utilización en la diagnosis o prognosis relativa al síndrome de Dubin-Johnson.

10 Los compuestos de fórmula (I) pueden ser utilizados, por lo tanto, en la determinación de la función del riñón, función biliar, función intestinal o función del hígado de un humano o animal, o se pueden utilizar en la fabricación de un agente de diagnóstico o pronóstico para la determinación de la función del riñón, función biliar, función intestinal o función del hígado de un humano o de un animal. La MRP2 es expresada en el riñón, intestino e hígado, por lo tanto la eliminación de la ruta de MRP2 y/o MRP3 de un sujeto puede proporcionar información para su utilización en la determinación de la función del riñón, función biliar, función intestinal o función del hígado de un sujeto.

15 Los compuestos de fórmula (I) pueden ser utilizados también en la diagnosis o prognosis de cirrosis de hígado, colestasis, enfermedad de hígado por grasa, enfermedad de hígado alcohólica, colangitis esclerosante primaria o hepatitis vírica, o en la fabricación de un agente de diagnóstico o pronóstico para su utilización en la diagnosis o prognosis de cirrosis de hígado, colestasis, enfermedad de hígado por grasa, enfermedad de hígado alcohólica, colangitis esclerosante primaria o hepatitis vírica.

20 Los compuestos de fórmula (I) pueden ser utilizados también en la determinación del estado de la ruta de eliminación de bilirrubina o ruta de eliminación de bilirrubina conjugada de un humano o animal, o en la fabricación de un agente de diagnóstico o pronóstico para la determinación del estado de la ruta de eliminación de bilirrubina o ruta de eliminación de bilirrubina conjugada de un humano o un animal.

25 La bilirrubina es un producto de descomposición de hemecatabolismo. En el hígado la bilirrubina es conjugada con ácido glucurónico y es excretada en forma de bilis. La bilirrubina y conjugados de bilirrubina, incluyendo glucuronidos de bilirrubina tales como glucuronil-bilirrubina, son transportados mediante MRP2 [Jedlitschky y otros, Expert Opin Drug Metab Toxicol 2006 Jun 2(3):351-66]. Los niveles incrementados de bilirrubina conjugada en el plasma indican un posible desorden en el transporte biliar de bilirrubina conjugada, por lo que los niveles de la bilirrubina del suero son útiles para predecir la mortalidad de candidatos al transplante de hígado.

30 La bilirrubina y conjugados de bilirrubina son transportados mediante la ruta de evacuación de MRP2, por lo que se pueden utilizar las determinaciones de la actividad funcional de la ruta de evacuación de MRP2 y/o MRP3 para determinar la actividad de evacuación de la bilirrubina o bilirrubina conjugada. La determinación de la eliminación de la bilirrubina y la bilirrubina conjugada pueden proporcionar una indicación del estado de la ruta de eliminación de la bilirrubina. Por la determinación del estado de la ruta de evacuación de bilirrubina o bilirrubina conjugada de un sujeto, se puede indicar la existencia de desórdenes en el transporte de bilirrubina o bilirrubina conjugada.

35 Los términos “ruta de evacuación de bilirrubina” y “ruta de evacuación de bilirrubina conjugada” se utilizan en esta descripción con referencia al transporte de bilirrubina/bilirrubina conjugada a través de las membranas celulares.

40 Las características preferentes de estos aspectos son las que se han descrito en lo anterior.

45 De acuerdo con otro aspecto adicional de la invención, se da a conocer un programa de ordenador para determinar la actividad funcional de la ruta de eliminación de MRP2 y/o MRP3 de un sujeto humano o animal, utilizando una determinación del nivel de un derivado del ácido bílico en la sangre de un humano o animal en un intervalo de tiempo predeterminado después de la introducción de una cantidad del derivado de ácido bílico en el sujeto para conseguir un valor numérico, de manera que el valor numérico indica la actividad funcional de la ruta de eliminación de MRP2 y/o MRP3 del sujeto.

50 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se da a conocer un método para determinar la actividad funcional de la ruta de absorción de OATP1B3 de un sujeto humano o animal, dicho método comprende:

- 55
- (i) determinar el nivel de un derivado de ácido bílico en la sangre de dicho sujeto humano o animal en un intervalo de tiempo predeterminado después de la introducción de una cantidad del derivado de ácido bílico en el sujeto; y
 - (ii) utilizar la determinación obtenida en la etapa (i) para indicar la actividad funcional de la ruta de absorción de OATP1B3 del sujeto.
- 60

65 Estudios anteriores han demostrado la absorción parcial dependiente del sodio de una parte, pero no toda, de las sales blicas fluorescentes en hepatocitos de rata [Maglova LM y otros, Hepatology 1995 Aug; 22(2):637-647]. Además, la absorción de colil-glicil-fluoresceína en células CHO expresando NTCP de rata, pero no células de tipo natural ha sido demostrada [Boyer JL y otros, Am J Physiol 1994 Mar; 266(3 Pt 1):G382-G387]. Podría esperarse por

lo tanto que se puede absorber CLF en los hepatocitos mediante NTCP. En vez de ello, los inventores han descubierto que se absorbe CLF en los hepatocitos mediante OATP1B3, y los inventores han descubierto que el método anterior puede ser utilizado para indicar actividad funcional de la ruta de absorción de OATP1B3 de un sujeto.

5 Las características preferentes de este aspecto de la invención son las que se han descrito en lo anterior, en relación a los aspectos anteriormente descritos de la invención.

La invención se describirá a continuación mediante un ejemplo, haciendo referencia a los dibujos, en los que:

10 Breve descripción de los dibujos

La figura 1A es una micrografía de inmunofluorescencia, que muestra la expresión del polipéptido cotransportador Na⁺/taurocolato (NTCP) en células transfectadas de modo estable. En la figura 1A las partes fluorescentes de la micrografía aparecen oscuras y las partes no fluorescentes aparecen blancas. El NTCP es una proteína que efectúa la mediación de la absorción de ácidos bólicos en las células del hígado. El NTCP fue visualizado tal como se ha descrito en la sección de material y métodos que sigue más adelante.

La figura 1B muestra la caracterización cinética de CHO-NTCP, en la que se incubaron células con concentraciones crecientes de TC (taurocolato) durante 45 segundos en presencia de sodio (■) o potasio (▲). Las tasas de absorción dependientes de sodio (▼) fueron utilizadas para determinar los parámetros cinéticos. Los datos presentan medias ±SD de triplicados. En el caso en que no hay barras de error, eran menores que el símbolo.

Las figuras 2A-2D se refieren a estudios de absorción en células CHO que expresan transportadores de absorción hepatocelular; los datos para las figuras 2B-2D representan medias ±SD.

La figura 2A muestra imágenes de fluorescencia después de incubación de células de transportador CHO con 1 μmol/L CLF durante 5 minutos. Las imágenes fluorescentes (paneles de la derecha) se complementan con imágenes de contraste de fase (paneles de la izquierda). En las imágenes de fluorescencia (paneles de la derecha), las partes fluorescentes aparecen oscuras y las partes no fluorescentes aparecen blancas.

La figura 2B es un gráfico que muestra el transporte de CLF mediado por NTCP en presencia (barras negras) y ausencia de sodio (barras blancas) durante 1 y 5 minutos.

La figura 2C es un gráfico que muestra el transporte de CLF para células CHO (tipo natural y células transfectadas con OATP1B1, OATP1B3 y OATP2B1). Las células fueron incubadas con 1 μmol/L CLF durante 1 minutos (barra blanca) o 5 minutos (barras negras).

La figura 2D se refiere al transporte cinético CLF mediado por OATP1B3 y muestra un gráfico de transporte de CLF con respecto a concentración de CLF. Las células fueron incubadas con concentraciones crecientes de CLF durante 45 segundos. Se han mostrado tasas de absorción corregidas para unión de 0 segundos.

Las figuras 3A-3D muestran la inhibición de la actividad de transporte de transportadores de absorción hepatocelular por CLF. Se incubaron células CHO expresando NTCP, OATP1B1, OATP1B3 y OATP2B1 con 0, 5 ó 50 μmol/L de CLF y con los substratos 2,5 μmol/L TC, 1 μmol/L estrona-3-sulfato, 10 μmol/L TC y 1 μmol/L estrona-3-sulfato, respectivamente. Los datos representan medias ±SD de determinaciones por triplicado.

La figura 3A muestra los resultados para células CHO expresando NTCP con 2,5 μmol/L TC.

La figura 3B muestra los resultados para células CHO expresando OATP1B1 con 1 μmol/L estrona-3-sulfato.

La figura 3C muestra los resultados para células CHO expresando OATP1B3 con 10 μmol/L TC.

La figura 3D muestra los resultados para células CHO expresando OATP2B1 con 1 μmol/L estrona-3-sulfato.

La figura 4A muestra transferencias Western de vesículas de membrana de células de insecto *Sf21* no infectadas e infectadas con ABCB11, ABCC2, ABCC3 y ABCG2 cDNA conteniendo baculovirus. Las transferencias Western muestran la presencia de proteínas ABCB11, ABCC2, ABCC3 y ABCG2 en las células de insecto *Sf21* infectadas correspondientes.

Las figuras 4B a 4F muestran transporte dependiente de tiempo de CLF en vesículas de membrana de plasma procedentes de células (B) de tipo natural *Sf21*, células (C) *Sf21* expresando *ABCB11* (C), *ABCG2* (D), *ABCC2* (E) o *ABCC3* (F), respectivamente.

Las figuras 4G y 4H muestran la absorción dependiente de la concentración CLF en vesículas de membrana de *Sf21* conteniendo *ABCC2* (G) o *ABCC3* (H) respectivamente.

Las figuras 5A y 5B muestran la inhibición de CLF del transporte de DNP-SG y TC en proteína *ABCC2* (A) y *ABCB11* (B) conteniendo vesículas de membrana de *Sf21* respectivamente. Los valores son expresados como porcen-

ES 2 360 727 A1

taje de transporte máximo dependiente de ATP. Se comprobó la significancia utilizando la prueba t de Student de dos caras: *P<0,05 para el transporte en presencia y en ausencia de inhibidor.

5 La figura 6 muestra la liberación de plasma de CLF en ratones. Ratones de tipo natural *Abcc3*^{-/-} y *Abcc2*^{-/-} recibieron 100 μ L de 2 mmol/L CLF por inyección en la vena de la cola. Después del tiempo indicado se extrajo sangre. Se expresan datos como porcentaje medio del nivel inicial de CLF a los dos minutos. La significancia fue comprobada utilizando la prueba t de Student de dos lados: *P<0,05 para *Abcc2*^{-/-} con respecto a ratones de tipo natural.

10 La figura 7A muestra la aparición de CLF dependiente del tiempo en la bilis de ratones de tipo natural *Abcc3*^{-/-} y *Abcc2*^{-/-}. Los datos representan medias \pm SD.

15 La figura 7B muestra niveles de CLF en sangre, orina, hígado y bilis de ratones de tipo natural *Abcc3*^{-/-} y *Abcc2*^{-/-} después de 2 horas. Los ratones recibieron 100 μ L de 1 mmol/L CLF por inyección en la vena de la cola. Los datos representan medias \pm SD. Los niveles de plasma son expresados en nmol/L y los niveles en orina, hígado y bilis como porcentaje de la dosis administrada. La significancia fue comprobada utilizando la prueba t de Student de dos lados: *P<0,05 para *Abcc2*^{-/-} con respecto a ratones de tipo natural. Los datos representan medias \pm SD.

20 La figura 8 indica la absorción intestinal de TC y CLF. La aparición de TC y CLF en la bilis después de la administración ileal de 100 μ L de una mezcla de 2 mmol/L TC y CLF en ratones de tipo natural. Se recogió bilis después de los momentos de tiempo indicados. Los datos representan medias \pm SD. El gráfico es un trazado de niveles biliares acumulativos en forma de porcentaje de dosis aplicada. Se comprobó la significancia utilizando la prueba t de Student de dos lados: *P<0,05 para absorción de TC con respecto a absorción de CLF.

25 La figura 9 muestra curvas de eliminación de plasma referentes al ejemplo 2. El gráfico de la izquierda tiene un eje lineal y el gráfico de la derecha tiene eje logarítmico-lineal.

La figura 10 muestra curvas de eliminación de plasma relativas al ejemplo 10. El gráfico de la izquierda tiene eje lineal y el gráfico de la derecha tiene eje logarítmico-lineal.

30

Descripción de ejemplos de realización

Ejemplo 1

35 *Demostración de que el derivado de ácido bílico CLF es un sustrato para MRP2*

Materiales

40 Se obtuvo colilil fluoresceína (CLF) de Norgine, Harefield, Reino Unido. Se obtuvieron [³H]GSH (52 Ci/mmol) y [³H]TC (1,19 Ci/mmol) de la firma Perkin Elmer Life and Analytical Sciences (Boston, MA, USA). Se llevó a cabo la síntesis de [³H]DNP-SG tal como se describe por de Waart DR y otros [Liver Int 2006 Apr; 26(3):362-368]. Se adquirió [³H]E₂17 β G (40,5 Ci/mmol) de NEN Life Science Products (Boston, MA, USA). Se compraron los filtros de membrana de acetato de celulosa de Schleicher and Schuell (Dassel, Alemania). La sacarosa fue obtenida de Brunswig Chemie (Amsterdam, Holanda). El fosfato de creatina fue adquirido a Boehringer Mannheim (Almere, Holanda). La creatina cinasa fue adquirida de Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania). El metanol (calidad HPLC) fue obtenido de Baker (Deventer, Holanda). El Tritón X-100 fue adquirido de Merck (Darmstadt, Alemania). Todos los demás productos químicos y reactivos fueron adquiridos a Sigma-Aldrich (Zwijndrecht, Holanda).

50 *Animales*

Se cultivaron ratones *Abcc2*^{-/-} (contra un fondo de virus Friend de tipo B (FVB)) en el National Cancer Institute (Amsterdam, Holanda). La producción y caracterización de los ratones *Abcc2*^{-/-} fue tal como se describe por Vlaming y otros [J Pharmacol Exp Ther 2006 Jul; 318(1):319-327]. Los ratones de tipo natural y *Abcc3*^{-/-} (contra fondo FVB) fueron cultivados en el instituto de animales del Academic Medical Center. La producción y caracterización de ratones *Abcc3*^{-/-} tuvo lugar tal como se describió por Zelcer y otros [J Hepatol 2006 Apr; 44(4):768-775].

Generación de células CHO que expresan de manera estable líneas celulares y NTCP

60 cDNA para NTCP humano [Hagenbuch y otros, J Clin Invest 1994 Mar; 93(3):1326-1331] fue cortado con *EcoRV* y *HindI* y la región de codificación ligada en pcDNA5/FRT (Invitrogen, Life-Technologies, Carlsbad, CA). Células CHO FpIn (Invitrogen, Life-Technologies) fueron transfectadas con el constructo resultante utilizando Lipofectamina® 2000 (Invitrogen, Life-Technologies). Se seleccionaron células transfectadas establemente con 550 μ g de Hygromycin-B en medio HAM-F12 (Gibco, Invitrogen, Life-Technologies). Las células transfectadas fueron clonadas con el método de dilución limitante. Se identificaron los clones que expresaban NTCP funcional por ensayos de transporte con taurocolato marcado radioactivamente (ver a continuación). Para caracterizar adicionalmente las células clonadas se llevó a cabo localización por inmunofluorescencia de NTCP utilizando un anticuerpo policlonal contra NTCP [Kullak-Ublick G y otros, Gastroenterology 1997 Oct; 113(4):1295-1305] tal como se describe por Huber RD y otros

ES 2 360 727 A1

[Am J Physiol Cell Physiol 2007 Feb; 292(2):C795-C806]. Se describieron con anterioridad células CHO expresando OATP1B1, OATP1B3 y OATP2B1 [Treiber y otros, DMD 35:1400-1407, 2007].

Experimentos de transporte con líneas celulares transfectadas de manera estable

Para todos los experimentos de transporte se cultivaron células en platos de cultivo de 3 cm durante 24 horas en medios suplementados con butirato sódico 5 mmol/L para incrementar los niveles de expresión de los transportadores transfectados [Palermo DP y otros, J Biotechnol 1991 Jun; 19(1):35-47].

- Experimentos de transporte con absorción de sustratos marcados radioactivamente: estos experimentos fueron llevados a cabo tal como se ha descrito por Huber RD y otros [Am J Physiol Cell Physiol 2007 Feb; 292(2):C795-C806].

- Experimentos de transporte con absorción de CLF: la absorción fue llevada a cabo en los mismos tampones que para los sustratos radioactivos antes mencionados. Para la visualización de la absorción de CLF se inspeccionaron las células inmediatamente con un microscopio Leica-DM-IRBE-invertido (Leica-Microsystems, Wetzlar, Alemania) equipado con una cámara Hamamatsu-ORKA-ER (Hamamatsu-Photonics, Japón). Para determinar la absorción de CLF se solubilizaron células mediante la adición de 2 ml 1% (p/v) Triton-X-100. Después de solubilización completa se utilizaron 1,5 ml para medir la fluorescencia en un espectrómetro de luminiscencia Perkin-Elmer LS-5 a λ_{exc} 486 nm (ranura 10 nm) y λ_{em} 520 nm (ranura 5 nm). Se determinó la proteína con el método del ácido bicínico utilizando el equipo de Interchim (Montfuçon, Francia). Los datos de transporte de las líneas celulares expresando OATP fueron corregidos para unión por sustracción de puntos de tiempo 0 minutos (valores en blanco) y excepto para las figuras 2B y 2C se normalizaron por minuto. El análisis cinético fue llevado a cabo con regresión no lineal de los datos a la ecuación de Michaelis-Menten utilizando GraphPad PRISM-V-4.00 (GraphPad-Software-Inc., San Diego, CA).

Preparación de vesículas de membrana

La producción de baculovirus recombinante tuvo lugar tal como se describe por de Waart y otros [Liver Int 2006 Apr; 26 (3):362-368]. Baculovirus recombinante *ABCC3* y *ABCG2* fue un amable regalo de Borst [Breedveld P. y otros, Cancer Res 2004 Aug 15; 64(16):5804-5811 y Borst P. y otros, J Biol Chem 2001 Dec 7; 276(49):46400-46407.]. El baculovirus *ABCB11* recombinante fue un amable regalo de Thompson [Thompson RJ y otros, Gastroenterology 2002 Nov; 123(5):1649-1658]. Las células de S/21 cultivadas a 27°C fueron infectadas con *ABCB11*, *ABCC2*, *ABCC3* y *ABCG2*-cDNA que contenían baculovirus. Las células fueron recogidas a los 2-4 días después de infección. La preparación de vesículas de membrana tuvo lugar tal como se describe por de Waart y otros [Liver Int 2006 Apr; 26 (3):362-368].

Transferencia Western y análisis de proteína

Se fraccionaron vesículas de membrana mediante 6% SDS-PAGE, se transfirieron sobre membranas de nitrocelulosa (Schleicher&Schuell, Dassel, Alemania) que fueron bloqueadas en solución salina con tampón fosfato (PBS)/5% leche en polvo/0,05% Tween-20. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: sonda anti-his; sc-803 (Santa Cruz, USA), anti-*ABCG2*; BXP-21 [Maliepaard M y otros, Cancer Res 2001 Apr 15; 61(8):3458-3464], anti-*ABCC2*; M₂III6 [Scheffer y otros, Cancer Res 2000 Sep 15; 60(18):5269-5277] y anti-*ABCC3*; M₃III21 [Scheffer y otros, Cáncer Res 2000 Sep 15; 60(18):5269-5277]. Los complejos inmuno fueron visualizados con inmunoglobulinas conjugadas con peroxidasa de rábano y detectados utilizando quimioluminiscencia (Amersham, Reino Unido).

Ensayos de transporte con vesículas de membrana

Se llevaron a cabo estudios de transporte con vesículas de membrana utilizando las técnicas de filtrado rápido descritas por Heijn M y otros [Am J Physiol 1992 Jan; 262(1 Pt 1):C104-C110]. El radiomarcado fue medido con un contador de destellos. Cuando se utilizó CLF como sonda se colocaron filtros en el tubo de vidrio, se añadió 0,1% Triton-X-100 y se sometieron los tubos a torbellino. Las muestras se pipetearon a placas de 96 pocillos (Kartell, Noviglio, Italia) y se cuantificó la cantidad de CLF por medición de fluorescencia a λ_{exc} 485 nm y λ_{em} 520 nm utilizando NovoStar (BMG-labtech, Offenburg, Alemania).

Experimentos con animales

Se alojaron ratones macho en una instalación para animales libre de patógenos en un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. Los ratones fueron anestesiados con una combinación de Hypnorm (VetaPharma, Reino Unido; 11,8 mg/kg de fluanisona y 0,37 mg/kg de fentanil-citrato) y diazepam (Centrafarm, Etten-Leur, Holanda; 5,9 mg/kg de valium). La temperatura corporal se mantuvo en 36±1°C con esterillas de calentamiento termostatzadas. Para los estudios de eliminación se infundieron ratones con CLF inyectando 100 μ L (2 mmol/L) de CLF en la vena de la cola. A continuación se extrajo sangre de la carótida en los momentos de tiempo indicados. Se desproteinizaron muestras de sangre por adición de dos volúmenes de metanol y se cuantificó el CLF en el sobrenadante por medición de fluorescencia tal como se ha descrito en lo anterior.

Para estudios de secreción biliar, la vesícula fue canulada con tubo de polietileno PE10 y se inyectaron 100 μ L (1 mmol/L) de CLF en la vena de la cola. Se recogió la bilis en fracciones de 10 minutos; el hígado y la sangre fueron

recogidos al final del experimento. Se desproteinizaron hígados homogeneizados por adición de dos volúmenes de MeOH y las muestras de bilis y de sangre fueron diluidas con 0,1% Triton-X-100. Se cuantificó CLF por medición de fluorescencia tal como se ha descrito en lo anterior.

5 Para estudios de absorción intestinal de taurocolato (TC) y CLF se anestesiaron ratones y se canuló la vesícula tal como se ha indicado en lo anterior. Los ratones recibieron TC y CLF por inyección de 100 μL (2 mmol/L) de CLF en el íleon. Se recogió la bilis cada 15 minutos. Se midió la radioactividad en un contador de destellos y se cuantificó CLF tal como se ha descrito en lo anterior.

10 *Resultados*

Se investigó el papel de los diferentes transportadores hepatocelulares de sal de bilis en la absorción hepática de CLF. Con este objetivo se generaron células CHO expresando de manera estable NTCP (CHO-NTCP) y se caracterizaron. La figura 1A muestra una micrografía de inmunofluorescencia de células transfectadas de manera estable de un ensayo de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo policlonal contra NTCP. Una micrografía de inmunofluorescencia para células de tipo natural (no mostrada) no mostró fluorescencia y, por lo tanto, sin expresión de NTCP en células CHO de tipo natural, pero la micrografía de inmunofluorescencia para células transfectadas (figura 1A) muestra fluorescencia en las membranas de la célula y por lo tanto muestra clara expresión de la membrana del plasma de NTCP en células transfectadas de manera estable. Además, la absorción de taurocolato (TC) en estas células era dependiente del sodio (datos no mostrados) y era saturable con concentraciones crecientes de taurocolato. Incluso para concentraciones elevadas en taurocolato, la absorción en ausencia de sodio era despreciable (figura 1B). Los valores de K_m y de V_{max} eran de 16,0 $\mu\text{mol/L}$ y 6738 pmol TC/mg proteína/minuto, respectivamente, para transporte dependiente de sodio de TC (figura 1B). Por el contrario, no se puede observar absorción dependiente de sodio de CLF mediada por NTCP por análisis de fluorescencia y por determinación cuantitativa de CLF de células NTCP incubadas con CLF (Figuras 2A y 2B, respectivamente). La imagen de fluorescencia de las células CHO que expresan NTCP (ver figura 2A) muestra ausencia de absorción de CLF en las células. Las células largas hacia la parte derecha de la imagen de las células CHO expresando NTCP, que muestran una tinción fluorescente débil, pueden no haber sido ya vitales. La absorción de CLF en ausencia de sodio (figura 2B) era comparable a la de las células de tipo natural (no mostrado) y tendía a aumentar de forma mínima con el incremento del tiempo de incubación.

A continuación, se examinó la absorción de CLF mediada por OATP1B1, OATP1B3 y OATP2B1 en células CHO de tipo natural y transfectadas de forma estable. Las imágenes de fluorescencia de las células CHO expresando OATP1B1, OATP1B3 y OATP2B1 (ver figura 2A) muestran absorción de CLF para las células CHO expresando OATP1B3 pero no para las OATP1B1 y OATP2B1. La imagen de fluorescencia de las células CHO expresando OATP1B3 muestra tinción fluorescente fuerte de las células, y por lo tanto muestra una absorción clara de CLF en las células expresando OATP1B3. La imagen de fluorescencia de las células CHO expresando OATP1B1 muestra tinción fluorescente muy débil, mostrando que la absorción de CLF en células OATP1B1 era débil pero uniforme. Como contraste, no se observó absorción en OATP2B1, mostrando la imagen de fluorescencia de las células CHO expresando OATP2B1 ninguna tinción fluorescente excepto una única célula positiva visible en la imagen de fluorescencia, que puede ser una célula con vitalidad parcialmente reducida, tal como se evalúa por microscopía de contraste de fase. Solamente se apreciaron velocidades de transporte elevadas de CLF dependientes del tiempo en células CHO expresando OATP1B3 (figuras 2A y 2C, respectivamente). La absorción de CLF por células OATP1B1 se observó de manera uniforme pero no por las células OATP2B1 (figuras 2A y 2C), indicando que CLF no es un sustrato para OATP2B1. El transporte de CLF mediado por OATP1B3 era dependiente de la concentración (figura 2D) con valores de K_m y V_{max} de $4,6 \pm 2,7 \mu\text{mol/L}$ y $213 \pm 42 \text{ pmol CLF/mg proteína/minuto}$, respectivamente (media de tres determinaciones independientes). Los experimentos de absorción con concentraciones crecientes de CLF y células OATP1B1 mostraron prueba de la saturabilidad (no mostrado). Debido a una baja relación de señal a ruido, en particular para concentraciones más elevadas de CLF, no fue posible la determinación de los parámetros cinéticos.

Se llevaron a cabo investigaciones para determinar si el transporte de compuestos modelo mediado por NTCP, OATP1B1, OATP1B3 y OATP2B1 podía ser inhibido por CLF a pesar de que CLF era solamente sustrato para OATP1B3. Las células CHO expresando NTCP, OATP1B1, OATP1B3 y OATP2B1 se incubaron con 0,5 ó 50 $\mu\text{mol/L}$ de CLF y con los sustratos 2,5 $\mu\text{mol/L}$ TC, 1 $\mu\text{mol/L}$ estrona-3-sulfato, 10 $\mu\text{mol/L}$ TC y 1 $\mu\text{mol/L}$ estrona-3-sulfato, respectivamente. Los datos representan medias \pm SD de determinaciones por triplicado. De manera sorprendente, CLF inhibió de manera muy eficaz el transporte de TC con intermedio de NTCP (figura 3A). El transporte de TC mediado por OATP1B3 pudo ser inhibido por CLF de manera dependiente de la dosis (figura 3C) tal como se había esperado. Finalmente, el transporte de un sustrato modelo estrona-3-sulfato mediado por OATP1B1 y OATP2B1 fue inhibido por CLF, si bien de manera mucho menos eficaz (figuras 3B y 3D, respectivamente), corroborando los experimentos de absorción con CLF. Se debe observar que la adición de CLF a células de tipo natural no tuvo influencia en la absorción del sustrato indicando que no interfiere con la integridad estructural de la membrana del plasma (figura 3).

A efectos de comprobar si los transportadores canaliculares dependientes de ATP ABCB11, ABCC2 y ABCG2, así como el transportador basolateral ABCC3, median en el transporte de CLF, estas proteínas humanas fueron expresadas en células de insecto S/21 (figura 4A). La figura 4B muestra que tuvo lugar una absorción ligera dependiente de ATP en las vesículas de control, indicando que un transportador endógeno es capaz de absorber CLF en forma dependiente de ATP. El transporte dependiente de ATP de CLF en proteínas ABCB11 y ABCG2 conteniendo vesículas de mem-

brana no fue superior al de las vesículas de control (figuras 4C y D, respectivamente). No obstante, las vesículas de membrana conteniendo ABCC2 y ABCC3 mostraron tasas de transporte de CLF mucho más elevadas en comparación con vesículas de membrana S/21 de tipo natural j de control (figuras 4B y 4F, respectivamente).

5 Se incubaron vesículas de membrana (10 μg y 30 μg de proteína total para ABCC2 y ABCC3, respectivamente) con concentraciones distintas de CLF en presencia o ausencia de 4 mmol/L ATP. El transporte de CLF mediado por ABCC2 y ABCC3 dependía de la concentración (Figuras 4G y H, respectivamente). Los valores de K_m eran de $3,3 \pm 2,0 \mu\text{mol/L}$ y $3,7 \pm 1,0 \mu\text{mol/L}$ para ABCC2 y ABCC3, y los valores de V_{max} eran de $436 \pm 215 \text{ pmol CLF/mg proteína/minuto}$ y $188 \pm 55 \text{ pmol CLF/mg proteína/minuto}$, respectivamente.

10 Otro sustrato modelo para ABCC2 es el dinitrofenil-glutatión (DNP-SG) y CLF debe inhibir el transporte de este compuesto. Se consiguió una inhibición mitad de la máxima de transporte de DNP-SG con CLF aproximadamente a $1 \mu\text{mol/L}$ (Figura 5A). Si bien no se observó indicación alguna de que CLF es sustrato para ABCB11, contiene la fracción colil y por lo tanto puede ser capaz de inhibir el transporte de sal biliar a través de ABCB11. Ciertamente, el transporte de TC pudo ser inhibido por CLF en forma dependiente de la dosis y la concentración a la que se observó un transporte mitad del máximo era aproximadamente de $10 \mu\text{mol/L}$ (Figura 5B).

15 Para investigar el papel de *Abcc2* y *Abcc3* en la eliminación del plasma de CLF se examinaron los niveles de CLF en el plasma de ratones *Abcc2*^{-/-} y *Abcc3*^{-/-} de tipo natural después de una inyección única de CLF en la vena de la cola. La eliminación de CLF estaba fuertemente dificultada en ratones *Abcc2*^{-/-} en comparación con ratones de tipo natural pero no afectada en ratones de tipo *Abcc3*^{-/-} (Figura 6). Para examinar el papel de *Abcc2* en la producción biliar de CLF se llevaron a cabo experimentos de infusión con ratones de tipo natural y deficientes en *Abcc2*. La excreción biliar de CLF era mucho más retardada en los ratones *Abcc2*^{-/-} (Figura 7A). Como consecuencia, casi el 70% de la dosis de CLF fue excretada hacia la bilis en los ratones de tipo natural dentro de 20 minutos, mientras que en el mismo periodo de tiempo menos de 2% había sido excretada a la bilis de ratones *Abcc2*^{-/-}. A los 120 minutos después de la administración (Figura 7B), la excreción biliar acumulativa de CLF era todavía significativamente más elevada en ratones de tipo natural que en ratones de tipo *Abcc2*^{-/-} (85% con respecto a 32% de la dosis administrada) lo que resultó en una retención hepática significativamente más elevada de CLF en ratones *Abcc2*^{-/-} con respecto a ratones wt (64% con respecto a 1% de la dosis administrada) y en niveles más elevados en sangre en ratones *Abcc2*^{-/-} con respecto a ratones wt ($1306 \pm 749 \text{ nmol/L}$ con respecto a $83 \pm 21 \text{ nmol/L}$). Estos datos indican que, en ratones, *Abcc2* es el transportador principal responsable de la excreción biliar de CLF. En línea con las observaciones de la figura 7A se observó que la producción biliar de CLF no estaba afectada en ratones *Abcc3*^{-/-} en comparación con ratones de tipo natural y no se encontraron diferencias en los contenidos de CLF en plasma y en hígado (Figura 7B).

30 Después de excreción a la bilis y suministro hacia el duodeno, las sales bilicas son absorbidas en el íleon mediante el transportador apical de ácido bílico dependiente de sodio (Asbt) [Wong MH y otros, J Biol Chem 1995 Nov 10; 270(45):27228-27234]. Para investigar si el CLF es absorbido en el intestino se inyectaron cantidades equimolares de CLF y [³H]TC en el duodeno o íleon de ratones FVB de tipo natural. Después de ello se recogió la bilis y se cuantificaron las cantidades excretadas de [³H]TC y CLF en la bilis. A las 4,5 horas después de la inyección ileal de ambos compuestos, solamente el 2% de CLF se recuperó en la bilis mientras que este porcentaje era de 68% para [³H]TC. Por lo tanto, la absorción de CLF en el íleon terminal es mínima. Esto muestra que la CLF no es un buen sustrato para Asbt.

45 Conclusiones

Los resultados de las investigaciones con respecto a la absorción de CLF muestran que la absorción de CLF en los hepatocitos no es probable que sea mediada por NTCP, puesto que no se encontró absorción de CLF en células CHO expresando NTCP humano. Esto no fue debido a una proteína no funcional, dado que estas células eran completamente capaces de mediar la absorción de la sal biliar natural, TC. El oponente ileal de NTCP hepático es Asbt y éste media el transporte de sales bilicas conjugadas y no conjugadas [Geyer J y otros, Arch Pharmacol 2006 Mar; 372(6):413-431]. Se han obtenido evidencias indirectas que sugieren que CLF no es transportado con intermedio de Asbt (murino) mientras que TC inyectado en el lumen ileal de ratones de tipo natural era recuperado de manera muy eficaz en la bilis (no se encontró casi CLF). Estos datos sugieren que tanto NTCP como Asbt, que son transportadores homólogos de sal biliar dependientes de sodio, son incapaces de transportar CLF.

Otros estudios anteriores han demostrado la absorción parcial dependiente del sodio de una parte, pero no toda, las sales bilicas fluorescentes en hepatocitos de rata [Maglova LM y otros, Hepatology 1995 Aug; 22(2):637-647]. Además, la absorción de colil-glicil-fluoresceína en células CHO expresando NTCP de rata, pero no células de tipo natural ha sido demostrada [Boyer JL y otros, Am J Physiol 1994 Mar; 266(3 Pt 1):G382-G387]. En contraste con CLF, otro conjugado de sal biliar, taurocolil-clorambucil, se encontró que era sustrato para NTCP [Kullak-Ublick GA y otros, Gastroenterology 1997 Oct; 113(4):1295-1305]. Este último compuesto es un conjugado en el grupo 3-OH de la sal biliar, mientras que CLF es conjugado en la cadena lateral. En este contexto es interesante que Baringhaus y otros han determinado el farmacóforo de ambos NTCP y Asbt y han encontrado que el grupo 3-OH no es esencial para el transporte, mientras que lo es una cadena lateral ácida [Baringhaus KH y otros, J Lipid Res 1999 Dec; 40(12):2158-2168]. Los datos anteriores se encuentran completamente en línea con este modelo e indican una diferencia de especie de la especificidad del sustrato de NTCP/Ntcp.

ES 2 360 727 A1

El transportador de sal biliar menos específico, OATP1B3, se ha demostrado que es un candidato más probable para la absorción en el hepatocito, lo que se corresponde con la especificidad amplia del sustrato de este transportador [Hagenbuch B y otros, Pflugers Arch 2004 Feb; 447(5):653-665].

5 Estos datos demuestran de forma sorprendente pero concluyente que ABCC2/Abcc2 es el transportador más destacado, responsable de la excreción biliar de CLF y no ABCB11. En los ratones, la gran mayoría de CLF en el plasma es excretado hacia la bilis con intermedio de Abcc2. Se puede argumentar que la especificidad del sustrato de ABCC2 humano puede ser distinta que en ratones. No obstante, en ensayos de vesícula de membrana de plasma se demuestra que el transporte de CLF con intermedio de ABCB11 humano es insignificante en cuanto a comparación con el
10 ABCC2 humano. Nuestros datos actuales muestran de manera decisiva que CLF no es transportado con intermedio de ABCB11.

Tal como se ha descrito, Mills y otros utilizaron ratas TR⁻ deficientes en Abcc2 y midieron CLF en la bilis después de la inyección de CLF en la vena yugular [J Hepatol 1999 Oct; 31(4):678-684]. La cantidad acumulativa de CLF en la bilis era similar en ratas Wistar TR⁻ y normales después de 30 minutos. No obstante, basándose en estos nuevos
15 datos, parece que los datos acumulativos fueron mal interpretados (a saber, las velocidades de transporte iniciales podrían ser todavía distintas). Las nuevas pruebas que se describen llevaron a cabo un estudio similar pero más extenso utilizando ratones de tipo natural y de tipo Abcc2^{-/-}. En ratones deficientes en Abcc2, la excreción biliar de CLF estaba fuertemente dificultada y retenida en el hígado, lo que sugiere que el transportador principal responsable para la
20 excreción biliar de CLF es Abcc2 y no Abcb11. Dado que existe todavía transporte biliar residual de CLF en ratones Abcc2^{-/-}, la contribución de Abcb11, si bien pequeña, no puede ser excluida.

La pérdida de función MRP2 es frecuentemente bien tolerada y compensada por la sobreexpresión de los transportadores de membrana, particularmente MRP3 [Nies y otros Pflugers Arch (2007) 453:643-659]. Las investigaciones
25 demuestran que no solamente ABCC2 sino también ABCC3 median el transporte de CLF. Por lo tanto, si se subregula MRP2 en pacientes, ello puede ser compensado por la sobreexpresión de MRP3 y la actividad funcional de la ruta MRP2 y/o MRP3 del sujeto puede ser investigada utilizando CLF.

Ejemplo 2

30 Se llevó a cabo un estudio con doce voluntarios sanos (seis varones, seis hembras) con edades de 21-40 años para comparar la farmacocinética del plasma de CLF después de una sola inyección intravenosa de 15 segundos de 2 mg de CLF, en presencia de cambios inducidos por medicación en las proteínas transportadores biliares. El estudio fue llevado a cabo en condiciones de ausencia de pretratamiento, de pretratamiento con rifampicina, conocida también
35 como rifampina (un inductor no específico e inhibidor de las rutas de evacuación hepática) y pretratamiento con ciclosporina (la ciclosporina es un conocido inhibidor de MRP2 [Jedlitschky y otros, Expert Opin Drug Metab Toxicol 2006 Jun 2(3):351-66]).

La CLF fue obtenida de Norgine, Harefield, Reino Unido. Los sujetos fueron estudiados en posición supina. Se
40 administraron 2 mg de CLF en tres ocasiones mediante inyección intravenosa de 15 segundos por la mañana del día D01 después de ayuno de una noche y descanso con las siguientes modalidades:

- Tratamiento R: sin pre- o comedicación
- 45 • Tratamiento T1: visitas ambulatorias durante la noche del día D-7 hasta la noche del día D-2 para una sola dosis nocturna de 600 mg de rifampicina; esta última dosis de rifampicina fue administrada en la noche del día D-1 después de ingreso.
- Tratamiento T2: dosis única de 100 mg de ciclosporina en la noche de D-1 y en la mañana de D01 una hora
50 antes de la administración de CLF.

Se recogieron muestras de sangre venosa antes de la inyección y 2, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120,
55 150, 180, 240 y 360 minutos después de la dosificación (17 muestras). El nivel de CLF de cada muestra se determinó utilizando HPLC.

El transcurso del tiempo de las concentraciones medias de CLF en plasma se indica en la figura 9. Se puede observar que el pretratamiento con rifampicina tuvo como resultado una ligera reducción de la eliminación y evacuación de CLF. El pre- y cotratamiento con ciclosporina provocó una inhibición distinta de la eliminación y evacuación de CLF. Este estudio muestra que CLF puede ser utilizado para determinar la actividad de OATP1B3 y/o la actividad de MRP2/3 de
60 un sujeto de manera que el sujeto ha sido pretratado con sustratos del fármaco que afectan la actividad de OATP1B3 y/o la actividad de MRP2/3.

Ejemplo 3

65 Se llevó a cabo un estudio en doce voluntarios sanos (seis varones, seis hembras) con edades de 21-40 años para comparar la farmacocinética del plasma de CLF después de una inyección intravenosa única de 15 segundos de 2 mg de CLF en presencia de cambios inducidos por medicación en proteínas del transportador biliar. Se estudió la interacción con ácido ursodesoxicólico y cloxacilina en este ejemplo.

ES 2 360 727 A1

Se obtuvo CLF de Norgine, Harefield, Reino Unido. Los sujetos fueron estudiados en posición supina. Se administraron 2 mg de CLF en tres ocasiones mediante una inyección intravenosa de 15 segundos en la mañana del día D01 después de ayuno durante una noche y descanso con las siguientes modalidades:

- 5 • Referencia R: sin pretratamiento
- Tratamiento T1: pretratamiento y cotratamiento con 1 g de cloxacilina t.i.d. durante tres días desde la mañana de D-3 hasta la mañana del día D01, 0:30 horas antes de la administración de CLF
- 10 • Tratamiento T2: pretratamiento de tres semanas con dosis diarias de 500 mg b.i.d. de ácido ursodesoxicólico (en la mañana y en la noche, cada vez con alimento) hasta la mañana del día D-1.

15 Se recogieron varias muestras de sangre antes de la inyección y 2, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 150, 180, 240 y 360 minutos después de la dosificación (17 muestras). El nivel de CLF en cada muestra se determinó utilizando HPLC.

20 El transcurso en el tiempo de las concentraciones medias observadas de CLF en plasma se presenta en la figura 10. Se puede observar que el pre- y cotratamiento con cloxacilina (inhibidor conocido de BSEP) muestra una inhibición ligera, pero estadísticamente significativa de la eliminación y evacuación de CLF. Como contraste, un pretratamiento con ácido ursodesoxicólico no tenía efectos (el ursodiol es un potenciador multifactorial y facilitador de la evacuación biliar hepática).

25 Estos ejemplos demuestran que el CLF puede ser utilizado para determinar cambios inducidos por medicación en la actividad MRP2/3 de un sujeto.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Método “*in vitro*” para determinar la actividad funcional de la ruta de evacuación de MRP2 y/o MRP3 a partir de muestras de sangre recogidas de un sujeto humano o animal después de la introducción de una cierta cantidad de un derivado de ácido bílico en dicho sujeto, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas llevadas a cabo en muestras de sangre del sujeto:

(i) determinación del nivel del derivado del ácido bílico en muestras de sangre de dicho humano o animal en un intervalo de tiempo predeterminado, y

(ii) utilizar la determinación obtenida en la etapa (i) para indicar la actividad funcional de la ruta de evacuación de MRP2 y/o MRP3 de dicho sujeto.

2. Método, según la reivindicación 1, en el que el método comprende una etapa adicional de utilización de la determinación obtenida para conseguir un valor numérico, en el que el valor numérico indica la actividad funcional de la ruta de evacuación de MRP2 y/o MRP3 del sujeto.

3. Método, según la reivindicación 1 o 2, en el que la determinación obtenida es comparada, como mínimo, con un estándar para indicar la actividad funcional de la ruta de evacuación de MRP2 y/o MRP3 del sujeto.

4. Método, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el nivel del derivado de ácido bílico en la sangre de dicho humano o animal se determina en dos o más intervalos de tiempo predeterminados después de la introducción de una cantidad de dicho derivado de ácido bílico en el sujeto.

5. Método, según la reivindicación 4, en el que el método comprende además la etapa de determinar la pendiente de un gráfico logarítmico-lineal de las determinaciones obtenidas con respecto al tiempo.

6. Método, según la reivindicación 4, en el que el método comprende además la etapa de determinar un área por debajo de la curva de eliminación de plasma derivada de las determinaciones obtenidas.

7. Método, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el derivado de ácido bílico comprende un marcador tal como un colorante o una fluorescencia.

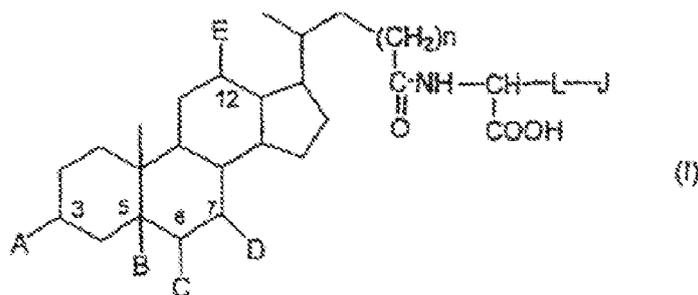
8. Método “*in vitro*”, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, cuyo método comprende además la etapa de proporcionar, como mínimo, una muestra de sangre que ha pasado por el hígado del sujeto y cuya muestra ha sido recogida en un intervalo de tiempo predeterminado, de manera que la muestra o muestras de sangre son procesadas para obtener plasma de la sangre o suero de la sangre.

9. Método, según la reivindicación 8, en el que la muestra o muestras de la sangre son procesadas por centrifugación.

10. Método, según la reivindicación 8 ó 9, en el que las proteínas de la sangre son separadas del plasma/suero de la sangre.

11. Método, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el derivado de ácido bílico comprende (a) una fracción esteroide que tiene (i), como mínimo, un sustituyente seleccionado entre el grupo que consiste en el sustituyente de 3-hidroxilo, un sustituyente de 7-hidroxilo y un sustituyente de 12-hidroxilo, y (ii) un grupo carboxilo fijado por medio de un enlace de amida a la cadena lateral de la fracción esteroide; y (b) una fracción activa que se tiene que direccionar al hígado, cuya fracción activa está fijada a un átomo de carbono α con respecto al grupo carboxilo.

12. Método, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el derivado de ácido bílico tiene una fórmula general (I):



en la que A es seleccionada entre el grupo que consiste en α -OH y β -OH; B es seleccionada entre el grupo que consiste en α -H y β -H; C es seleccionada entre el grupo que consiste en -H, α -OH y β -OH; o B y C conjuntamente

ES 2 360 727 A1

forman un doble enlace; D es seleccionada del grupo que consiste en -H, α -OH y β -OH; E es seleccionada del grupo que consiste en -H, α -OH y β -OH; L es una fracción de enlace; J es una fracción de color o fluorescencia; y n es 0 ó 1.

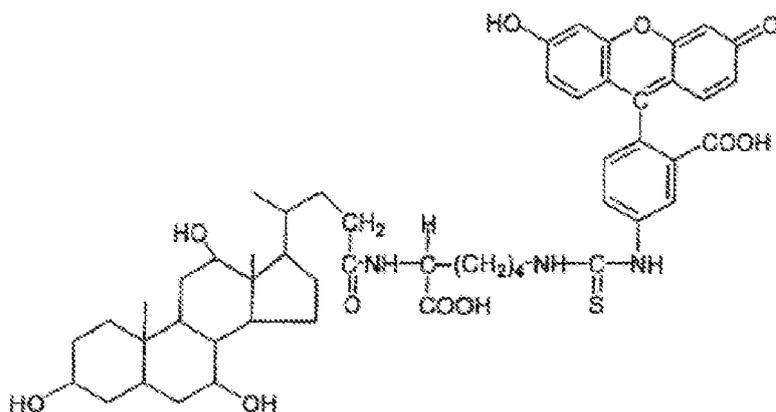
13. Método, según la reivindicación 12, en el que J es o incluye una fracción de fluoresceína, rodamina u otra fracción fluorescente.

14. Método, según la reivindicación 12 ó 13, en el que la fracción de enlace tiene terminación N en su extremo fijado a la fracción activa J, y L es seleccionado del grupo que consiste en: $-(CH_2)_nNH$, en el que n es 3 ó 4, $-(CH_2)_4NH-(CH_2)_3NHC(=NH)NH-$, y $-(CH_2)_2-CH(OH)CH_2NH-$.

15. Método, según la reivindicación 12 ó 13, en el que la fracción $-NH-CH(COOH)-L-$ de la fórmula general (I) se deriva de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en S-adenosilhomocisteína, S-adenosilmetionina, S-aminoimidazol-4-carboxamida, asparagina, cadaverina, cistamina, citrulina, ácido diaminopimélico, ácido 2,4-diaminobutírico, cisteamina, glutamina, 3-hidroxiquinurenina, quinurenina, putrescina y negamicin.

16. Método, según la reivindicación 11, en el que la fracción esteroide del derivado de ácido bílico se basa en un ácido seleccionado del grupo que consiste en ácido cólico, ácido quenodesoxicólico, ácido desoxicólico, ácido hiodesoxicólico, ácido hiocólico, ácido α -, β - u ω -muricólico, ácidos no bílicos, ácido litocólico, ácido 3 β -hidroxicolenoico, ácido ursodesoxicólico y ácido alocólico (ácido 5 α -colan-24-oico).

17. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 u 8 a 10, en el que el derivado de ácido bílico es colil-lisil-fluoresceína (CLF) que tiene la fórmula:



18. Método, según la reivindicación 17, en el que el derivado de ácido bílico es una sal de colil-lisil-fluoresceína.

19. Utilización de un derivado de ácido bílico para determinar la actividad funcional de la ruta de evacuación de MRP2 y/o MRP3 de un humano o un animal.

20. Utilización de la determinación de la actividad funcional de MRP2 y/o MRP3 obtenida mediante el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 para determinar la función hepática de un humano o un animal.

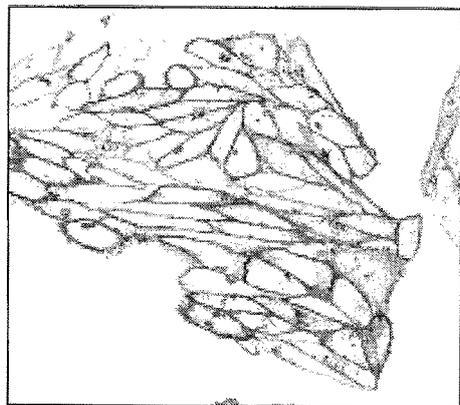
21. Método para la determinación de la actividad funcional de la ruta de evacuación de MRP2 y/o MRP3 de un humano o animal sustancialmente tal como se ha descrito.

22. Utilización de un derivado de ácido bílico para determinar la actividad funcional de la ruta de MRP2 y/o MRP3 de un humano o animal sustancialmente tal y como se ha descrito.

23. Método "in vitro" para determinar la actividad funcional de la ruta de absorción de OATP1B3 de un sujeto humano o animal, dicho método comprende:

- (i) determinar el nivel de un derivado de ácido bílico en la sangre de dicho sujeto humano o animal en un intervalo de tiempo predeterminado después de la introducción de una cantidad del derivado de ácido bílico en el sujeto; y
- (ii) utilizar la determinación obtenida en la etapa (i) para indicar la actividad funcional de la ruta de absorción de OATP1B3 del sujeto.

Fig. 1A



CHO-NTCP

Fig. 1B

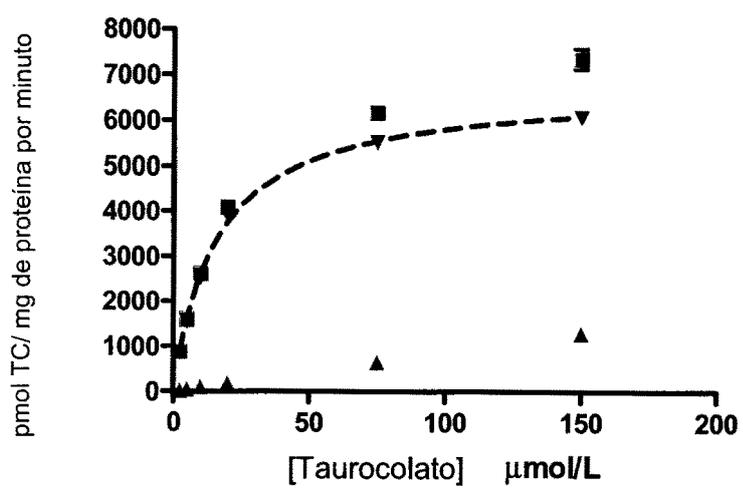


Fig. 2A

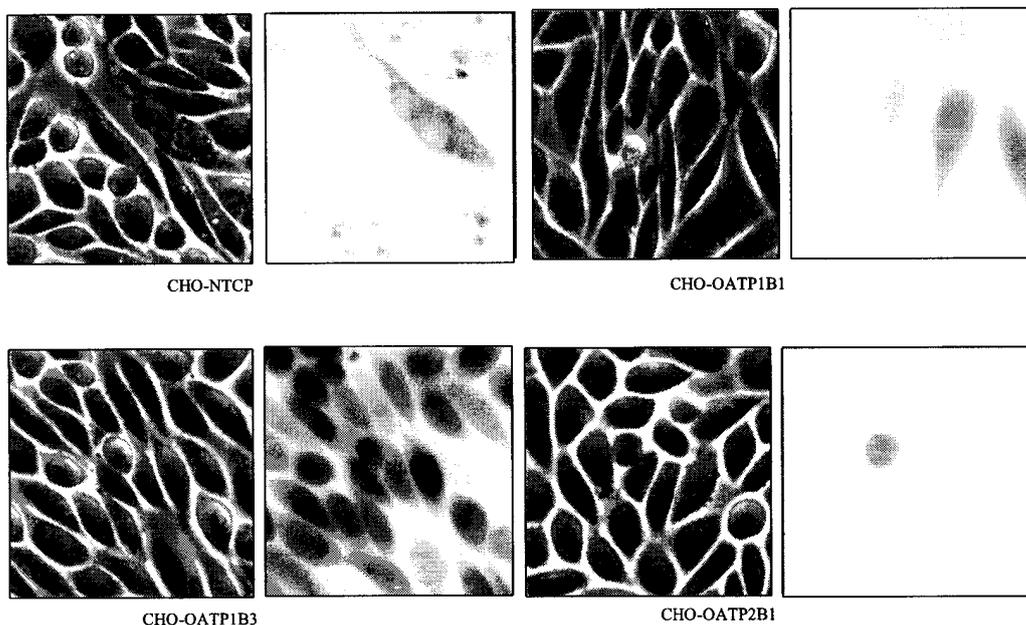


Fig. 2B

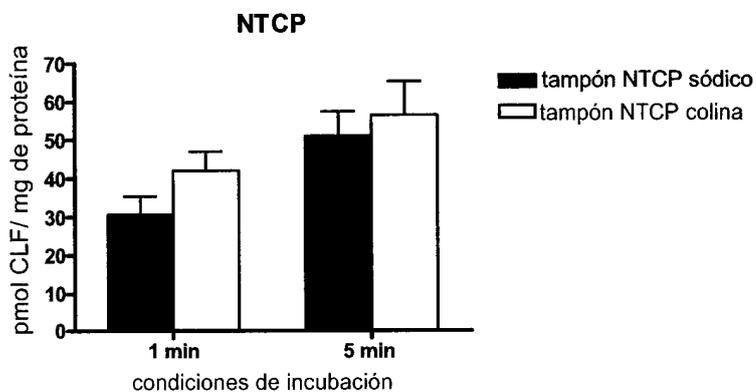


Fig. 2C

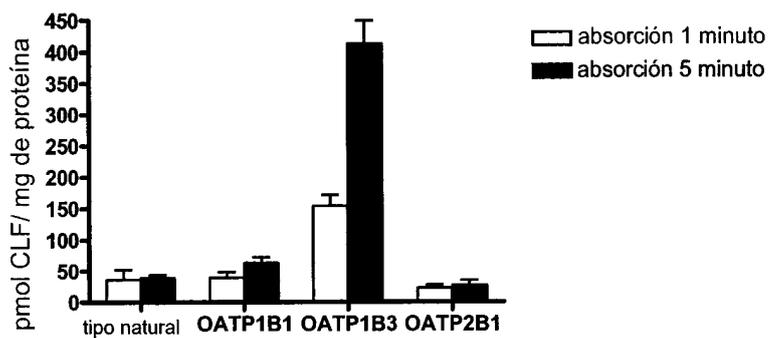


Fig. 2D

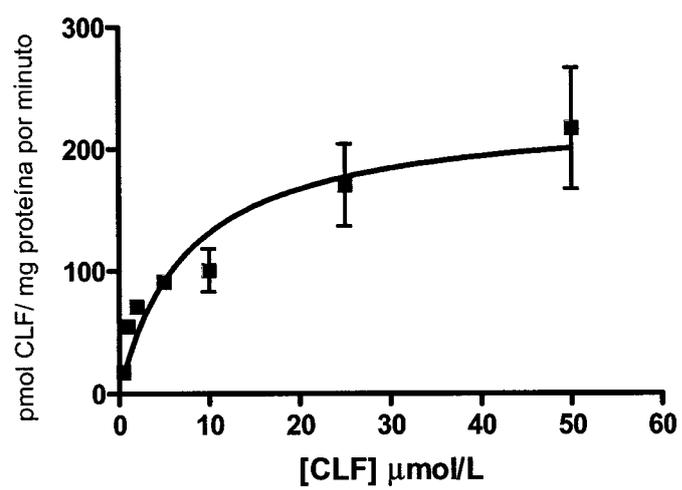


Fig. 3A

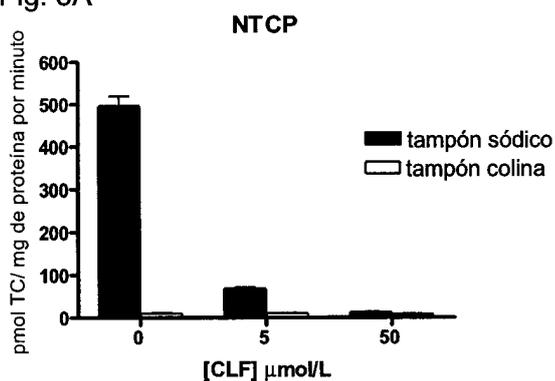


Fig. 3B

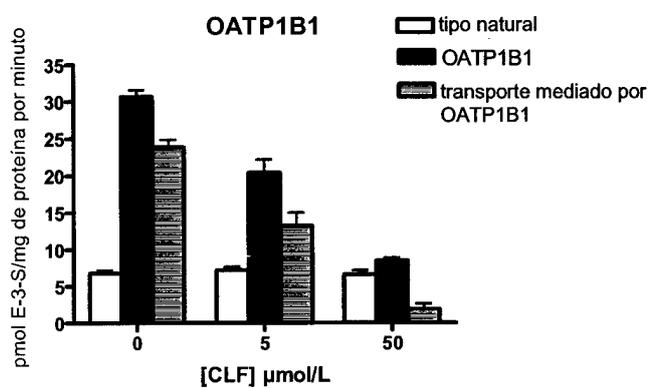


Fig 3C

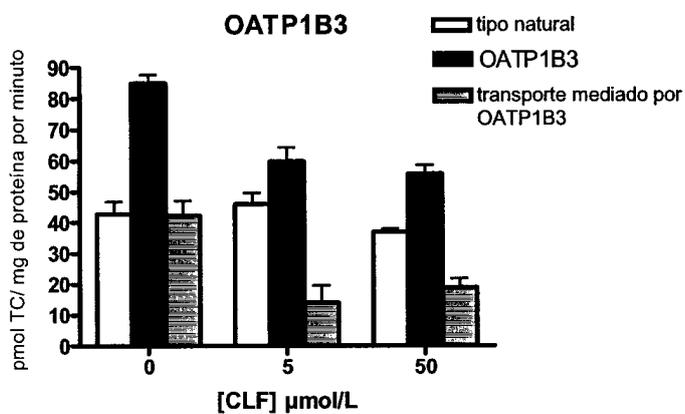


Fig. 3D

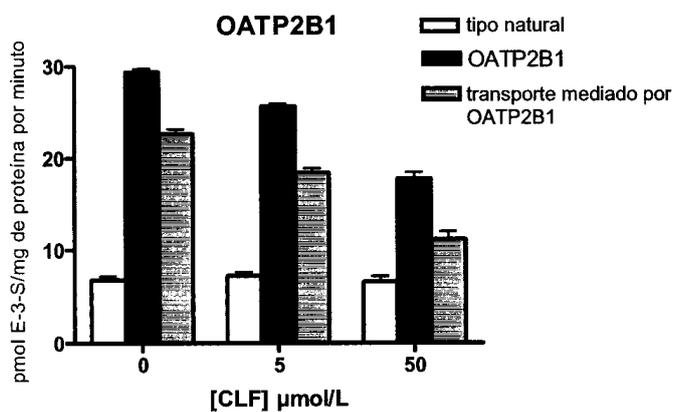


Fig. 4A

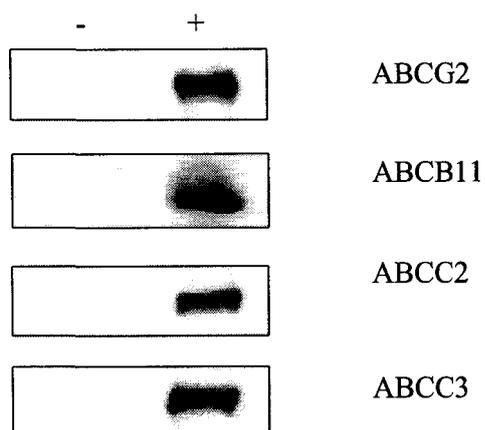


Figura 4B

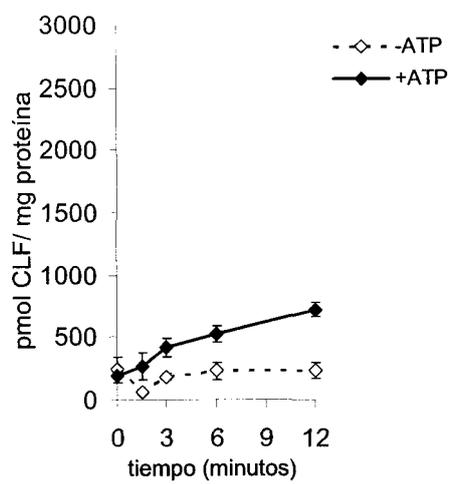


Figura 4C

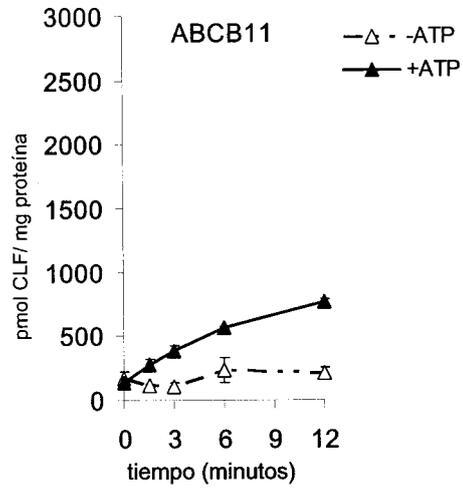


Figura 4D

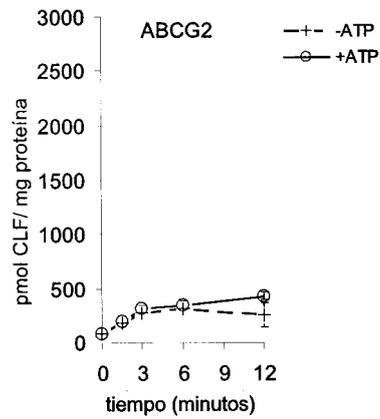


Figura 4E

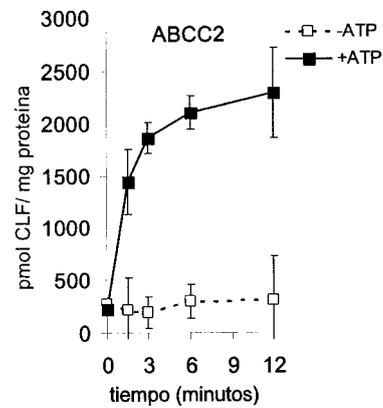


Figura 4F

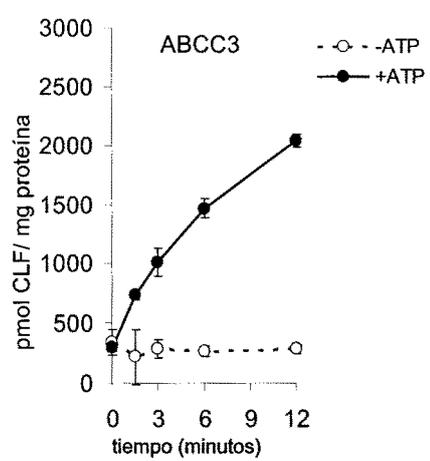


Figura 4G

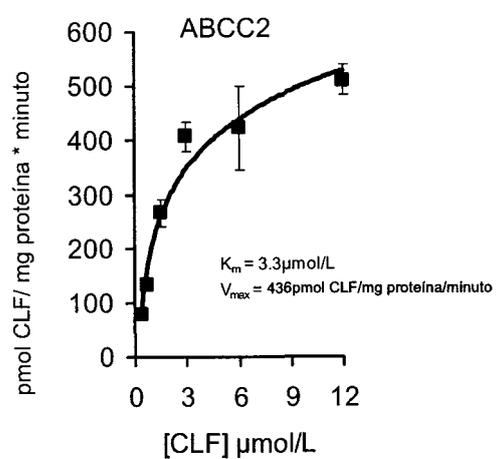


Figura 4H

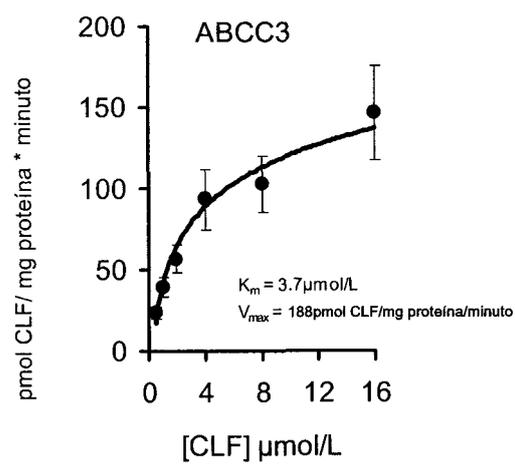


Figura 5A

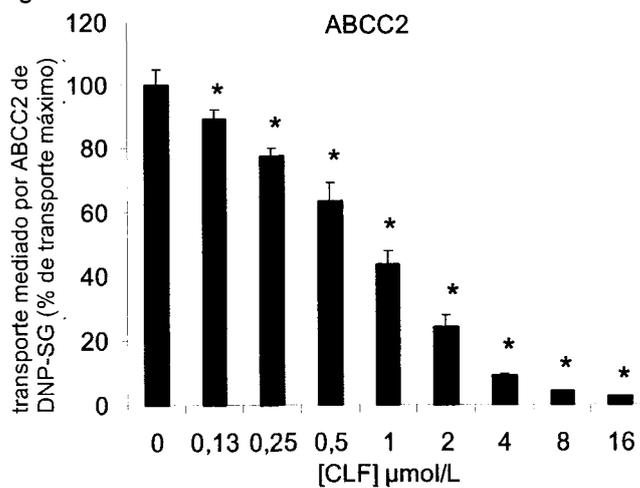


Figura 5B

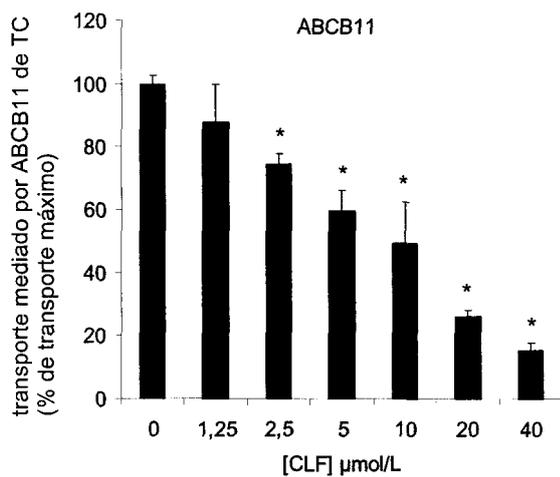


Figura 6

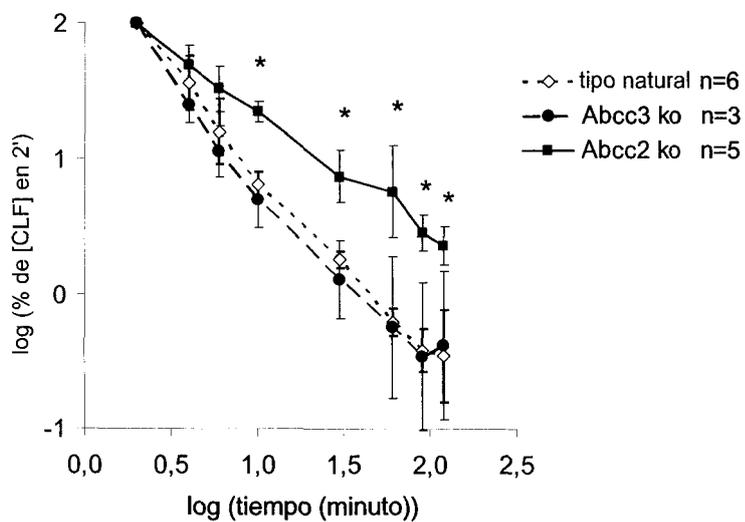


Figura 7A

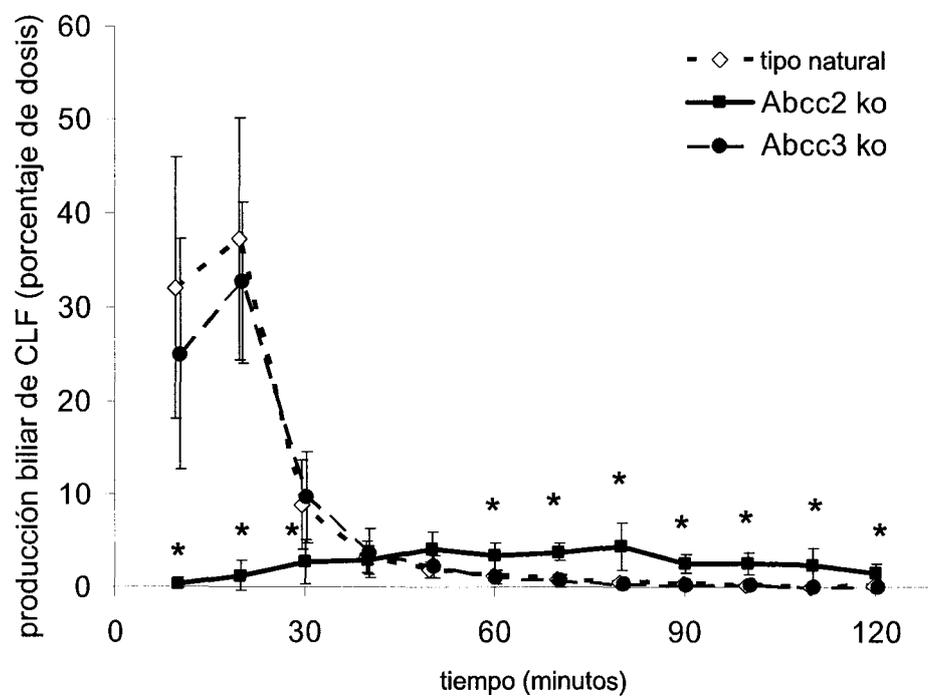


Figura 7B

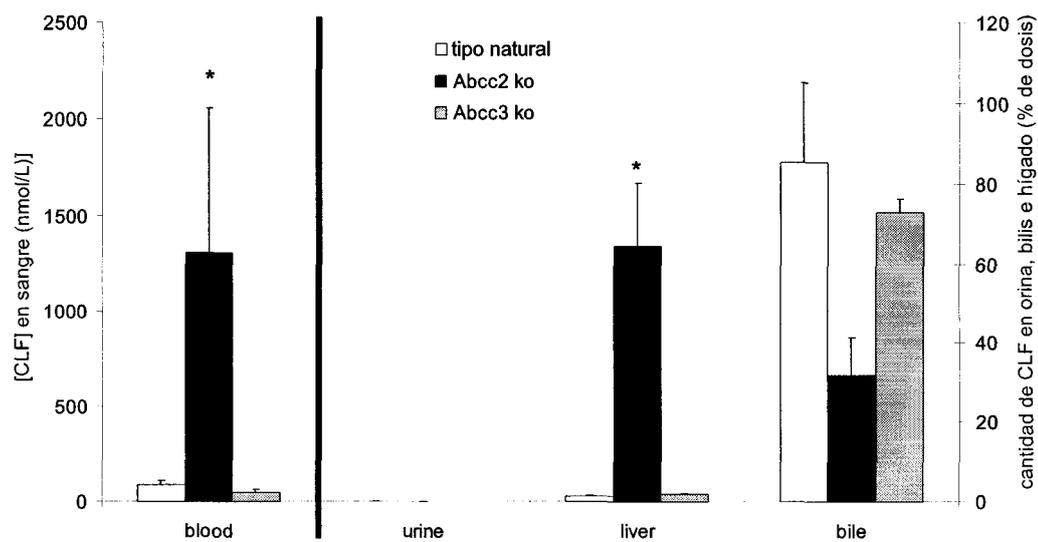
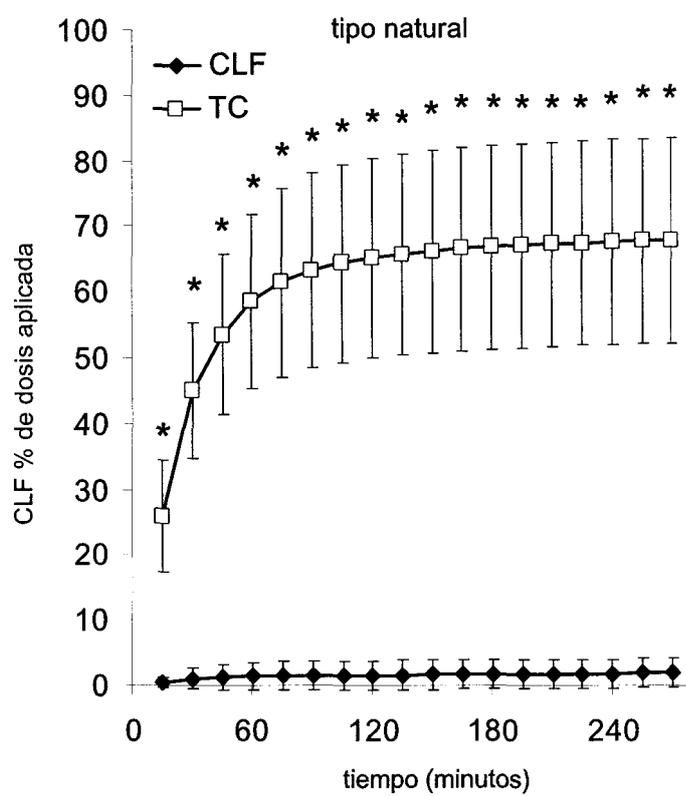


Fig. 8



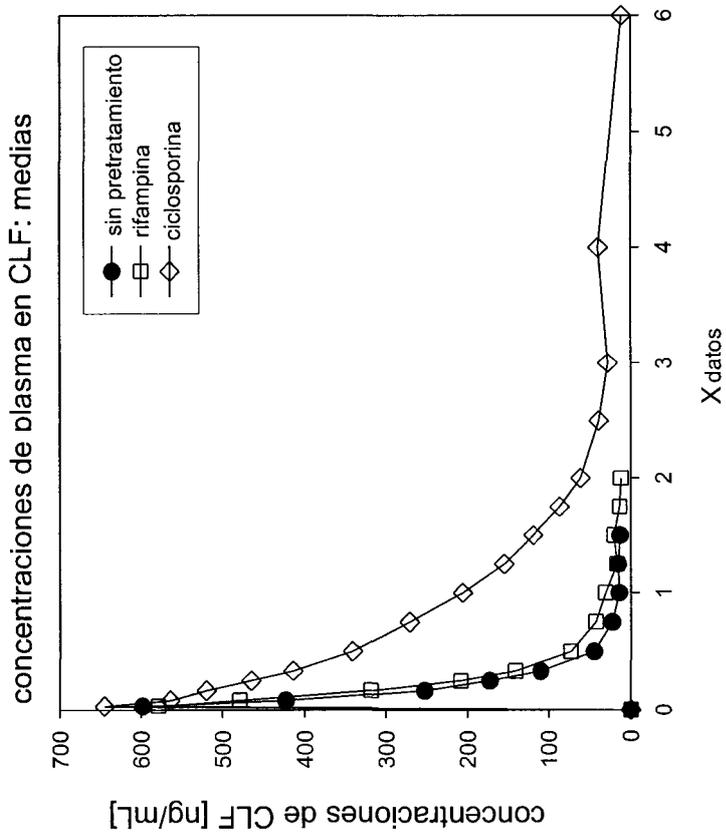
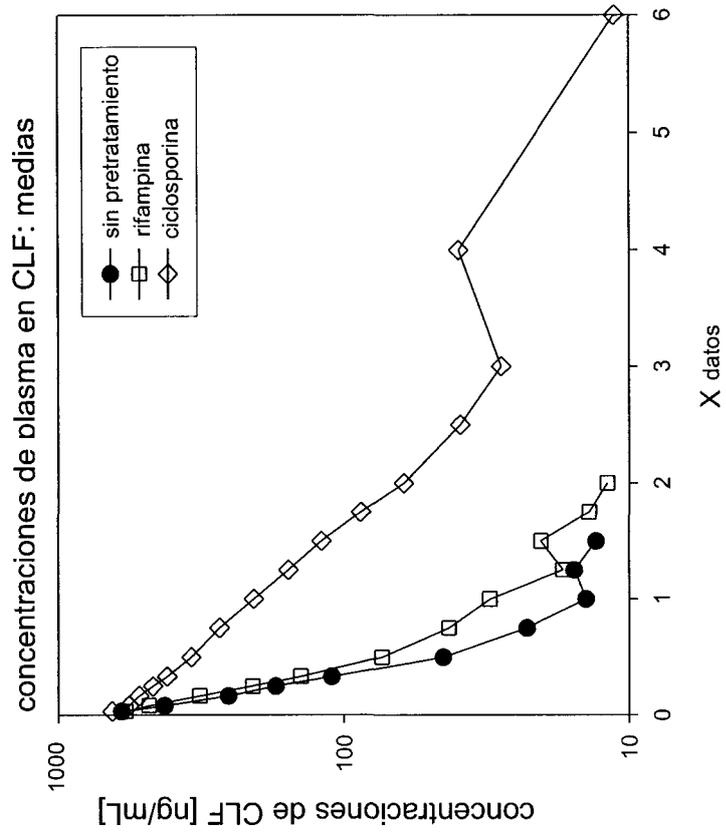


Figura 9

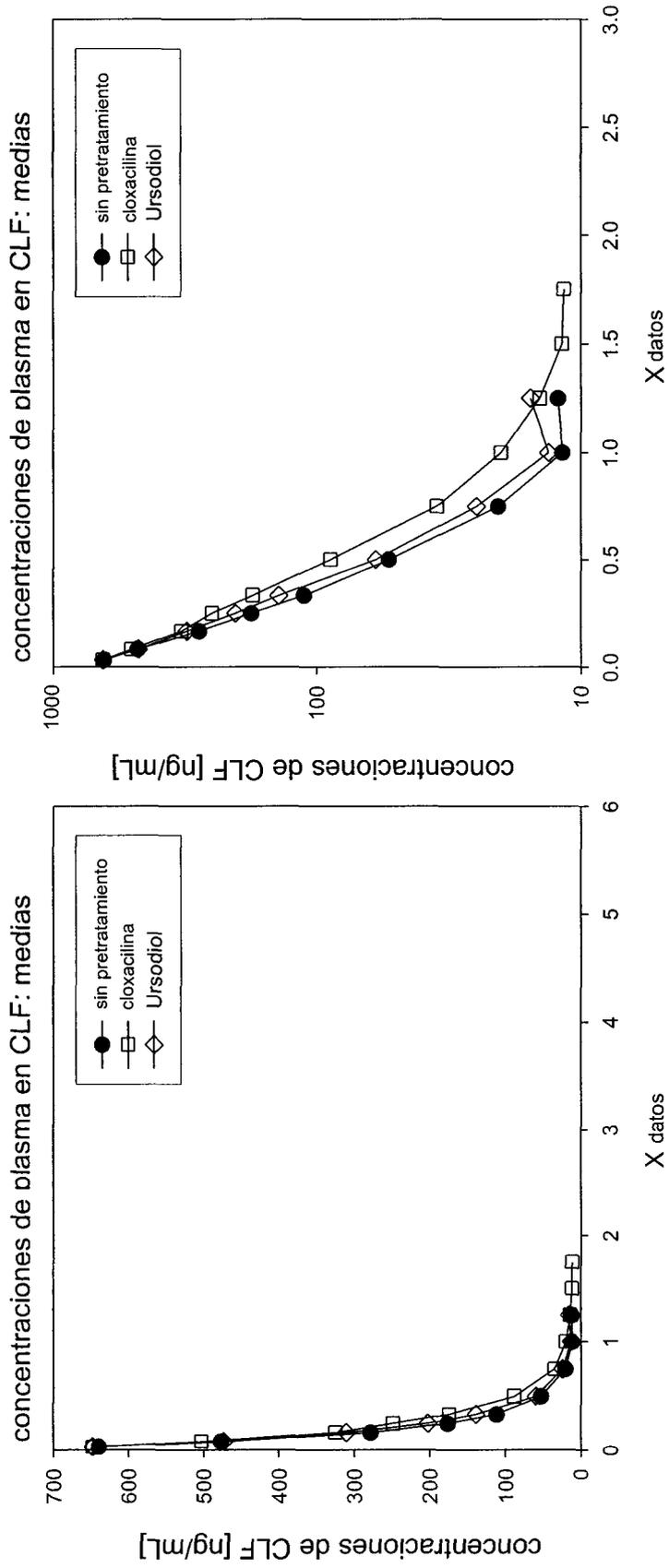


Figura 10



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200901222

②② Fecha de presentación de la solicitud: 14.05.2009

③② Fecha de prioridad: **15-05-2008**

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 9907325 A1 (NORGINE LTD et al.) 18.02.1999, todo el documento.	1-23
A	MILLS C O et al.: "Different Pathways of Canalicular Secretion of Sulfated and Non-Sulfated Fluorescent Bile Acids: a Study in Isolated Hepatocyte Couplets and TR- Rats", Journal of Hepatology (1999) vol. 31, pp.: 678-684, ISSN 016R-8278, todo el documento.	1-23
A	AKITA, H et al.: "Characterization of Bile Acid Transport Mediated by Multidrug Resistance Associated Protein 2 and Bile Salt Export Pump", Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes (2001) vol. 1511(1) pp.: 7-16, ISSN 0005-2736, todo el documento.	1-23
A	WO 0001297 A1 (HOEFT ANDREAS) 13.01.2000, todo el documento.	1-23
A	EP 1290976 A2 (PULSION MEDICAL SYS AG) 12.03.2003, todo el documento.	1-23
A	US 2005048464 A1 (TIAN XIANBIN et al.) 03.03.2005, todo el documento.	1-23
A	YAMAGUCHI H et al.: "Transport of Fluorescent Chenodeoxycholic Acid Via the Human Organic Anion Transporters OATP1B1 and OATP1B3", J. Lipid Res. (2006), vol. 47, pp.: 1196-1202. DOI 10.1194/jlr.M500532-JLR200. Todo el documento.	23

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
03.05.2011

Examinador
A. Maquedano Herrero

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N33/50 (2006.01)

G01N33/58 (2006.01)

G01N33/68 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 03.05.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-23	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-23	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 9907325 A1 (NORGINE LTD et al.)	18.02.1999
D02	MILLS C O et al.: "Different Pathways of Canalicular Secretion of Sulfated and Non-Sulfated Fluorescent Bile Acids: a Study in Isolated Hepatocyte Couplets and TR- Rats", Journal of Hepatology (1999) vol. 31, pp.: 678-684, ISSN 016R-8278, todo el document.	
D03	AKITA, H et al.: "Characterization of Bile Acid Transport Mediated by Multidrug Resistance Associated Protein 2 and Bile Salt Export Pump", Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes (2001) vol. 1511 (1) pp.: 7-16, ISSN 0005-2736, todo el document.	
D04	WO 0001297 A1 (HOEFT ANDREAS)	13.01.2000
D05	EP 1290976 A2 (PULSION MEDICAL SYS AG)	12.03.2003
D06	US 2005048464 A1 (TIAN XIANBIN et al.)	03.03.2005
D07	YAMAGUCHI H et al.: "Transport of Fluorescent Chenodeoxycholic Acid Via the Human Organic Anion Transporters OATP1B1 and OATP1B3", J. Lipid Res. (2006), vol. 47, pp.: 1196-1202. DOI 10.1194/jlr.M500532-JLR200. Todo el documento.	

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La solicitud reivindica un método in vitro para determinar la actividad funcional de la ruta de evacuación de MRP2 y/o MRP3 (Multidrug Resistance Protein 2/3) a partir de muestras de sangre recogidas de un sujeto humano o animal después de la introducción por vía endovenosa de cierta cantidad de un derivado de ácido bílico en dicho sujeto. El método incluye tomar varias muestras de sangre a distintos tiempos con el fin de conseguir una curva. A partir de la pendiente de esta curva y de la superficie que genera la misma, se comparan los datos con un estándar y se obtiene información sobre el funcionamiento de la ruta de evacuación. En la reivindicación 23 se reivindica el mismo método para obtener información de la ruta de absorción de OATP1B3 (organic anion transporter polypeptide 1B3) del sujeto.

D01-D03 reflejan el estado de la técnica anterior. D01, documento más cercano, corresponde a una patente del mismo solicitante en la que se describe un procedimiento idéntico al de la solicitud, pero para determinar la función hepática. En él se utiliza el mismo derivado de ácido bílico, se introduce en el cuerpo del paciente vía endovenosa y se toman muestras puntuales de sangre a lo largo del tiempo.

D02 se refiere a la utilización de colil-lisil-fluoresceína (CLF) en hepatocitos de rata para estudios de transporte de ácidos biliares.

D03 es un estudio que revela la implicación de la ruta de evacuación MRP2 en el transporte de conjugados de ácidos biliares en ratas.

El hecho es que aunque la solicitud reivindica un método para determinar la actividad funcional de la ruta de evacuación MRP2 y/o MRP3 y la de la ruta de absorción de OATP1B3 y D01 reivindica un método para determinar la función hepática, ese método es el mismo. Es decir, de alguna manera, estaríamos hablando de un segundo uso de un método conocido. Sin embargo, esto no es real. Ya en D01 se dice que tanto la absorción como la secreción de ácidos biliares son funciones fundamentales del hígado y que la concentración de éstos se encuentra elevada en multitud de patologías hepáticas. Es decir, esto implica que para un experto en la materia sería obvio pasar de D01 al objeto de la invención de la solicitud. Dado que el procedimiento es idéntico, lo que vale para determinar la funcionalidad del hígado, sería bastante factible que pudiera servir para determinar la actividad funcional de una ruta de evacuación o de absorción que interviene en el transporte de ácidos biliares.

Así pues, se considera que las reivindicaciones 1-23 son nuevas en el sentido del artículo 6.1 de la Ley 11/1986. Por otro lado, las reivindicaciones 1-23 carecen de actividad inventiva en el sentido del artículo 8.1 de la Ley 11/1986.