

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 570 570**

51 Int. Cl.:

B01D 61/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2011** **E 11706799 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016** **EP 2539051**

54 Título: **Método para determinar la constante de unión de compuestos de alta afinidad**

30 Prioridad:

25.02.2010 EP 10154696

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

19.05.2016

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

ASSMUS, FRAUKE y
FISCHER, HOLGER

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 570 570 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

Método para determinar la constante de unión de compuestos de alta afinidad

5 El éxito de un compuesto como fármaco no sólo depende de su potencia, sino del equilibrio óptimo entre la concentración del fármaco, las interacciones farmacológicas, la seguridad, la farmacocinética y los costes de producción.

10 Antes de que el compuesto pueda resultar eficaz en el receptor, influyen considerablemente su liberación, absorción y distribución. Únicamente un fármaco libre (no unido) puede resultar eficaz sobre el receptor. En el caso de que el fármaco se una con fuerza excesiva a proteínas, podría reducirse la intensidad de su respuesta farmacológica y también podría presentar un efecto sobre el volumen de distribución, la metabolización y la eliminación del fármaco.

15 Resulta esencial maximizar la generación de una tabla de datos in vitro mediante cribados ADME de alto rendimiento (A=absorción, D=distribución, M=metabolismo, E=excreción) a fin de obtener información para el químico para encontrar una sustancia con las mejores propiedades físico-químicas y para entender la relación entre estructura química y parámetros físico-químicos.

20 Un método conocido para determinar la unión de las proteínas es, por ejemplo, una diálisis de equilibrio tal como se indica en Kratochwil et al. (Biochem. Pharmacol. 64(9):1355-74, 1 de nov. de 2002) El punto de partida de dicho método son dos cámaras, una cámara para muestras y una cámara para proteínas, las cuales están separadas por una membrana semipermeable. Se selecciona el nivel de corte de peso molecular (NCPM) de la membrana de manera que la sustancia de ensayo pueda permear pero la macromolécula (por ejemplo la proteína) resulte retenida. Se introduce en la cámara para muestras una concentración y volumen conocidos de la sustancia de ensayo. A
25 continuación, se introduce una concentración conocida de la proteína en la cámara para proteínas en un volumen equivalente al de la sustancia en la cámara para muestras. Debido a que la sustancia de ensayo se difunde a través de la membrana, una parte se unirá a la proteína y una parte se mantendrá libre en solución. Cuanto más baja sea la afinidad de la interacción, más alta será la concentración de la sustancia de ensayo que se mantendrá no unida en cualquier tiempo dado. La difusión de la sustancia de ensayo a través de la membrana y la unión de la sustancia de
30 ensayo continuará hasta alcanzar el equilibrio. En el equilibrio, la concentración del compuesto de ensayo libre en solución es la misma en ambas cámaras. Sin embargo, en la cámara para proteínas, la concentración total de la sustancia de ensayo es más alta debido a la sustancia de ensayo unida (en el caso de que el compuesto de ensayo se una a la proteína). La concentración de sustancia de ensayo libre en la cámara para muestras seguidamente puede utilizarse para determinar las características de unión del compuesto de ensayo.

35 Otro método es la utilización de la tecnología de BIAcore, en la que uno de la pareja de unión se inmoviliza sobre un chip sensor. El otro componente de la pareja de unión fluye por el chip que se ha introducido en una microcelda. La detección de la unión se basa en el fenómeno de la "resonancia del plasmón superficial" (RPS), pequeños cambios en la reflexión de la luz monocromática de un chip metálico que se producen al unirse una proteína u otra molécula a la superficie del chip.

40 Sin embargo, ninguno de dichos métodos resulta adecuado para determinar la capacidad de unión a proteínas de sustancias de alta afinidad en un ensayo de alto rendimiento, ya que no resulta posible diferenciar entre una unión de 99% y de 99,99% con un alto rendimiento de sustancias. El motivo es que la concentración de la sustancia de ensayo libre, que es lo analizado finalmente, es excesivamente baja para ser cuantificada.

50 Con fármacos de alta afinidad, pequeños cambios en la cantidad de sustancias unidas pueden producir una influencia profunda sobre la fracción libre en el cuerpo (ver la tabla, posteriormente) e influir de esta manera sobre el efecto y los efectos secundarios. Por lo tanto, resulta muy importante realizar una medición dentro de este mismo intervalo.

Ejemplo con una diferencia de 4%:

Unión al 99% → al 95%	1% libre → 5% libre	Factor 5
Unión al 80 % → al 76 %	20 % libre → 24 % libre	Factor 1,2

55 Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para determinar la constante de unión de un compuesto de alta afinidad de interés a proteínas, comprendiendo las etapas siguientes:

60 a) adición del compuesto de alta afinidad a un sistema de dos cámaras, en el que las dos cámaras están separadas por una membrana que es permeable al compuesto de interés, y determinación de la cantidad del compuesto de alta afinidad de interés en una de las cámaras tras alcanzarse el equilibrio de distribución,

b) adición de un compuesto sumidero a una de las cámaras (cámara sumidero), en el que el compuesto sumidero es una sustancia que reduce significativamente la afinidad del compuesto de interés para una proteína no específica; dicha proteína no específica se une a un amplio abanico de compuestos y el compuesto sumidero no permea la

membrana, y determinación del coeficiente de distribución del compuesto de interés respecto al compuesto sumidero tras alcanzarse el equilibrio de distribución,

- 5 c) adición de una proteína no específica a la otra cámara (cámara de proteínas), en la que la proteína no específica no puede permear la membrana, y determinación del coeficiente de distribución del compuesto de interés respecto a la proteína no específica en presencia de un compuesto sumidero tras alcanzarse el equilibrio de distribución, y
 d) determinación de la constante de unión del compuesto de unión con el coeficiente de distribución de las etapas b) y c).

10 Las etapas a), b) y c) pueden llevarse a cabo consecutivamente, o pueden llevarse a cabo en paralelo (ver la figura 3). Por lo tanto, la presente invención proporciona además un método para determinar la constante de unión de un compuesto de alta afinidad de interés a proteínas, comprendiendo las etapas siguientes:

15 a) provisión de sistemas de dos cámaras para el rendimiento en paralelo, en los que las dos cámaras de cada sistema están separadas por una membrana que es permeable al compuesto de interés, y adición del compuesto de alta afinidad a un sistema de dos cámaras, y determinación de la cantidad del compuesto de alta afinidad de interés en una de las cámaras tras alcanzarse el equilibrio de distribución,

20 b) adición de un compuesto de alta afinidad y un compuesto sumidero a una de las cámaras de un segundo sistema de cámaras (cámara sumidero), en el que el compuesto sumidero es una sustancia que reduce significativamente la afinidad del compuesto de interés para una proteína no específica; dicha proteína no específica se une a un amplio abanico de compuestos y el compuesto sumidero no permea la membrana, y determinación del coeficiente de distribución del compuesto de interés respecto al compuesto sumidero tras alcanzarse el equilibrio de distribución,

25 c) adición de una proteína de alta afinidad y un compuesto sumidero a una de las cámaras de un tercer sistema de cámaras (cámara sumidero) y adición de una proteína no específica a la otra cámara (cámara de proteínas), en la que la proteína no específica no puede permear la membrana, y determinación del coeficiente de distribución del compuesto de interés respecto a la proteína no específica en presencia de un compuesto sumidero tras alcanzarse el equilibrio de distribución, y

30 d) determinación de la constante de unión del compuesto de unión con el coeficiente de distribución de las etapas b) y c),

en el que las etapas a), b) y c) se llevan a cabo en paralelo.

Además, la presente solicitud proporciona la utilización de un compuesto sumidero para determinar la constante de unión de un compuesto de ensayo de alta afinidad.

35 Un compuesto sumidero es una sustancia que reduce significativamente la afinidad de sustancias de ensayo de alta afinidad para una proteína no específica. La expresión reduce significativamente la afinidad se refiere a que la diferencia entre la cantidad de sustancia de ensayo unida y la cantidad de proteína no específica en presencia y en ausencia del compuesto sumidero es estadísticamente relevante ($p \leq 0,05$, preferentemente $p \leq 0,01$). Con el fin de evitar que el compuesto sumidero cruce la membrana pero permitir que el compuesto de ensayo sí la pase, el tamaño del compuesto de ensayo preferentemente es mayor en un factor de 2 al tamaño del compuesto de ensayo. Preferentemente, el compuesto sumidero es un agente acomplejante. Más preferentemente, el compuesto sumidero es polivinilpirrolidona (PVP), más preferentemente, el compuesto sumidero es polivinilpirrolidona K-25 (PVP 25, PVP K-25). Para el fin del método anteriormente indicado, puede utilizarse una combinación de compuestos sumidero, por ejemplo PVP y ciclodextrina.

45 La expresión "compuesto de alta afinidad" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un compuesto para el que, bajo condiciones fisiológicas y en presencia de un exceso de proteína plasmática (por ejemplo albúmina), por lo menos 95% de la cantidad total del mismo se encuentra unida a dicha proteína plasmática (=como máximo 5% de la cantidad de dicho compuesto se encuentra en forma libre). Preferentemente, por lo menos 97% se encuentra unido, más preferentemente por lo menos 98%, y todavía más preferentemente por lo menos 99% se encuentra presente en forma unida. Las condiciones fisiológicas se definen como pH 7,0 y 37°C. En términos de la presente invención, un compuesto de alta afinidad o un compuesto de ensayo es preferentemente un fármaco.

50 La expresión "sustancia de ensayo" o "compuesto de ensayo", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un compuesto de alta afinidad.

La expresión "constante de unión" se refiere a una constante que describe la afinidad de unión entre dos moléculas en el equilibrio. Describe el estado de equilibrio entre sustancia de ensayo libre y unida.

60 La expresión "sustancia unida" o "compuesto unido" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una sustancia o compuesto que se encuentra unido a una proteína (en particular a una proteína no específica) o al compuesto sumidero. La expresión "fracción ocupada" se refiere a la fracción de compuestos de ensayo que se encuentra unida. En otras palabras, es la proporción entre la cantidad de compuesto de ensayo unida en el equilibrio a un compuesto sumidero ($C_{\text{sustancia de ensayo unida}}$) y la cantidad total de compuesto de ensayo ($C_{\text{sustancia de ensayo total}}$).

65

$$\text{Fracción ocupada} = \text{Fracción unida} = \frac{C_{\text{sustancia de ensayo unida}}}{C_{\text{sustancia de ensayo total}}}$$

5 Una proteína no específica se une, en contraste con una proteína específica, a un amplio abanico de compuestos (unión no selectiva). Las proteínas no específicas son, en particular, proteínas del plasma, tales como, por ejemplo, albúmina sérica y glucoproteína ácida α_1 . Preferentemente, la proteína no específica es albúmina sérica humana (ASH).

10 La membrana utilizada en el método de la presente invención es una membrana semipermeable. Una membrana semipermeable es una membrana que permite que una especie seleccionada de moléculas pase a su través mediante difusión. Las membranas semipermeables para el ensayo anteriormente indicado puede ser cruzadas por el compuesto de alta afinidad (y el tampón) pero no por el compuesto sumidero o la proteína no específica. Preferentemente, la membrana semipermeable es una membrana selectiva para tamaños.

15 Las membranas semipermeables pueden caracterizarse utilizando el nivel de corte de peso molecular (NCPM). Preferentemente, el NCPM es aproximadamente la mitad del peso molecular del compuesto sumidero o de la proteína no específica, el que sea más bajo. También resulta preferente una proporción de entre 22 y 27 entre los pesos moleculares de la sustancia de ensayo y el compuesto sumidero o la proteína no específica, el que sea más bajo. Más preferentemente, la proporción es de aproximadamente 25. Las membranas adecuadas para los métodos de la presente invención se encuentran disponibles comercialmente, por ejemplo membranas de diálisis.

20 Preferentemente, la concentración de proteína no específica utilizada en el ensayo corresponde a la concentración de la proteína in vivo. Para la ASH, la concentración fisiológica es de aproximadamente 60 mM.

25 La concentración del compuesto sumidero para un rendimiento óptimo del método de la invención puede determinarse poniendo en práctica el método de la invención con diferentes concentraciones del compuesto sumidero (es decir, la dilución en serie).

30 El ensayo se lleva a cabo en un sistema de dos cámaras, en el que las dos cámaras se encuentran separadas por una membrana semipermeable. La permeabilidad de la membrana se selecciona de manera que la sustancia de ensayo pueda pasar a través de la membrana pero no el compuesto de ensayo ni tampoco la proteína no específica.

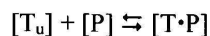
35 Las mediciones del método de la invención (etapas a), b) y c) pueden llevarse a cabo en paralelo (ver la figura 3) o consecutivamente. Preferentemente las mediciones se llevan a cabo en paralelo. A continuación se describe una realización preferente: para el experimento de referencia (etapa a) del método anteriormente indicado, se añade el compuesto de interés a una de las cámaras (ver la figura 2B) y se determina la distribución del compuesto en dicho sistema tras alcanzarse el equilibrio de la distribución, en el que la masa del compuesto en por lo menos una de las cámaras se determina tras alcanzarse el equilibrio de la distribución.

40 Para el experimento de unión 1 (etapa b) del método anteriormente indicado, se añade el compuesto de interés y el compuesto sumidero a la cámara en un sistema de dos cámaras diferente del utilizado para llevar a cabo el experimento de referencia (ver también la figura 2B). Tras alcanzarse el equilibrio del sistema de unión, se mide la cantidad de compuesto de alta afinidad en la cámara sin el compuesto sumidero (cámara de proteínas) y se determina el coeficiente de distribución del compuesto de interés respecto al compuesto sumidero.

45 Para el experimento de unión 2 (etapa d) del método anteriormente indicado, se añade el compuesto de interés y el compuesto sumidero a la cámara (cámara sumidero) en un sistema de dos cámaras diferente del utilizado para llevar a cabo el experimento de referencia o de unión (ver la figura 2C) y se añade una proteína no específica a la cámara sin compuesto sumidero (cámara de proteínas). Tras alcanzarse un equilibrio, se mide la cantidad de sustancia de ensayo libre (no unida al compuesto sumidero) en la cámara sumidero y se determina el coeficiente de distribución del compuesto de interés respecto a la proteína no específica en presencia del compuesto sumidero.

La constante de unión del compuesto de alta afinidad se determina de la manera siguiente:

55 la unión de un compuesto de ensayo a una proteína no específica es un proceso reversible que puede describirse mediante el equilibrio siguiente (Lindup W.E., Plasma protein binding of drugs -some basic and clinical aspects, in Progress in Drug Metabolism, L.F.C. J.W. Bridges, G.G. Gibson, Editor 1987. páginas 141 a 185).



$$K_p = \frac{[T \cdot P]}{[T_u] * [P]}$$

60 [P] = concentraciones de la proteína no específica

[T_u] = concentraciones del compuesto de ensayo no unido a proteína no específica.

K_P = Constante de unión del compuesto de ensayo a la proteína no específica

[T•P] = concentración de compuesto de ensayo unido a proteína no específica tras alcanzarse el equilibrio

- 5 La constante de unión K_P puede convertirse en fracción no unida *f_u* utilizando la fórmula a continuación, derivada de la ley de masas:

$$f_u = 1 - f_b = \frac{100}{1 + K_P * [P]} \quad (1)$$

- 10 *f_b* = fracción de compuesto de ensayo unida a la proteína no específica

La constante de unión a proteína no específica (K_P) (2) puede calcularse a partir de la combinación de coeficientes de división respecto a compuesto de ensayo (DC_{sumidero}) (3) y respecto a la proteína no específica en presencia del compuesto sumidero (DC_{P'}) (3).

15

$$K_P = DC_{sumidero} * DC_{P'} \quad (2)$$

Del estudio de unión I (con compuesto sumidero, fib. 2B):

$$DC_{sumidero} = \frac{[T - Sumid.]}{[T_{u(sumidero)}]} = \frac{m_{Tb(sumid.)}}{m_{u(sumid.)}} * \frac{V_{total} - V_{sumid.}}{V_{sumid.}} = \frac{m_{T(ref)} - m_{Tu(sumid.)}}{m_{Tu(sumid.)}} \quad (3)$$

20

m_{T(ref)} = Masa de compuesto de ensayo en equilibrio, en ausencia del compuesto sumidero y la proteína no específica (medida en una de las cámaras)

m_{Tu(sumid.)} = Masa de compuesto de ensayo no unido en el equilibrio, en presencia del compuesto sumidero

25

Del estudio de unión II (sistema con compuesto sumidero y compuesto de alta afinidad, fib. 2C):

$$DC_{P'} = \frac{[T - P']}{[T_{u(sumid.)}]} = \frac{m_{Tb(P')}}{m_{Tu(P')}} * \frac{V_{total} - V_P}{V_P} = \frac{m_{T(ref)} - m_{Tu(P')}}{m_{Tu(P')}} \quad (4)$$

- 30 [T•P'] = Concentración de compuesto de ensayo unido a proteína no específica en presencia del compuesto sumidero

[T-Sumid.] = Concentración de compuesto de ensayo unido al compuesto sumidero

m_{Tb(P')} = Masa de compuesto de ensayo unido a la proteína no específica en el equilibrio, en el sistema con el compuesto sumidero y la proteína no específica

- 35 m_{Tu(P')} = Masa de compuesto de ensayo no unido a la proteína no específica en el equilibrio en el sistema con el compuesto de ensayo y la proteína no específica

V_{total} es el volumen total en la cámara de diálisis (p.ej. 200 ml)

V_P es el volumen de proteína no específica

V_{sumid.} es el volumen de compuesto sumidero

- 40 Los volúmenes pueden calcularse a partir de la densidad y masa del material aplicado
V = masa/densidad (por ejemplo la densidad de la albúmina sérica humana: ρ_{ASH} = 1,4 g/cm³, densidad de PVP25: ρ_{PVP} = 1,2 g/cm³).




- 45 La cantidad de sustancia de ensayo libre y/o unida puede determinarse espectrofotométricamente de manera directa en un espectrofotómetro o tras la separación en un sistema de HPLC.

- 50 Para todos los experimentos de referencia y de unión, los sistemas de cámaras preferentemente se incuban bajo temperatura ambiente y presión normal (por ejemplo durante la noche (aproximadamente 12 horas)). Para acelerar la consecución del equilibrio, la cámara puede agitarse (preferentemente durante aproximadamente 1-3 horas, más preferentemente durante 1 a 2 horas, todavía más preferentemente durante aproximadamente 1 hora).

- 55 En una realización preferente, el método de la presente invención se lleva a cabo en paralelo en una placa que comprende una pluralidad de sistemas de dos cámaras. Estos ensayos ejecutados en paralelo pueden ser idénticos o pueden diferir, por ejemplo en la identidad o la concentración del compuesto de alta afinidad.

Tras la descripción general de la presente invención, ésta se entenderá mejor haciendo referencia a los ejemplos específicos, los cuales se incluyen en la presente memoria únicamente con fines ilustrativos y no pretenden ser limitativos, a menos que se indique lo contrario, en relación a las figuras siguientes.

Figuras:

- 5 La figura 1 muestra un sistema de cámaras de diálisis que consiste de 10 barras de Teflon™ en las que 8 de las barras de Teflon™ presentan 12 orificios perforados en cada sitio y dos presentan 12 orificios perforados en un lado (figura 1A). Dichos orificios perforados presentan la forma de un semicilindro (ver la figura 1B) de manera que dos barras conjuntamente forman una fila de 12 pocillos cilíndricos (filas A a I). Entre las barras de Teflon™ se insertan membranas semipermeables (M) de manera que cada pocillo cilíndrico está dividido en dos cámaras semicilíndricas. Las 10 barras de Teflon™ con las membranas se ensamblan con dos ejes conectores de acero inoxidable (R).
- 10 La figura 2 muestra el sistema de cámaras de diálisis durante un ensayo. La cámara comprende dos cámaras (cámara 1, cámara 2) que se separan mediante una membrana M. La membrana selectiva para el tamaño M separa las dos cámaras y es permeable al compuesto de ensayo pero no al compuesto sumidero o a la proteína no específica. Compuesto de ensayo: ; proteína no específica: ; el compuesto sumidero: . La cámara en un círculo indica la cámara de la que se extrae una muestra para la medición. La figura 2A) muestra una representación esquemática de la situación en el sistema de cámaras bajo las condiciones de referencia, en la que el compuesto de ensayo se distribuye uniformemente en el sistema de cámaras. La figura 2B) muestra una representación esquemática de la situación en el sistema de cámaras con el compuesto de ensayo y el compuesto sumidero. El compuesto de ensayo y el compuesto sumidero se añaden a la cámara 1 e influyen sobre la distribución del compuesto de ensayo ya que sólo el compuesto de ensayo no unido puede cruzar la membrana. La figura 2C) muestra una representación esquemática de la situación en el sistema de cámaras con el compuesto de ensayo, el compuesto sumidero y la proteína no específica. El compuesto de ensayo y el compuesto sumidero se añaden a la cámara 1 y la proteína no específica se añade a la cámara 2. El compuesto sumidero reduce la cantidad de compuesto de ensayo no unido disponible para la proteína no específica. La figura 2D) muestra una representación esquemática de la situación en el sistema de cámaras con un ensayo de la técnica anterior. Un porcentaje elevado del compuesto de ensayo se encuentra unido a la proteína no específica.
- 15 La figura 3 muestra una representación esquemática del método de la presente solicitud realizada en paralelo en 3 sistemas de dos cámaras.
- 20 La figura 4 muestra la estructura química de beta-hidroxipropil-ciclodextrina (A) y de un monómero polivinilpirrolidona (B).
- 25 La figura 5 muestra una comparación entre la fracción ocupada de un compuesto de ensayo (warfarina, diclofenac) con el compuesto sumidero PVP 25 y la fracción ocupada de los compuestos de ensayo con una combinación de compuestos sumidero (beta-hidroxipropil-ciclodextrina, PVP25). Eje X: concentración de compuesto de ensayo no unido en el equilibrio, en mM; eje y: concentración de compuesto de ensayo unido. -■- Warfarina con PVP25; -▲- diclofenac con PVP25; ♦ Warfarina con PVP25 y β-hidroxipropil-ciclodextrina (- - Lineal), ▲ Diclofenac con PVP25 y β-hidroxipropil-ciclodextrina; (..... Lineal).
- 30 La figura 6 muestra una representación gráfica de la fracción ocupada de carvedilol con una combinación de compuestos sumidero (beta-hidroxipropil-ciclodextrina, PVP25). Eje X: concentración de compuesto no unido carvedilol en el equilibrio, en mM; eje y: concentración de compuesto de ensayo unido. ♦ Carvedilol PVP 25 con β-hidroxipropil-ciclodextrina
- 35 La figura 7 muestra una representación gráfica de la fracción ocupada de compuestos de ensayo (diclofenac, warfarina, carvedilol, naproxeno, proxicam y glibenclamida) con el compuesto sumidero PVP25. Eje x: concentración de carvedilol, en mM; eje y: fracción ocupada de carvedilol, en % (cantidad del compuesto de ensayo unido en relación a compuesto sumidero). ♦ Diclofenac con PVP25 (.....Lineal); • warfarina, con PVP (- -Lineal); ▲ carvedilol, con PVP 25 (- -Lineal), X Naproxeno con PVP25 (- -Lineal); * Piroxicam con PVP25 (-Lineal); • Glibenclamida con PVP25 (..... Lineal).
- 40 La figura 8 muestra una representación gráfica de la fracción ocupada de compuestos de ensayo (diclofenac, warfarina, carvedilol, naproxeno, proxicam y glibenclamida) con el compuesto sumidero PVP25 en presencia de albúmina de suero humano (ASH). Eje x: concentración de carvedilol, en mM; eje y: fracción ocupada de carvedilol, en % (cantidad del compuesto de ensayo unido en relación a compuesto sumidero). ♦ Diclofenac con PVP25 (.....Lineal); ■ warfarina, con PVP (Linear); ▲ Carvedilol, con PVP 25 (- - Lineal), X Naproxeno con PVP25 (- Lineal); * Piroxicam con PVP25 (- - - Lineal); • Glibenclamida con PVP25 (-Lineal).
- 45 La figura 9 muestra una representación gráfica de la distribución de la clorpromazina (A), el diclofenac (B), el piroxicam (C), el naproxeno (D), la warfarina (E) y la glibenclamida (F) respecto a ASH en presencia de PVP25 (■) y respecto a PVP25 (▲)
- 50 La figura 10 muestra una representación gráfica de la constante de unión determinada con el método de la presente invención en comparación con los valores de la literatura.

65

Ejemplos:

Se utilizaron reactivos disponibles comercialmente a los que se hace referencia en los ejemplos, siguiendo las instrucciones del fabricante, a menos que se indique lo contrario.

5

Ejemplo 1: Materiales y métodos

1.1 Cámaras de diálisis

10 Se utilizó una cámara Device HTD 96 de diálisis Micro-Equilibrium de 96 pocillos reutilizable para los experimentos indicados posteriormente. El sistema de cámaras consistía de 10 barras de Teflon™, en las que las membranas semipermeables (ver 1.2 Membranas) se introdujeron entre dos barras de Teflon™, formando cada una dos compartimientos en cada pocillo.

15 El bloque con Teflon™ ensamblado se insertó en un marco de acero. Para garantizar el sellado entre pocillos individuales, las barras se apretaron entre sí con una placa de acero. Dicha placa de acero impuso una contrapresión con 8 muelles de disco sobre las barras de Teflon™.

20 Antes de cada experimento se lavaron las barras de Teflon™ mediante enjuague cuatro veces en etanol.

1.2 Membranas

• NCPM

25 A continuación se sometieron a ensayo los NCPM en dependencia del aditivo:

Aditivo	[kDa]
Agente micelar	6-8; 12-14
Ciclodextrina	1
PVP	3,5
Mezcla de PVP-ciclodextrina	1

• Material de la membrana

30 A) Tiras de membrana de diálisis HTD 96 (celulosa regenerada) con NCPM de 6 a 8 kDa (HTDialysis, LLC, nº de catálogo 1103) y NCPM de 12 a 14 kDa (HTDialysis, LLC, nº de catálogo 1101).

Las membranas anteriormente indicadas se hidrataron con agua desionizada durante 60 minutos. A continuación, se trataron durante 20 minutos con etanol al 20% y después se enjuagaron dos veces con agua desionizada.

35 B) Spektra/Por 6 (celulosa regenerada) con NCPM de 1 kDa (Spectrum Laboratories, nº de catálogo 132640, 45 mm de ancho plano/10 m de longitud) y con NCPM de 3,5 kDa (Spectrum Laboratories, nº de catálogo: 132592, 45 mm de ancho plano/10 m de longitud)

Eliminación de metales pesados:

40 Solución de lavado de metales pesados que comprende EDTA (Spektrum, nº de cat. 132908); 1 parte de solución de lavado + 9 partes de H₂O destilada.

45 A continuación, 1 h de lavado seguido de 5 min. en H₂O destilada.

Eliminación de sulfuros al 0,1%:

Solución de lavado de sulfuros A (=sulfito de Na) y B (=ácido sulfúrico al 0,4%) (Spektrum, nº de cat.: 132 906).

50 A 80°C las membranas se lavaron con una solución que comprendía 2 partes de H₂O dest. + 1 parte de solución A. A continuación, las membranas se lavaron en H₂O caliente a 60°C durante 2 min.). A continuación, las membranas se lavaron en una solución que comprendía 100 partes de agua y 4 partes de solución B y después se lavaron en agua destilada durante algunos minutos.

55 Alternativamente se utilizaron membranas prelavadas.

C) Spektra/Por 7 (celulosa regenerada) NCPM: 3,5 kDa (Spektrum Laboratories, nº de catálogo: 132111, 45 mm de ancho plano/5 m de longitud)

60 Las membranas se lavaron en agua destilada.

1.3 Compuestos sumidero**A) Ciclodextrina (figura 3):**

5 La condición para la utilización de ciclodextrina es que el peso molecular sea superior al NVPM de la membrana utilizada, con el fin de garantizar que el compuesto sumidero se separe de la cámara sumidero.

Se utilizaron las ciclodextrinas siguientes:

- 10
- beta-hidroxipropil-ciclodextrina
 - gamma-ciclodextrina.

B) Polivinilpirrolidona PVP (figura 4)

15 PVP (Polyvidon, Povidon, Povidonum), homopolímero de N-vinilpirrolidona

El peso molecular habitualmente se expresa como el valor K. El peso molecular es dependiente del grado de polimerización (aprox. 2.500-3.000.000 daltons).

20 Los experimentos se llevaron a cabo con PVP25 (PVP K-25) con un peso molecular de $M_r \sim 24.000$ y PVP15 (PVP K-15) con un peso molecular de $M_r \sim 10.000$.

1.4 Compuestos de ensayo

- 25
- Warfarina ((RS)-4-hidroxi-3-(3-oxo-1-fenilbutil)-2H-cromén-2-ona),
 - Furosemida (ácido 4-cloro-2-(furán-2-ilmetilamino)-5-sulfamoilbenzoico),
 - Diclofenac (ácido 2-(2-(2,6-diclorofenilamino)fenil)acético),
 - Verapamilo (2-(3,4-dimetoxifenil)-5-[2-(3,4-dimetoxifenil)etil-metil-amino]-2-(1-metiletil)pentanonitrilo),
 - Clorpromazina (3-(2-cloro-10H-fenotiazín-10-il)-N,N-dimetil-propán-1-amina),
 - Carvedilol (3-(9H-carbazol-4-iloxi)-2-hidroxipropil[[2-(2-metoxifenoxi)etil]amina),
 - 30
 - Naproxeno (ácido (+)-(S)-2-(6-metoxinaftalén-2-il)propanoico),
 - Piroxicam ((8E)-8-[hidroxi-(piridín-2-ilamino)metilidén]-9-metil-10,10-dioxo-10 λ 6-tia-9-azabicyclo[4.4.0]deca-1,3,5-trién-7-ona),
 - Glibenclamida (5-cloro-N-(4-[N-(ciclohexilcarbamoil)sulfamoil]fenetil)-2-metoxibenzamida).

1.5 Procedimiento experimental

35 1) Preparación de las membranas (ver el Ejemplo 2) y ensamblaje de la cámara de diálisis en el Ejemplo 1.

40 2) Rellenado de la cámara de proteínas (cámara 2) con tampón y los demás excipientes hasta el volumen final, de aproximadamente 100 a 150 μ l. Resulta importante que el volumen sea exactamente el mismo en ambos lados. Volumen en cada cámara:

45 con ciclodextrinas puras como compuesto sumidero, el volumen en cada cámara era de 147 ml (γ -ciclodextrina al 2,5% (m/V)),

con PVP y PVP en combinación con ciclodextrinas como compuesto sumidero en la cámara el volumen era de 100 μ l (PVP15 al 4% (m/V), PVP25 al 4% (m/V), PVP25 al 4% (m/V) + β -hidroxipropil-ciclodextrina al 4% (m/V))

50 Tampón: TAPSO 50 mM, pH 7,4, isotonizada con NaCl hasta la concentración total de 154 mM, excipiente añadido diferente según el excipiente

Concentración final del compuesto de ensayo: 0,02 mM a 0,6 mM

55 Concentración final de ASH: 60 mM

Concentración final de DMSO: al 6 % (v/v)

Se añadió la solución madre de DMSO al final debido al largo tiempo necesario, aunque las cámaras deben rellenarse con rapidez debido al riesgo de que se secase la membrana.

60 3) Todas las etapas de pipeteado se automatizaron (Tecan).

4) Para evitar la evaporación, el ensamblaje de TeflonTM se cubrió con una película adhesiva (nº de cat. 1102; HT-Dialysis).

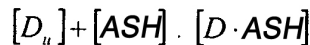
5) El sistema de cámaras se agitó durante 1 hora y después se incubó durante la noche (aproximadamente 12 horas). Debe evitarse la agitación durante un tiempo prolongado debido al riesgo de una mayor evaporación causada por el calor generado.

6) Tras alcanzar el equilibrio, una muestra de la cámara sumidero (referencia, estudio de unión II con compuesto sumidero y ASH) o de la cámara de proteínas (referencia, estudio de unión I con sólo compuesto sumidero) se transfirió a una placa de UV de semiárea y se analizó espectrométricamente (max. espectro, lector de placas 190, 250 a 500 nm) o se analizó mediante HPLC.

1.6 Análisis de los datos de mediciones

El coeficiente de distribución y la constante de unión pueden calcularse con los estudios de unión.

La unión de fármacos a ASH es un proceso reversible que puede describirse mediante el equilibrio siguiente [4]



en el que los corchetes se utilizan para referirse a concentraciones y $[D_u]$, $[ASH]$ y $[D \cdot ASH]$ son las concentraciones de fármaco no unido a ASH, ASH y fármaco unido a ASH, respectivamente.

La constante de unión K_{ASH} puede convertirse en fracción no unida f_u utilizando la fórmula a continuación, derivada de la ley de masas:

$$f_u = \frac{100}{1 + K_{ASH} \cdot [ASH]} \tag{1}$$

La constante de unión a ASH (K_{ASH}) (2) puede calcularse a partir de la combinación de coeficientes de distribución con PVP (DC_{PVP}) (3) y con ASH en presencia de PVP (DC_{ASH}) (3).

$$K_{ASH} = DC_{PVP} \cdot DC_{ASH} \tag{2}$$

Del estudio de unión I:

$$VK_{PVP} = \frac{[D - PVP]}{[D_u(PVP)]} = \frac{m_{D_b(PVP)}}{m_{D_u(PVP)}} \cdot \frac{V_{total} - V_{PVP}}{V_{PVP}} = \frac{m_{D_{ref}} - m_{D_u(PVP)}}{m_{D_u(PVP)}} \tag{3}$$

Del estudio de unión II:

$$VK_{ASH} = \frac{[D - ASH]}{[D_u(ASH)]} = \frac{m_{D_{(ASH)}}}{m_{D_u(ASH)}} \cdot \frac{V_{total} - V_{ASH}}{V_{ASH}} = \frac{m_{D_{ref}} - m_{D_u(ASH)}}{m_{D_u(ASH)}} \tag{4}$$

En el que $[D-ASH]$ y $[D-PVP]$ son el fármaco unido a ASH en presencia de PVP y el fármaco unido a PVP, respectivamente.

V_{total} es el volumen total en la cámara de diálisis (200 µl) y V_{ASH} y V_{PVP} son los volúmenes de ASH y PVP25, los cuales pueden calcularse a partir de la densidad y el peso de la muestra.

$$V_{ASH} = \frac{m_{ASH}}{\rho_{ASH}}$$

$\rho_{ASH} = 1,4 \text{ g/cm}^3$ y $\rho_{PVP} = 1,2 \text{ g/cm}^3$. Para determinar la densidad, PVP debió fundirse y se produjeron variaciones debido a la inclusión de aire. Por lo tanto, la densidad real se basa en información obtenida de BASF (fabricante).

La ecuación anteriormente indicada puede aplicarse análogamente para determinar la concentración del compuesto de ensayo no unido/unido en el equilibrio con otro compuesto sumidero.

Ejemplo 2: comparación entre beta-hidroxipropil-ciclodextrina y gamma-ciclodextrinas

Membrana

Valor de corte: 1 kDa, Spektra/Por 6

Concentración de warfarina	0,01mM a 0,4mM
Concentración de beta-hidroxiopropil-ciclodextrina	1%; 5%; 10% (m/V)
Concentración de gamma-ciclodextrina	al 2,5 % (m/V)
Análisis	UV

5 Se muestran los resultados en la Tabla 1. Con una solución al 10% de beta-hidroxiopropil-ciclodextrina, puede unirse más de 30% del compuesto de ensayo. La afinidad para la gamma-ciclodextrina es considerablemente más baja que para la beta-hidroxiopropil-ciclodextrina (se requiere una concentración 2,5 veces más alta de gamma-ciclodextrina para conseguir la misma fracción ocupada).

Tabla 1: niveles de unión de excipiente medidos para la warfarina

Excipiente	f_b (%)	SD
γ -Ciclodextrina al 2,5 % (m/V)	6,0	2,5
β -Hidroxiopropil-ciclodextrina al 1% (m/V)	6,8	2,1
β -Hidroxiopropil-ciclodextrina al 10% (m/V)	27,6	4,4

10 **Ejemplo 3: ensayo con beta-hidroxiopropil-ciclodextrina como compuesto sumidero**

Las condiciones de ensayo son las indicadas anteriormente, a menos que se indique específicamente lo contrario.

Membrana:	Valor de corte: 1 kDa; Spektra/por 6
Concentración de compuesto de ensayo:	0,02 mM a 0,06 mM
Concentración de beta-hidroxiopropil-ciclodextrina:	10% (m/V)
Duración de la incubación:	toda la noche (aprox. 12h)

Tecan

15

Volumen total por pocillo o cámara:	294 μ l volumen total (cada cámara: 147 μ l, ver anteriormente)
Concentración de DMSO	6 % (V/V)
Análisis:	Spektra max, 50 μ l

Tabla 2: Unión media de compuestos de ensayo a beta-hidroxiopropil-ciclodextrina

Sustancia de ensayo	Carbamazepina	Warfarina	Diclofenac	Quinina	Ceftriaxona
Peso molecular	236,27	308,33	296,15	324,4	554,6
Promedio de unión [%]	31,3	26,9	23,1	21,6	14,2

20 Conclusión: cuanto más bajo el peso molecular del compuesto de ensayo, mayor afinidad para la beta-hidroxiopropil-ciclodextrina

Ejemplo 4: comparación entre PVP15 y PVP25

25 Las condiciones de ensayo son las indicadas anteriormente, a menos que se indique específicamente lo contrario.
Concentraciones de los fármacos: 0,02-0,6 mM
Cantidades de PVP15 y PVP25: cada uno 40 g/l

Tabla 3: promedio de unión de compuestos de ensayo a PVP15 y PVP25. (n.d.=no determinado)

Sustancia de ensayo	Warfarina	Furosemida	Diclofenac	Verapamilo	Clorpromazina
Promedio de unión [%] a PVP15	34,5	37,0	21,7	n.d.	17,0
Promedio de unión [%] a PVP25	51,4	49,4	46,4	13,1	n.d.

30 Las sustancias de ensayo presentan una afinidad más elevada para PVP25 que para PVP15. Por lo tanto, los experimentos de los ejemplos siguientes se llevaron a cabo con PVP25.

Ejemplo 5: ensayo con combinación de PVP25 y ciclodextrina como compuesto sumidero

Membrana	Valor de corte: 1 kDa; Spektra/por
Concentración de PVP25	4,0 % (m/V)
Concentración de beta-hidroxiopropil-ciclodextrina	4,0 % (m/V)
Concentración de los compuestos de ensayo (warfarina, diclofenac)	0,02 mM a 0,6 mM

35 Tecan para pipeteado:

Volumen total por pocillo	100 ml por pocillo
Concentración de DMSO	6 % (VN)
Análisis	Spektra max, 50 μ l

Se muestran los resultados en las figuras 5 y 6. La utilización de beta-hidroxiopropil-ciclodextrina y PVP25 desplaza el equilibrio hacia menos complejo de fármaco y complejo sumidero que la utilización de únicamente PVP25 (ver la figura 6).

- 5 Tabla 4: resumen de niveles de unión de excipiente medidos para la warfarina (incluyendo resultados de los Ejemplos 2 y 4).

Excipiente	f_b (%)	SD
γ -Ciclodextrina al 2,5 % (m/V)	6,0	2,5
β -Hidroxiopropil-ciclodextrina al 1% (m/V)	6,8	2,1
β -Hidroxiopropil-ciclodextrina al 10% (m/V)	27,6	4,4
PVP15 4% (m/V)	34,5	2,9
PVP25 4% (m/V)	51,4	3,1
PVP25 4% (m/V) + β -hidroxiopropil-ciclodextrina 4% (m/V)	27,9	1,8

Ejemplo 6: ensayo con PVP25 y albúmina de suero humano (ASH)

- 10 Se utilizaron las mismas condiciones experimentales que las indicadas en el Ejemplo 5, excepto en que se utilizó el compuesto de ensayo Carvedilol. Se muestran los resultados en las figuras 8 y 9.

membrana	Spektra/Por 6, NCPM: 3,5 kDa,
concentración de PVP (compuesto sumidero)	4,0 % (m/V)
concentración de ASH (proteína no específica)	60 mM
concentración de compuesto de ensayo	0,02 mM a 0,6 mM
DMSO -concentración	6%
volumen cada compartimiento	100 μ l
Control	únicamente PVP

Tecan:

duración de la diálisis	durante la noche (aprox. 12 h)
análisis	HPLC /Programa: ATHESA
volumen de inyección:	4 μ l

- 15 Condiciones de la HPLC:
- Se llevó a cabo la analítica en un sistema de HPLC (Agilent 1100). Las separaciones se llevaron a cabo en una columna RP (Chromolith flash, RP18e, 4,6x25 mm). Se eluyeron las muestras con gradiente de agua con ácido fórmico al 0,05% (A) y acetonitrilo (B). Condiciones del gradiente: inicial: 5% de B, 0,4 min.; 95% de B; 1 min. 95% de B; 1,1 min. 5% de B.

- 20 Los resultados con compuesto de ensayo y PVP se muestran en la figura 7 y los resultados con los compuestos de ensayo, PVP25 y ASH se muestran en las figuras 8 y 9.

25 **Ejemplo 7: comparación con los valores de la literatura**

- 30 Los niveles de unión determinados del compuesto de ensayo en el Ejemplo 6 ("nuevo enfoque") se compararon con los valores determinados con métodos convencionales (valores de la literatura). Se muestran los resultados en la Tabla 2 y en la figura 10.

Tabla 5: niveles de unión de compuestos de ensayo de la literatura y derivados del Ejemplo 6.

Compuesto	f_u (%) ^{nuevo enfoque}	f_u (%) ^{literatura}	Ref. de la lit.
Clorpromazina	99,44	97,80	Kratochwil, N.A., et al., Predicting plasma protein binding of drugs: a new approach. Biochem Pharmacol, 2002. 64(9): p. 1355-74
Piroxicam	99,64	99,0	Dollery, C., Therapeutic Drugs. second ed. Churchill Livingstone. Vol. 2. 1999.
Warfarina	99,92	99,4	[Kratochwil, N.A., et al., Predicting plasma protein binding of drugs: a new approach. Biochem Pharmacol, 2002. 64(9): p. 1355-74
Diclofenac	99,95	99,5	Kratochwil, N.A., et al., Predicting plasma protein binding of drugs: a new approach. Biochem Pharmacol, 2002. 64(9): p. 1355-74
Naproxeno	99,98	99,7	Dollery, C., Therapeutic Drugs. second ed. Churchill Livingstone. Vol. 2. 1999
Glibenclamida	99,95	99,67	del propio laboratorio (con métodos convencionales)

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para determinar la constante de unión de un compuesto de alta afinidad de interés a proteínas, comprendiendo las etapas siguientes:
- 10 a) adición de compuesto de alta afinidad a un sistema de dos cámaras, en el que las dos cámaras están separadas por una membrana semipermeable, que es permeable al compuesto de interés, y determinación de la cantidad del compuesto de alta afinidad de interés en una de las cámaras tras alcanzarse el equilibrio de distribución,
- 15 b) adición de un agente acomplejante como compuesto sumidero a una de las cámaras, en el que el compuesto sumidero es una sustancia que reduce significativamente la afinidad del compuesto de interés para una proteína no específica; dicha proteína no específica se une a un amplio abanico de compuestos y el compuesto sumidero no permea la membrana, y determinación del coeficiente de distribución del compuesto de interés respecto al compuesto sumidero tras alcanzarse el equilibrio de distribución,
- 20 c) adición de una proteína del plasma como proteína no específica a la otra cámara, en la que la proteína del plasma no puede permear la membrana, y determinación del coeficiente de distribución del compuesto de interés respecto a la proteína del plasma en presencia de un compuesto sumidero tras alcanzarse el equilibrio de distribución, y d) determinación de la constante de unión del compuesto de alta afinidad de interés con el coeficiente de distribución de las etapas b) y c), y en la que el compuesto de alta afinidad de interés se refiere a un compuesto que bajo condiciones fisiológicas y en presencia de un exceso de proteína del plasma, por lo menos el 95% de la cantidad total del mismo se encuentra unida a dicha proteína del plasma.
- 25 2. Método según la reivindicación 1, en el que el filtro es una membrana selectiva para el tamaño.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el compuesto sumidero es PVP25.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la proteína del plasma es albúmina sérica.
- 30 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las etapas a), b) y c) se llevan a cabo en paralelo.

Figura 1A

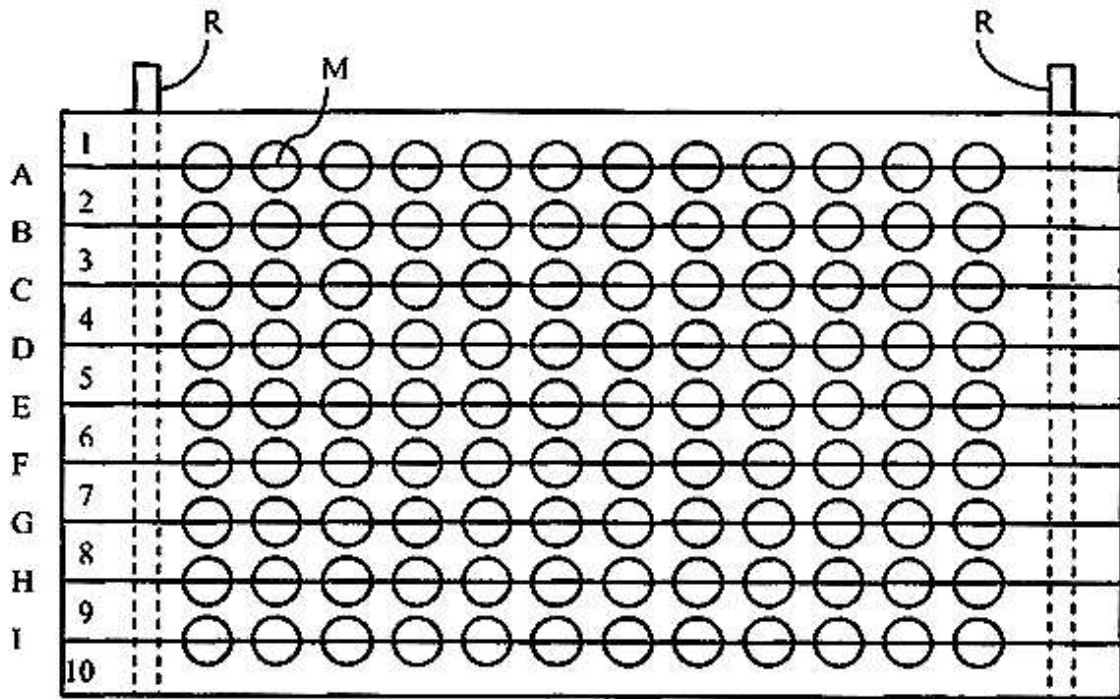


Figura 1B

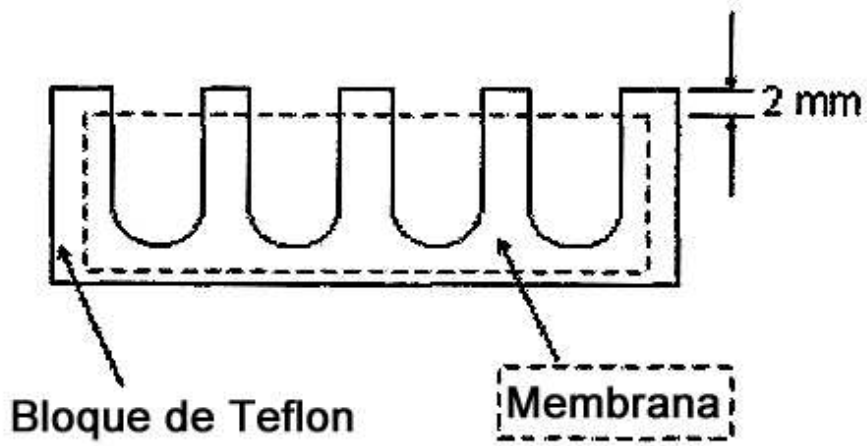


Figura 2

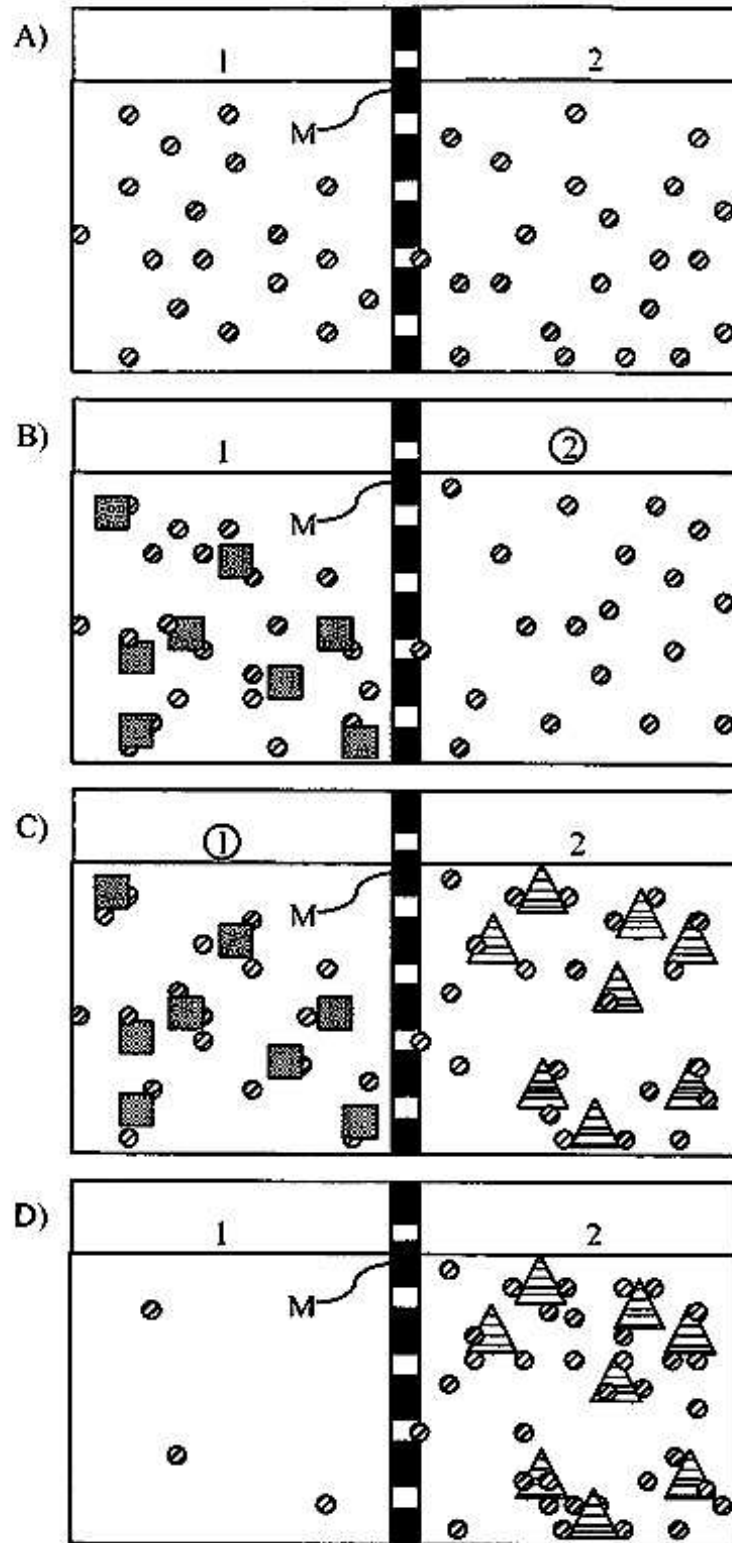


Figura 3

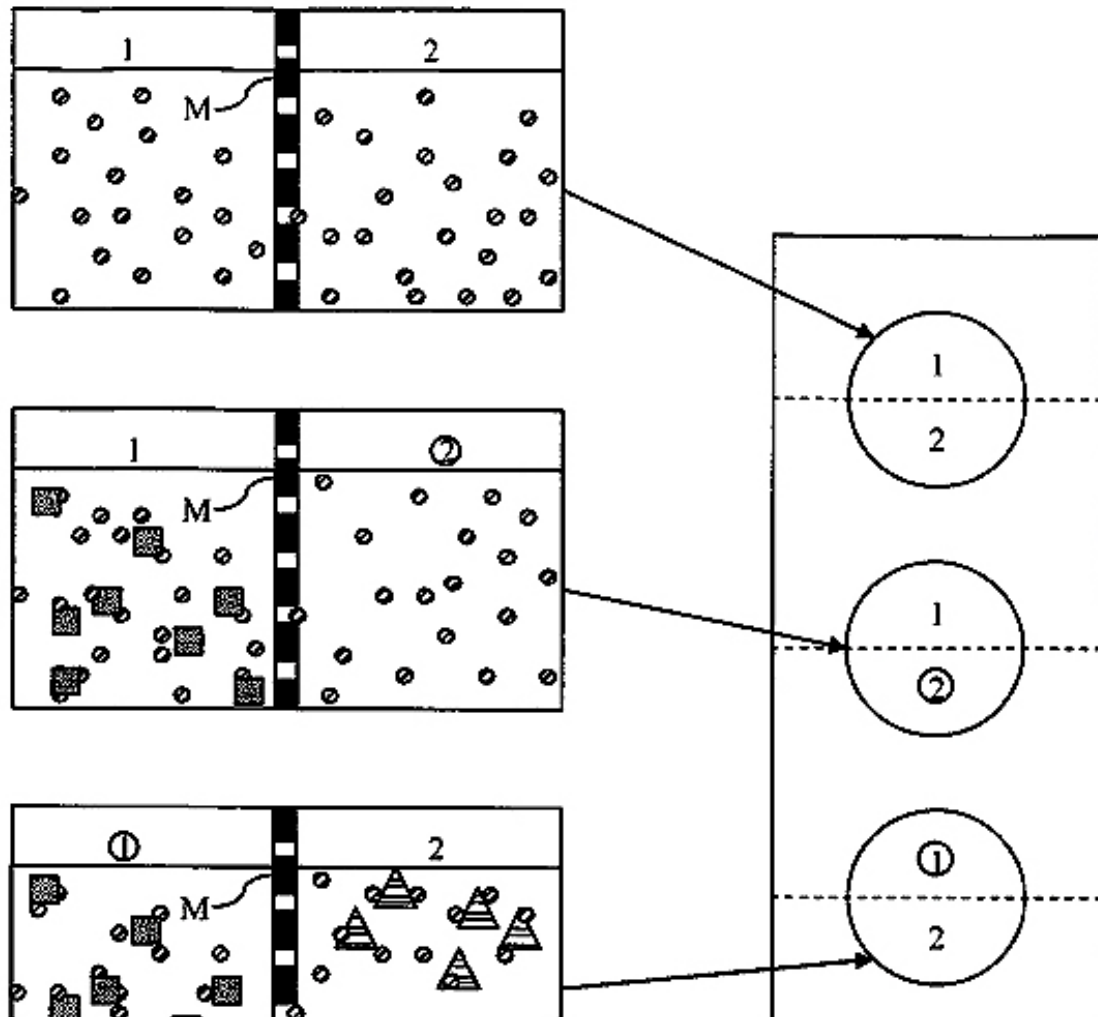


Figura 4A

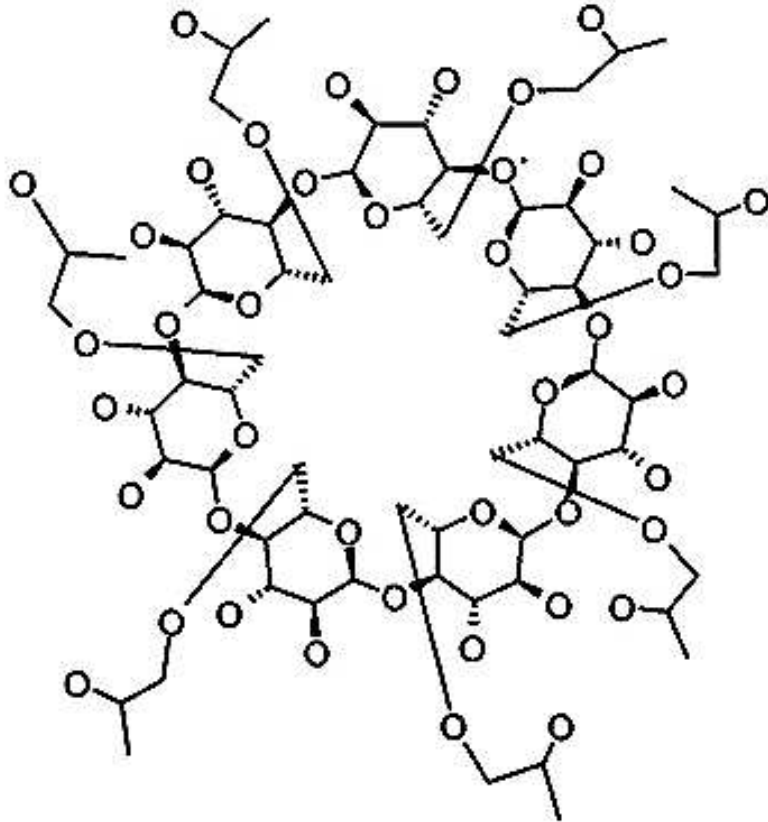


Figura 4B

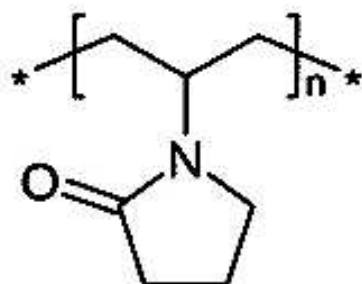


Figura 5

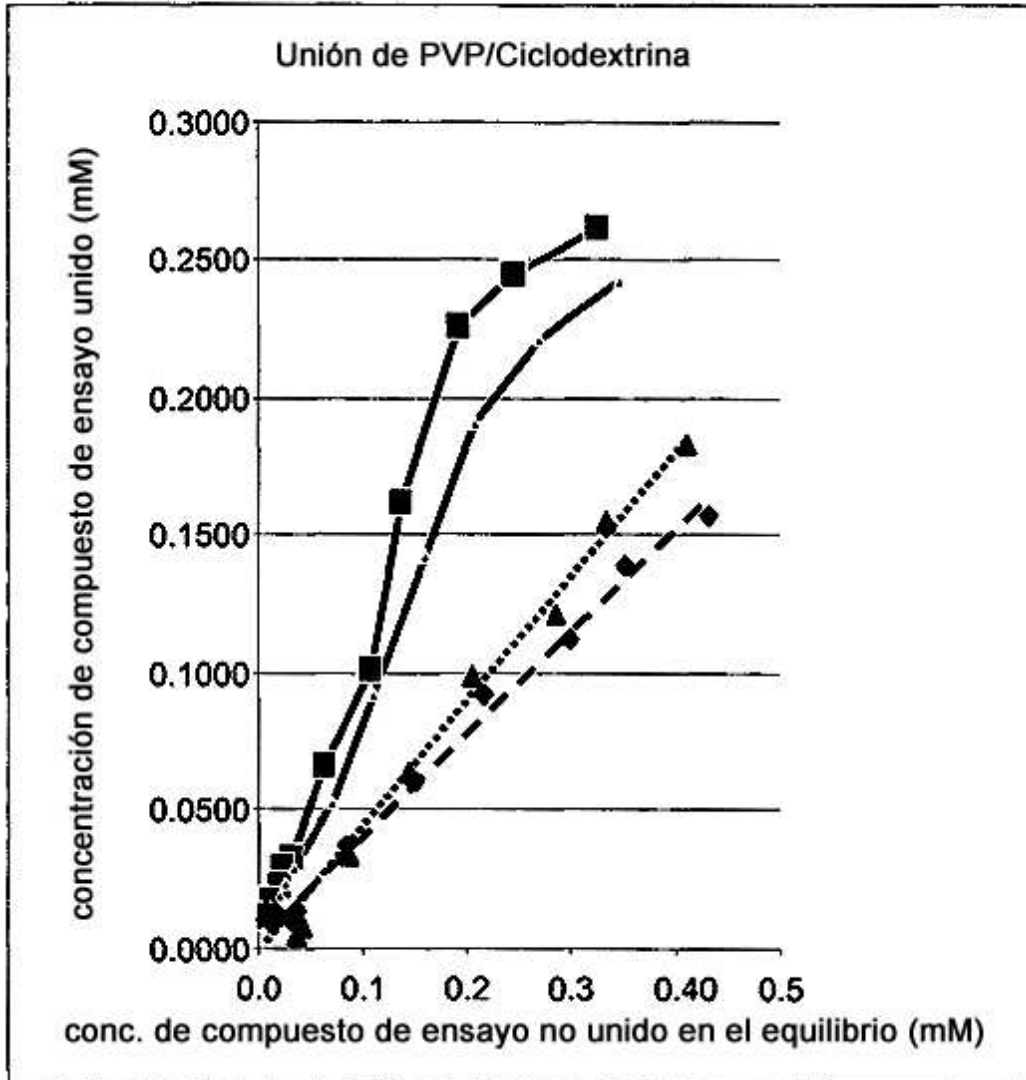


Figura 6

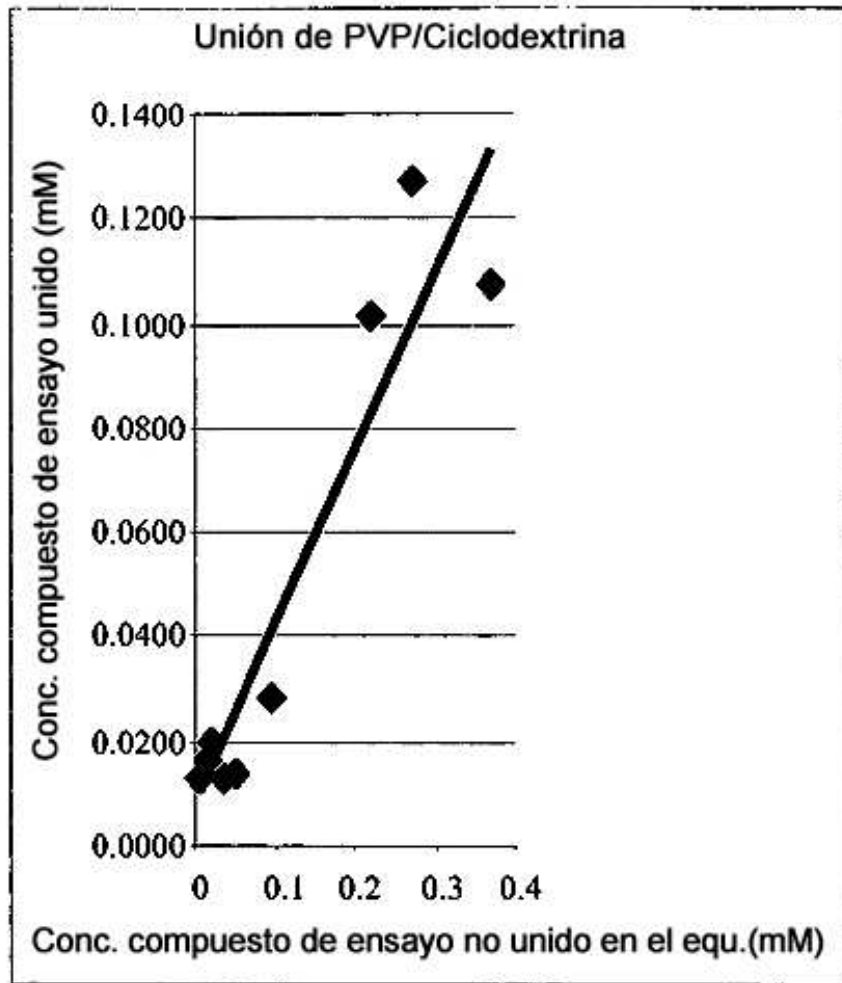


Figura 7

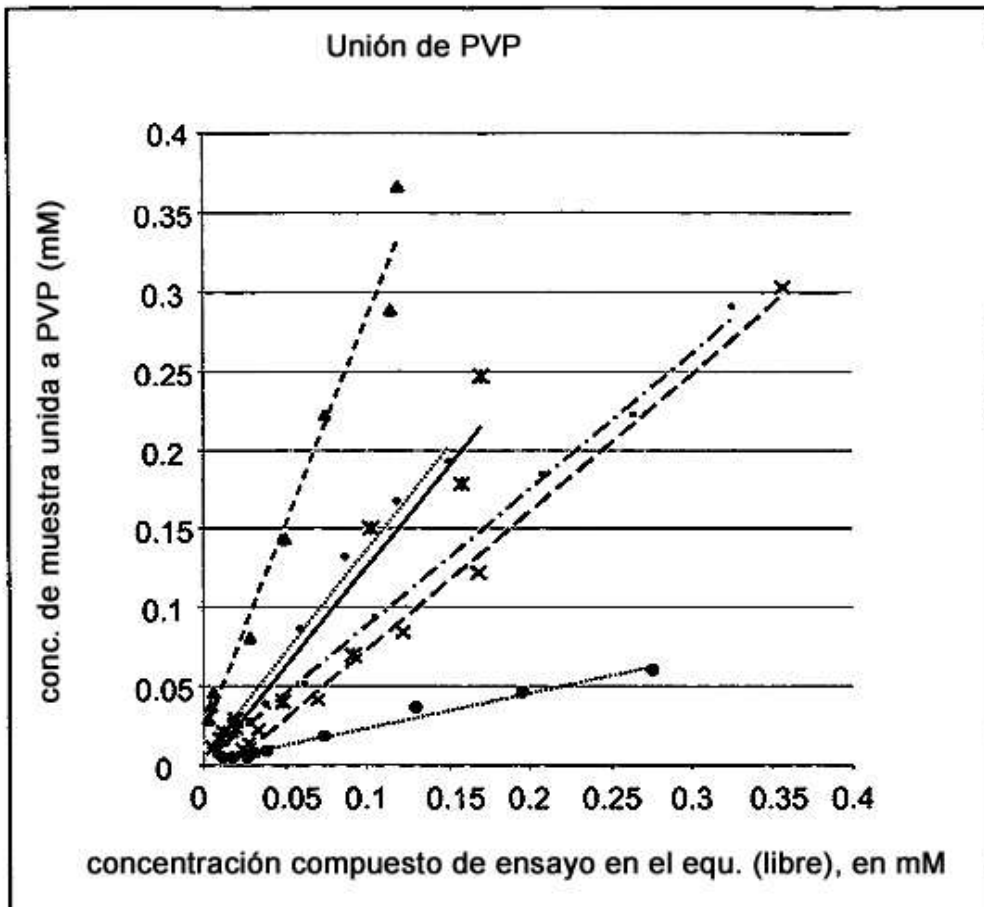


Figura 8

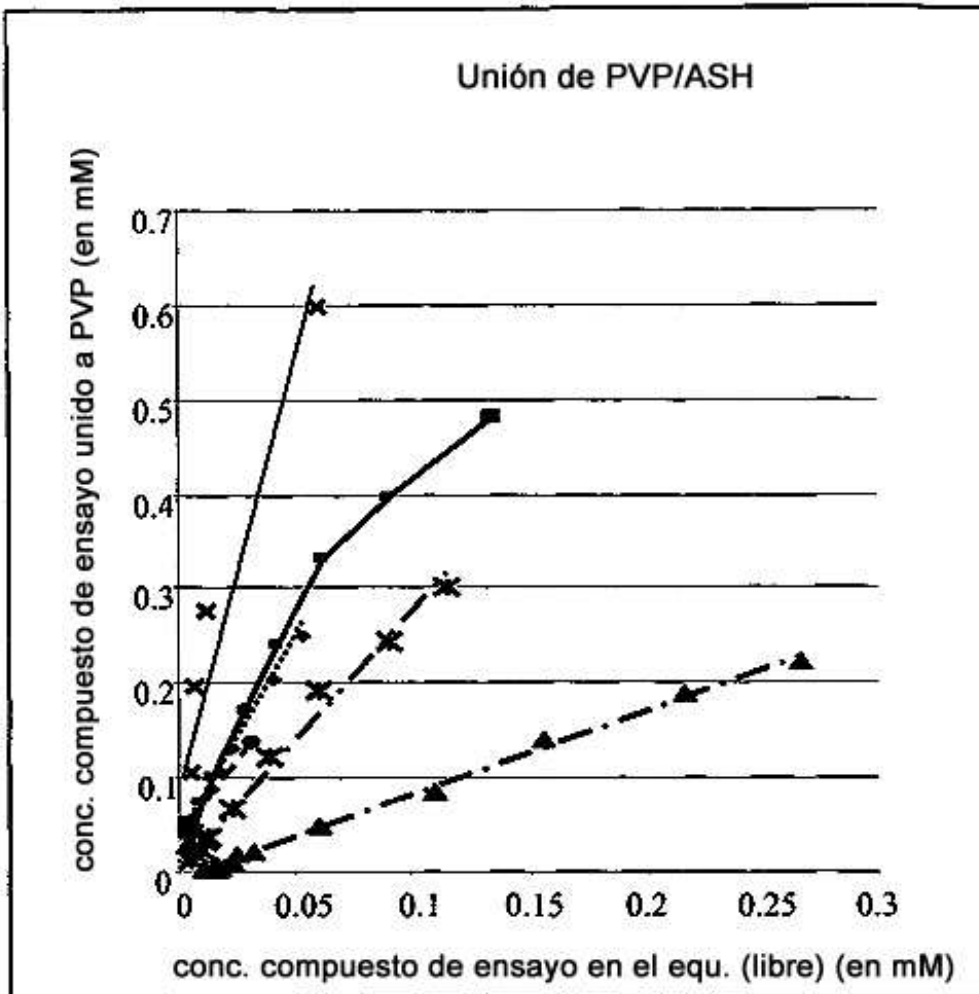


Figura 9A

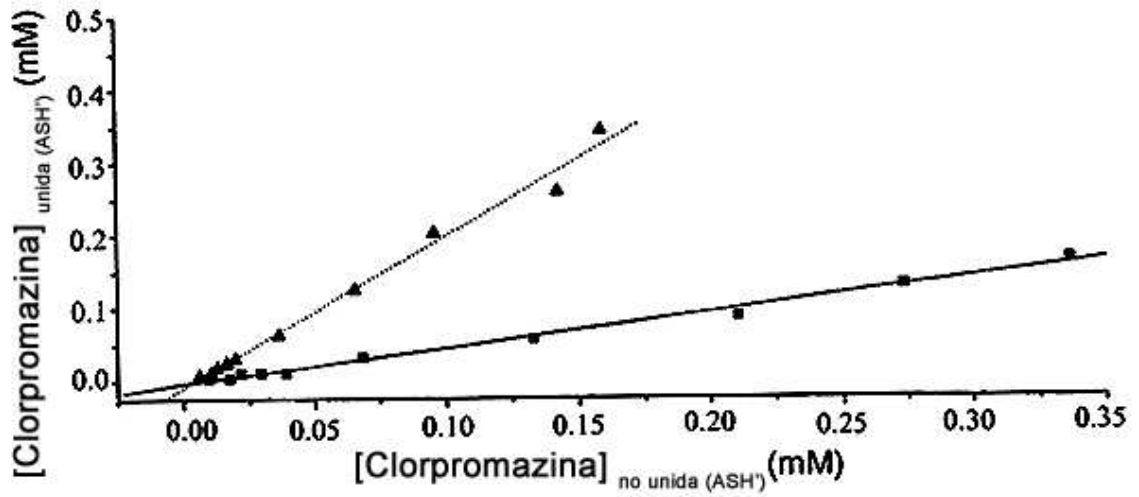


Figura 9B:

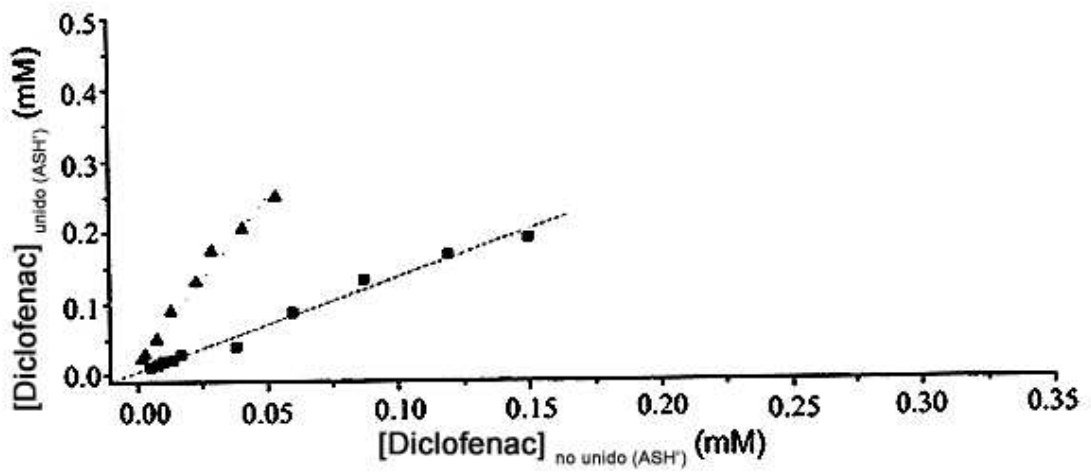


Figura 9C:

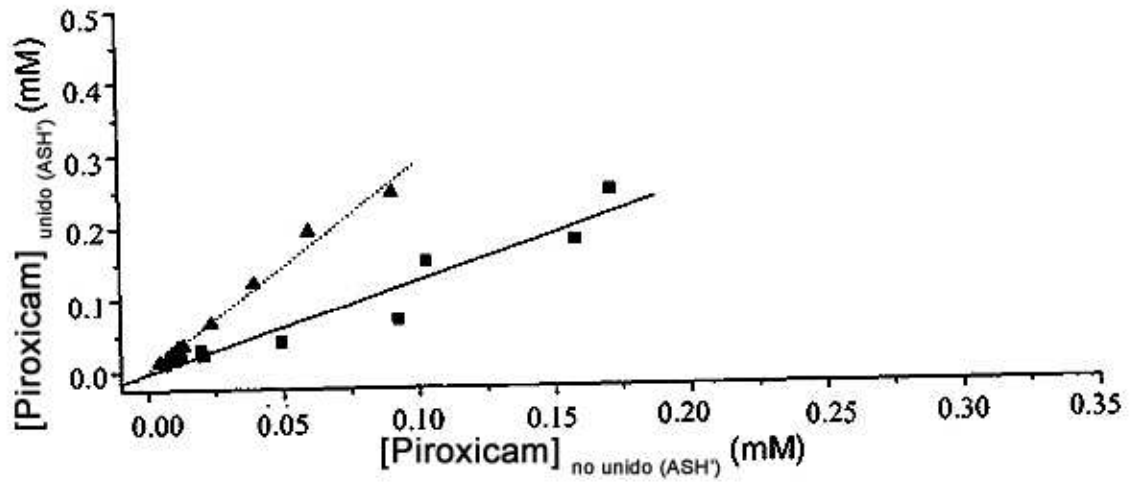


Figura 9D:

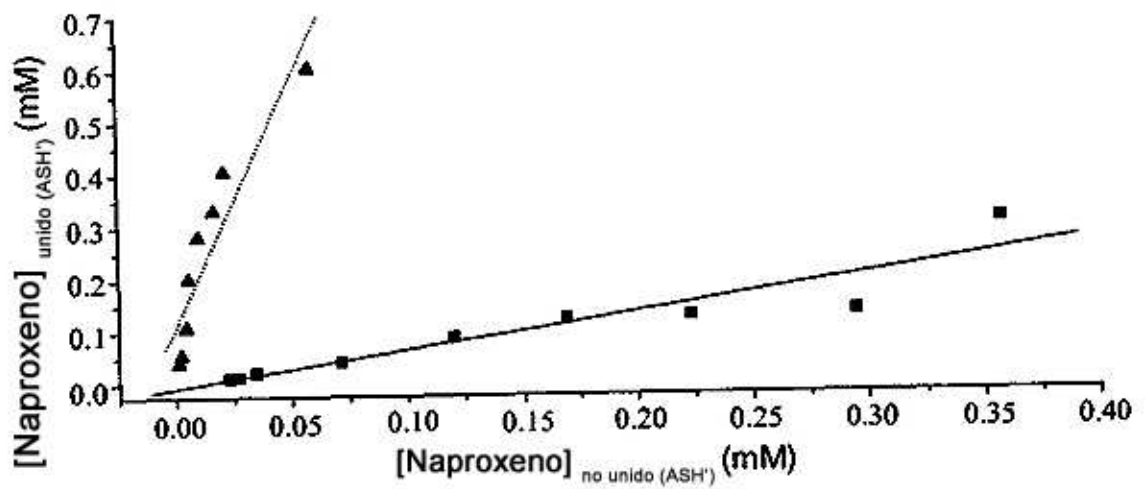


Figura 9E:

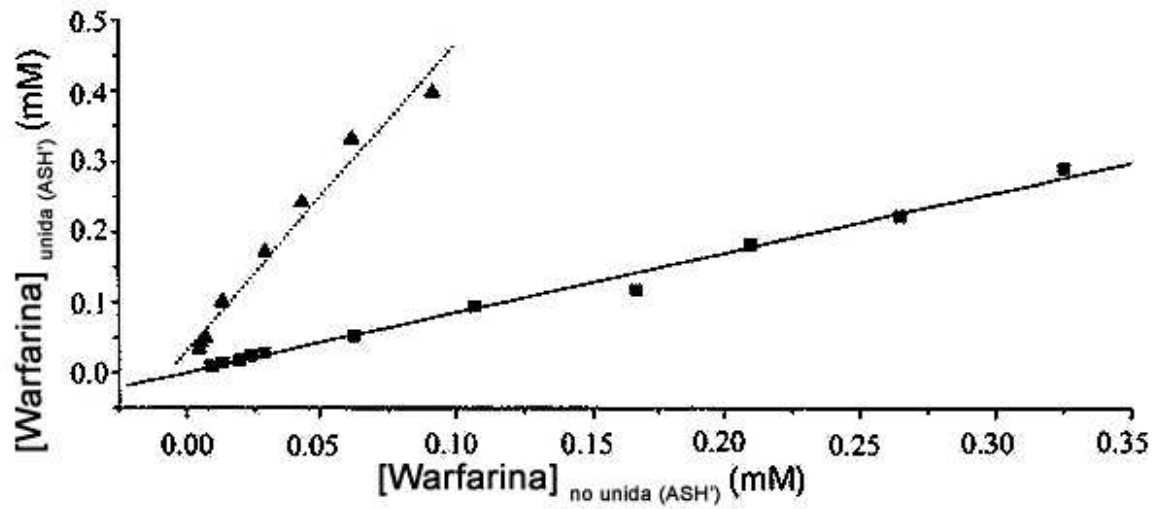


Figura 9F:

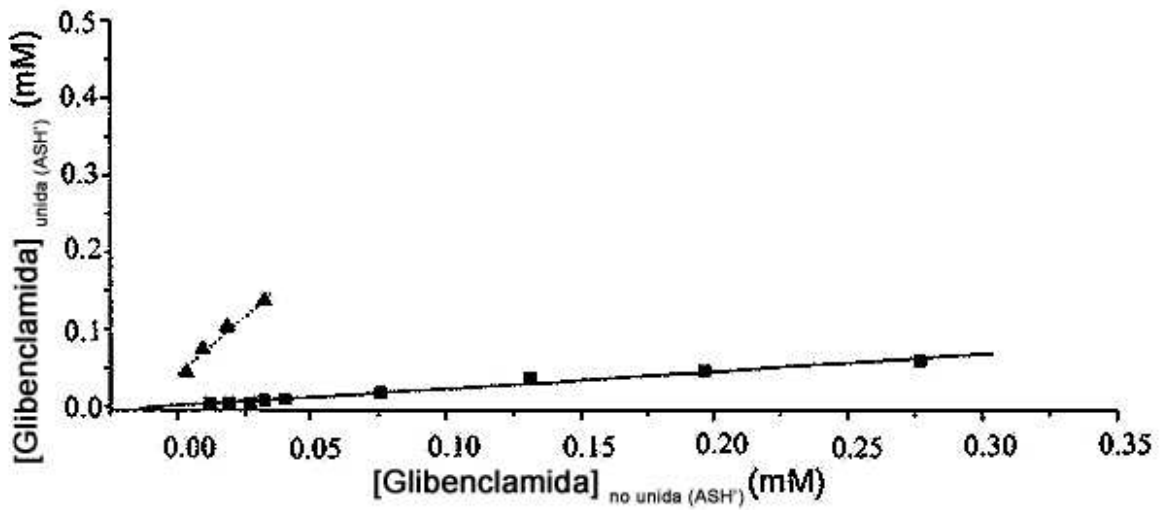


Figura 10

