

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 593 797**

51 Int. Cl.:

A61B 5/097 (2006.01)

A61B 5/083 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.04.2012 PCT/EP2012/056808**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.10.2012 WO12140213**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2012 E 12720448 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016 EP 2696757**

54 Título: **Método para determinar la capacidad metabólica de al menos una enzima**

30 Prioridad:

13.04.2011 DE 102011007310
15.04.2011 US 201161476113 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.12.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

HEYNE, KARSTEN;
STOCKMANN, MARTIN y
RUBIN, TOM

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 593 797 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 capacidad metabólica de al menos una enzima

5 La invención se refiere a un método para determinar la capacidad metabólica de al menos una enzima de acuerdo con las reivindicaciones.

10 Las enzimas contribuyen significativamente a la degradación de las sustancias nocivas en el cuerpo de los animales y los seres humanos. Hay una multitud de diversas enzimas, por ejemplo, citocromos, que convierten catalíticamente sustratos.

15 Como las enzimas o los sistemas enzimáticos (en lo sucesivo se hará siempre solo referencia a las enzimas, aunque se entienden ambos) ejercen funciones importantes, es de gran importancia determinar su capacidad funcional en un organismo. Esto sucede hoy en día, por ejemplo, a través de exámenes directamente en los cultivos de células fuera del organismo, lo que tiene la desventaja de que la enzima no se examina en su entorno nativo. Los exámenes en el organismo generalmente implican la administración de sustratos marcados con isótopos, que son metabolizados por la enzima. La administración o aplicación tiene lugar mediante intervenciones quirúrgicas, tales como por ejemplo la inyección directa en el corazón, o bien por otros métodos, tales como por ejemplo tomando el sustrato por vía oral.

20 Las aplicaciones no quirúrgicas aquí casi siempre tienen la desventaja de que la disponibilidad del sustrato en la sangre conlleva varios minutos. Es decir, el período de tiempo que transcurre desde el momento en el que aumenta la concentración del sustrato S en la sangre hasta que alcanza una concentración máxima (sin tener en cuenta posibles disminuciones en la concentración por el metabolismo) lleva varios minutos.

25 Una alternativa es la detección de alta sensibilidad de gases traza sin la administración previa de un sustrato. Pero esto tiene la desventaja de que la anamnesis exacta del individuo examinado y todas las causas del enriquecimiento de un gas en el aire de respiración deben ser conocidos. En principio, sin embargo, esta anamnesis no se puede determinar con precisión suficiente.

30 Zeng et al.: "13C-methacetin breath test parameter S for liver diseases diagnosis", Science in China (Serie C), vol. 39, N.º 1, Febrero de 1996, páginas 87-98 describe un método para el diagnóstico hepático que se basa en un análisis de la absorción del fármaco y la eliminación del fármaco. Se describe específicamente un parámetro de diagnóstico avanzado S que combina otros varios parámetros como, por ejemplo, una constante de tiempo de eliminación.

35 Martin Stockmann: "Wertigkeit eines neu entwickelten Verfahrens zur Bestimmung der Leberfunktion in der Leberchirurgie (LIMAX-Test)", Habilitación Treatise, febrero de 2009 describe un método para el cálculo de un valor denominado LiMAX basado en los valores de delta respecto al basal medidos de las relaciones entre $^{12}\text{CO}_2$ y $^{13}\text{CO}_2$ en el aire de exhalación de un individuo sin ajuste de una curva modelo a los valores medidos.

El objetivo subyacente de la presente invención es proporcionar un método, por el que la capacidad metabólica de una enzima se puede determinar de forma muy precisa y resuelta en el tiempo.

45 Este objetivo se consigue con un método que tiene las características de la reivindicación 1. Tal método para la determinación de la capacidad metabólica de al menos una enzima comprende las etapas posteriormente explicadas.

50 En primer lugar, se lleva a cabo una determinación resuelta en el tiempo de la concentración de un producto en el aire exhalado por un individuo. El producto se genera aquí por un metabolismo de un sustrato, previamente administrado al individuo, por al menos una enzima del individuo. A menudo, en el metabolismo de un sustrato correspondiente intervienen sistemas enzimáticos enteros.

55 Posteriormente, se ajusta una función modelo a los valores medidos de la concentración del producto que se obtuvieron por la determinación resuelta en el tiempo de la concentración del producto. Es decir, los valores medidos obtenidos empíricamente están ajustados por una función matemática, que puede ser especificada mediante una ecuación.

60 Por último, la capacidad metabólica de la enzima se determina basándose en los parámetros de la función modelo que especifica la función modelo. Para este fin, se pueden utilizar básicamente varios parámetros de la función modelo.

65 Lo que tiene de especial el método reivindicado es que la concentración del producto se determina solo hasta que se alcanza la concentración máxima del producto en el aire exhalado por el individuo y que la determinación de la capacidad metabólica de la enzima se lleva a cabo basándose en al menos dos parámetros de la función modelo. Estos parámetros no pueden, sin embargo, ser el valor máximo de la función modelo y de la constante de tiempo de

la función modelo al mismo tiempo, especialmente no cuando la función modelo es una función mono-exponencial. Por otra parte, un tiempo de inicio hasta y/o un tiempo de finalización t_m de la función modelo no se pueden seleccionar como parámetros.

5 Cuando se cumplen estas condiciones básicas, se puede analizar la cinética del metabolismo de diferente progresión de varios sustratos y de este modo la diversidad de cinéticas de la generación del producto, lo que en última instancia, permitirá determinar la capacidad metabólica de una enzima o un sistema enzimático. Los parámetros seleccionados de la función modelo permiten extraer conclusiones directas sobre la capacidad metabólica de la enzima. La capacidad metabólica de una enzima puede servir como base para la determinación
10 cuantitativa del estado de salud de un individuo en relación con las funciones corporales específicas. Esto puede tener lugar en las etapas posteriores del proceso que no son parte del método reivindicado. Como las enzimas se producen en diversos órganos o compartimentos del cuerpo, el presente método es adecuado como base para numerosos exámenes posteriores. Preferiblemente, el método puede formar la base para analizar el estado del hígado que se caracteriza por ejemplo por la capacidad de la función hepática o la microcirculación en el hígado.

15 Con el fin de obtener datos fiables y significativos de la capacidad metabólica determinada de la enzima, es de gran ventaja cuando se puede asegurar una rápida disponibilidad del sustrato en la sangre del individuo. Una ingestión oral del sustrato es generalmente inadecuada para este propósito.

20 La dependencia temporal de la concentración de sustrato en la sangre (sin metabolismo) se especifica por la función $S(t)$. Con el fin de dar una definición más precisa de la disponibilidad o la liberación del sustrato en la sangre, se definirá aquí el período de liberación FZ. Si C_{max} es la máxima concentración de sustrato esperada en la sangre (sin metabolismo), hasta el momento en el tiempo, en el cual la concentración de sustrato en la sangre se ha incrementado hasta 4 % a 6 % de la C_{max} y t_m el momento en el tiempo, en el cual la concentración de sustrato en la
25 sangre ha aumentado hasta el 40 % a 60 % de C_{max} , en particular, en el cual la concentración de sustrato en la sangre está por encima de 40 %, por encima de 50 % o por encima de 60 % de C_{max} , entonces el periodo de liberación FZ está dado por la diferencia de tiempo entre t_m y (FZ = $t_m - t_0$). En otras palabras, el período de liberación es el período de tiempo que se necesita para alcanzar un aumento de la concentración de sustrato en la sangre (partiendo del supuesto de que la concentración se encuentra ligeramente por encima del 0 % de C_{max} , sin embargo, todavía en un rango de porcentaje de un dígito de C_{max}), en particular por un factor de 10, en particular por un factor de 12, en particular por un factor de 15 y, en particular, por un factor de 20.

30 El periodo de liberación para una administración oral estándar de un sustrato es generalmente más de 5 minutos y varía considerablemente entre individuos de un día a otro. Por esta razón, las administraciones con un periodo largo de liberación conducen a resultados distorsionados, ya que los resultados de la medición están enrevesados con la función $S(t)$ y por lo tanto quedan "velados" con una función que es desconocida.

35 Los periodos largos de liberación, conocidos en la técnica anterior, y las desventajas acompañantes cuando posteriormente se determina la capacidad metabólica de una enzima se pueden evitar por una inducción específica del aparato metabólico del individuo, que se ha de examinar, por medio de una administración no quirúrgica de un sustrato. Para la inducción específica, se predetermina la dosis del sustrato, de manera que en las etapas subsiguientes de interpretación, se pueda estimar la reacción del aparato metabólico en relación con la dosis del sustrato. Preferiblemente, los gases únicamente se examinan como productos, cuya concentración cambia por inducción del aparato metabólico como resultado de la administración del sustrato. La inducción del aparato
40 metabólico por el sustrato y la rápida respuesta del metabolismo acto seguido es un punto clave para la aplicación posterior del método reivindicado.

45 En una realización, la inducción específica explicada del aparato metabólico es una parte del método, que precede al paso de la determinación resuelta en el tiempo de la concentración del producto.

50 La administración y la liberación del sustrato, que está en función del tipo y forma de administración, se lleva a cabo mejor de tal manera que el período de liberación (y por tanto la disponibilidad del sustrato en la sangre) es más rápido de 60 segundos, en particular más rápido de 50 segundos, en particular más rápido de 40 segundos, en particular más rápido de 30 segundos, en particular más rápido de 20 segundos y, especialmente, más rápido de 10 segundos.

55 El sustrato, por lo tanto, se administra mejor en una forma de dosificación que permite un tiempo de liberación del sustrato en la sangre del individuo dentro de los tiempos anteriormente mencionados. Tal periodo de liberación corto básicamente se puede conseguir mediante diversas formas de administración o aplicaciones. Sin limitar la interpretación, aquí se presentan unas cuantas formas: a) inhalación de un aerosol que contiene el sustrato, b) administración a través de la piel, por ejemplo con nanovehículos eficientes, c) ingesta por vía oral de un sustrato conmutable (en particular sustrato activable), que se libera por absorción de energía. Después de ser administrado por vía oral, el sustrato, que en el estado unido es no degradable, puede así ser liberado por completo dentro de un segundo por aplicación de energía, en particular por luz. Tales sustratos en el estado unido también se denominan compuestos enjaulados en términos técnicos. El uso de tales compuestos enjaulados permiten una liberación ultra-rápida y selectiva del correspondiente sustrato metabolizable, inducible en cualquier momento.

La rápida disponibilidad del sustrato en la sangre garantiza la rápida disponibilidad del sustrato en la enzima, cuya capacidad metabólica puede ser examinada.

5 Cuando el sustrato está en la sangre y se encuentra en la enzima, este puede ser metabolizado por la enzima. De esta manera, se genera el producto o los productos, a los que en lo sucesivo solo se hará referencia como un producto individual. Las etapas del metabolismo tienen que ser ejecutadas de forma muy rápida y exacta en 10 segundos, en particular en 5 segundos, en particular en 1 segundo, en particular en 0,1 segundos, en particular en 0,01 segundos, en particular en 0,001 segundos. En la escala de tiempo de la disponibilidad del sustrato esto garantiza un metabolismo prácticamente instantáneo. El producto o los productos P, formados durante el 10 metabolismo del sustrato, están disueltos en la sangre y se exhalan a través de los pulmones, de modo que se pueden detectar en el aire exhalado por el individuo. Aunque actualmente se hace referencia a un solo producto, las realizaciones del método comprenden no solo la detección de un producto individual, sino de varios productos.

15 Para especificar la capacidad metabólica de la enzima se pueden usar diferentes parámetros de varias funciones de ajuste. Ejemplos de parámetros adecuados son los parámetros del grupo que comprende el valor máximo de la función modelo, en el momento i -ésimo de la función modelo con $i = 1, 2, 3, 4, \dots$, el momento central j -ésimo de la función modelo con $j = 1, 2, 3, 4, \dots$, la desviación estándar de la función modelo, una constante de tiempo de la función modelo, el centro de gravedad de las constantes de tiempo, la desviación media de las constantes de tiempo del centro de gravedad, la variación de las constantes de tiempo, la distribución de las constantes de tiempo, la 20 ponderación de las constantes de tiempo, la ponderación de la distribución de las constantes de tiempo, el coeficiente corrector de la variación de las constantes de tiempo.

25 Los momentos de una función modelo se explican, por ejemplo, en el Handbook of mathematics de Bronstein y Semendjajew (p. 665 a la 668, 25ª ed., 1991). En esta referencia también se pueden encontrar numerosas otras funciones modelo y parámetros del modelo, que pueden ser utilizados individualmente o en combinación unos con otros dentro del alcance de la presente invención.

Un ejemplo de dos parámetros que son muy adecuados para especificar la función modelo son la concentración máxima o cantidad P_{\max} del producto P en el aire de respiración y el primer momento de la función modelo de t_0 a t_m .

30 El primer momento M_1 se define por: $M_i = \sum_k t_k^i p_k$, con $i = 1$, en el que la suma se calcula sobre todos los puntos de medición k entre a y t_m . Aquí, t_k es el tiempo del punto de medición k -ésima y p_k el valor medido de la concentración del producto P en el aire de respiración en el tiempo t_k .

35 Un ejemplo adicional de dos parámetros que son muy adecuados para especificar la función modelo son la concentración máxima o la cantidad P_{\max} del producto P en el aire de respiración y el segundo momento central de la

función modelo desde t_0 hasta t_m . El segundo momento central MZ_2 se define por: $MZ_i = \sum_k (t_k - M_1)^i$, con $i = 2$. El segundo momento central es la varianza del primer momento y da la anchura de la distribución de la función de aumento del metabolismo examinado.

40 Otras combinaciones de parámetros, por ejemplo de P_{\max} , M_1 y MZ_2 , así como de los momentos más altos, momentos centrales más altos u otros parámetros, en particular los otros parámetros mencionados anteriormente, son posibles y dan, dependiendo de la enzima examinada, información directa acerca de la capacidad metabólica de la enzima.

45 La función modelo puede tener básicamente una o varias constantes de tiempo. Por ejemplo, en el caso en el que una combinación de múltiples funciones se utiliza como función modelo, la función modelo tiene múltiples constantes de tiempo. La existencia de múltiples constantes de tiempo es un requisito previo para el hecho de que se puedan seleccionar como parámetros, por ejemplo, el centro de gravedad de las constantes de tiempo, la desviación media de las constantes de tiempo del centro de gravedad, la variación de las constantes de tiempo, la distribución de las 50 constantes de tiempo, la ponderación de las constantes de tiempo, la ponderación de la distribución de las constantes de tiempo o la ponderación de la variación de las constantes de tiempo.

55 Preferiblemente, la función modelo (o función de ajuste) es una función de la solución de una ecuación diferencial de primer orden, una función de la solución de una ecuación diferencial de segundo orden, una función de la solución de una ecuación diferencial de tercer orden, una función de la solución de una combinación de ecuaciones diferenciales de diversos órdenes o una función multi-exponencial como una función del tiempo. Cuando se utiliza una combinación de las ecuaciones diferenciales de varios órdenes, la función de la solución también puede incluir contribuciones de una ecuación diferencial de orden cero.

60 Para permitir una medición especialmente sencilla del aire exhalado y para lograr una alta precisión de las mediciones al mismo tiempo, por lo que el valor informativo de los valores medidos obtenidos mejora significativamente, la determinación de la concentración del producto se lleva a cabo mejor en flujo continuo .

Mediante una medición de la absorción de acuerdo con la ley de Beer-Lambert con un coeficiente de extinción conocido y una longitud de la trayectoria conocida de la célula de medición, se puede obtener inmediatamente la concentración de la sustancia examinada. Preferiblemente, además, también se determina la velocidad de flujo del aire exhalado, que fluye a través de un aparato de medida utilizado para determinar la concentración. A continuación, la cantidad del producto examinado puede calcularse a partir del producto de la concentración y el volumen que fluyó a través del aparato de medición. El volumen, que fluyó a través del aparato de medición, se obtiene multiplicando el flujo de volumen por el tiempo durante el que se observó el flujo de volumen.

La resistencia a la respiración del instrumento de medida es aquí preferiblemente de menos de 100 mbar, en particular menos de 80 mbar, en particular menos de 70 mbar y en especial de menos de 60 mbar. Esto se consigue por ejemplo, por una estructura abierta sin válvulas y sin trampillas de aire.

El aumento del producto en la sangre se refleja proporcionalmente en el aire de respiración. La cantidad o concentración del producto se mide en el aire de respiración como una función del tiempo. En una realización el aire exhalado es en su totalidad (completamente) canalizado a través de un instrumento de medición, por medio del cual se detecta el producto. Es decir, en esta realización todo el aire exhalado de al menos un aliento del individuo se usa como el aire exhalado. Por lo tanto, la concentración del producto en el aire de respiración se puede determinar de una manera especialmente ventajosa minimizando el error de medición al no utilizar interpolaciones.

En otra realización, el aire exhalado de una respiración o de múltiples respiraciones (aproximadamente de 2 a 20 respiraciones, en particular de 3 a 15 respiraciones, en particular de 4 a 10 respiraciones, en particular de 5 a 8 respiraciones) se mezcla completamente entre sí y una parte de esta mezcla es entonces canalizada a través de un instrumento de medición, por medio del cual se detecta el producto.

Con el fin de obtener datos que se puedan reproducir especialmente bien el individuo examinado debería estar mejor situado en una fase estable mientras se determina la concentración del producto en el aliento. Con los seres humanos y los animales esto se puede garantizar, por ejemplo, no sometiendo al organismo a fuertes movimientos durante la determinación de la concentración del producto en el aire exhalado. Por ejemplo, en el estado tumbado del individuo, el levantamiento de las piernas 45 grados desde la posición horizontal puede cambiar los valores medidos de la concentración del producto en el aire de respiración. A causa de la función de almacenamiento de la sangre y su distribución en el organismo, caminar, correr o los movimientos al estar de pie conducen a valores modificados de la concentración del producto en el aire exhalado. Por lo tanto, la determinación de la concentración del producto se lleva a cabo mejor cuando el individuo está esencialmente en una posición de reposo. Esta posición de reposo puede ser una posición tumbada o sentada. Es ventajoso cuando la posición de las piernas y/o de la parte superior del cuerpo del individuo cambia en menos de 45 grados, en particular en menos de 30 grados y, especialmente, en menos de 15 grados en comparación con la posición predeterminada. En la posición de tumbado del individuo esta posición predeterminada es por ejemplo una posición esencialmente horizontal del individuo.

De acuerdo con la invención reivindicada, solo el aumento de la concentración del producto (es decir, la dinámica del metabolismo) se analiza hasta el máximo. Este máximo corresponde a la concentración máxima de un producto en el aire exhalado por el individuo. Este aumento se consigue preferiblemente en menos de 40 minutos, en particular menos de 20 minutos y, especialmente, menos de 10 minutos. Cuanto más tiempo se necesita para lograr el aumento, más probabilidades existen de que los propios procesos del cuerpo puedan influir en el resultado, por lo que la precisión global de los datos de medición obtenidos disminuye.

La ejecución del método actualmente reivindicado con la ayuda de la espectroscopia de RMN y/o TC es ligeramente diferente a la ejecución mediante espectroscopia de infrarrojos y/o la espectrometría de masas. La espectroscopia de RMN y la TC son métodos de estudios de imagen y se pueden emplear, por ejemplo, de las siguientes maneras:

a) Por medio de la espectroscopia de RMN y la TC se examina el área espacial de interés. Además, se analiza el producto en el aire de respiración. Una comparación de ambas mediciones proporciona nueva información.

b) Por medio de la espectroscopia de RMN y la TC se examina el área espacial de interés, mientras que además se analiza el producto en el aire exhalado. Una comparación de las secuencias cronológicas de ambas mediciones proporciona nueva información. La espectroscopia de RMN y la TC pueden rastrear el aumento y disminución de la concentración de producto de una manera espacialmente resuelta. El uso de sustratos marcados con isótopos o de sustratos con alta densidad electrónica permite aquí el uso de la espectroscopia de RMN y la TC de una manera especialmente ventajosa.

Con el fin de permitir una comparación con otros individuos, se hace preferiblemente una normalización con respecto al peso corporal del individuo examinado. En particular, dicha normalización puede realizarse dividiendo el valor obtenido de ser indicativo de la capacidad metabólica por el peso corporal del individuo. En caso de que el peso corporal ya se considere en la función modelo que se utiliza para la obtención de un valor indicativo de la capacidad metabólica, el peso corporal se considera dos veces durante todo el método. A modo de ejemplo, es concebible que el valor que sea indicativo de la capacidad metabólica lleve una unidad en la que kg^2 esté presente en el denominador. Este sería el resultado de dos divisiones consecutivas por el peso corporal del individuo (o una

división por el cuadrado del peso corporal del individuo).

En una realización, la función modelo se puede expresar mediante la siguiente fórmula:

$$5 \quad \text{CapMet} = \text{cal} * [F(\text{producto}, t) - f(\text{producto}, t)_{\text{nat}}] * g(P) * h(n) * L(n/M) * (n/M^2) * V(n/M),$$

en la que

CapMet	indica la capacidad metabólica,
cal	es una constante en la que se tiene en cuenta las correcciones,
F(producto, t)	es una función que expresa la dinámica del producto exhalado,
f(producto, t) _{nat}	es una función que expresa la abundancia natural del producto en el aire exhalado por el individuo antes de la administración del sustrato,
g(P)	es una función que expresa la dependencia de la velocidad de producción del producto P del individuo del estado de actividad del individuo,
h(n)	es una función que expresa el número de moléculas de producto generadas por molécula de sustrato,
L(n/M)	es una función que expresa un comportamiento no lineal de la capacidad metabólica dependiente del número de moléculas de sustrato administradas n, en la que M indica el peso corporal del individuo y
V(n/M)	es una función que expresa las dependencias debidas a los diferentes procedimientos de administración del sustrato.

10 Todas estas funciones y constantes individuales de la función modelo ilustrativa se explicarán con más detalle en lo sucesivo con respecto a una realización específica relativa a ¹³CO₂ como producto del metabolismo de un sustrato marcado con ¹³C. Estas explicaciones no deben interpretarse como limitantes de la fórmula general de la CapMet indicada anteriormente, pero ayudará a comprender mejor los parámetros individuales de esta función modelo.

15 Un ejemplo preferido del método reivindicado es la determinación de la función metabólica de un órgano, por ejemplo, el hígado, medida a través de la dinámica del metabolismo de un sustrato marcado con ¹³C por medio de la determinación de la capacidad metabólica de una enzima. Un sustrato posible es la ¹³C-metacetina que se metaboliza a ¹³CO₂ y paracetamol en las células del hígado por la enzima CYP450 1 A2. Otros sustratos, tales como ¹³C-cafeína, también son adecuados para una determinación acorde.

20 La dinámica del ¹³CO₂ generado por el metabolismo proporciona información sobre la función metabólica del hígado u otro órgano. Desafortunadamente, el ¹³CO₂ tiene una abundancia natural de aproximadamente 1,1 % del total de CO₂ en el cuerpo humano. Por lo tanto, hay que discriminar entre la abundancia natural en el cuerpo y el ¹³CO₂ adicional generado por el metabolismo de sustrato en el hígado. Otros sustratos con diferentes productos del metabolismo pueden no sufrir estas limitaciones. Una forma común de determinar la abundancia natural de ¹³CO₂ en el cuerpo es medir la relación entre ¹³CO₂ y ¹²CO₂ antes de la administración del sustrato. Dependiendo del procedimiento de medición, la abundancia natural se calculará mediante una función f(¹³CO₂, ¹²CO₂)_{nat}. Dos ejemplos posibles para esta función son:

$$30 \quad f(^{13}\text{CO}_2, ^{12}\text{CO}_2)_{\text{nat}} = k1 * ^{13}\text{CO}_2 / ^{12}\text{CO}_2 * 0,011,$$

con un número constante k1; o

$$35 \quad f(^{13}\text{CO}_2, ^{12}\text{CO}_2)_{\text{nat}} = k2 * (k3 * ^{13}\text{CO}_2 - ^{12}\text{CO}_2) / (^{13}\text{CO}_2 - ^{12}\text{CO}_2),$$

con números constantes k2 y k3.

40 También son posibles otras funciones. En particular, si la abundancia natural de ¹³CO₂ en el cuerpo se determina durante un cierto período de tiempo o se expresa como un valor medio de diferentes medidas en los distintos puntos de tiempo, hay que considerar una dependencia del tiempo. Entonces, esta función debe escribirse como f(¹³CO₂, ¹²CO₂, t)_{nat}. Si no existe una dependencia del tiempo, f(¹³CO₂, ¹²CO₂, t)_{nat} es igual a f(¹³CO₂, ¹²CO₂)_{nat}.

45 Con el fin de determinar la función metabólica de la dinámica del ¹³CO₂ exhalado o de la dinámica de la relación ¹³CO₂/¹³CO₂ exhalada, se usa la función F(¹³CO₂, ¹²CO₂, t). La forma más fácil de la función F es tomar el valor máximo de la dinámica en el tiempo t_{max}. Otra opción es utilizar el primer o segundo momento de la dinámica o utilizar una combinación del área bajo la curva hasta el valor máximo, el área bajo la curva hasta el medio valor de la máxima y la duración de estos puntos de tiempo. Otras combinaciones son también posibles utilizando las funciones descritas anteriormente.

50

En una realización, la función total que describe la capacidad metabólica (CapMet) del hígado (idéntica a la capacidad metabólica de una enzima seleccionada) viene dada por la siguiente fórmula:

$$\text{CapMet} = \text{cal} * [F(^{13}\text{CO}_2, ^{12}\text{CO}_2, t) - f(^{13}\text{CO}_2, ^{12}\text{CO}_2, t)_{\text{nat}}] * g(P_{\text{CO}_2}) * h(n) * L(n/M) * (n/M^2) * V(n/M)$$

En esta fórmula, el número constante cal tiene en cuenta las correcciones, en particular debido a la calibración de los experimentos y debido a aplicaciones médicas.

P_{CO_2} indica la tasa total de producción de CO_2 que depende de la situación de actividad del individuo para respirar (en reposo o practicando deporte) que determina los valores naturales de $^{12}\text{CO}_2$ y $^{13}\text{CO}_2$ en el aire exhalado. Por lo tanto, la velocidad total de producción de CO_2 se describe aquí mediante la función $g(P_{\text{CO}_2})$. En el caso más sencillo de un individuo en reposo la función está dada por $g(P_{\text{CO}_2}) = K4 * P_{\text{CO}_2}$, con $k4 = 1$.

La función $h(n)$ describe la parte de las moléculas que se metabolizarán por el hígado en $^{13}\text{CO}_2$. El número de moléculas de sustrato n se da en mol. Dependiendo del sustrato puede variar entre x y 0 , siendo x un número mayor que 0 . Los sustratos muy funcionales tienen valores de x cerca o por encima de 1 . Un sustrato con $x = 3$ significa que por molécula de sustrato se generarán 3 moléculas de $^{13}\text{CO}_2$ por el metabolismo.

La función $V(n/M)$ describe dependencias debido a diversos procedimientos de administración de los sustratos. Por ejemplo, las administraciones oral e intravenosa tienen como resultado diferentes procesos metabólicos y constantes de tiempo. Estas diferencias se corrigen por la función $V(n/M)$.

Dado que el número de moléculas de sustrato que se metabolizan aumenta con el aumento moléculas de sustrato, los valores de señal medidos de la dinámica aumentan al aumentar el número de moléculas de sustrato. Para el metabolismo hepático es útil administrar una cantidad específica de moléculas por peso corporal cuadrado M^2 . Esto tiene en cuenta que el hígado aumenta su potencia con el aumento del peso corporal al cuadrado. Por lo tanto, la capacidad metabólica del hígado es proporcional a n/M^2 .

Finalmente, debido a los procesos de distribución dentro del cuerpo, los procesos de difusión y de transporte en las membranas celulares de las células del hígado, la capacidad metabólica del hígado determinada "CapMet" depende de forma no lineal del número de moléculas de sustrato administradas n . La función $L(n/M)$ describe esta funcionalidad. La función $L(n/M)$ tiene algunas regiones, donde se muestra la dependencia lineal, pero con dosis de administración crecientes, se aparta cada vez más de una dependencia lineal.

En una realización, $g(P)$ es P - o si el producto es CO_2 , $g(P_{\text{CO}_2})$ es P_{CO_2} , respectivamente - y/o $V(n/M)$ es 1 y/o $h(n)$ es 1 .

En el caso más simple, lo que representa una realización preferida adicional, cuando $g(P_{\text{CO}_2}) = P_{\text{CO}_2}$, $V(n/M)=1$ y $h(n)=1$ la capacidad metabólica hepática se calcula mediante:

$$\text{CapMet} = \text{cal} * [F(^{13}\text{CO}_2, ^{12}\text{CO}_2, t) - f(^{13}\text{CO}_2, ^{12}\text{CO}_2, t)_{\text{nat}}] * P_{\text{CO}_2} * (n/M^2) * L(n/M)$$

En una realización, es posible calcular $F(^{13}\text{CO}_2, ^{12}\text{CO}_2, t)$ de la misma manera que $f(^{13}\text{CO}_2, ^{12}\text{CO}_2)_{\text{nat}}$, p.ej. mediante una de las dos ecuaciones según se ha indicado anteriormente.

La capacidad metabólica CapMet se puede usar para determinar la capacidad hepática máxima posible mediante la variación de la dosificación (n/M) y la interpolación de la función $L(n/M)$. En cualquier caso, la capacidad metabólica puede ser considerada como equivalente a la capacidad metabólica de una enzima seleccionada.

Aunque la capacidad metabólica del hígado se elige aquí como ejemplo ilustrativo, todas las explicaciones anteriores también se pueden transferir a la capacidad metabólica de un órgano en general y también se aplican a la determinación de la capacidad metabólica de una enzima sin más deducciones a la función o potencia metabólica de un órgano.

Con el fin de determinar la concentración del producto, se pueden usar varios métodos de medición de alta sensibilidad y resueltos en el tiempo tales como por ejemplo espectroscopía de absorción de infrarrojos, espectrometría de masas, espectroscopía de resonancia magnética nuclear (espectroscopía de RMN) o la tomografía computarizada (TC), por ejemplo en la forma de TC de volumetría, individualmente o en cualquier combinación entre sí. Mediante una combinación de este tipo, se pueden combinar entre sí las ventajas respectivas de los métodos de medición individuales para de este modo poder hacer declaraciones complementarias o más precisas sobre la capacidad metabólica de la enzima.

Los sustratos adecuados, que por un lado pueden ser metabolizados por las enzimas del individuo examinada y cuyos metabolitos se pueden detectar fácilmente, son metacetina marcada con ^{13}C , fenacetina marcada con ^{13}C , aminopirina marcada con ^{13}C , cafeína marcada con ^{13}C , eritromicina marcada con ^{13}C y/o etoxicumarina marcada

con ^{13}C . El uso de estos sustratos, individualmente o en combinación, en un método de acuerdo con las explicaciones anteriores también se divulga aquí.

Las dosis preferibles aquí son aproximadamente 0,1 mg a 10 mg por kilogramo de peso corporal del individuo, en particular 0,5 mg a 9 mg, en particular 1 mg a 8 mg, en particular 2 mg a 7 mg, en particular 3 mg a 6 mg y especialmente 4 mg a 5 mg por kilogramo de peso corporal del individuo.

Dentro del alcance del presente método, se determina preferiblemente el contenido absoluto de un producto del metabolismo marcado con ^{13}C , en particular el contenido de $^{13}\text{CO}_2$, en el aire exhalado. Aquí, la medición del contenido del producto marcado con ^{13}C , en particular del contenido de $^{13}\text{CO}_2$, en el aire exhalado puede tener lugar tanto en tiempo real como de forma continua. La determinación continua de la concentración del producto del metabolismo marcado con ^{13}C , en particular de la concentración de $^{13}\text{CO}_2$, en el aire exhalado en el instrumento de medición tiene como resultado la detección de más puntos de datos, con la consiguiente mayor resolución y precisión de la curva de medición, calculada a partir de los puntos de datos detectados.

Muchos sustratos, lo que sería adecuado para la detección directa de una dinámica del metabolismo mediante la determinación de la concentración del producto en el aire exhalado por un individuo, son por desgracia difícil de disolver. Eso no es una desventaja cuando se toman por vía oral estos sustratos y posteriormente se activan en la sangre mediante la inducción lumínica (compuestos enjaulados). Las formas alternativas de administración, en parte, dependen del hecho de que estos sustratos se pueden disolver por ejemplo, en una solución acuosa o una solución ligeramente volátil. Para este fin se pueden emplear nanovehículos, que pueden ser modelados específicamente y por lo tanto contienen áreas que pueden absorber el sustrato de una forma suficiente. El desarrollo de nanovehículos ofrece posibilidades de gran alcance y se pueden emplear para el análisis de la respiración en la espectroscopia de infrarrojos, espectrometría de masas, TC y/o espectroscopia de RMN.

Si no se quiere depender de cualquiera de los compuestos o nanovehículos enjaulados, es recomendable el uso de un agente solubilizante tal como, por ejemplo, propilenglicol para lograr una mejor solubilidad del sustrato. El uso de una solución acuosa de ^{13}C -metacetina y un solubilizante, en particular propilenglicol, en un método de acuerdo con las explicaciones anteriores, también se describe en el presente documento.

La concentración del solubilizante, especialmente del propilenglicol, aquí preferiblemente es de 10 a 100 mg/ml, en particular 20 a 80 mg/ml, en particular 30 a 70 mg/ml y especialmente de 40 a 60 mg/ml y la concentración de ^{13}C -metacetina es preferiblemente de 0,2 a 0,6 % en peso por peso, en particular 0,3 a 0,5 % en peso por peso o aproximadamente 0,4 % en peso por peso.

En una realización alternativa, la ^{13}C -metacetina se emplea en una concentración aún mayor, es decir, en una concentración de más de 3 % en peso por peso, particularmente más de 4 % en peso por peso, particularmente más de 5 % en peso por peso. La concentración del solubilizante aquí puede estar en los intervalos mencionados anteriormente.

Otras ventajas y detalles de la invención reivindicada actualmente se explicarán adicionalmente con la ayuda de las figuras de ejemplos de realización.

Fig. 1 muestra una representación gráfica de la cinética de la concentración de un producto metabolizado durante el período de medición y

Fig. 2 muestra una representación gráfica de la no linealidad de la capacidad metabólica del hígado determinada de acuerdo con una realización.

La figura 1 muestra una representación gráfica de la concentración de producto medida en el aire exhalado por un individuo como una función del tiempo. Como sustrato, se administró al individuo metacetina marcada con ^{13}C a una dosis de 2 mg por kilogramo de peso corporal del individuo, en el que el periodo de liberación fue inferior a 60 segundos. En el cuerpo del individuo la metacetina marcada con ^{13}C se metaboliza en el hígado en paracetamol y CO_2 marcado con ^{13}C . Este último se detectó como producto en el aire exhalado por el individuo.

El diagrama de la Figura 1 muestra un aumento de la concentración de $^{13}\text{CO}_2$ en la forma de valor delta respecto al valor basal (valor DOB) en el aire exhalado. Un DOB aquí se refiere a un cambio en la relación $^{13}\text{CO}/^{12}\text{CO}_2$ de una milésima por encima de la relación natural. Los valores de medición obtenidos, ilustrados en la Figura 1, son posteriormente ajustados con una función modelo adecuada. Esto todavía no se ilustra en la Figura 1. A partir de esta función modelo - con una ecuación de la función familiar como tal - se pueden ahora derivar diferentes parámetros que especifican la función. A partir de estos parámetros se pueden sacar conclusiones acerca de la capacidad metabólica del sistema enzimático examinado.

El punto de tiempo del metabolismo máximo de la metacetina (t_{max} , aproximadamente a 6,5 minutos) y el punto de tiempo del metabolismo semi-máximo de la metacetina ($t_{1/2}$, aproximadamente a 1,5 minutos) se indican en la Figura 1.

- Como la metacetina se metaboliza casi exclusivamente en el hígado, con la dinámica del metabolismo especificada es posible rastrear directa e inmediatamente el metabolismo del sustrato administrado por las enzimas existentes en el hígado. De esta manera, la metacetina administrada es desmetilada por la enzima CYP450 1A2 en el hígado. Mediante la interpretación del aumento de la cinética de la metacetina administrada y los parámetros derivados de la misma es ahora posible determinar directamente la función hepática. Aquí, por ejemplo el valor de la concentración máxima del producto en el aire exhalado P_{max} permite hacer una declaración sobre el número de las células hepáticas sanas y el volumen del hígado, que está por lo tanto disponible para el metabolismo; mientras que el aumento en la forma de la(s) constante(s) de tiempo de la función modelo, ajustada a los valores de medición, permite hacer declaraciones sobre la velocidad de entrada del sustrato en las células del hígado. La(s) constante(s) de tiempo de la función modelo por lo tanto permiten hacer declaraciones sobre si el hígado es en absoluto capaz de absorber sustratos. A partir de la dispersión de las constantes de tiempo se pueden extraer conclusiones sobre las diferencias intercelulares con respecto a una susceptibilidad del sustrato de las células del hígado.
- La Figura 2 muestra la no linealidad de la capacidad metabólica del hígado determinada por el metabolismo de la metacetina. La capacidad metabólica se determinó de acuerdo con las fórmulas indicadas anteriormente para diferentes metabolismos de la metacetina observados después de la administración de metacetina en diferentes dosis. Específicamente, se administraron 1 mg de metacetina marcada con ^{13}C por kg de peso corporal, 2 mg/kg, 4 mg/kg y 8 mg/kg.
- Un mg de metacetina marcada con ^{13}C por kg de peso corporal M, así como 2 mg/kg muestran una dependencia lineal en las señales medidas. El aumento de la administración hasta 4 mg/kg muestra 10 % de desviación del comportamiento lineal y la administración de 8 mg/kg muestra más de 20 % de desviación del comportamiento lineal.
- Esta no linealidad se expresa por la función $L(n/M)$, en la que n indica el número de moléculas de sustrato, es decir, moléculas de metacetina y M indica el peso corporal en kg. Esta función $L(n/M)$ forma parte de la curva de ajuste representada en la Figura 2 por la curva de interpolación entre los puntos de medición individuales. La curva recta indica una curva de interpolación hipotética si se asume una dependencia lineal de la capacidad metabólica de la dosis del sustrato, considerándose los efectos como no lineales.

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar la capacidad metabólica de al menos una enzima, que comprende las etapas siguientes:

- 5 • determinación resuelta en el tiempo de la concentración de un producto en el aire exhalado por un individuo, en donde el producto ha sido creado por el metabolismo de un sustrato, administrado previamente al individuo, por al menos una enzima del individuo,
- ajuste de una función modelo a los valores medidos de la concentración del producto, que se obtuvieron mediante la determinación resuelta en el tiempo de la concentración del producto y
- 10 • determinación de la capacidad metabólica de la enzima basándose en parámetros de la función modelo, que especifica la función modelo,

caracterizado por que

15 la concentración del producto solo se determina hasta que se alcanza la concentración máxima del producto en el aire exhalado por el individuo y **por que** la determinación de la capacidad metabólica de la enzima se lleva a cabo basándose en al menos dos parámetros de la función modelo, con la condición de que el valor máximo de la función modelo y de la constante de tiempo de la función modelo no se seleccionen al mismo tiempo como parámetros, en la medida en que la función modelo es una función mono-exponencial y con la condición adicional de que un tiempo de inicio y/o un tiempo final de la función modelo no se seleccionen como parámetros.

20 2. Método según la reivindicación 1, **caracterizado por que** los parámetros se seleccionan del grupo que comprende el valor máximo de la función modelo, el momento i-ésimo de la función modelo con $i = 1, 2, 3, 4, \dots$, el momento central j-ésimo de la función modelo con $j = 1, 2, 3, 4, \dots$, la desviación estándar de la función modelo, una constante de tiempo de la función modelo, el centro de gravedad de las constantes de tiempo, la desviación media de las constantes de tiempo del centro de gravedad, la variación de las constantes de tiempo, la distribución de las constantes de tiempo, la ponderación de las constantes de tiempo, la ponderación de la distribución de las constantes de tiempo, la ponderación de la variación de las constantes de tiempo.

30 3. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la determinación de la concentración del producto se lleva a cabo de forma continua de tal manera que el aire exhalado fluye a través de un aparato de medición que se utiliza para determinar la concentración, en el que se determina una velocidad de flujo del aire exhalado.

35 4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** todo el aire exhalado de al menos un aliento del individuo se usa como el aire exhalado.

5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la determinación de la concentración del producto se lleva a cabo mientras el individuo está esencialmente en una posición de reposo.

40 6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la determinación de la concentración del producto se lleva a cabo mientras el individuo está en una posición tumbada o sentada, en la que la posición de las piernas y/o de la parte superior del cuerpo del individuo cambia menos de 45 grados, en particular menos de 30 grados y, especialmente, menos de 15 grados en comparación con una posición predeterminada.

45 7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la función modelo se puede expresar por la siguiente fórmula:

$$\text{CapMet} = \text{cal} * [F(\text{producto}, t) - f(\text{producto}, t)_{\text{nat}}] * g(P) * h(n) * L(n/M) * (n/M^2) * V(n/M),$$

50 en la que

CapMet indica la capacidad metabólica,
 cal es una constante en la que se tienen en cuenta las correcciones,
 F(producto, t) es una función que expresa la dinámica del producto exhalado,
 f(producto, t)_{nat} es una función que expresa la abundancia natural del producto en el aire exhalado por el individuo antes de la administración del sustrato,
 g(P) es una función que expresa la dependencia entre la velocidad de producción del producto P del individuo y el estado de actividad del individuo,
 h(n) es una función que expresa el número de moléculas de producto generadas por molécula de sustrato,
 L(n/M) es una función que expresa un comportamiento no lineal de la capacidad metabólica dependiente del número de moléculas de sustrato administradas n, en la que M indica el peso corporal del individuo y
 V(n/M) es una función que expresa las dependencias debidas a los diferentes procedimientos de administración del sustrato.

8. Método según la reivindicación 7, **caracterizado por que** $g(P) = P$ y/o $h(n) = 1$ y/o $V(n/M) = 1$.

9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la función modelo se puede expresar por la siguiente fórmula:

5

$$\text{CapMet} = \text{cal} * [F(^{13}\text{CO}_2, ^{12}\text{CO}_2, t) - f(^{13}\text{CO}_2, ^{12}\text{CO}_2, t)_{\text{nat}}] * g(P_{\text{CO}_2}) * h(n) * L(n/M) * (n/M^2) * V(n/M),$$

en la que

CapMet indica la capacidad metabólica,

cal es una constante en la que se tienen en cuenta las correcciones,

$F(^{13}\text{CO}_2, ^{12}\text{CO}_2, t)$ es una función que expresa la dinámica del $^{13}\text{CO}_2$ exhalado como producto o expresión de la dinámica de la relación exhalada $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$,

$f(^{13}\text{CO}_2, ^{12}\text{CO}_2, t)_{\text{nat}}$ es una función que expresa la abundancia natural de $^{13}\text{CO}_2$ y $^{12}\text{CO}_2$ en el aire exhalado por el individuo antes de la administración del sustrato,

$g(P_{\text{CO}_2})$ es una función que expresa la dependencia entre la tasa de producción de P_{CO_2} del individuo y el estado de actividad del individuo,

$h(n)$ es una función que expresa el número de moléculas de CO_2 generadas por molécula de sustrato,

$L(n/M)$ es una función que expresa un comportamiento no lineal de la capacidad metabólica dependiente del número de moléculas de sustrato administradas n , en la que M indica el peso corporal del individuo y

$V(n/M)$ es una función que expresa dependencias debidas a los diferentes procedimientos de administración del sustrato.

10

10. Método según la reivindicación 9, **caracterizado por que** $g(P_{\text{CO}_2}) = P_{\text{CO}_2}$ y/o $h(n) = 1$ y/o $V(n/M) = 1$.

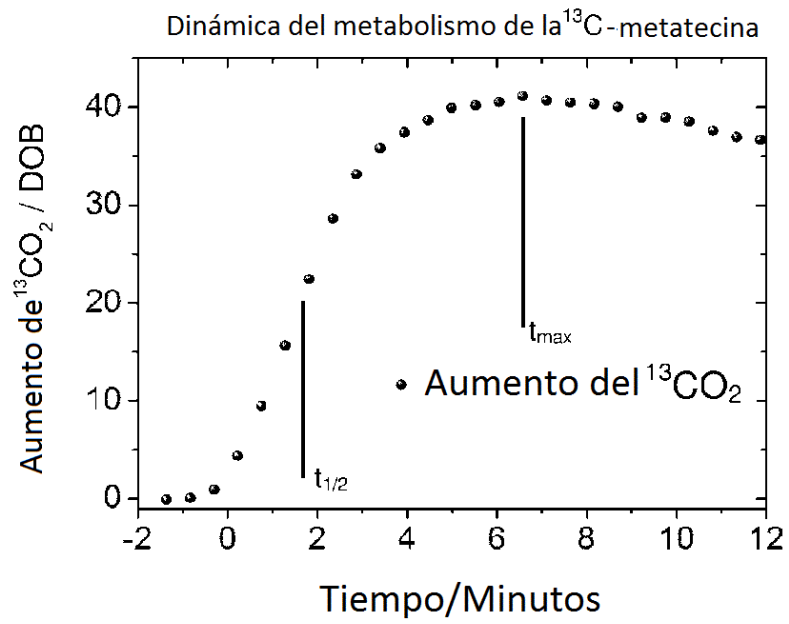


FIG 1

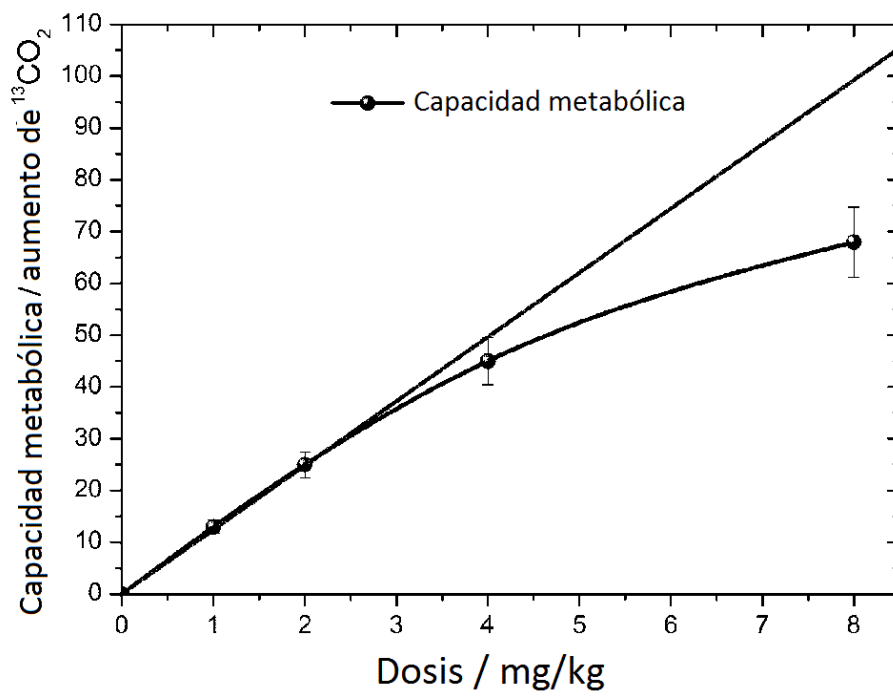


FIG 2