

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 032**

51 Int. Cl.:

**A61B 5/00** (2006.01)

**A61K 49/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2010 E 10801579 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2013 EP 2365777**

54 Título: **Determinación de la función hepática por medio de la medición cuantitativa de la metabolización de sustratos**

30 Prioridad:

**24.12.2009 DE 102009055321**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**29.11.2013**

73 Titular/es:

**HUMEDICS GMBH (100.0%)  
Marie-Elisabeth-Lüders-Strasse 1  
10625 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

**HEYNE, KARSTEN y  
STOCKMANN, MARTIN**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 432 032 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

Determinación de la función hepática por medio de la medición cuantitativa de la metabolización de sustratos

5 La invención se refiere a un procedimiento para facilitar datos de partida para la determinación de la función hepática de un ser vivo según el preámbulo de la reivindicación 1.

10 El hígado constituye un órgano vital para el funcionamiento de un ser vivo, en particular de seres humanos, dado que en el hígado se degradan enzimáticamente muchas sustancias, tales como por ejemplo medicamentos. La degradación de sustancias se cataliza a este respecto predominantemente mediante la familia de los citocromos, en particular en forma de las P450-oxigenasas. A este respecto se sabe desde hace mucho tiempo que distintos citocromos metabolizan diversas sustancias. Se sabe también que mediante la medición de la concentración de las sustancias metabolizadas puede evaluarse la función del hígado.

15 Así se describe en un artículo de Matsumoto *et al.* (Digestive Diseases Science, 1987, vol. 32, páginas 344-348) la administración oral de  $^{13}\text{C}$ -metacetina en pacientes sanos y con daño hepático, convirtiéndose la  $^{13}\text{C}$ -metacetina en el hígado con la liberación de  $^{13}\text{CO}_2$ . La determinación del contenido en  $^{13}\text{CO}_2$  en el aire espirado posibilita con ello, a este respecto, una información sobre el grado de daño del hígado.

20 Braden *et al.* (Aliment Pharmacol. Ther., 2005, vol. 21, páginas 179 - 185) describe la medición de la proporción de  $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$  en el aire espirado de individuos, a los que igualmente se les administró previamente  $^{13}\text{C}$ -metacetina por vía oral. A este respecto se mide de manera continua preferentemente durante un espacio de tiempo de 60 min, para determinar la actividad enzimática máxima.

25 Este enfoque no es suficiente, sin embargo, para su uso en la práctica clínica, dado que en particular debido a la administración oral de la  $^{13}\text{C}$ -metacetina puede deducirse únicamente una información sobre si el hígado funciona o eventualmente si aún funciona hasta cierto punto bien. Sin embargo de esto no puede deducirse ninguna estrategia de tratamiento directa para el médico.

30 Además, los procedimientos usados hasta ahora en el diagnóstico del hígado no son individualmente específicos, sino que posibilita únicamente información estadística sobre conjuntos de pacientes. Esto significa que por medio de las mediciones mencionadas puede reunirse información de si con un determinado resultado de medición es elevada o no la probabilidad de un diagnóstico negativo. Por la medición individual tampoco puede deducirse directamente la función hepática.

35 Por tanto es deseable desarrollar ensayos sencillos que posibiliten información pronosticadora con respecto a las reservas funcionales del tejido de células hepáticas. Los parámetros de laboratorio convencionales no son lo suficientemente sensibles para evaluar de manera fiable los procesos biológicos complejos en el hígado así como sus modificaciones en caso de enfermedad.

40 En el documento WO 2007/000145 A2 se describe un procedimiento de análisis que permite una determinación cuantitativa de la función hepática. El procedimiento se basa en una formación rápida de sustrato del sustrato que va a metabolizarse en el hígado y la determinación de la velocidad de conversión máxima del sustrato, que posibilita información sobre la capacidad funcional del hígado de un paciente.

45 Un procedimiento que permite una información individual sobre la función de metabolización cuantitativa de un órgano individual, en particular del hígado, puede presentar en distintas configuraciones las siguientes propiedades:

50 1.) la dinámica de la metabolización de un sustrato en el hígado del paciente se analiza en tiempo real y con alta resolución. A este respecto puede preverse que el inicio de la metabolización se realice rápidamente en comparación con el aumento de la metabolización, es decir es deseable cuando el 70 % de la iniciación de la metabolización discurre al menos al doble de la velocidad.

55 2.) La metabolización se mide directamente, es decir, que o bien un producto de metabolización es accesible directamente de una medición o bien puede medirse directamente otra magnitud que se encuentra en una proporcionalidad fija con respecto al producto de metabolización. Esto significa por ejemplo en ensayos de gas de respiración que se mide preferentemente cada respiración, sin embargo al menos dos respiraciones por minuto. Por tanto se prescinde de un almacenamiento temporal de la muestra de gas de respiración y una extracción parcial del gas de respiración con respecto a los posibles fallos de procedimiento que se producen.

60 3.) La magnitud medida no se modifica en más del 20 % mediante factores fisiológicos, es decir cuanto más baja sea la influencia de los factores fisiológicos, tales como por ejemplo la distribución del sustrato en el organismo a través de la sangre, más exacta es la determinación cuantitativa del producto de metabolización.

65 4.) El proceso de metabolización del sustrato administrado es unívoco y transcurre exclusivamente o en más del 90 % en las células hepáticas y en ninguna otra parte del organismo.

5.) El proceso de metabolización no varía en su eficacia de reacción entre seres humanos, dado que esto sería contrario a una determinación cuantitativa individual. Por consiguiente se excluyen procesos de metabolización que presentan una variación genética fuerte. Dado el caso, debería conocerse en una variación genética del proceso de metabolización al menos la intensidad de la variación de un proceso de metabolización genéticamente no modificado.

6.) Lo más favorable es cuando se realiza el proceso de metabolización mediante enzimas hepáticas o coenzimas hepáticas que se producen de manera uniforme en todas las células hepáticas del hígado. Si se produce una acumulación de enzimas hepáticas o coenzimas hepáticas en zonas específicas del hígado, puede alcanzarse como máximo una información ponderada para estas zonas sobre la función hepática. Tampoco deben cargarse fuertemente las enzimas hepáticas o coenzimas hepáticas mediante otras reacciones de metabolización de modo que esto conduzca a una modificación del proceso de metabolización en un orden de magnitud de más del 30 % y con ello una modificación de más del 30 % de la dinámica de metabolización.

Con los procedimientos conocidos hasta ahora no es posible realizar los puntos mencionados.

La presente invención se basa en el objetivo de proporcionar un procedimiento que permita una información individual sobre la función de metabolización cuantitativa del hígado.

Este objetivo se consigue mediante el presente procedimiento para facilitar datos de partida para la determinación de la función hepática de un ser vivo, en particular de la función hepática de un ser humano, de acuerdo con la reivindicación 1.

A este respecto, el procedimiento de acuerdo con la invención comprende la etapa de la determinación del contenido del  $^{13}\text{CO}_2$  formado como producto de metabolización de un sustrato marcado con  $^{13}\text{C}$  en el aire espirado durante un intervalo de tiempo determinado por medio de un aparato medidor con al menos una unidad de evaluación, en el que el sustrato se administró previamente al ser vivo y lo transforma el hígado con liberación del  $^{13}\text{CO}_2$ . La cantidad del  $^{13}\text{CO}_2$  formado en el aire espirado es, a este respecto, preferentemente proporcional a la cantidad del al menos un sustrato administrado. El procedimiento de acuerdo con la invención está caracterizado por que basándose en los puntos de medición determinados se describe el aumento inicial medido del contenido del  $^{13}\text{CO}_2$  en el aire espirado con una ecuación diferencial de primer orden. A partir de la solución de esta ecuación diferencial de primer orden se determinan sucesivamente un valor máximo  $A_{\text{máx}}$  (también denominado  $\text{DOB}_{\text{máx}}$ , representado  $\text{DOB}$  "delta over baseline") así como una constante de tiempo tau del aumento del contenido en  $^{13}\text{CO}_2$ .

El valor máximo  $A_{\text{máx}}$  o  $\text{DOB}_{\text{máx}}$  corresponde a este respecto al máximo de la dinámica de metabolización y la constante de tiempo tau corresponde a la constante de tiempo del aumento de la dinámica de metabolización. La invención posibilita la adaptación (el denominado "ajuste") de una curva a los valores medidos realmente de la modificación temporal del contenido en  $^{13}\text{C}$ , representando esta curva una solución de la ecuación diferencial de primer orden y presentando al menos dos valores, concretamente el valor máximo  $A_{\text{máx}}$  y la constante de tiempo  $\tau$  (tau). En particular, en caso de la solución de la ecuación diferencial se trata de una función exponencial que describe de manera aproximada el aumento inicial del contenido del  $^{13}\text{CO}_2$  en el aire espirado. Sus valores  $A_{\text{máx}}$  y tau representan magnitudes características que caracterizan el comportamiento inicial del aumento. Con ello, la presente invención posibilita por medio de la determinación de dos parámetros del aumento inicial medido un análisis especialmente fino y de alta resolución de cuadros clínicos del hígado. En particular, la evaluación también del parámetro tau junto al valor máximo  $A_{\text{máx}}$  permite una evaluación fina de este tipo. La presente invención proporciona con ello a un médico datos de partida mejorados para un diagnóstico.

El sustrato que va a metabolizarse se transporta a las células hepáticas. La ecuación diferencial con la que accede el transporte de la sustancia a las células hepáticas puede describirse mediante la siguiente ecuación

$$\frac{d}{dt} X = f(X, Y, Z, \dots) + C \frac{\partial^2}{\partial z^2} X$$

o en tres dimensiones

$$\frac{d}{dt} X = f(X, Y, Z, \dots) + C \Delta X$$

en la que X representa la concentración del sustrato que va a metabolizarse y C representa el coeficiente de difusión.

Se acepta el coeficiente de difusión C en primera aproximación como independiente del sitio. Dado que en la evaluación de la dinámica de metabolización no puede realizarse ninguna resolución específica del sitio, o se promedia en todos los sitios, se reduce la dependencia del sitio a una constante de difusión aparente  $C_{\text{ava}}$  y resulta

de la siguiente ecuación:

$$\frac{d}{dt} X = f(X, Y, Z, \dots) - C_{ave} X$$

- 5 Es esencial que la etapa de metabolización en la enzima discurra rápidamente en comparación con la dinámica de difusión, es decir al menos al doble de velocidad. Así tiene lugar la metabolización por ejemplo mediante el citocromo CYP P450 1A2 de promedio en el intervalo de sub-milisegundos.

- 10 De manera condicionada por la metabolización del sustrato se toma el sustrato del hígado, de manera que se reduce la concentración de sustrato X y se mantiene un gradiente de concentración entre el interior de la célula y el exterior de la célula, hasta que la sustancia se haya degradado completamente.

- 15 Los factores en una escala de tiempo más larga se proporcionan mediante la función  $f(X, Y, Z, \dots)$ . Estos factores de influencia deben constituir al inicio de la dinámica de metabolización menos del 20 % de la dinámica de metabolización, para que pueda describirse la ecuación diferencial (ED) con una ED de primer orden de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\frac{d}{dt} X = -C_{ave} X.$$

- 20 La solución de esta ED corresponde a la ecuación

$$X(t) = X_0 \exp(-t/C_{ave}),$$

- 25 en la que  $C_{ava}$  representa una constante de tiempo tau de la conversión y X representa la concentración del sustrato administrado.

- 30 El momento  $t=0$  resulta de la adaptación de la dinámica o de la iniciación de la metabolización. Si se determina  $^{13}\text{CO}_2$  como producto de metabolización marcado con  $^{13}\text{C}$ , entonces el aumento de la concentración de este producto de metabolización A es proporcional a la reducción del sustrato administrado X. Debido a ello, a partir del recorrido del sustrato que disminuye exponencialmente un recorrido del producto de metabolización que aumenta exponencialmente de acuerdo con

$$y(t) = A_{m\acute{a}x} - A \cdot \exp(-t/\tau),$$

- 35 en la que  $A_{m\acute{a}x}$  es la amplitud máxima de la función ajustada y con ello representa la concentración o cantidad máxima del  $^{13}\text{CO}_2$  y tau es la constante de tiempo de la conversión. Existe por tanto una curva exponencial que describe el aumento.

De acuerdo con la invención, la solución de la ecuación diferencial de primer orden corresponde a la ecuación

40

$$y(t) = A_{m\acute{a}x} - A_0 \exp\left(-\frac{t-t_0}{\tau}\right)$$

- 45 en la que  $y(t)$  representa la dinámica de metabolización del al menos un sustrato, t representa el tiempo de medición,  $t_0$  representa el inicio de la metabolización, tau representa la constante de tiempo de la conversión y  $A_{m\acute{a}x}$  representa la amplitud máxima de la función ajustada o la concentración máxima del  $^{13}\text{CO}_2$  y  $A_0$  representa la concentración inicial del  $^{13}\text{CO}_2$ .

A partir de la ecuación anterior es posible por consiguiente una determinación de  $A_{m\acute{a}x}$  y de la constante de tiempo tau.

- 50 La función exponencial mencionada se adapta por tanto preferentemente a los valores de medición del aumento inicial del contenido del  $^{13}\text{CO}_2$  en el aire espirado. De la adaptación se deducen entonces el valor máximo  $A_{m\acute{a}x}$  y la constante de tiempo tau.

- 55 Para la determinación de la función hepática cuantitativa de un ser vivo es importante a este respecto que el valor  $A_{m\acute{a}x}$  sea proporcional al número de las células hepáticas que participan en la metabolización y que la constante de tiempo tau proporcione información sobre la accesibilidad de la sustancia que va a metabolizarse a las enzimas hepáticas o coenzimas hepáticas.

En una forma de realización de la presente invención se describe el aumento de  $^{13}\text{CO}_2$  en el aire espirado hasta un valor del 70 % del valor máximo del aumento de  $^{13}\text{CO}_2$ , preferentemente hasta el valor máximo del aumento de  $^{13}\text{CO}_2$  con una ecuación diferencial de primer orden.

- 5 En una configuración especialmente preferente de la invención es posible ahora determinar a partir del valor  $A_{\text{máx}}$  o  $\text{DOB}_{\text{máx}}$  el valor máximo de conversión del al menos un sustrato en el hígado mediante la siguiente ecuación

$$LiMAx = \frac{DOB_{\text{máx}} R_{\text{PDB}} PM}{BW}$$

- 10 en la que  $R_{\text{PDB}}$  corresponde al valor 0,011237 (patrón Pee-Dee-Belemnite de la proporción de  $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ ), P corresponde a la tasa de producción de  $\text{CO}_2$ , M corresponde a la masa molar de la sustancia administrada y BW corresponde al peso corporal de la persona.

15 Con el uso del procedimiento de acuerdo con la invención para la determinación de la función hepática ha de tenerse en cuenta a este respecto que, con una constante de tiempo grande tau, el valor máximo del proceso de metabolización o de la dinámica de metabolización que puede leerse directamente puede desviarse del valor máximo  $A_{\text{máx}}$  o  $\text{DOB}_{\text{máx}}$  determinado a partir de la ecuación diferencial de primer orden. Esto tiene su raíz en que con un aumento lento de la tasa de metabolización aumentan las influencias de otros factores, tales como por ejemplo la distribución del sustrato en el organismo. Por este motivo es deseable producir la iniciación de la metabolización  
20 rápidamente, tal como puede realizarse esto por ejemplo mediante la administración intravenosa del sustrato que va a metabolizarse. La administración intravenosa del sustrato garantiza una facilitación rápida del sustrato en el hígado y la iniciación rápida unida a ello de la metabolización del sustrato. La administración intravenosa también permite la facilitación de un gradiente de sustrato suficientemente alto entre las células hepáticas y la sangre, que permite el registro de una dinámica de metabolización y la obtención de una velocidad de conversión máxima del sustrato.

25 Se prefiere adicionalmente que el sustrato que va a metabolizarse presente unidades estructurales que correspondan a las estructuras mostradas en la figura 1. En particular debería usarse como sustrato marcado con  $^{13}\text{C}$  un compuesto que permita la liberación de  $^{13}\text{CO}_2$  por medio de una reacción de desalquilación de un grupo alcoxilo R1, en particular de un grupo metoxilo. Generalmente, los sustratos usados pueden ser moléculas grandes o pequeñas que presentan o bien un anillo de seis miembros de átomos de carbono o isótopos de carbono así como un grupo alcoxilo, hidroxilándose en primer lugar el grupo alcoxilo mediante un citocromo P450 existente en el hígado, disociándose a continuación  $^{13}\text{CO}_2$ . Ciertos ejemplos de sustratos adecuados son entre otros la  $^{13}\text{C}$ -metacetina, fenacetina, etoxicumarina, cafeína, eritromicina y/o aminopirina. A este respecto es concebible también que un átomo de carbono pueda sustituirse por otro átomo, tal como por ejemplo nitrógeno o azufre. También es  
35 concebible que los sustratos usados se basen en compuestos con un anillo de cinco miembros que están sustituidos al menos con un grupo alcoxilo R1. Lógicamente pueden sustituirse también en este caso uno o dos átomos de carbono del anillo de cinco miembros por otro átomo, tal como por ejemplo nitrógeno o azufre. Lógicamente también es posible que los sustratos usados presentes distintos sustituyentes. Así pueden seleccionarse los restos R2, R3, R4, R5 y R6 mostrados en la figura 1 de un grupo que contiene halógenos, grupos alquilo, grupos carboxilo, grupos éster o grupos silano. Lógicamente no es concluyente esta enumeración de posibles sustituyentes, sino que puede extenderse a sustituyentes habituales para el experto.

40 El sustrato marcado con  $^{13}\text{C}$  se administra de manera preferente en una concentración entre 0,1 y 10 mg/kg de peso corporal. La concentración del sustrato que va a metabolizarse debería seleccionarse a este respecto de modo que la dinámica de metabolización esté distanciada en la zona lineal de la saturación. Si la concentración de sustrato supera un valor determinado, ya no es posible describir el aumento de  $^{13}\text{CO}_2$  en el aire espirado por medio de una ecuación diferencial de primer orden. Así, en el caso del uso de  $^{13}\text{C}$ -metacetina como sustrato que va a metabolizarse, la cantidad administrada debería encontrarse no por encima de 10 mg/kg de peso corporal.

50 En el contexto del presente procedimiento se determina preferentemente el contenido en  $^{13}\text{CO}_2$  absoluto en el aire espirado. A este respecto, la medición del contenido en  $^{13}\text{CO}_2$  en el aire espirado debería realizarse tanto en tiempo real como continuamente. Una determinación continua de la concentración de la concentración de  $^{13}\text{CO}_2$  en el aire espirado en el aparato medidor da como resultado la determinación de más puntos de datos, de manera que resulta una resolución y precisión superior de la curva de medición formada por los puntos de datos determinados. Una  
55 determinación fiable del valor máximo  $A_{\text{máx}}$  o  $\text{DOB}_{\text{máx}}$  y de la constante de tiempo tau debería basarse en al menos cinco puntos de medición, preferentemente al menos siete puntos de medición.

60 En una forma de realización especialmente preferente se combina el presente procedimiento con otros procedimientos analíticos, en particular con la volumetría CT. Esto permite una amplia información sobre el estado de salud de un paciente y una planificación de operación dirigida, por ejemplo en el caso de la aparición de tumores.

En otra forma de realización se combina el presente procedimiento con otros procedimientos analíticos, en particular la tomografía por resonancia magnética (TRM). A este respecto se localiza el sustrato marcado con  $^{13}\text{C}$  que va a metabolizarse con la TRM de obtención de imágenes en el hígado. La dinámica de metabolización se determina

mediante el presente procedimiento y puede compararse con TRM de resolución temporal. La combinación de los dos procedimientos permite analizar una resolución espacial y temporal de la metabolización de enzimas individuales en particular en el hígado. Generalmente, la resolución temporal de la TRM es demasiado lenta para seguir la dinámica de metabolización. Si se sincronizan los datos de la obtención de imágenes sin embargo con la

5 dinámica de metabolización del presente procedimiento, entonces puede conseguirse una mejor imagen de la metabolización, por ejemplo mediante ponderación de los datos de TRM en distintos momentos.

Adicionalmente, en una variante pueden seleccionarse los sustratos marcados con  $^{13}\text{C}$  que van a metabolizarse de modo que se metabolicen por enzimas o coenzimas en el hígado, que no están distribuidas homogéneamente en todo el hígado, sino que existen de manera reforzada en regiones específicas. Debido a que puede determinarse la función de metabolización de regiones individuales en el hígado.

10

Para la determinación de la dinámica de metabolización y de la imagen espacial de este proceso para una enzima o coenzima distribuida de manera homogénea en el hígado ha de garantizarse que el sustrato acceda de manera muy rápida y eficaz a las células hepáticas y allí pueda detectarse sin perturbaciones por medio de TRM, mientras que al mismo tiempo se mide con el presente procedimiento la dinámica de metabolización.

15

Un ejemplo de realización para ello es la metacetina marcada con  $^{13}\text{C}$  que es soluble mediante el solubilizador propilenglicol en disolución acuosa en una concentración suficientemente alta. La concentración del propilenglicol asciende a de 10 a 100 mg/ml, con lo que puede conseguirse una disolución de metacetina con una concentración del 0,2 % al 0,6 % de metacetina. Esta combinación especial de sustrato marcado con  $^{13}\text{C}$  (metacetina) y el solubilizador propilenglicol en disolución acuosa permite una medición por TRM casi libre de fondo de la metacetina marcada con  $^{13}\text{C}$ . La proporción de isótopos natural de  $^{13}\text{C}$  puede influir muy negativamente en las mediciones de TRM. Todos los átomos de carbono de la metacetina, del solubilizador y de las sustancias orgánicas residuales en las células hepáticas pueden proporcionar aportaciones a una señal de fondo muy perturbadora. Mediante la elección especial de la marcación con  $^{13}\text{C}$  en el grupo metilo unido a través de un grupo éter en la metacetina (o sea el grupo metoxilo) se diferencia el desplazamiento de isótopos del carbono marcado con  $^{13}\text{C}$  en metacetina de las señales de TRM de los átomos de carbono del solubilizador y de los aminoácidos y por consiguiente de la mayoría de otras sustancias orgánicas en las células hepáticas. Otros sitios de la marcación con  $^{13}\text{C}$  no muestran esta ventaja e impiden con ello mediciones de TRM útiles. El contraste de la obtención de imágenes por TRM puede elevarse mediante elección acertada de los pulsos aprovechando los efectos de acoplamiento (por ejemplo NOE, DEPT, etc.).

20  
25  
30

En particular en caso de funciones hepáticas muy malas, la combinación de los dos procedimientos ofrece claros efectos sinérgicos. Adicionalmente, la combinación permite una resolución espacial de la microcirculación en el hígado.

35

Los valores  $A_{\text{máx}}$  y tau determinados por medio del presente procedimiento pueden usarse para multitud de aplicaciones. Los siguientes usos y campos de uso son a este respecto especialmente importantes: determinación de la función hepática, seguimiento de la generación del hígado tras una operación, planificación de operaciones, en particular en un hígado dañado, determinación de la función de un hígado trasplantado, evaluación de septicemia, en particular de pacientes en cuidados intensivos, determinación del daño hepático mediante fármacos en la autorización de fármacos, seguimiento de daños a largo plazo del hígado, determinación de daños hepáticos mediante alimentos genéticamente modificados, usándose en el campo de la seguridad de trabajo en la industria química, en la medicina de trabajo, chequeo preventivo para el cáncer de hígado, control de enfermedades hepáticas, ajuste de la dosificación de fármacos, detección de daños hepáticos en animales, en la medicina del medio ambiente y chequeo rutinario de la función hepática.

40  
45

La presente invención se explicará a continuación por medio de los siguientes ejemplos de realización con referencia a las figuras, sin que estas explicaciones tengan una acción limitativa sobre el alcance de protección de la invención.

50

Muestran:

la figura 1 una representación esquemática de las sustancias adecuadas para la realización del procedimiento;

55

la figura 2 una representación esquemática del desarrollo del procedimiento de medición;

la figura 3 una representación gráfica de la cinética de aumento por medio de los valores DOB medidos con respecto al tiempo de medición;

60

la figura 4a una representación gráfica de la cinética de aumento en caso de función hepática normal;

la figura 4b una representación gráfica de la cinética de aumento en caso de cirrosis hepática;

65 la figura 4c una representación gráfica de la cinética de aumento en caso de daños hepáticos graves;

la figura 4d una representación gráfica de la cinética de aumento en caso de fallo hepático;

la figura 5 una representación gráfica del valor máximo de conversión  $L_{iMAX}$  con respecto al tiempo en caso de función hepática normal, función hepática limitada y fallo hepático.

- 5 La figura 6 una representación esquemática del transporte de una sustancia administrada en el hígado
- La figura 7 una representación gráfica de la cinética de aumento para la determinación de los datos de los valores máximos de A y de la constante de tiempo tau
- 10 La figura 8 una representación gráfica de la reducción de la concentración de un sustrato que va a metabolizarse y del aumento de la concentración de un producto de metabolización en la sangre

15 La determinación de la función hepática de un ser humano sigue preferentemente un esquema tal como se muestra en la figura 2. En este desarrollo de medición se inicia la metabolización mediante la administración intravenosa del sustrato que va a metabolizarse, en particular  $^{13}C$ -metacetina 1 junto con disolución isotónica de cloruro de sodio 1a.

20 Mediante la administración de sustrato intravenosa se garantiza la formación rápida de sustrato necesaria para la evaluación y la rápida iniciación con la metabolización del sustrato. La iniciación de la metabolización del sustrato, provocada mediante la conversión enzimática del sustrato en el hígado es a este respecto más rápida que el ritmo respiratorio.

25 El transporte del sustrato administrado en el hígado y la conversión o degradación que tiene lugar allí del sustrato está explicada esquemáticamente en la figura 6. El sustrato administrado (círculos doblemente rayados), tal como por ejemplo  $^{13}C$ -metacetina, se transporta con una constante de transporte específica hacia las células hepáticas, allí se hace reaccionar mediante las correspondientes enzimas (hexágonos rayados una sola vez), en particular P450 oxigenasas por ejemplo por medio de desalquilación con una determinada constante de reacción y se transporta el producto desalquilado (círculos rayados una sola vez) por ejemplo paracetamol con una constante de transporte específica así como el producto de metabolización marcado con  $^{13}C$  (círculos rayados una sola vez) por ejemplo  $^{13}CO_2$  con una constante de transporte específica fuera de las células hepáticas hacia la sangre.

30 Además de una activación enzimática del sustrato en particular mediante P450-oxigenasas es concebible también una liberación o activación del sustrato por medio de la exposición a la luz u otros procesos rápidos. El producto de metabolización liberado, por ejemplo  $^{13}CO_2$  se transporta a través de la sangre hacia el pulmón y allí se elimina por respiración. El aire espirado se conduce preferentemente a través de una mascarilla respiratoria y una conducción de unión continuamente hacia el aparato medidor 2 y se evalúa por medio de un ordenador 3 (Stockmann *et al.*, Annals of Surgery, 2009, 250: 119-125). Un aparato medidor que puede usarse para el presente procedimiento se describe entre otros en el documento WO 2007/107366 A1.

40 Debido al aparato medidor específico usado es posible seguir la metabolización del sustrato en cada respiración en tiempo real. Esto se explica en la figura 3. El diagrama de la figura 3 muestra un aumento de la concentración de  $^{13}CO_2$  en forma del valor DOB en el aire espirado, correspondiendo el aumento a una ecuación diferencial de primer orden. A este respecto 1 DOB designa una modificación de la proporción de  $^{13}CO_2$  con respecto a  $^{12}CO_2$  en una milésima parte por encima de la proporción natural. A partir de este aumento pueden deducirse, tal como se ha descrito anteriormente, tanto  $A_{m\acute{a}x}$  o  $DOB_{m\acute{a}x}$  como la constante de tiempo tau. Después de que el aumento de  $^{13}CO_2$  haya conseguido un valor máximo, sigue una reducción de la concentración de  $^{13}CO_2$ , lo que se debe a varios procesos dinámicos en el organismo que contribuyen a la reducción de la señal de medición.

50 Con la dinámica de metabolización descrita es posible seguir directa e inmediatamente la metabolización de un sustrato administrado mediante las enzimas existentes en el hígado. Así, el sustrato administrado preferente metacetina se desmetila a través de la enzima CYP1A2. Mediante la evaluación de la cinética de aumento de la metacetina administrada, que corresponde a una ecuación diferencial de primer orden, y los parámetros derivados de la misma  $A_{m\acute{a}x}$  y tau es posible ahora determinar directamente la función hepática. A este respecto, el valor máximo  $A_{m\acute{a}x}$  posibilita una información sobre el número de células hepáticas sanas y el volumen de hígado que está a disposición con ello para el metabolismo, mientras que el aumento en forma de la constante de tiempo tau posibilita información sobre la velocidad de entrada del sustrato en la células hepática. En particular la constante de tiempo tau posibilita por tanto información sobre si el hígado puede absorber generalmente sustratos.

60 La figura 7 muestra por medio de un ejemplo la determinación de los parámetros relevantes basándose en una curva que representa el aumento del  $^{13}CO_2$  en el aire de respiración tras la toma de metacetina marcada con  $^{13}C$ , véase para ello también la explicación con respecto a la figura 3. Basándose en los puntos de datos determinados (curva A) con un valor A máximo medido de 22,01 DOB se realiza una adaptación (ajuste) con una solución descrita tal como anteriormente de una ecuación diferencial de primer orden (curva B). A partir de la solución de la ecuación diferencial de acuerdo con

65

$$y(t) = A_{\text{máx}} - A_0 \exp\left(-\frac{t-t_0}{\tau}\right)$$

se realiza la determinación de la amplitud  $A_{\text{máx}}$  de la función ajustada con 22,09 DOB y de una constante de tiempo  $\tau$  para la conversión de 2,42 minutos. Una constante de tiempo pequeña de 2,42 minutos indica a este respecto una buena permeabilidad hepática, mientras que un aumento lento de la curva que se basa en los puntos de medición indica constantes de tiempo en el intervalo de más de 5 minutos y con ello un endurecimiento del tejido hepático y la permeabilidad del hígado empeorada asociada a ello.

Además de o adicionalmente a la determinación del contenido de un producto de metabolización marcado con  $^{13}\text{C}$  tal como por ejemplo  $^{13}\text{CO}_2$  en el aire espirado para la evaluación de la función hepática es concebible también observar la reducción de concentración del producto desalquilado en la sangre y a partir de la cinética de aumento correspondiente deducir una constante de tiempo  $\tau$ .

Esta variante está mostrada en la figura 8. Las modificaciones de concentración del sustrato marcado con  $^{13}\text{C}$  administrado por ejemplo  $^{13}\text{C}$ -metacetina y del producto de desalquilación formado en el hígado por ejemplo paracetamol se observan por medio de un procedimiento analítico adecuado por ejemplo HPLC. La concentración de la  $^{13}\text{C}$ -metacetina se reduce debido a la metabolización (la curva que disminuye exponencialmente comienza con una concentración inicial de 20 mg/ml de  $^{13}\text{C}$ -metacetina), mientras que la concentración del paracetamol aumenta como compensación (curva inferior en la figura 8). Las modificaciones de concentración iniciales pueden describirse también en este caso con una ecuación diferencial de primer orden. Por medio de la solución descrita para una ecuación diferencial de primer orden pueden deducirse las correspondientes constantes de tiempo, ascendiendo la constante de tiempo  $\tau_1$  para el aumento rápido inicial de la concentración del paracetamol a 1,3 min, mientras que la constante de tiempo  $\tau_2$  para el aumento ralentizado posterior de la concentración condicionado mediante una distribución posterior en la sangre se encuentra a 16 min.

El presente procedimiento para facilitar datos de partida para la determinación de la función hepática puede usarse para multitud de aplicaciones.

Así el procedimiento posibilita la evaluación del estado de salud general de un paciente, en particular una evaluación de la función hepática de un paciente. En las figuras 4a-d está representado gráficamente el aumento de la metabolización como función del tiempo. A este respecto resultan para distintos cuadros clínicos distintas cinéticas de aumento con distintos valores máximos  $A$  y distintas constantes de tiempo  $\tau$ . Tal como se ha descrito, el valor  $A$  posibilita la determinación de la conversión máxima  $\text{LiMAx}$ , que es directamente proporcional a la función hepática. La figura 4a muestra una función hepática normal con una conversión máxima  $\text{LiMAx}$  de 504  $\mu\text{g}/\text{h}/\text{kg}$ , mientras que en las figuras 4b - 4d se explican diversos cuadros clínicos. En caso de una cirrosis hepática está limitada la metabolización del sustrato administrado, de modo que la conversión máxima  $\text{LiMAx}$  alcanza tan solo un valor de 307  $\mu\text{g}/\text{h}/\text{kg}$ . En caso de otros daños hepáticos hasta el fallo hepático se reduce la conversión máxima del sustrato administrado de manera correspondiente a un valor de 144  $\mu\text{g}/\text{h}/\text{kg}$  (figura 4c) o 55  $\mu\text{g}/\text{h}/\text{kg}$  (figura 4d).

El presente procedimiento permite igualmente el pronóstico o seguimiento de la generación del hígado y la comprobación del estado del hígado tras una operación tal como por ejemplo tras una resección hepática. Así es posible por medio del presente procedimiento comprobar ya algunos minutos tras una operación de hígado o incluso ya durante la operación si el hígado puede funcionar y en qué medida.

En la figura 5 están representadas las funciones hepáticas tras una operación del hígado. Así se diferencian las conversiones máximas  $\text{LiMAx}$  significativamente entre un hígado regular sano, un hígado debilitado o un hígado fuertemente dañado. Tras una operación lleva por regla general algunos días hasta que el hígado se regenera. Si la conversión máxima  $\text{LiMAx}$  y con ello la función hepática tras una operación es ya muy baja, puede pronosticarse que el hígado del paciente no mejora y que con alta probabilidad morirá. Mediante el presente procedimiento sin embargo es posible un reconocimiento rápido de tales casos críticos, de modo que los pacientes afectados puedan tratarse alternativamente por ejemplo mediante un trasplante de hígado y gracias a ello se recuperen.

El presente procedimiento permite igualmente un pronóstico del resultado de la operación antes de una operación y por consiguiente una planificación de la operación adecuada. Así puede determinarse por ejemplo en combinación con una volumetría CT antes de una operación de hígado no sólo el tejido dañado, tal como por ejemplo tejido tumoral, sino también el tejido que ha eliminarse en total forzosamente. Esto es necesario, dado que en caso de un tratamiento de tumor debe eliminarse a ser posible mucho tejido alrededor del tumor para minimizar el riesgo de dispersión de un tumor. A este respecto, sin embargo, si se elimina demasiado volumen de hígado existe la posibilidad de que el paciente muera. La dimensión del volumen de hígado que ha de eliminarse depende de la función hepática del volumen de hígado que queda. Mediante la determinación exacta de la función hepática del volumen de hígado existente puede planificarse una operación por tanto con mucha exactitud, de modo que el paciente tenga óptimas oportunidades de supervivencia y recuperación.

Esto se especifica por medio del siguiente ejemplo. Si el volumen del tumor asciende a por ejemplo 153 ml, entonces es conveniente eliminar en total aproximadamente 599 ml de volumen de hígado. Por consiguiente, con un volumen total de hígado de 1.450 ml se quedaría un volumen residual de 698 ml, lo que garantizaría una supervivencia del paciente. La conversión máxima LiMAx de la 13C-metacetina administrada asciende antes de la operación a 307  $\mu\text{g}/\text{h}/\text{kg}$ . El volumen residual pretendido de 698 ml correspondería a una conversión máxima LiMAx de 165  $\mu\text{g}/\text{h}/\text{kg}$ . Por tanto, por medio del presente procedimiento ya durante la operación puede determinarse de manera continua la conversión, de modo que se garantice que se consiga el volumen residual necesario para la supervivencia de 698 ml. En el presente caso, el volumen residual del hígado asciende tras la operación a 625 ml y presenta una conversión máxima de 169  $\mu\text{g}/\text{h}/\text{kg}$ . Mediante una comparación directa del volumen de hígado sano con el valor LiMAx puede determinarse el volumen de hígado que va a reseccionarse por regla de tres para obtener un valor LiMAx objetivo.

El presente procedimiento permite también la determinación de la función o la no función postoperatoria (PNS) de un hígado trasplantado. Tras un trasplante de hígado ocurre en aproximadamente el 5 % de los casos que el hígado trasplantado no funciona por ejemplo debido a una circulación sanguínea insuficiente. Hasta ahora no puede reconocerse esto hasta varios días. Con el presente procedimiento es posible, por el contrario, reconocer la pérdida de función del hígado ya tras algunos minutos, dado que la constante de tiempo  $\tau$  proporciona información sobre la accesibilidad del sustrato administrado en el hígado. De manera correspondiente puede tratarse el paciente inmediatamente y por ejemplo puede realizarse un nuevo trasplante.

También son posibles la medición del éxito de la operación tras un trasplante de hígado y la planificación de otras etapas de tratamiento por medio del presente procedimiento. Así, tras un trasplante de hígado puede determinarse inmediata y directamente la función del hígado con el presente procedimiento de medición y puede optimizarse el tratamiento posterior del paciente individualmente.

El presente procedimiento posibilita además la evaluación de un riesgo de septicemia para pacientes en cuidados intensivos. Se sabe que en la medicina de cuidados intensivos el riesgo de morir por septicemia es muy alto. Con el presente procedimiento de medición es posible ahora determinar directamente en la hospitalización y durante el tratamiento un daño hepático o una función normal de las células hepáticas.

La determinación del daño hepático es importante también en particular en la autorización de medicamentos y fármacos. Por tanto, uno de los campos de aplicación más importantes del presente procedimiento es el uso del procedimiento para la comprobación de daños hepáticos provocados por medicamentos y fármacos en el desarrollo de una autorización de fármacos. En el contexto de la autorización de fármacos debe mostrarse en una prueba toxicológica que los fármacos que van a autorizarse no dañan el hígado. Habitualmente, una estimación de riesgo segura se deduce de una serie de distintos ensayos con animales. No obstante se producen en seres humanos con frecuencia efectos secundarios inesperados que sólo difícilmente pueden detectarse en el contexto de los ensayos con animales. Por el contrario, con el presente procedimiento puede determinarse de manera exacta y cuantitativa una acción tóxica en animales y seres humanos. Debido al presente procedimiento que permite una determinación eficaz cuantitativa de la función hepática, es posible ahora realizar estudios para determinar la dosificación de fármacos de manera más rápida y más exacta.

También por medio del presente procedimiento pueden seguirse daños a largo plazo asociados a una reconstrucción del hígado provocada por fármacos, tales como por ejemplo anticonceptivos. Durante la ingesta regular de fármacos, tales como por ejemplo de anticonceptivos, puede producirse modificaciones del hígado que en primer lugar influyen en la accesibilidad de las células hepáticas y después conducen a una reducción de la función hepática. Estas modificaciones del hígado puede detectarse mediante los tiempos de aumento  $\tau$ , a través de los cuales puede determinarse la velocidad de entrada de las sustancias en las células hepáticas, y el valor máximo A, que posibilita información sobre el número de células hepáticas sanas. Los ensayos regulares con el presente procedimiento de medición permiten por tanto la visualización de tales modificaciones hepáticas. Basándose en los datos determinados, el médico puede realizar una modificación de la asignación de fármacos, de modo que no tenga lugar ninguna modificación del hígado posterior.

La influencia de sustancias y alimentos genéticamente modificados sobre seres vivos, en particular el ser humano, sólo difícilmente puede determinarse actualmente. Esto está condicionado en particular por que las concentraciones de sustancias biológicas perjudiciales se encuentran con frecuencia por debajo o justo en el límite de detección o no se conoce en absoluto hasta ahora su nocividad. El presente procedimiento permite una detección unívoca del daño del hígado por alimentos genéticamente modificados.

Igualmente, con el presente procedimiento pueden seguirse, controlarse e identificarse influencias de productos químicos en la industria química o la industria farmacéutica. Esto permite una comprobación eficaz de la salud de seres humanos en el sitio de trabajo.

Otros campos de aplicación del presente procedimiento se encuentran en los campos de la medicina laboral para la estimación de riesgos patológicos, en la prevención de cáncer de hígado, en el control de enfermedades hepáticas,

tales como por ejemplo hepatitis, en la detección de daños hepáticos en animales, tales como por ejemplo provocados por la hierba de Santiago en caballos, envenenamientos y en la medicina medioambiental para la búsqueda de sustancias perjudiciales para el hígado en el suelo, alimento y/o en el agua potable.

- 5 Un campo de uso especialmente preferente del presente procedimiento es el ajuste de medicamentos. Dado que el hígado metaboliza la mayoría de todos los fármacos administrados, con una alta función hepática se metaboliza manera correspondiente una gran parte de los fármacos, mientras que con una peor función hepática se metaboliza una proporción más baja de los fármacos. Sin embargo para un paciente esto significa que, dependiendo de la función hepática, el nivel de dosificación del fármaco en el organismo es distinto y por consiguiente también puede
- 10 desarrollar una actividad diferente. Por tanto, una acción óptima de los fármacos debería adaptarse a la función hepática. Como ejemplo se indica en este caso la administración de Tacrolimus, un inmunosupresor frente a reacciones de rechazo en un trasplante de órgano. El ajuste exacto de una dosis de Tacrolimus es muy importante, dado que una alta dosis de Tacrolimus actúa de manera tóxica y una dosis demasiado baja es ineficaz. Con conocimiento exacto de la función hepática es posible ahora ajustar la dosis exactamente y optimizar la acción del
- 15 fármaco.

El presente procedimiento puede usarse igualmente debido a su sencillez y rapidez en caso de un médico de cabecera para fines de un chequeo del hígado para consultar la función hepática como parte del estado de salud.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para facilitar datos de partida para la determinación de la función hepática de un ser vivo, en particular de un ser humano, que comprende

- la determinación del contenido de  $^{13}\text{CO}_2$  como producto de metabolización de un sustrato marcado con  $^{13}\text{C}$  en el aire espirado de un ser vivo durante un intervalo de tiempo determinado, por medio al menos de un aparato medidor con al menos una unidad de evaluación, habiéndose administrado el sustrato previamente al ser vivo y habiéndolo transformado el hígado con liberación del  $^{13}\text{CO}_2$ ,

**caracterizado por que**

el aumento inicial medido del contenido del  $^{13}\text{CO}_2$  en el aire espirado se describe con una ecuación diferencial de primer orden y a partir de la solución de la ecuación diferencial de primer orden se determinan el valor  $A_{\text{máx}}$  para la concentración máxima del  $^{13}\text{CO}_2$  y la constante de tiempo tau del aumento del contenido del  $^{13}\text{CO}_2$ , usándose como solución de la ecuación diferencial de primer orden la ecuación

$$y(t) = A_{\text{máx}} - A_0 \exp\left(-\frac{t-t_0}{\text{tau}}\right)$$

en la que y(t) representa la dinámica de metabolización del al menos un sustrato,  $A_{\text{máx}}$  representa la amplitud máxima de la función ajustada o la concentración máxima del  $^{13}\text{CO}_2$ ,  $A_0$  representa la concentración inicial del  $^{13}\text{CO}_2$ , tau representa la constante de tiempo,  $t_0$  representa el inicio de la metabolización y t representa el tiempo de medición.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado por que** el aumento de  $^{13}\text{CO}_2$  en el aire espirado hasta un valor del 70 % del valor máximo del  $^{13}\text{CO}_2$ , en particular hasta el valor máximo del  $^{13}\text{CO}_2$ , se describe con una ecuación diferencial de primer orden.

3 Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la cantidad del  $^{13}\text{CO}_2$  formado es proporcional a la cantidad del al menos un sustrato administrado.

4. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado por que** la función exponencial mencionada se adapta a los valores de medición del aumento inicial del contenido del  $^{13}\text{CO}_2$  en el aire espirado y a partir de la adaptación se determinan el valor máximo  $A_{\text{máx}}$  y la constante de tiempo tau.

5. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** a partir del valor  $A_{\text{máx}}$  se determina la conversión máxima del al menos un sustrato en el hígado mediante la ecuación,

$$LiMAX = \frac{A_{\text{máx}} R_{\text{PBD}} PM}{BW}$$

en la que  $R_{\text{PBD}}$  como patrón Pee-Dee-Belemnite de la proporción de  $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$  corresponde al valor 0,011237, P corresponde a la tasa de producción de  $\text{CO}_2$ , M corresponde a la masa molar de la sustancia administrada y BW corresponde al peso corporal de la persona.

6. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** como sustrato marcado con  $^{13}\text{C}$  se usa un sustrato a partir del cual se libera  $^{13}\text{CO}_2$  por medio de una reacción de desalquilación de un grupo alcoxilo, en particular de un grupo metoxilo.

7. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** se determina el contenido absoluto del  $^{13}\text{CO}_2$  en el aire espirado.

8. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la determinación del  $^{13}\text{CO}_2$  formado se realiza en tiempo real.

9. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el contenido del  $^{13}\text{CO}_2$  formado en el aire espirado se determina de manera continua en el aparato medidor.

10. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** se combina con la tomografía por resonancia magnética como procedimiento analítico adicional de manera que la dinámica de metabolización se determina mediante un procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores y se compara con tomografía por resonancia magnética de resolución temporal para analizar una resolución espacial y temporal de la metabolización de enzimas individuales.

FIG 1

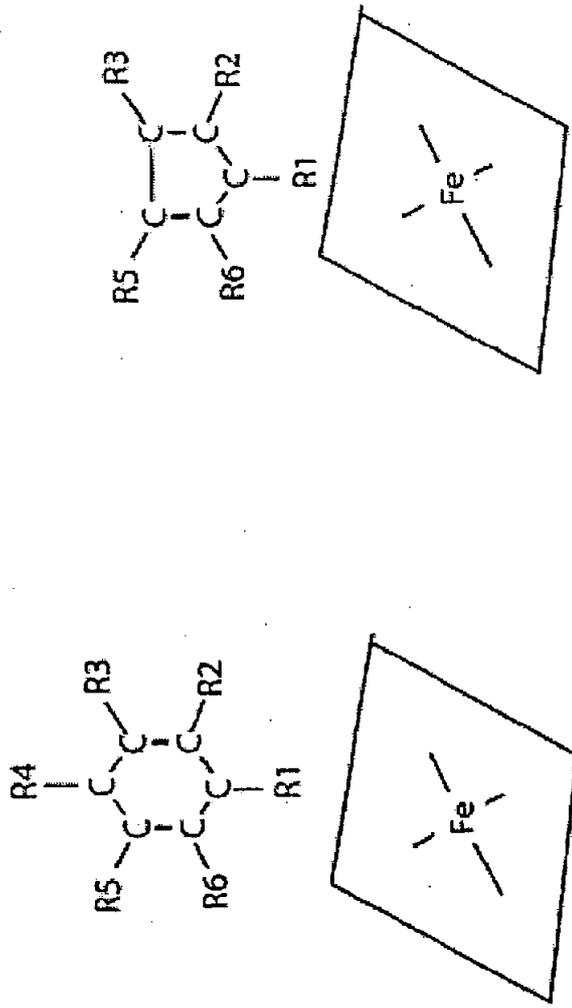


FIG 2

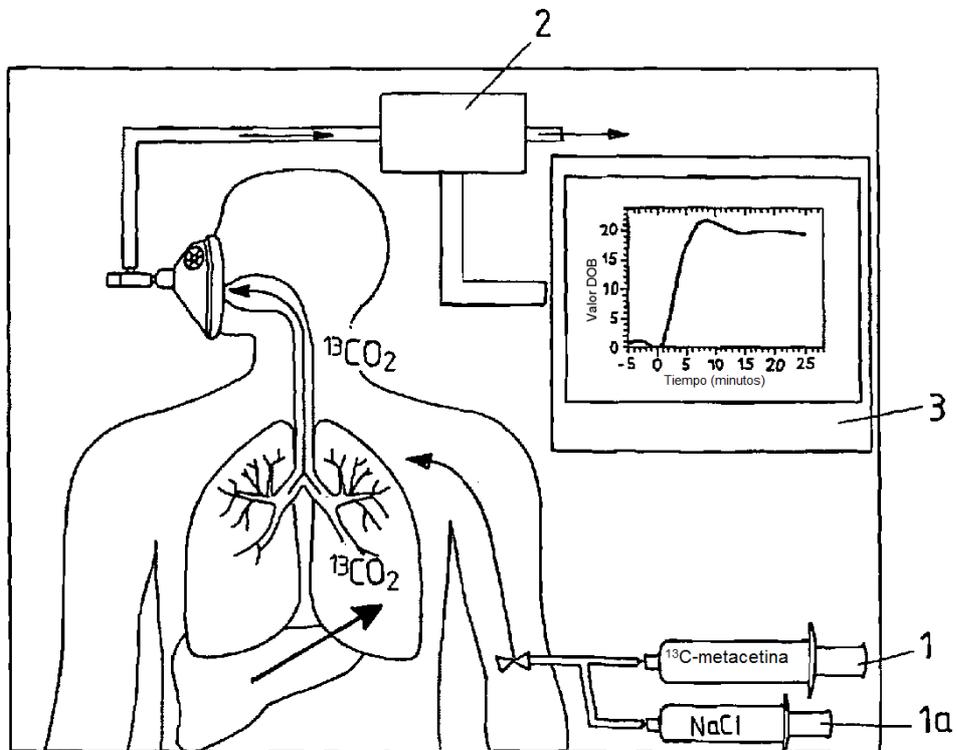


FIG 3

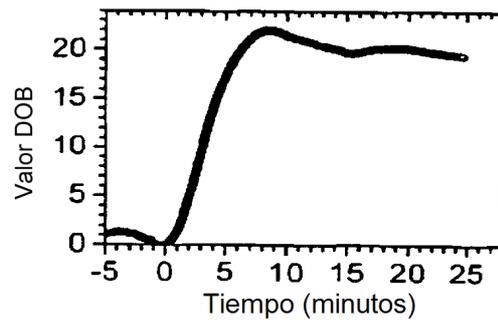


FIG 4A-4D

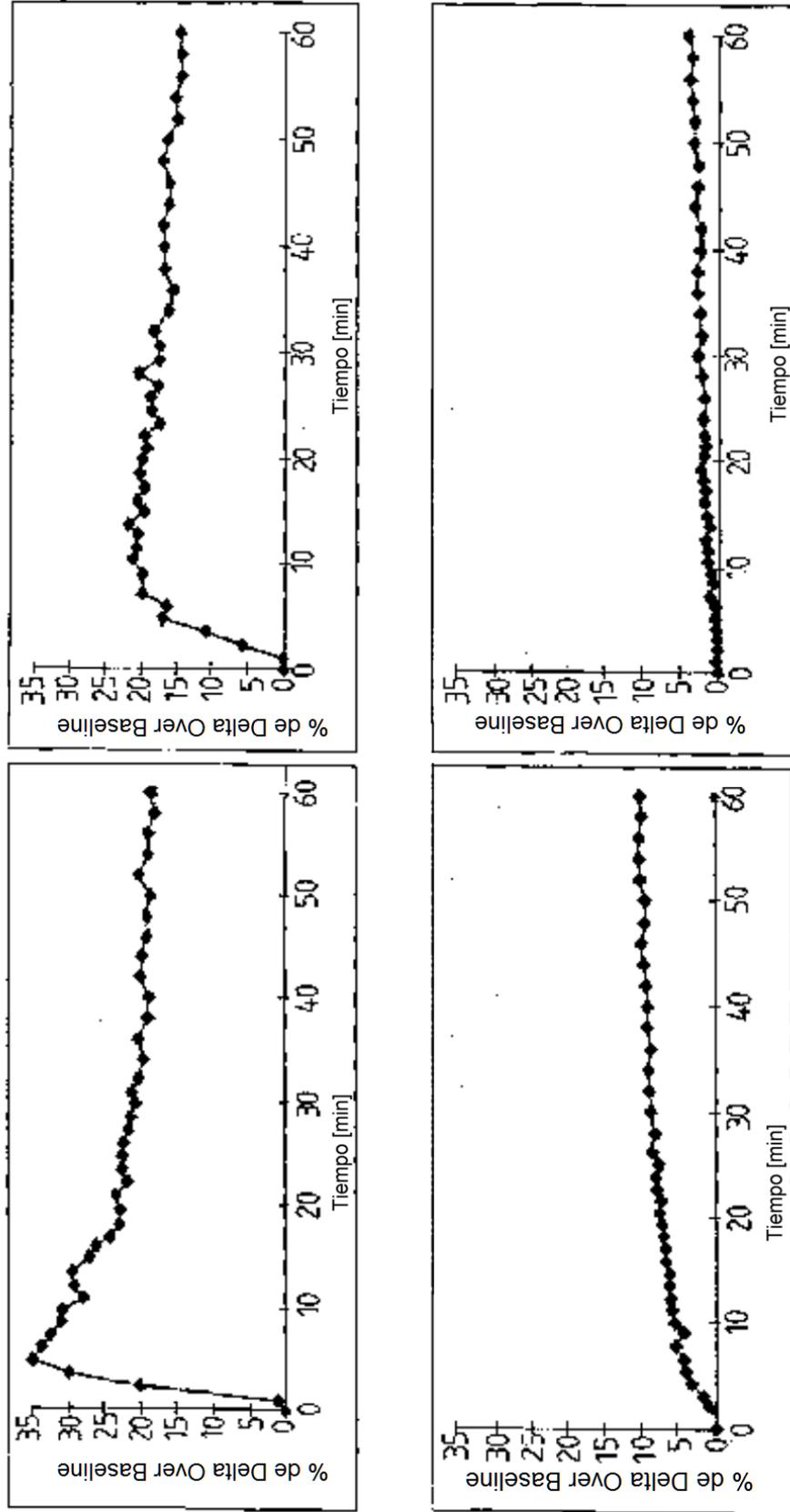


FIG 5

Operación

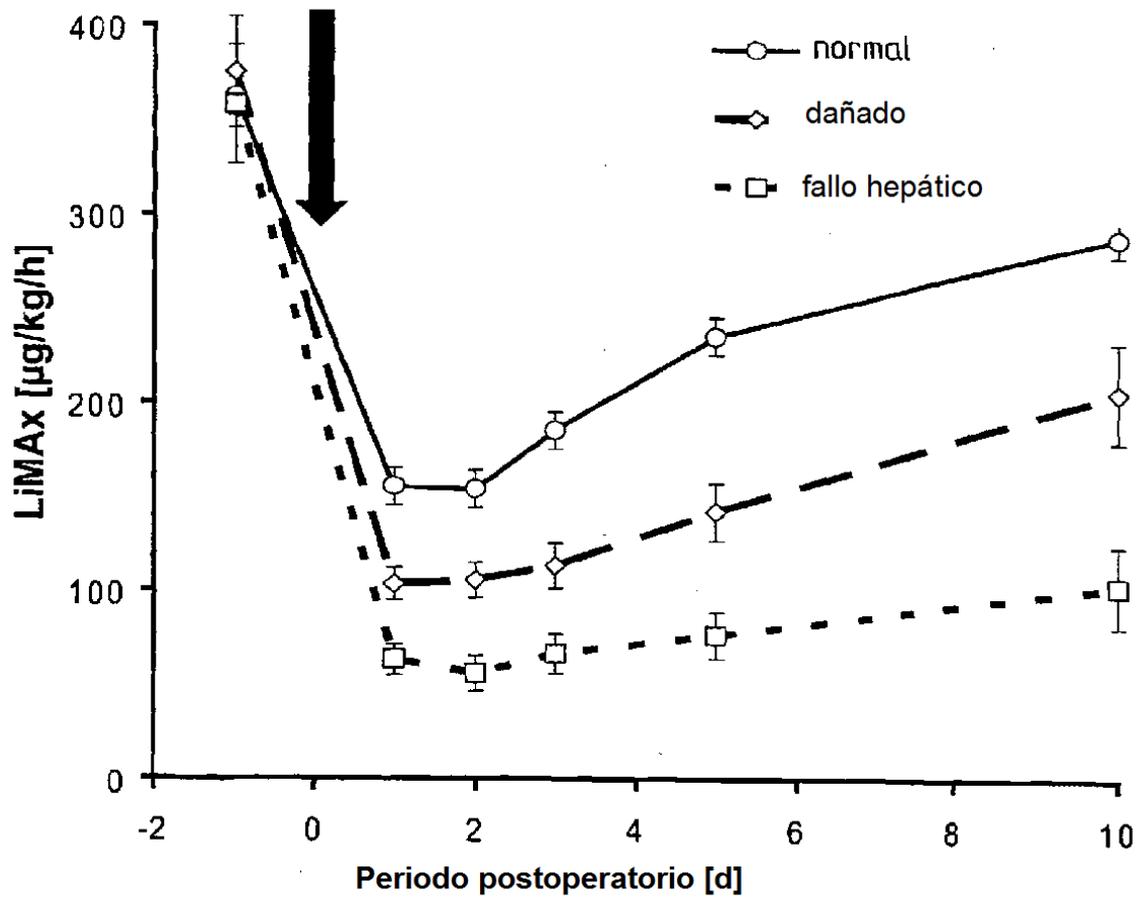


FIG 6

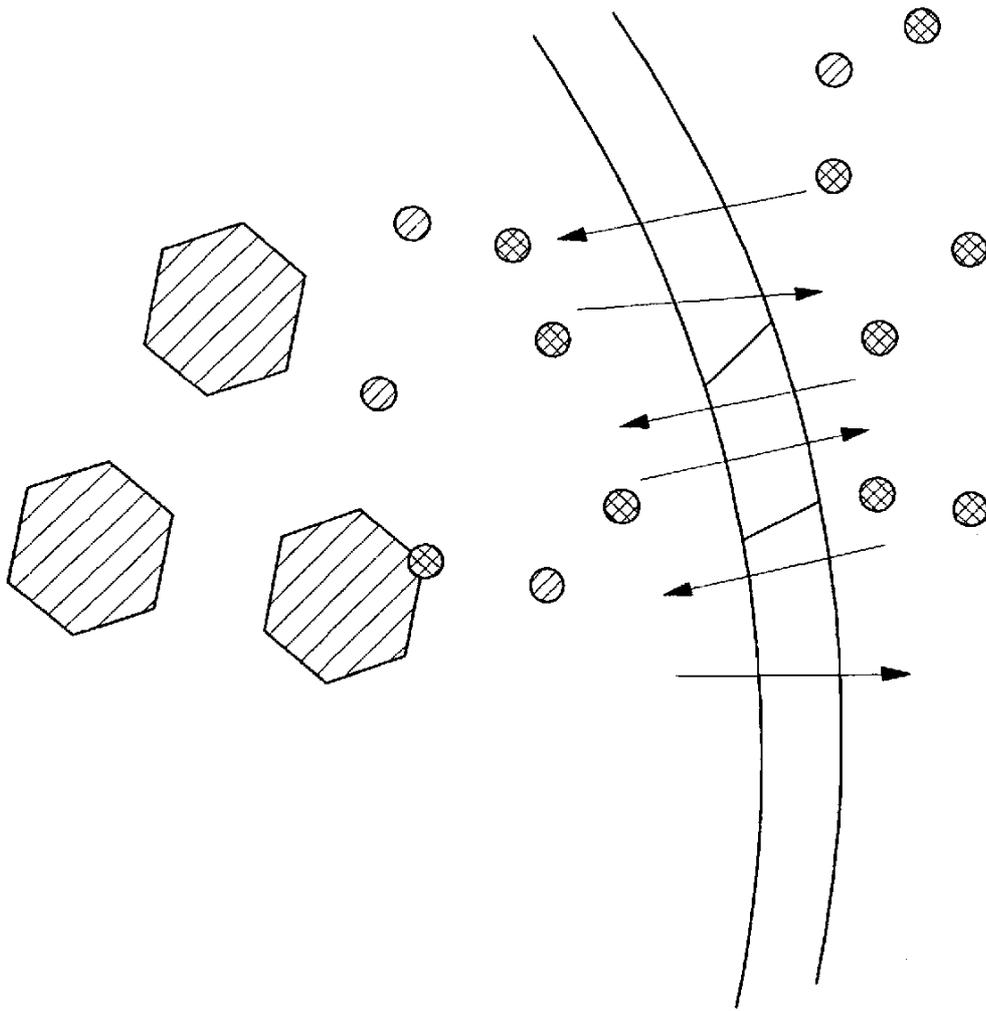


FIG 7

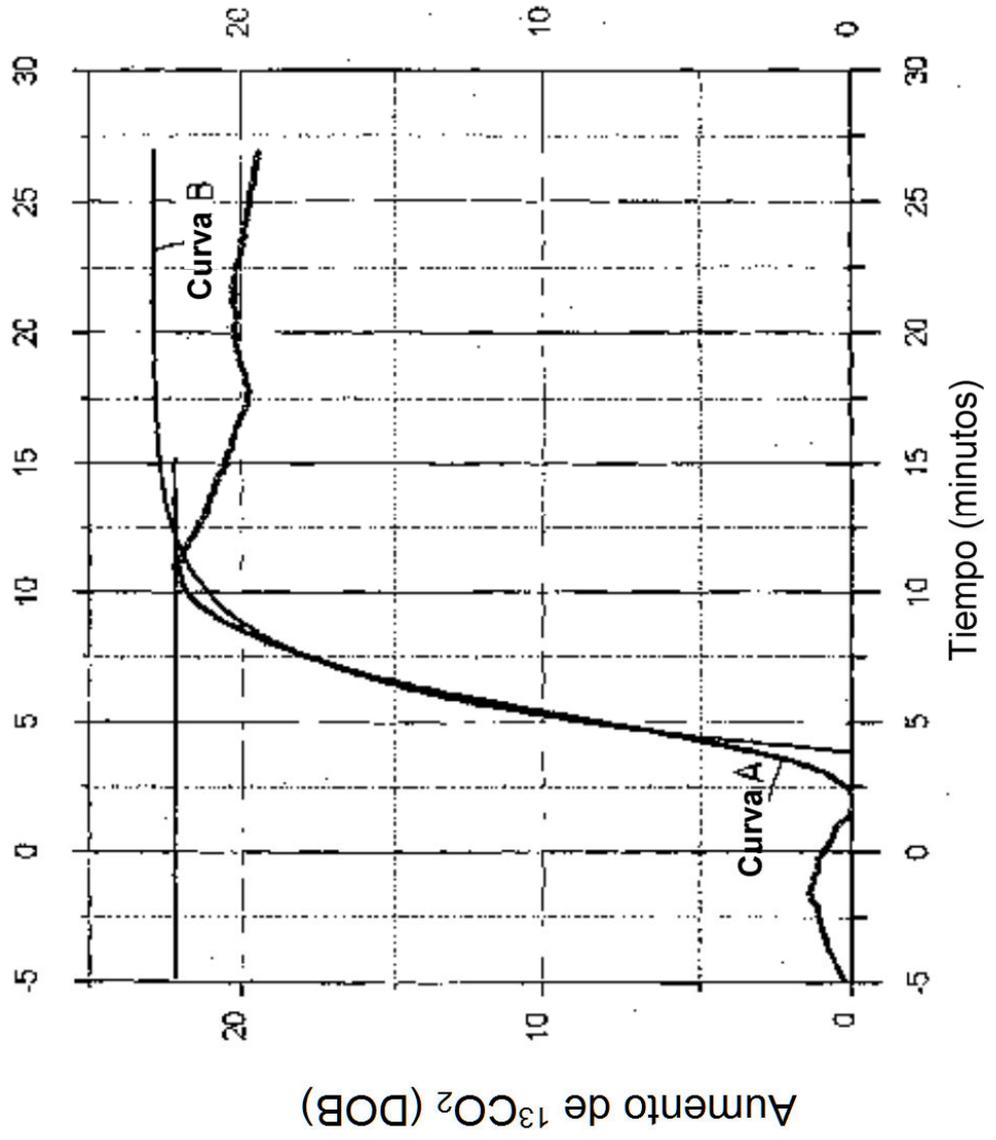


FIG 8

