

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 823 349**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.05.2012 PCT/US2012/040008**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2012 WO12166802**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2012 E 12731209 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2020 EP 2715346**

54 Título: **Procedimiento para evaluación de la función hepática y el flujo sanguíneo portal**

30 Prioridad:

31.05.2011 US 201161491429 P

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

06.05.2021

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
COLORADO, A BODY CORPORATE (100.0%)
1800 Grant Street, 8th Floor
Denver, CO 80203, US**

72 Inventor/es:

**EVERSON, GREGORY, THOMAS y
HELMKE, STEVE, MARK**

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 823 349 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

Procedimiento para evaluación de la función hepática y el flujo sanguíneo portal

5 **ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

10 Todas las enfermedades hepáticas tienen características fisiopatológicas comunes con progresión de la enfermedad estimulada por inflamación, acumulación de fibrosis y alteración de la circulación portal. Existen dificultades para monitorear la función hepática y el flujo sanguíneo portal en pacientes con enfermedad hepática. Tales enfermedades incluyen hepatitis C crónica, enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease), colangitis esclerosante primaria (PSC, primary sclerosing colangitis), hepatitis B crónica, enfermedad hepática alcohólica, enfermedad hepática autoinmune, cirrosis criptogénica, hemocromatosis, enfermedad de Wilson, deficiencia de alfa-1-antitripsina y enfermedades colestásicas del hígado.

15 *Hepatitis C crónica.* Se pueden utilizar dos pruebas de función hepática conocidas para medir el flujo sanguíneo portal y se validaron previamente con una cohorte grande de pacientes con hepatitis C crónica. Una de estas pruebas de función hepática, llamada prueba FLOW, mide con precisión el flujo sanguíneo portal a partir de un mínimo de 5 muestras de sangre tomadas durante un período de 90 minutos después de una dosis oral de colato deuterado. La prueba FLOW se describe en Everson, Patente US 2010/0055734, Methods for Diagnosis and Intervention of Hepatic Disorders, presentada el 11 de septiembre de 2009.

20 Otra prueba de función hepática, la prueba SHUNT, comprende la administración simultánea de una dosis intravenosa de ^{13}C -colato y una dosis oral de colato deuterado. La prueba SHUNT se puede utilizar para medir el flujo sanguíneo portal, y el flujo sanguíneo hepático sistémico y por lo tanto, determinar la cantidad de derivación portal sistémica. La prueba SHUNT se describe en Everson et al., Patente US2008/0279766, Methods for Diagnosis and Intervention of Hepatic Disorders, presentada el 26 de enero de 2006. Es deseable una prueba que pueda estimar de manera más simple y rápida el flujo sanguíneo portal y la función hepática en pacientes con hepatitis C crónica. Una prueba sencilla y eficaz para estimar el flujo sanguíneo portal también es aplicable a otras enfermedades hepáticas crónicas.

30 *Enfermedad del hígado graso no alcohólico.* La enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) (Browning et al., 2004, Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the united states: Impact of ethnicity. Hepatology. 40: 1387-1395) puede afectar hasta un tercio de la población de EE. UU. y esta vasta epidemia se oculta principalmente porque las personas generalmente son asintomáticas y tienen "pruebas de función hepática" normales. La prevalencia continúa en aumento junto con los principales factores de riesgo que son la obesidad, el síndrome metabólico y la resistencia a la insulina. La NAFLD puede progresar desde un hígado graso simple, llamado esteatosis, que es relativamente benigno, a la más grave NASH (non-alcoholic steatohepatitis), esteatohepatitis no alcohólica. La hepatitis es una inflamación del hígado y puede deberse, además, al consumo excesivo de alcohol, tal como en la esteatohepatitis alcohólica (ASH, alcoholic steatohepatitis), o infección viral, es decir, la hepatitis C crónica (CHC, chronic hepatitis C). Todas estas enfermedades hepáticas crónicas (CLD, chronic liver diseases) se caracterizan por una fisiopatología similar con inflamación, muerte celular y fibrosis que conducen a una alteración progresiva de la microvasculatura hepática. Aproximadamente el 5 % de los pacientes con NAFLD progresarán a cirrosis (Adams et al., 2005, The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: A population-based cohort study. Gastroenterology. 129: 113-121) y la NAFLD superará a la CHC como la principal indicación de trasplante de hígado.

45 *Colangitis esclerosante primaria*

50 El sello distintivo de la fisiopatología de la PSC es la fibrosis portal que conduce a la hipertensión portal (PHTN, portal hypertension) de forma más temprana en la enfermedad en comparación con otras etiologías de enfermedad hepática. La evaluación de la gravedad de la enfermedad en la PSC carece de un patrón oro, ya que la biopsia hepática tiene un error de muestreo significativo y ya no se recomienda. El gradiente de presión venosa hepática (HVPG, "hepatic venous pressure gradient") es invasivo, caro y poco práctico, y los modelos clínicos se crearon realmente para evaluar la enfermedad en estadio tardío. Existe una necesidad insatisfecha de una evaluación precisa no invasiva de la PSC en el espectro de la gravedad de la enfermedad.

55 Enfermedad crónica del hígado. Aunque la hepatitis C crónica y la NAFLD son las dos enfermedades hepáticas crónicas más comunes en los EE. UU., una prueba de detección para la estimación del flujo sanguíneo portal es deseable para pacientes que tienen, o se sospecha que tienen, cualquier enfermedad hepática crónica, tales como, aunque sin limitación a las mismas, hepatitis C crónica, enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), hepatitis B crónica, colangitis esclerosante primaria (PSC), enfermedad hepática alcohólica, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), enfermedad hepática autoinmune, cirrosis criptogénica, hemocromatosis, enfermedad de Wilson, deficiencia de alfa-1-antitripsina y enfermedades hepáticas colestásicas. Las estimaciones sugieren que 30 millones o más de estadounidenses pueden verse afectados por una enfermedad hepática crónica.

65 *Dificultades en el monitoreo de pacientes con enfermedad hepática crónica.* Actualmente, la única forma de distinguir la esteatohepatitis no alcohólica (NASH) de la esteatosis y de monitorear la progresión de la NASH es mediante una biopsia con aguja, que evalúa el grado de actividad inflamatoria y el estadio de la fibrosis. La biopsia se considera el

patrón oro a pesar de sufrir numerosas fuentes de falta de precisión y los riesgos de un procedimiento invasivo. Los pacientes tienen que estar sedados y una parte de ellos experimentará sangrado y otras complicaciones (Janes y Lindor, 1993, *Ann Intern Med.* 118: 96-98; Seeff et al., 2010, *Clin Gastroenterol Hepatol.* 8: 877-883). La biopsia con aguja es una muestra muy pequeña de un órgano muy grande y es muy difícil obtener trozos lo suficientemente grandes de lugares suficientes para un muestreo adecuado (Vuppalanchiet et al., 2009, *Clin Gastroenterol Hepatol.* 7: 481-486; Bedossa et al., 2003, *Hepatology.* 38: 1449-1457; Regevet et al., 2002, *Am J Gastroenterol.* 97: 2614-2618). La interpretación de la biopsia es subjetiva y depende de la experiencia del observador (Rousselet et al., 2005, *Hepatology.* 41: 257-264) y el tamaño y número de muestras de tejido (Rousselet et al., 2005; Vuppalanchiet et al., 2009). Al describir la progresión de la fibrosis en la CHC, se puede utilizar el sistema Ishak de 6 estadios (Ishak et al., 1995, *J Hepatol.* 22: 696-699), pero más típico es un sistema más simple de 4 estadios (Knodell et al., 1981, *Hepatology.* 1: 431-435; Batts y Ludwig, 1995, *Am J Surg Pathol.* 19: 1409-1417; Scheuer, 1991, *J Hepatol.* 13: 372-374), tal como Metavir (Group, TFMCS, 1994, *Hepatology.* 20: 15-20) que es muy comparable al sistema de 4 estadios que se utiliza para la NASH (Brunt et al., 1999, *Am J Gastroenterol.* 94: 2467-2474; Kleiner et al., 2005, *Hepatology* 41: 1313-1321). Sin embargo, la heterogeneidad de las lesiones en la NASH disminuye la precisión (Ratziu et al., 2005, *Gastroenterology.* 128: 1898-1906). No es práctico realizar una biopsia de un tercio de la población, especialmente porque el procedimiento tiene una tasa de error estimada del 20 % o más. Otros análisis de sangre estándar para el hígado no son muy útiles. Las enzimas hepáticas, tales como ALT o AST pueden aumentar durante los brotes de actividad, pero a menudo se encuentran en el intervalo normal debido a la lenta tasa de progresión. La producción hepática de albúmina o factores de coagulación solo disminuye en los últimos estadios de la CLD. Se desean medios no invasivos para distinguir la NASH de la esteatosis y monitorear con precisión la progresión de la NASH.

Deficiencias de otros procedimientos de prueba no invasivos. La necesidad de una evaluación hepática no invasiva ha llevado a la comercialización de nuevos procedimientos que incluyen paneles de biomarcadores, pruebas metabólicas de aliento y elastografía transitoria. Paneles de biomarcadores (Mukherjee y Sorrell, 2006, *Noninvasive tests for liver fibrosis. Semin Liver Dis.* 26: 337-347; Shah et al., 2009, *Comparison of noninvasive markers of fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. Clin Gastroenterol Hepatol.* 7: 1104-1112), tales como FibroTest®, no son lo suficientemente sensibles para detectar CHC en estadio temprano (Boursier et al., 2009, *Improved diagnostic accuracy of blood tests for severe fibrosis and cirrhosis in chronic hepatitis c. Eur J Gastroenterol Hepatol.* 21: 28-38; Shaheen et al., 2007, *Fibrotest and fibroscan for the prediction of hepatitis c-related fibrosis: A systematic review of diagnostic test accuracy. Am J Gastroenterol.* 102: 2589-2600) o NASH (Ratziu et al., 2006, *Diagnostic value of biochemical markers (fibrotest-fibrosure) for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. BMC Gastroenterol.* 6: 6; Angulo et al., 2007, *The NAFLD fibrosis score: A noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. Hepatology.* 45: 846-854; Wong et al., 2010, *Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology.* 51: 454-462) o para rastrear la progresión porque las proteínas/fragmentos circulantes no pueden informar con precisión sobre la estructura fina, la alteración de la microvasculatura y el deterioro del flujo.

Las pruebas metabólicas son variables porque dependen de las enzimas CYP que varían según el sexo, la edad, la genética, la dieta, los medicamentos y no son sensibles a la enfermedad en estadio temprano porque las enzimas no disminuyen significativamente hasta estadios tardíos. BreathID® tiene una prueba metabólica de metacetina en ensayos de la FDA, pero este procedimiento no pudo detectar CHC en estadio temprano en estudios anteriores (Braden et al., 2005, *13c-methacetin breath test as liver function test in patients with chronic hepatitis c virus infection. Aliment Pharmacol Ther.* 21: 179-185).

FibroScan®, también en ensayos de la FDA, utiliza elastografía transitoria para medir la rigidez del hígado para estimar la fibrosis (Del Poggio y Colombo, 2009, *Is transient elastography a useful tool for screening liver disease? World J Gastroenterol.* 15: 1409-1414). Este procedimiento no es sensible a la CLD en estadio temprano (Del Poggio y Colombo, 2009, *infra*; Friedrich-Rust et al., 2008, *Performance of transient elastography for the staging of liver fibrosis: A meta-analysis. Gastroenterology.* 134: 960-974) que incluye CHC (Shaheen et al., 2007, *infra*, y Rossi et al., 2003, *Validation of the fibrotest biochemical markers score in assessing liver fibrosis in hepatitis c patients. Clin Chem.* 49: 450-454) o NASH (Wong et al., 2010, *Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology.* 51: 454-462) y está comprometida por la obesidad, un factor de riesgo importante para la NAFLD. Es evidente que se necesitan medios no invasivos más eficaces para distinguir la NASH de la esteatosis y monitorear con precisión la progresión de la NASH.

Se da a conocer un procedimiento para estimar el flujo sanguíneo portal y la función hepática en un individuo. La prueba STAT de un solo punto que se da a conocer en el presente documento es una prueba simplificada y conveniente destinada a fines de detección que puede estimar razonablemente el flujo sanguíneo portal a partir de una única muestra de sangre tomada, por ejemplo, 60 minutos después de la administración oral de colato deuterado. Todas las enfermedades hepáticas tienen características fisiopatológicas comunes con progresión de la enfermedad estimulada por inflamación, acumulación de fibrosis y alteración de la circulación portal. Dado que STAT proporciona una estimación precisa del flujo sanguíneo portal, la prueba se desarrolla como diagnóstica con aplicación para todas las enfermedades hepáticas. Las enfermedades hepáticas para las que se podría utilizar el diagnóstico STAT incluyen, entre otras, hepatitis C crónica, enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), colangitis esclerosante primaria (PSC), hepatitis B crónica, enfermedad hepática alcohólica, enfermedad hepática autoinmune, cirrosis criptogénica,

hemocromatosis, enfermedad de Wilson, deficiencia de alfa-1-antitripsina y enfermedades hepáticas colestásicas. STAT puede administrarse como una prueba de detección *in vitro* a un paciente que tiene o se sospecha que tiene alguna enfermedad hepática crónica.

- 5 Los procedimientos de prueba no invasivos que se dan a conocer en el presente documento son superiores a cada uno de estos competidores en cuanto a la capacidad de detectar la CLD en estadio temprano y monitorear con precisión la progresión de la enfermedad, por ejemplo, hepatitis C crónica, colangitis esclerosante primaria (PSC), enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), hepatitis B crónica, enfermedad hepática alcohólica, enfermedad hepática autoinmune, cirrosis criptogénica, hemocromatosis, enfermedad de Wilson, deficiencia de alfa-1-antitripsina y enfermedades hepáticas colestásicas. En una realización específica, la prueba STAT de punto
10 único se utiliza como un cribado para evaluar la progresión de la enfermedad de la hepatitis C crónica (CHC), colangitis esclerosante primaria (PSC) y enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD).

15 **CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION**

La presente invención se define según las reivindicaciones. Por tanto, la presente invención da a conocer un procedimiento *in vitro* para la estimación del flujo sanguíneo portal en un individuo a partir de una única muestra de sangre o suero, comprendiendo el procedimiento: recibir una muestra que consiste en una única muestra de sangre o suero tomada de un individuo que tiene, o se sospecha que tiene o desarrolla, un trastorno hepático, en el que la única muestra de sangre o suero se toma en un punto temporal que se selecciona entre 30 y 180 minutos después de la administración oral al individuo de un compuesto de colato distinguible, en el que no se coadministra por vía intravenosa ningún otro compuesto de colato distinguible, y en el que se ha tomado la muestra del individuo en un único punto temporal específico después de la administración oral al individuo del compuesto de colato distinguible; medir la concentración del compuesto de colato distinguible administrado por vía oral en la única muestra de sangre o suero; y comparar la concentración del compuesto de colato distinguible en la única muestra de sangre o suero del individuo con un valor de corte de la concentración de compuesto de colato distinguible o valores de corte establecidos a partir de una población de pacientes conocida, en el que la concentración de compuesto de colato distinguible en la muestra comparada con el valor de corte de la concentración del compuesto de colato distinguible o los valores de corte en la población de pacientes conocida es una estimación del flujo sanguíneo portal en el individuo.

30 En una realización, el compuesto de colato distinguible que se administra por vía oral es ácido cólico estable marcado isotópicamente.

35 En una realización, el ácido cólico marcado isotópicamente se selecciona de 24-13C ácido cólico o 2,2,4,4-2H ácido cólico.

40 En una realización, la única muestra de sangre o suero se toma en un punto de tiempo que se selecciona entre 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175 o 180 minutos, o en cualquier punto de tiempo intermedio, después de la administración oral del compuesto de colato distinguible.

En una realización, la única muestra de sangre o suero se toma en un punto de tiempo que se selecciona entre 45, 60 o 90 minutos después de la administración oral del compuesto de colato distinguible.

45 En una realización, el procedimiento comprende, además, las etapas de convertir la concentración del compuesto de colato distinguible en la muestra mediante la utilización de una ecuación, en una tasa de flujo (ml/min/kg) estimada en el individuo; y comparar la tasa de flujo estimada en el individuo con un valor de corte de la tasa de filtración portal hepática (FLOW) o valores de corte de los valores establecidos a partir de una población de pacientes conocida.

50 En una realización, la etapa de medición comprende cuantificar la concentración del compuesto de colato distinguible en la muestra por GC-MS o HPLC-MS.

La memoria descriptiva da a conocer un procedimiento para estimar el flujo sanguíneo portal y la función hepática en un individuo que comprende administrar por vía oral ácido cólico marcado isotópicamente a un individuo sospechoso de tener o de estar desarrollando un trastorno hepático, por ejemplo, CHC, NAFLD o PSC. En un aspecto, la prueba STAT es una prueba simplificada conveniente destinada a fines de detección que puede estimar razonablemente el flujo sanguíneo portal a partir de una única muestra de sangre tomada 60 minutos después de la administración oral de colato deuterado.

60 La prueba de Hepquant SHUNT (SHUNT) descrita anteriormente implica la coadministración oral e intravenosa de compuestos de colato distinguibles y la toma y análisis, como mínimo, de aproximadamente 5 muestras de sangre en intervalos de aproximadamente 90 minutos después de la administración. La prueba SHUNT proporciona aclaramientos de colato por vía oral e intravenosa y una evaluación integral de la derivación hepática del flujo sanguíneo hepático y de la función hepática. La prueba Hepquant FLOW (FLOW) descrita anteriormente implica la administración oral de un compuesto de colato distinguible y la toma y análisis, como mínimo, de aproximadamente 5 muestras de sangre a intervalos durante aproximadamente 90 minutos después de la administración para dar un
65

aclaramiento oral del colato (circulación portal, tasa de filtración hepática portal; HFR (hepatic filtration rate) portal). La prueba Hepquant STAT descrita en el presente documento implica la administración oral de un compuesto de colato distinguible y la toma de una única muestra de sangre en un punto de tiempo definido, por ejemplo, 60 minutos después de la administración. Se ha descubierto, sorprendentemente, que el análisis de una única muestra de sangre se puede utilizar para estimar FLOW y se correlaciona, además, con SHUNT. A medida que avanza la enfermedad hepática, FLOW, que evalúa el flujo sanguíneo portal, se reduce, mientras que SHUNT, que evalúa la derivación portal-sistémica, aumenta. STAT, que utiliza una única muestra de sangre para inferir FLOW alterada, también aumenta a medida que avanza la enfermedad hepática.

En el presente documento se da a conocer un procedimiento para la estimación del flujo sanguíneo portal en un individuo, comprendiendo el procedimiento: administrar por vía oral un compuesto de colato distinguible a un individuo con un trastorno hepático, o que se sospecha que tiene o desarrolla el mismo, en el que ningún otro colato distinguible se coadministra por vía intravenosa; tomar una muestra de sangre del individuo en un único punto de tiempo específico después de la administración oral del colato distinguible al individuo; medir la concentración del colato distinguible administrado por vía oral en la muestra de sangre; y comparar la concentración del colato distinguible en la muestra de sangre con valores o valores de corte establecidos a partir de una población de pacientes conocida, como una estimación del flujo sanguíneo portal en el individuo.

En un aspecto, el compuesto de colato distinguible administrado por vía oral es un ácido cólico marcado isotópicamente. En un aspecto, el término ácido cólico se refiere a la sal sódica del ácido cólico. Tal como se utiliza en el presente documento, los términos compuesto de colato, colato y ácido cólico se utilizan indistintamente. En aspectos particulares, el ácido cólico marcado isotópicamente se selecciona entre 24-13C ácido cólico o 2,2,4,4-2H ácido cólico. En un aspecto específico, el ácido cólico es 2,2,4,4-2H ácido cólico. En otros aspectos diversos, la única muestra de sangre se toma en un punto de tiempo que se selecciona entre aproximadamente entre 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, o 180 minutos, o en cualquier punto de tiempo intermedio, después de la administración oral del compuesto de colato distinguible. En un aspecto específico, la muestra de sangre se toma en cualquier punto de tiempo entre 30 y 180 minutos. En aspectos particulares, la única muestra de sangre se toma en un punto de tiempo que se selecciona entre aproximadamente 45, 60 o 90 minutos después de la administración oral del compuesto de colato distinguible. En un aspecto específico, la única muestra de sangre se toma aproximadamente 60 minutos después de la administración oral del compuesto de colato distinguible. En otro aspecto específico, la única muestra de sangre se toma aproximadamente 45 minutos después de la administración oral del compuesto de colato distinguible. En aspectos adicionales, la etapa de medición comprende cuantificar la concentración del compuesto de colato distinguible en la muestra por GC-MS o HPLC-MS. En un aspecto particular, la muestra se analiza mediante HPLC-MS. El procedimiento puede comprender, además, la etapa de comparar la concentración de colato distinguible en la muestra de sangre con la concentración de colato distinguible en una o más muestras anteriores del mismo individuo a lo largo del tiempo.

Cuando la concentración del colato distinguible en la muestra de sangre está por encima de un valor de corte establecido en la etapa de comparación de la prueba STAT, el procedimiento puede comprender, además, la evaluación de la circulación portal mediante la determinación del aclaramiento de colato oral en el individuo en la prueba FLOW; que comprende las etapas de administrar por vía oral un ácido cólico marcado isotópicamente a un individuo con un trastorno hepático, o con sospecha de tener o desarrollar el mismo, en el que no se coadministra por vía intravenosa ningún compuesto de ácido cólico adicional; tomar muestras del individuo a intervalos durante un período de menos de 3 horas después de la administración de los agentes al individuo; y medir el aclaramiento del ácido cólico marcado isotópicamente administrado por vía oral para evaluar la circulación portal en el individuo. La evaluación de la circulación portal en el individuo puede ser un indicador de la progresión, como mínimo, de una afección hepática en un individuo.

Cuando la concentración del colato distinguible en la muestra de sangre está por encima de un valor de corte establecido en la etapa de comparación de la prueba STAT, el procedimiento puede comprender, además, la evaluación de la derivación de colato en el individuo; la prueba adicional de SHUNT comprende las etapas de: administrar por vía oral un primer ácido cólico distinguible marcado isotópicamente a un individuo que tiene, o se sospecha que tiene o desarrolla, un trastorno hepático; coadministrar por vía intravenosa un segundo ácido cólico distinguible marcado isotópicamente al individuo; tomar muestras de sangre o suero a intervalos durante un período de menos de 3 horas después de la administración de los agentes al individuo; cuantificar el primero y el segundo ácido cólico marcado isotópicamente en las muestras mediante HPLC-MS; y calcular la derivación de ácido cólico mediante la fórmula: $\text{AUCoral/AUCiv} \times \text{Doseiv/Doseoral} \times 100 \%$; en el que AUCoral es el área bajo la curva de las concentraciones séricas del primer ácido cólico y AUCiv es el área bajo la curva del segundo ácido cólico; y en el que la derivación de colato es un indicador de la función hepática del individuo.

En la prueba SHUNT, la administración oral del primer ácido cólico marcado y la coadministración intravenosa del segundo ácido cólico marcado pueden realizarse simultáneamente. En la prueba SHUNT adicional, las muestras de sangre pueden tomarse del individuo a los 5, 20, 45, 60 y 90 minutos después de la dosis.

65

La presente memoria descriptiva da a conocer un kit de componentes para la estimación del flujo sanguíneo portal en un individuo mediante la prueba STAT; el kit comprende un primer componente que comprende uno o más viales, comprendiendo cada frasco una única dosis oral del compuesto de colato distinguible; y un segundo componente que comprende uno o más conjuntos de tubos de recogida de muestras de suero sanguíneo estériles etiquetados. El kit puede comprender, además, uno o más conjuntos de viales de transporte etiquetados, conteniendo cada vial de transporte un patrón interno de ácido cólico.

El kit también puede comprender una única caja tanto para enviar los frascos a un médico como para enviar las muestras del médico a un laboratorio de referencia para su análisis. El kit puede incluir el compuesto de colato distinguible 2,2,4,4-²H ácido cólico. El ²H-ácido cólico puede estar en forma de polvo o en forma de solución.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra los resultados de la prueba FLOW descrita anteriormente en controles sanos y en todos los estadios de CHC. Los datos de HALT-C (CHC en estadio tardío, compensada estable, Ishak F2-6) se combinaron con datos del estudio temprano de CHC (controles sanos (C) y CHC en estadio temprano, Ishak F1-2) y un estudio de donantes sanos para trasplante de hígado de donante vivo (controles sanos (C)). Los datos de los pacientes F2 no fueron diferentes entre los estudios y se combinaron. El flujo sanguíneo portal (media +/- SEM) para controles sanos y los pacientes con todos los estadios de CHC se representaron como una función continua que demuestra la capacidad para evaluar todo el espectro de la enfermedad. La n de cada grupo se indica sobre su símbolo. La prueba HepQuant FLOW podría aumentar la detección temprana de la enfermedad hepática cuando es más tratable.

La figura 2 muestra los datos de la prueba SHUNT descrita anteriormente en controles sanos y todas las etapas de CHC. Los datos de HALT-C se combinaron con datos del estudio temprano de CHC (controles sanos (C) y CHC en estadio temprano, Ishak F1-2) y un estudio de donantes sanos para trasplante de hígado de donante vivo (controles sanos (C)). Los datos de los pacientes F2 no fueron diferentes entre los estudios y se combinaron. La fracción de derivación portal sistémica (media +/- SEM) para controles sanos y pacientes con todas las etapas de CHC se representaron como una función continua que demuestra la capacidad para evaluar todo el espectro de la enfermedad. La n de cada grupo se indica sobre su símbolo. La mayor variabilidad en F1 se debe al pequeño número de pacientes que se diagnosticaron en este estadio temprano. La prueba de HepQuant SHUNT podría aumentar la detección temprana de la enfermedad hepática cuando es más tratable.

La figura 3 muestra los datos de la prueba FLOW descrita anteriormente en controles sanos y todas las etapas de CHC. Los datos de HALT-C (CHC en estadio tardío, compensado estable, METAVIR F1-4) se combinaron con datos del estudio temprano de CHC (controles sanos (C) y CHC en estadio temprano, METAVIR F1) y un estudio de donantes sanos para trasplante de hígado de donantes vivos (controles sanos (C)). Los datos de los pacientes F1 no fueron diferentes entre los estudios y se combinaron. El flujo sanguíneo portal (media +/- SEM) para controles sanos y los pacientes con todos los estadios de CHC se representaron como una función continua que demuestra la capacidad para evaluar todo el espectro de la enfermedad. La n de cada grupo se indica sobre su símbolo.

La figura 4 muestra los datos de la prueba SHUNT descrita anteriormente en controles sanos y todos los estadios de CHC. Los datos de HALT-C (CHC en estadio tardío, compensado de forma estable, METAVIR F1-4) se combinaron con datos del estudio temprano de CHC (controles sanos (C) y CHC en estadio temprano, METAVIR F1) y un estudio de donantes sanos para trasplante de hígado de donantes vivos (controles sanos (C)). Los datos de los pacientes F1 no fueron diferentes entre los estudios y se combinaron. La fracción de derivación portal sistémica (media +/- SEM) para controles sanos y pacientes con todas las etapas de CHC se representó como una función continua que demuestra la capacidad para evaluar todo el espectro de la enfermedad. La n de cada grupo se indica sobre su símbolo.

La figura 5 muestra los valores de corte y la correlación de los resultados de la prueba STAT (uM) descritos en el presente documento en un único punto de tiempo a 45 minutos después de la administración oral de 4D-colato ([2,2,4,4-²H]-Ácido cólico) cuando se compara con la prueba FLOW de circulación portal en 5 puntos de tiempo durante 90 minutos después de la administración oral de 4D colato. La línea de puntos horizontal indica el valor de corte (< 9,5 ml/min/kg) para pacientes FLOW con alto riesgo de descompensación dentro de los 2 años posteriores a la prueba. Las líneas verticales de puntos indican los valores de corte de tres intervalos de resultados STAT: A (riesgo bajo), B (riesgo intermedio) y C (riesgo alto).

La figura 6 ilustra la aplicación clínica de la prueba STAT para un paciente con sospecha de tener enfermedad hepática. Por ejemplo, un resultado de prueba STAT de 45 minutos que se encuentre dentro del intervalo de aproximadamente 0 hasta aproximadamente 0,6 uM (intervalo "A") probablemente prediga que el resultado de la prueba FLOW también estará dentro del intervalo normal para la circulación portal. El paciente con un resultado de prueba STAT que se encuentre dentro del intervalo A puede seguirse, por ejemplo, mediante la utilización de una prueba STAT anual. Un resultado de la prueba STAT que se encuentre dentro del intervalo de aproximadamente 0,6 uM hasta aproximadamente 1,50 uM (intervalo "B") probablemente prediga que el resultado de la prueba FLOW estará dentro de un intervalo comprometido para la circulación portal. El paciente con un resultado de la prueba STAT que se encuentre dentro del intervalo B debe evaluarse más a fondo, por ejemplo, con las pruebas FLOW o SHUNT, para

- 5 evaluar la circulación portal y el aclaramiento y derivación de colato, respectivamente. Es probable que un resultado de la prueba STAT por encima de aproximadamente 1,50 uM (intervalo C) prediga una enfermedad avanzada. El paciente con un resultado de la prueba STAT que se encuentre dentro del rango C debe evaluarse más a fondo, por ejemplo, mediante pruebas adicionales con FLOW o SHUNT o mediante procedimientos de cribado clínico, tales como EGD (endoscopia superior, esofagogastroduodenoscopia) para várices o imágenes radiológicas (ecografía (US, ultrasonography), tomografía computarizada (CT, computed tomography), resonancia magnética (MRI, magnetic resonance imaging) para el HCC ("hepatocellular carcinoma", carcinoma hepatocelular).
- 10 La figura 7 ilustra la aplicación clínica de la prueba STAT para un paciente que ingresa en tratamiento por enfermedad hepática. El paciente puede monitorearse periódicamente para detectar mejoría o progresión de la enfermedad. Por ejemplo, en dependencia del resultado de la prueba STAT, puede seguirse al paciente para una mejoría cuantitativa con pruebas anuales STAT, FLOW o SHUNT.
- 15 La figura 8 muestra la precisión y correlación ($R^2 = 0,8965$) de la prueba STAT de 60 minutos en relación con la prueba FLOW de pacientes con CHC temprana y la ecuación para interconvertir los valores log STAT y log FLOW para obtener un estimado de la tasa de flujo.
- 20 La figura 9A muestra un diagrama de cajas para STAT en pacientes con CHC en estadio F0-F2 de fibrosis de Ishak en comparación con controles sanos. STAT aumentó significativamente en pacientes con HCV F0-F2 en comparación con los controles.
- 25 La figura 9B muestra la sensibilidad de las pruebas estándar de laboratorio en comparación con la prueba STAT en la detección de pacientes con HCV crónica en estadio temprano.
- La figura 9C muestra ALT, STAT con valores de corte y pruebas de cribado combinadas para la identificación de pacientes con HCV en estadio temprano.
- 30 La figura 10A muestra los resultados promedio de la prueba HFR portal (FLOW) en pacientes con PSC en comparación con controles sanos.
- La figura 10B muestra el promedio de las puntuaciones MELD en 38 pacientes con PSC.
- 35 La figura 10C muestra los resultados promedio de la prueba HFR portal (FLOW) en pacientes con PSC no incluidos en la lista para trasplante en comparación con pacientes con PSC incluidos en la lista para trasplante de hígado (LT, liver transplant).
- La figura 10D muestra puntuaciones MELD promedio en pacientes con PSC no incluidos en la lista para trasplante en comparación con pacientes con PSC incluidos en la lista para LT.
- 40 La figura 10E muestra el promedio de los resultados de la prueba Portal HFR (FLOW) en pacientes con PSC sin várices en comparación con pacientes con PSC con várices.
- 45 La figura 10F muestra el promedio de las puntuaciones MELD en pacientes con PSC sin várices en comparación con pacientes con PSC con várices.
- 50 La figura 11 muestra SHUNT y HFR portal en controles sanos y pacientes con PSC: □ muestra valores promedio para controles sanos; ◇ muestra el promedio de pacientes con PSC no incluidos en la lista de LT; círculos abiertos ○ muestra pacientes con PSC individuales sin várices; círculos sombreados ◐ muestra pacientes con PSC individuales incluidos en la lista con várices sin ascitis; círculos sólidos ● muestra pacientes individuales con PSC incluidos en la lista con várices y ascitis. Además, se muestran los valores individuales para los pacientes A, B, C y D de PSC incluidos en la lista; con várices sin ascitis (B, D), y con várices y ascitis (A, C).
- 55 La figura 12 muestra HFR (Portal HFR, FLOW) para pacientes con PSC en diversos estadios de la enfermedad en comparación con controles sanos.
- La figura 13 muestra SHUNT para pacientes con PSC en diversos estadios de la enfermedad en comparación con controles sanos.
- 60 La figura 14 muestra STAT para pacientes con PSC en diversos estadios de la enfermedad en comparación con controles sanos.
- La figura 15 muestra los resultados de las pruebas FLOW y SHUNT con valores de corte de FLOW y SHUNT para controles sanos individuales y pacientes con PSC.
- 65 La figura 16 muestra los resultados de las pruebas FLOW y SHUNT con valores de corte de FLOW y SHUNT para controles sanos individuales y pacientes con HCV.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5 Los procedimientos y pruebas que se dan a conocer en el presente documento se basan en una nueva visión de la enfermedad hepática crónica, que es la interrupción del flujo sanguíneo portal, no la fibrosis per se, lo que es perjudicial y debe ser el objetivo del análisis de la función hepática.

10 Un ejemplo de enfermedad hepática crónica es la NAFLD, que puede progresar desde un hígado graso simple llamado esteatosis, que es relativamente benigno, a la esteatohepatitis no alcohólica (NASH) más grave. Además, la hepatitis también puede deberse al consumo excesivo de alcohol, como en la esteatohepatitis alcohólica (ASH), o a una infección viral, es decir, la hepatitis C crónica (CHC). Otra enfermedad hepática crónica es la PSC. Todas estas enfermedades hepáticas crónicas (CLD) se caracterizan por una fisiopatología similar con inflamación, muerte celular y fibrosis que conducen a una alteración progresiva de la microvasculatura hepática, por lo que una prueba para medir el flujo sanguíneo portal funcionará para la evaluación de todas las CLD.

15 Casi todas las otras pruebas propuestas para evaluar la enfermedad hepática crónica se han centrado en la fibrosis, ya sea en los biomarcadores séricos o en el cambio en la elasticidad del tejido (Mukherjee y Sorrell, 2006, Noninvasive tests for liver fibrosis. Semin Liver Dis. 26: 337-347; Manning and Afdhal, 2008. Diagnosis and quantitation of fibrosis. Gastroenterology. 134: 1670-1681; Poynard et al., 2008, Concordance in a world without a gold standard: A new non-invasive methodology for improving accuracy of fibrosis markers. PLoS One. 3: e3857).

20 Tanto la fibrosis como la alteración de la microvasculatura aumentan a medida que avanza la enfermedad, pero no están perfectamente vinculadas. Esto explica por qué los pacientes con fibrosis extrema, cirrosis, pueden permanecer estables mientras su flujo portal se mantenga por encima de un umbral crítico. Esto explica, además, por qué los pacientes sólo con fibrosis moderada pero con un flujo gravemente alterado pueden tener complicaciones graves. Esta nueva apreciación puede cambiar todo el enfoque de la evaluación de la enfermedad hepática. Al dirigirse al flujo portal, los médicos pueden detectar fácilmente la enfermedad hepática en estadio temprano, evaluar con precisión el estado de sus pacientes y predecir los resultados clínicos. Pueden resultar tratamientos más efectivos para la enfermedad hepática si se realizan investigaciones sobre nuevas terapias y nuevos fármacos que se centran en mejorar y/o mantener el flujo portal.

25 El nuevo enfoque en el flujo portal podría revolucionar la forma en que se clasifica y se monitorea la enfermedad hepática crónica. La biopsia aún sería útil en el diagnóstico inicial para descartar enfermedades autoinmunes y trastornos hereditarios, pero no se utilizaría para evaluar el estado de los pacientes o hacer un seguimiento a lo largo del tiempo. El deterioro del flujo portal se utilizaría para guiar el tratamiento y determinar cuándo sería apropiado detectar várices y carcinoma hepatocelular. El flujo portal sería un nuevo criterio de valoración determinado con mayor precisión para los ensayos clínicos.

30 La prueba STAT se puede utilizar para estimar el flujo sanguíneo portal y cribar poblaciones grandes para la detección de pacientes con enfermedad hepática crónica, incluida la hepatitis C crónica, la PSC y la NAFLD. La prueba STAT descrita en el presente documento está destinada a fines de detección. La relación de STAT con los procedimientos de la técnica anterior para determinar el aclaramiento del colato de la circulación portal, específicamente las pruebas FLOW y SHUNT, se ha validado mediante la utilización de una cohorte grande de pacientes con hepatitis C crónica. La utilización de las pruebas FLOW y SHUNT con respecto a pacientes con hepatitis C crónica fue asunto de las Patentes US 2010/0055734 y US2008/0279766 anteriores. STAT se puede utilizar para definir la gravedad de la enfermedad en pacientes con hepatitis C crónica, mediante el rastreo de la progresión de la enfermedad y la respuesta a los tratamientos.

35 Los transportadores entéricos altamente conservados (ISBT, MRP3) se dirigen específicamente al colato oral hasta la circulación portal. Los transportadores hepáticos altamente conservados (NTCP, OATP) eliminan el colato de la circulación portal y sistémica. Por tanto, la evaluación cuantitativa no invasiva de la circulación portal se puede realizar mediante la administración a un paciente de un compuesto de colato distinguible y la evaluación de un nivel del compuesto de colato distinguible en muestras de sangre extraídas en varios puntos de tiempo múltiples para determinar una curva de aclaramiento oral.

40 El aclaramiento de colato oral (dosis/área bajo la curva de aclaramiento oral) es una medida del flujo sanguíneo portal efectivo (FLOW). El aclaramiento del colato intravenoso (dosis/área bajo la curva de aclaramiento intravenoso) es una medida del flujo sanguíneo hepático total. La relación de aclaramiento intravenoso respecto a oral evalúa la fracción de derivación sistémica portal (SHUNT). En un aspecto, la memoria descriptiva da a conocer procedimientos en los que el aclaramiento del colato oral se puede estimar a partir de la concentración sérica de colato oral en un único punto de tiempo, por ejemplo, 60 minutos después de la administración (STAT).

45 En el hígado enfermo, a medida que se escapa más sangre de la extracción por derivación intrahepática y extrahepática a la circulación sistémica, aumenta SHUNT, disminuye HFR o el flujo portal y aumenta STAT. En un individuo de control normal, el flujo sanguíneo portal efectivo (FLOW) es alto en un hígado sano debido a la baja

resistencia vascular. La derivación portal sistémica (SHUNT) es mínima. El colato oral a los 60 minutos (STAT) es bajo. Por ejemplo, en un control sano $FLOW = 37 \text{ ml min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$, $SHUNT = 18 \%$ y $STAT = 0,2 \mu\text{M}$. Sin embargo, en un individuo con enfermedad hepática, la inflamación, la fibrosis y el aumento de la resistencia vascular reducen el flujo sanguíneo portal efectivo (FLOW). Aumenta la derivación portal-sistémica (SHUNT). El colato oral a los 60 minutos (STAT) es alto. Por ejemplo, en un paciente F2 con CHC, $FLOW = 9 \text{ ml min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$, $SHUNT = 35 \%$ y $STAT = 1,6 \mu\text{M}$.

STAT se puede utilizar para estimar el flujo sanguíneo portal y utilizar como prueba de cribado para detectar, definir la gravedad de la enfermedad, monitorear la progresión de la enfermedad y monitorear la respuesta al tratamiento en pacientes que tienen, o se sospecha que tienen, enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD). La prueba STAT puede utilizarse como una prueba de detección para ayudar al médico a distinguir la NASH de la esteatosis, así como una prueba de cribado para detectar, definir la gravedad de la enfermedad, rastrear la progresión de la enfermedad y monitorear la respuesta al tratamiento en pacientes que tienen NASH.

STAT se puede aplicar para estimar el flujo sanguíneo portal y utilizar como prueba de detección en cualquier enfermedad hepática crónica. Por ejemplo, STAT se puede utilizar como una prueba de cribado para detectar, definir la gravedad de la enfermedad, rastrear la progresión de la enfermedad y monitorear la respuesta al tratamiento en pacientes que tienen, o se sospecha que tienen, cualquier enfermedad hepática crónica, tales como, pero sin limitación a las mismas, hepatitis C crónica, enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD), hepatitis B crónica, enfermedad hepática alcohólica, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), enfermedad hepática autoinmune, cirrosis criptogénica, hemocromatosis, enfermedad de Wilson, deficiencia de alfa-1-antitripsina y enfermedades hepáticas colestásicas.

Compuesto administrado por vía oral.

En varias realizaciones, el flujo portal puede evaluarse mediante la utilización de cualquier compuesto de prueba administrado por vía oral con las siguientes características: absorción del 100 % después de la administración oral, extracción hepática alta (>70 % en el primer paso a través del hígado de un individuo sano), y eliminación de la sangre o plasma exclusivamente por el hígado. El compuesto de prueba para la medición del flujo portal puede ser un compuesto endógeno o un xenobiótico.

Varios ácidos biliares endógenos y conjugados de ácidos biliares cumplen estos criterios; por ejemplo, el compuesto de prueba puede seleccionarse entre ácido cólico, cualquier conjugado de glicina de ácido cólico, cualquier conjugado de taurina de ácido cólico; ácido quenodesoxicólico, cualquier conjugado de glicina de ácido quenodesoxicólico, cualquier conjugado de taurina de ácido quenodesoxicólico; ácido desoxicólico, cualquier conjugado de glicina de ácido desoxicólico, cualquier conjugado de taurina de ácido desoxicólico; o ácido litocólico, o cualquier conjugado de glicina o conjugado de taurina del mismo. En varios aspectos, cualquier ácido biliar o conjugado de ácido biliar puede estar en forma de una sal fisiológicamente aceptable, por ejemplo, la sal sódica del ácido cólico. En un aspecto, el término ácido cólico se refiere a la sal sódica del ácido cólico. El ácido cólico (colato) es el compuesto de prueba en una realización preferente. Tal como se utiliza en el presente documento, los términos compuesto de colato, colato y ácido cólico se utilizan indistintamente.

Los xenobióticos que podrían administrarse por vía oral y que además tienen una alta eliminación hepática al primer paso podrían incluir, aunque sin limitación a los mismos, propranolol, nitroglicerina o derivado de nitroglicerina, o galactosa y compuestos relacionados.

En un aspecto, el compuesto de prueba es propranolol. El propranolol es un β bloqueador no selectivo y se ha demostrado que es eficaz para la prevención del sangrado y resangrado por várices, y se utiliza ampliamente como farmacoterapia para el tratamiento de la hipertensión portal en pacientes con cirrosis. (Suk et al., 2007, Effect of propranolol on portal pressure and systemic hemodynamics in patients with liver cirrhosis and portal hypertension: a prospective study. *Gut and Liver* 1 (2): 159-164). El hígado elimina casi por completo el propranolol. Se ha demostrado que el aclaramiento plasmático total de (+)-propranolol constituye una buena estimación del flujo sanguíneo hepático en pacientes con función hepática normal. (Weiss et al., 1978 (+)-Propranolol clearance, an estimation of hepatic blood flow in man, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 5: 457-460).

En otro aspecto, el compuesto de prueba es 5-mononitrato de isosorbide. Este compuesto puede administrarse por vía oral y se detecta en plasma mediante HPLC-EIMS. (Sun et al., High performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometric determination of isosorbide 5-mononitrate in human plasma, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Sci.* 1 de febrero de 2007; 846(1-2):323-8).

En un aspecto, el compuesto de prueba es galactosa. La capacidad de eliminación de galactosa (GEC) se ha utilizado como índice de la función hepática residual. La galactosa en la prueba GEC generalmente se administra por vía intravenosa a una dosis de 0,5 mg/kg y se toman muestras venosas cada 5 minutos entre 20 y 60 minutos. El aclaramiento de galactosa está disminuido en individuos con enfermedad hepática crónica y cirrosis. El hecho de que este carbohidrato tenga una alta tasa de extracción, sin embargo, hace que el metabolismo de la galactosa dependa del flujo sanguíneo hepático y de la masa funcional hepática. (Tygstrup N, Determination of the hepatic elimination capacity (Lm) of galactose by a single injection, *Scand J Lab Clin invest*, 18 Suppl 92, 1966, 118-126). El carbohidrato

galactosa se metaboliza casi exclusivamente en el hígado, y la tasa de eliminación a concentraciones sanguíneas es lo suficientemente alta como para producir una conversión enzimática casi saturada, la GEC se utiliza como una medida cuantitativa de la capacidad metabólica del hígado. Un estudio ha demostrado que entre los pacientes con cirrosis recién diagnosticada y una GEC disminuida, la GEC fue un fuerte indicador de mortalidad. (Jepsen et al., 2009, The galactose elimination capacity and mortality in 781 Danish patients with newly-diagnosed liver cirrhosis: a cohort study. BMC Gastroenterol. 2009, 9:50).

En ciertos aspectos, se incorporan uno o más isótopos diferenciables en el compuesto de prueba seleccionado, con el fin de utilizarlos para evaluar la función hepática. El isótopo diferenciable puede ser un isótopo radiactivo o estable incorporado en el compuesto de prueba. Pueden utilizarse isótopos estables (^{13}C , ^2H , ^{15}N , ^{18}O) o isótopos radiactivos (^{14}C , ^3H , Tc-99m). Las ventajas de los isótopos estables son la falta de exposición a la radiactividad, la abundancia natural y la especificidad de los análisis utilizados para la identificación del compuesto de prueba (determinación de masa por espectrometría de masa). Los compuestos estables marcados isotópicamente están disponibles comercialmente. Por ejemplo, los compuestos de ácido cólico marcados con ^{13}C y ^2H pueden adquirirse en Sigma-Aldrich, CDN Isotopes y Cambridge Isotope Laboratories, Inc.

En otros aspectos, el compuesto de prueba puede ser un compuesto endógeno no marcado, tal como colato no marcado. En el aspecto que utiliza un compuesto endógeno no marcado, la dosis oral de prueba es suficientemente grande, por ejemplo, 2,5-7,5 mg/kg de colato, para que la concentración sérica resultante sea distinguible por encima de la concentración sérica de referencia de ese compuesto endógeno.

La plataforma para detectar y medir el compuesto de prueba en la muestra de sangre del individuo depende del tipo de compuesto de prueba administrado. Para los isótopos estables, la concentración del compuesto de prueba en una muestra de sangre puede medirse, por ejemplo, mediante GC/MS o LC/MS. Para los compuestos de prueba radiomarcados, por ejemplo, puede emplearse espectroscopía de centelleo. Para el análisis de los compuestos no marcados, pueden emplearse, por ejemplo, autoanalizadores, luminiscencia o ELISA. Se contempla, además, que las pruebas de tira con un revelador de color sensible directa o indirectamente a la presencia y cantidad del compuesto de prueba pueden emplearse para utilizar en una prueba casera o en una prueba en el punto de atención médica.

Flujo sanguíneo portal.

El flujo sanguíneo portal puede cuantificarse de forma no invasiva y precisa mediante la explotación de la fisiología única del ácido biliar endógeno, colato, que puede marcarse, por ejemplo, con isótopos seguros, estables no radiactivos. Una de estas pruebas de función hepática, llamada prueba FLOW, mide con precisión el flujo sanguíneo portal de un mínimo de 5 muestras de sangre tomadas durante un período de 90 minutos después de una dosis oral de colato deuterado. La prueba FLOW se describe en Everson, Patente US 2010/0055734, Methods for Diagnosis and Intervention of Hepatic Disorders, presentada el 11 de septiembre de 2009. Si se administra una dosis intravenosa simultánea adicional de ^{13}C -colato al mismo tiempo que la dosis oral de colato deuterado, la prueba SHUNT puede medir, además, el flujo sanguíneo hepático sistémico y, por lo tanto, la cantidad de derivación portal-sistémica. La prueba SHUNT se describe en Everson et al., Patente US2008/0279766, Methods for Diagnosis and Intervention of Hepatic Disorders, presentada el 26 de enero de 2006. La presente memoria descriptiva proporciona un procedimiento simplificado de prueba llamado prueba STAT, que es una prueba conveniente simplificada destinada a fines de detección que puede estimar razonablemente el flujo sanguíneo portal a partir de una única muestra de sangre tomada en un solo punto de tiempo, por ejemplo, 60 minutos después de la administración oral de un compuesto de colato distinguible, por ejemplo, un colato deuterado. En la tabla 1, a continuación, se muestra una comparación de las realizaciones típicas de SHUNT, FLOW y las pruebas STAT descritas en el presente documento.

Tabla 1. Pruebas de función hepática.

Nombre de la prueba	Compuesto de prueba	Vía de administración	Muestras	Qué se mide o se define
SHUNT	^{13}C -colato $4\text{D-}^2\text{H}$ -colato	Intravenosa Oral	n = 5 durante 90 minutos	Aclaraciones y evaluación integral de la derivación del flujo sanguíneo hepático y la función hepática
FLOW	$4\text{D-}^2\text{H}$ -colato	Oral	n = 5 durante 90 minutos	Circulación portal (tasa de filtración hepática portal; HFR portal)
STAT	$4\text{D-}^2\text{H}$ -colato	Oral	n = 1 a los 60 minutos	Estima FLOW y se correlaciona con SHUNT

Las versiones de investigación de las pruebas FLOW y SHUNT se compararon con otras pruebas hepáticas propuestas en el ensayo HALT-C de pacientes con hepatitis C crónica (CHC) con fibrosis de moderada a avanzada (Ishak F2-6) y en el estudio temprano de CHC de controles sanos y pacientes en estadio temprano (Ishak F1-2). FLOW

y SHUNT se correlacionaron con el estadio de fibrosis, la prevalencia de cirrosis, la prevalencia de várices y el tamaño de las várices (Everson et al., 2008, The spectrum of hepatic functional impairment in compensated chronic Hepatitis C: Results from the Hepatitis C anti-viral long-term treatment against cirrhosis trial. *Aliment Pharmacol Ther.* 27: 798-809; Everson et al., 2007. Portal-systemic shunting in patients with fibrosis or cirrhosis due to chronic hepatitis C: The minimal model for measuring cholate clearances and shunt. *Aliment Pharmacol Ther.* 26: 401-410) y podrían rastrear la mejoría después de SVR (Everson et al., 2009. Quantitative tests of liver function measure hepatic improvement after sustained virological response: Results from the HALT-C trial. *Aliment Pharmacol Ther.* 29: 589-601). FLOW fue superior a todas las demás pruebas e incluso a la biopsia para predecir los resultados clínicos (Everson, et al., enviado a *Gastroenterology*). FLOW y SHUNT fueron las únicas pruebas que pudieron detectar disfunción hepática en pacientes con CHC temprana en comparación con controles sanos (Helmke, et al., enviado a *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*). Los datos de FLOW (flujo sanguíneo portal) de los controles (C) y los pacientes de ambos estudios se combinaron y representaron gráficamente (media +/- SEM, la n para cada grupo indicada sobre su símbolo) como una función continua que demuestra la capacidad para evaluar el espectro completo de la enfermedad y en comparación con la puntuación de Ishak, véase la figura 1. De manera similar, SHUNT aumentó continuamente con la progresión de la enfermedad (Everson et al., 2008, *infra*), tal como se muestra en la figura 2. Las pruebas I HepQuant FLOW, SHUNT y STAT pueden utilizarse para evaluar todo el espectro de NAFLD.

Sorprendentemente, se ha descubierto en un estudio importante de casi 300 pacientes con CHC, que el flujo portal medido mediante pruebas de colato fue superior en la predicción de resultados clínicos al estándar de oro actual de fibrosis medido por biopsia (Everson et al., 2011). En el Estudio Temprano de CHC, el deterioro del flujo portal y el aumento de la derivación medido por la prueba de colato fue la fisiopatología detectable más temprana. Estos resultados han conducido a una nueva comprensión de la CLD de que lo perjudicial es la alteración de la microvasculatura hepática y no la fibrosis per se. Esta alteración de la microvasculatura altera el flujo sanguíneo portal, que puede cuantificarse de forma no invasiva y precisa mediante la explotación de la fisiología exclusiva del ácido biliar endógeno, colato.

Se ha descubierto que el flujo sanguíneo portal es la clave para la evaluación del hígado. El hígado recibe ~ 75 % de su sangre a través de la vena porta, que trae los nutrientes para el procesamiento y los compuestos perjudiciales para la desintoxicación. Este sistema de baja presión sanguínea es sensible a la alteración más temprana de la microvasculatura, de modo que los primeros estadios de la CLD pueden detectarse mediante la disminución del flujo portal y el aumento de la derivación antes que cualquier otro impacto fisiológico. El flujo sanguíneo sistémico hepático a alta presión disminuye menos y solo más tarde en el proceso de la enfermedad. A diferencia de la biopsia que muestrea solo 1/50.000 parte del hígado, el flujo portal es una medida de todo el órgano. A medida que avanza la enfermedad, hay una alteración creciente de la arquitectura de la microvasculatura y un deterioro creciente del flujo portal que causa las principales manifestaciones de la CLD avanzada. La alteración del flujo causa ascitis, hipertensión portal y várices esofágicas. La alteración del flujo causa un aumento de la derivación de las toxinas que conduce a la encefalopatía hepática.

El colato es una sonda exclusiva del flujo sanguíneo portal y del flujo sistémico hepático. Muchas pruebas hepáticas han intentado utilizar el aclaramiento de compuestos orales o intravenosos, pero solo el colato ha logrado evaluar la CLD en estadio temprano y tardío. Otros compuestos orales se absorben en varios sitios a lo largo del tracto gastrointestinal y no se dirigen a la circulación portal. Otros compuestos son absorbidos por transportadores no específicos. El colato oral se absorbe específicamente por las células epiteliales del íleon terminal a través del transportador ileal de sal biliar dependiente de Na^+ de alta afinidad (ISBT) y los transportadores MRP3 lo expulsan directamente en el flujo sanguíneo portal (Trauner y Boyer, 2003, Bile salt transporters: Molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev.* 83: 633-671). Un conjunto diferente de transportadores de alta afinidad, que incluyen el cotransportador $\text{Na}^+/\text{taurocolato}$ (NTCP, $\text{Na}^+/\text{taurocholate}$ cotransporter) y proteínas transportadoras de aniones orgánicos (OATP, organic anion transporting proteins), a continuación, lo llevan a los hepatocitos con una extracción de primer paso altamente eficiente (Trauner y Boyer, 2003, *infra*) de modo que cualquier colato que escape a la extracción sea una medida directa del flujo portal. Una vez es intracelular, se conjuga rápidamente con glicina y taurina, para que la forma no conjugada no reaparezca en la circulación intrahepática, lo que confundiría la farmacocinética. Otras sales biliares no conjugadas, tales como el desoxicolato y el quenodesoxicolato, se comportarían de manera similar, pero son agentes solubilizantes mucho más fuertes y no serían tan seguras de administrar. La seguridad del paciente se garantiza mediante la utilización de un compuesto endógeno marcado con un isótopo estable que evita los riesgos de exposición a xenobióticos o a radiación. Todas las proteínas y sistemas involucrados están altamente conservados y son esenciales para que la farmacocinética del colato sea consistente entre individuos y no se vea afectada por el género, la edad o la composición genética, ni por la dieta o los medicamentos concomitantes.

Previamente, los estudios en humanos demostraron la utilidad clínica de las pruebas FLOW y SHUNT en la CHC. Se han propuesto una serie de nuevas pruebas hepáticas a lo largo de los años, pero se han realizado pocos estudios para comparar directamente sus eficacias y la utilidad clínica real. Se realizó un ensayo HALT-C multicéntrico muy grande cuyo objetivo principal era determinar la eficacia de la supresión del virus de la hepatitis C a largo plazo, pero que también incluyó un estudio complementario para evaluar una batería de nuevas pruebas cuantitativas de función hepática. (Everson et al., 2009. Quantitative tests of liver function measure hepatic improvement after sustained virological response: Results from the HALT-C trial. *Aliment Pharmacol Ther.* 29: 589-601). Se evaluaron casi 300

pacientes con CLD avanzada (Ishak F2-6) pero compensada. Un estudio temprano de CHC que se completó recientemente comparó estas pruebas en 25 controles sanos y 23 pacientes con CHC en estadio temprano (Ishak F1-2) para examinar el espectro completo de esta CLD. La capacidad metabólica del hígado se evaluó mediante pruebas de cafeína, antipirina, lidocaína y galactosa. Todas estas actividades se redujeron en pacientes con cirrosis, pero ninguna fue diferente en los pacientes con CHC en estadio temprano en comparación con los controles sanos. (Everson et al., 2008. The spectrum of hepatic functional impairment in compensated chronic hepatitis c: Results from the hepatitis c anti-viral long-term treatment against cirrhosis trial. *Aliment Pharmacol Ther.* 27: 798-809). Estos resultados sugieren que la capacidad metabólica se mantiene hasta que se produce una pérdida significativa de parénquima funcional en un estadio más tardío de la CLD. En HALT-C, los pacientes fueron evaluados en serie cada 2 años y seguidos para monitorear los resultados. FLOW, mediante la utilización de un valor de corte de <9,5 ml/min/kg, fue superior a las otras pruebas en la predicción de resultados clínicos con la mayor sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y el mejor rendimiento mediante análisis ROC (Quantitative Liver Function Tests Improve the Prediction of Clinical Outcomes in Chronic Hepatitis C: Results from the HALT-C Trial, Everson et al., enviado a *Gastroenterology*). FLOW tuvo un estadístico c de ROC más alta (0,84) en relación con SHUNT (0,79). La mejoría después de la SVR fue más significativa para FLOW ($p = 0,0002$) que para SHUNT ($p = 0,0003$) (Everson et al., 2009, *infra*). En el estudio temprano de CHC, FLOW disminuyó de 34 ± 14 ml/min/kg (media \pm SD) en controles a 23 ± 10 ml/min/kg en CHC temprana ($p < 0,002$) pero el aumento de SHUNT (20 ± 6 % en controles con respecto a 31 ± 14 % en pacientes con CHC temprana $p < 0,0002$) fue estadísticamente más significativo. Ninguna de las otras pruebas pudo distinguir a los pacientes con CHC en estadio temprano de los controles sanos. Estos resultados sugieren que SHUNT y FLOW superan a otras pruebas funcionales en la detección temprana de enfermedades hepáticas, el seguimiento de los pacientes y la predicción de resultados clínicos.

Con el fin de transformar las pruebas de investigación en pruebas clínicas comerciales viables, se realizaron varios avances para aumentar la conveniencia del paciente, simplificar el análisis y aumentar la precisión. En los estudios publicados, se tomaron 14 muestras de sangre durante 180 minutos después de la administración de colatos marcados para definir las curvas de aclaramiento. La farmacocinética de estas curvas es notablemente consistente debido a la conservación de los sistemas subyacentes. Se analizaron más de 500 estudios HALT-C para demostrar que solo 5 muestras de sangre obtenidas a los 5, 20, 45, 60 y 90 minutos pudieron modelar matemáticamente estas curvas con una precisión del 98 % del procedimiento de 14 puntos (Everson et al., 2007. Portal-systemic shunting in patients with fibrosis or cirrhosis due to chronic hepatitis c: The minimal model for measuring cholate clearances and shunt. *Aliment Pharmacol Ther.* 26: 401-410). Esto reduce en gran medida los requisitos de sangre del paciente, el tiempo que se dedica y los esfuerzos de procesamiento de muestras de laboratorio. Anteriormente, un procedimiento complicado de cromatografía de gases y espectrometría de masas (GCMS) requería días para derivatizaciones químicas complejas y series analíticas largas. Se desarrolló un procedimiento de LCMS robusto, que elimina la derivatización química requerida en el procedimiento de GCMS y reduce el procesamiento de muestras de días a 3 horas al tiempo que aumenta la recuperación, la reproducibilidad y la precisión. La técnica de LCMS ha sido validada de acuerdo con las pautas de la FDA en cuanto a selectividad, exactitud, precisión, recuperación, estabilidad y ausencia de interferencias por componentes del suero o medicamentos concomitantes.

La prueba STAT es diferente de las pruebas SHUNT y FLOW en cuanto a que solo se extrae una única muestra de sangre del paciente, lo que hace que la prueba sea más económica en términos de requerir menos tiempo de personal clínico, tiempo de instrumentación y menos suministros clínicos y de laboratorio. Por ejemplo, una única extracción de sangre no requiere un catéter permanente. Además, la preparación de una única muestra es menos propensa a errores que múltiples muestras secuenciales. La prueba es, además, más cómoda para el paciente y requiere menos tiempo en la clínica.

Fundamento y diseño del estudio para la aplicación de las pruebas HepQuant para la NAFLD.

Se espera una similitud en la progresión de la enfermedad de la NAFLD y CHC. En un aspecto de la memoria descriptiva, es factible evaluar el espectro completo de NAFLD porque la progresión fisiopatológica es muy similar a la de CHC. La progresión se describe típicamente por 4 estadios de la fibrosis descrita histológicamente. Tanto en el sistema CHC Metavir (Grupo, TFMCS. 1994. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C *Hepatology.* 20: 15-20) como en el sistema NASH (Brunt et al., 1999, Nonalcoholic steatohepatitis: A proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol.* 94: 2467-2474; Kleiner et al., 2005. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 41: 1313-1321) la ausencia de fibrosis observable se puntúa como F0. La fibrosis en estadio temprano, F1, tiende a ser más periportal en la CHC y puede ser periportal y/o perisinusoidal en la NASH. En ambos sistemas de puntuación, F2 es fibrosis periportal y perisinusoidal más extensa, F3 es fibrosis en puente y F4 es cirrosis (Grupo, TFMCS. 1994; Brunt et al., 1999; Kleiner et al., 2005; Goodman, ZD. 2007. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases. *J Hepatol.* 47: 598-607). Debido a este patrón de progresión similar, se espera que el deterioro del flujo portal en pacientes con NASH en los estadios F1-F4 sea comparable a la de los pacientes con CHC en los correspondientes estadios F1-F4 de Metavir. Los datos previos de los presentes inventores de CHC, estratificados de acuerdo con el sistema Ishak de 6 estadios, pueden convertirse fácilmente (Goodman et al., 2007, *infra*) al sistema Metavir para permitir la estimación descrita a continuación del tamaño del efecto esperado, el número de individuos requeridos y el poder aproximado del estudio propuesto de los presentes inventores. La correlación entre

los sistemas de puntuación para las puntuaciones FLOW e Ishak, las puntuaciones SHUNT e Ishak, las puntuaciones FLOW y Metavir y las puntuaciones SHUNT y Metavir se muestra en las figuras 1-4, respectivamente.

Impacto de las pruebas hepáticas en los estadios tempranos de la enfermedad hepática crónica. Si bien la mayor parte del desarrollo de pruebas anteriores se ha centrado en la detección de fibrosis y cirrosis avanzadas, se ha discutido que la necesidad más seria en la NAFLD es la capacidad de distinguir la NASH en estadio temprano de la esteatosis simple (Wilson y Chalasani, N. 2007. Noninvasive markers of advanced histology in nonalcoholic fatty liver disease: Are we there yet? *Gastroenterology*. 133: 1377-1378; discusión 1378-1379; y Vuppalanchi y Chalasani 2009. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: Selected practical issues in their evaluation and management. *Hepatology*. 49: 306-317). Las pruebas FLOW y SHUNT podrían detectar la disfunción hepática de los pacientes con NASH y diferenciarlos de aquellos con esteatosis simple que se espera que tengan un flujo portal casi normal.

A diferencia de las pruebas FLOW y SHUNT, que requieren un mínimo de 5 muestras de sangre extraídas del paciente durante un período de 90 minutos o más después de la administración de colato marcado de forma distinguible, se ha descubierto sorprendentemente que los resultados de una prueba que incluye una única muestra de sangre extraída después de la administración oral de un compuesto de colato marcado de manera distinguible se correlaciona con los resultados de las pruebas FLOW y SHUNT. La prueba de detección en un solo punto de tiempo se llama prueba STAT.

De acuerdo con la invención reivindicada, la única muestra de sangre o suero se toma en un punto de tiempo que se selecciona entre 30 y 180 minutos después de la administración oral al individuo de un compuesto de colato distinguible. Tal como se describe en el presente documento, el punto de tiempo para la única extracción de sangre de la prueba STAT del paciente puede seleccionarse, por ejemplo, entre cualquier punto de tiempo después de la administración oral de un colato distinguible; por ejemplo, cualquier punto de tiempo que se selecciona entre aproximadamente 10 y aproximadamente 180 minutos después de la administración. El punto de tiempo puede ser un punto de tiempo único que se selecciona entre aproximadamente 20 y aproximadamente 120 minutos después de la administración. En otro aspecto, el punto de tiempo es un punto de tiempo único que se selecciona entre aproximadamente 30 y aproximadamente 90 minutos después de la administración. En un aspecto, la muestra de sangre se extrae del paciente en cualquier punto de tiempo que se selecciona entre aproximadamente 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, o 90 minutos, o en cualquier punto de tiempo en el medio, después de la administración oral del colato distinguible. En un aspecto, el punto de tiempo para la única extracción de sangre se selecciona entre aproximadamente 45, aproximadamente 60 o aproximadamente 90 minutos después de la administración. En un aspecto particular, la única muestra de sangre se extrae del paciente aproximadamente 45 minutos después de la administración. Ver, por ejemplo, la figura 5, en la que se comparan los resultados de la prueba STAT a los 45 minutos después de la administración con la prueba FLOW. En otro aspecto particular, la única muestra de sangre se extrae del paciente aproximadamente a los 60 minutos después de la administración oral de un colato distinguible. Véase, por ejemplo, la figura 8, en la que los resultados de la prueba STAT a los 60 minutos después de la administración se comparan con la prueba FLOW. Las concentraciones de colato a los 60 minutos se convierten mediante la ecuación en flujos estimados (ml/min/kg) y se comparan con los resultados reales de la prueba FLOW.

En una realización, el colato distinguible para la administración oral puede ser cualquier compuesto de colato distinguible que se distinga analíticamente de un ácido cólico endógeno. En un aspecto, el compuesto de colato distinguible se selecciona entre cualquier compuesto de ácido cólico marcado isotópicamente conocido en la técnica. Los compuestos de colato distinguibles que se utilizan en cualquiera de estos ensayos podrían marcarse con isótopos estables (^{13}C , ^2H , ^{18}O) o radiactivos (^{14}C , ^3H). Pueden adquirirse compuestos de colato distinguibles (por ejemplo, CDN Isotopes Inc., Quebec, CA). En un aspecto preferente, el colato distinguible se selecciona entre cualquier isótopo conocido seguro, no radiactivo estable, del ácido cólico. En un aspecto específico, el compuesto de colato distinguible es 2,2,4,4- ^2H ácido cólico. En otro aspecto específico, el compuesto de colato distinguible es 24- ^{13}C ácido cólico.

STAT puede utilizarse como prueba de detección para un paciente que tiene PSC o se sospecha que tiene la misma. Un resultado de la prueba STAT de $0,4 \pm 0,1$ indica un paciente sano. En pacientes diagnosticados con PSC, $0,7 \pm 0,5$ indica PSC sin PHTN, $1,6 \pm 1,5$ indica PSC con PHTN (esplenomegalia de várices), $2,2 \pm 1,4$ indica PSC con várices y $3,7 \pm 0,9$ indica PSC descompensada (sangrado de várices o ascitis). Un resultado STAT puede indicar que el paciente debe seguirse con pruebas adicionales, tales como FLOW, SHUNT u otras pruebas diagnósticas. Véase, por ejemplo, las figuras 6 y 7.

La prueba STAT puede utilizarse como prueba de detección para un paciente que tiene NAFLD o se sospecha que tiene la misma. La hepatitis también puede deberse al consumo excesivo de alcohol, como en la esteatohepatitis alcohólica (ASH), o a una infección viral, es decir, la hepatitis C crónica (CHC). Todas estas enfermedades hepáticas crónicas (CLD) se caracterizan por una fisiopatología similar con inflamación, muerte celular y fibrosis que conducen a una alteración progresiva de la microvasculatura hepática, por lo que, en varios aspectos, la prueba STAT funcionará en todas las CLD.

La prueba STAT de un solo punto puede utilizarse como un cribado *in vitro* para la progresión de la enfermedad de cualquier enfermedad hepática crónica. Por ejemplo, un paciente individual diagnosticado, por ejemplo, con hepatitis C crónica, hepatitis B crónica, citomegalovirus, virus de Epstein Barr, enfermedad hepática alcohólica, toxicidad por

amiodarona, toxicidad por metotrexato, toxicidad por nitrofurantoína, NAFLD, PSC, hemocromatosis, enfermedad de Wilson, hepatitis crónica autoinmune, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria o carcinoma hepatocelular, pueden monitorearse a lo largo del tiempo mediante la prueba STAT.

5 El resultado de la prueba STAT puede ser una indicación del flujo sanguíneo portal en cualquier paciente. La prueba STAT está en desarrollo especialmente para detectar un gran número de pacientes potenciales. Aquellos con un flujo portal estimado sospechosamente bajo serían remitidos a una prueba FLOW o SHUNT para evaluar con mayor precisión la insuficiencia hepática en la NASH en estadio temprano. Los pacientes con NASH necesitan monitorearse regularmente para determinar la progresión con el fin de predecir el curso de su enfermedad (Soderberg et al., 2010, Decreased survival of subjects with elevated liver function tests during a 28-year follow-up. *Hepatology*. 51: 595-602; Rafiq et al., 2009, Long-term follow-up of patients with nonalcoholic fatty liver. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 7: 234-238). Se ha cuestionado la utilidad pronóstica de la biopsia en la NAFLD (Angulo, P. 2010. Long-term mortality in nonalcoholic fatty liver disease: Is liver histology of any prognostic significance? *Hepatology*. 51: 373-375). Se encontró que las pruebas FLOW y SHUNT son superiores a la biopsia para predecir los resultados en la CHC y además, se espera que sean superiores en la NAFLD.

La prueba STAT puede utilizarse para monitorear la eficacia del tratamiento para un paciente con enfermedad hepática. El tratamiento puede ser un tratamiento antiviral.

20 La prueba STAT puede utilizarse para priorizar a los pacientes que esperan un trasplante de hígado. En un aspecto, los pacientes que esperan un trasplante de hígado son pacientes con PSC, NASH, o HCV crónica.

La prueba STAT es una prueba no invasiva *in vitro* que puede utilizarse para detectar pacientes en busca de función hepática o enfermedad hepática; monitorear a los pacientes con enfermedad hepática sometidos a terapia antiviral; monitorear la progresión de la enfermedad en pacientes con enfermedad hepática crónica; determinar el estadio de la enfermedad en un paciente diagnosticado con HCV o PSC; dar prioridad a los pacientes con enfermedad hepática para el trasplante de hígado; determinar la selección de pacientes con hepatitis B crónica que deben recibir terapia antiviral; evaluar el riesgo de descompensación hepática en pacientes con carcinoma hepatocelular (HCC) en evaluación para resección hepática; identificar un subgrupo de pacientes en lista de espera con una puntuación MELD baja ("model for end-stage liver disease score", modelo para la enfermedad hepática en etapa terminal.) que tienen riesgo de morir mientras esperan un donante de órganos; como criterio de valoración en ensayos clínicos; reemplazar la biopsia hepática en poblaciones pediátricas; seguir la función del aloinjerto; medir el retorno de la función en donantes vivos; medir el deterioro funcional en la enfermedad hepática colestásica (PSC, colangitis esclerosante primaria); o, utilizar en combinación con ALT para identificar a los pacientes con HCV F0-F2 en estadio temprano.

35 Kits.

La presente memoria descriptiva proporciona kits para utilizar con los procedimientos y procedimientos de comparación dados a conocer en el presente documento. El colato distinguible que se proporciona en un kit puede emplearse en una prueba *in vitro* para evaluar la salud del hígado en un centro de salud y/o en un formato de kit casero. Los resultados de la prueba pueden utilizarse de acuerdo con la figura 7. Por ejemplo, un paciente sospechoso de tener una enfermedad o afección puede evaluarse con la prueba STAT después de someterse a una historia clínica o examen físico o a pruebas de laboratorio estándar. Un resultado de prueba bajo (intervalo "A") sugerirá que el paciente debe seguirse con un examen anual. Un resultado intermedio (intervalo "B") indicará que el paciente debe evaluarse con la prueba FLOW o SHUNT. Un resultado alto (intervalo "C") indica que se debe sospechar que el paciente tiene un estadio avanzado de la enfermedad y debe, por ejemplo, someterse a esofagogastroduodenoscopia (EGD) o a detección de carcinoma hepatocelular (HCC).

El compuesto de colato distinguible se utiliza como agente de evaluación del flujo sanguíneo hepático y puede comprender, un medio de recipiente adecuado, una dosis oral de colato distinguible para ser administrada posiblemente en una instalación para pacientes ambulatorios, dentro de un entorno hospitalario o fuera de un entorno hospitalario. También pueden incluirse tubos de muestra para la recogida de muestras de sangre. En un ejemplo, un kit puede comprender una dosis oral del colato distinguible y tubos de muestra para la recogida de una única muestra después de un período, por ejemplo, que se selecciona a partir de un punto de tiempo específico de aproximadamente 10 a aproximadamente 200 minutos después de la administración oral del colato distinguible. En un ejemplo específico, se recoge una muestra de sangre en un punto de tiempo aproximadamente 45 minutos después de la administración del colato distinguible. En otro ejemplo específico, se recoge una muestra de sangre en un período de tiempo de aproximadamente 60 minutos después de la administración del colato distinguible. En un ejemplo adicional, un kit puede comprender componentes necesarios para un período de prueba de 30 minutos después de la administración de agentes distinguibles. Los kits pueden comprender, además, una composición alícuota adecuada del agente específico, tal como colato, o una composición farmacéutica de diagnóstico que comprende un colato distinguible, ya sea marcado o sin marcar, que puede utilizarse para preparar una curva estándar para un ensayo de detección. La composición farmacéutica de diagnóstico que comprende un colato distinguible puede contener excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables adicionales, tal como se conoce en la técnica.

65

Los medios de recipiente de los kits incluirán, generalmente, como mínimo, un vial, tubo de ensayo, matraz, botella, jeringa u otro medio de recipiente, en el que puede colocarse el agente distinguible y, preferentemente, en alícuotas de forma adecuada. Los kits de la presente memoria descriptiva también incluirán, típicamente, un medio para contener el agente distinguible y cualquier otro recipiente de reactivo en un confinamiento cerrado para la venta comercial. Tales recipientes pueden incluir recipientes de plástico moldeados por inyección o por soplado en los cuales se retienen los viales deseados. Además, los kits pueden contener un producto para diluir el agente oral distinguible.

El kit puede incluir, además, instrucciones para comparar la cantidad de compuesto de colato distinguible hasta un valor de corte o cortes de valores para determinar el estado del flujo sanguíneo portal y/o la función hepática en el paciente.

Preparación de muestras de control de calidad para kits.

La FDA proporciona pautas sobre los niveles aceptables de exactitud y precisión de los procedimientos analíticos. Véase, por ejemplo, Bioanalytical Method Validation, mayo de 2001, Sección VI. Application of Validated Method to Routine Drug Analysis. Una vez validado el procedimiento analítico para uso rutinario, su exactitud y precisión deben monitorearse regularmente para asegurar que el procedimiento continúe su función satisfactoriamente. Para lograr este objetivo, se preparan varias muestras de control de calidad por separado y deben analizarse con muestras de prueba procesadas a intervalos basados en el número total de muestras. Las muestras de control de calidad se ejecutan por duplicado a tres concentraciones (una cerca del límite inferior de cuantificación (LLOQ) (es decir, 3 x LLOQ), una en el medio del intervalo y una cerca del límite superior del intervalo) y deben incorporarse en cada ejecución del ensayo. El número de muestras de control de calidad (en múltiplos de tres) dependerá del número total de muestras en la ejecución. Los resultados de las muestras de control de calidad proporcionan la base para aceptar o rechazar la ejecución. Como mínimo, cuatro de cada seis muestras de control de calidad deben estar dentro del 15 % de sus respectivos valores nominales. Dos de las seis muestras de control de calidad pueden estar fuera del 15 % de su valor nominal respectivo, pero no ambas a la misma concentración.

Las muestras de control de calidad deben cubrir los intervalos alto, medio y bajo de ambas curvas estándar. Las muestras de control de calidad se diseñan para simular de cerca las concentraciones reales de compuestos marcados que se encuentran en el suero del paciente durante el transcurso de tiempo de la prueba. La concentración de $[24\text{-}^{13}\text{C}]\text{-CA}$ es muy alta en el punto de tiempo temprano y cae exponencialmente a concentraciones medias y bajas. La concentración de $[2,2,4,4\text{-}^2\text{H}]\text{-CA}$ es muy baja en el punto de tiempo temprano, aumenta a su valor más alto en los puntos de tiempo intermedios y, a continuación, cae a una concentración media.

Procedimientos.

En una realización, los procedimientos de prueba STAT se utilizan para la detección temprana de enfermedad hepática no diagnosticada. En ciertos aspectos, los procedimientos de prueba STAT descritos en el presente documento se utilizan para detectar enfermedad hepática en estadio temprano y monitorear con precisión la progresión de la enfermedad hepática. La detección temprana con una prueba como STAT conduce a una intervención temprana cuando puede ser más efectiva y puede reducir los costes de atención médica y reducir considerablemente la morbilidad y la mortalidad.

Si el resultado de la prueba STAT para un paciente está por encima de un valor umbral, el paciente puede someterse a las pruebas FLOW y/o SHUNT que se utilizan junto con la prueba STAT. Las pruebas FLOW y SHUNT pueden utilizarse para rastrear con precisión la enfermedad hepática. Los pacientes que intentan modificar su dieta y estilo de vida pueden ver incluso pequeños efectos positivos en un período de tiempo relativamente corto que los anima a perseverar. Los médicos pueden rastrear a sus pacientes y administrar su atención de manera más efectiva. La evaluación rápida y precisa de la eficacia de nuevos fármacos y terapias acelerará enormemente su desarrollo.

La prueba STAT puede administrarse a cualquier paciente. La prueba STAT puede administrarse a un paciente diagnosticado con NAFLD, PSC, hepatitis C, hepatitis B, enfermedad hepática alcohólica y/o trastornos colestásicos o sospechoso de tener los mismos.

Se contempla que los procedimientos de la descripción puedan utilizarse junto con las pruebas FLOW y SHUNT (aclaramiento del colato oral y derivación del colato) para una serie de aplicaciones clínicas, por ejemplo, la selección de pacientes con hepatitis B crónica que deberían recibir terapia antiviral; evaluar el riesgo de descompensación hepática en pacientes con carcinoma hepatocelular (HCC) en evaluación para resección hepática; identificar un subgrupo de pacientes en lista de espera con una baja puntuación MELD (modelo para la enfermedad hepática en etapa terminal) que están en riesgo de morir mientras esperan un donante de órganos; como criterio de valoración en ensayos clínicos; reemplazar la biopsia hepática en poblaciones pediátricas; seguir la función del aloinjerto; medir el retorno de la función en donantes vivos; y medir el deterioro funcional en la enfermedad hepática colestásica (PSC, "primary sclerosing colangitis", colangitis esclerosante primaria.).

En un aspecto específico, los procedimientos de la presente memoria descriptiva pueden utilizarse repetidamente a lo largo del tiempo como un indicador del resultado clínico. Por ejemplo, la figura 5 muestra los valores de corte y la

correlación de los resultados de la prueba STAT (uM) en un único punto de tiempo a los 45 minutos después de la administración oral de 4D-colato en comparación con la prueba FLOW de circulación portal en 5 puntos de tiempo por encima de los 90 minutos después de la administración oral de 4D colato. La línea de puntos horizontal indica el valor de corte (< 9,5 ml/min/kg) para pacientes FLOW con alto riesgo de descompensación dentro de los 2 años posteriores a la prueba. Las líneas verticales de puntos indican los valores de corte para tres intervalos de resultados A, B y C.

Los procedimientos de detección STAT descritos en el presente documento pueden utilizarse junto con las pruebas FLOW y SHUNT (aclaramiento del colato oral y derivación del colato) para monitorear el flujo sanguíneo hepático y la función hepática en un paciente individual. Se utiliza una población conocida de pacientes para establecer varios valores de corte para la prueba de cribado de un solo punto STAT en un punto de tiempo particular que se selecciona para extraer la única muestra de sangre después de la administración oral del colato distinguible.

Se establece la correlación estadística de los resultados de la prueba STAT de la población conocida de pacientes en comparación con los resultados de la prueba FLOW o SHUNT. En un aspecto, la figura 5 muestra los valores de corte y la correlación de los resultados de la prueba STAT (uM) en un único punto de tiempo a los 45 minutos después de la administración oral de 4D-colato en comparación con la prueba FLOW de circulación portal en 5 puntos de tiempo por encima de los 90 minutos después de la administración oral de 4D colato. La línea de puntos horizontal indica el valor de corte (< 9,5 ml/min/kg) para pacientes FLOW con alto riesgo de descompensación dentro de los 2 años posteriores a la prueba. Las líneas verticales de puntos indican los valores de corte para tres intervalos de resultados A, B y C.

El resultado de la prueba STAT para un paciente individual puede compararse con los valores de corte establecidos.

La figura 6 ilustra un aspecto de una aplicación clínica de la prueba STAT para un paciente sospechoso de tener una enfermedad hepática. Es probable que un resultado de la prueba STAT de un paciente que se encuentre dentro del intervalo de aproximadamente 0 a aproximadamente 0,6 uM (intervalo "A") prediga que el resultado de la prueba FLOW también estará dentro del intervalo normal para la circulación portal. El paciente con un resultado de prueba STAT que se encuentre dentro del intervalo A puede seguirse, por ejemplo, mediante la utilización de una prueba STAT anual. Un resultado de la prueba STAT que se encuentre dentro del intervalo de aproximadamente 0,6 uM hasta aproximadamente 1,50 uM (intervalo "B") probablemente prediga que el resultado de la prueba FLOW estará dentro de un intervalo comprometido para la circulación portal. El paciente con un resultado de la prueba STAT que se encuentre dentro del intervalo B debe evaluarse más a fondo, por ejemplo, con las pruebas FLOW o SHUNT, para evaluar la circulación portal y el aclaramiento y derivación del colato, respectivamente. Es probable que un resultado de la prueba STAT por encima de aproximadamente 1,50 uM (intervalo "C") prediga una enfermedad avanzada. El paciente con un resultado de la prueba STAT que se encuentre dentro del intervalo C debe evaluarse más a fondo, por ejemplo, mediante EGD (endoscopia superior, esofagogastroduodenoscopia) y mediante detección de HCC (carcinoma hepatocelular).

La prueba STAT puede utilizarse para monitorear periódicamente a un paciente en busca de mejoría o progresión de la enfermedad hepática. La figura 7 ilustra la aplicación clínica de la prueba STAT para un paciente que ingresa en tratamiento por enfermedad hepática. El paciente puede monitorearse periódicamente para detectar mejoría o progresión de la enfermedad. Por ejemplo, en dependencia del resultado de la prueba STAT, puede seguirse al paciente para una mejoría cuantitativa con pruebas anuales STAT, FLOW o SHUNT.

La prueba STAT puede utilizarse para detectar y evaluar la gravedad de la enfermedad en un paciente diagnosticado con PSC o sospechoso de tener la misma. STAT mostró diferencias significativas entre controles sanos y pacientes con enfermedad leve, y aquellos con PHTN y descompensación (ascitis o sangrado por várices), tal como se muestra en la figura 14. La prueba STAT simple y conveniente puede utilizarse como un cribado para dirigir a los pacientes hacia las pruebas más elaboradas FLOW y SHUNT que se muestran en las figuras 12 y 13, respectivamente. Se demostró que la prueba SHUNT diferencia significativamente entre cada subgrupo, distinguiendo a los pacientes con PSC con enfermedad leve de los controles sanos, y también diferenciando las cohortes con PHTN y sin la misma, y el grupo con PHTN del grupo con antecedentes de ascitis o sangrado por várices, tal como en la figura 13.

Definiciones y acrónimos

Tal como se utiliza en el presente documento, "un" o "una" pueden significar uno o más de un artículo.

Tal como se utiliza en el presente documento, "aclaramiento" puede significar la eliminación de una sustancia de un lugar a otro.

Tal como se utiliza en el presente documento, la especificación, "paciente", "individuo" o "individuos" puede incluir, aunque sin limitación a los mismos, mamíferos, tales como seres humanos o, por ejemplo, mamíferos, tales como perros, gatos, hurones, conejos, cerdos, caballos, ganado, aves o reptiles. El acrónimo "HALT-C, hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrosis trial" se refiere al ensayo de tratamiento antiviral a largo plazo contra la cirrosis de la hepatitis C. El ensayo HALT-C fue un ensayo grande, prospectivo, aleatorizado y controlado a largo plazo de terapia con interferón peg a baja dosis en pacientes con hepatitis C avanzada que no habían tenido una respuesta virológica sostenida respecto a un curso previo de terapia basada en interferón. Un ensayo de tratamiento antiviral a largo plazo

contra la cirrosis de la hepatitis C (HALT-C) patrocinado por el NIH examinó si la utilización a largo plazo de la terapia antiviral (tratamiento de mantenimiento) retardaría la progresión de la enfermedad hepática. En pacientes no cirróticos que presentaban fibrosis significativa, se esperaba que la terapia de mantenimiento eficaz ralentizara o detuviera la progresión histológica a cirrosis, según las evaluaciones mediante biopsias hepáticas seriadas. Sin embargo, el seguimiento de la progresión de la enfermedad con biopsia conlleva el riesgo de complicaciones, posiblemente la muerte. Además, el error de muestreo y la variación de la interpretación patológica de la biopsia hepática limitan la precisión de la evaluación histológica y los criterios de valoración. El criterio de valoración histológico es menos fiable porque ya existe fibrosis avanzada y no pueden detectarse cambios en la fibrosis relacionados con el tratamiento o la progresión de la enfermedad. Por tanto, los criterios de valoración estándar para una respuesta eficaz a la terapia de mantenimiento en pacientes cirróticos son la prevención de la descompensación clínica (ascitis, sangrado por várices y encefalopatía) y la estabilización de la función hepática medida clínicamente por la puntuación de Childs-Turcotte-Pugh (CTP). Sin embargo, se sabía que los criterios de valoración clínicos y la puntuación CTP eran parámetros insensibles de la progresión de la enfermedad. Las técnicas de isótopos duales que emplean colatos distinguibles se aprovecharon en el desarrollo de la prueba SHUNT y se utilizaron junto con el ensayo HALT-C.

El término "prueba de SHUNT" se refiere a una prueba QLFT ("quantitative liver function test", prueba cuantitativa de función hepática) descrita anteriormente que se utiliza como una evaluación integral del flujo sanguíneo hepático y la función hepática. La prueba SHUNT se utiliza para determinar el aclaramiento plasmático del ácido cólico administrado por vía oral e intravenosa en individuos con y sin enfermedad hepática crónica. En la prueba SHUNT, se analizan, como mínimo, 5 muestras de sangre que se han extraído de un paciente a intervalos durante un período, como mínimo, de aproximadamente 90 minutos después de la administración oral e intravenosa de colatos diferenciables. El análisis de muestras para colatos marcados isotópicamente estables se realiza, por ejemplo, mediante GC-MS, después de la derivatización de la muestra, o LC-MS, sin derivatización de la muestra. La relación de las AUC del ácido cólico administrado por vía oral con respecto al administrado por vía intravenosa, corregida para las dosis administradas, define la derivación del colato. La derivación del colato puede calcularse mediante la fórmula: $AUC_{oral}/AUC_{iv} \times Dosis_{oral}/Dosis_{oral} \times 100 \%$, en la que AUC_{oral} es el área bajo la curva de las concentraciones séricas del ácido cólico administrado por vía oral y el AUC_{iv} cólico administrado por vía intravenosa. La prueba SHUNT se describe en Everson et al., Patente US2008/0279766, Methods for Diagnosis and Intervention of Hepatic Disorders, presentada el 26 de enero de 2006. Estos estudios demostraron un aclaramiento reducido de colato en pacientes que tenían daño hepatocelular o derivación portosistémica.

La prueba SHUNT permite medir la eliminación hepática de primer paso de los ácidos biliares a partir de la circulación portal. La eliminación dependiente del flujo de los ácidos biliares en el primer paso por el hígado varía desde el 60 % para los dihidroxiácidos biliares no conjugados hasta el 95% para el colato conjugado con glicina. El colato libre que se utiliza en el presente documento tiene una eliminación informada de primer paso de aproximadamente el 80 % que concuerda estrechamente con la eliminación de primer paso observada previamente en controles sanos, de aproximadamente el 83 %. Después de la absorción por el hígado, el ácido cólico se conjuga eficazmente con glicina o taurina y se secreta en la bilis. El ácido cólico fisicoquímicamente se separa fácil de otros ácidos biliares y conjugados de ácido biliar o ácido cólico, mediante la utilización de procedimientos cromatográficos.

El acrónimo "IV" o "iv" se refiere a intravenoso.

El acrónimo "PO" se refiere a por oral.

El acrónimo "PHM" se refiere a masa hepática perfundida.

El acrónimo "SF" se refiere a la fracción de derivación, por ejemplo, como en colato SF.

El acrónimo "ROC" se refiere a la característica operativa del receptor. La curva ROC es un diagrama gráfico que ilustra el rendimiento de un sistema clasificador binario a medida que varía su umbral de discriminación. Se crea al representar en un gráfico la fracción de verdaderos positivos de los positivos (TPR=tasa de verdaderos positivos) frente a la fracción de falsos positivos de los negativos (FPR=tasa de falsos positivos), en varios valores de umbral. La sensibilidad es la probabilidad de un resultado positivo de la prueba, o de un valor por encima de un umbral, entre las personas con enfermedad. La sensibilidad se define como la tasa de verdaderos positivos (TPR): $TPR=TP/P=TP/(TP+FN)$. La tasa de falsos positivos (FPR) es $FPR = FP/N = FP/(FP + FN)$. La precisión (ACC) se define como $ACC = (TP + TN)/(P + N)$. La especificidad es la probabilidad de un resultado negativo de la prueba, o un valor por debajo de un umbral, entre aquellos sin enfermedad. La especificidad (SPC) o tasa de verdaderos negativos (TN) se define como $SPC=TN/N = TN/(FP+TN)=1-FPR$. El valor de predicción positivo (PPV, positive prediction value) se define como: $PPV=TP/(TP+FP)$. El valor predictivo negativo (NPV, negative predictive value) se define como $NPV=TN/(TN+FN)$. El estadístico c es el área bajo la curva ROC, o "AUROC" (área bajo la curva característica operativa del receptor) y va desde 0,5 (sin discriminación) hasta un máximo teórico de 1 (discriminación perfecta).

El término "aclaramiento oral del colato" (Cl_{oral}) se refiere al aclaramiento de un compuesto de colato administrado por vía oral. El aclaramiento oral de colato se utiliza como medida del flujo sanguíneo portal. El ácido cólico administrado por vía oral se absorbe a través de las células del revestimiento epitelial del intestino delgado, se une a la albúmina en la sangre portal y se transporta al hígado a través de la vena porta. Aproximadamente el 80 % del ácido cólico se

extrae de la sangre portal en su primer paso a través del hígado. El ácido cólico que se escapa de la extracción hepática sale del hígado a través de las venas hepáticas que drenan hacia la vena cava de regreso al corazón y se entrega a la circulación sistémica. El área bajo la curva (AUC, area under the curve) de la concentración venosa periférica frente al tiempo después de la administración oral de ácido cólico cuantifica la fracción de ácido cólico que escapa a la extracción hepática y define el "aclaramiento oral del colato".

El término "prueba FLOW" se refiere al aclaramiento del colato oral (tasa de filtración hepática portal; HFR portal) que se utiliza como una medida del flujo sanguíneo portal, o de la circulación portal, que se obtiene a partir del análisis, como mínimo, de 5 muestras de sangre extraídas de un paciente durante un período, por ejemplo, de aproximadamente 90 minutos después de la administración oral de un colato diferenciable.

El término "prueba STAT" se refiere a una estimación del flujo sanguíneo portal mediante el análisis de una muestra de sangre de un paciente extraída en un período de tiempo definido después de la administración oral de un colato diferenciable. La prueba STAT se refiere al análisis de una única muestra de sangre extraída en un punto de tiempo específico después de la administración oral de un colato diferenciable. En un aspecto específico, la prueba STAT es una prueba simplificada conveniente destinada a fines de cribado que puede estimar razonablemente el flujo sanguíneo portal (tasa de flujo estimada) a partir de una única muestra de sangre tomada 60 minutos después de la administración oral de colato deuterado.

El término "aclaramiento del colato intravenoso" (Cl_{iv}) se refiere al aclaramiento de un compuesto de colato administrado por vía intravenosa. El ácido cólico administrado por vía intravenosa, unido a la albúmina, se distribuye sistémicamente y se entrega al hígado a través de la vena porta del flujo sanguíneo arterial. El AUC de la concentración venosa periférica frente al tiempo después de la administración intravenosa de ácido cólico equivale al 100 % de la liberación sistémica de ácido cólico. La relación de las AUC del ácido cólico administrado por vía oral con respecto al administrado por vía intravenosa, corregida para las dosis administradas, define la derivación del colato.

El término "prueba cuantitativa de función hepática" (QLFT, quantitative liver function test), se refiere a ensayos que miden la capacidad del hígado para metabolizar o extraer compuestos de prueba, puede identificar pacientes con función hepática deteriorada en estadios tempranos de la enfermedad y posiblemente definir el riesgo de cirrosis, esplenomegalia y várices. Uno de estos ensayos es el ensayo de derivación del colato, en el que se evalúa el aclaramiento del colato mediante el análisis de muestras de fluidos corporales después de que el cuerpo haya absorbido el colato exógeno.

El término "puntuación de fibrosis de Ishak" se utiliza en referencia a un sistema de puntuación que mide el grado de fibrosis (cicatrización) del hígado, causada por necroinflamación crónica. Una puntuación de 0 representa no fibrosis y 6 es fibrosis establecida. Las puntuaciones 1 y 2 indican grados leves de fibrosis portal; los estadios 3 y 4 indican fibrosis moderada (puente). Una puntuación de 5 indica formación nodular y cirrosis incompleta, y 6 es cirrosis definitiva.

El término "muestra estándar" se refiere a una muestra con una concentración conocida de un analito, que se utiliza con fines comparativos cuando se analiza una muestra que contiene una concentración desconocida de analito.

El término "hepatitis C crónica" (CHC) se refiere a una enfermedad hepática crónica causada por una infección viral y que produce inflamación del hígado, daño al hígado y cirrosis. La hepatitis C es una infección causada por un virus transmitido por la sangre que ataca el hígado y provoca inflamación. Muchas personas infectadas con el virus de la hepatitis C (HCV) no presentan síntomas hasta que aparece el daño hepático, a veces años después, durante pruebas médicas de rutina.

El término "esteatohepatitis alcohólica" (ASH) se refiere a una afección crónica de inflamación del hígado causada por el consumo excesivo de bebida. La lesión hepática inflamatoria progresiva se asocia con una ingesta abundante de etanol a largo plazo y puede progresar a cirrosis.

El término "esteatohepatitis no alcohólica" (NASH) se refiere a una afección crónica grave de inflamación del hígado, progresiva a partir de la afección de hígado graso simple menos grave llamada esteatosis. La esteatosis simple (hígado graso alcohólico) es una consecuencia temprana y reversible del consumo excesivo de alcohol. Sin embargo, en ciertos casos, la acumulación de grasa puede estar asociada con inflamación y cicatrización en el hígado. Esta forma más grave de la enfermedad se denomina esteatohepatitis no alcohólica (NASH). La NASH se asocia con un riesgo mucho mayor de fibrosis hepática y cirrosis que la NAFLD. La NAFLD puede progresar a NASH con fibrosis, cirrosis y carcinoma hepatocelular.

El término "enfermedad de hígado graso no alcohólico" (NAFLD) se refiere a una enfermedad hepática crónica común caracterizada en parte por una condición de hígado graso con factores de riesgo asociados de obesidad, síndrome metabólico y resistencia a la insulina. Tanto la NAFLD como la NASH se asocian a menudo con obesidad, diabetes mellitus y elevaciones asintomáticas de ALT y gamma-GT séricas. La monitorización ecográfica puede sugerir la presencia de una infiltración grasa del hígado; la diferenciación entre la NAFLD y NASH, generalmente requiere una biopsia de hígado.

El término "colangitis esclerosante primaria" (PSC) se refiere a una enfermedad hepática crónica causada por inflamación progresiva y cicatrización de los conductos biliares del hígado. La cicatrización de los conductos biliares puede bloquear el flujo de bilis y provocar colestasis. La inflamación puede provocar cirrosis hepática, insuficiencia hepática y cáncer de hígado. La obstrucción biliar crónica causa fibrosis del tracto portal y finalmente cirrosis biliar e insuficiencia hepática. El tratamiento definitivo es el trasplante de hígado. Las indicaciones para el trasplante incluyen colangitis bacteriana recurrente, ictericia refractaria al tratamiento médico y endoscópico, cirrosis descompensada y complicaciones de la hipertensión portal (PHTN). La PSC progresa a través de inflamación crónica, fibrosis/cirrosis, circulación portal alterada, hipertensión portal y derivación portal-sistémica a várices-ascitis y encefalopatía. El flujo portal alterado es una indicación de complicaciones clínicas.

Se proporcionan otras definiciones a lo largo de la especificación.

Ordenador/Procesador

El procedimiento de detección, pronóstico y/o diagnóstico que se emplea en la prueba STAT puede emplear la utilización de un procesador/sistema informático. Por ejemplo, un sistema informático universal que comprende un procesador acoplado a la memoria del programa que almacena el código del programa informático para implementar el procedimiento, la memoria de trabajo y las interfaces, tales como una pantalla de ordenador convencional, teclado, ratón e impresora, así como otras interfaces, tales como una interfaz de red, y las interfaces de software que incluyen una interfaz de base de datos encuentran uso en una realización descrita en el presente documento.

El sistema informático acepta la entrada del usuario desde un dispositivo de entrada de datos, tales como un teclado, un archivo de datos de entrada o una interfaz de red, u otro sistema, como el sistema que interpreta, por ejemplo, los datos de LC-MS o GC-MS, y proporciona una salida a un dispositivo de salida, tal como una impresora, pantalla, interfaz de red o dispositivo de almacenamiento de datos. El dispositivo de entrada, por ejemplo una interfaz de red, recibe una entrada que comprende la detección de un compuesto colato distinguible medido a partir de una muestra de sangre o suero procesada descrita en el presente documento y la cuantificación de esos compuestos. El dispositivo de salida proporciona una salida, tal como una pantalla, que incluye uno o más números y/o un gráfico que representa la detección y/o cuantificación de los compuestos.

El sistema informático está acoplado a un almacén de datos que almacena los datos generados por los procedimientos descritos en el presente documento. Estos datos se almacenan para cada medición y/o cada individuo; opcionalmente se almacena una pluralidad de conjuntos de cada uno de estos tipos de datos correspondientes a cada individuo. Pueden utilizarse uno o más ordenadores/procesadores, por ejemplo, tales como una máquina separada, por ejemplo, acoplada a un sistema informático a través de una red, o puede comprender un programa separado o integrado que se ejecuta en un sistema informático. Cualquiera que sea el procedimiento empleado, estos sistemas reciben datos y, a cambio, proporcionan datos relacionados con la detección/diagnóstico.

Un procedimiento para seleccionar un tratamiento para un individuo que tiene un nivel anormal de compuesto de colato distinguible en una muestra de sangre o suero extraída en un solo punto de tiempo después de la administración oral puede comprender calcular una puntuación de salida, mediante la utilización de un dispositivo informático, al ingresar el nivel de compuesto de colato distinguible en una función que proporciona una relación predictiva entre el nivel de colato y el resultado, para individuos que tienen una enfermedad o trastorno hepático; y visualizar la puntuación de salida, mediante la utilización de un dispositivo informático. En realizaciones, el compuesto de colato distinguible en la muestra se convierte mediante la utilización de una ecuación en una tasa de flujo portal estimada (ml/min/kg) en el individuo. En realizaciones, la ecuación es $y = 0,9702x + 0,0206$, en la que x es el log Hepquant FLOW e y es LOG Hepquant STAT. El procedimiento puede comprender, además, determinar si la puntuación de salida es mayor, igual o menor que un valor de corte, mediante la utilización de un dispositivo informático; y mostrar si es probable que el individuo experimente un resultado clínico si la puntuación de salida es mayor, igual o menor que un valor de corte.

Un dispositivo informático puede comprender una unidad de procesamiento; y una memoria del sistema conectada a la unidad de procesamiento, incluyendo la memoria del sistema instrucciones que, cuando son ejecutadas por la unidad de procesamiento, hacen que la unidad de procesamiento: calcule un nivel de compuesto de colato distinguible de una única muestra de sangre de un individuo en una función que proporciona una relación predictiva entre el nivel de colato distinguible del individuo que tiene una enfermedad o disfunción hepática; y mostrar la puntuación de salida. La memoria del sistema puede incluir instrucciones que, cuando las ejecuta la unidad de procesamiento, hacen que la unidad de procesamiento determine si la puntuación de salida es mayor o igual o menor que un valor de corte; y mostrar si es probable que el individuo experimente un resultado clínico si la puntuación de salida es mayor o igual que el valor de corte.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar las realizaciones preferentes de la presente invención. Los expertos en la técnica deben apreciar que las técnicas descritas en los ejemplos que siguen representan técnicas que

los presentes inventores han descubierto que funcionan bien en la práctica de la invención y, por lo tanto, puede considerarse que constituyen modos preferentes para su práctica. Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar las realizaciones preferentes.

5 **Ejemplo 1. Estimación del flujo portal a partir de una única extracción de sangre.**

Se analizaron cuidadosamente las concentraciones de colato sérico en puntos de tiempo individuales de las pruebas FLOW y SHUNT en los estudios HALT-C y CHC temprano y se encontró que las diferencias a los 45, 60 y 90 minutos eran altamente significativas ($p < 0,005$). La concentración a los 60 minutos tuvo la mejor correlación ($r^2 = 0,8$) con el flujo portal. Se derivó una ecuación que podría transformar la concentración (μM) a los 60 min en un flujo portal estimado ($\text{ml}/\text{min}/\text{kg}$) con una precisión del 85 % del procedimiento FLOW de 5 puntos. Esto condujo al desarrollo de la prueba STAT, en la cual, en una realización, el paciente bebe una dosis oral de un compuesto de colato distinguible, por ejemplo, colato deuterado, y da una única muestra de sangre después de 1 hora. La precisión de la prueba STAT en relación con la prueba FLOW se muestra en la figura 8.

15

Ejemplo 2. Eficacia de STAT (flujo portal estimado) en la detección de disfunción hepática.

En el estudio temprano de CHC, los controles sanos tenían un flujo portal de $34 \pm 14 \text{ ml}/\text{min}/\text{kg}$ (media \pm SD). La disfunción hepática se definió como un flujo portal más de 1 SD por debajo de la media de control, un flujo $<20 \text{ ml}/\text{min}/\text{kg}$. En el grupo de CHC temprana, aproximadamente $\frac{1}{2}$ los pacientes presentaban disfunción hepática. Los flujos portales estimados en los pacientes con CHC temprana se calcularon a partir de la ecuación mostrada en la figura 8 mediante la utilización de su nivel de colato sérico a los 60 minutos. El flujo estimado podría detectar disfunción hepática con una sensibilidad del 90 %, una especificidad del 85 %, un valor predictivo positivo (PPV) del 82 % y un valor predictivo negativo (NPV) del 92 %. Estos resultados preliminares demuestran que una única muestra de sangre después de una dosis de colato oral podría utilizarse para detectar disfunción hepática en la CLD en estadio temprano.

20

Además, en el estudio temprano de CHC analizamos el impacto potencial de STAT si se utiliza como prueba de cribado. Actualmente, en el entorno de atención primaria se criba a los adultos mediante ALT para detectar enfermedades hepáticas. En el análisis de los presentes inventores del estudio temprano de CHC, éstos "encontraron que la adición de STAT a ALT podría mejorar la detección de pacientes con hepatitis C crónica. En pacientes en estadio temprano, ALT fue anormal en solo el 34 %, STAT fue anormal en el 48%, y 65% de los pacientes tenían ALT o STAT anormales. El cribado con la combinación de ALT y STAT duplicaría la tasa de detección de pacientes con enfermedad hepática debida a hepatitis C crónica. Por supuesto, cuando se utiliza en una estrategia de este tipo, STAT también detectaría pacientes con otras enfermedades hepáticas distintas de la hepatitis C crónica.

30

STAT tiene, además, valores de corte de prueba que se correlacionan con la enfermedad hepática avanzada. En pacientes con hepatitis C crónica y en pacientes con enfermedad hepática colestásica crónica, colangitis esclerosante primaria, el resultado STAT con FLOW estimado de $<10 \text{ ml}/(\text{kg min})$ se correlacionó con el riesgo de descompensación hepática o complicaciones clínicas. En esta situación, STAT reflejaría que se necesita FLOW o SHUNT para proporcionar una cuantificación precisa de la circulación portal.

35

Ejemplo 3. Procedimiento de desempeño para una prueba STAT de ejemplo. Suministros

Compuestos de prueba PO (per oral):

45

$^2\text{H}_4$ -Colato ($[\text{2,2,4,4-}^2\text{H}]\text{-ácido cólico}$, 40 mg) (por ejemplo, isótopos CDN).
Bicarbonato de sodio (por ejemplo, 600 mg).

Suministros de prueba para pacientes:

50

Tubos y etiquetas de transferencia de suero/plasma.
Jeringa de 10 cc para extracción de sangre.
Tubos vacutainer de 7 cc con tapa roja y de 7 cc con tapa gris para la recogida de muestras de suero.

55

Cubo para desecho de agujas

Una sustancia para beber, tal como jugo de manzana o de uva, para diluir los compuestos de prueba orales.

Preparación de ejemplo del compuesto de prueba

60

Una solución ilustrativa de una composición oral puede contener $^2\text{H}_4$ colato y bicarbonato de sodio (por ejemplo, 40 mg y 600 mg, respectivamente). En un procedimiento de ejemplo, el día antes de la prueba, puede añadirse agua hasta aproximadamente la marca de 10 cc en un tubo que contiene los compuestos de prueba orales para obtener la solución de prueba oral. Tapar bien el tubo y sacudir para mezclar. Remover el contenido para que todos los gránulos de polvo caigan en el agua.

65

5 El día de la prueba, verter la solución de prueba oral disuelta en un recipiente, tal como un recipiente de orina. Enjuagar el tubo en el recipiente de orina con aproximadamente 10 ml de agua. Antes de comenzar la prueba, añadir un líquido de dilución, tal como zumo de uva o manzana (no zumo de cítricos) hasta aproximadamente la marca de 40 ml en el recipiente de orina que contiene la solución de prueba oral. Agitar suavemente para mezclar; no sacudir ni remover, o la mezcla puede salirse del recipiente como espuma. Téngase zumo extra a mano para enjuagar.

Procedimiento de prueba

10 En un procedimiento de ejemplo se utilizará el siguiente procedimiento. Opcionalmente, recoger la muestra de suero de referencia (véase Recolección de Muestras) antes de administrar el compuesto de prueba.

Administración de Compuestos de Prueba.

15 Iniciar el temporizador. Registrar T = 0,0 - hacer que el paciente beba una solución oral de colato y zumo. Enjuagar el recipiente con un poco más de zumo y hacer que el paciente beba el enjuague. Registrar la hora del temporizador.

Recogida de muestra

Sangre

20 Tomar la muestra de sangre intravenosa del paciente a los 60 minutos después de la administración de colato. Registrar la hora del temporizador.

25 Procesar las muestras de sangre y realizar el análisis de muestras mediante HPLC MS (tal como se describe a continuación para FLOW y SHUNT); o por GC/MS para determinar la concentración de colato distinguible en la muestra de sangre. El resultado de la prueba de muestra para un paciente dado en una fecha/punto de tiempo específicos puede compararse con los valores de corte establecidos, por ejemplo, a partir de un grupo control, o alternativamente cada paciente puede servir como su propio control a lo largo del tiempo.

30 **Ejemplo 4. Procedimiento para la realización de los ensayos SHUNT y FLOW con análisis por HPLC-MS.**

La realización de los ensayos FLOW (prueba de aclaramiento del colato oral) y SHUNT (prueba de derivación del colato) se describe en las Patentes US 2010/0055734 y US 2008/0279766.

35 Recogida y procesamiento de muestras.

Reactivos y suministros.

40 Los siguientes reactivos y suministros se utilizan en los procedimientos de las pruebas de derivación del colato y aclaramiento del colato. Si el paciente se somete únicamente a la prueba de aclaramiento del colato oral, se omiten la solución intravenosa y la albúmina humana al 25 % para inyección.

Solución intravenosa- 20 mg 24-¹³C-ácido cólico en 5 cc 1mEq/ml de bicarbonato de sodio

Compuestos de ensayo PO 2,2,4,4-²H (40 mg) y bicarbonato de sodio (600 mg)

45 Albúmina humana al 25 % para inyección (5 ml) para añadir a una solución de 24-¹³C-ácido cólico.

Suministros intravenosos, incluidos 250 ml NS, catéter permanente, llave de paso de 3 vías.

Jeringas de 10 cc para administrar compuestos de prueba por vía intravenosa

Tubos de tapa roja de 7 cc para recogida de muestras

Crioviales de 3 ml para almacenamiento de suero

Cubo para desecho de agujas

50 Zumo de manzana o uva (no cítrico) para compuestos orales de prueba

Temporizador

Centrífuga

Pipetas de transferencia

55 Preparación del paciente.

60 Se comprueba que el paciente no tenga reacción alérgica al látex. Se comprueba, además, que el paciente no ha comido ni bebido nada (NPO), excepto agua, desde la medianoche de la noche anterior al día de la prueba. Se miden y se registran la altura y el peso del paciente. Al paciente se le coloca una vía intravenosa con una llave de tres vías y se coloca solución salina normal para mantenerla abierta (NS TKO) antes de que comience la prueba.

Soluciones madre del compuesto de colato.

Preparación del compuesto de prueba.

5 La solución oral se utiliza para una o ambas pruebas de aclaramiento de colato oral y/o ensayo de derivación de colato. La solución oral que incluye 2,2,4,4-²H-ácido cólico (40 mg) y bicarbonato de sodio (600 mg) se disuelve en aproximadamente 10 cc de agua 24 horas antes de la prueba, se mezcla vigorosamente. La solución se almacena en el refrigerador o a temperatura ambiente. Justo antes de la administración, se agrega zumo de uva o manzana (no cítrico) a la mezcla. La solución de zumo se mezcla bien y se vierte en una taza para que el paciente la beba. La taza se enjuaga con jugo extra que se administra al paciente.

15 La solución intravenosa se utiliza para una o ambas pruebas de aclaramiento del colato intravenoso y/o para el ensayo de derivación del colato. El personal de farmacia prepara una formulación de 20 mg de 24-¹³C-ácido cólico en 5 cc de bicarbonato de sodio 1 mEq/ml. La dosis de prueba es 20 mg de 24-¹³C-ácido cólico en 10 cc de diluyente. Si el vial está congelado, se deja descongelar por completo. Justo antes de comenzar la prueba, la solución del 24-¹³C-ácido cólico se mezcla con albúmina de la siguiente manera (este procedimiento evita la pérdida del compuesto de prueba durante el proceso de mezcla). Colocar toda la solución de 24-¹³C-ácido cólico (aproximadamente 5 cc) en una jeringa de 10 cc. Colocar 5 cc de albúmina en otra jeringa de 10 cc. Quitar la aguja de la jeringa del 24-¹³C-colato y colocar una llave de paso de 3 vías. Separar la aguja de la jeringa de albúmina e inyectar albúmina a través de la llave de paso en la jeringa del 24-¹³C-colato. Aspirar un poco de aire en la jeringa de ácidos biliares/albúmina y mezclar las soluciones suavemente con inversión de la jeringa varias veces. Expulsar aire.

Administración del compuesto de prueba.

25 Recoger las muestras de referencia antes de administrar los compuestos de prueba. La hora en que se toman estas muestras debe registrarse en la hoja de registro de recolección de muestras. La administración de los compuestos de prueba se realiza de la siguiente manera. Iniciar el temporizador. Registrar el reloj de 24 horas como T = 0. Registrar la hora. A T = 1-3 minutos administrar los compuestos orales. Hacer que el paciente beba la solución oral y el zumo. Enjuagar la taza con más zumo y hacer que el paciente se beba el enjuague. Registrar la hora del temporizador. A T= 30 4-5 minutos, mediante la utilización de la llave de paso de 3 vías, administrar por vía intravenosa 20 mg de ¹³C ácido cólico en 5 ml de albúmina humana al 25 %. Registrar la hora del temporizador. Regresar la línea a NS a través de una llave de paso de 3 vías.

Recogida de muestras.

35 Recoger todas las muestras a través de la llave de paso de 3 vías con descarte de 0,5 ml antes de cada muestra para evitar la dilución o la contaminación cruzada de las muestras. Recoger 5 ml en tapas rojas en los siguientes momentos. (T = hora del temporizador).

- 40 a. T = 10 minutos, recoger 5 minutos, registrar la hora del temporizador;
 b. T = 25 minutos, recoger 20 minutos, registrar la hora del temporizador;
 c. T = 50 minutos, recoger 45 minutos, registrar la hora del temporizador;
 d. T = 65 minutos, recoger 60 minutos, registrar la hora del temporizador;
 e. T = 95 minutos, recoger 90 minutos, registrar la hora del temporizador.

45 Manipulación de muestras.

Los tubos de tapa roja se dejan coagular a temperatura ambiente durante, como mínimo, 30 minutos. Todos los tubos de sangre se centrifugan durante 10 minutos a 3.000 rpm. El suero se retira a viales debidamente etiquetados y se congela a -20 °C hasta que se transportan las muestras.

Preparación de soluciones madre de compuestos de colato.

La determinación precisa del aclaramiento del colato y de la derivación depende de estándares de calibración precisos. Las concentraciones de los compuestos de ácido cólico en soluciones madre deben ser precisas y reproducibles. Se pesan porciones muy precisas (error < 0,5 %) de los polvos de ácido cólico, se utilizan embudos de pesaje de vidrio y se lavan con NaHCO₃ 1 M para asegurar la transferencia cuantitativa del polvo al matraz. Los matraces volumétricos se utilizan para garantizar volúmenes precisos de modo que las concentraciones finales de las soluciones madre primarias sean precisas. Las pipetas de desplazamiento de aire calibradas se utilizan para dispensar volúmenes precisos de las soluciones madre primarias que se llevan al volumen completo en matraces volumétricos para preparar soluciones madre secundarias que también son muy precisas. Las soluciones madre secundarias se utilizan para preparar las muestras de la curva estándar, las muestras de exactitud y precisión, las muestras de recuperación, las muestras de control de calidad, las muestras de selectividad y las muestras de estabilidad, tal como se describe en los SOP correspondientes.

65 Se requieren los siguientes reactivos.
 NaHCO₃ 1 M

NaHCO₃ 0,1 M
 NaHCO₃ 0,1 M/BSA 2 %
 Metanol, calidad LCMS
 Agua, calidad CLRW (agua de reactivo de laboratorio clínico)
 5 Ácido Cólico, pureza 98 %
 Ácido Quenodesoxicólico, pureza 98 %
 [24-¹³C]-Ácido Cólico, 99 en átomo % ¹³C
 [2,2,4,4-²H]-Ácido Cólico, 98 en átomo % ²H.

10 Todas las soluciones madre primarias se preparan a una concentración de 250 uM mediante la utilización de la tabla 2, a continuación.

Tabla 2. Soluciones madre primarias del compuesto de colato.

	ácido cólico	Ácido cólico 13-C	Ácido cólico 4-D	ácido quenodesoxicólico
15 PM	408,56	409,59	412,60	392,56
pureza	98,0 %	99,0 %	98,0 %	98,0 %
volumen	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml
20 conc	250 uM	250 uM	250 uM	250 uM
peso	10,42 mg	10,34 mg	10,53 mg	10,01 mg

25 Las soluciones madre primarias se preparan por separado en NaHCO₃ 0,1 M y en metanol de la siguiente manera. Pesar la cantidad apropiada de compuesto de ácido cólico (+/- 0,05 mg) en un embudo de vidrio de pesaje. Transferir el polvo a un matraz aforado de 100 ml. Utilizar metanol o NaHCO₃ 0,1 M para enjuagar cualquier polvo residual del embudo en el matraz. Llevar a un volumen final de 100 ml con metanol y mezclar bien. Etiquetar el frasco con una caducidad de 1 mes. Almacenar a -20 °C.

30 El ácido cólico sin marcar se prepara como un patrón interno 50 uM en MeOH o NaHCO₃ 0,1 M de la siguiente manera. Pipetear 2,0 ml del patrón primario CA 250 uM apropiado en un matraz aforado de 10 ml. Llevar a un volumen total de 10 ml con NaHCO₃ 0,1 M o metanol y mezclar bien. Etiquetar el frasco con una caducidad de 1 año. Almacenar a 4 °C.

35 Las soluciones madre secundarias de [24-¹³C]-Ácido Cólico preparadas en metanol se muestran en la tabla 3. Cada solución madre secundaria en el tubo de ensayo de vidrio apropiado con tapa de rosca de 15 ml. Los tubos se tapan y sellan de forma segura con varias capas de parafilm y se almacenan a -20 °C.

Tabla 3. Soluciones madre secundarias de [24-¹³C]-Ácido cólico en metanol.

concentración final del ensayo	Soluciones madre secundarias	13C-CA 250 uM (m)	Metanol	Total
uM	uM	ul	ml	ml
40 0,20	B (m) 2,0	80 +	9,92 =	10,00
45 1,00	D (m) 10,0	400 +	9,60 =	10,00
6,00	F (m) 60,0	2.400 +	7,60 =	10,00
		2.880	27,12	30,00

50 En la tabla 4 se muestran las soluciones madre secundarias de [2,2,4,4-²H]-ácido cólico preparadas en metanol. Cada solución madre secundaria está en el tubo de ensayo de vidrio apropiado con tapa de rosca de 15 ml. Los tubos se tapan y sellan de forma segura con varias capas de parafilm y se almacenan a -20 °C.

Tabla 4. Soluciones madre secundarias de [2,2,4,4-²H]-Ácido Cólico en metanol.

concentración final del ensayo	Soluciones Madres Secundarias	4D-CA 250 uM (m)	Metanol	Total
uM	uM	ul	ml	ml
60 0,30	I (m) 3,0	120 +	9,88 =	10,00
1,00	K (m) 10,0	400 +	9,60 =	10,00
3,00	L (m) 30,0	1.200 +	7,80 =	10,00
65		1720	28,28	30,00

Las soluciones madre secundarias de [24-¹³C]-ácido cólico preparadas en NaHCO₃ 0,1 M y BSA se muestran en la tabla 5. Cada solución madre secundaria se transfiere al tubo plástico apropiado con tapa de rosca de 15 ml, se tapa, se sella con varias capas de parafilm y se almacena a 4 °C.

5

Tabla 5. Soluciones madre secundarias de [24-¹³C]-ácido cólico en NaHCO₃ 0,1 M y BSA.

10

15

20

concentración final del ensayo	Soluciones madre secundarias	13C-CA 250 uM	NaHCO3 0,1 M	BSA 2 %	Total
uM	uM	ul	ml	ml	ml
0,10	A 1,0	40 +	4,96 +	5,00 =	10,00
0,20	B 2,0	80 +	4,92 +	5,00 =	10,00
0,60	C 6,0	240 +	4,76 +	5,00 =	10,00
1,00	D 10,0	400 +	4,60 +	5,00 =	10,00
2,00	E 20,0	800 +	4,20 +	5,00 =	10,00
6,00	F 60,0	2.400 +	2,60 +	5,00 =	10,00
10,00	G 100,0	4.000 +	1,00 +	5,00 =	10,00
		7.960	27,04	35,00	70,00

25

Las soluciones madre secundarias de [2,2,4,4-²H]-Ácido Cólico preparadas en NaHCO₃ 0,1 M y BSA se muestran en la tabla 6. Cada solución madre secundaria se transfiere al tubo plástico apropiado con tapa de rosca de 15 ml, se tapa, se sella con varias capas de parafilm y se almacena a 4 °C.

Tabla 6. Soluciones madre secundarias de [2,2,4,4-²H]-ácido cólico en NaHCO₃ 0,1 M y BSA.

30

35

40

concentración final del ensayo	Soluciones Madres Secundarias	4D-CA 250 uM	NaHCO3 0,1 M	BSA 2 %	Total
uM	uM	ul	ml	ml	ml
0,10	H 1,0	40 +	4,96 +	5,00 =	10,00
0,30	I 3,0	120 +	4,88 +	5,00 =	10,00
0,50	J 5,0	240 +	4,80 +	5,00 =	10,00
1,00	K 10,0	400 +	4,60 +	5,00 =	10,00
3,00	L 30,0	1.200 +	3,80 +	5,00 =	10,00
5,00	M 50,0	2.000 +	3,00 +	5,00 =	10,00
		3.960	26,04	30,00	60,00

45

Las soluciones madre secundarias, tal como se prepararon anteriormente, se utilizan en la preparación de muestras de exactitud y precisión en suero humano con colato no marcado como patrón interno. Las soluciones madre secundarias se usan en la preparación de muestras de recuperación con la adición de colato no marcado como patrón interno.

50

Para medir con precisión la función hepática del paciente con el ensayo de derivación del colato, cada uno de los dos compuestos de colato de isótopos estables diferentes deben cuantificarse con precisión en el suero del paciente. Para hacer esto, la exactitud, precisión y recuperación de cada una de las dos curvas estándar deben validarse en sus respectivos intervalos de concentraciones.

55

La exactitud y precisión de un ensayo se evalúan al ejecutar múltiples réplicas de muestras en el límite inferior de cuantificación (LLOQ), de los intervalos de concentraciones bajo, medio y alto. La exactitud es la proximidad del valor medio medido al valor real. La precisión es la reproducibilidad del valor medido indicado por el CV. La recuperación se evalúa mediante la comparación de la respuesta del detector del analito extraído del suero con la del analito puro medido a concentraciones bajas, medias y altas.

60

Preparación de muestras de control de calidad

65

La FDA proporciona pautas sobre los niveles aceptables de exactitud y precisión de los procedimientos analíticos. Véase, por ejemplo, Bioanalytical Method Validation, mayo de 2001, Sección VI. Application of Validated Method to Routine Drug Analysis. Una vez validado el procedimiento analítico para uso rutinario, su exactitud y precisión deben monitorearse regularmente para asegurar que el procedimiento continúe su función satisfactoriamente. Para lograr este objetivo, se preparan varias muestras de control de calidad por separado y deben analizarse con muestras de

prueba procesadas a intervalos basados en el número total de muestras. Las muestras de control de calidad se procesan por duplicado a tres concentraciones (una cerca del límite inferior de cuantificación (LLOQ, lower limit of quantification) (es decir, 3 x LLOQ), una en el medio del intervalo y una cerca del límite superior del intervalo) y deben incorporarse en cada ejecución del ensayo. El número de muestras de control de calidad (en múltiplos de tres) dependerá del número total de muestras en la ejecución. Los resultados de las muestras de control de calidad proporcionan la base para aceptar o rechazar la ejecución. Al menos cuatro de cada seis muestras de control de calidad deben estar dentro del 15 % de sus respectivos valores nominales. Dos de las seis muestras de control de calidad pueden estar fuera del 15 % de su valor nominal respectivo, pero no ambas a la misma concentración.

5 Las muestras de control de calidad deben cubrir los intervalos alto, medio y bajo de ambas curvas estándar. Las muestras de control de calidad se diseñan para simular de cerca las concentraciones reales de compuestos marcados que se encuentran en el suero del paciente durante el transcurso de tiempo de la prueba. La concentración de [24-¹³C]-CA es muy alta en el punto de tiempo temprano y cae exponencialmente a concentraciones medias y bajas. La concentración de [2,2,4,4-²H]-CA es muy baja en el punto de tiempo temprano, aumenta a su valor más alto en los puntos de tiempo intermedios y, a continuación, cae a una concentración media.

Suministros

20 Los siguientes suministros se utilizan para preparar las muestras de control de calidad que se utilizan en los procedimientos de prueba de derivación de colato y aclaramiento de colato. Si las muestras de los pacientes se someten únicamente a la prueba de aclaramiento del colato oral, pueden omitirse las muestras de control de calidad de [24-¹³C]-CA.

Suero humano AB (Bioproductos Gemini # 100-512)

25 Solución madre de patrón interno de colato sin marcar (IS (internal standard); ácido cólico 50 uM en NaHCO₃ 0,1 M) Soluciones madre secundarias de [24-¹³C]-ácido cólico y [2,2,4,4-²H]-ácido cólico en NaHCO₃ 0,1 M/BSA 1 %:

- B 2,0 uM [24-¹³C]-CA
- D 10,0 uM [24-¹³C]-CA
- 30 F 60,0 uM [24-¹³C]-CA
- I 3,0 uM [2,2,4,4-²H]-CA
- K 10,0 uM [2,2,4,4-²H]-CA
- L 30,0 uM [2,2,4,4-²H]-CA

35 matraces aforados de 10 ml
pipeta de desplazamiento de aire P1000 y puntas de 1 ml
crioviales nuevos y limpios

40 Procedimiento de preparación de muestras de control de calidad para aclaramiento de colato y ensayos.

45 Las muestras de [24-¹³C]-ácido cólico y [2,2,4,4-²H]-ácido cólico de control de calidad se preparan de la siguiente manera. Para cada conjunto de muestras de control de calidad, etiquetar 3 matraces aforados limpios de 10 ml como "QC 1", "QC 2" y "QC 3", tal como se muestra en la tabla 7. Pueden utilizarse matraces volumétricos más grandes para preparar lotes más grandes. Utilizar 1/10 del volumen nominal de los matraces más grandes como la cantidad de solución madre secundaria a agregar, tal como se indica a continuación.

Tabla 7. Muestras de control de calidad.

Tubos	[24- ¹³ C] -CA	[2,2,4,4- ² H] -CA
QC1	1,00 ml F	1,00 ml I
QC2	1,00 ml D	1,00 ml L
QC3	1,00 ml B	1,00 ml K

55 Mediante la utilización de un P1000, agregar 1,0 ml de la solución madre de [24-¹³C]-CA y 1,0 ml de la solución madre de [2,2,4,4-²H]-CA a los matraces apropiados, tal como se indica en la tabla 6. Llevar cada matraz a un total exacto de 10,0 ml con suero humano. Tapar bien cada matraz y mezclar bien con inversión varias veces. Etiquetar 8 crioviales como "QC 1", 8 como "QC 2" y 8 como "QC 3". Colocar alícuotas de 1,2 ml de cada mezcla de control de calidad en los viales apropiados. Almacenar las muestras de control de calidad congeladas a -80 °C. Las muestras de control de calidad tienen una caducidad de 1 año.

Cromatografía líquida de alta presión - Espectroscopia de masas (HPLC-MS) Preparación de muestras

65 Con el fin de garantizar pruebas precisas de la función hepática, los compuestos de prueba de colato marcados deben aislarse e identificarse de las muestras de suero de los pacientes. Los compuestos de colato son moléculas anfipáticas

- con regiones hidrófobas e hidrófilas. Los colatos son, además, ácidos carboxílicos que pueden existir en forma de ácido libre sin carga (ácido cólico) o en forma de ácido carboxílico cargado (colato) en dependencia del pH. Estas propiedades pueden aprovecharse para aislar compuestos de colato del suero. La utilización de HPLC/MS en lugar de GC/MS, permite el análisis de colato sin derivatización de la muestra. Alternativamente, la GC/MS puede utilizarse para el análisis de muestras con derivatización mediante cualquier técnica conocida en la técnica, por ejemplo, mediante el procedimiento de Everson y Martucci, Patente US 2008/0279766.
- 5
- Reactivos, suministros y equipamiento
- 10 Los siguientes reactivos se preparan y se utilizan en la preparación de muestras de HPLC-MS.
 Agua, calidad CLRW (agua de reactivo de laboratorio clínico)
 Metanol, calidad LCMS
 Éter dietílico, calidad ACS
 Solución madre primaria de patrón interno (IS) de ácido cólico sin marcar (CA 50 µM en NaHCO₃ 0,1 M)
- 15 Muestras de control de calidad (preparadas tal como se describió anteriormente)
 NaOH 1,0 N (disolver 20 g de NaOH en 500 ml de agua)
 NaOH 0,01 N (diluir NaOH 1,0 N 1 a 100 con agua)
 Metanol al 10 % (agregar 100 ml de metanol a un cilindro de 1 litro y llevar hasta 1,0 litro con agua)
 Metanol al 90 % (agregar 900 ml de metanol a un cilindro de 1 litro y llevar hasta 1,0 litro con agua)
- 20 HCl 0,2 N (agregar 1,0 ml de HCl concentrado calidad ACS lentamente con agitación a 57,0 ml de agua)
 Fase móvil (acetato de amonio 10 mM/metanol 60 %)
 Tubos de ensayo desechables de 16 x 100 y 13 x 100
 Pipeta de desplazamiento de aire P1000 y puntas de 1 ml
 Pipeta de desplazamiento de aire P100 y puntas de 0,2 ml
- 25 Pipeta repetidora
 Mezclador Vortex
 Cartuchos SPE (Bond Elut LRC C18 OH, 500 mg, Varian, Inc.)
 Colector de vacío
 Speed-Vac
- 30 Centrífuga de mesa
 Speed-Vac acoplado a campana extractora
 Baño de ultrasonidos
 Dispensadores repetidores para agua, metanol, metanol al 10 % y metanol al 90 %
- 35 Retirar las muestras de suero del paciente y un conjunto de muestras de control de calidad (2 de cada uno de QC1, 2 y 3) del congelador y déjelas descongelar hasta temperatura ambiente. Debe utilizarse equipo de protección personal (PPE, personal protective equipment) que incluye bata de laboratorio, guantes y protección para los ojos. Todos los eluatos y el equipamiento deben desinfectarse. Las pipetas y puntas que entren en contacto con la muestra deben desecharse como residuos peligrosos.
- 40 Etiquetar un conjunto de tubos de ensayo (16 x 100) para cada paciente con las iniciales de ese paciente y el código del punto de tiempo (5 min es 1, 20 min es 2, 45 min es 3, 60 min es 4, 90 min es 5). Mediante la utilización de una pipeta P1000, transferir 0,50 ml de suero del paciente del tubo de recogida apropiado al tubo de ensayo apropiado.
- 45 Etiquetar un conjunto de tubos de ensayo (16 x 100) para cada muestra de control de calidad (QC1a, QC1b, QC2a, QC2b, QC3a, QC3b). Mediante la utilización de un P1000, transferir 0,50 ml de cada muestra de control de calidad al tubo de ensayo correspondiente.
- 50 Etiquetar 2 tubos de ensayo (13 x 100) como STD1 y STD2.
- A cada muestra de paciente y cada muestra de control de calidad y cada tubo de muestra STD, agregar 50 µl de la solución madre primaria de patrón interno (IS) de ácido cólico sin marcar mediante la utilización de una pipeta repetidora.
- 55 Dejar a un lado los tubos STD para una posterior acidificación y extracción con éter en el paso 21.
- A cada tubo de muestra de paciente y tubo de muestra de control de calidad, agregar 1,0 ml de NaOH 0,01 N con una pipeta repetidora y agitar en vortex durante 30 segundos.
- 60 Etiquetar un juego de cartuchos SPE con uno para cada suero de paciente y muestra de control de calidad a procesar.
- En la campana, agregar 5 ml de metanol con un dispensador repetidor a cada cartucho. Esta etapa puede realizarse en un colector de vacío con alto vacío o por gravedad. Esto humecta el lecho de resina con disolvente. Una vez que la parte superior del líquido llegue a la parte superior de la fritada, agregar la siguiente solución. Evitar que los cartuchos se sequen.
- 65

ES 2 823 349 T3

- Agregar 10 ml de agua con el dispensador repetidor a cada cartucho. Esto equilibra el lecho de resina para prepararlo para unirse a los compuestos de colato. Este paso puede realizarse en el colector de vacío a alto vacío o por gravedad.
- 5 A cada cartucho SPE agregar la muestra adecuada. Los compuestos de colato se unirán al lecho de resina. A cada tubo de ensayo de muestra, agregar un enjuague de agua de 1 ml con el repetidor, agitar en vortex y agregar este enjuague al cartucho apropiado. Dejar correr la muestra por gravedad durante 20 minutos o más, a continuación, se puede utilizar un vacío bajo ≤ 3 pulgadas Hg para sacar la muestra.
- 10 Después de que la muestra haya entrado completamente en el lecho de resina, agregar 2,5 ml de agua a cada cartucho SPE con el dispensador repetidor. Esto lava el lecho de resina de la columna. Usar vacío bajo ≤ 3 pulgadas Hg.
- 15 A cada cartucho SPE agregar 2,5 ml de metanol al 10 % con el dispensador repetidor. Esto lava adicionalmente el lecho de resina de la columna. Utilizar vacío bajo ≤ 3 pulgadas Hg.
- Etiquetar un juego de tubos de ensayo (13 x 100) con uno para cada muestra de paciente y cada muestra de control de calidad.
- 20 Colocar cada tubo de ensayo en una gradilla y encima colocar su cartucho SPE correspondiente.
- A cada cartucho SPE agregar 2,5 ml de metanol al 90 % con el dispensador repetidor. Esto eluye los compuestos de colato que se recogen en los tubos de ensayo.
- 25 Colocar los tubos de ensayo en el Speed-Vac y centrifugar al vacío con calor alto durante 45 minutos para reducir el volumen de eluato y eliminar el metanol que interfiere con la extracción del éter.
- 30 A cada tubo del Speed-Vac y a cada uno de los tubos STD, agregar 0,5 ml de HCl 0,2 N con la Eppendorf Repeater Pipette y agitar en el vortex durante 30 segundos. Esta acidificación convierte los compuestos de colato en su forma de ácido libre para la extracción con éter.
- 35 En la campana de vapores, a cada tubo agregar 3 ml de éter dietílico y agitar vigorosamente en vortex durante 30 segundos. Esto extrae la forma de ácido libre de los compuestos de colato a la fase de éter.
- Centrifugar durante 5 minutos a un mínimo de 5.000 rpm para acelerar la separación de fases.
- Etiquetar otro juego de tubos de ensayo (13 x 100) uno para cada muestra.
- 40 Recoger con cuidado la capa de éter superior y transferirla a los nuevos tubos de ensayo.
- Colocar los extractos de éter en el Speed-Vac conectado a la campana de vapores y centrifugue al vacío sin calor hasta que las muestras estén secas. Alternativamente, las muestras pueden secarse con una corriente suave de gas N_2 .
- 45 Añadir 100 μ l de fase móvil a las muestras secas, agitar en vortex durante 30 segundos y someter a ultrasonido.
- Transferir las muestras a viales Agilent de 1,5 ml y tapar.
- Parámetros de HPLC/MS y preparación del sistema
- 50 Reactivos, suministros y equipamiento.
- Los siguientes reactivos se preparan y se utilizan en el análisis de muestras por HPLC-MS.
Agua, agua de Reactivo de laboratorio clínico (CLRW)
Metanol calidad LCMS
- 55 Acetato de amonio 10 mM agua
Acetato de amonio 10 mM metanol
Fase móvil: 60 % de acetato de amonio 10 mM metanol/ 40 % acetato de amonio 10 mM agua
Matraces aforados, tamaños apropiados
Cilindro graduado
- 60 Los siguientes instrumentos y suministros se utilizan en el análisis de muestras por HPLC-MS.
Balanza analítica calibrada
Instrumento de HPLC/MS: cromatógrafo de líquidos con espectrómetro de masas Agilent serie 1100 equipado con una fuente multimodo G1956A, muestreador automático, Software HP Chemstation o equivalente.
- 65 Columna de cromatografía de líquidos Agilent Eclipse XDB C8, 2,1X100 mm de 3,5 μ m Desgasificador de filtro de disolvente

Filtros de nailon de 0,22 µm

Los disolventes y la fase móvil se preparan cada uno, se filtra con un filtro de nailon 0,22 µm y se desgasifica. Los disolventes y la fase móvil caducan 48 horas después de la preparación.

5 El sistema LCMS está preparado y ajustado; la columna se estabiliza a 40 °C y se acondiciona al hacer pasar la fase móvil durante 30 minutos. Las muestras se cargan en el muestreador automático. La velocidad de flujo de la columna es de 0,4 ml/min de tampón de fase móvil isocrático; 60% acetato de amonio 10 mM metanol / 40% acetato de amonio 10 mM agua al. El muestreador automático inyecta 5 microlitros de cada muestra. La MS se ejecuta en ionización por electropulverización multimodo (MM-ES) con ionización por ionización química a presión atmosférica (APCI). La monitorización de iones seleccionados se realiza a 407,30, 408,30 y 411,30 m/z. Los picos están integrados por el software del sistema. Se analizan tres muestras de control de calidad con cada serie analítica. La concentración de las muestras de control de calidad debe estar dentro de 15% de precisión.

15 Los datos de la monitorización selectiva de iones de una o ambas muestras intravenosas y orales se utilizan para generar curvas de aclaramiento oral e intravenoso individualizadas para el paciente. Las curvas se integran a lo largo de sus respectivos intervalos de tiempo válidos y se genera un área para cada una. La comparación de las curvas de aclaramiento de colato intravenoso y oral permite determinar la eliminación hepática de primer paso o la derivación portal. La fracción de derivación hepática calculada mediante la fórmula:

$$20 \text{ Fracción de derivación} = [\text{AUC}_{\text{oral}}/\text{AUC}_{\text{IV}}] * [\text{Dosis}_{\text{IV}}/\text{Dosis}_{\text{oral}}] * 100 \%$$

en la que AUC representa el área bajo la curva y Dosis representa la cantidad (en mg) de dosis administrada.

25 **Ejemplo 5. Pruebas y análisis de NAFLD.**

Protocolo clínico. El colato deuterado (producto # 614149) y el ¹³C-colato (producto # 605883) se adquieren de Sigma-Isotec (Saint Louis, MO) y se disuelven en tampón de bicarbonato de sodio. El inventor tiene los IND # 65121 y 65123 sobre estos compuestos desde 2002 e informa anualmente a la FDA. Un farmacéutico de investigación filtra el ¹³C-colato para inyección, se comprueba la esterilidad y los pirógenos y se congela en alícuotas. Después de un ayuno nocturno, cada individuo recibirá un catéter intravenoso permanente y se extraerá una muestra de sangre venosa de referencia. El individuo beberá la dosis de colato deuterado mezclada con jugo de uva, y al mismo tiempo, se administrará el ¹³C-colato mezclado con albúmina por vía intravenosa. En puntos de tiempo de 5, 20, 45, 60 y 90 minutos, se extraerán muestras de sangre venosa. Una vez procesadas hasta suero, las muestras se transferirán al Laboratorio de pruebas clínicas. Cada individuo se evaluará 3 veces en un período de 1 mes.

Análisis de laboratorio. Las muestras de suero de los pacientes se enriquecerán con colato no marcado como patrón interno y, a continuación, los colatos se aislarán mediante SPE y extracción con éter. Se utilizará LCMS en C8 y la monitorización de iones seleccionados (SIM) para cuantificar los compuestos de prueba mediante el procedimiento de dilución de isótopos. Todas las series analíticas incluirán curvas estándar apropiadas y muestras de control de calidad. El aclaramiento oral (resultado de la prueba FLOW) y el aclaramiento intravenoso se calcularán a partir de las concentraciones séricas en los 5 puntos de tiempo. La relación entre el aclaramiento intravenoso y el oral es el resultado de la prueba SHUNT. El aclaramiento oral que se estima solamente a partir del punto de tiempo de 60 minutos es el resultado de la prueba STAT.

45 **Ejemplo 6. Alteración significativa de la circulación portal en más de la mitad de los pacientes con HCV crónico con fibrosis en estadio F0-F2 de Ishak. Establecimiento de un valor de corte para la identificación de un subconjunto de alto riesgo.**

50 Aproximadamente el 40% de los pacientes con hepatitis C crónica (CHC) tienen una enfermedad mínima definida por los estadios de fibrosis de Ishak de F0 a F2. Un subconjunto de pacientes F0-F2, supuestamente con insuficiencia hepática, progresa hasta cirrosis y se descompensan clínicamente. Este estudio se utilizó para identificar el subconjunto de alto riesgo mediante la cuantificación de la insuficiencia hepática mediante la utilización de pruebas cuantitativas no invasivas.

55 Procedimientos: Los pacientes con CHC e Ishak F0-F2 (n = 21) fueron reclutados en la clínica de los presentes inventores Clínica de Hepatología y comparados con individuos de control sanos (n = 32).

60 Los individuos se sometieron a una dieta sin cafeína y se mantuvieron en ayuna durante toda la noche. A la mañana siguiente se administraron por vía oral cafeína (300 mg), antipirina (500 mg) y 2,2,4,4-d₄-colato (40 mg); y se administraron por vía intravenosa 24-¹³C-colato (20 mg), galactosa (30 g) y lidocaína (0,5 mg/kg). Las muestras cronometradas fueron: muestras de saliva de cafeína y antipirina 0-60 horas, muestras de suero de MEGX 15 y 30 minutos, muestras de suero de galactosa 20-80 minutos y muestras de suero de colato 0-90 minutos.

65 Los procedimientos analíticos incluyeron HPLC (cafeína, antipirina, MEGX) y espectrofotofluorimetría (galactosa). Los colatos marcados se analizaron mediante un procedimiento LCMS validado según las directrices de la FDA en cuanto

a exactitud y precisión. Todos fueron evaluados mediante pruebas estándar de laboratorio y pruebas metabólicas que incluyen eliminación de cafeína, aclaramiento de antipirina, capacidad de eliminación de galactosa y formación de MEGX a partir de lidocaína. La mayoría de los pacientes con CHC F0-F2 estaban en el intervalo normal en las pruebas estándar de laboratorio. La función hepática no estuvo afectada significativamente en los pacientes con CHC F0-F2.

La circulación portal se cuantificó mediante el aclaramiento de d4-colato administrado por vía oral (FLOW), la relación de los aclaramientos de ¹³C-colato intravenoso con respecto al d4-colato administrado por vía oral (SHUNT), y al d4-colato sérico a los 60 min (STAT). Los colatos marcados se analizaron mediante un procedimiento LCMS validado en cuanto a exactitud y precisión. A medida que avanza la CHC, FLOW, que evalúa el flujo sanguíneo portal, se reduce, mientras que SHUNT, que evalúa la derivación portal-sistémica, aumenta. STAT, que utiliza una única muestra de sangre para inferir el FLUJO alterado, también aumenta.

Resultados: Dentro del grupo de pacientes F0-F2, el 62 % tenía ALT normal, el 95 % tenía bilirrubina normal, el 95 % tenía INR normal y el 71 % tenía albúmina normal. Todas las pruebas metabólicas fallaron en detectar insuficiencia hepática en pacientes F0-F2. Sin embargo, los pacientes F0-F2 tenían FLOW significativamente más bajo, SHUNT más alto y STAT más alto, tal como se muestra en la tabla 8. Se demostró que STAT es más sensible que las pruebas estándar en la detección del HCV en estadio temprano.

Tabla 8. Resultados de las pruebas FLOW, STAT y SHUNT en pacientes con HCV F0-F2 en comparación con controles sanos.

Prueba	Controles (n=32)	CHC F0-F2 (n=21)	valor p	Estadístico c de ROC	Valor de corte	Sens.	Espec.
FLOW (ml/min/kg)	30+/-9	20+/-6	0,00003	0,81	<20,3	57 %	88 %
SHUNT (%)	19+/-5%	26+/- 7%	0,0008	0,75	>25,2 %	52 %	88 %
STAT (µM)	0,38+/- 0,13	0,64+/- 0,13	0,0005	0,73	>0,52	52 %	91 %

La mayoría de los pacientes con CHC con enfermedad F0-F2 tienen una alteración significativa de la circulación portal que puede cuantificarse de forma única mediante FLOW, SHUNT y STAT. Las diferencias entre los controles y los pacientes con HCV F0-F2 se evaluaron mediante pruebas t no pareadas de dos colas y se representan gráficamente como un diagrama de cajas en la figura 9A. La línea discontinua indica el valor medio. La línea continua que atraviesa la caja representa el valor mediano y la parte inferior y superior de cada caja representan los percentiles 25 y 75. Las barras de error representan los percentiles 10 y 90. Se utilizó el análisis ROC de los resultados de la prueba para todos los individuos para determinar los valores de corte óptimos que distinguían a los pacientes F0-F2 de los controles y que definían la insuficiencia hepática para cada prueba. STAT se analizó como una prueba de detección en pacientes con CHC temprano. Se muestra una comparación de la sensibilidad en pacientes con CHC temprano en STAT en comparación con bilirrubina, INR, albúmina y ALT en la figura 9B. El valor de corte que se utiliza para definir la insuficiencia hepática e identificar el subconjunto de alto riesgo en la prueba STAT es > 0,52 µM. Al utilizar el valor de corte 0,52 µM, la prueba STAT identificó el 52 % de los pacientes en estadio temprano que cumplían con los criterios. Cuando la prueba STAT se combinó con la prueba ALT, con un valor de corte > 47, el porcentaje de pacientes con HCV en estadio temprano que cumplen con STAT > 0,52 µM o ALT >47 fue el 67 % de los pacientes en estadio temprano los que cumplieron con los criterios; tal como se muestra en la figura 9C. La insuficiencia hepática puede definir el subconjunto de pacientes F0-F2 que tienen la mayor necesidad de tratamiento antiviral. STAT aumenta significativamente en pacientes con CHC F0-F2. En un aspecto, un resultado de la prueba STAT por encima del valor de corte de alto riesgo se utiliza para definir la gravedad de la enfermedad o identificar a los pacientes a realizarles las pruebas SHUNT y FLOW. SHUNT alto y HFR portal bajo se asocian con várices, ascitis, otras complicaciones, descompensación y necesidad de trasplante, tal como se describe con más detalle en los ejemplos 7 y 8.

Ejemplo 7. La medición no invasiva de la circulación portal mediante la utilización de colatos cuantifica la gravedad de la enfermedad en pacientes en lista de espera con colangitis esclerosante primaria.

MELD ("model for end stage liver disease", modelo para la enfermedad hepática en etapa terminal) se implementó en 2002 para priorizar a los pacientes que esperaban un trasplante de hígado. MELD es una escala numérica que se utiliza para los adultos candidatos a un trasplante de hígado para determinar con qué urgencia un paciente necesita un trasplante de hígado dentro de los próximos tres meses. El número se calcula mediante la utilización de las pruebas de laboratorio más recientes, incluida la bilirrubina, que mide la eficacia con la cual el hígado excreta la bilis; INR (tiempo de protrombina) que mide la capacidad de producir factores de coagulación de la sangre; y creatinina. Es posible que MELD no evalúe adecuadamente la gravedad de la enfermedad en los pacientes con colangitis esclerosante primaria (PSC) incluidos en las listas, en comparación con los aclaramientos del colato duales o las pruebas que cuantifican la circulación portal.

- El procedimiento de aclaramiento del colato dual produce 3 resultados de prueba: la fracción de derivación portal sistémica (SHUNT); la tasa de filtración hepática portal (HFR portal, que también se define como FLOW en las discusiones y ejemplos anteriores) basada en el compuesto de colato distinguible administrado por vía oral en la sangre; y la tasa de filtración hepática sistémica (HFR sistémica), basada en el compuesto de colato distinguible administrado por vía intravenosa en la sangre. Se administra colato-2,2,4,4-d₄(40 mg) por vía oral y se absorbe en la vena porta mediante transportadores entéricos específicos. Se administra colato-24-¹³C (20 mg) por vía intravenosa y se absorbe principalmente a través de la arteria hepática desde la circulación sistémica. Los transportadores hepáticos específicos aclaran el colato de la circulación portal y sistémica.
- Se compararon 38 pacientes con PSC con 32 controles sanos. De los pacientes con PSC, se incluyeron 10 pacientes en la lista para trasplante de hígado; 28 pacientes no se incluyeron en la lista. Se tomaron muestras de sangre periférica a los 0, 5, 20, 45, 60 y 90 minutos después de la dosificación simultánea. Los colatos marcados en suero se analizan mediante LCMS validado según las pautas de la FDA en cuanto a exactitud y precisión.
- En los pacientes con hígado sano, se utilizaron las curvas de aclaramiento de colato intravenoso y de colato oral para determinar SHUNT: ~ 20 %. Se utilizó el aclaramiento de colato oral por kg de peso corporal para determinar la tasa de filtración hepática portal (HFR portal): ~ 30 ml/min/kg. El aclaramiento intravenoso por kg de peso corporal determina el HFR sistémico ~ 6 ml/min/kg. Los controles sanos mostraron SHUNT bajo, HFR portal alto y HFR sistémico alto.
- En los pacientes con hígado enfermo, se utilizaron curvas de aclaramiento de colato intravenoso y oral para determinar SHUNT de aproximadamente el 30 % hasta aproximadamente el 90 %. El HFR portal es aproximadamente de 20 ml/min/kg hasta aproximadamente 2 ml/min/kg. El HFR sistémico es aproximadamente de 4 ml/min/kg hasta aproximadamente 1 ml/min/kg. Los pacientes con enfermedad hepática presentan mayor SHUNT, menor HFR portal y menor HFR sistémica a medida que aumenta la gravedad de la enfermedad.
- Resultados. SHUNT alto y HFR portal bajo se asociaron con várices, ascitis, otras complicaciones, descompensación y necesidad de trasplante.
- La figura 10 muestra (A) HFR portal determinada por aclaramiento de colato distinguible oral y (B) MELD en pacientes con PSC (n=38) en comparación con controles sanos (n=32). HFR portal y SHUNT (no mostrado) son significativamente diferentes en pacientes con PSC frente a controles sanos. La figura 10 muestra (C) HFR portal determinado por aclaramiento de colato distinguible oral y (D) MELD en pacientes con PSC no incluidos en la lista para trasplante de hígado (n=28) y pacientes con PSC incluidos en la lista para trasplante de hígado (n=10). HFR portal, SHUNT (no mostrado) y MELD son significativamente diferentes entre los pacientes con HSC incluidos en la lista y los pacientes con PSC no incluidos en la lista para LT (liver transplant). La figura 10 muestra (E) HFR portal determinado por aclaramiento de colato distinguible oral y (F) MELD en pacientes con PSC incluidos en la lista con várices (n=5) en comparación con pacientes con PSC incluidos en la lista sin várices (n=5). HFR portal y SHUNT (datos no mostrados), pero no MELD, son significativamente diferentes entre los pacientes con PSC incluidos en la lista con y sin várices.
- La figura 11 muestra la correlación entre SHUNT y HFR portal en controles sanos y pacientes con PSC: □ muestra valores promedio para controles sanos; ◇ muestra el promedio de pacientes con PSC no incluidos en la lista de trasplante hepático; círculos abiertos ○ muestran pacientes individuales con PSC en lista sin várices; círculos grises sombreados ◐ muestran pacientes individuales con PSC incluidos en la lista con várices sin ascitis; círculos sólidos ● muestran pacientes individuales con PSC en lista con várices y ascitis. Además, los pacientes individuales se indican de la siguiente manera: Paciente A: MELD 20, el más bajo HFR portal y el más bajo HFR sistémico, requirió trasplante hepático de emergencia dentro de un mes. Paciente B: MELD 17, el más alto SHUNT, en progreso a los 20 años, se seleccionó para recibir LDLT dentro de los seis meses. Paciente C: MELD 13, segundo HFR portal más bajo, en 1 año de seguimiento; requirió 6 ERCP de dilatación y paracentesis. Paciente D: MELD 11, en 1 año de seguimiento tuvo colecistectomía. Se encontró que otros pacientes estaban clínicamente estables en el seguimiento de 1 año. Sorprendentemente, a pesar de las puntuaciones MELD relativamente bajas, los 4 pacientes con los más altos SHUNT y HFR portal más bajos experimentaron complicaciones clínicas cuya gravedad se correlacionó con la prueba de colato.

Ejemplo 8. Medición no invasiva de la circulación portal mediante la utilización de colato para cuantificar la gravedad de la enfermedad en la colangitis esclerosante primaria.

El sello distintivo de la fisiopatología de la PSC es la fibrosis portal que conduce a PHTN (hipertensión portal) más temprana en la enfermedad en comparación con otras etiologías de enfermedad hepática. La evaluación de la gravedad de la enfermedad en la PSC carece de un patrón de oro, ya que la biopsia hepática tiene un error de muestreo significativo y ya no se recomienda, el HVPG es invasivo, costoso y poco práctico, y los modelos clínicos se crearon realmente para evaluar la enfermedad en estadio tardío.

Existe una necesidad insatisfecha de una evaluación precisa y no invasiva de la PSC en el espectro de la gravedad de la enfermedad. Se demostró que las pruebas de colato evalúan la gravedad de la enfermedad y mejoran la predicción de los resultados en la población con HCV.

Los objetivos de este estudio fueron determinar la reproducibilidad de las pruebas de colato en una cohorte de PSC, evaluar la capacidad de las pruebas de colato para cuantificar la gravedad de la enfermedad en la PSC y, por último, explorar el potencial pronóstico de las pruebas de colato para predecir la descompensación clínica.

5 Se realizaron pruebas cuantitativas de función hepática mediante la utilización de dos colatos distinguibles marcados de forma diferencial administrados por vía oral y/o intravenosa para obtener tres resultados de prueba diferentes: SHUNT, HFR Portal (FLOW) y STAT. El colato oral es captado por transportadores entéricos específicos directamente en la vena porta y transportadores hepáticos lo eliminan en su primer paso a través del hígado. El colato intravenoso se distribuye sistémicamente y es extraído tanto por la arteria hepática como por la vena porta. Se midieron las
10 concentraciones de ambos colatos en 5 momentos diferentes dentro de 90 minutos y se calcularon los aclaramientos. El aclaramiento intravenoso sobre el aclaramiento oral es la fracción SHUNT sistémica portal. El aclaramiento oral por kilogramo de peso corporal representa la tasa de filtración hepática portal (HFR portal, FLOW) o la cantidad de entrega de sangre portal. STAT es la concentración de colato oral a los 60 minutos y se demostró que estima con precisión la HFR portal.

15 Los valores para la función hepática normal se establecieron en controles sanos en estudios previos: el SHUNT promedio es el 20 %, el HFR promedio (FLOW) es 30 y el STAT promedio es 0,4. En el hígado enfermo, a medida que se escapa más sangre de la extracción por derivación intrahepática y extrahepática a la circulación sistémica, el SHUNT aumenta (~30-90 %), la HFR (FLOW) o el flujo portal disminuye (~20 a 2 ml/min/kg) y STAT aumenta (0,6 a 5
20 uM).

Procedimientos. Los pacientes se sometieron a Historia & examen físico y pruebas de laboratorio estándar en la visita de referencia, además de las pruebas de colato. Se realizó una revisión retrospectiva de los informes de imágenes/endoscópicos, y aquellos con antecedentes de descompensación determinados por antecedentes de ascitis o sangrado por várices tenían ascitis en las imágenes o al examen físico, o se realizó una endoscopia con evidencia de
25 sangrado por várices. Aquellos con características de PHTN tenían esplenomegalia en los estudios radiológicos o várices documentadas por endoscopia. Las pruebas de colato se realizaron 2 días diferentes dentro de un mes para obtener datos reproducibles, y se realizó un seguimiento prospectivo durante un año para los eventos clínicos.

30 En total, se inscribieron 38 pacientes en el estudio, 10 de los cuales ya estaban incluidos en lista para trasplante. Fieles a los datos demográficos típicos de la PSC, casi las tres cuartas partes eran hombres, la gran mayoría eran caucásicos, la media de la edad era 49. Esta cohorte tenía una enfermedad relativamente leve, ya que la puntuación media de MELD fue 9,5, la puntuación media de CTP fue 6 y la puntuación media del riesgo mayo de PSC fue de 0,87. Hubo 22 pacientes sin características de PHTN, 12 con PHTN sin antecedentes de descompensación y 4 con
35 antecedentes de descompensación.

La reproducibilidad de las pruebas de colato se evaluó mediante el coeficiente de correlación, el coeficiente de variación y la correlación intraclase. Las pruebas de colato demostraron una reproducibilidad excelente con variaciones muy bajas de una fecha de prueba a otra. Los CV promedio para SHUNT, FLOW y STAT fueron el 9,0 %, 9,2 % y 21 %, respectivamente. Como STAT es una medición de un solo punto de tiempo, en lugar de un promedio de varios puntos, se esperaba un CV más alto. No hubo cambios significativos en el CV en el intervalo de resultados de las pruebas, lo que indica una reproducibilidad excelente en un amplio intervalo de gravedad de la enfermedad. La correlación intraclase (ICC) se utilizó para medir la variabilidad de un individuo en el espectro de todos los resultados de las pruebas. Los ICC para SHUNT, FLOW y STAT entre dos visitas de prueba fueron 0,93, 0,91 y 0,96,
45 respectivamente, lo que indica que la variabilidad individual es muy baja. Para poner esto en contexto, el ICC de 0,7 - 0,8 indica un fuerte acuerdo entre las pruebas. Las tres pruebas de colato distinguieron a los controles sanos de los pacientes con PSC con enfermedad leve, lo que muestra la capacidad de detectar alteraciones subclínicas en el flujo portal.

50 Tal como se muestra en la figura 12, la HFR portal distinguió entre diferentes grados de gravedad de la enfermedad. En comparación con los controles sanos, incluso los pacientes con PSC sin características de PHTN o evidencia de descompensación tenían HFR significativamente deteriorada. Además, hubo una diferencia significativa entre el grupo con PHTN y la cohorte con evidencia de descompensación en forma de ascitis o antecedentes de sangrado por várices.

55 Tal como se muestra en la figura 13, SHUNT demostró diferencias significativas entre cada subgrupo, al distinguir nuevamente a los pacientes con PSC con enfermedad leve de los controles sanos, y además, diferenciar las cohortes con y sin PHTN, y el grupo con PHTN del mismo con antecedentes de ascitis o sangrado por várices.

60 La figura 14 ilustra que, sorprendentemente, con una única muestra de sangre extraída en un punto de tiempo específico, STAT mostró diferencias significativas entre los controles sanos y la enfermedad leve, y aquellos con PHTN y descompensación.

65 Cada una de las tres pruebas de colato mostró una asociación significativa con várices. Se utilizó el análisis de la curva ROC de las pruebas SHUNT, FLOW y STAT para identificar a los pacientes con PSC con várices (10 de 35). AUROC ("area under the receiver operating characteristic curve", área bajo la curva característica operativa del receptor) se

utilizó para derivar el estadístico C. Un valor de corte STAT superior a 0,79 uM dio como resultado una sensibilidad del 100 % y una especificidad del 84 % para predecir las várices, tal como se muestra en la tabla 9.

Tabla 9. Valores de corte predictivos de várices en pacientes con PSC para SHUNT, FLOW y STAT.

Valores de corte	Sensibilidad	Especificidad	PPV	NPV	Estadístico-c
SHUNT >40,5 %	100 %	76 %	63 %	100 %	0,92
FLOW <13 ml/min/kg	100 %	76 %	63 %	100 %	0,93
STAT > 0,79 uM	100 %	84 %	71 %	100 %	0,93

Se utilizó el análisis de la curva ROC de las pruebas SHUNT, FLOW y STAT para identificar a los pacientes con PSC con descompensación (antecedentes de sangrado de várices o ascitis, 4 de 35). Un valor de corte STAT superior a 2,2 uM dio como resultado una sensibilidad de 100 % y una especificidad de 97 % para predecir la descompensación, tal como se muestra en la tabla 10.

Tabla 10. Valores de corte predictivos de descompensación en pacientes con PSC para SHUNT, FLOW y STAT.

Valores de corte	Sensibilidad	Especificidad	PPV	NPV	Estadístico-c
SHUNT >54 %	100 %	87 %	50 %	100 %	0,94
FLOW <4,3 ml/min/kg	100 %	100 %	100 %	100 %	1,00
STAT > 2,2 uM	100 %	97 %	80 %	100 %	0,99

Las pruebas SHUNT, FLOW y STAT pueden utilizarse para predecir la presencia de várices e informar cuales pacientes deben someterse a evaluación endoscópica, y pueden predecir la descompensación clínica con mayor precisión que los modelos clínicos tradicionales. Se determinó que las pruebas SHUNT, FLOW y STAT son pruebas diagnósticas reproducibles y fiables para evaluar la enfermedad de la PSC en todo el espectro de gravedad.

SHUNT, FLOW, STAT y gravedad de la enfermedad PSC

Se estableció una escala de valores de corte de gravedad de la enfermedad PSC para las pruebas SHUNT, FLOW y STAT mediante los procedimientos anteriores y se muestra en la tabla 11.

Tabla 11. Valores de corte predictivos de la gravedad de la enfermedad en pacientes con PSC para SHUNT, FLOW y STAT.

SHUNT (%)	FLOW (ml min ⁻¹ kg ⁻¹)	STAT (uM)	Gravedad de la enfermedad de PSC
71±11	3±1	3,7±0,9	PSC descompensada (sangrado de várices o ascitis)
62±17	7±4	2,2±1,4	PSC con várices
54±19	11±7	1,6±1,5	PSC con PHTN (esplenografía o várices)
37±12	16±5	0,7±0,5	PSC sin PHTN
19±5	30±9	0,4±0,1	Sano

Referencias

- Browning, JD, Szczepaniak, LS, Dobbins, R, Nuremberg, P, Horton, JD, Cohen, JC, Grundy, SM and Hobbs, HH. 2004. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the united states: Impact of ethnicity. *Hepatology*. 40: 1387-1395.
- Adams, LA, Lymp, JF, St Sauver, J, Sanderson, SO, Lindor, KD, Feldstein, A and Angulo, P. 2005. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: A population-based cohort study. *Gastroenterology*. 129: 113-121.
- Janes, CH and Lindor, KD. 1993. Outcome of patients hospitalized for complications after outpatient liver biopsy. *Ann Intern Med*. 118: 96-98.
- Seeff, LB, Everson, GT, Morgan, TR, Curto, TM, Lee, WM, Ghany, MG, Shiffman, ML, Fontana, RJ, Di Bisceglie, AM, Bonkovsky, HL and Dienstag, JL. 2010. Complication rate of percutaneous liver biopsies among persons with advanced chronic liver disease in the halt-c trial. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 8: 877-883.

5. Vuppalanchi, R, Unalp, A, Van Natta, ML, Cummings, OW, Sandrasegaran, KE, Hameed, T, Tonascia, J and Chalasani, N. 2009. Effects of liver biopsy sample length and number of readings on sampling variability in nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 7: 481-486.
6. Bedossa, P, Dargere, D and Paradis, V. 2003. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis c. *Hepatology.* 38: 1449-1457.
7. Regev, A, Berho, M, Jeffers, LJ, Milikowski, C, Molina, EG, Pyrsopoulos, NT, Feng, ZZ, Reddy, KR and Schiff, ER. 2002. Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic hcv infection. *Am J Gastroenterol.* 97: 2614-2618.
8. Rousselet, MC, Michalak, S, Dupre, F, Croue, A, Bedossa, P, Saint-Andre, JP and Cales, P. 2005. Sources of variability in histological scoring of chronic viral hepatitis. *Hepatology.* 41: 257-264.
9. Ishak, K, Baptista, A, Bianchi, L, Callea, F, De Groote, J, Gudat, F, Denk, H, Desmet, V, Korb, G, MacSween, RN and et al. 1995. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol.* 22: 696-699.
10. Knodell, RG, Ishak, KG, Black, WC, Chen, TS, Craig, R, Kaplowitz, N, Kiernan, TW and Wollman, J. 1981. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology.* 1: 431-435.
11. Batts, KP and Ludwig, J. 1995. Chronic hepatitis. An update on terminology and reporting. *Am J Surg Pathol.* 19: 1409-1417.
12. Scheuer, PJ. 1991. Classification of chronic viral hepatitis: A need for reassessment. *J Hepatol.* 13: 372-374.
13. Group, TFMCS. 1994. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis c *Hepatology.* 20: 15-20.
14. Brunt, EM, Janney, CG, Di Bisceglie, AM, Neuschwander-Tetri, BA and Bacon, BR. 1999. Nonalcoholic steatohepatitis: A proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol.* 94: 2467-2474.
15. Kleiner, DE, Brunt, EM, Van Natta, M, Behling, C, Contos, MJ, Cummings, OW, Ferrell, LD, Liu, YC, Torbenson, MS, Unalp-Arida, A, Yeh, M, McCullough, AJ and Sanyal, AJ. 2005. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 41: 1313-1321.
16. Ratziu, V, Charlotte, F, Heurtier, A, Gombert, S, Giral, P, Bruckert, E, Grimaldi, A, Capron, F and Poynard, T. 2005. Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.* 128: 1898-1906.
17. Everson, GT, Shiffman, ML, Morgan, TR, Hoefs, JC, Sterling, RK, Wagner, DA, Kulig, CC, Curto, TM and Wright, EC. 2008. The spectrum of hepatic functional impairment in compensated chronic hepatitis c: Results from the hepatitis c anti-viral long-term treatment against cirrhosis trial. *Aliment Pharmacol Ther.* 27: 798-809.
18. Everson, GT, Martucci, MA, Shiffman, ML, Sterling, RK, Morgan, TR and Hoefs, JC. 2007. Portal-systemic shunting in patients with fibrosis or cirrhosis due to chronic hepatitis c: The minimal model for measuring cholate clearances and shunt. *Aliment Pharmacol Ther.* 26: 401-410.
19. Everson, GT, Shiffman, ML, Hoefs, JC, Morgan, TR, Sterling, RK, Wagner, DA, Desanto, JL, Curto, TM and Wright, EC. 2009. Quantitative tests of liver function measure hepatic improvement after sustained virological response: Results from the halt-c trial. *Aliment Pharmacol Ther.* 29: 589-601.
20. Wilson, S and Chalasani, N. 2007. Noninvasive markers of advanced histology in nonalcoholic fatty liver disease: Are we there yet? *Gastroenterology.* 133: 1377-1378; discussion 1378-1379.
21. Vuppalanchi, R and Chalasani, N. 2009. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: Selected practical issues in their evaluation and management. *Hepatology.* 49: 306-317.
22. Soderberg, C, Stal, P, Askling, J, Glaumann, H, Lindberg, G, Marmur, J and Hultcrantz, R. 2010. Decreased survival of subjects with elevated liver function tests during a 28-year follow-up. *Hepatology.* 51: 595-602.
23. Rafiq, N, Bai, C, Fang, Y, Srishord, M, McCullough, A, Gramlich, T and Younossi, ZM. 2009. Long-term followup of patients with nonalcoholic fatty liver. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 7: 234-238.
24. Angulo, P. 2010. Long-term mortality in nonalcoholic fatty liver disease: Is liver histology of any prognostic significance? *Hepatology.* 51: 373-375.

25. Mukherjee, S and Sorrell, MF. 2006. Noninvasive tests for liver fibrosis. *Semin Liver Dis.* 26: 337-347.
- 5 26. Shah, AG, Lydecker, A, Murray, K, Tetri, BN, Contos, MJ and Sanyal, AJ. 2009. Comparison of noninvasive markers of fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 7: 1104-1112.
- 10 27. Boursier, J, Bacq, Y, Halfon, P, Leroy, V, de Ledinghen, V, de Muret, A, Bourliere, M, Sturm, N, Foucher, J, Oberti, F, Rousselet, MC and Cales, P. 2009. Improved diagnostic accuracy of blood tests for severe fibrosis and cirrhosis in chronic hepatitis c. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 21: 28-38.
- 15 28. Shaheen, AA, Wan, AF and Myers, RP. 2007. Fibrotest and fibroscan for the prediction of hepatitis c-related fibrosis: A systematic review of diagnostic test accuracy. *Am J Gastroenterol.* 102: 2589-2600.
- 20 29. Ratziu, V, Massard, J, Charlotte, F, Messous, D, Imbert-Bismut, F, Bonyhay, L, Tahiri, M, Munteanu, M, Thabut, D, Cadranet, JF, Le Bail, B, de Ledinghen, V and Poynard, T. 2006. Diagnostic value of biochemical markers (fibrotest-fibrosure) for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol.* 6: 6.
- 30 30. Angulo, P, Hui, JM, Marchesini, G, Bugianesi, E, George, J, Farrell, GC, Enders, F, Saksena, S, Burt, AD, Bida, JP, Lindor, K, Sanderson, SO, Lenzi, M, Adams, LA, Kench, J, Therneau, TM and Day, CP. 2007. The nafld fibrosis score: A noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with nafld. *Hepatology.* 45: 846-854.
- 35 31. Wong, VW, Vergniol, J, Wong, GL, Foucher, J, Chan, HL, Le Bail, B, Choi, PC, Kowo, M, Chan, AW, Merrouche, W, Sung, JJ and de Ledinghen, V. 2010. Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 51: 454-462.
- 40 32. Braden, B, Faust, D, Sarrazin, U, Zeuzem, S, Dietrich, CF, Caspary, WF and Sarrazin, C. 2005. 13c-methacetin breath test as liver function test in patients with chronic hepatitis c virus infection. *Aliment Pharmacol Ther.* 21: 179-185.
- 45 33. Del Poggio, P and Colombo, S. 2009. Is transient elastography a useful tool for screening liver disease? *World J Gastroenterol.* 15: 1409-1414.
- 50 34. Friedrich-Rust, M, Ong, MF, Martens, S, Sarrazin, C, Bojunga, J, Zeuzem, S and Herrmann, E. 2008. Performance of transient elastography for the staging of liver fibrosis: A meta-analysis. *Gastroenterology.* 134: 960-974.
- 55 35. Rossi, E, Adams, L, Prins, A, Bulsara, M, de Boer, B, Garas, G, MacQuillan, G, Speers, D and Jeffrey, G. 2003. Validation of the fibrotest biochemical markers score in assessing liver fibrosis in hepatitis c patients. *Clin Chem.* 49: 450-454.
36. Trauner, M and Boyer, JL. 2003. Bile salt transporters: Molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev.* 83: 633-671.
37. Manning, DS and Afdhal, NH. 2008. Diagnosis and quantitation of fibrosis. *Gastroenterology.* 134: 1670-1681.
38. Poynard, T, Ingiliz, P, Elkrief, L, Munteanu, M, Lebray, P, Morra, R, Messous, D, Bismut, FI, Roulot, D, Benhamou, Y, Thabut, D and Ratziu, V. 2008. Concordance in a world without a gold standard: A new non-invasive methodology for improving accuracy of fibrosis markers. *PLoS One.* 3: e3857.
39. Goodman, ZD. 2007. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases. *J Hepatol.* 47: 598-607.
40. Ludwig, J, Barham, SS, LaRusso, NF, Elveback, LR, Wiesner, RH and McCall, JT. 1981. Morphologic features of chronic hepatitis associated with primary sclerosing cholangitis and chronic ulcerative colitis. *Hepatology.* 1: 632-640.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento *in vitro* para la estimación del flujo sanguíneo portal en un individuo a partir de una única muestra de sangre o suero, comprendiendo el procedimiento:
- 5 recibir una muestra que consiste en una única muestra de sangre o suero tomada de un individuo que tiene un trastorno hepático, o se sospecha que tiene o desarrolla el mismo, en el que la única muestra de sangre o suero se toma en un punto de tiempo que se selecciona entre 30 y 180 minutos después de la administración oral de un compuesto de colato distinguible al individuo, en el que no se coadministra por vía intravenosa ningún otro compuesto de colato distinguible, y en el que la muestra se ha tomado del individuo en un único punto de tiempo específico
- 10 después de la administración oral del compuesto de colato distinguible al individuo; medir la concentración del compuesto de colato distinguible administrado por vía oral en la única muestra de sangre o suero; y
- comparar la concentración del compuesto de colato distinguible en la única muestra de sangre o suero del individuo con un valor de corte de la concentración de compuesto de colato distinguible o valores de corte establecidos a partir
- 15 de una población de pacientes conocida, en el que la concentración de compuesto de colato distinguible en la muestra en comparación con el valor de corte de la concentración de compuesto de colato distinguible o los valores de corte en la población de pacientes conocida es una estimación del flujo sanguíneo portal en el individuo.
- 20 2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el compuesto de colato distinguible administrado por vía oral es ácido cólico marcado isotópicamente estable.
3. Procedimiento, según la reivindicación 2, en el que el ácido cólico marcado isotópicamente se selecciona entre
- 25 $24\text{-}^{13}\text{C}$ ácido cólico o $2,2,4,4\text{-}^2\text{H}$ ácido cólico.
4. Procedimiento, según la reivindicación 1, en donde la única muestra de sangre o suero se toma en un punto de tiempo que se selecciona entre el grupo que consiste en 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175 o 180 minutos, o en cualquier punto de tiempo intermedio, después de la administración oral del compuesto de colato distinguible.
- 30 5. Procedimiento, según la reivindicación 4, en el que la única muestra de sangre o suero se toma en un punto de tiempo que se selecciona entre 45, 60 o 90 minutos después de la administración oral del compuesto de colato distinguible.
- 35 6. Procedimiento, según la reivindicación 1, que comprende, además, las etapas de convertir la concentración del compuesto de colato distinguible en la muestra mediante la utilización de una ecuación en una tasa de flujo estimada (ml/min/kg) en el individuo; y
- comparar la tasa de flujo estimada en el individuo con un valor de corte de la tasa de filtración hepática portal (FLOW) o valores de corte de valores de corte establecidos a partir de una población de pacientes conocida.
- 40 7. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la etapa de medición comprende cuantificar la concentración del compuesto de colato distinguible en la muestra por GC-MS o HPLC-MS.

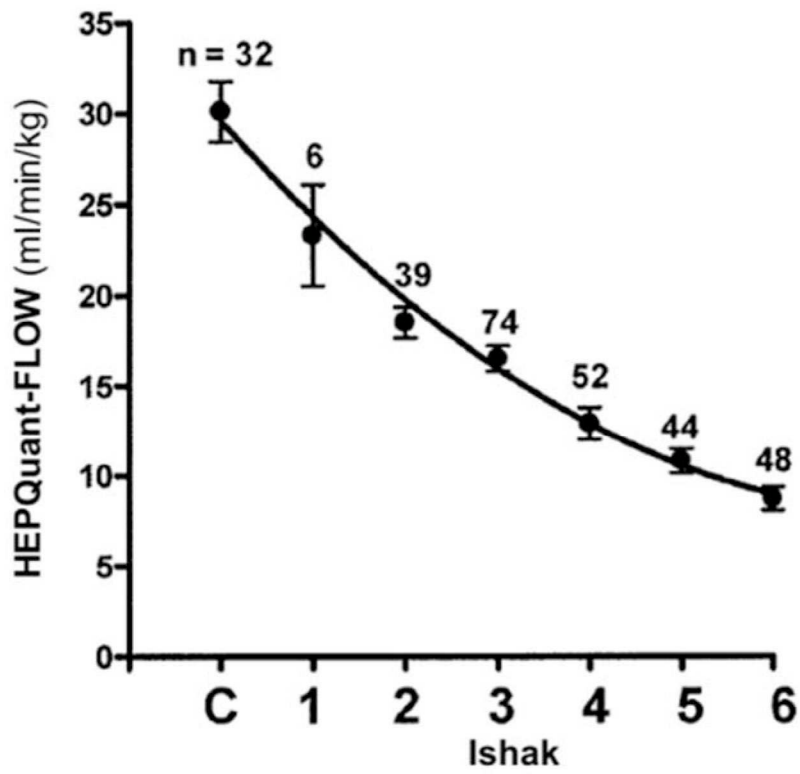


FIGURA 1

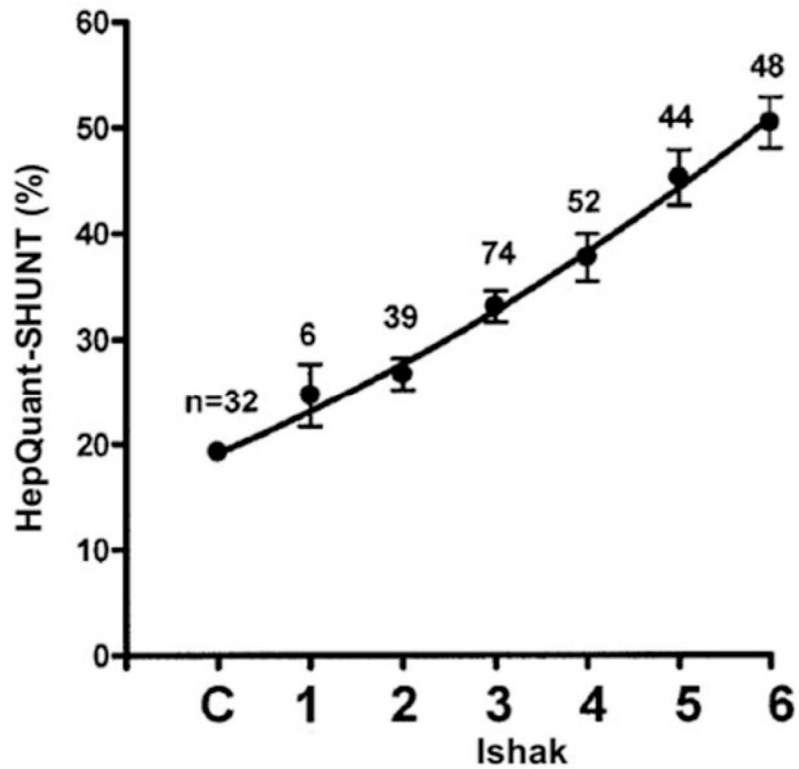


FIGURA 2

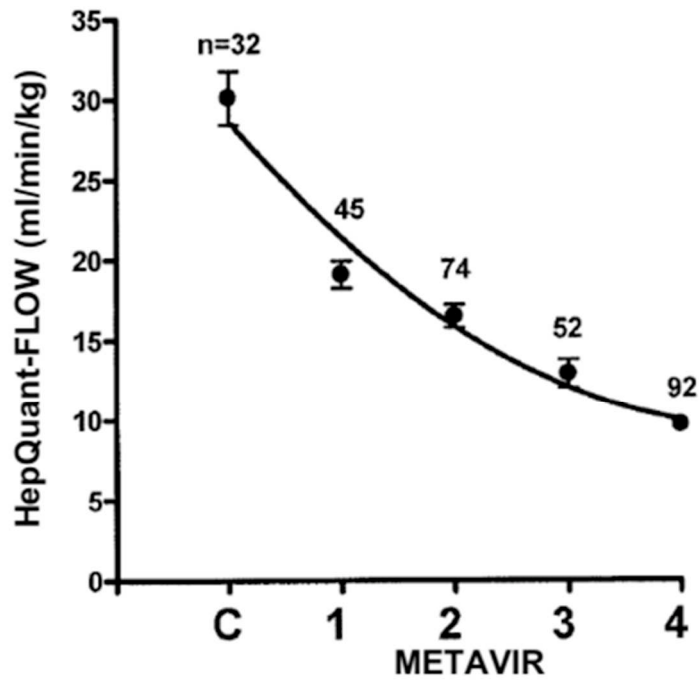


FIGURA 3

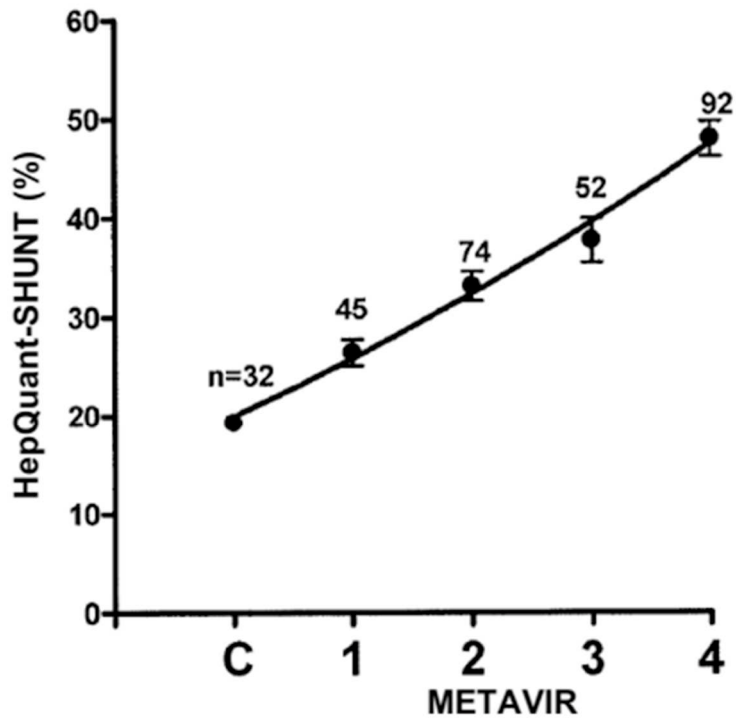


FIGURA 4

Valores de corte para HQ-STAT, 45 min

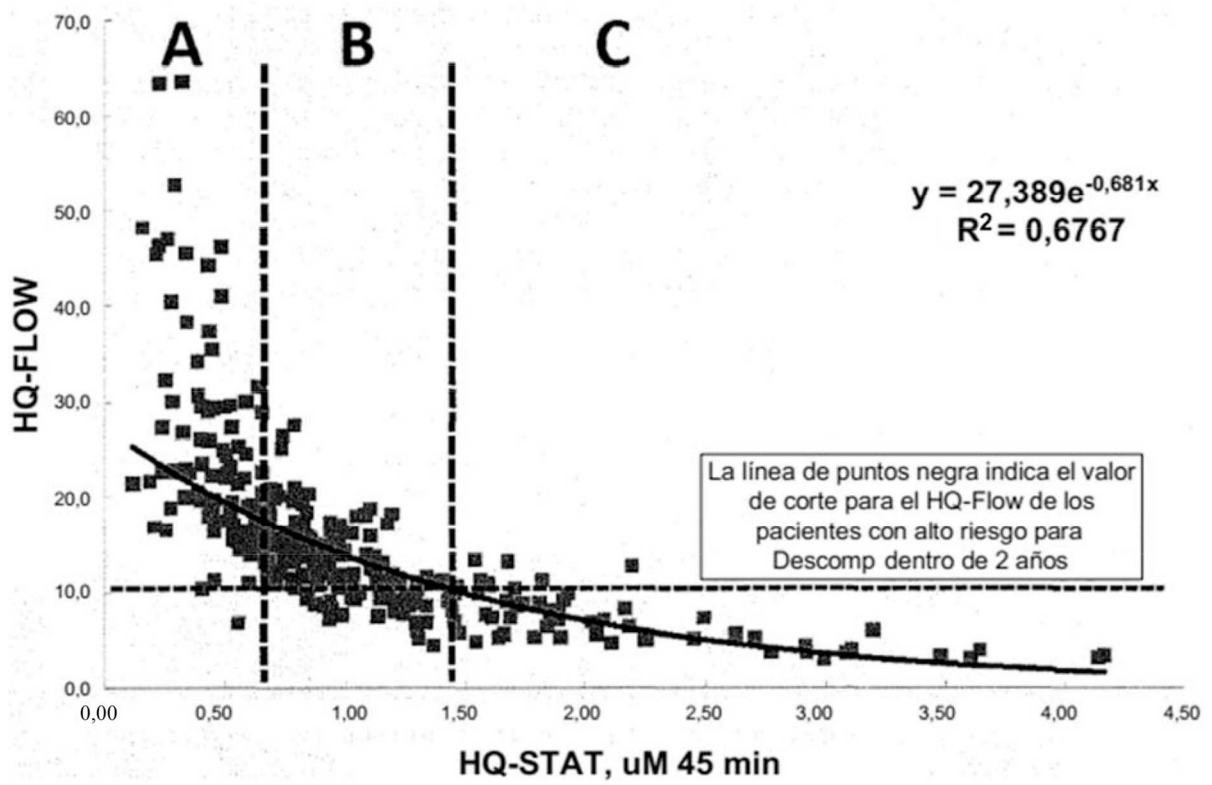


FIGURA 5

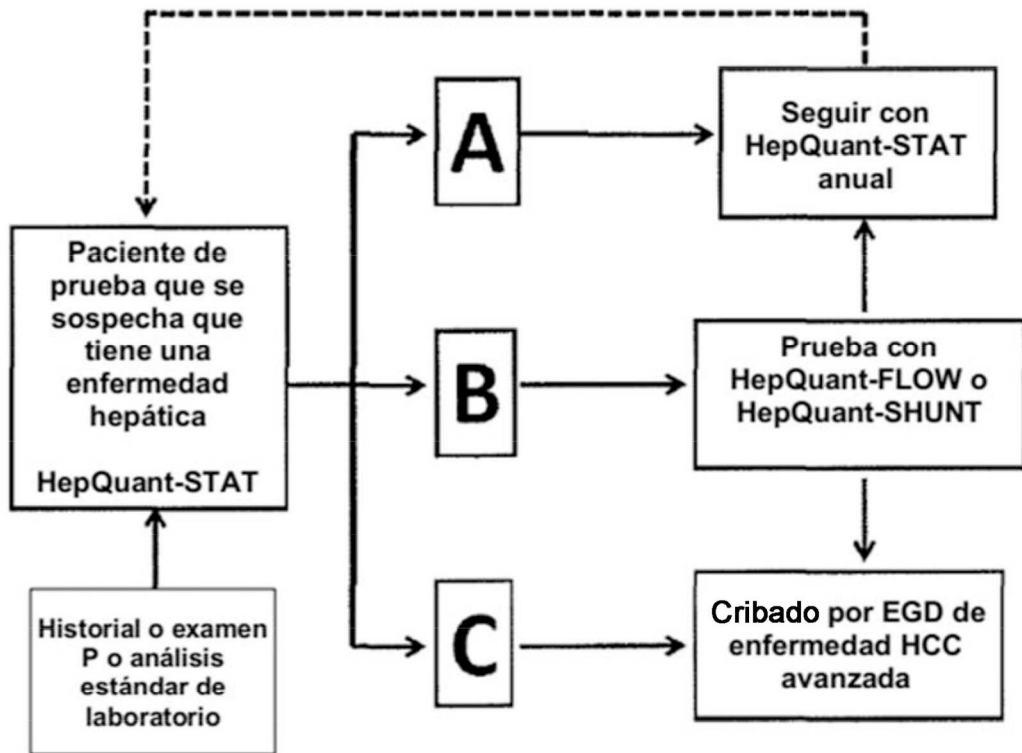


FIGURA 6

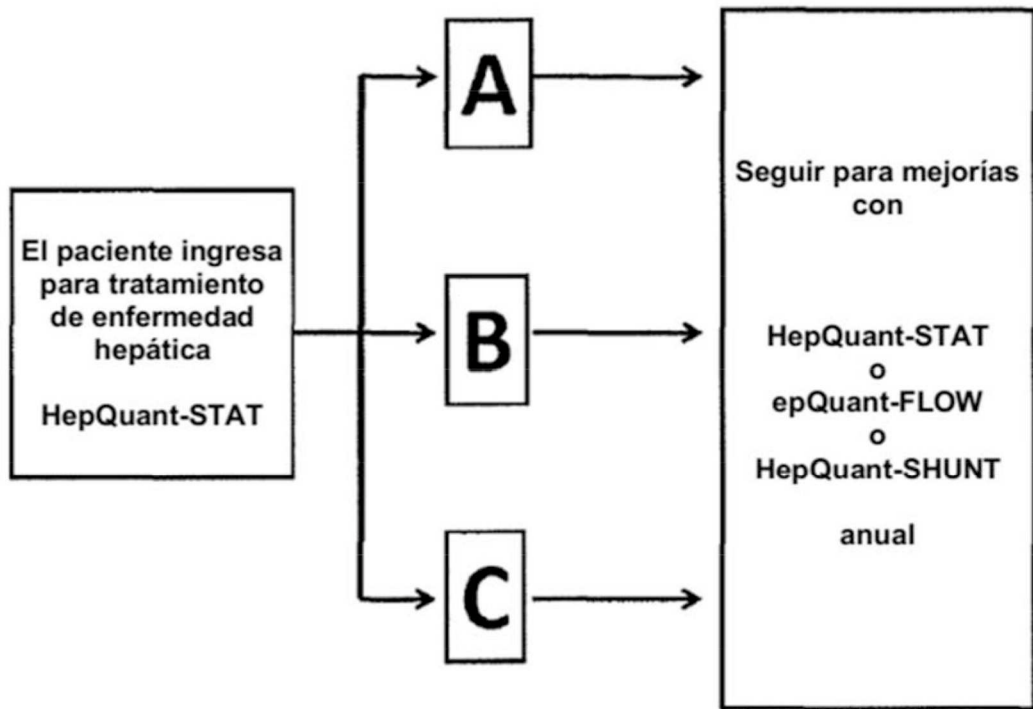


FIGURA 7

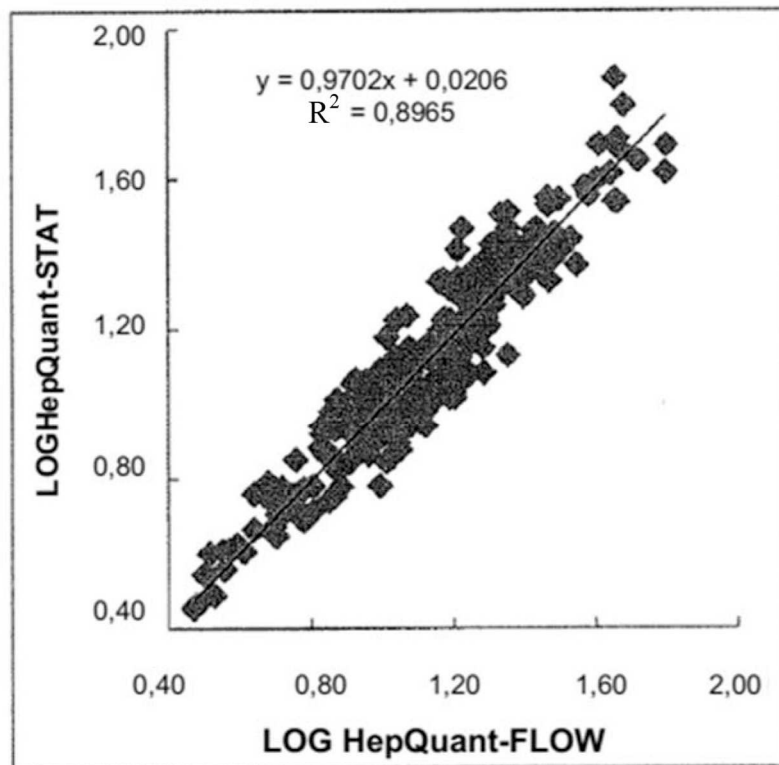


FIGURA 8

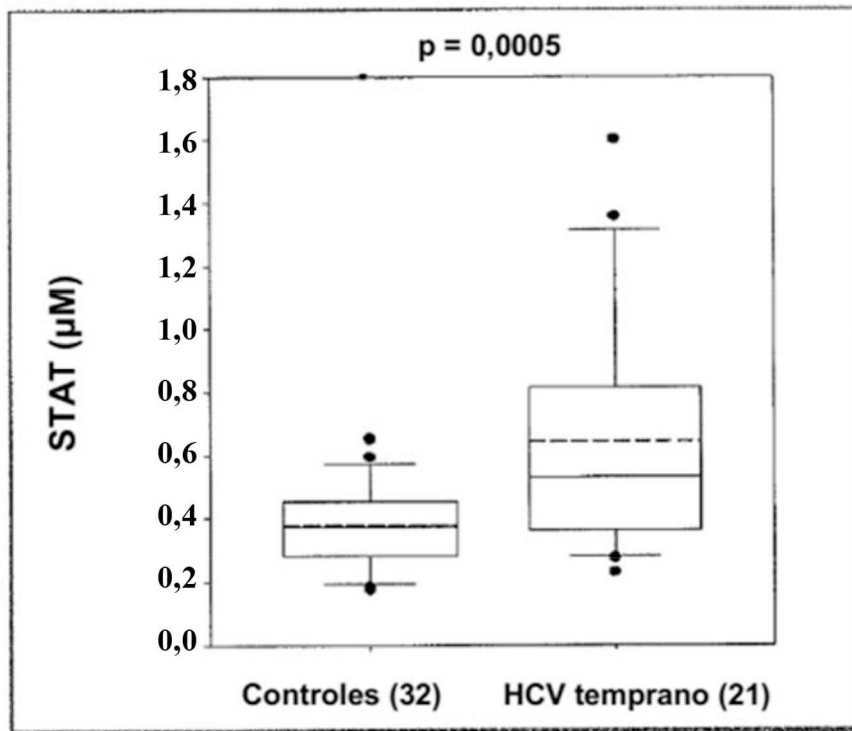


FIGURA 9A

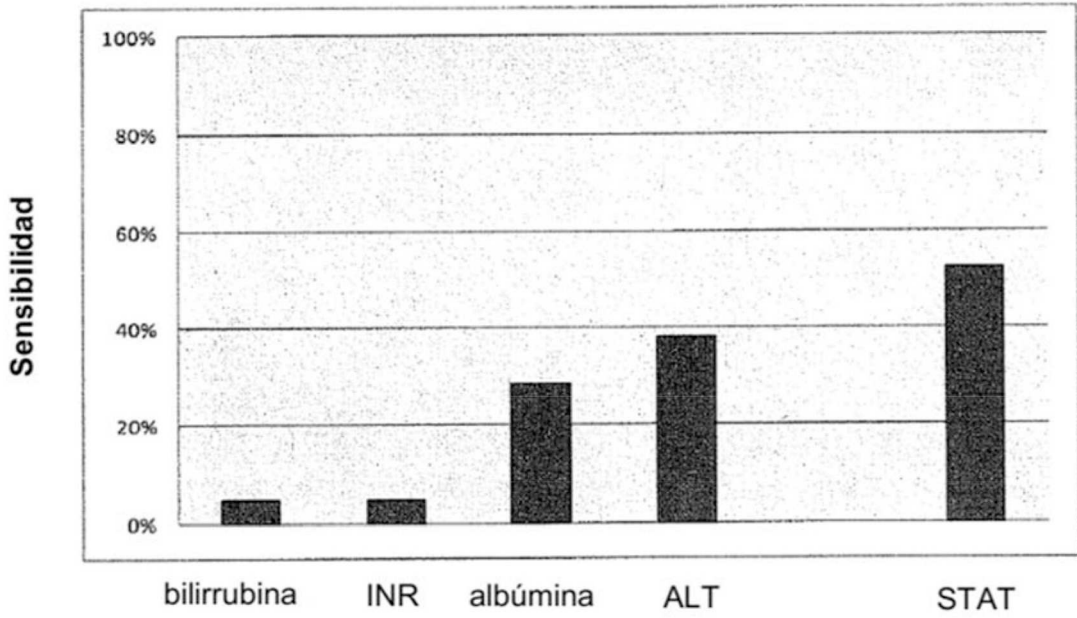


FIGURA 9B

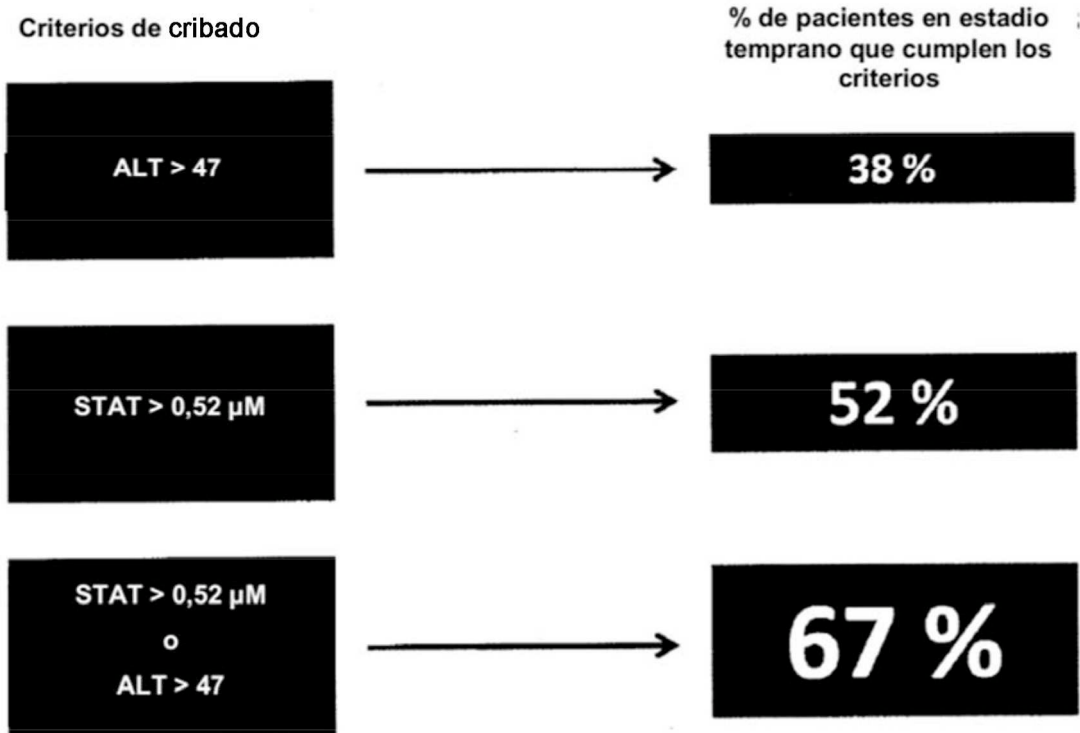


FIGURA 9C

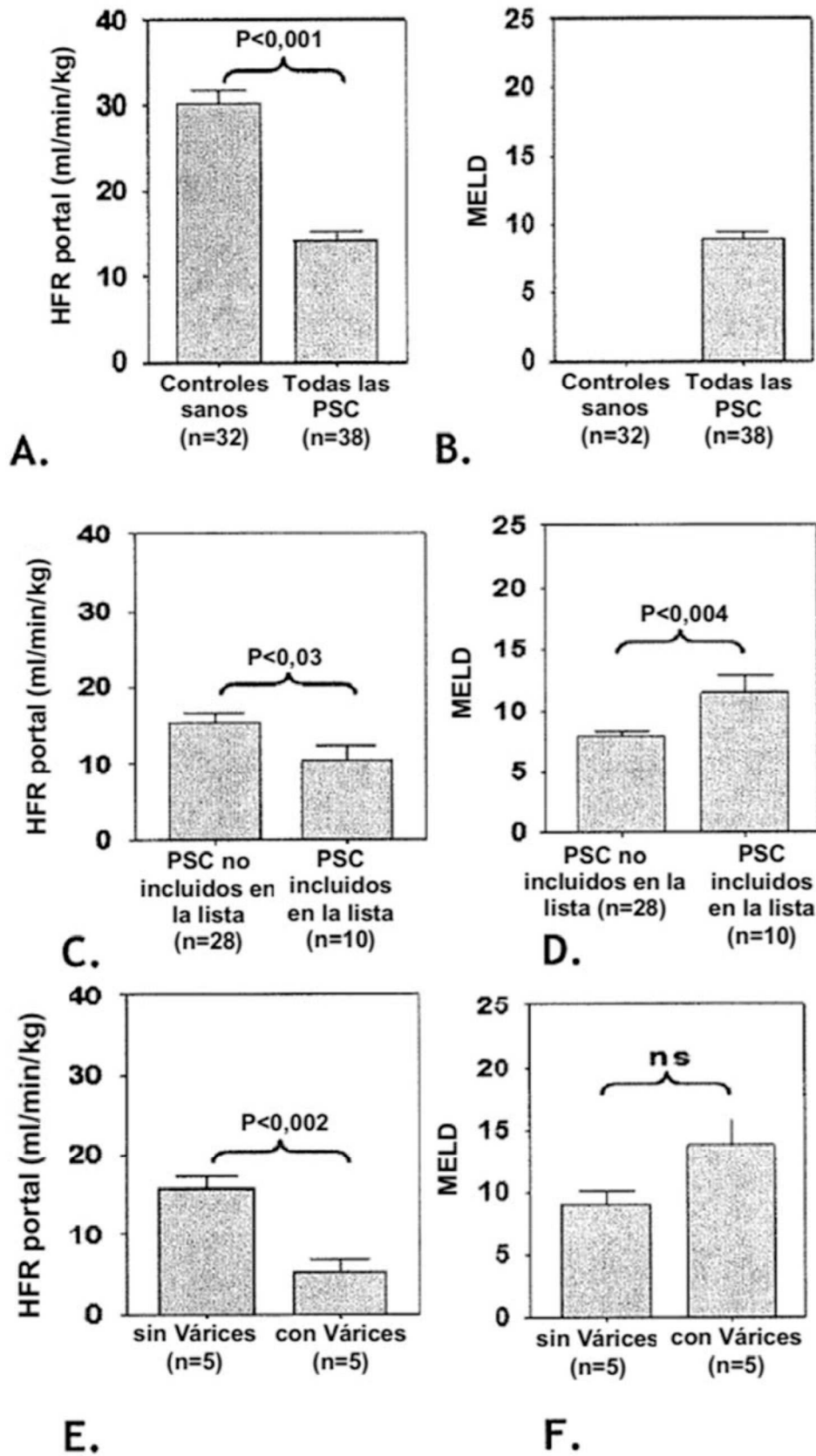


FIGURA 10

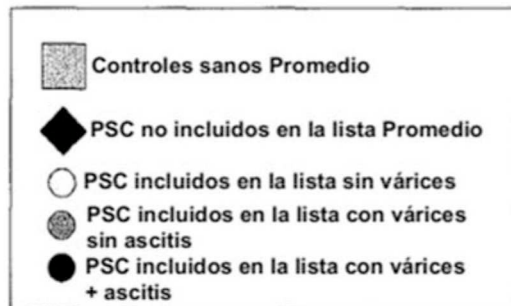
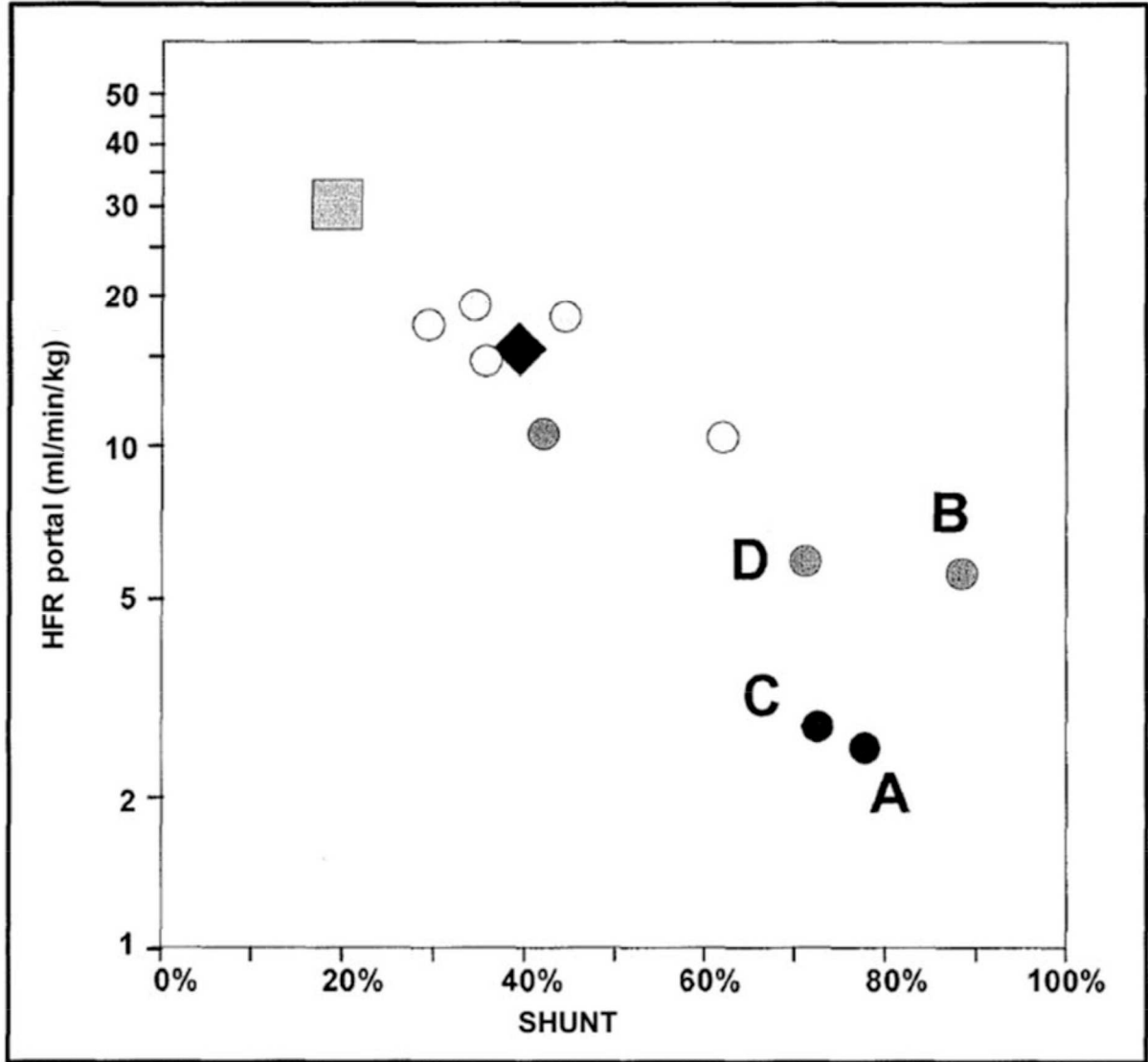


FIGURA 11

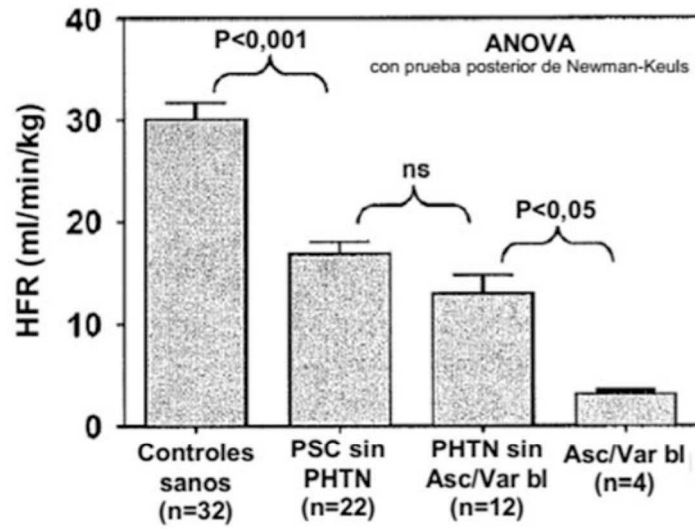


FIGURA 12

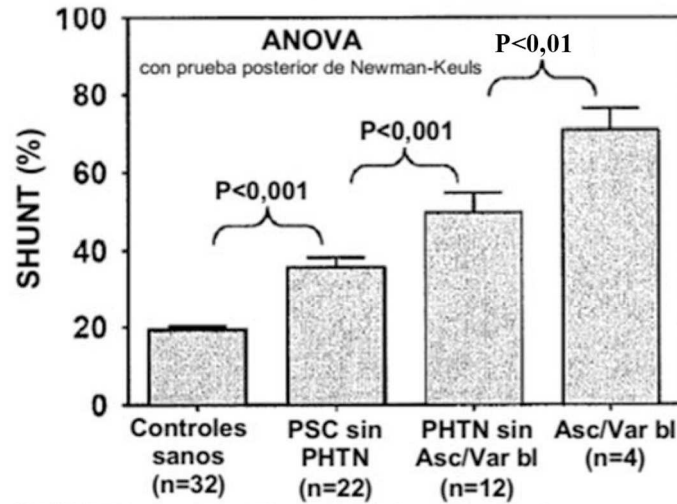


FIGURA 13

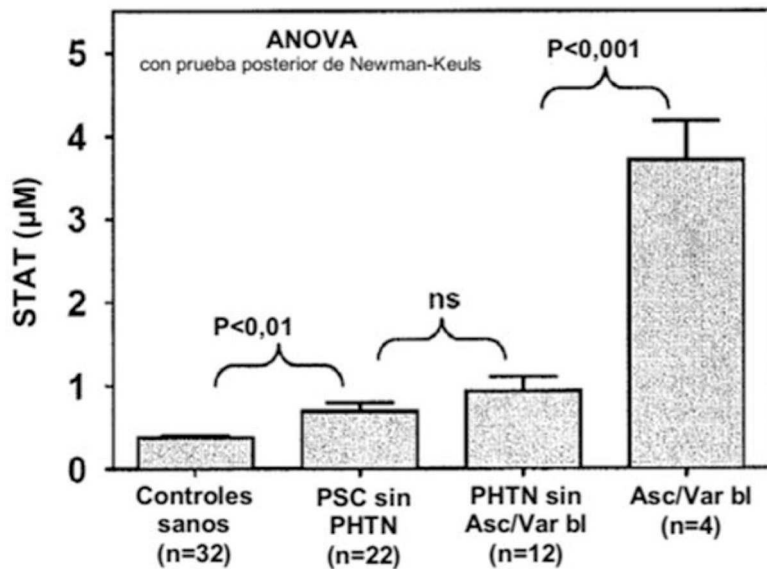


FIGURA 14

Pacientes con PSC: Valores de corte normales leves, moderados y de deterioro marcado para informes genéricos de individuos

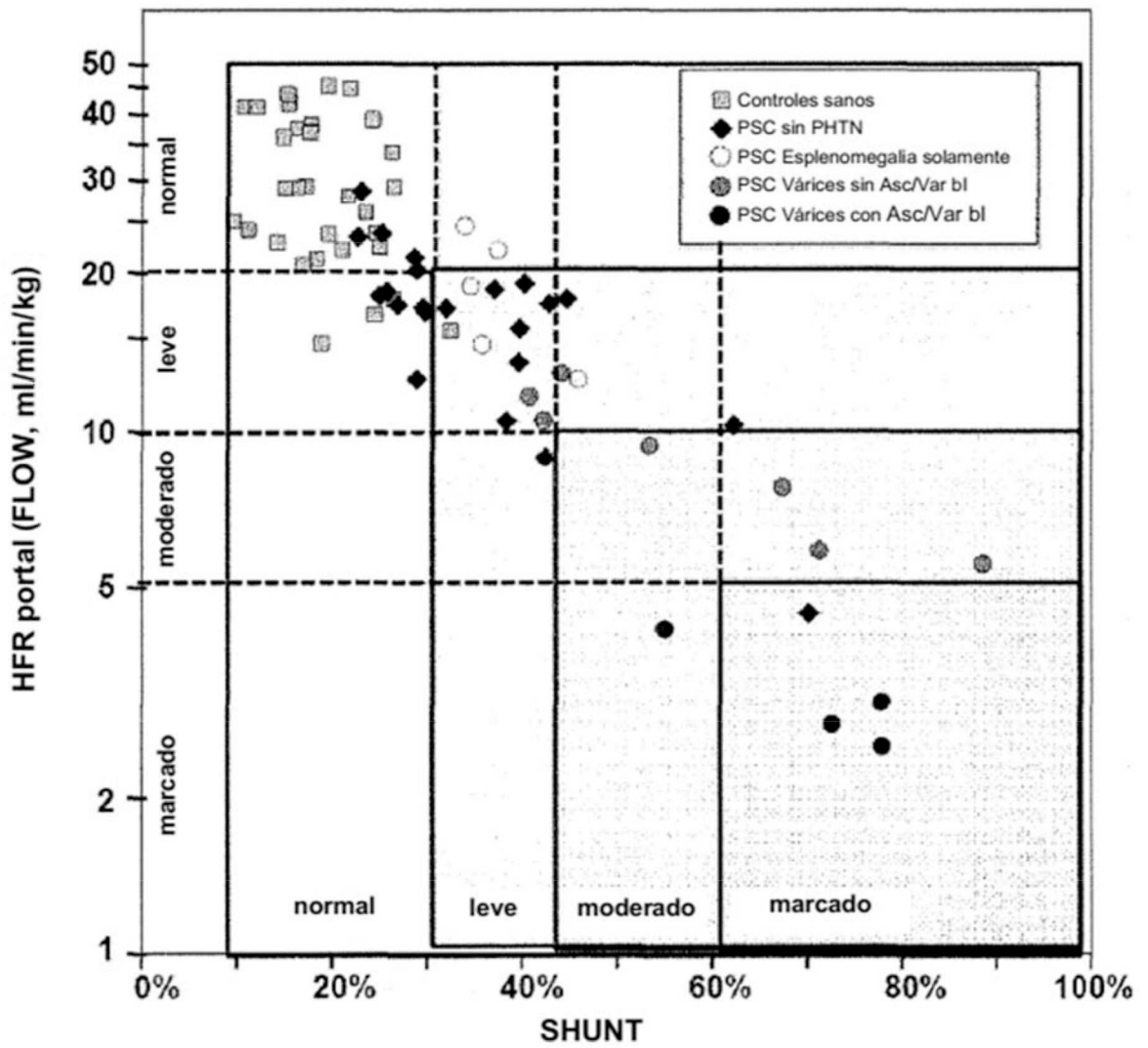


FIGURA 15

Pacientes HCV: Valores de corte normales leves, moderados y de deterioro marcado para informes genéricos de individuos

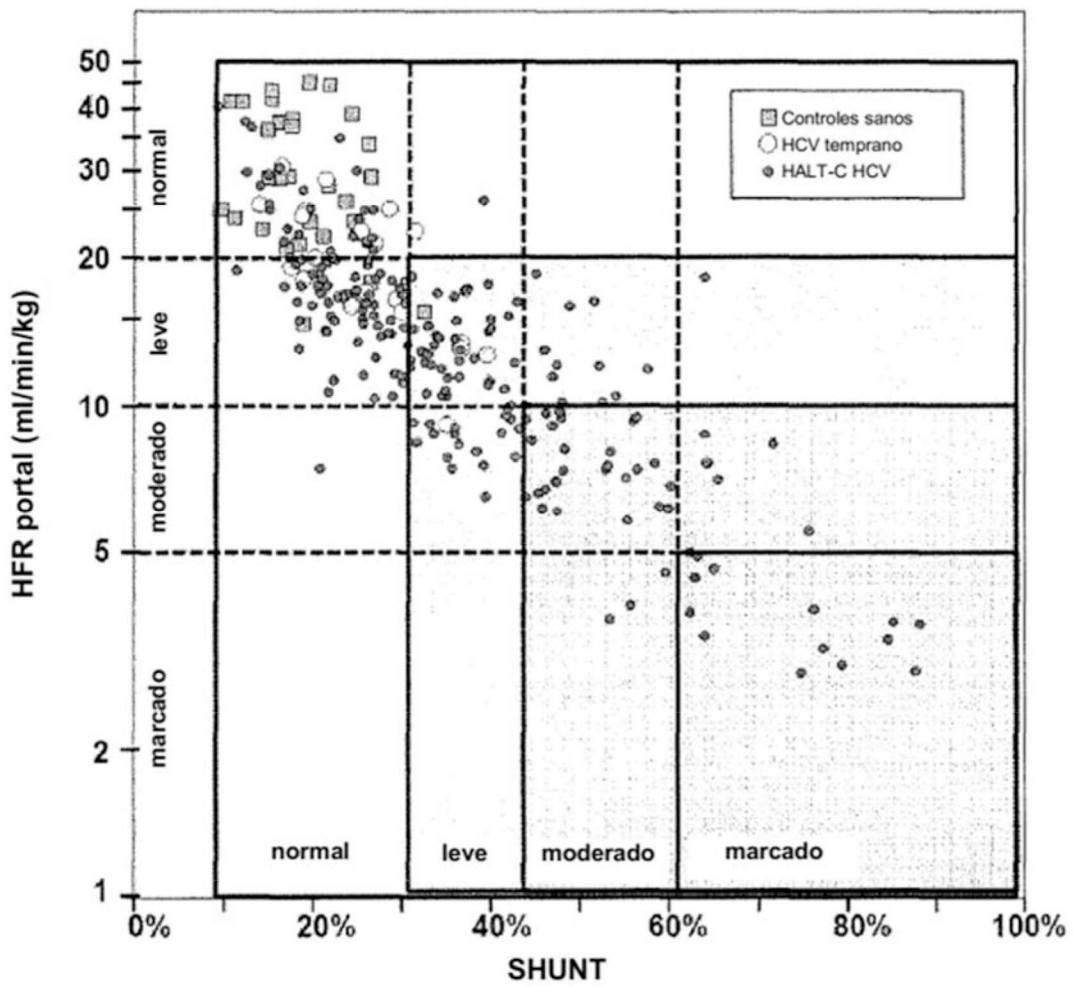


FIGURA 16

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 20100055734 A, Everson
- US 20080279766 A, Everson

Literatura no patente citada en la descripción

- **BROWNING et al.** Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the united states: Impact of ethnicity. *Hepatology*, 2004, vol. 40, 1387-1395
- **ADAMS et al.** The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: A population-based cohort study. *Gastroenterology*, 2005, vol. 129, 113-121
- **JANES ; LINDOR.** *Ann Intern Med.*, 1993, vol. 118, 96-98
- **SEEFF et al.** *Clin Gastroenterol Hepatol.*, 2010, vol. 8, 877-883
- **VUPPALANCHI et al.** *Clin Gastroenterol Hepatol.*, 2009, vol. 7, 481-486
- **BEDOSSA et al.** *Hepatology*, 2003, vol. 38, 1449-1457
- **REGEV et al.** *Am J Gastroenterol*, 2002, vol. 97, 2614-2618
- **ROUSSELET et al.** *Hepatology*, 2005, vol. 41, 257-264
- **ISHAK et al.** *J Hepatol.*, 1995, vol. 22, 696-699
- **KNODELL et al.** *Hepatology*, 1981, vol. 1, 431-435
- **BATTS ; LUDWIG.** *Am J Surg Pathol.*, 1995, vol. 19, 1409-1417
- **SCHEUER.** *J Hepatol.*, 1991, vol. 13, 372-374
- *Hepatology*, 1994, vol. 20, 15-20
- **BRUNT et al.** *Am J Gastroenterol*, 1999, vol. 94, 2467-2474
- **KLEINER et al.** *Hepatology*, 2005, vol. 41, 1313-1321
- **RATZIU et al.** *Gastroenterology*, 2005, vol. 128, 1898-1906
- **MUKHERJEE ; SORRELL.** Noninvasive tests for liver fibrosis. *Semin Liver Dis.*, 2006, vol. 26, 337-347
- **SHAH et al.** Comparison of noninvasive markers of fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.*, 2009, vol. 7, 1104-1112
- **BOURSIER et al.** Improved diagnostic accuracy of blood tests for severe fibrosis and cirrhosis in chronic hepatitis c. *Eur J Gastroenterol Hepatol.*, 2009, vol. 21, 28-38
- **SHAHEEN et al.** Fibrotest and fibroscan for the prediction of hepatitis c-related fibrosis: A systematic review of diagnostic test accuracy. *Am J Gastroenterol*, 2007, vol. 102, 2589-2600
- **RATZIU et al.** Diagnostic value of biochemical markers (fibrotest-fibrosure) for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol*, 2006, vol. 6, 6
- **ANGULO et al.** The NAFLD fibrosis score: A noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology*, 2007, vol. 45, 846-854
- **WONG et al.** Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 2010, vol. 51, 454-462
- **BRADEN et al.** 13c-methacetin breath test as liver function test in patients with chronic hepatitis c virus infection. *Aliment Pharmacol Ther.*, 2005, vol. 21, 179-185
- **DEL POGGIO ; COLOMBO.** Is transient elastography a useful tool for screening liver disease?. *World J Gastroenterol*, 2009, vol. 15, 1409-1414
- **FRIEDRICH-RUST et al.** Performance of transient elastography for the staging of liver fibrosis: A meta-analysis. *Gastroenterology*, 2008, vol. 134, 960-974
- **ROSSI et al.** Validation of the fibrotest biochemical markers score in assessing liver fibrosis in hepatitis c patients. *Clin Chem.*, 2003, vol. 49, 450-454
- **MANNING ; AFDHAL.** Diagnosis and quantitation of fibrosis. *Gastroenterology*, 2008, vol. 134, 1670-1681
- **POYNARD et al.** Concordance in a world without a gold standard: A new non-invasive methodology for improving accuracy of fibrosis markers. *PLoS One*, 2008, vol. 3, e3857

- **SUK et al.** Effect of propranolol on portal pressure and systemic hemodynamics in patients with liver cirrhosis and portal hypertension: a prospective study. *Gut and Liver*, 2007, vol. 1 (2), 159-164
- **WEISS et al.** +)-Propranolol clearance, an estimation of hepatic blood flow in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1978, vol. 5, 457-460
- **SUN et al.** High performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometric determination of isosorbide 5-mononitrate in human plasma. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Sci.*, 01 February 2007, vol. 846 (1-2), 323-8
- **TYGSTRUP N.** Determination of the hepatic elimination capacity (Lm) of galactose by a single injection. *Scand J Lab Clin Invest*, 1966, vol. 18 (92), 118-126
- **JEPSEN et al.** The galactose elimination capacity and mortality in 781 Danish patients with newly-diagnosed liver cirrhosis: a cohort study. *BMC Gastroenterol*, 2009, vol. 9, 50
- **EVERSON et al.** The spectrum of hepatic functional impairment in compensated chronic Hepatitis C: Results from the Hepatitis C anti-viral long-term treatment against cirrhosis trial. *Aliment Pharmacol Ther.*, 2008, vol. 27, 798-809
- **EVERSON et al.** Portal-systemic shunting in patients with fibrosis and cirrhosis due to chronic hepatitis c: The minimal model for measuring cholate clearances and shunt. *Aliment Pharmacol Ther.*, 2007, vol. 26, 401-410
- **EVERSON et al.** Quantitative tests of liver function measure hepatic improvement after sustained virological response: Results from the HALT-C trial. *Aliment Pharmacol Ther.*, 2009, vol. 29, 589-601
- **TRAUNER ; BOYER.** Bile salt transporters: Molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev.*, 2003, vol. 83, 633-671
- **EVERSON et al.** The spectrum of hepatic functional impairment in compensated chronic hepatitis c: Results from the hepatitis c anti-viral long-term treatment against cirrhosis trial. *Aliment Pharmacol Ther.*, 2008, vol. 27, 798-809
- Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, 1994, vol. 20, 15-20
- **BRUNT et al.** Nonalcoholic steatohepatitis: A proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol*, 1999, vol. 94, 2467-2474
- **KLEINER et al.** Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 2005, vol. 41, 1313-1321
- **GOODMAN, ZD.** Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases. *J Hepatol.*, 2007, vol. 47, 598-607
- **WILSON ; CHALASANI, N.** Noninvasive markers of advanced histology in nonalcoholic fatty liver disease: Are we there yet?. *Gastroenterology*, 2007, vol. 133, 1377-1378
- **VUPPALANCHI ; CHALASANI.** Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: Selected practical issues in their evaluation and management. *Hepatology*, 2009, vol. 49, 306-317
- **SODERBERG et al.** Decreased survival of subjects with elevated liver function tests during a 28-year follow-up. *Hepatology*, 2010, vol. 51, 595-602
- **RAFIQ et al.** Long-term follow-up of patients with nonalcoholic fatty liver. *Clin Gastroenterol Hepatol.*, 2009, vol. 7, 234-238
- **ANGULO, P.** Long-term mortality in nonalcoholic fatty liver disease: Is liver histology of any prognostic significance?. *Hepatology*, 2010, vol. 51, 373-375
- Application of Validated Method to Routine Drug Analysis. *Bioanalytical Method Validation*. May 2001
- Application of Validated Method to Routine Drug Analysis. *Bioanalytical Method Validation*, May 2001
- **BROWNING, JD ; SZCZEPANIAK, LS ; DOBBINS, R ; NUREMBERG, P ; HORTON, JD ; COHEN, JC ; GRUNDY, SM ; HOBBS, HH.** Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the united states: Impact of ethnicity. *Hepatology*, 2004, vol. 40, 1387-1395
- **ADAMS, LA ; LYMP, JF ; ST SAUVER, J ; SANDERSON, SO ; LINDOR, KD ; FELDSTEIN, A ; ANGULO, P.** The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: A population-based cohort study. *Gastroenterology*, 2005, vol. 129, 113-121
- **JANES, CH ; LINDOR, KD.** Outcome of patients hospitalized for complications after outpatient liver biopsy. *Ann Intern Med.*, 1993, vol. 118, 96-98
- **SEEFF, LB ; EVERSON, GT ; MORGAN, TR ; CURTO, TM ; LEE, WM ; GHANY, MG ; SHIFFMAN, ML ; FONTANA, RJ ; DI BISCEGLIE, AM ; BONKOVSKY, HL.** Complication rate of percutaneous liver biopsies among persons with advanced chronic liver disease in the halt-c trial. *Clin Gastroenterol Hepatol.*, 2010, vol. 8
- **VUPPALANCHI, R ; UNALP, A ; VAN NATTA, ML ; CUMMINGS, OW ; SANDRASEGARAN, KE ; HAMEED, T ; TONASCIA, J ; CHALASANI, N.** Effects of liver biopsy sample length and number of readings on sampling variability in nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.*, 2009, vol. 7, 481-486
- **BEDOSSA, P ; DARGERER, D ; PARADIS, V.** Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis c. *Hepatology*, 2003, vol. 38, 1449-1457

- REGEV, A ; BERHO, M ; JEFFERS, LJ ; MILIKOWSKI, C ; MOLINA, EG ; PYRSOPOULOS, NT ; FENG, ZZ ; REDDY, KR ; SCHIFF, ER. Sampling error and intraobserver variation in liver biopsy in patients with chronic hcv infection. *Am J Gastroenterol*, 2002, vol. 97, 2614-2618
- ROUSSELET, MC ; MICHALAK, S ; DUPRE, F ; CROUE, A ; BEDOSSA, P ; SAINT-ANDRE, JP ; CALES, P. Sources of variability in histological scoring of chronic viral hepatitis. *Hepatology*, 2005, vol. 41, 257-264
- ISHAK, K ; BAPTISTA, A ; BIANCHI, L ; CALLEA, F ; DE GROOTE, J ; GUDAT, F ; DENK, H ; DESMET, V ; KORB, G ; MACSWEEN, RN et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol.*, 1995, vol. 22, 696-699
- KNODELL, RG ; ISHAK, KG ; BLACK, WC ; CHEN, TS ; CRAIG, R ; KAPLOWITZ, N ; KIERNAN, TW ; WOLLMAN, J. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology*, 1981, vol. 1, 431-435
- BATTS, KP ; LUDWIG, J. Chronic hepatitis. An update on terminology and reporting. *Am J Surg Pathol.*, 1995, vol. 19, 1409-1417
- SCHEUER, PJ. Classification of chronic viral hepatitis: A need for reassessment. *J Hepatol.*, 1991, vol. 13, 372-374
- Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis c. *Hepatology*, 1994, vol. 20, 15-20
- BRUNT, EM ; JANNEY, CG ; DI BISCEGLIE, AM ; NEUSCHWANDER-TETRI, BA ; BACON, BR. Non-alcoholic steatohepatitis: A proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol*, 1999, vol. 94, 2467-2474
- KLEINER, DE ; BRUNT, EM ; VAN NATTA, M ; BEHLING, C ; CONTOS, MJ ; CUMMINGS, OW ; FERRELL, LD ; LIU, YC ; TORBENSON, MS ; UNALP-ARIDA, A. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 2005, vol. 41, 1313-1321
- RATZIU, V ; CHARLOTTE, F ; HEURTIER, A ; GOMBERT, S ; GIRAL, P ; BRUCKERT, E ; GRIMALDI, A ; CAPRON, F ; POYNARD, T. Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 2005, vol. 128, 1898-1906
- EVERSON, GT ; SHIFFMAN, ML ; MORGAN, TR ; HOEFS, JC ; STERLING, RK ; WAGNER, DA ; KULIG, CC ; CURTO, TM ; WRIGHT, EC. The spectrum of hepatic functional impairment in compensated chronic hepatitis c: Results from the hepatitis c anti-viral long-term treatment against cirrhosis trial. *Aliment Pharmacol Ther.*, 2008, vol. 27, 798-809
- EVERSON, GT ; MARTUCCI, MA ; SHIFFMAN, ML ; STERLING, RK ; MORGAN, TR ; HOEFS, JC. Portal-systemic shunting in patients with fibrosis or cirrhosis due to chronic hepatitis c: The minimal model for measuring cholate clearances and shunt. *Aliment Pharmacol Ther.*, 2007, vol. 26, 401-410
- EVERSON, GT ; SHIFFMAN, ML ; HOEFS, JC ; MORGAN, TR ; STERLING, RK ; WAGNER, DA ; DESANTO, JL ; CURTO, TM ; WRIGHT, EC. Quantitative tests of liver function measure hepatic improvement after sustained virological response: Results from the halt-c trial. *Aliment Pharmacol Ther.*, 2009, vol. 29, 589-601
- WILSON, S ; CHALASANI, N. Noninvasive markers of advanced histology in nonalcoholic fatty liver disease: Are we there yet?. *Gastroenterology*, 2007, vol. 133, 1377-1378
- VUPPALANCHI, R ; CHALASANI, N. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: Selected practical issues in their evaluation and management. *Hepatology*, 2009, vol. 49, 306-317
- SODERBERG, C ; STAL, P ; ASKLING, J ; GLAUMANN, H ; LINDBERG, G ; MARMUR, J ; HULTCRANTZ, R. Decreased survival of subjects with elevated liver function tests during a 28-year follow-up. *Hepatology*, 2010, vol. 51, 595-602
- RAFIQ, N ; BAI, C ; FANG, Y ; SRISHORD, M ; MCCULLOUGH, A ; GRAMLICH, T ; YOUNOSSI, ZM. Long-term follow-up of patients with nonalcoholic fatty liver. *Clin Gastroenterol Hepatol.*, 2009, vol. 7, 234-238
- MUKHERJEE, S ; SORRELL, MF. Noninvasive tests for liver fibrosis. *Semin Liver Dis.*, 2006, vol. 26, 337-347
- SHAH, AG ; LYDECKER, A ; MURRAY, K ; TETRI, BN ; CONTOS, MJ ; SANYAL, AJ. Comparison of noninvasive markers of fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.*, 2009, vol. 7, 1104-1112
- BOURSIER, J ; BACQ, Y ; HALFON, P ; LEROY, V ; DE LEDINGHEN, V ; DE MURET, A ; BOURLIERE, M ; STURM, N ; FOUCHER, J ; OBERTI, F. Improved diagnostic accuracy of blood tests for severe fibrosis and cirrhosis in chronic hepatitis c. *Eur J Gastroenterol Hepatol.*, 2009, vol. 21, 28-38
- SHAHEEN, AA ; WAN, AF ; MYERS, RP. Fibrotest and fibroscan for the prediction of hepatitis c-related fibrosis: A systematic review of diagnostic test accuracy. *Am J Gastroenterol*, 2007, vol. 102, 2589-2600
- RATZIU, V ; MASSARD, J ; CHARLOTTE, F ; MES-SOUS, D ; IMBERT-BISMUT, F ; BONYHAY, L ; TAHIRI, M ; MUNTEANU, M ; THABUT, D ; CADRANEL, JF. Diagnostic value of biochemical markers (fibrotest-fibrosure) for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol*, 2006, vol. 6, 6

- **ANGULO, P ; HUI, JM ; MARCHESINI, G ; BUGHIANESI, E ; GEORGE, J ; FARRELL, GC ; ENDERS, F ; SAKSENA, S ; BURT, AD ; BIDA, JP.** The nafld fibrosis score: A noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with nafld. *Hepatology*, 2007, vol. 45, 846-854
- **WONG, VW ; VERGNIOL, J ; WONG, GL ; FOUCHER, J ; CHAN, HL ; LE BAIL, B ; CHOI, PC ; KOWO, M ; CHAN, AW ; MERROUCHE, W.** Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 2010, vol. 51, 454-462
- **BRADEN, B ; FAUST, D ; SARRAZIN, U ; ZEUZEM, S ; DIETRICH, CF ; CASPARY, WF ; SARRAZIN, C.** 13c-methacetin breath test as liver function test in patients with chronic hepatitis c virus infection. *Aliment Pharmacol Ther.*, 2005, vol. 21, 179-185
- **DEL POGGIO, P ; COLOMBO, S.** Is transient elastography a useful tool for screening liver disease?. *World J Gastroenterol*, 2009, vol. 15, 1409-1414
- **FRIEDRICH-RUST, M ; ONG, MF ; MARTENS, S ; SARRAZIN, C ; BOJUNGA, J ; ZEUZEM, S ; HERRMANN, E.** Performance of transient elastography for the staging of liver fibrosis: A meta-analysis. *Gastroenterology*, 2008, vol. 134, 960-974
- **ROSSI, E ; ADAMS, L ; PRINS, A ; BULSARA, M ; DE BOER, B ; GARAS, G ; MACQUILLAN, G ; SPEERS, D ; JEFFREY, G.** Validation of the fibrotest biochemical markers score in assessing liver fibrosis in hepatitis c patients. *Clin Chem.*, 2003, vol. 49, 450-454
- **TRAUNER, M ; BOYER, JL.** Bile salt transporters: Molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev.*, 2003, vol. 83, 633-671
- **MANNING, DS ; AFDHAL, NH.** Diagnosis and quantitation of fibrosis. *Gastroenterology*, 2008, vol. 134, 1670-1681
- **POYNARD, T ; INGILIZ, P ; ELKRIEF, L ; MUNTEANU, M ; LEBRAY, P ; MORRA, R ; MESSOUS, D ; BISMUT, FI ; ROULOT, D ; BENHAMOU, Y.** Concordance in a world without a gold standard: A new non-invasive methodology for improving accuracy of fibrosis markers. *PLoS One*, 2008, vol. 3, e3857
- **LUDWIG, J ; BARHAM, SS ; LARUSSO, NF ; ELVEBACK, LR ; WIESNER, RH ; MCCALL, JT.** Morphologic features of chronic hepatitis associated with primary sclerosing cholangitis and chronic ulcerative colitis. *Hepatology*, 1981, vol. 1, 632-640