

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 489 016**

51 Int. Cl.:

G01N 33/94 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2009 E 09740779 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.05.2014 EP 2344892**

54 Título: **Acetaminofeno glucuronidado como un marcador de trastornos hepáticos**

30 Prioridad:

01.10.2008 US 194835 P

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

01.09.2014

73 Titular/es:

**THE ARIZONA BOARD OF REGENTS ON BEHALF
OF THE UNIVERSITY OF ARIZONA (100.0%)
University Services Bldg. Room 204 888 N. Euclid
Avenue
Tucson, AZ 85721-0158, US**

72 Inventor/es:

CHERRINGTON, NATHAN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 489 016 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

Acetaminofeno glucuronidado como un marcador de trastornos hepáticos

Antecedentes de la invención

5 El acetaminofeno (APAP, por sus siglas en inglés) es el analgésico no opioide utilizado más comúnmente y el agente analgésico y antipirético de referencia respecto al cual se comparan otros productos similares. El metabolismo de APAP, cuya inmensa mayoría tiene lugar en el hígado, está bien definido (Figura 1). Al menos la mitad de una dosis administrada está conjugada con ácido glucurónico (GLUC) y un tercio con sulfato (SULF). La ruta enzimática de la oxidasa de función mixta dependiente de CYP-450, principalmente a través de CYP2E1, metaboliza aproximadamente un 5-9%. Esto da como resultado la formación de un metabolito intermedio reactivo
10 tóxico (NAPQI), que se conjuga posteriormente con glutatión para formar los conjugados con ácido mercaptúrico y cisteína atóxicos. Menos de un 5% de una dosis recomendada de acetaminofeno se excreta sin modificar por los riñones. El acetaminofeno experimenta una eliminación de primer orden desde el cuerpo y tiene una semivida plasmática corta (2.0-2.4 horas).

15 El APAP proporciona un ejemplo excelente del papel esencial que juegan los transportadores de salida en la excreción de metabolitos de fármacos del hígado. Todos los metabolitos de APAP requieren un transporte de salida con el fin de ser excretados desde el hígado y se puede detectar cada uno tanto en la bilis como en la orina. Los estudios de disposición *in vivo* y experimentos de transporte funcional *in vitro* indican que cada uno de los transportadores ABC ABCC2, ABCC3, ABCC4 y ABCG2 tiene la capacidad de transportar diversos fármacos conjugados y no conjugados, incluidos los metabolitos de APAP. ABCC2 y ABCG2 se ubican en la membrana (apical) canalicular de los hepatocitos a partir de la cual excretan sus sustratos en los canaliculos biliares. En consecuencia, en un hígado sano, la excreción biliar de los conjugados con SULF, GLUC y GSH de APA está
20 mediada predominantemente por ABCC2, aunque ABCG2 también parece contribuir a la excreción de los conjugados APAP-SULF. ABCC3 y ABCC4 se expresan en la membrana (basolateral) sinusoidal de los hepatocitos y colangiocitos a partir de la cual expulsan sus sustratos en la sangre. La excreción sinusoidal del metabolito APA-GLUC a partir de los hepatocitos está mediada predominantemente por ABCC3, mientras que ABCC4 parece mediar la excreción de los metabolitos APAP-SULF. Recientes estudios indican que ABCC3 y ABCC4 tienen la misma función en la salida de APAP-SULF.

Un estudio reciente (Drug. Metabolism and Disposition, 35:1970-1978 (2007)) ha mostrado que en un modelo en ratas de esteatohepatitis no alcohólica (NASH, por sus siglas en inglés), generada alimentando ratas con una dieta deficiente en metionina y colina (MCD, por sus siglas en inglés) durante 8 semanas, los transportadores de salida hepáticos ABCC3 y ABCC4 incrementaron la expresión proteica. La administración a estas ratas MCD de grandes dosis de APAP (1 mmol/kg) (equivalente a una dosis de 10 gramos en un ser humano de 150 libras, o una dosis de 17 gramos en un ser humano de 250 libras) dio como resultado un cambio de la excreción biliar a la plasmática de APAP-GLUC respecto al control. Sin embargo, dado que no existen seres humanos deficientes en metionina y colina, y las grandes dosificaciones de APAP administradas en el modelo en ratas, se ha especulado que la rata MCD no es un buen modelo para la NASH humana o para estudios del metabolismo hepático de fármacos en seres humanos. Es algo generalmente aceptado que ningún modelo en animales refleja con exactitud la NASH humana. Numerosas diferencias bioquímicas hacen que cualquier comparación directa esté potencialmente llena de inconvenientes en forma de artefactos. Por ejemplo, el modelo MCD carece del componente de resistencia a la insulina que, a menudo, es un componente de la NASH (Rinella ME y Green RM, *J Hepatol.* de enero 2004; 40(1):47-51). Además, mientras que la esteatosis en seres humanos ocurre en una dieta occidental típica alta en grasas que da como resultado un incremento del flujo neto de lípidos a través del hígado, el modelo MCD provoca esteatosis y esteatohepatitis mediante una disfunción del metabolismo de lípidos. Por lo tanto, la comparación directa entre el modelo MCD y seres humanos no es apropiada. Esto supone una preocupación especial para la dieta MCD, ya que los efectos de esta dieta antinatural frente a los efectos del daño hepático en sus variables no pueden ponerse de manifiesto.

El-Azab G *et al.*, *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, vol. 34, n.º 7, 1996, páginas 299-303, describen un estudio en el cual el nivel plasmático de acetaminofeno y sus metabolitos con glucurónido y sulfato se determinó en pacientes con un hígado cirrótico que padecían infección por esquistosoma y se comparó con el correspondiente en grupos de sujetos sanos. La concentración plasmática de acetaminofeno-glucurónido disminuyó de manera importante en los pacientes con un hígado cirrótico respecto al control.

En Forrest J A H *et al.*, *European Journal of Clinical Pharmacology*, Springer Verlag, Al., vol. 15, n.º 6, 1 de noviembre de 1979 (01-11-1979), páginas 427-431, se midieron las concentraciones plasmáticas y la excreción urinaria de paracetamol y sus conjugados con glucurónido, sulfato, cisteína y ácido mercaptúrico en ocho sujetos normales, ocho pacientes con una enfermedad hepática leve y siete pacientes con enfermedad hepática tras una dosis oral de 1.5 g de paracetamol. Las proporciones promedio de concentraciones plasmáticas de paracetamol inalterado respecto al paracetamol-glucurónido y -sulfato fueron significativamente mayores en pacientes con

enfermedad hepática grave que en los sujetos normales.

5 Gmyrek D *et al.*, TSCHXSESUNDH.WE 1971, vol. 26, n.º 11, 1971, páginas 503-508, describe una investigación sobre si es utilizable un ensayo de carga de paracetamol (NAPAP) como un ensayo de la función hepática en la hepatitis aguda. Se observó que la proporción de NAPAP libre respecto al NAPAP-glucurónido se incrementó en las muestras de orina procedentes de pacientes con hepatitis. La proporción se redujo tras el tratamiento de la enfermedad en el hospital.

10 Corcoran G B *et al.*, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 241, n.º 3, 1987, páginas 921-927 describe el uso de acetaminofeno como un fármaco prototipo para examinar la influencia de la obesidad en el potencial nefrotóxico y hepatotóxico de los fármacos activados metabólicamente. El análisis se llevó a cabo en un modelo en ratas obesas. La conclusión es que las ratas obesas forman más conjugados de tipo glucurónido que los controles.

15 En Shinoda Shigeo *et al.*, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, vol. 30, n.º 1, enero de 2007 (01-2007), páginas 157-161, se estudiaron la farmacocinética y la farmacodinámica de APAP en voluntarios sanos y pacientes con dolor crónico. Se midieron las concentraciones plasmáticas de APAP y metabolitos de APAP en los voluntarios y se midieron las concentraciones plasmáticas de APAP y las puntuaciones del dolor en los pacientes con dolor crónico. Se sugirió que los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos medidos se podrían utilizar para determinar un régimen posológico de APAP eficaz para pacientes con dolor crónico.

Compendio de la invención

20 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para diagnosticar esteatohepatitis no alcohólica (NAHS) o fibrosis hepática en un ser humano, que comprende:

- (a) determinar una cantidad de acetaminofeno (APAP)-glucurónido en una muestra de plasma y/o una muestra de orina obtenidas a partir de un sujeto humano después de que al sujeto humano se le haya administrado acetaminofeno (APAP), donde el sujeto humano está en riesgo de esteatohepatitis no alcohólica (NASH) o fibrosis hepática;
- 25 (b) comparar la cantidad de APAP-glucurónido en la muestra de plasma o en la muestra de orina o en ambas respecto a un control; e
- (c) identificar al sujeto humano como uno que padece esteatohepatitis no alcohólica (NASH) o fibrosis hepática si la cantidad de APAP-glucurónido en la muestra de plasma o en la muestra de orina o en ambas está elevada respecto al control.

30 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar a un sujeto humano en riesgo de una reacción farmacológica adversa, que comprende:

- (a) determinar una cantidad de acetaminofeno (APAP)-glucurónido en una muestra de plasma y/o una muestra de orina obtenidas a partir de un sujeto humano después de que al sujeto humano se le haya administrado acetaminofeno (APAP), donde el sujeto humano necesita el tratamiento con un fármaco terapéutico seleccionado a partir del grupo constituido por doxorubicina, morfina, cisplatino, ectopósido, metotrexato, fármacos conjugados glucuronidados, fármacos conjugados con glutatión y fármacos conjugados con sulfato;
- 35 (b) comparar la cantidad de APAP-glucurónido en la muestra de plasma o en la muestra de orina o en ambas respecto a un control; e
- 40 (c) identificar al sujeto humano como uno en riesgo de una reacción farmacológica adversa si la cantidad de APAP-glucurónido en la muestra de plasma o en la muestra de orina o en ambas está elevada respecto al control.

45 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un método para determinar una dosificación apropiada de un fármaco terapéutico seleccionado a partir del grupo constituido por doxorubicina, morfina, cisplatino, ectopósido, metotrexato, fármacos conjugados glucuronidados, fármacos conjugados con glutatión y fármacos conjugados con sulfato para un sujeto humano, que comprende:

- (a) determinar una cantidad de acetaminofeno (APAP)-glucurónido en una muestra de plasma y/o una muestra de orina obtenidas a partir de un sujeto humano después de que al sujeto humano se le haya administrado acetaminofeno (APAP), donde el sujeto humano necesita el tratamiento con un fármaco terapéutico seleccionado a partir del grupo constituido por doxorubicina, morfina, cisplatino, ectopósido, metotrexato, fármacos conjugados glucuronidados, fármacos conjugados con glutatión y fármacos conjugados con sulfato;
- 50

- (b) comparar la cantidad de APAP-glucurónido en la muestra de plasma o en la muestra de orina o en ambas respecto a un control; y
- (c) determinar que el sujeto humano debería recibir una dosificación no habitual del fármaco si la cantidad de APAP-glucurónido en la muestra de plasma o en la muestra de orina o en ambas está elevada respecto al control.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona medios de almacenamiento legibles por una máquina, que comprenden un conjunto de instrucciones para hacer que un dispositivo que mide un metabolito lleve a cabo los pasos de determinación, comparación e identificación de cualquier realización de los métodos del primer, segundo y tercer aspectos.

En la presente se proporcionan realizaciones de cada uno de los aspectos de la invención.

Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** es un organigrama que muestra el metabolismo del acetaminofeno.

La **Figura 2** proporciona autorradiografías que muestran la expresión de ABCC3 y ABCC4 hepáticos en seres humanos con NAFLD.

Las **Figuras 3A-B** muestran la proteína ABCC2 ubicada en los bordes de la membrana canicular muy definidos en hígados procedentes de pacientes sanos normales (A), pero que claramente se confunde con las vesículas de la membrana lejos de los canalículos en hígados con NASH (B).

La **Figura 4** muestra la concentración de APAP y sus metabolitos principales en plasma a lo largo de 4 horas.

La **Figura 5** es un gráfico que muestra la concentración de APAP y los metabolitos de APAP en la orina de voluntarios sanos normales, pacientes con esteatosis y pacientes con esteatohepatitis.

Las **Figuras 6A-C** son gráficos de APAP-Gluc plasmático para NASH (A), inflamación hepática (B) y fibrosis hepática (C).

Descripción detallada de la invención

En esta solicitud, a menos que se afirme lo contrario, las técnicas utilizadas se pueden encontrar en cualquiera de varias referencias muy conocidas tales como: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook *et al.*, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press), *Gene Expression Technology (Methods in Enzymology, vol. 185, editado por D. Goeddel, 1991. Academic Press, San Diego, CA)*, "Guide to Protein Purification" en *Methods in Enzymology* (M.P. Deutscher, ed., (1990) Academic Press, Inc.); *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis *et al.* 1990. Academic Press, San Diego, CA), *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 2.ª ed.* (R.I. Freshney. 1987. Liss, Inc. Nueva York, NY), *Gene Transfer and Expression Protocols*, págs. 109-128, ed. E.J. Murray, The Humana Press Inc., Clifton, N.J.) y el *Ambion 1998 Catalog* (Ambion, Austin, TX).

Tal como se emplean en la presente, las formas singulares "un", "uno/a" y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto prescriba claramente lo contrario. "Y" tal como se emplea en la presente se usa indistintamente con "o" a menos que se indique expresamente lo contrario.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para diagnosticar esteatohepatitis no alcohólica (NAHS) o fibrosis hepática en un ser humano, que comprende:

- (a) determinar una cantidad de APAP-glucurónido en una muestra de plasma y/o una muestra de orina obtenidas a partir de un sujeto humano después de que al sujeto humano se le haya administrado acetaminofeno (APAP), donde el sujeto humano está en riesgo de esteatohepatitis no alcohólica (NASH) o fibrosis hepática;
- (b) comparar la cantidad de APAP-glucurónido en la muestra de plasma o en la muestra de orina o en ambas respecto a un control; e
- (c) identificar al sujeto humano como uno que padece esteatohepatitis no alcohólica (NASH) o fibrosis hepática si la cantidad de APAP-glucurónido en la muestra de plasma o en la muestra de orina o en ambas está elevada respecto al control.

El inventor ha demostrado que los métodos de la invención proporcionan un análisis de orina o un análisis de sangre no invasivo para identificar pacientes humanos con varios trastornos hepáticos.

El sujeto humano puede ser un adolescente o un adulto. Las muestras de plasma y/o de orina se pueden obtener a

partir del sujeto humano por técnicas habituales de uso común por los expertos en la técnica.

Tal como se emplea en la presente, la expresión “trastorno hepático” incluye cualquier enfermedad hepática en seres humanos que exhiba una modificación del metabolismo del acetaminofeno, tal como se demuestra en la presente incluidas, sin carácter limitante, la fibrosis hepática, hepatitis, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), esteatohepatitis alcohólica, esteatohepatitis inducida por toxinas, colangitis esclerosante primaria, cirrosis y septicemia.

Tal como se emplea en la presente, “acetaminofeno” (APAP) es el reductor de la fiebre y del dolor ampliamente conocido, y sus formulaciones, con la estructura que se muestra en la Figura 1. Al sujeto humano se le puede administrar cualquier dosificación adecuada de APAP. Aunque al sujeto humano se le puede administrar más de una dosis de APAP, se prefiere la dosis máxima indicada de 1000 mg para minimizar el riesgo de toxicidad y a la vez facilitar aún el análisis de la formación de metabolitos. En una realización preferida de todos los aspectos y realizaciones de la invención, se ha administrado al sujeto humano una dosificación total de entre 250 mg y 1000 mg de APAP. En una realización preferida, los sujetos humanos no han tomado nada de APAP durante al menos 24 horas antes de la prueba. En una realización preferida de todos los aspectos y realizaciones de la invención, se ha administrado al sujeto humano una dosificación total de entre 250 mg y 1000 mg de de APAP. Se puede haber administrado cualquier formulación adecuada de APAP incluidas, sin carácter limitante, formas farmacéuticas orales líquidas y formas farmacéuticas orales sólidas.

Tal como se emplea en la presente, “APAP-glucurónido” se refiere a un metabolito específico de APAP, con la estructura que se muestra en la Figura 1.

Tal como se emplea en la presente, un “control” es cualquier medio para normalizar la cantidad de APAP-glucurónido que se está midiendo en el sujeto humano con un hígado sano. En una realización preferida, el control comprende los niveles de APAP-glucurónido predefinidos de una población o individuo normales (es decir, de los que se sabe que no padecen el trastorno hepático de interés).

Tal como se emplea en la presente, una cantidad “elevada” de APAP-glucurónido respecto al control puede ser cualquier incremento por encima del control y, preferentemente, es un incremento estadísticamente significativo (p. ej., $p \leq 0.05$). En diversas realizaciones preferidas, el nivel elevado de APAP-glucurónido supone una diferencia de 1.2 veces, 1.4 veces, 1.5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces o más en la cantidad de APAP-glucurónido en la muestra de orina o de sangre respecto al control apropiado.

Las muestras de plasma y/u orina obtenidas en cualquier momento adecuado tras la administración de APAP para detectar APAP-glucurónido se pueden utilizar en los métodos de todos los aspectos y realizaciones de la invención. En una realización preferida de todos los aspectos y realizaciones de la invención, se mide la cantidad de APAP-glucurónido en una muestra de plasma y la medida se realiza entre 1 minuto y 180 minutos tras la administración de APAP; más preferentemente entre 1 minuto y 120 minutos tras la administración de APAP y aún más preferentemente entre 1 minuto y 60 minutos tras la administración de APAP. En diversas realizaciones preferidas adicionales, la medida se realiza entre 10 minutos y 180 minutos; 30 minutos y 180 minutos; 45 minutos y 180 minutos; 60 minutos y 180 minutos; 10 minutos y 120 minutos; 30 minutos y 120 minutos; 45 minutos y 120 minutos; 10 minutos y 60 minutos; 30 minutos y 60 minutos; y 45 minutos y 60 minutos. En otra realización preferida de todos los aspectos y realizaciones de la invención, se mide la cantidad de APAP-glucurónido en una muestra de orina, donde se realiza una medida entre 120 y 480 minutos tras la administración de APAP; más preferentemente entre 120 minutos y 360 minutos tras la administración de APAP; e incluso más preferentemente entre 120 minutos y 300 minutos tras la administración de APAP o entre 120 minutos y 240 minutos tras la administración de APAP. En diversas realizaciones preferidas adicionales, la medida se realiza entre 180 minutos y 480 minutos; 180 minutos y 360 minutos; 180 minutos y 300 minutos; 180 minutos y 240 minutos; 240 minutos y 480 minutos; 240 minutos y 360 minutos; 240 minutos y 300 minutos; 300 minutos y 480 minutos; 300 minutos y 360 minutos; 360 minutos y 480 minutos. En diversas realizaciones preferidas adicionales se pueden realizar 1, 2, 3, 4 o más medidas, por ejemplo, para evaluar incrementos en el APAP-glucurónido en comparación con un control en uno o más puntos temporales. Los métodos pueden comprender además la detección y/o medida de otros analitos en el plasma y/u orina incluidos, sin carácter limitante, APAP, APAP-sulfato, APAP-NAC y APAP-CG/CYS.

Se pueden llevar a cabo cualesquiera pasos de procesamiento adecuados para preparar la muestra de plasma y/u orina para la medida de APAP-glucurónido. En una realización ilustrativa, se precipitan las proteínas a partir de las muestras de plasma y/u orina utilizando técnicas habituales y se centrifugan; el sobrenadante resultante se utiliza a continuación para el paso de medida de los métodos de la invención.

La medida de una cantidad de APAP-glucurónido en la muestra de plasma o en la muestra de orina o en ambas se puede llevar a cabo mediante cualquier técnica adecuada para la medida del analito incluidas, sin carácter limitante, la cromatografía (tal como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía de gases (GC), GC-espectrometría de masas (GC-MS), cromatografía en capa fina (TLC), etc.), resonancia magnética nuclear (RMN), técnicas electroquímicas espectroscópicas, electroforesis capilar y técnicas inmunológicas.

En una realización preferida adicional de cualquiera de las realizaciones anteriores, los pasos de determinación, comparación e identificación están automatizados; en esta realización, estos pasos se pueden llevar a cabo utilizando un instrumento automatizado, tal como un dispositivo para llevar a cabo cualquiera de las técnicas anteriores. Tales dispositivos incorporarían medios de almacenamiento legibles por una máquina que comprenden instrucciones para hacer que el dispositivo lleve a cabo los pasos de determinación, comparación e identificación.

Las muestras de plasma y/u orina obtenidas a partir de un sujeto de ensayo humano se pueden almacenar antes de medir APAP-GLUC; los expertos en la técnica conocen condiciones de almacenamiento adecuadas. Por ejemplo, las muestras se pueden congelar a temperaturas adecuadas durante la duración del almacenamiento deseada; en una realización, las muestras son estables durante un tiempo de hasta un año a -80 °C.

En el primer aspecto, el sujeto humano está en riesgo de esteatohepatitis no alcohólica (NASH). La enfermedad del hígado graso no alcohólica (NAFLD, por sus siglas en inglés) comprende un conjunto de lesiones patológicas que varían entre la esteatosis hepática y una forma de hepatitis de ácido graso conocida como esteatohepatitis no alcohólica (NASH), la forma más grave de NAFLD. Las características histológicas asociadas independientemente con el diagnóstico de NASH en las biopsias en seres humanos incluyen la esteatosis hepática, hepatocitos vacuolados, inflamación lobular, hialinos de Mallory y fibrosis perisinusoidal. Además, la NASH tiene el potencial de progresar hasta una cirrosis que requiera trasplante de hígado.

Tal como se describe en la presente, el inventor ha descubierto que en los pacientes con NASH humanos, el transportador ABCC2 no está ubicado correctamente en la membrana canalicular, sino que se ubica en su lugar dentro de las vesículas de la membrana lejos de los canalículos en los hígados NASH. Esta ubicación aberrante del transportador ABCC2 no se identificó en el modelo MCD en ratas descrito en Lickteig *et al.* (2007). El inventor también ha descubierto que la expresión de ABCC3 y ABCC4 hepáticos se eleva en los pacientes con NASH humanos. Sin querer ceñirse a ningún tipo de mecanismo de acción, el inventor cree que el tráfico hepático alterado de ABCC2 a las vesículas de la membrana altera la disposición de APAP-GLUC para favorecer la retención plasmática mediante ABCC3 y/o ABCC4 (y posteriormente su excreción en la orina), más que el aclaramiento biliar mediante ABCC2.

Los métodos de esta realización pueden servir para clasificar sujetos que padecen NAFLD y distinguir aquellos que padecen NASH de aquellos con esteatosis hepática. Los métodos actuales para diagnosticar NASH se basan en la biopsia hepática. Por lo tanto, los métodos no invasivos para diagnosticar NASH tienen un valor clínico y permiten un comienzo más rápido del tratamiento de NASH que incluye, sin carácter limitante, programas intensivos de reducción de peso y tratamiento farmacológico terapéutico.

En una realización preferida, el sujeto humano en riesgo de NASH padece una o más de las siguientes enfermedades: enfermedad del hígado graso no alcohólica, síndrome metabólico de la esteatosis, obesidad, dislipidemia, resistencia a la insulina, enfermedad cardiovascular y diabetes.

En el primer aspecto de la invención, el sujeto humano, como alternativa, está en riesgo de fibrosis hepática. La fibrosis hepática consiste en una cicatrización sumamente exagerada en la cual se acumula un exceso de tejido conectivo en el hígado. La matriz extracelular se produce de manera excesiva, o se degrada de manera deficiente, o ambas. La fibrosis por sí misma no causa síntomas pero puede conducir a hipertensión portal (la deformidad cicatricial distorsiona el flujo de sangre a través del hígado) o cirrosis (el fracaso a la hora de reemplazar de manera apropiada las células hepáticas destruidas da como resultado la disfunción hepática). Los métodos actuales para diagnosticar la fibrosis hepática se basan en la biopsia hepática. Por lo tanto, los métodos no invasivos para diagnosticar la fibrosis hepática tienen valor clínico. En una realización preferida, el sujeto humano en riesgo de fibrosis hepática padece, o ha padecido previamente, una o más afecciones que predisponen a la fibrosis hepática seleccionadas a partir del grupo constituido por la deficiencia de α_1 -antitripsina, enfermedad de Wilson, fructosemia, galactosemia, enfermedades de almacenamiento de glucógeno de tipo III, IV, VI, IX y X, hemocromatosis, enfermedad de Gaucher, síndrome de Zellweger, tirosinemia, infección bacteriana, infección vírica (tal como por el virus de la hepatitis B (HBV, por sus siglas en inglés) o el virus de la hepatitis C (HCV, por sus siglas en inglés), síndrome de Budd-Chiari, alcoholismo, drogadicción, insuficiencia cardíaca, enfermedad venooclusiva hepática, colestasis y flebotrombosis portal.

Tal como se describe más detalladamente a continuación, el inventor ha descubierto que los sujetos humanos con fibrosis hepática tienen una cantidad más elevada de APAP-GLUC en el plasma y la orina que los sujetos humanos sin fibrosis hepática. Los métodos de la invención permiten un comienzo más rápido del tratamiento de la fibrosis hepática que incluye, sin carácter limitante, retirar la base de la lesión hepática, por ejemplo, eliminando mediante terapia antivírica el HBC o HCV; absteniéndose de ingerir alcohol en la enfermedad hepática alcohólica; retirar los metales pesados tales como hierro o cobre en la hemocromatosis y la enfermedad de Wilson respectivamente; o descomprimir las vías biliares en la colestasis.

La fibrosis hepática se clasifica histológicamente de manera general en leve (deformidad cicatricial mínima alrededor de los vasos sanguíneos), moderada (deformidad cicatricial que se extiende hacia afuera desde los vasos

sanguíneos hepáticos) o grave (deformidad cicatricial que forma puentes entre los vasos sanguíneos). Se puede identificar a un sujeto humano como uno que tiene fibrosis hepática grave si la cantidad de APAP-glucurónido en una muestra de plasma o en una muestra de orina o en ambas está elevada respecto al control. El sujeto humano puede padecer NASH.

- 5 En la presente se describe un método para diagnosticar a un ser humano en riesgo de hepatitis, una inflamación del hígado caracterizada por una necrosis en parches o difusa. Las causas principales son los virus específicos de la hepatitis, el alcohol y los fármacos. Por lo tanto, el sujeto humano con hepatitis puede padecer, o haber padecido previamente, uno o más trastornos seleccionados a partir del grupo constituido por alcoholismo, drogadicción, infección bacteriana, infección vírica (tal como hepatitis A, B, C, D y/o E), infección fúngica, infección por protozoos, infección por helmintos, infección por espiroquetas, sarcoidosis, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn.

10 Tal como se describe más detalladamente a continuación, el inventor ha descubierto que los sujetos humanos con inflamación hepática (hepatitis) tienen una cantidad más elevada de APAP-GLUC en plasma y orina que los sujetos humanos sin fibrosis hepática. La inflamación hepática se clasifica histológicamente de manera general en leve (menos de 2 focos de inflamación), moderada (2-4 focos de inflamación) o grave (más de 4 focos de inflamación). Se puede identificar a un sujeto humano como uno que tiene una inflamación hepática moderada o grave si la cantidad de APAP-glucurónido en una muestra de plasma o de orina o en ambas está elevada respecto al control. Se puede identificar a un sujeto humano como uno que tiene una inflamación hepática grave si la cantidad de APAP-glucurónido en una muestra de plasma o de orina o en ambas está elevada respecto al control. El sujeto humano puede padecer NASH y/o fibrosis hepática.

20 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar a un sujeto humano en riesgo de una reacción farmacológica adversa, que comprende:

- (a) determinar una cantidad de acetaminofeno APAP-glucurónido en una muestra de plasma y/o una muestra de orina obtenidas a partir de un sujeto humano después de que al sujeto humano se le haya administrado acetaminofeno (APAP), donde el sujeto humano necesita el tratamiento con un fármaco terapéutico seleccionado a partir del grupo constituido por doxorrubicina, morfina, cisplatino, ectopósido, metotrexato, fármacos conjugados glucuronidados, fármacos conjugados con glutatión y fármacos conjugados con sulfato;
- (b) comparar la cantidad de APAP-glucurónido en la muestra de plasma o en la muestra de orina o en ambas respecto a un control; e
- 30 (c) identificar al sujeto humano como uno en riesgo de una reacción farmacológica adversa si la cantidad de APAP-glucurónido en la muestra de plasma o en la muestra de orina o en ambas está elevada respecto al control.

35 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un método para determinar una dosificación apropiada de un fármaco terapéutico seleccionado a partir del grupo constituido por doxorrubicina, morfina, cisplatino, ectopósido, metotrexato, fármacos conjugados glucuronidados, fármacos conjugados con glutatión y fármacos conjugados con sulfato para un sujeto humano, que comprende:

- (a) determinar una cantidad de APAP-glucurónido en una muestra de plasma y/o una muestra de orina obtenidas a partir de un sujeto humano después de que al sujeto humano se le haya administrado acetaminofeno (APAP), donde el sujeto humano necesita el tratamiento con un fármaco terapéutico seleccionado a partir del grupo constituido por doxorrubicina, morfina, cisplatino, ectopósido, metotrexato, fármacos conjugados glucuronidados, fármacos conjugados con glutatión y fármacos conjugados con sulfato;
- (b) comparar la cantidad de APAP-glucurónido en la muestra de plasma o en la muestra de orina o en ambas respecto a un control; y
- 45 (c) determinar que el sujeto humano debería recibir una dosificación no habitual del fármaco si la cantidad de APAP-glucurónido en la muestra de plasma o en la muestra de orina o en ambas está elevada respecto al control.

50 Todos los términos comunes entre el primer, segundo y tercer aspectos de la invención comparten la misma definición; todas las realizaciones del primer aspecto son aplicables al segundo y tercer aspectos de la invención a menos que el contexto prescriba claramente lo contrario.

Tal como se describe en la presente, el inventor ha descubierto que en pacientes con NASH humanos, el transportador ABCC2 no está ubicado correctamente en la membrana canicular, sino que se ubica en su lugar dentro de las vesículas de la membrana lejos de los canalículos en los hígados NASH. Esta ubicación aberrante del transportador ABCC2 no se identificó en el modelo MCD en ratas descrito en Lickteig *et al.* (2007). El inventor

- también ha descubierto que la expresión de ABCC3 y ABCC4 hepáticos se eleva en los pacientes con NASH humanos. Sin querer ceñirse a ningún tipo de mecanismo de acción, el inventor cree que el tráfico hepático alterado de ABCC2 a las vesículas de la membrana altera la disposición de APAP-GLUC para favorecer la retención plasmática mediante ABCC3 y/o ABCC4 (y posteriormente su excreción en la orina), más que el aclaramiento biliar mediante ABCC2. El cambio proporcional en la eliminación de los metabolitos de APAP de la bilis en el plasma/orina indica, por lo tanto, alteraciones en la expresión del transportador de salida y/o la ubicación celular que puede afectar a la ruta de eliminación del fármaco y, por lo tanto, proporciona métodos para identificar aquellos sujetos humanos en riesgo de una reacción farmacológica adversa debida a alteraciones en la expresión y/o ubicación del transportador de salida.
- 5 Tal como se emplea en la presente, “en riesgo de una reacción farmacológica adversa” quiere decir que es más probable que un sujeto humano experimente una o más reacciones adversas asociadas con el fármaco que va a recibir. Este tipo de posibles reacciones adversas incluye cualesquiera reacciones adversas de este tipo, tanto aquellas enumeradas en la bibliografía para un fármaco dado como las reacciones adversas idiosincráticas.
- 10 Tal como se emplea en la presente, una “dosificación no habitual del fármaco” quiere decir que el médico que atiende debería alterar una dosificación del fármaco que se va a administrar al sujeto humano para tener en cuenta un incremento en el riesgo de una reacción farmacológica adversa.
- 15 En diversas realizaciones preferidas del segundo y tercer aspectos de la invención, el sujeto humano que necesita el tratamiento farmacológico terapéutico está en riesgo o padece NASH, fibrosis hepática y/o inflamación hepática. Los sujetos humanos en riesgo de cada uno de estos trastornos se describen detalladamente en el primer aspecto de la invención. En otra realización preferida, el sujeto humano padece cualquier trastorno que conlleva una alteración en la expresión y/o ubicación de los transportadores ABCC2, ABCC3 y/o ABCC4. En una realización preferida, el trastorno conlleva una ubicación aberrante del transportador ABCC2.
- 20 El fármaco terapéutico se selecciona entre doxorubicina, cisplatino, ectopósido, metotrexato, morfina, ezetimiba, fármacos conjugados glucuronidados, fármacos conjugados con glutatión y fármacos conjugados con sulfato, es decir, cuyo o cuyos metabolitos se transportan desde el hígado mediante los transportadores ABCC2, ABCC3 y/o ABCC4.
- 25 Al sujeto humano se le puede administrar cualquier dosificación adecuada de APAP. Aunque se puede haber administrado más de una dosis de APAP al sujeto humano, en una realización preferida se ha administrado una dosificación única para facilitar el análisis de la formación de metabolitos. En una realización preferida, los sujetos humanos no han tomado nada de APAP durante al menos 24 horas antes de la prueba. En una realización preferida adicional de todos los aspectos y realizaciones de la invención, se ha administrado al sujeto humano una dosificación total de entre 250 mg y 1000 mg de APAP. Se puede haber administrado cualquier formulación adecuada de APAP incluidas, sin carácter limitante, formas farmacéuticas orales líquidas y formas farmacéuticas orales sólidas.
- 30 Se pueden utilizar las muestras de plasma y/u orina obtenidas en cualquier momento adecuado tras la administración de APAP para detectar APAP-glucurónido en los métodos de todos los aspectos y realizaciones de la invención. En una realización preferida de todos los aspectos y realizaciones de la invención, la cantidad de APAP-glucurónido se mide en una muestra de plasma, y la medida se realiza entre 1 minuto y 240 minutos tras la administración de APAP; más preferentemente entre 1 minuto y 180 minutos tras la administración de APAP, e incluso más preferentemente entre 1 minuto y 120 minutos o entre 1 minuto y 60 minutos tras la administración de APAP. En otra realización preferida de todos los aspectos y realizaciones de la invención, la cantidad de APAP-glucurónido se mide en una muestra de orina, donde se realiza una medida entre 120 minutos y 480 minutos tras la administración de APAP; más preferentemente entre 120 minutos y 360 minutos tras la administración de APAP, en incluso más preferentemente entre 120 minutos y 300 minutos o entre 120 minutos y 240 minutos tras la administración de APAP.
- 35 Se pueden llevar a cabo cualesquiera pasos de procesamiento adecuados para preparar la muestra de plasma y/u orina para la medida de APAP-glucurónido. En una realización ilustrativa, se precipitan las proteínas a partir de las muestras de plasma y/u orina utilizando técnicas habituales y se centrifugan; el sobrenadante resultante se utiliza a continuación para el paso de medida de los métodos de la invención.
- 40 La medida de una cantidad de APAP-glucurónido en la muestra de plasma o en la muestra de orina o en ambas se puede llevar a cabo mediante cualquier técnica adecuada para la medida del analito incluidas, sin carácter limitante, la cromatografía (tal como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía de gases (GC), GC-espectrometría de masas (GC-MS), cromatografía en capa fina (TLC), etc.), resonancia magnética nuclear (RMN), técnicas electroquímicas espectroscópicas, electroforesis capilar y técnicas inmunológicas.
- 45 Tal como se emplea en la presente, un “control” es cualquier medio para normalizar la cantidad de APAP-glucurónido que se está midiendo en el sujeto humano con un hígado sano. En una realización preferida, el control comprende los niveles de APAP-glucurónido predefinidos de una población o individuo normales (es decir, de los

que se sabe que no padecen el trastorno hepático de interés).

Tal como se emplea en la presente, una cantidad "elevada" de APAP-glucurónido respecto al control puede ser cualquier incremento por encima del control y, preferentemente, es un incremento estadísticamente significativo (p. ej., $p \leq 0.05$). En diversas realizaciones preferidas, el nivel elevado de APAP-glucurónido supone una diferencia de 1.2 veces, 1.4 veces, 1.5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces o más en la cantidad de APAP-glucurónido en la muestra de orina o de sangre respecto al control apropiado.

En una realización preferida adicional de cualquiera de las realizaciones anteriores, los pasos de determinación, comparación e identificación están automatizados; en esta realización, estos pasos se pueden llevar a cabo utilizando un instrumento automatizado, tal como un dispositivo para llevar a cabo cualquiera de las técnicas anteriores. Tales dispositivos incorporarían medios de almacenamiento legibles por una máquina que comprenden instrucciones para hacer que el dispositivo lleve a cabo los pasos de determinación, comparación e identificación.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un medio de almacenamiento legible por una máquina que comprende un conjunto de instrucciones para hacer que un dispositivo que mide un metabolito lleve a cabo los pasos de determinación, comparación e identificación de cualquier realización de los métodos del primer, segundo y tercer aspectos de la invención. Tal como se emplea en la presente, la expresión "medio legible por ordenador" incluye discos magnéticos, discos ópticos, memoria orgánica y cualquier otro sistema de almacenamiento masivo volátil (p. ej., memoria de acceso aleatorio ("RAM", por sus siglas en inglés)) o no volátil (p. ej., memoria de solo lectura ("ROM", por sus siglas en inglés)) legible por el CPU. El medio legible por ordenador incluye un medio legible por ordenador cooperativo o interconectado que existe exclusivamente en el sistema de procesamiento o que se distribuye entre los múltiples sistemas de procesamiento interconectados que pueden ser locales o remotos respecto al sistema de procesamiento. Tal como se emplea en la presente, "dispositivo que mide un metabolito" se refiere a un dispositivo capaz de llevar a cabo las medidas del analito para llevar a cabo la invención incluidos, sin carácter limitante, los dispositivos cromatográficos (tales como los dispositivos de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), los dispositivos de cromatografía de gases (GC), los dispositivos de GC-espectrometría de masas (GC-MS), los dispositivos de cromatografía en capa fina (TLC), etc.), dispositivos de resonancia magnética nuclear (RMN), dispositivos espectroscópicos, dispositivos electroquímicos, dispositivos de detección inmunológica y dispositivos de electroforesis capilar.

Ejemplo de referencia 1: Incremento de la expresión del transportador de salida hepático en seres humanos diagnosticados con NASH

Se llevaron a cabo estudios para determinar si los pacientes que padecían NAFLD muestran un metabolismo y disposición alterados de acetaminofeno. Se obtuvieron muestras hepáticas humanas a partir de pacientes con un hígado normal, con esteatosis, con NASH con hígado graso y con NASH terminal (cirrosis criptogénica) del Liver Tissue Procurement and Distribution System financiado por la NIH (LTPADS).

Análisis de proteínas por inmunotransferencia. Se separaron lisados de células enteras (20 μg /pocillo) por SDS-PAGE en geles al 7.5% y se transfirieron a membranas de PVDF durante toda la noche a 30 miliamperios constantes. Se bloquearon todas las membranas durante una hora a temperatura ambiente con leche en polvo desnatada al 5% preparada en solución salina tamponada con fosfato con Tween 20 (PBST). A continuación se incubaron las membranas en una solución del anticuerpo primario (dilución 1:2000 en PBST-leche) constituida por anticuerpos anti-ABCC3, anti-ABCC4 monoclonales (Abcam, Cambridge, MA) o anti-GAPDH policlonales (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) durante toda la noche a 4 °C. Tras la incubación durante toda la noche, se incubaron las membranas en soluciones del anticuerpo secundario conjugado con HRP (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) durante una hora a temperatura ambiente. Se detectó la unión a los anticuerpos utilizando el kit ECL Advance Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ) según el protocolo del fabricante.

La **Figura 2** muestra la expresión de ABCC3 y ABCC4 hepáticos en seres humanos con NAFLD. Hubo poca variación en la expresión de ABCC3 y ABCC4 en hígados con esteatosis en comparación con hígado normal; sin embargo, hubo un incremento considerable en la expresión proteica en hígados humanos en cualquier etapa de NASH. Aunque previamente se consideraba que la expresión de estos transportadores en seres humanos poseía una gran variación entre los individuos, parece que la variación puede deberse en su mayor parte al estado de la enfermedad.

Ejemplo de referencia 2: La ubicación celular de ABCC2 está alterada en hígados humanos diagnosticados con NASH.

El tráfico celular alterado como un medio de regulación de la función de ABCC2 ha estado bien documentado en diversas condiciones tales como toxicidades inducidas por fármacos y embarazo. Un requisito para la actividad de ABCC2 es la ubicación correcta en la membrana canalicular. Desplazar el transportador ABCC2 lejos de la membrana canalicular y al interior de las vesículas de la membrana puede ser una ventaja evolutiva que permita a la célula regular rápidamente la actividad de transporte sin tener que esperar por el proceso relativamente lento de la

degradación proteica/síntesis *de novo*.

Tinción inmunohistoquímica. Resumiendo, los cortes histológicos de muestras hepáticas humanas incluidas en parafina y fijadas en formol se desparafinaron en xileno y se rehidrataron en etanol y a continuación se restauraron los antígenos en tampón citrato (pH 6.0). Se bloqueó la actividad peroxidasa endógena con H₂O₂ al 0.3% (v/v) en metanol durante 20 minutos. Se colocaron todos los portaobjetos en soportes para portaobjetos Shandon Sequenza™ (Thermo-Scientific, Waltham, MA) para las incubaciones restantes con el reactivo. Se bloqueó la tinción de fondo incubando todas las muestras en Background Sniper™ (Biocare Medical, Concord, CA) durante 10 minutos. A continuación se incubaron las muestras con un anticuerpo anti-MRP2 monoclonal de ratón durante toda la noche a 4 °C. El día siguiente, las muestras se incubaron con la sonda de ratón y el polímero HRP (Biocare Medical, Concord, CA) durante 15 minutos cada uno para detectar el anticuerpo unido. El cambio de color se llevó a cabo por incubación en Betazoid™ DAB (Biocare Medical, Concord, CA) durante 3 minutos seguido por la desactivación con agua desionizada. Todas las muestras se sometieron a una tinción de contraste con una solución de hematoxilina recién filtrada (Sigma-Aldrich, S. Luis, MO). Se obtuvieron imágenes de todos los portaobjetos con un microscopio Eclipse™ E4000 de Nikon y una cámara Exwave™ DXC-390 de Sony.

Tal como se observa en la **Figura 3** la proteína ABCC2 está ubicada en los bordes de la membrana canicular muy definidos en hígados procedentes de pacientes sanos normales, pero claramente se confunde con las vesículas de la membrana lejos de los canalículos en hígados con NASH. Este mecanismo del tráfico de ABCC2 lejos de su sitio de actividad permite al hepatocito regular y conservar componentes endógenos importantes de manera eficaz durante el estrés celular, a la vez que mantiene la expresión proteica. El tráfico celular alterado de ABCC2 a las vesículas de la membrana altera la disposición de APAP-GLUC para favorecer la retención plasmática más que el aclaramiento biliar.

Ejemplo 3: Los niveles de acetaminofeno-glucurónido son superiores en el plasma y la orina de pacientes pediátricos con NASH que en pacientes con esteatosis.

Se realizó un estudio en pacientes pediátricos cuyo estado de la enfermedad había sido verificado con una biopsia. Para el estudio preliminar se quisieron veinticuatro pacientes pediátricos (12-18 años) debido a la supuesta ausencia de factores de confusión (p. ej., consumo alcohólico, consumo ilícito de drogas) y a la creciente prevalencia de obesidad infantil. Por el contrario, los pacientes pediátricos están limitados en la cantidad de daño hepático real que puede tener lugar simplemente debido a la edad, en la que los pacientes pediátricos son incapaces de desarrollar degeneración vacuolar y se limitan al depósito de grasa, inflamación y fibrosis.

Análisis por cromatografía líquida de alta resolución. Se cuantificaron APAP y sus metabolitos en muestras de orina y plasma por cromatografía líquida de alta resolución basándose en métodos descritos previamente (Howie *et al.*, 1977a; Chen *et al.*, 2000; Slitt *et al.*, 2003d). Se resolvieron APAP y sus metabolitos utilizando una columna Zorbmax™ SB-C 18 de fase inversa, 4.6-mm x 25-cm con una precolumna Phenomenex™ Security Guard y se eluyó utilizando una fase móvil compuesta por un 12.5% de metanol de calidad HPLC, un 1% de ácido acético y un 86.5% de agua, que se utilizó de manera isocrática con un flujo de 1.2 mL/min. Se monitorizó la elución de los metabolitos a una longitud de onda de 254 nm. Los tiempos de retención de APAP y sus metabolitos se determinaron por comparación con los de patrones auténticos. Debido a que este método de HPLC no separa los conjugados de APAP con cisteinilglicina y cisteína, estos se cuantificaron conjuntamente como APAP-GC/CYS. Se analizaron las muestras utilizando un sistema de HPLC System Gold™ de Beckman (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA) equipado con un módulo de disolvente de 128 nm y un detector de 166 nm. La cuantificación se basó en las áreas de picos integradas. La concentración de APAP y sus metabolitos se calculó utilizando una curva patrón de APAP ya que los coeficientes de extinción molar de APAP y sus metabolitos conjugados son aproximadamente iguales (Howie *et al.*, 1977b). Para precipitar las proteínas en el plasma y la orina las muestras se diluyeron 1:2, 1:2 y 1:3 respectivamente con metanol enfriado con hielo y se centrifugaron a 4000 x g durante 30 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes resultantes se recogieron y diluyeron en fase móvil 1:3 (orina) o 1:2 (plasma) antes del análisis por HPLC.

La **Figura 4** muestra la concentración de APAP y sus metabolitos principales en plasma 1 hora después de la administración de APAP. En la Tabla 1 se muestran los datos referentes a la media y mediana.

Tabla 1

	Media (nmol/mL)	Mediana (nmol/mL)
Normal 1h	29.9	29.0
Normal 2h	54.3	48.9
Normal 3h	46.7	39.2
Esteatosis 1h	30.5	32.6
Esteatosis 2h	44.3	41.1

	Media (nmol/mL)	Mediana (nmol/mL)
Esteatosis 4h	35.5	35.3
NASH 1h	60.7	75.9
NASH 2h	72.7	66.4
NASH 4h	68.3	62.6

La concentración de APAP-GLUC en el plasma de pacientes con esteatohepatitis fue significativamente mayor que en los pacientes con una esteatosis simple en todos los puntos temporales medidos. Además, la Figura 5 muestra la concentración de APAP y los metabolitos de APAP en la orina de voluntarios sanos normales, pacientes con esteatosis y pacientes con esteatohepatitis. Las diferencias en los niveles de APAP-GLUC no son significativamente diferentes entre pacientes con NASH y otros grupos hasta las cuatro horas debido a las restricciones de tiempo de la producción de orina y vaciado de la vejiga, así como al requisito del metabolismo hepático y la posterior distribución al riñón. Estos datos indican claramente el potencial para desarrollar un análisis de sangre o un análisis de orina no invasivos para distinguir los pacientes con NASH de aquellos que simplemente tienen esteatosis.

5

10

Ejemplo 4. Los niveles de acetaminofeno-glucurónido son mayores en el plasma de pacientes pediátricos con fibrosis hepática que en pacientes sin fibrosis hepática

Las medidas de HPLC y otros detalles experimentales son tal como se describen en el Ejemplo 3; los datos se muestran en la Figura 6. La fibrosis hepática se caracterizó histológicamente como leve (deformidad cicatricial mínima alrededor de los vasos sanguíneos), moderada (deformidad cicatricial que se extiende hacia afuera desde los vasos sanguíneos hepáticos) o grave (deformidad cicatricial que forma puentes entre los vasos sanguíneos).

15

Ejemplo 5. Los niveles de acetaminofeno-glucurónido son mayores en el plasma de pacientes pediátricos con inflamación hepática que en pacientes sin inflamación hepática

Las medidas de HPLC y otros detalles experimentales son tal como se describen en el Ejemplo 3; los datos se muestran en la Figura 6. La inflamación hepática se caracterizó histológicamente como leve (menos de 2 focos de inflamación), moderada (2-4 focos de inflamación) o grave (más de 4 focos de inflamación).

20

REIVINDICACIONES

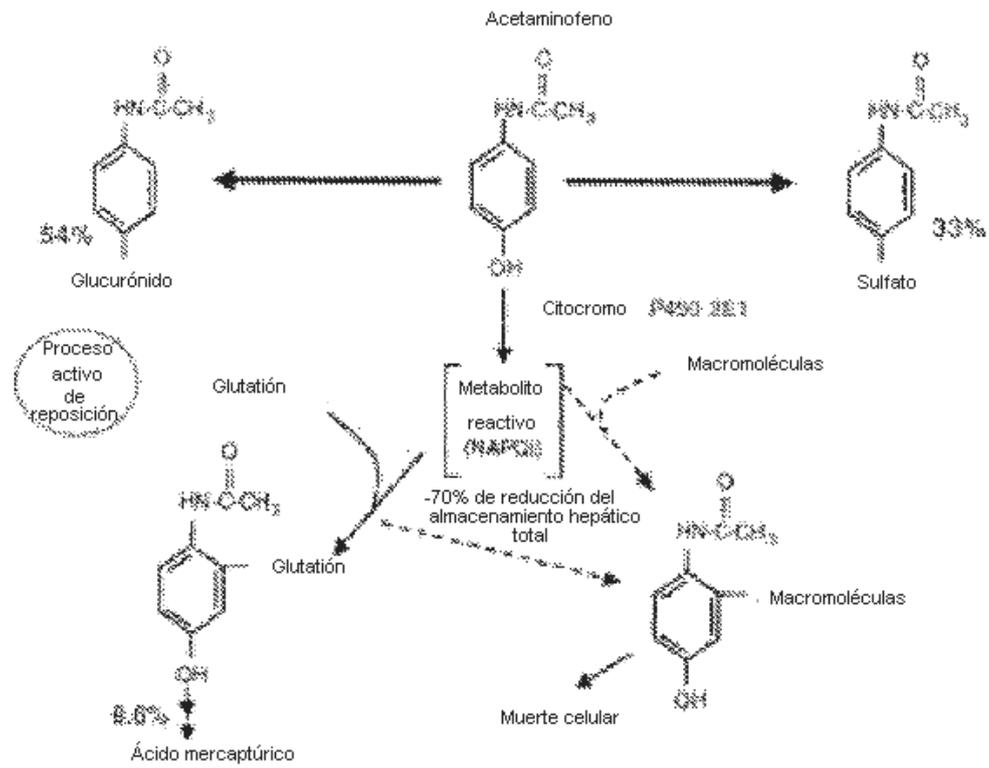
1. Un método para diagnosticar la esteatohepatitis no alcohólica (NASH) o fibrosis hepática en un ser humano, que comprende:
- 5 (a) determinar una cantidad de acetaminofeno (APAP)-glucurónido en una muestra de plasma y/o una muestra de orina obtenidas a partir de un sujeto humano después de que al sujeto humano se le haya administrado acetaminofeno (APAP), donde el sujeto humano está en riesgo de esteatohepatitis no alcohólica (NASH) o fibrosis hepática;
- 10 (b) comparar la cantidad de APAP-glucurónido en la muestra de plasma o en la muestra de orina o en ambas respecto a un control; e
- (c) identificar al sujeto humano como uno que padece esteatohepatitis no alcohólica (NASH) o fibrosis hepática si la cantidad de APAP-glucurónido en la muestra de plasma o en la muestra de orina o en ambas está elevada respecto al control.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, donde el sujeto humano en riesgo de NASH padece una o más de las siguientes enfermedades: enfermedad del hígado graso no alcohólica; síndrome metabólico, obesidad, dislipidemia, resistencia a la insulina y diabetes.
3. El método de la reivindicación 1, donde el sujeto humano en riesgo de fibrosis hepática padece, o ha padecido previamente, una o más de las afecciones seleccionadas a partir del grupo constituido por la deficiencia de α_1 -antitripsina, enfermedad de Wilson, fructosemia, galactosemia, enfermedades de almacenamiento de glucógeno de tipo III, IV, VI, IX y X, hemocromatosis, enfermedad de Gaucher, síndrome de Zellweger, tirosinemia, infección bacteriana, infección vírica, parasitosis, síndrome de Budd-Chiari, alcoholismo, drogadicción, insuficiencia cardíaca, enfermedad venooclusiva hepática y flebotrombosis portal.
- 20 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la cantidad de APAP-glucurónido se mide en una muestra de plasma, y donde se realiza una medida entre 1 minuto y 180 minutos tras la administración de APAP, o donde la cantidad de APAP-glucurónido se mide en una muestra de orina, y donde se realiza una medida entre 120 minutos y 480 minutos tras la administración de APAP.
- 25 5. Un método para identificar a un sujeto humano en riesgo de una reacción farmacológica adversa, que comprende:
- (a) determinar una cantidad de acetaminofeno (APAP)-glucurónido en una muestra de plasma y/o una muestra de orina obtenidas a partir de un sujeto humano después de que al sujeto humano se le haya administrado acetaminofeno (APAP), donde el sujeto humano necesita el tratamiento con un fármaco terapéutico seleccionado a partir del grupo constituido por doxorubicina, morfina, cisplatino, ectopósido, metotrexato, fármacos conjugados glucuronidados, fármacos conjugados con glutatión y fármacos conjugados con sulfato;
- 30 (b) comparar la cantidad de APAP-glucurónido en la muestra de plasma o en la muestra de orina o en ambas respecto a un control; e
- 35 (c) identificar al sujeto humano como uno en riesgo de una reacción farmacológica adversa si la cantidad de APAP-glucurónido en la muestra de plasma o en la muestra de orina o en ambas está elevada respecto al control.
- 40 6. Un método para determinar una dosificación apropiada de un fármaco terapéutico seleccionado a partir del grupo constituido por doxorubicina, morfina, cisplatino, ectopósido, metotrexato, fármacos conjugados glucuronidados, fármacos conjugados con glutatión y fármacos conjugados con sulfato para un sujeto humano, que comprende:
- (a) determinar una cantidad de acetaminofeno (APAP)-glucurónido en una muestra de plasma y/o una muestra de orina obtenidas a partir de un sujeto humano después de que al sujeto humano se le haya administrado acetaminofeno (APAP), donde el sujeto humano necesita el tratamiento con un fármaco terapéutico seleccionado a partir del grupo constituido por doxorubicina, morfina, cisplatino, ectopósido, metotrexato, fármacos conjugados glucuronidados, fármacos conjugados con glutatión y fármacos conjugados con sulfato;
- 45 (b) comparar la cantidad de APAP-glucurónido en la muestra de plasma o en la muestra de orina o en ambas respecto a un control; y
- 50 (c) determinar que el sujeto humano debería recibir una dosificación no habitual del fármaco si la cantidad de APAP-glucurónido en la muestra de plasma o en la muestra de orina o en ambas está elevada respecto al

control.

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la cantidad de APAP-glucurónido se mide en una muestra de plasma, y donde se realiza una medida entre 1 minuto y 180 minutos tras la administración de APAP.
- 5 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la cantidad de APAP-glucurónido se mide en una muestra de orina, y donde se realiza una medida entre 120 minutos y 480 minutos tras la administración de APAP.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde se administran entre 250 mg y 1000 mg de APAP al sujeto humano.
- 10 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde los pasos de determinación, comparación e identificación están automatizados.
11. Un medio de almacenamiento legible por una máquina que comprende un conjunto de instrucciones para hacer que un dispositivo que mide un metabolito lleve a cabo los pasos de determinación, comparación e identificación de cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

15

Figura 1. Metabolismo de acetaminofeno



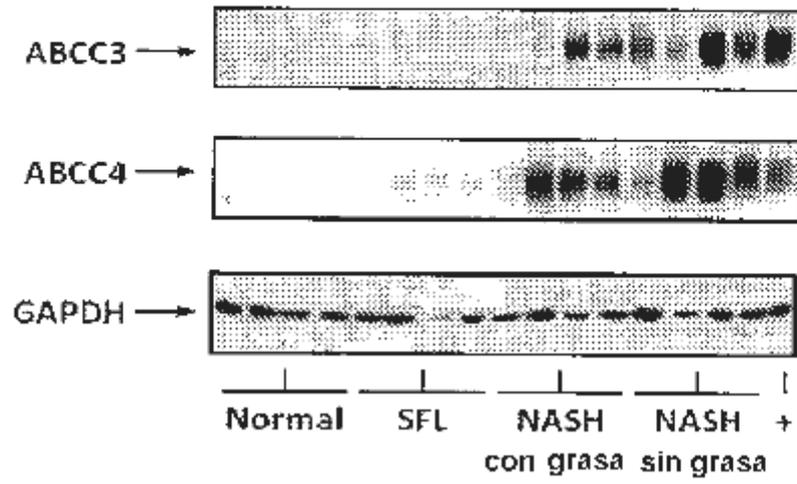


Figura 2



Figura 3A

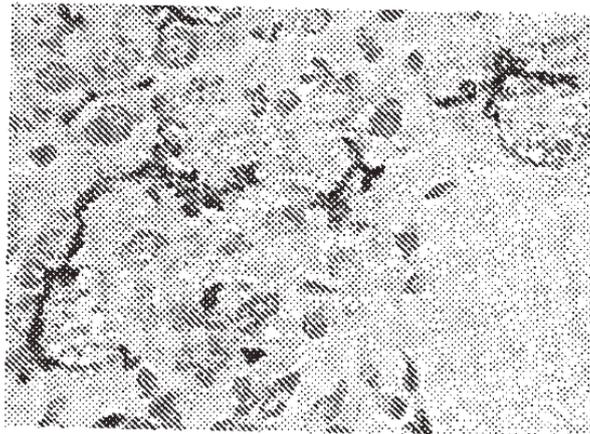


Figura 3B

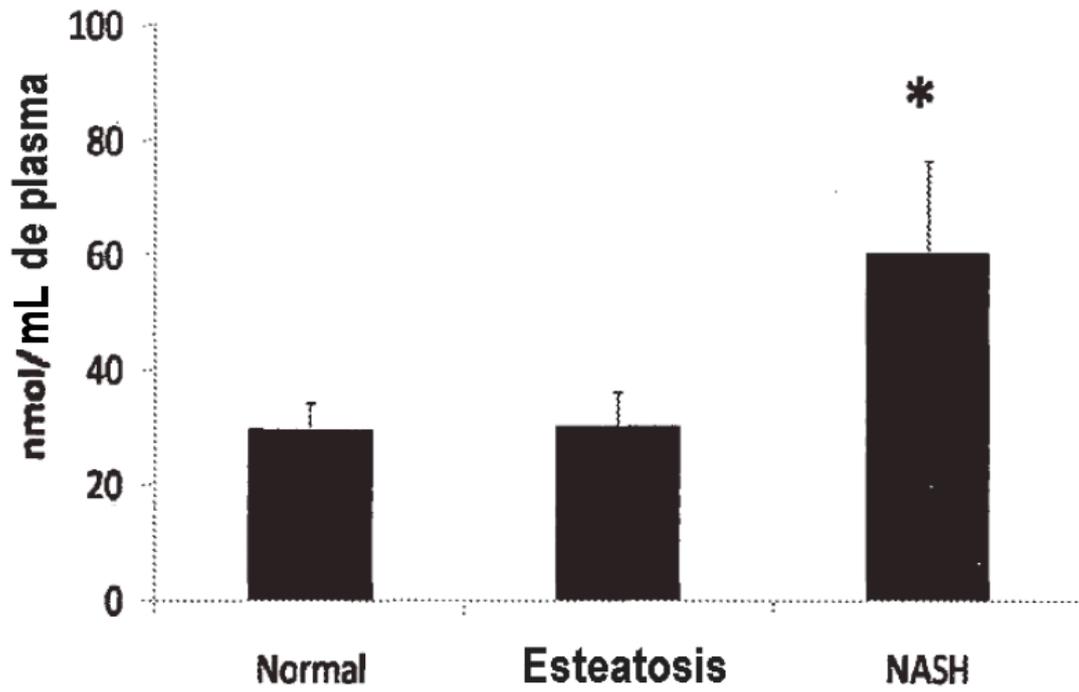


Figura 4

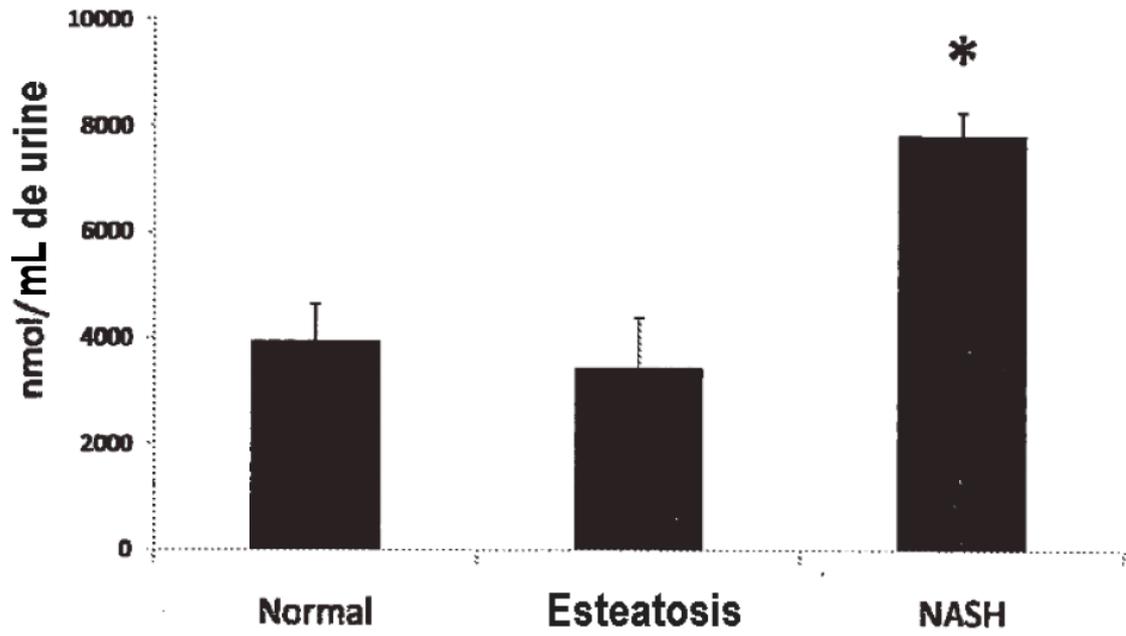


Figura 5

Figura 6: APAP-Gluc en plasma

