

(12) **Österreichische Patentanmeldung**

(21) Anmeldenummer: **A 757/2009**

(22) Anmeldetag: **15.05.2009**

(43) Veröffentlicht am: **15.12.2009**

(51) Int. Cl.⁸: **G01N 33/49** (2006.01),
G01N 33/68 (2006.01),
C07J 9/00 (2006.01)

(30) Priorität:

15.05.2008 GB 0808777 beansprucht.

(73) Patentinhaber:

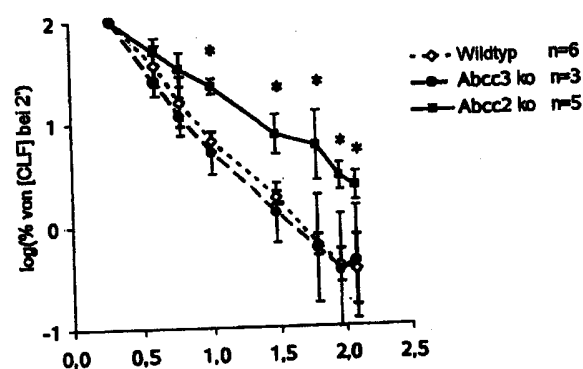
NORGINE BV
NL-1101 CA AMSTERDAM ZUID-OOST
(NL)

(54) **PROGNOSTISCHES VERFAHREN**

(57) Ein Verfahren zur Bestimmung der funktionellen Aktivität des MRP2- und/oder MRP3-Efflux-Weges eines menschlichen oder tierischen Subjektes umfasst:

(i) Bestimmen des Pegels des Gallensäure-Derivats in dem Blut des menschlichen oder tierischen Subjektes nach einem vorgegebenen Zeitintervall nach der Einführung einer Menge des Gallensäure-Derivats in das Subjekt; und

(ii) Verwendung der im Schritt (i) gewonnenen Bestimmung zur Anzeige der funktionellen Aktivität des MRP2- und/oder MRP3-Efflux-Weges des Subjektes.



Zusammenfassung

Ein Verfahren zur Bestimmung der funktionellen Aktivität des MRP2- und/oder MRP3-Efflux-Weges eines menschlichen oder tierischen Subjektes umfasst:

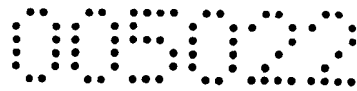
- 5 (i) Bestimmen des Pegels des Gallensäure-Derivats in dem Blut des menschlichen oder tierischen Subjektes nach einem vorgegebenen Zeitintervall nach der Einführung einer Menge des Gallensäure-Derivats in das Subjekt; und
- (ii) Verwendung der im Schritt (i) gewonnenen Bestimmung zur Anzeige der funktionellen Aktivität des MRP2- und/oder MRP3-Efflux-Weges des Subjektes.

Prognostisches Verfahren

Die vorliegende Erfindung bezieht auf ein neues Verfahren zur Bestimmung der funktionellen Aktivität des MRP2- und/oder MRP3-Ausstrom- oder Efflux-Weges eines menschlichen oder tierischen Subjektes, und auf die Verwendung eines Gallensäure-Derivats bei einem derartigen Verfahren.

MRP2/Mrp2 (ABCC2/Abcc2), auch bekannt als Multidrug Resistance Protein 2, ist ein Mitglied der ABCC-Teilfamilie der ATP-Binding-Cassette-Transporter-Überfamilie. Ein Überblick über die ATP-Binding-Cassette-Transporter-Überfamilie ist in "The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter-Superfamily" von Michael Dean vom National Cancer Institute, Frederick, Maryland angegeben, veröffentlicht von dem US-National Center for Biotechnology Information. MRP2 wird auf der apikalen Domäne von Hepatozyten, Enterozyten des proximalen Dünndarms und proximalen Nierentubuluszellen sowie im Gehirn und der Plazenta exprimiert.

MRP2 ist klinisch wichtig, weil es die Pharmakokinetik vieler Medikamente moduliert, und seine Expression und Aktivität ebenfalls durch einen Bereich von Medikamenten und Krankheiten geändert wird. Beispielsweise wird die Expression von MRP2 in Patienten mit Lebererkrankungen geändert, wie z.B. der primären biliären Zirrhose, der Cholestase (beispielsweise einer medikamentös bedingten Cholestase), Fettlebererkrankung, alkoholbedingter Lebererkrankung, einer primären Sklerose-Cholangitis oder einer Virushepatitis. In den Nieren wirkt MRP2 bei der renalen Entfernung von Substraten aus dem Blut in den Urin. In der Leber ist MRP2 ein wesentlicher Exporter von organischen Anionen von der Leber in die Galle. MRP2 kann sulfatierte und glukuronosierte Gallensalze sowie andere organische Anionen und/oder ihre Konjugate mit Glukuronat, Glutathion und Sulfat transportieren [Gerk et al J Pharmakol Exp Ther 2002 Aug; 302(2):407-415]. Zusätzlich zum Transport von Konjugaten transportiert MRP2 einen Bereich von Molekülen, unter Einschluss von chemotherapeutischen Krebsmitteln, Urikosurika, Antibiotika, Leukotrienen, Glutathionen, Toxinen und Schwermetallen. MRP2 spielt weiterhin eine wichtige Rolle bei der Beseitigung von Bilirubin-Glucuronosiden von Hepatozyten in die Galle. Das MRP2-Gen ist in Patienten mit dem Dubin-Johnson-Syndrom mutiert, einer Fehlfunktion des organischen Ionentransports beim



Menschen. Das Fehlen von funktionellen MRP2 in der kanalikulären Membran ruft eine konjugierte Hyperbilirubinämie hervor, wie sie bei der erblichen Dubin-Johnson-Syndrom-Erkrankung beobachtet wird.

- 5 Der Verlust der MRP2-Funktion wird in vielen Fällen durch die Aufwärtsregelung anderer Membran-Transporter gut toleriert und kompensiert, insbesondere des Multidrug Resistance Proteins 3 (MRP3, auch als ABCC3 bekannt) in dem basolateralen Element von Hepatozyten [Nies et al Pflugers Arch (2007) 453:643-659]. Genauso wie MRP2 ist MRP3 ein Mitglied der ABCC-Teilfamilie der ATP-
10 Binding-Cassette-Transporter-Überfamilie. MRP3 ist im Darm, der Niere und der Leber vorhanden.

Die Kenntnis des Zustandes der MRP2/3-Aktivität einer Person könnte daher zur Anzeige eines weiten Bereiches von möglichen Konditionierungen verwendet
15 werden.

Es ist daher ein Ziel der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Feststellung der funktionellen Aktivität des MRP2- und/oder MRP3-Ausstrom- oder Efflux-Weges eines Menschen oder Tieres zu schaffen.

20 Wir haben in unerwarteter Weise herausgefunden, dass MRP2 der am stärksten herausragende Transporter ist, der für die Gallenexkretion von Choly-Lysyl-Fluorescein (CLF) verantwortlich ist, was auch als Fluorescein-Lisikol bekannt ist, und dass MRP3 für die basolaterale Exkretion von CLF verantwortlich ist. Entsprechend
25 können CLF und andere Gallensäuren, die einen ähnlichen metabolischen/Ausscheidungs-Pfad haben, zur Feststellung der funktionellen Aktivität der MRP2/3-Ausfluss-Bahn verwendet werden.

Die vorliegende Erfindung ist insbesondere im Hinblick auf die Veröffentlichung von
30 Mills et al in Biochim Biophys Acta 1991 Dec 6;1115(2):151-156 überraschend. Sie zeigten, dass in Ratten die Gallen-Exkretionsrate von CLF nach einer Halsvenen-injektion eine ähnliche Kinetik zu der von Glycocholat hat, von dessen Transport bekannt ist, dass er durch ABCB11 vermittelt wird. ABCB11 ist ein Mitglied der ABCB-Teilfamilie der ATP-Binding Cassette (ABC)-Transporter-Überfamilie.

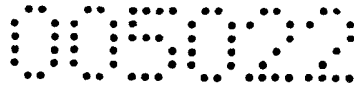
Weitere Anhaltspunkte die zu der Annahme führten, dass CLF über ABCB11 transportiert wird, wurden von Baxter et al. [Biochim Biophys Acta 1995 Jun 6;1256(3):374-380] geliefert. Baxter et al. verabreichten Glycocholat und CLF an isolierte getrennte Rattenlebern unter Recycling-Bedingungen und beobachteten, dass CLF in der Lage war, die Phospholipid- und Cholesterol-Abgabe in einer ähnlichen Weise wie die zu vergrößern, die für Glycocholat festgestellt wurde. Es wurde in der gleichen Studie gezeigt, dass Rattenleber eine wesentlich größere Fähigkeit zur Übertragung von Glycocholat (GC) aus dem Perfusat zur Galle hat, als CLF, und dass gleichzeitig die Vergrößerung der Phospholipid- und Cholesterol-Abgabe bei CLF verglichen mit GC kleiner war.

In einer späteren Studie [Mills et al in J Hepatol 1999 Oct;31(4):678-684], untersuchten Mills et al ABCC2/Abcc2 als möglichen Transporter für CLF. Sie schlossen jedoch aus einer Studie mit normalen und TR (Abcc2-Mangel-) Wistar-Ratten, dass Abcc2 nicht an der Gallenexkretion von CLF beteiligt war, und zwar auf der Grundlage der Beobachtung einer ähnlichen Gallenexkretion in beiden Stämmen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass vor den vorliegenden Untersuchungen die Gesamtheit des Standes der Technik hinsichtlich dieses Gegenstandes einhellig geschlossen hat, dass CLF von der Leber in die Galle durch den ABCB11/Abcb11-Weg transportiert wurde, und nicht über den ABCC2/Abcc2-Weg, und es wurde daher nicht als ein Mittel zur Verwendung in einem Verfahren für die Bestimmung der MRP2/3-Aktivität in Betracht gezogen.

Gemäß der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Bestimmung der funktionellen Aktivität des MRP2 und/oder MRP3-Efflux- oder Ausstrom-Weges eines menschlichen oder tierischen Subjekts geschaffen, wobei das Verfahren Folgendes umfasst:

- (i) Bestimmen des Pegels eines Gallensäure-Derivats im Blut des Menschen oder Tieres zu einem vorgegebenen Zeitintervall nach der Einführung einer Menge des Gallensäure-Derivats in das Subjekt, und
- (ii) Verwenden der im Schritt (i) gewonnenen Bestimmung zur Anzeige der funktionellen Aktivität des MRP2 und/oder MRP3-Ausfluss-Pfades des Subjektes.



Gemäß einem weiteren Gesichtspunkt der Erfindung wird ein Verfahren zur Durchführung einer Prognose oder Diagnose an einem menschlichen oder tierischen Subjekt geschaffen, wobei das Verfahren Folgendes umfasst:

- 5 Bestimmen des Pegels der Gallensäure-Derivats in dem Blut des menschlichen oder tierischen Subjekts zu einem vorgegebenen Zeitintervall nach der Einführung einer Menge des Gallensäure-Derivats in das Subjekt, dadurch gekennzeichnet, dass die gewonnene Bestimmung zur Anzeige der funktionellen Aktivität des MRP2- und/oder MRP3-Efflux-Weges des Subjektes
10 verwendet wird.

Der Ausdruck "Bestimmung" in diesem Kontext hat eine breite Bedeutung. Er schließt sowohl eine quantitative Analyse zum Quantifizieren des Pegels oder der Menge des Gallensäure-Derivats in der Probe als auch die qualitative Analyse zur
15 Feststellung, ob diese Gallensäure vorliegt oder nicht, und falls passend, das Ausmaß ein, in dem dieses vorhanden ist. Somit ist es für dieses Verfahren nicht wesentlich, dass ein numerischer Wert für den Pegel des Gallensäure-Derivats in dem Blut gewonnen wird. Beispielsweise kann die Feststellung, dass der Pegel des Gallensäure-Derivats in dem Blut innerhalb eines bestimmten Bereiches liegt, dazu
20 verwendet werden, die funktionelle Aktivität des MRP2- und/oder MRP3-Weges abzuschätzen. Durch Analogie werden den Worten "bestimmen" und "Bestimmung" eine gleiche Bedeutung gegeben.

Die Bestimmung des Pegels der Gallensäure kann so ausgeführt werden, wie dies
25 in der europäischen Patentschrift EP 1 003 458 beschrieben ist (wobei der gesamte Text hiervon durch diese Bezugnahme eingeführt wird und einen integralen Teil dieser Offenbarung bilden soll). Diese Patentschrift beschreibt die Verwendung von gefärbten oder fluoreszierenden Gallensäure-Derivaten in menschlichen Subjekten zur Feststellung der Leberfunktion des Subjektes. Ein Beispiel eines derartigen
30 Gallensäure-Derivats, das in der EP 1 003 458 angegeben ist, ist das fluoreszierende Fluoreszein-Derivat Cholyl-Lysyl-Fluorescein (CLF). Die EP 1 003 458 beschreibt die Verwendung von CLF als möglichen Leberfunktionstest.

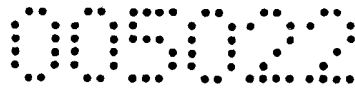
Der Zweck der Verwendung einer Gallensäure-Derivat-Verbindung, wie z.B. CLF, in
35 einem Leberfunktionstest bestand darin, eine Verbindung zu schaffen, die von

Hepatozyten in die Galle in der gleichen Weise transportiert würden, wie natürliche Gallensäuren. Gallensäuren werden in die Leberzellen durch zumindest zwei Transportsysteme aufgenommen: ein Na⁺-abhängiges System, das Na⁺/Taurocholat-Cotransporter-Polypeptid (auch bekannt als NTCP) und ein Na⁺-unabhängiges System, das Transporter in der organischen Anion-Transporter-Familie beinhaltet (bekannt als die OATP-Familie). Gallensäuren werden in die Gallenkanäle durch die Gallensalz-Exportpumpe exkretiert, die auch als BSEP oder ABCB11 bekannt ist, was auf der Gallenkanal-Seite der Leberzellen exprimiert. Wie dies vorstehend beschrieben wurde, wurde vor der vorliegenden Erfindung angenommen, dass CLF in die Galle über ABCB11 exkretiert wird.

Statt dessen haben wir festgestellt, dass das vorstehende Verfahren zur Anzeige der funktionellen Aktivität des MRP2- und/oder MRP3-Efflux- oder Ausstrom-Weges eines Subjektes verwendet werden kann. Die MRP2/MRP3-Expression und Aktivität werden durch einen weiten Bereich von Arzneimitteln und Erkrankungszuständen geändert, so dass die Kenntnis der funktionellen Aktivität des MRP2- und/oder MRP3-Ausscheidungs-Pfades des Subjektes zur Anzeige eines weiten Bereiches von Bedingungen unter Einschluss der vorstehend erwähnten verwendet werden kann. Dieses Verfahren ist daher bei der Diagnose oder Prognose eines Bereiches von Bedingungen nützlich, die aus denen ausgewählt sind, bei denen die MRP2- und/oder MRP3-Expression modifiziert wird, beispielsweise aufwärts geregelt oder abwärts geregelt wird, oder bei denen das MRP2- und/oder MRP3-Gen mutiert ist. Vorzugsweise wird das Verfahren der vorliegenden Erfindung dazu verwendet, einen Zustand oder eine Erkrankung zu diagnostizieren oder prognostizieren, wie sie hier beschrieben ist.

Die Ausdrücke "funktionelle Aktivität des MRP2- und/oder MRP3-Efflux-Weges" oder "funktionelle Aktivität des MRP2- und/oder MRP3-Ausscheidungs-Weges", wie sie hier verwendet werden, beziehen sich auf die Transportaktivität des MRP2-Transporter-Proteins und/oder des MRP3-Transporter-Proteins beim Transport von Substraten über Zellularmembranen hinweg.

Die Bestimmung des Pegels des Gallensäure-Derivats in dem Blut kann auf eine Anzahl von Arten verarbeitet oder analysiert werden. Der Pegel des Gallensäure-Derivats in dem Blut kann mit zumindest einer Standardmessung verglichen



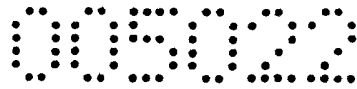
werden. Ähnliche Ergebnisse, die zu unterschiedlichen vorgegebenen Zeitintervallen gewonnen werden, können mit derartigen Standardmessungen verglichen werden.

- 5 Es ist jedoch nicht erforderlich, einen Vergleich mit einem Standard durchzuführen. Es ist möglich, die gewonnene Bestimmung dazu zu verwenden, eine direkte Anzeige der funktionellen Aktivität des MRP2- und/oder MRP3-Ausscheidungs-
Weges eines Subjektes zu erzielen, ohne dass die Notwendigkeit irgendeines Vergleichs mit Ergebnissen von einem gesunden Subjekt oder einem Subjekt mit
10 einer bekannten MRP2- /MRP3-Funktion besteht.

- Vorzugsweise umfasst das Verfahren einen weiteren Schritt der Verwendung der Bestimmung des Pegels des Gallensäure-Derivats zur Gewinnung eines numerischen Wertes, wobei der numerische Wert die funktionelle Aktivität des
15 MRP2- und/oder MRP3-Efflux-Weges des Subjektes anzeigt. Ein einziger Zahlenwert, der die funktionelle Aktivität des MRP2- und/oder MRP3-Efflux-Weges des Subjektes anzeigt, liefert in vorteilhafter Weise eine brauchbare Maßnahme für Ärzte, Funktionen eines Patienten abzuschätzen, die durch die MRP2/3-Aktivität beeinflusst werden, wie z.B. eine Leberfunktion, Nierenfunktion oder Darmfunktion.
20 Ein derartiger Zahlenwert kann durch Verwendung der Bestimmung des Pegels des Gallensäure-Derivats zur Erzielung eines direkten Maßes der funktionellen Aktivität des MRP2- und/oder MRP3-Efflux-Weges des Subjektes gewonnen werden.

- Vorzugsweise wird die erreichte Bestimmung mit zumindest einem Standard
25 verglichen, um die funktionelle Aktivität des MRP2- und/oder MRP3- Efflux-Weges des Subjektes anzuzeigen.

- Vorzugsweise wird der Pegel des Gallensäure-Derivats in dem Blut des Subjektes zu zwei oder mehr vorgegebenen Zeitintervallen nach der Einführung einer Menge
30 des Gallensäure-Derivats in das Subjekt bestimmt. Dadurch, dass eine Serie von Blutproben über die Zeit genommen wird, kann eine Plasma-Ausscheidungs-Kurve konstruiert und mit Plasma-Ausscheidungs-Kurven verglichen werden, die von Subjekten gewonnen wurden, die eine bekannte MRP2/3-Aktivität haben. Zwei oder mehr Bestimmungen des Pegels des Gallensäure-Derivats in dem Blut des
35 Subjektes, die zu unterschiedlichen Zeitintervallen gewonnen werden, können zur



Gewinnung des numerischen Wertes verwendet werden, der die funktionelle Aktivität des MRP2- und/oder MRP3-Ausscheidungs-Weges des Subjektes anzeigt.

5 Wenn beispielsweise der Pegel des Gallensäure-Derivats in dem Blut des Subjektes zu zwei oder mehr vorgegebenen Zeitintervallen bestimmt wird, kann die zu einem ersten Zeitintervall nach der Verabreichung gewonnene Bestimmung und die zu einem zweiten Zeitintervall nach der Verabreichung gewonnene Bestimmung als ein Verhältnis oder als ein prozentualer Anteil ausgedrückt werden. So kann ein Verhältnis der Bestimmung nach 30 Minuten oder nach 60 Minuten als das
10 Verhältnis der Bestimmung nach 10 Minuten ausgedrückt werden. Dieses Verhältnis ergibt einen Zahlenwert, im Allgemeinen kleiner als 1, der eine Anzeige der funktionellen Aktivität des MRP2- und/oder MRP3-Weges des Subjektes ergibt.

15 Alternativ kann die Bestimmung zu dem späteren Zeitintervall, beispielsweise 30, 60 oder 90 Minuten, als ein prozentualer Teil der Bestimmung zu dem früheren Zeitintervall, beispielsweise 10 Minuten, nach der Verabreichung des Gallensäure-Derivats ausgedrückt werden. Dieser prozentuale Wert ergibt in gleicher Weise eine Anzeige der funktionellen Aktivität des MRP2- und/oder MRP3-Weges des Subjektes.

20

Alternativ kann ein Zahlenwert, der die funktionelle Aktivität des MRP2/3-Weges eines Subjektes anzeigt, durch Bestimmen der Steigung einer logarithmisch-linearen Plasma-Ausscheidungskurve gewonnen werden, die aus den gewonnenen Bestimmungen abgeleitet wird. Alternativ kann ein Zahlenwert durch Bestimmen der
25 Fläche unter einer Plasma-Ausscheidungskurve gewonnen werden, die aus den Ergebnissen abgeleitet ist. Weiterhin kann die Differenz zwischen den Steigungen einer logarithmisch-linearen Kurve, die aus einer Test-Plasma-Ausscheidungskurve und einer logarithmisch-linearen Kurve, die von einer Standard-Ausscheidungskurve abgeleitet wird, berechnet werden, um den Zahlenwert zu liefern, der die
30 funktionelle Aktivität des MRP2- und/oder MRP3-Weges anzeigt. In gleicher Weise kann die Differenz zwischen der Fläche unter der Plasma-Ausscheidungskurve, die von Testergebnissen abgeleitet wird, und einer Standard-Ausscheidungskurve berechnet werden, um den Zahlenwert zu liefern.

Der Ausdruck "Standard" in diesem Kontext hat eine weite Bedeutung. Er soll irgendeine einzelne Messung oder eine Serie (zwei oder mehr) Messungen umfassen, die von einem menschlichen oder tierischen Subjekt gewonnen werden. Dies schließt Messungen ein, die von gesunden Subjekten, Subjekten mit einer bekannten MRP2/3-Funktion ein, und es kann eine Messung oder Messungen einschließen, die von dem Subjekt gewonnen werden, dessen MRP2/3-Funktion untersucht wird. Dies bedeutet, dass wenn man sich mit dem Fortschreiten oder der Stadienbestimmung einer Krankheit befasst, man Messungen vergleichen kann, die über die Zeit gewonnen werden, wobei das Subjekt selbst als Kontrolle wirkt.

10

Vorzugsweise umfasst das Gallensäure-Derivat einen Marker, wie z.B. eine Farbe, oder eine Fluoreszenz.

15

Vorzugsweise umfasst das Verfahren weiterhin den Schritt der Lieferung von zumindest einer Blutprobe, die durch die Leber des Subjektes hindurch gelaufen ist, wobei diese Probe zu einem vorgegebenen Zeitintervall nach der Verabreichung des Gallensäure-Derivats an das Subjekt gesammelt wurde, wobei die Blutprobe oder die Blutproben verarbeitet werden, um Blutplasma oder Blutserum zu gewinnen. Daher kann ein in-vitro-Verfahren zur Bestimmung der funktionellen Aktivität des MRP2- und/oder MRP3-Efflux-Weges eines Subjektes geschaffen werden.

20

Vorzugsweise werden die Blutprobe oder die Blutproben durch Zentrifugieren verarbeitet. Vorzugsweise werden die Blut-Proteine von dem Blutplasma/Blutserum getrennt.

25

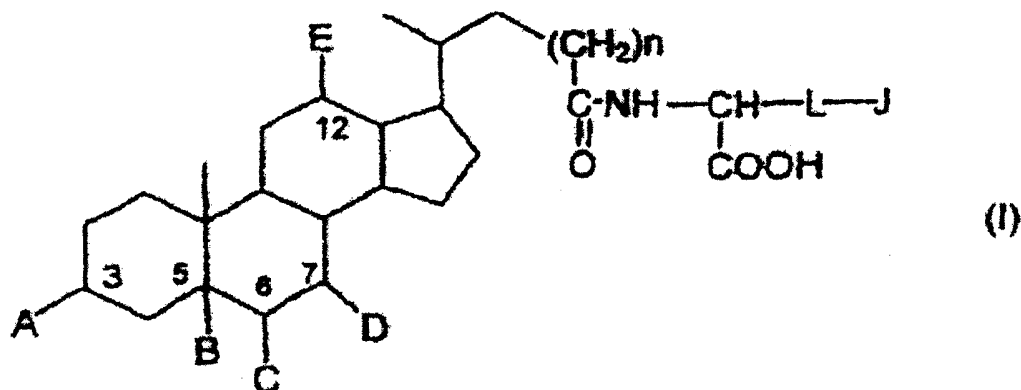
Vorzugsweise wird das Gallensäure-Derivat dem Subjekt intravenös verabreicht.

30

Vorzugsweise umfasst das Gallensäure-Derivat (a) einen Steroid-Anteil, der (i) zumindest einen Substituenten, der aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus einem 3-Hydroxyl-Substituenten, einem 7-Hydroxyl-Substituenten und einem 12-Hydroxyl-Substituenten besteht und (ii) eine Carboxyl-Gruppe aufweist, die mit Hilfe einer Amid-Koppelung an einer Seitenkette des Steroid-Anteils angebracht ist; und (b) einen aktiven Anteil, der auf die Leber zu richten ist, wobei der aktive Anteil an einem α -Carbon-Atom bezüglich der Carboxyl-Gruppe angebracht ist.

35

Insbesondere wird bevorzugt, dass das Gallensäure-Derivat die allgemeine Formel (I):



hat, worin A aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus α -OH und β -OH besteht; B aus
 5 der Gruppe ausgewählt ist, die aus α -H und β -H besteht; C aus der Gruppe
 ausgewählt ist, die aus -H, α -OH und β -OH besteht; oder B und C zusammen eine
 Doppelbindung bilden; D aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus -H, α -OH und β -
 OH besteht; E aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus H, α -OH und β -OH besteht; L
 ein Bindungsanteil ist; J ein eingefärbter oder fluoreszierender Anteil ist; und n
 10 gleich 0 oder 1 ist.

In der vorstehenden Formel ist der Bindungsanteil L vorzugsweise an seinem Ende
 N-terminiert und an dem eingefärbten oder fluoreszierenden Anteil J angebracht
 und ist vorzugsweise $-(CH_2)_nNH$, worin n gleich 3 oder 4 ist, $-(CH_2)_4NH$ -
 15 $(CH_2)_3NHC(=NH)NH$ - oder $-(CH_2)_2-CH(OH)CH_2NH$ -.

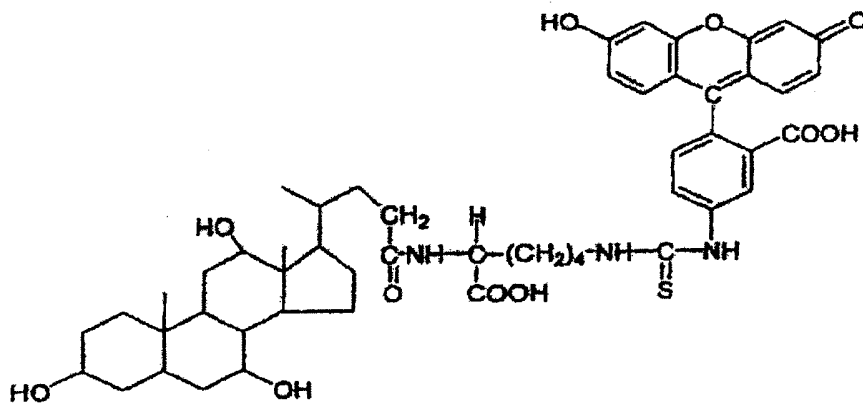
Alternativ kann der Anteil $-NH-CH(COOH)-L$ - von S-Adenosylhomocystein, S-
 Adenosylmethionin, S-Amino-Imadazol-4-Carboxiamid, Asparagin, Cadaverin,
 Cystamin, Citrullin, Diaminopimelinsäure, 2,4-Diaminobutylsäure, Cysteamin,
 20 Glutamin, 3-Hydroxykynurenin, Kynurenin, Putrescin oder Negamycin abgeleitet
 sein. Alternativ können azidische Aminosäuren anstelle des vorstehenden
 verwendet werden, wobei der aktive Anteil J eine Aminogruppe aufweist und/oder
 Hydrophob ist.

25 In der vorstehenden Formel ist J ein Fluoreszin, Rhodamin oder ein anderer
 fluoreszierender Anteil oder schließt diesen ein.
 Vorzugsweise beruht der Steroid-Anteil des Gallensäure-Derivats auf einer Säure,

die aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Cholsäure, Chenodeoxycholsäure, Deoxycholsäure, Hyodeoxycholsäure, Hyocholsäure, α -, β -, oder ω -Muricholsäure, Nor-Gallensäuren, Lithocholsäure, 3 β -Hydroxycholenoidsäure, Ursodeoxycholsäure und Allocholsäure (5 α -Cholan-24-OIC-Säure) besteht.

5

Besonders bevorzugt ist das Gallensäure-Derivat ein Cholyl-Lysyl-Fluoreszin (CLF) mit der Formel:



oder Salze hiervon. Vorzugsweise ist das Gallensäure-Derivat ein Trinatrium-Salz.

- 10 Vorzugsweise ist das Gallensäure-Derivat ein Cholyl-L-Lysyl-Fluoreszin, das als Fluoreszin-Lisicol bekannt ist. Vorzugsweise ist das Gallensäure-Derivat ein Fluoreszin-Lisicol-Trinatrium-Salz.

- 15 Gemäß einem weiteren Gesichtspunkt der Erfindung wird die Verwendung der funktionellen MRP2- und/oder MRP3-Aktivität, die aus dem vorstehenden Verfahren gewonnen wird, zur Bestimmung der Leberfunktion eines menschlichen oder tierischen Subjektes geschaffen.

- 20 Gemäß einem weiteren Gesichtspunkt der Erfindung wird die Verwendung eines Gallensäure-Derivats zur Bestimmung der funktionellen Aktivität des MRP2- und/oder MRP3-Efflux-Weges eines menschlichen oder tierischen Subjektes geschaffen.

Gemäß einem weiteren Gesichtspunkt der Erfindung wird die Verwendung eines

Gallensäure-Derivats bei der Diagnose oder Prognose des Dubin-Johnson-Syndroms, der Zirrhose der Leber, der Cholestase, der Fettlebererkrankung, der Alkohollebererkrankung, der primären Sklerose-Cholangitis oder der viralen Hepatitis geschaffen.

5

Gemäß einem weiteren Gesichtspunkt der Erfindung wird die Verwendung eines Gallensäure-Derivats bei der Herstellung eines Diagnose- oder Prognose-Mittels zur Verwendung bei der Diagnose oder Prognose des Dubin-Johnson-Syndroms, der der Zirrhose der Leber, der Cholestase, der Fettlebererkrankung, der
10 Alkohollebererkrankung, der primären Sklerose-Cholangitis oder der viralen Hepatitis geschaffen.

Gemäß einem weiteren Gesichtspunkt der Erfindung wird die Verwendung eines Gallensäure-Derivats bei der Bestimmung des Zustandes des Bilirubin-Clearance-
15 Pfades oder des konjugierten Bilirubin-Clearance-Pfades eines menschlichen oder tierischen Subjektes geschaffen.

Gemäß einem weiteren Gesichtspunkt der Erfindung wird die Verwendung eines Gallensäure-Derivats bei der Herstellung eines diagnostischen oder prognostischen
20 Mittels zur Bestimmung des Zustandes des Bilirubin-Clearance-Pfades oder des konjugierten Bilirubin-Clearance-Pfades eines menschlichen oder tierischen Subjektes geschaffen.

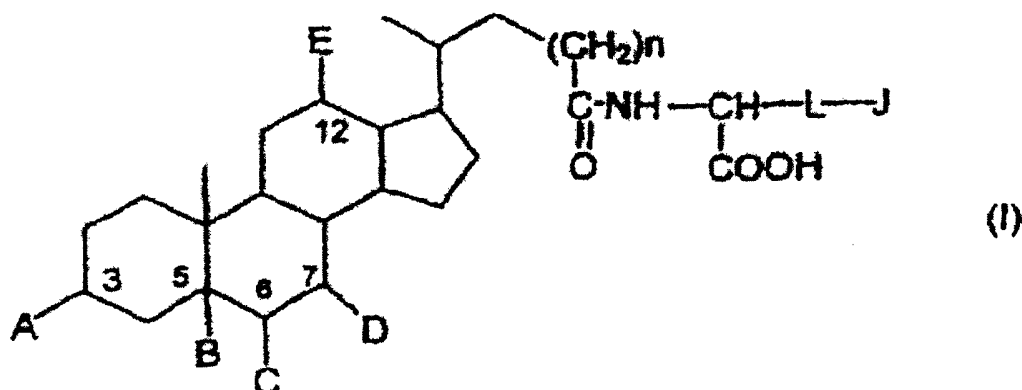
Gemäß einem weiteren Gesichtspunkt der Erfindung wird die Verwendung eines
25 Gallensäure-Derivats zur Bestimmung der Nierenfunktion, der Gallenfunktion, der Darmfunktion oder der Leberfunktion eines menschlichen oder tierischen Subjektes geschaffen.

Gemäß einem weiteren Gesichtspunkt der Erfindung wird die Verwendung eines
30 Gallensäure-Derivats für die Herstellung eines Diagnose- oder Prognose-Mittels zur Bestimmung der Nierenfunktion, der Gallenfunktion, der Darmfunktion oder der Leberfunktion eines menschlichen oder tierischen Subjektes geschaffen.

Vorzugsweise umfasst das Gallensäure-Derivat (a) einen Steroid-Anteil der (i)
35 zumindest einen Substituenten, der aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus einem

- 3-Hydroxyl-Substituenten, einem 7-Hydroxyl-Substituenten und einem 12-Hydroxyl-Substituenten besteht, und (ii) eine Carboxyl-Gruppe aufweist, die mit Hilfe einer Amid-Koppelung an eine Seitenkette des Steroid-Anteils angebracht ist, und (b) einen aktiven Anteil, der auf die Leber zu zielen ist, wobei der aktive Anteil an einem
- 5 α -Carbon-Atom bezüglich der Carboxyl-Gruppe angebracht ist.

Vorzugsweise ist das Gallensäure-Derivat eine Verbindung der Formel (I):



- 10 worin A aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus α -OH und β -OH besteht; B aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus α -H und β -H besteht; C aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus -H, α -OH und β -OH besteht; oder B und C zusammen eine Doppelbindung bilden; D aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus -H, α -OH und β -OH besteht; E aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus H, α -OH und β -OH besteht;
- 15 ein Bindungsanteil ist; J ein eingefärbter oder fluoreszierender Anteil ist; und n gleich 0 oder 1 ist.

Vorzugsweise schließt J einen Fluoreszein-, Rhodamin oder anderen fluoreszierenden Anteil ein oder ist dieser.

20

Vorzugsweise ist der Bindungsanteil N-abgeschlossen und an seinem Ende an dem aktiven Anteil J angebracht, und L ist aus der Gruppe ausgewählt, die aus Folgendem besteht: $-(CH_2)_nNH$, worin n 3 oder 4 ist, $-(CH_2)_4NH-(CH_2)_3NHC(=NH)NH-$ und $-(CH_2)_2-CH(OH)CH_2NH-$.

25

Vorzugsweise ist der Anteil $-NH-CH(COOH)-L-$ in der allgemeinen Formel (I) von einer Verbindung abgeleitet, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus S-

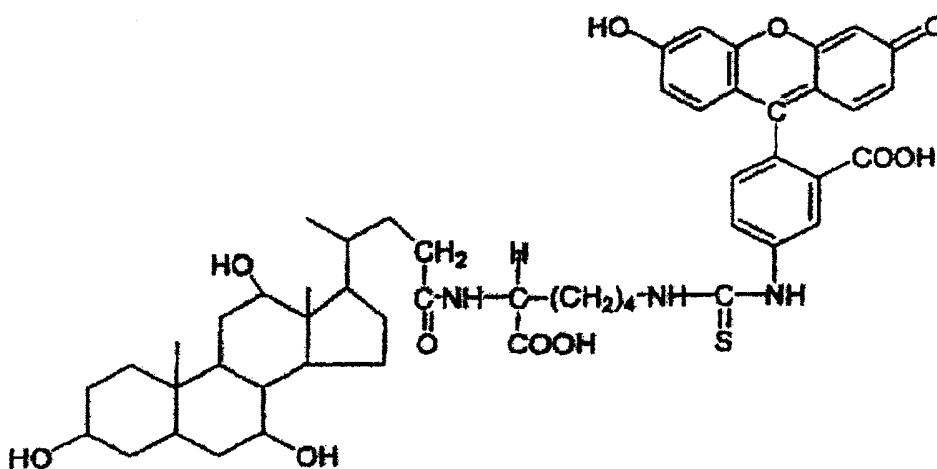
Adenosylhomocystein, S-Adenosylmethionin, S-Amino-Imadazol-4-Carboxiamid, Asparagin, Cadaverin, Cystamin, Citrullin, Diaminopimelsäure, 2,4-Diaminobutylsäure, Cysteamin, Glutamin, 3-Hydroxykynurenin, Kynurenin, Putrescin und Negamycin besteht.

5

Vorzugsweise beruht der Steroid-Anteil des Gallensäure-Derivats auf einer Säure, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Cholsäure, Chenodeoxycholsäure, Deoxycholsäure, Hyodeoxycholsäure, Hyocholsäure, α -, β -, oder ω -Muricholsäure, Nor-Gallensäuren, Lithocholsäure, 3 β -Hydroxycholenoidsäure, Ursodeoxycholsäure und Allocholsäure (5 α -Cholan-24-OIC-Säure) besteht.

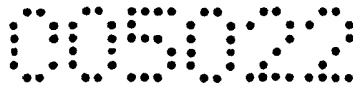
10

Vorzugsweise ist das Gallensäure-Derivat ein Choly-Lysyl-Fluoreszein (CLF) mit der Formel:



- 15 oder Salzen hiervon. Vorzugsweise ist das Gallensäure-Derivat ein Trinatrium-Salz.
Vorzugsweise ist das Gallensäure-Derivat ein Fluoreszein-Lysicol-Trinatrium-Salz.

- 20 Der Anmelder hat unerwartet herausgefunden, dass im Gegensatz zu den Lehren des Standes der Technik MRP2 und MRP3 Verbindungen der allgemeinen Formel (I) transportieren. Eine Verbindung dieser Formel kann daher zur Bestimmung der funktionellen Aktivität des MRP2- und/oder MRP3-Weges eines menschlichen oder tierischen Subjektes verwendet werden.



Die Verbindungen der Formel (I) können bei der Diagnose oder Prognose des Dubin-Johnson-Syndroms oder bei der Herstellung eines diagnostischen oder prognostischen Mittels zur Verwendung bei der Diagnose oder Prognose des Dubin-Johnson-Syndroms verwendet werden. Das Dubin-Johnson-Syndrom ist mit Mutationen in dem MRP2-Gen verknüpft. Entsprechend kann die Bestimmung der Aktivität des MRP2- und/oder MRP3-Weges eines Subjektes Information zur Verwendung bei der Diagnose oder Prognose bezüglich des Dubin-Johnson-Syndroms liefern.

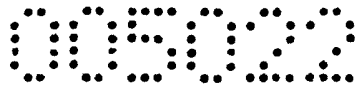
- 10 Die Verbindungen der Formel (I) können weiterhin zur Bestimmung der Nierenfunktion, der Gallenfunktion, der Darmfunktion oder der Leberfunktion eines menschlichen oder tierischen Subjektes verwendet werden oder sie können bei der Herstellung eines Diagnose- oder Prognose-Mittels zur Bestimmung der Nierenfunktion, Gallenfunktion, Darmfunktion oder Leberfunktion eines menschlichen oder tierischen Subjektes verwendet werden. MRP2 wird in der Niere, dem Darm und der Leber exprimiert, so dass die Bestimmung der Aktivität des MRP2- und/oder MRP3-Weges eines Subjektes Information zur Verwendung bei der Bestimmung der Nierenfunktion, Gallenfunktion, Darmfunktion oder Leberfunktion eines Subjektes liefern kann.

20

- Die Verbindungen der Formel (I) können weiterhin bei der Diagnose oder Prognose der Leberzirrhose, der Cholestase, der Fettlebererkrankung, der Alkohollebererkrankung, der primären Sklerose-Cholangitis oder der Virushepatitis oder bei der Herstellung eines Diagnose- oder Prognose-Mittels zur Verwendung bei der Diagnose oder Prognose der Leberzirrhose, Cholestase, Fettlebererkrankung, Alkohollebererkrankung, primären Sklerose-Cholangitis oder der viralen Hepatitis verwendet werden.

- 30 Die Verbindungen der Formel (I) können weiterhin bei der Bestimmung des Zustandes des Bilirubin-Clearance-Weges oder des konjugierten Bilirubin-Clearance-Weges eines menschlichen oder tierischen Subjektes oder bei der Herstellung eines Diagnose- oder Prognose-Mittels zur Bestimmung des Zustandes des Bilirubin-Clearance-Weges oder des konjugierten Bilirubin-Clearance-Weges eines menschlichen oder tierischen Subjektes verwendet werden.

35



Bilirubin ist ein Abbauprodukt des Häm-Katabolismus. In der Leber wird Bilirubin mit Glucuronsäure konjugiert und in der Galle exkretiert. Bilirubin und Konjugierte von Bilirubin unter Einschluss von Bilirubin-Glucuroniden, wie z.B. Glucuronosyl-Bilirubin, werden über MRP2 [Jedlitschky et al, Expert Opin Drug Metab Toxicol 2006 Jun 2(3):351-66] transportiert. Vergrößerte Pegel von konjugiertem Bilirubin in Plasma zeigen eine mögliche Störung des Gallentransportes von konjugiertem Bilirubin an, so dass Serum-Bilirubin-Pegel bei der Vorhersage der Sterblichkeit von Lebertransplantations-Kandidaten nützlich sind.

- 10 Bilirubin und Bilirubin-Konjugierte werden über den MRP2-Efflux-Weg transportiert, so dass Bestimmungen der funktionellen Aktivität des MRP2- und/oder MRP3-Efflux-Weges dazu verwendet werden, die Clearance-Aktivität von Bilirubin oder konjugiertem Bilirubin zu bestimmen. Die Bestimmung der Bilirubin- und konjugiertem Bilirubin-Clearance kann eine Anzeige des Zustandes des Bilirubin-Efflux-Weges geben. Durch Bestimmen des Zustandes des Bilirubin-Clearance-Weges oder des konjugierten Bilirubin-Clearance-Weges eines Subjektes kann dies Störungen bei dem Bilirubin oder konjugiertem Bilirubin-Transport anzeigen.

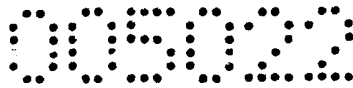
- 20 Die Ausdrücke "Bilirubin-Clearance-Weg" und "konjugierter Bilirubin-Clearance-Weg", wie sie hier verwendet werden, beziehen sich auf den Transport von Bilirubin/konjugiertem Bilirubin über Zellmembranen.

Die bevorzugten Merkmale dieser Gesichtspunkte sind so, wie dies weiter oben beschrieben wurde.

25

- Gemäß einem weiteren Gesichtspunkt der Erfindung wird ein Computerprogramm zur Bestimmung der funktionellen Aktivität des MRP2- und/oder MRP3-Ausscheidungs-Weges eines menschlichen oder tierischen Subjektes unter Verwendung der Bestimmung des Pegels eines Gallensäure-Derivats in dem Blut eines menschlichen oder tierischen Subjektes zu einem vorgegebenen Zeitintervall nach der Einführung einer Menge des Gallensäure-Derivats in das Subjekt geschaffen, um einen numerischen oder Zahlenwert zu gewinnen, wobei der numerische Wert die funktionelle Aktivität des MRP2- und/oder MRP3-Ausscheidungs-Weges des Subjektes anzeigt.

35



Gemäß einem weiteren Gesichtspunkt der Erfindung wird ein Verfahren zur Bestimmung der funktionellen Aktivität des OATP1B3- Aufnahme-Weges eines menschlichen oder tierischen Subjektes, wobei das Verfahren Folgendes umfasst:

- 5 (i) Bestimmen des Pegels eines Gallensäure-Derivats in dem Blut des menschlichen oder tierischen Subjektes zu einem vorgegebenen Zeitintervall nach der Einführung einer Menge des Gallensäure-Derivats in das Subjekt; und
- (ii) Verwenden der im Schritt (i) gewonnenen Bestimmung zur Anzeige der funktionellen Aktivität des OATP1B3-Aufnahme-Weges des Subjektes.

10 Frühere Studien zeigten die partielle Natrium-abhängige Aufnahme von einigen, jedoch nicht allen fluoreszierenden Gallensalzen in Ratten-Hepatozyten [Maglova LM et al, Hepatology 1995 Aug;22(2):637-647]. Zusätzlich wurde die Aufnahme von Choly-Glycyl-Fluoreszin in Ratten-Ntcp-exprimierende CHO-Zellen, nicht jedoch in Wildtyp-Zellen gezeigt [Boyer JL et al, Am J Physiol 1994 Mar;266(3 Pt 1):G382-
15 G387]. Es könnte daher erwartet werden, dass CLF über NTCP in Hepatozyten aufgenommen werden könnte. Stattdessen haben wir gefunden, dass CLF in Hepatozyten über OATP1B3 aufgenommen wird, und wir haben gefunden, dass das vorstehende Verfahren zur Anzeige der funktionellen Aktivität des OATP1B3-Aufnahmeweges eines Subjektes verwendet werden kann.

20

Die bevorzugten Merkmale dieses Gesichtspunktes sind so, wie dies vorstehend bezüglich der vorher beschriebenen Gesichtspunkte der Erfindung beschrieben wurde.

25 Die Erfindung wird nunmehr in Form eines Beispiels unter Bezugnahme auf die Zeichnungen beschrieben, in denen:

Figur 1A eine Immunfluoreszenz-Mikrographiedarstellung ist, die die Expression von Na⁺/Taurocholat-Kotransporter-Polypeptid (NTCP) in stabil
30 transfizierten Zellen zeigt. In Figur 1A erscheinen die fluoreszierenden Teile der Mikrografiedarstellung dunkel und die nicht fluoreszierenden Teile erscheinen weiß. NTCP ist ein Protein, das die Aufnahme von Gallensäuren in Leberzellen vermittelt. NTCP wurde so visualisiert, wie dies in dem nachfolgenden Material- und Methoden-Abschnitt beschrieben ist.

35

Figur 1B zeigt eine kinetische Charakterisierung von CHO-NTCP, bei der die Zellen mit zunehmenden TC- (Taurocholat-) Konzentrationen für 45 Sekunden bei Vorliegen von Natrium (■) oder Kalium (□) inkubiert wurden. Natrium-abhängige Aufnahme-
raten (□) wurden zur Bestimmung der kinetischen Parameter verwendet.

5 Daten stellen Mittel $\pm$ SD von Triplikaten dar. Wenn Fehlerbalken fehlen, waren sie kleiner als das Symbol.

Figuren 2A-2D beziehen sich auf Aufnahmestudien an CHO-Zellen, die hepatozelluläre Aufnahmetransporter exprimieren; die Daten für Figur 2B-2D stellen

10 Mittelwerte $\pm$ SD dar.

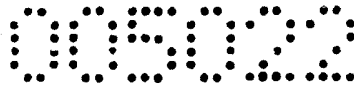
Figur 2A zeigt Fluoreszenz-Bilder nach der Inkubation von CHO-Transporter-Zellen mit 1 μ mol/L CLF über 5 Minuten. Fluoreszenz-Bilder (rechte Felder) werden mit Phasenkontrast-Bildern (linke Felder) komplementiert. In den
15 Fluoreszenz-Bildern (rechte Felder) erscheinen die fluoreszierenden Teile dunkel, und die nicht fluoreszierenden Teile erscheinen weiß.

Figur 2B ist eine grafische Darstellung, die den durch NTCP vermittelten Transport von CLF bei Vorliegen (schwarze Streifen) und Fehlen von Natrium
20 (weiße Streifen) für 1 und 5 Minuten zeigt.

Figur 2C ist eine grafische Darstellung, die den Transport von CLF für CHO-Zellen (Wildtyp und mit OATP1B1, OATP1B3 und OATP2B1 transfizierte Zellen) zeigt. Die Zellen wurden mit 1 μ mol/L CLF während 1 (weiße Balken) oder 5 Minuten
25 (schwarze Balken) inkubiert.

Figur 2D bezieht sich auf die Kinetiken des durch OATP1B3 vermittelten CLF-Transports und zeigt eine grafische Darstellung des CLF-Transports gegenüber der CLF-Konzentration. Zellen wurden mit zunehmenden
30 Konzentrationen von CLF über 45 Sekunden inkubiert. Gezeigt sind Aufnahme-
raten, die für eine Null-Sekunden-Bindung korrigiert sind.

Figuren 3A-3D beziehen sich auf die Behinderung der Transportaktivität von hepatozellulären Aufnahme-Transportern durch CLF. CHO-Zellen, die NTCP,
35 OATP1B1, OATP1B3 und OATP2B1 exprimieren, wurden mit 0, 5 oder 50 μ mol/L



CLF inkubiert, und zwar mit den Substraten 2, 5 $\mu\text{mol/L}$ TC, 1 $\mu\text{mol/L}$ Estron-3-Sulfat, 10 $\mu\text{mol/L}$ TC bzw. 1 $\mu\text{mol/L}$ Estron-3-Sulfat. Die Daten stellen Mittelwerte $\pm\text{SD}$ von Triplikat-Bestimmungen dar.

5 Figur 3 zeigt die Ergebnisse für CHO-Zellen, die NTCP exprimieren, mit 2,5 $\mu\text{mol/L}$ TC.

Figur 3B zeigt die Ergebnisse für CHO-Zellen, die OATP1B1 exprimieren, mit 1 $\mu\text{mol/L}$ Estron-3-Sulfat.

10

Figur 3C zeigt die Ergebnisse für CHO-Zellen, die OATP1B3 exprimieren, mit 10 $\mu\text{mol/L}$ TC.

15 Figur 3D zeigt die Ergebnisse für CHO-Zellen, die OATP2B1 exprimieren, mit 1 $\mu\text{mol/L}$ Estron-3-Sulfat.

Figur 4A zeigt Westernblots von Membranvesikeln von Sf21-Insektenzellen, die mit ABCB11, ABCC2, ABCC3 und ABCG2 cDNA enthaltenden Bakulovirus nicht infiziert und infiziert waren. Die Westernblots zeigen das Vorliegen von Proteinen ABCB11, ABCC2, ABCC3 und ABCG2 in den jeweiligen infizierten Sf21-Insektenzellen.

20

Figuren 4B bis 4 zeigen den zeitabhängigen Transport von CLF in Plasma-Membran-Vesikel vom Wildtyp-Sf21-Zellen (B), Sf21-Zellen, die ABCB11 exprimieren (C, ABCG2 (D), ABCC2 (E) bzw. ABCC3 (F).

25

Figuren 4G und 4H zeigen die konzentrationsabhängige Aufnahme von CLF in Sf21-Membran-Vesikel, die ABCC2 (G) bzw. ABCC3 (H) enthalten.

Figuren 5A und 5B zeigen die Veränderung des DNP-SG- und TC-Transports in ABCC2 (A) und ABCB11 (B)- Protein, die Sf21-Membran-Vesikel enthalten, durch CLF. Die Werte sind als prozentualer Anteil des maximalen ATP-abhängigen Transports ausgedrückt. Die Signifikanz wurde unter Verwendung des zweiseitigen Student-t-Tests getestet: $*P < 0,05$ für den Transport bei Vorliegen gegenüber dem Fehlen des Inhibitors.

30

35

Figur 6 zeigt die Plasma-Clearance von CLF in Mäusen. Wildtyp, Abcc3^{-/-} und Abcc2^{-/-}-Mäuse erhielten 100 µl an 2mmol/L CLF durch Injektion in die Schwanzvene. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurde Blut abgenommen. Die Daten sind als der mittlere prozentuale Anteil des anfänglichen CLF-Pegels bei zwei Minuten ausgedrückt. Die Signifikanz wurde unter Verwendung des zweiseitigen Student-t-Tests getestet: *P<0,05 für Abcc2^{-/-} gegenüber Wildtyp-Mäusen.

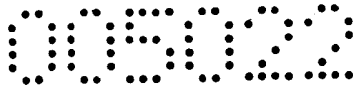
Figur 7A zeigt das zeitabhängige Auftreten von CLF in der Galle vom Wildtyp, Abcc3^{-/-} und Abcc2^{-/-}-Mäusen. Die Daten stellen den Mittelwert ±SD dar.

Figur 7B zeigt die CLF-Pegel im Blut, Urin, Leber und Galle vom Wildtyp, Abcc3^{-/-} und Abcc2^{-/-}-Mäusen nach zwei Stunden. Die Mäuse erhielten 100µl an 1mmol/L CLF durch Injektion in die Schwanzvene. Die Daten stellen den Mittelwert ±SD dar. Plasma-Pegel sind in nmol/L ausgedrückt, und die Pegel in Urin, in der Leber und in der Galle als prozentualer Anteil der verabreichten Dosis. Die Signifikanz wurde unter Verwendung des zweiseitigen Student-t-Tests getestet: *P<0,05 für Abcc2^{-/-} gegenüber Wildtyp-Mäusen. Die Daten stellen den Mittelwert ±SD dar.

Figur 8 bezieht auf die intestinale Aufnahme von TC und CLF. Das Auftreten von TC und CLF in der Galle nach der ilealen Verabreichung einer 100 µL-Mischung von 2mmol/L TC und CLF in Wildtyp-Mäusen. Die Galle wurde nach den angegebenen Zeitpunkten gesammelt. Die Daten stellen einen Mittelwert ±SD dar. Die grafische Darstellung ist eine Kurve der kumulativen Gallenpegel als prozentualer Anteil der verabreichten Dosis. Die Signifikanz wurde unter Verwendung des zweiseitigen Student-t-Tests getestet: *P<0,05 für die TC-Aufnahme gegenüber der CLF-Aufnahme.

Figur 9 zeigt die Plasma-Eliminations-Kurven bezüglich des Beispiels 2. Die linke Kurve hat eine lineare und die rechte Kurve hat eine logarithmisch-lineare Achse.

Figur 10 zeigt die Plasma-Eliminations-Kurven bezüglich des Beispiels 10. Die linke Kurve hat eine lineare und die rechte Kurve hat eine logarithmisch-lineare Achse.



Beispiel 1: Demonstration, dass das Gallensäure-Derivat CLF ein Substitut für MRP2 ist

5

Materialien

Cholyl-Lysyl-Fluoreszein (CLF) wurde von Norgine, Harefield, UK beschafft. [³H]GSH (52 Ci/mmol) and [³H]TC 1,19 Ci/mmol) wurden von Perkin Elmer Life and Analytical Sciences (Boston, MA, USA) beschafft. Die [³H]DNP-SG-Synthese wurde so durchgeführt, wie dies von de Waart DR et al [Liver Int 2006 Apr;26(3):362-368] beschrieben wurde. [³H]E₂17βG (40,5 Ci/mmol) wurde von NEN Life Science Products (Boston, MA, USA) gekauft. Zellulose-Azetat-Membranfilter wurden von Schleicher und Schuell (Dassel, Deutschland) gekauft. Sucrose wurde von Brunschwig Chemie (Amsterdam, Niederlande) beschafft. Kreatin-Kinase wurde von Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) gekauft. Methanol (HPLC-Güte) wurde von Baker (Deventer, Niederlande) beschafft. Triton X-100 wurde von Merck (Darmstadt, Deutschland) gekauft. Alle anderen Chemikalien und Reagenzien wurden von Sigma-Aldrich (Zwijndrecht, Niederlande) gekauft.

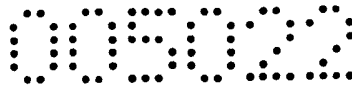
20

Tiere

Abcc2^{-/-}-Mäuse (gegen einen Friend-Virus B-Typ- (FVB-) Hintergrund) wurden an dem National Cancer Institute (Amsterdam, Niederlande) aufgezogen. Die Produktion und Charakterisierung der Abcc2^{-/-}-Mäuse wurde von Vlaming et al [Pharmacol Exp Ther 2006 Jul;318(1):319-327] beschrieben. Wildtyp- und Abcc3^{-/-}-Mäuse (gegen einen FVB-Hintergrund) wurden an dem Tierinstitut des Academic Medical Center aufgezogen. Die Produktion und Charakterisierung der Abcc3^{-/-}-Mäuse war so, wie dies von Zelcer et al [J Hepatol 2006 Apr;44(4):768-775] beschrieben wurde.

Erzeugung von CHO-Zellen, die stabile NTCP und Zellen-Linien exprimieren

cDNA für menschliches NTCP [Hagenbuch et al, J Clin Invest 1994 Mar;93(3):1326-



1331] wurde mit EcoRV und HindI verschnitten und der Codierungsbereich wurde in pcDNA5/FRT verknüpft (Invitrogen, Life-Technologies, Karlsbad, CA). CHO FlpIn-Zellen (Invitrogen, Life-Technologies) wurden mit dem resultierenden Konstrukt unter Verwendung von Lipofektamin® 2000 (Invitrogen, Life-Technologies) 5 transfiziert. Stabile transfizierte Zellen wurden mit 550 µg Hygromycin-B in einem HAM-F-12-Medium (Gibco, Invitrogen, Life-Technologies) selektiert. Transfizierte Zellen wurden mit dem begrenzenden Verdünnungs-verfahren geklont. Klone, die funktionelle NTCP exprimieren, wurden durch Transport-Assays mit radioaktiv markiertem Taurocholat (siehe unten) identifiziert. Um die geklonten Zellen weiter 10 zu charakterisieren wurde eine Immunofluoreszenz-Lokalisierung von NTCP unter Verwendung eines polyklonalen Antikörpers gegen NTCP [Kullak-Ublick G et al, Gastroenterology 1997 Oct;113(4):1295-1305] durchgeführt, wie dies von Huber RD et al [Am J Physiol Cell Physiol 2007 Feb;292(2):C795-C806] beschrieben wurde. CHO-Zellen, die OATP1B1, OAT1B3 und OATP2B1 exprimieren, wurden bereits 15 vorher beschrieben [Treiber et al, DMD 35:1400-1407, 2007].

Transportexperimente mit stabil infizierten Zellen-Linien

Für alle Transportexperimente wurde auf 3 cm-Kulturschalen gezogene Zellen über 20 24 Stunden in Medien kultiviert), die mit 5mmol/L Natrium-Butyrat ergänzt wurden, um die Exprimations-Pegel transfizierter Transporter zu vergrößern [Palermo DP et al, J Biotechnol 1991 Jun;19(1):35-47] .

- Transportexperimente mit der Aufnahme von radioaktiv markierten 25 Substraten: diese Experimente wurden durchgeführt, wie dies von Huber RD et al [Am J Physiol Cell Physiol 2007 Feb;292(2):C795-C806] beschrieben wurde.

- Transportexperimente mit Aufnahme von CLF: die Aufnahme wurde in den gleichen Puffern wie für die vorstehend genannten radioaktiven Substrate 30 durchgeführt. Für die Visualisierung der CLF-Aufnahme wurden Zellen unmittelbar mit einem Leica-DM-IRBE-invertierten Mikroskop (Leica-Microsystems, Wetzlar, Deutschland) inspiziert, das mit einer Hamamatsu-ORKA-ER-Kamera ausgerüstet war (Hamamatsu-Photonics, Japan). Um die Aufnahme von CLF zu bestimmen, wurden Zellen durch die Hinzufügung von 2ml 1% (w/v) Triton X-100 solubilisiert. 35 Nach der vollständigen Solubilisation wurden 1,5ml zur Messung der Fluoreszenz in

einem Perkin-Elmer LS-5-Lumineszenz-Spektrometersatz bei λ_{exc} 486nm (Schlitz 10nm) und λ_{em} 520nm (Schlitz 5nm) verwendet. Protein wurde mit dem Bicinchonin-Säure-Verfahren unter Verwendung eines Kit von Interchim (Montfucon, Frankreich) bestimmt. Transportdaten von OATP, das Zellen-Linien exprimiert, wurden für die

5 Bindung durch Subtrahieren von 0min-Zeitpunkten (Leerwerte) korrigiert und wurden mit Ausnahme der Figuren 2B und 2C pro Minute normalisiert. Eine kinetische Analyse wurde mit einer nichtlinearen Regression der Daten auf die Michaelis-Menten-Gleichung unter Verwendung der GraphPad PRISM-V-4.00 (GraphPad-Software-Inc., San Diego, CA) durchgeführt.

10

Vorbereitung der Membran-Vesikel

Die Produktion von rekombinatem Bakulovirus wurde vom de Waart et al [Liver Int 2006 Apr;26(3):362-368] beschrieben. ABCC3 und ABCG2-rekombinante

15 Bakuloviren waren eine freundliche Gabe von Borst [Breedveld P. et al, Cancer Res 2004 Aug 15;64(16):5804-5811 und Borst P. et al J Biol Chem 2001 Dec 7;276(49):46400-46407]. ABCB11-rekombinanter Bakulovirus war eine freundliche Gabe von Thompson [Thompson RJ et al, Gastroenterology 2002 Nov;123(5):1649-1658]. Sf21-Zellen, die bei 27°C aufgezogen wurden, wurden mit ABCB11, ABCC2,

20 ABCC3 und ABCG2-cDNA infiziert, die Bakulovirus enthält. Zellen wurden 2-4 Tage nach der Infektion entnommen. Die Membran-Vesikel-Zubereitung war so, wie dies von de Waart et al [Liver Int 2006 Apr;26(3):362-368] beschrieben wurde.

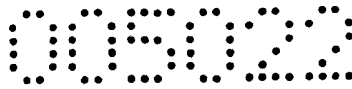
Westernblotting und Protein-Analyse

25

Membran-Vesikel wurden durch 5% SDS-PAGE fraktioniert, auf Nitrozellulose Membranen (Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) geblottet, die in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS)/5% Milchpulver/0,05% Tween-20 blockiert wurden. Die folgenden Antikörper wurden verwendet: anti-his-Probe; sc-803 (Santa Cruz,

30 USA), anti-ABCG2; BXP-21 [Maliepaard M et al, Cancer Res 2001 Apr 15;61(8):3458-3464], anti-ABCC2; M₂III6 [Scheffer et al, Cancer Res 2000 Sep 15;60(18):5269-5277] und anti-ABCC3; M₆III21 [Scheffer et al, Cancer Res 2000 Sep 15;60(18): 5269-5277]. Immun-Komplexe wurden mit Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Immunglobulinen visualisiert und unter Verwendung einer

35 Chemilumineszenz (Amersham, UK) detektiert.



Transport-Assays mit Plasma-Membran-Vesikeln

Transport-Studien mit Membran-Vesikeln wurden unter Verwendung der
5 Schnellfiltrationstechnik durchgeführt, wie sie von Heijn M et al [Am J Physiol 1992
Jan;262(1 Pt 1):C104-C110] beschrieben wurde. Eine Markierung mit radioaktiven
Atomen wurde mit einem Szintillationszähler gemessen. Wenn CLF als eine Probe
verwendet wurde, wurden Filter in einem Glasrohr angeordnet, 0,1% Triton X-100
wurde hinzugefügt, und die Rohre wurden verwirbelt. Die Proben wurden in Platten
10 mit 96-Vertiefungen (Kartell, Noviglio, Italien) pipettiert, und die Menge von CLF
durch die Messung der Fluoreszenz bei $\lambda_{exc}485nm$ und $\lambda_{em}520nm$ unter
Verwendung eines NovoStar (BMG-labtech, Offenburg, Deutschland) quantifiziert.

Tierexperimente

15

Männliche Mäuse wurden in einer Pathogen-freien Tieranlage auf einem 12
Stunden Hell-Dunkel-Zyklus untergebracht. Die Mäuse wurden mit einer
Kombination von Hypnorm (VetaPharma, UK; 11,8mg/kg Fluanison und 0,37mg/kg
Fentanyl-Zitrat) und Diazepam (Centrafarm, Etten-Leur, Niederlande; 5,9mg/kg
20 Valium) anästisiert. Die Körpertemperatur wurde auf $36 \pm 1^\circ C$ auf thermostatisch
gesteuerten Heizkissen gehalten. Für Clearance-Studien wurden Mäuse mit CLF
dadurch infusiert, dass 100 μ L (2mmol/L) CLF in die Schwanzvene injiziert wurde.
Nachfolgend wurde Blut von der Carotis zu den angegebenen Zeitpunkten
entnommen. Blutproben wurden durch die Hinzufügung von zwei Volumen Methanol
25 deproteinisiert, und die Menge an CLF in dem Überstand wurde durch Messung der
Fluoreszenz in der vorstehend beschriebenen Weise quantifiziert.

Für Gallensekretionsstudium wurde die Gallenblase mit PE10-Polyethylen-Schlauch
kanüliert und 100 μ L (1mmol/L) CLF wurde in die Schwanzvene injiziert. Galle
30 wurde in 10 Minuten-Fractionen gesammelt. Leber und Blut wurden am Ende des
Experimentes gewonnen. Homogenisierte Leber wurden durch Hinzufügung von
zwei Volumen von MeOH deproteinisiert, und Gallen- und Blutproben wurden mit
0,1% Triton X-100 verdünnt. Die Menge an CLF wurde durch die Messung der
Fluoreszenz in der vorstehend beschriebenen Weise quantifiziert.

35

Für die intestinalen Aufnahme-Studien von Taurocholat (TC) und CLF wurden Mäuse anästhesiert und die Gallenblase wurde in der vorstehend beschriebenen Weise kanülisiert. Mäuse erhielten sowohl TC als auch CLF durch Injizieren von 100µL (2mmol/L) CLF in das Ileum. Galle wurde allen 15 Minuten gesammelt. Die Radioaktivität wurde in einem Szintillationszähler gemessen und CLF wurde in der vorstehend beschriebenen Weise quantifiziert.

Ergebnisse

- Die Rolle unterschiedlicher hepatozellulärer Gallensalz-Transporter in der hepatischen Aufnahme von CLF wurde untersucht. Für diesen Zweck wurden CHO-Zellen, die NTCP stabil exprimieren, erzeugt (CHO-NTCP) und charakterisiert. Figur 1A zeigt eine Immunofluoreszenz-Mikrographie von stabil transfizierten Zellen von einem Immunofluoreszenz-Assay unter Verwendung eines polyklonalen Antikörpers gegen NTCP. Eine Immunofluoreszenz-Mikrographie für Wildtyp-Zellen (nicht gezeigt) zeigte keine Fluoreszenz und daher keine Expression von NTCP in Wildtyp-CHO-Zellen, doch zeigt die Immunofluoreszenz-Mikrographie für transfizierte Zellen (Figur 1A) eine Fluoreszenz an den Zellmembranen, und zeigt daher eine klare Plasma-Membran-Expression von NTCP in stabil transfizierten Zellen.
- Weiterhin war die Aufnahme von Taurocholat (TC) in diese Zellen Natrium-abhängig (Daten nicht gezeigt) und war mit zunehmenden Taurocholat-Konzentrationen sättigbar. Selbst bei hohen Taurocholat-Konzentrationen war die Aufnahme bei Fehlen von Natrium vernachlässigbar (Figur 1B). Die K_m - und die V_{max} -Werte waren 16,0µmol/L bzw. 6738pmol TC/mg Protein/min, für den Natrium-abhängigen Transport von TC (Figur 1B). Im Gegensatz hierzu konnte keine Natrium-abhängige Aufnahme von CLF unter Vermittlung durch MTCP durch die Fluoreszenz-Analyse und die quantitative Bestimmung von CLF von NTCP-Zellen beobachtet werden, die mit CLF inkubiert wurden (Figuren 2A bzw. 2B). Das Fluoreszenz-Bild der CHO-Zellen, die NTCP exprimieren (siehe Figur 2A) zeigt das Fehlen der CLF-Aufnahme in Zellen. Die langen Zellen nach rechts des Bildes von CHO-Zellen, die NTCP exprimieren, was eine schwache Fluoreszenz-Färbung zeigt, können möglicherweise nicht mehr vital gewesen sein. Die Aufnahme von CLF bei Fehlen von Natrium (Figur 2B) war vergleichbar mit der von Wildtyp-Zellen (nicht gezeigt) und neigte dazu, mit zunehmender Inkubationszeit minimal größer zu werden.

Als nächstes wurde die durch OATP1B1, OATP1B3 und OATP2B1 vermittelte Aufnahme von CLF im Wildtyp und stabil transfizierten CHO-Zellen überprüft. Die Fluoreszenz-Bilder der CHO-Zellen, die OATP1B1, OATP1B3 und OATP2B1 exprimieren (siehe Figur 2A), zeigen die Aufnahme von CLF für die CHO-Zellen, die OATP1B3 exprimieren, jedoch nicht für OATP1B1 und OATP2B1. Das Fluoreszenz-Bild der CHO-Zellen, die OATP1B3 exprimieren, zeigt eine starke Fluoreszenz-Färbung der Zellen und zeigt damit eine eindeutige Aufnahme von CLF in die OATP1B3 exprimierenden Zellen. Das Fluoreszenz-Bild der CHO-Zellen, die OATP1B1 exprimieren, zeigt eine sehr schwache Fluoreszenz-Färbung, was zeigt, dass die Aufnahme von CLF in OATP1B1 Zellen sehr schwach jedoch stetig war. Im Gegensatz hierzu wurde keine Aufnahme im OATP2B1 gefunden, und das Fluoreszenz-Bild der OATP2B1 exprimierenden CHO-Zellen zeigt keine Fluoreszenz-Färbung, mit Ausnahme einer einzigen positiven Zelle, die in dem Fluoreszenz-Bild sichtbar ist, was eine Zelle mit teilweise reduzierter Vitalität sein kann, wie dies durch die Phasenkontrast-Mikroskopie beurteilt wird. Hohe zeitabhängige Transportraten von CLF wurden lediglich in OATP1B3 exprimierenden CHO-Zellen gefunden (Figuren 2A bzw. 2B). Die Aufnahme von CLF durch OATP1B1-Zellen wurde übereinstimmend beobachtet, jedoch nicht durch OATP2B1-Zellen (Figuren 2A und 2C), was anzeigt, dass CLF kein Substrat für OATP2B1 ist. Der OATP1B3-vermittelte CLF-Transport war konzentrationsabhängig (Figur 2D) mit K_m und den V_{max} -Werten von $4,6 \pm 2,7 \mu\text{mol/L}$ bzw. $213 \pm 42 \text{ pmol CLF/mg Protein/min}$ (Mittelwert von drei unabhängigen Bestimmungen). Aufnahmeexperimente mit zunehmenden CLF-Konzentrationen und OATP1B1-Zellen zeigten einen Nachweis für eine Sättigbarkeit (nicht gezeigt). Aufgrund eines niedrigen Signal-/Störverhältnisses, insbesondere bei höheren CLF-Konzentrationen, war keine Bestimmung der kinetischen Parameter möglich.

Es wurden Untersuchungen ausgeführt, um festzustellen, ob der Transport von Modell-Verbindungen, die durch NTCP, OATP1B1, OATP1B3 und OATP2B1 vermittelt wurden, durch CLF behindert werden könnte, obwohl CLF ein Substrat lediglich für OATP1B3 ist. CHO-Zellen, die NTCP, OATP1B1, OATP1B3 und OATP2B1 exprimieren, wurden mit 0, 5 oder $50 \mu\text{mol/L}$ CLF und mit den Substraten $2,5 \mu\text{mol/L}$ TC, $1 \mu\text{mol/L}$ Estron-3-Sulfat, $10 \mu\text{mol/L}$ TC bzw. $1 \mu\text{mol/L}$ Estron-3-Sulfat inkubiert. Daten stellen Mittelwerte $\pm$ SD von dreifachen Bestimmungen dar. Unübersehbar hemmte CLF sehr wirkungsvoll den Transport von TC über NTCP

(Figur 3A). Der durch OATP1B3 vermittelte Transport von TC konnte durch CLF in einer Dosis abhängigen Weise (Figur 3C) gehemmt werden, wie dies erwartet wurde. Schließlich wurde der Transport des Modellsubstrats Estron-3-Sulfat vermittelt durch OATP1B1 und OATP2B3 durch CLF gehemmt, wenn auch weniger wirkungsvoll (Figuren 3B bzw. 3D) was die Aufnahmeexperimente mit CLF bestätigt. Es sei bemerkt, dass die Hinzufügung von CLF zu Wildtyp-Zellen keinen Einfluss auf die Substrat-Aufnahme hatte, was zeigt, dass dies die strukturelle Integrität der Plasma-Membran nicht stört (Figur 3).

Um zu testen, ob die kanalikulären ATP-abhängigen Transporter ABCB11, ABCC2 und ABCG2 sowie die basolateralen Transporter ABCC3 den Transport von CLF vermitteln, wurden diese menschlichen Proteine in Sf21-Insektenzellen exprimiert (Figur 4A). Figur 4B zeigt, dass eine geringe ATP-abhängige Aufnahme in Kontroll-Vesikel erfolgte, was anzeigt, dass ein endogener Transporter in der Lage ist, CLF in einer ATP-abhängigen Weise aufzunehmen. Der ATP-abhängige Transport von CLF in ADCB11 und ABCG2-Protein-enthaltenden Membran-Vesikeln war nicht höher als in Kontroll-Vesikeln (Figuren 4C bzw. B). ABCC2 und ABCC3 enthaltende Membran-Vesikel zeigten jedoch wesentlich höhere CLF-Transportraten verglichen mit Kontroll-Wildtyp-Sf21-Membran-Vesikeln (Figuren 4E bzw. F).

Membran-Vesikel (10µg und 30µg vom Gesamteiweiß für ABCC2 bzw. ABCC3) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von CLF bei Vorliegen oder Fehlen von 4mmol/L ATP inkubiert. Der ABCC2- und ABCC3-vermittelte Transport von CLF war konzentrationsabhängig (Figuren 4G bzw. H). Die k_m -Werte waren $3,3 \pm 2,0 \mu\text{mol/L}$ und $3,7 \pm 1,0 \mu\text{mol/L}$ für ABCC2 bzw. ABCC3, und die V_{max} -Werte waren $4,36 \pm 2,15 \text{ pmol CLF/mg Protein/min}$ bzw. $188 \pm 55 \text{ pmol CLF/mg Protein/min}$.

Ein weiteres Modellsubstrat für ABCC2 ist Dinitrophenyl-Glutathion (DNP-SG) und CLF sollte den Transport dieser Verbindung behindern. Eine halbe maximale Behinderung des DNP-SG-Transports mit CLF wurde bei ungefähr $1 \mu\text{mol/L}$ erzielt (Figur 5A). Obwohl kein Hinweis gefunden wurde, dass CLF ein Substrat für ABCB11 ist, enthält es einen Cholyl-Anteil und könnte daher in der Lage sein, den Gallensalz-Transport über ABCB11 zu hemmen. Tatsächlich konnte der TC-Transport durch CLF in einer Dosis-abhängigen Weise gehemmt werden und die Konzentration, bei der der halbe maximale Transport beobachtet wurde, betrug

ungefähr 10µmol/L (Figur 5B).

Um die Rolle von Abcc2 und Abcc3 bei der Plasma-Clearance von CLF zu untersuchen, wurden die CLF-Pegel im Plasma von Wildtyp-Abcc2^{-/-} und Abcc3^{-/-}-
 5 Mäusen nach einer einzigen Injektion von CLF in die Schwanzvene untersucht. Die Clearance von CLF wurde sehr stark bei Abcc2^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen beeinträchtigt, wurde jedoch nicht bei Abcc3^{-/-}-Mäusen beeinflusst (Figur 6). Um die Rolle von Abcc2^{-/-} beim Gallen-Ausgang von CLF zu untersuchen, wurden Infusionsexperimente mit Wildtyp- und Abcc2^{-/-}-Mangel-Mäusen durchgeführt. Die
 10 Gallenexkretion von CLF war bei den Abcc2^{-/-}-Mäusen stark verzögert (Figur 7A). Als Folge wurden fast 70% der CLF-Dosis in die Galle von Wildtyp-Mäusen innerhalb von 20 Minuten exkretiert, während in der gleichen Zeitspanne weniger als 2% in Galle in Abcc2^{-/-}-Mäusen exkretiert wurde. Bei 120 Minuten nach der Verabreichung (Figur 7B) war die kumulative Gallen-Exkretion von CLF bei Wildtyp-
 15 Mäusen immer noch beträchtlich höher als bei Abcc2^{-/-}-Mäusen (85% gegenüber 32% der verabreichten Dosis), was zu einer beträchtlich höheren hepatitischen Retention von CLF in Abcc2^{-/-} gegenüber Wildtyp-Mäusen (64% gegenüber 1% der verabreichten Dosis) und zu einem höheren Blutpegel in Abcc2^{-/-} gegenüber Wildtyp-Mäusen führte (1306±749nmol/L gegenüber 83±21nmol/L). Diese Daten
 20 zeigen, dass bei Mäusen Abcc2^{-/-} der Haupt-transporter ist, der für die Gallen-Exkretion von CLF verantwortlich ist. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Figur 7A wurde beobachtet, dass der Gallen-Ausgang von CLF in Abcc3^{-/-}-Mäusen verglichen mit Wildtyp-Mäusen nicht beeinflusst wurde, und dass keine Unterschiede hinsichtlich der Plasma- und Leber-CLF-Inhalte gefunden wurden
 25 (Figur 7B).

Nach der Exkretion in die Galle und der Zuführung in das Duodenum wurden die Gallensalze in dem Ileum über dem apikalen Natrium-abhängigen Gallensäure-Transporter (ASBT) aufgenommen [Wong MH et al, J Biol Chem 1995 Nov
 30 10;270(45):27228-27234]. Um zu untersuchen, ob CLF im Intestinum aufgenommen wurde, wurden äquimolare Mengen von CLF und [³H]TC in das Duodenum oder Ileum vom Wildtyp-FVB-Mäusen injiziert. Danach wurde die Galle gesammelt und die Mengen von in die Galle exkretierten [³H]TC und CLF wurden quantifiziert. 4,5 Stunden nach ilealen Injektion beider Verbindungen wurde lediglich 2% der CLF in
 35 Galle zurückgewonnen, während dies 68% für [³H]TC war. Entsprechend ist die

Aufnahme von CLF in dem End-Ileum minimal. Dies zeigt, dass CLF kein gutes Substrat für das Asbt ist.

Schlussfolgerungen

5

Die Ergebnisse der Untersuchungen hinsichtlich der Aufnahme von CLF zeigen, dass die Aufnahme von CLF in Hepatozyten wahrscheinlich nicht durch NTCP vermittelt wird, weil keine Aufnahme von CLF in CHO-Zellen, die menschliches NTCP exprimieren, festgestellt wurde. Dies beruhte nicht auf einem nicht-
10 funktionellen Protein, weil diese Zellen vollständig in der Lage waren, die Aufnahme des natürlich auftretenden Gallensalzes, TC, zu vermitteln. Das ileale Gegenstück des hepatitischen NTCP ist ASPT, und dies vermittelt den Transport von konjugierten und nicht konjugierten Gallensalzen [Geyer J et al, Arch Pharmacol 2006 Mar;372(6):413-431]. Ein indirekter Nachweis wurde erzielt, um anzudeuten,
15 dass CLF nicht über (murines) Asbt transportiert wird, während in das ileale Lumen von Wildtyp-Mäusen injiziertes TC sehr effizient in Galle zurückgewonnen wurde (obwohl nahezu kein CLF gefunden wurde). Diese Daten deuten an, dass sowohl NTCP als auch Asbt, die homologe Natrium-abhängige Gallensalz-Transporter sind, nicht in der Lage sind, CLF zu transportieren.

20

Frühere Studien zeigten die partielle Natrium-abhängige Aufnahme von einigen, jedoch nicht allen fluoreszierenden Gallensalzen in Ratten-Hepatozyten [Maglova LM et al, Hepatology 1995 Aug;22(2):637-647]. Zusätzlich wurde die Aufnahme von Cholyl-Glycyl-Fluoreszin in Ratten-Ntcp-exprimierende CHO-Zellen, nicht jedoch in
25 Wildtyp-Zellen gezeigt [Boyer JL et al, Am J Physiol 1994 Mar;266(3 Pt 1):G382-G387]. Im Gegensatz zu CLF wurde festgestellt, dass ein anderes Gallensalz-Konjugat, Taurocholyl-Chlorambucil, ein Substrat für NTCP ist [Kullak-Ublick GA et al, Gastroenterology 1997 Oct;113(4):1295-1305]. Die letztere Verbindung ist ein Konjugat an der 3-OH-Gruppe von Gallensalz, während CLF an der Seitenkette
30 konjugiert ist. In diesem Kontext ist es interessant, dass Baringhaus et al die Pharmacophor-Eigenschaften sowohl von NTCP als auch ASTB bestimmten und feststellten, dass die 3-OH-Gruppe für den Transport nicht wesentlich ist, während die saure Seitenkette dies ist [Baringhaus KH et al, J Lipid Res 1999 Dec;40(12):2158-2168]. Die vorstehenden Daten stimmen vollständig mit diesem
35 Modell überein und zeigen eine Spezies-Differenz der Substrat-Spezifität von

NTCP/Ntcp.

Der weniger spezifische Gallensalz-Transporter, OATP1B3 erweist sich als wahrscheinlicherer Kandidat für die Aufnahme in die Hepatozyten, was in die breite Substrat-Spezifität dieses Transporters passt [Hagenbuch B et al, Pflugers Arch 2004 Feb;447(5):653-665].

Diese Daten zeigen überraschend jedoch schlüssig, dass ABCC2/Abcc2 der am stärksten überwiegende Transporter ist, der für die Gallen-Exkretion von CLF verantwortlich ist, und nicht ABCB11. In Mäusen wird die große Mehrheit von CLF im Plasma in die Galle über Abcc2 exkretiert. Es kann argumentiert werden, dass die Substrat-Spezifität von menschlichem ABCC2 von der in Mäusen verschieden sein kann. In Plasmamembran-Vesikel-Assays wurde jedoch gezeigt, dass der Transport von CLF über menschliches ABCB11 unbedeutend verglichen mit dem über menschliches ABCC2 ist. Unsere derzeitigen Daten zeigen deutlich, dass CLF nicht über ABCB11 transportiert wird.

Wie dies oben beschrieben wurde, verwendeten Mills et al. Abcc2-Mangel-TR-Ratten und haben CLF in der Galle nach der Injektion von CLF in die Jugularvene gemessen [J Hepatol 1999 Oct;31(4):678-684]. Die kumulative Menge von CLF in der Galle war ähnlich in TR- und normalen Wistar-Ratten nach 30 Minuten. Auf der Grundlage dieser neuen Daten scheint es jedoch so zu sein, dass die kumulativen Daten fehlinterpretiert wurden (weil nämlich die anfänglichen Transportraten immer noch unterschiedlich sein könnten). Die neuen hier beschriebenen Tests führten eine ähnliche jedoch umfangreichere Studie unter Verwendung von Wildtyp- und Abcc2^{-/-}-Mäusen aus. Bei Mäusen mit Abcc2-Mangel war die Gallen-Exkretion von CLF stark beeinträchtigt und es blieb in der Leber, was andeutet, dass Abcc2 und Abcb11 der Haupt-Transporter ist, der für die Gallen-Exkretion von CLF verantwortlich ist. Weil es nur noch einen kleinen Rest-Gallentransport von CLF in Abcc2^{-/-}-Mäusen gibt, kann ein Beitrag von Abcb11, wenn auch klein, nicht ausgeschlossen werden.

Der Verlust der MRP2-Funktion wird in vielen Fällen gut toleriert und durch die Aufwärtsregelung anderer Membran-Transporter kompensiert, insbesondere MRP3 [Nies et al Pflugers Arch (2007) 453:643-659]. Die Untersuchungen zeigen, dass

nicht nur ABCC2 sondern auch ABCC3 den Transport von CLF vermittelt. Wenn daher MRP2 in Patienten herunterreguliert ist, kann dies durch eine Aufwärtsregulation von MRP3 kompensiert werden, und die funktionelle Aktivität des MRP2- und/oder MRP3-Pfades des Subjektes kann unter Verwendung von CLF untersucht werden.

Beispiel 2

- Eine Studie wurde an zwölf gesunden Versuchspersonen (sech Männer, sechs Frauen) im Alter von 21 bis 40 Jahren durchgeführt, um die Plasma-Pharmakokinetiken von CLF nach einer einzigen 15 Sekunden dauernden intravenösen Injektion von 2mg CLF bei Vorliegen von Medikations-induzierten Änderungen der Gallen-Transporter-Proteine zu vergleichen. Die Studie wurde unter Bedingungen von keiner Vorbehandlung, einer Vorbehandlung mit Rifampizin, auch als Rifampin bekannt (ein nicht-spezifischer Induktor und Inhibitor von hepatischen Clearance-Pfaden) und einer Vorbehandlung mit Cyclosporin durchgeführt (Cyclosporin ist ein bekannter Inhibitor für MRP2 [Jedlitschky et al, Expert Opin Drug Metab Toxicol 2006 Jun 2(3):351-55]).
- CLF wurde von Norgine, Harefield, UK beschafft. Die Subjekte wurden in Rückenlage studiert. 2mg CLF wurde zu drei Gelegenheiten durch eine 15 Sekunden dauernde intravenöse Injektion am Morgen des Tages D01 nach einem Fasten über Nacht und einer Ruhe mit den folgenden Modalitäten verabreicht:
- Behandlung R: keine Vor- oder Mit-Medikation.
 - Behandlung T1: ambulatorische Besuche am Abend des Tages D-7 bis zum Abend des Tages -2 für eine einzige Abend-Dosis von 600 mg Rifampizin; die letzte Dosis von Rifampizin wurde am Abend des Tages D-1 nach der Einlieferung verabreicht.
 - Behandlung T2: Einzeldosis von 100 mg Cyclosporin am Abend des Tages D-1 und am Morgen von D01 eine Stunde vor der Verabreichung von CLF.

Verschiedene Blutproben wurden vor der Injektion und 2, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 150, 180, 240 und 360 Minuten nach der Dosierung (17 Proben) gesammelt. Der Pegel von CLF in jeder Probe wurde unter Verwendung von HPLC

bestimmt.

Der Zeitverlauf der beobachteten mittleren Plasma-CLF-Konzentrationen ist in Figur 9 gezeigt. Es ist zu erkennen, dass die Vorbehandlung mit Rifampizin zu einer
5 leichten Verringerung der Elimination und der Clearance von CLF führte. Eine vorherige und gleichzeitige Behandlung mit Cyclosporin rief eine deutliche Inhibition der Elimination und Clearance von CLF hervor. Diese Studie zeigt, dass CLF zur Bestimmung der OATP1B3-Aktivität und/oder der MRP2/3-Aktivität eines Subjektes
10 verwendet werden kann, wobei das Subjekt mit Medikament-Substraten vorbehandelt wurde, die die OATP1B3- und/oder die MRP2/3-Aktivität beeinflussen.

Beispiel 3

Eine Studie wurde an zwölf gesunden Versuchspersonen (sechs Männer, sechs
15 Frauen) im Alter von 21 bis 40 Jahren durchgeführt, um die Plasma-Pharmakokinetiken von CLF nach einer einzigen 15 Sekunden dauernden intravenösen Injektion von 2mg CLF bei Vorliegen von Medikations-induzierten Änderungen der Gallen-Transporter-Proteine zu vergleichen. Die Wechselwirkung mit Ursodeoxycholsäure und Cloxacillin wurde in diesem Beispiel studiert.

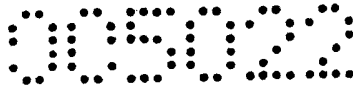
20

CLF wurde von Norgine, Harefield, UK beschafft. Die Subjekte wurden in Rückenlage studiert. 2mg CLF wurde an drei Gelegenheiten durch 15 Sekunden dauernde intravenöse Injektionen am Morgen des Tages D01 nach einem Fasten über Nacht und Ruhe mit den folgenden Modalitäten verabreicht:

25

- Referenz R: keine Vorbehandlung.
- Behandlung T1: vorherige und gleichzeitige Behandlung mit 1 g Cloxacillin t.i.d. für drei Tage vom Morgen von D-3 bis zum Morgen des Tages D01, 0:30 Stunden vor der Verabreichung von CLF.
- 30 • Behandlung T2: dreiwöchige Vorbehandlung mit täglichen Dosen von 500 mg b.i.d. Ursodeoxycholsäure (am Morgen und am Abend jedesmal mit Nahrung) bis zum Abend des Tages D-1.

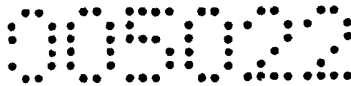
Venöse Blutproben wurden vor der Injektion und 2, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 75, 90,
35 105, 120, 150, 180, 240 und 360 Minuten nach der Dosierung (17 Proben)



gesammelt. Der Pegel von CLF in jeder Probe wurde unter Verwendung von HPLC bestimmt.

5 Der Zeitverlauf der beobachteten mittleren Plasma-CLF-Konzentrationen ist in Figur 10 gezeigt. Es ist zu erkennen, dass eine vorherige und gleichzeitige Behandlung mit Cloxacillin (einem bekannten BSEP-Inhibitor) eine leichte, jedoch statistisch bedeutsame Hemmung der Elimination und der Clearance von CLF zeigt. Im Gegensatz hierzu hatte eine Vorbehandlung mit Ursodeoxycholsäure keine Wirkung (Ursodiol ist ein bekannter Multi-Faktor-Verbesserer und Erleichterer der
10 hepatitischen Gallen-Clearance.

Diese Beispiele zeigen, dass CLF zur Bestimmung der Medikations-induzierten Änderungen der MRP2/3-Aktivität eines Subjektes verwendet werden kann.



Patentansprüche:

1. Verfahren zur Bestimmung der funktionellen Aktivität des MRP2- und/oder
5 MRP3-Efflux-Weges eines menschlichen oder tierischen Subjektes, wobei das
Verfahren Folgendes umfasst:
 - (i) Bestimmen des Pegels eines Gallensäure-Derivats in dem Blut des
menschlichen oder tierischen Subjektes zu einem vorgegebenen Zeitintervall nach
der Einführung einer Menge des Gallensäure-Derivats in das Subjekt; und
10 (ii) Verwenden der im Schritt (i) gewonnenen Bestimmung zur Anzeige
der funktionellen Aktivität des MRP2- und/oder MRP3-Efflux-Weges des Subjektes.
2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem das Verfahren einen weiteren Schritt
der Verwendung der gewonnenen Bestimmung zum Erreichen eines numerischen
15 Wertes umfasst, wobei der numerische Wert die funktionelle Aktivität des MRP2
und/oder MRP3-Efflux-Weges des Subjektes anzeigt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, bei dem die gewonnene Bestimmung
mit zumindest einem Standard verglichen wird, um die funktionelle Aktivität des
20 MRP2- und/oder MRP3-Efflux-Weges des Subjektes anzuzeigen.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem der Pegel
des Gallensäure-Derivats in dem Blut des menschlichen oder tierischen Subjektes
zu zwei oder mehr vorgegebenen Zeitintervallen nach der Einführung einer Menge
25 des Gallensäure-Derivats in das Subjekt bestimmt wird.
5. Verfahren nach Anspruch 4, bei dem das Verfahren weiterhin den Schritt
der Bestimmung einer Steigung einer logarithmisch-linearen Kurve der gewonnenen
Bestimmungen gegenüber der Zeit umfasst.
30
6. Verfahren nach Anspruch 4, bei dem das Verfahren weiterhin den Schritt
der Bestimmung einer Fläche unter der Plasma-Efflux-Kurve umfasst, die von den
gewonnenen Bestimmungen abgeleitet ist.



7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das Gallensäure-Derivat einen Marker, wie z.B. eine Farbe oder eine Fluoreszenz umfasst.

5

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Verfahren weiterhin den Schritt der Bereitstellung zumindest einer Blutprobe, die durch die Leber des Subjektes hindurchgelaufen ist, umfasst, wobei diese Probe an einem vorgegebenen Zeitintervall nach der Verabreichung des Gallensäure-Derivats an das Subjekt gesammelt wurde, wobei die Blutprobe oder die Blutproben verarbeitet werden, um Blutplasma oder Blutserum zu gewinnen.

10

9. Verfahren nach Anspruch 8, bei dem die Blutprobe oder die Blutproben durch Zentrifugation verarbeitet werden.

15

10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, bei dem die Blutproteine von dem Blutplasma/Blutserum getrennt werden.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das Gallensäure-Derivat dem Subjekt intravenös verabreicht wird.

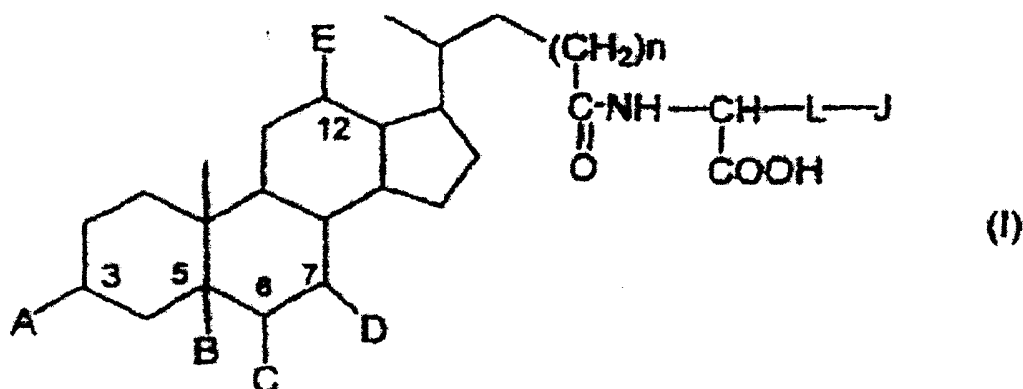
20

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das Gallensäure-Derivat Folgendes umfasst: (a) einen Steroid-Anteil, der (i) zumindest einen Substituenten, der aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus einem 3-Hydroxyl-Substituenten, einem 7-Hydroxyl-Substituenten und einem 12-Hydroxyl-Substituenten besteht, und (ii) eine Carboxyl-Gruppe aufweist, die mit Hilfe einer Amidbindung an einer Seitenkette des Steroid-Anteils angebracht ist; und (b) einen aktiven Anteil umfasst, der auf die Leber zu zielen ist, wobei der aktive Anteil an einem α -Kohlenstoffatom bezüglich der Carboxyl-Gruppe angebracht ist.

25

30

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das Gallensäure-Derivat die allgemeine Formel (I) aufweist:



worin A aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus α -OH und β -OH besteht; B aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus α -H und β -H besteht, C aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus -H, α -OH und β -OH besteht; oder B und C zusammen eine Doppelbindung bilden; D aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus -H, α -OH und β -OH besteht; E aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus -H, α -OH und β -OH besteht; L ein Bindungs-Anteil ist; J ein gefärbter oder fluoreszierender Anteil ist; und n 0 oder 1 ist.

10

14. Verfahren nach Anspruch 13, bei dem J ein Fluoreszein, Rhodamin oder ein anderer fluoreszierender Anteil ist oder diesen einschließt.

15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, bei dem der Bindungs-Anteil an seinem an dem aktiven Anteil J angebrachten Ende N-terminiert ist, und L aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus:

- $(\text{CH}_2)_n\text{NH}$, worin n 3 oder 4 ist,
- $(\text{CH}_2)_4\text{NH}-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}$ - und
- $(\text{CH}_2)_2-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}$ - besteht.

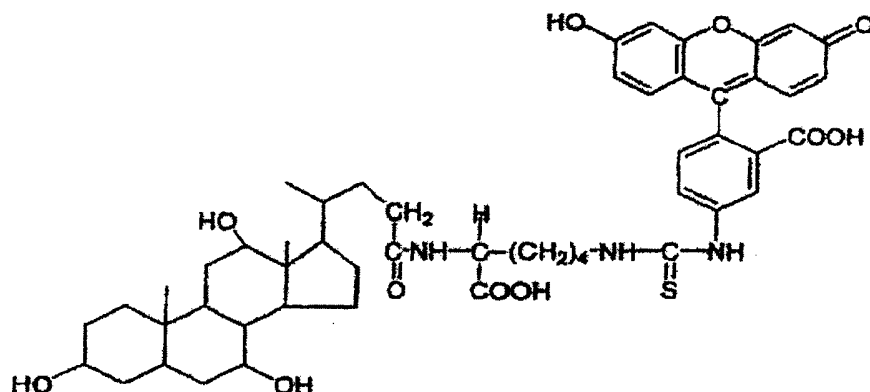
20

16. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, bei dem der Anteil $-\text{NH}-\text{CH}(\text{COOH})-\text{L}-$ in der allgemeinen Formel (I) von einer Verbindung abgeleitet ist, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus S-Adenosylhomozystein, S-Adenosylmethionin, S-Aminoimidazol-4-Carboxiamid, Asparagin, Cadaverin, Cystamin, Citrullin, Diaminopimelinsäure, 2,4-Diaminobutansäure, Cysteamin, Glutamin, 3-Hydroxy-Kynurenin, Kynurenin, Putrescin und Negamycin besteht.

25

17. Verfahren nach Anspruch 12, bei dem der Steroid-Anteil des Gallensäure-Derivats auf einer Säure beruht, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Cholsäure, Chenodeoxycholsäure, Deoxycholsäure, Hyodeoxycholsäure, Hyocholsäure, α -, β -, oder ω -Muricholsäure, Nor-Gallensäuren, Lithocholsäure, 3 β -Hydroxycholenoidsäure, Ursodeoxycholsäure und Allocholsäure (5 α -Cholan-24-OIC-Säure) besteht.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder 8 bis 11, bei dem das Gallensäure-Derivat ein Cholyl-Lysyl-Fluoreszin (CLF) mit der Formel:



10 ist.

19. Verfahren nach Anspruch 18, bei dem das Gallensäure-Derivat ein Salz von Cholyl-Lysyl-Fluoreszein ist.

15 20. Verwendung eines Gallensäure-Derivats zur Bestimmung der funktionellen Aktivität des MRP2- und/oder MRP3-Efflux-Weges eines menschlichen oder tierischen Subjektes.

21. Verwendung einer Bestimmung der funktionellen MRP2- und/oder MRP3-Aktivität, die aus dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18 gewonnen wurde, zur Bestimmung der Leberfunktion eines menschlichen oder tierischen Subjektes.

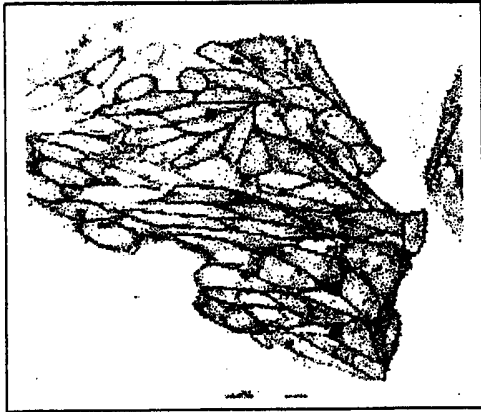
22. Verfahren zur Bestimmung der funktionellen Aktivität des MRP2- und/oder MRP3-Efflux-Weges eines menschlichen oder tierischen Subjektes im Wesentlichen so, wie dies hier beschrieben wurde.
- 5 23. Verwendung eines Gallensäure-Derivats zur Bestimmung der funktionellen Aktivität des MRP2- und/oder MRP3-Efflux-Weges eines menschlichen oder tierischen Subjektes im Wesentlichen so, wie dies hier beschrieben wurde.
- 10 24. Verfahren zur Bestimmung der funktionellen Aktivität des OATP1B3-Aufnahme-Weges eines menschlichen oder tierischen Subjektes, wobei das Verfahren Folgendes umfasst:
- (i) Bestimmen des Pegels eines Gallensäure-Derivats in dem Blut des menschlichen oder tierischen Subjektes zu einem vorgegebenen Zeitintervall nach der Einführung einer Menge des Gallensäure-Derivats in das Subjekt; und
- 15 (ii) Verwenden der im Schritt (i) gewonnenen Bestimmung zur Anzeige der funktionellen Aktivität des OATP1B3-Aufnahme-Weges des Subjektes.

20 Wien, 15. MAI 2009

Norgine BV
durch:

Patentanwälte
Mikšovsky & Pollhammer OG

Fig. 1A



CHO-NTCP

Fig. 1B

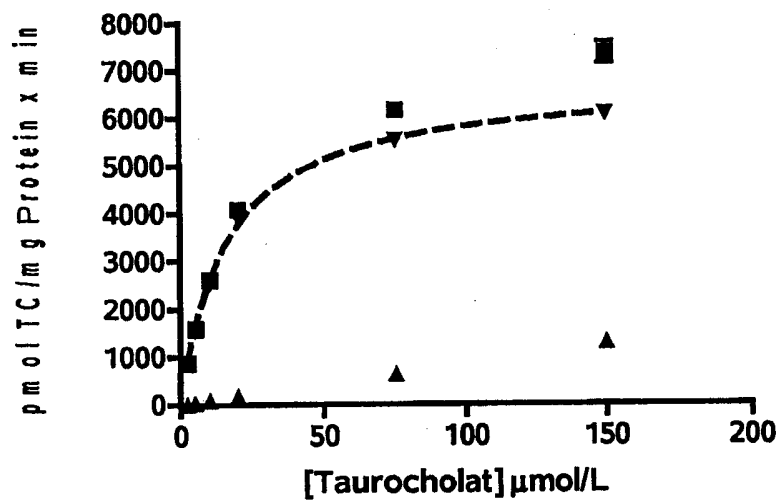


Fig. 2A

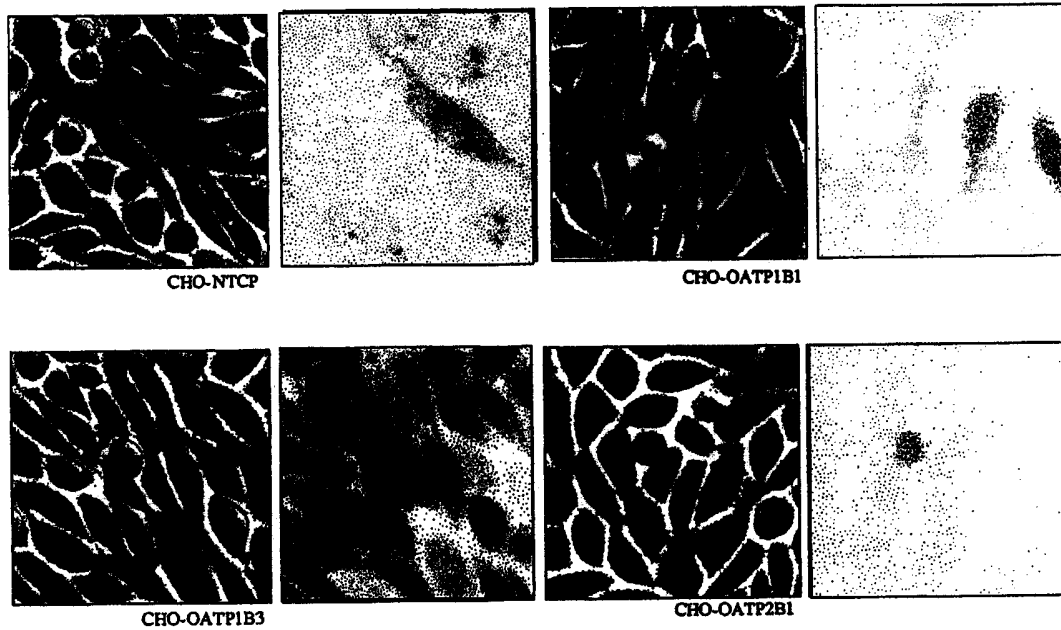


Fig. 2B

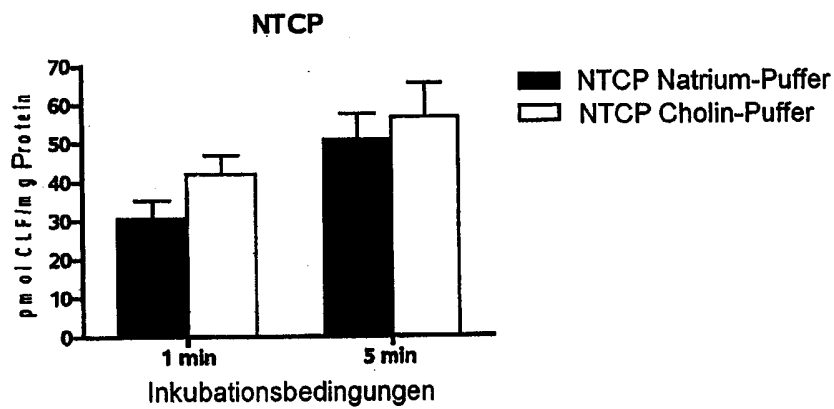


Fig. 2C

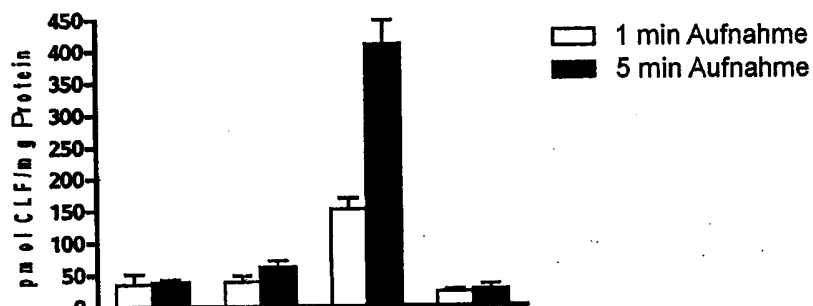


Fig. 2D

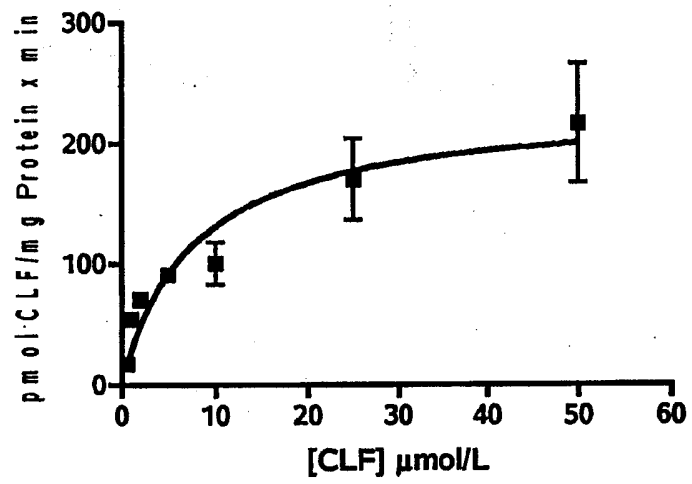


Fig. 3A

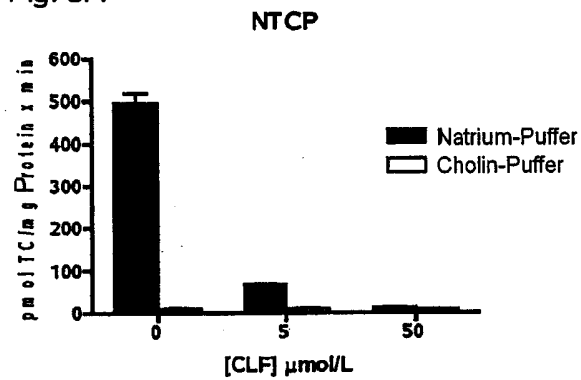


Fig. 3B

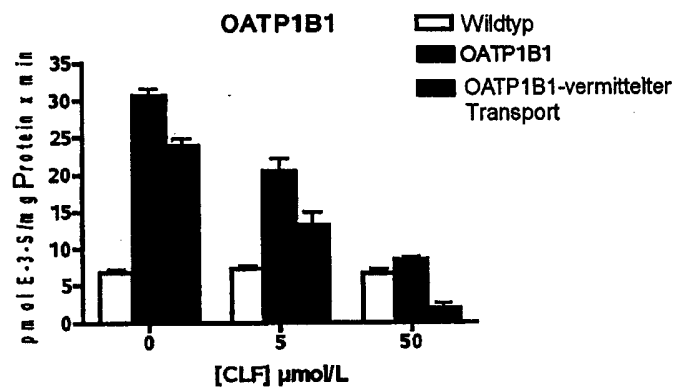


Fig 3C

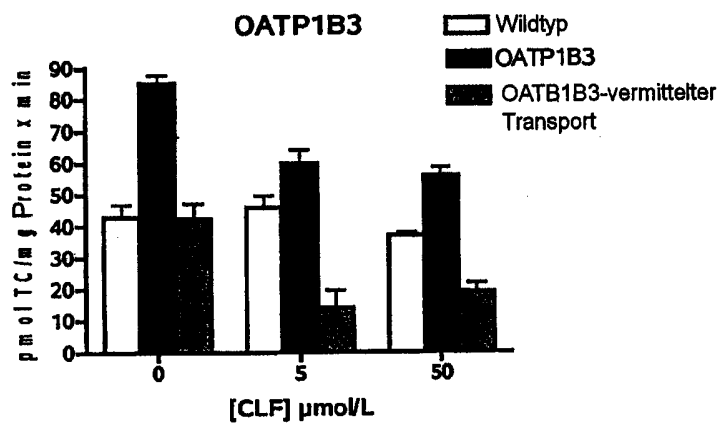


Fig. 3D

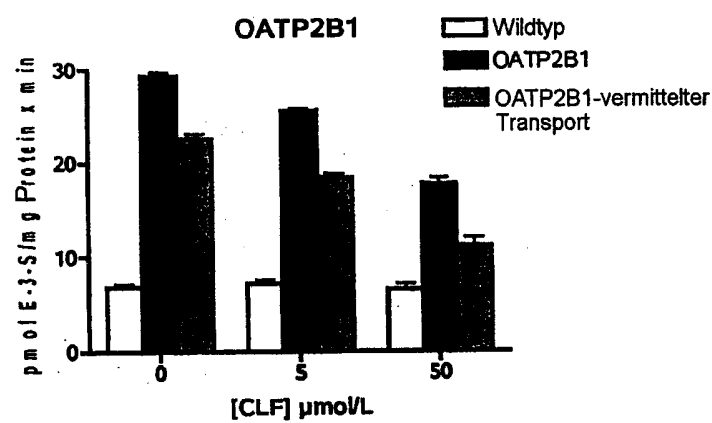


Fig. 4A

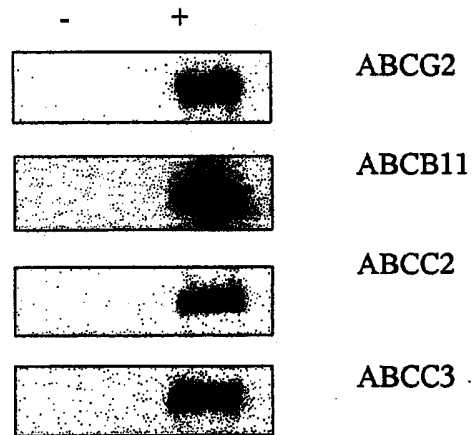


Fig. 4B

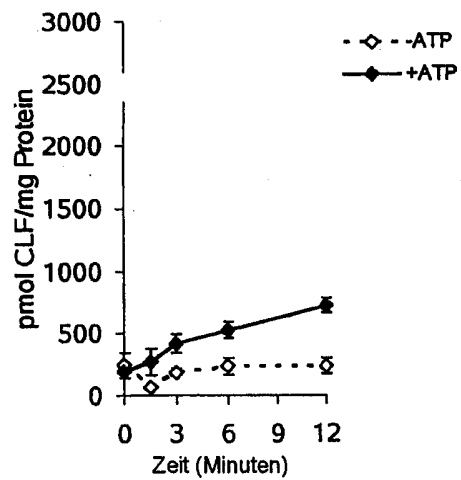


Fig. 4C

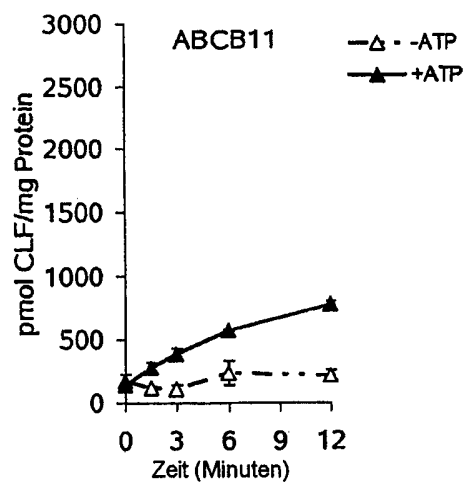


Fig. 4D

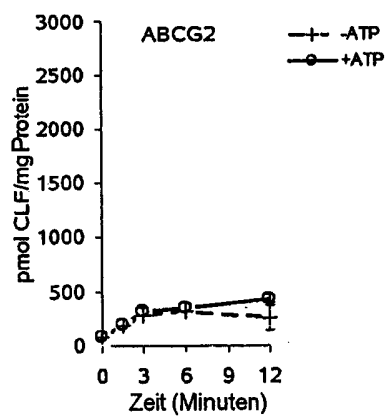


Fig. 4E

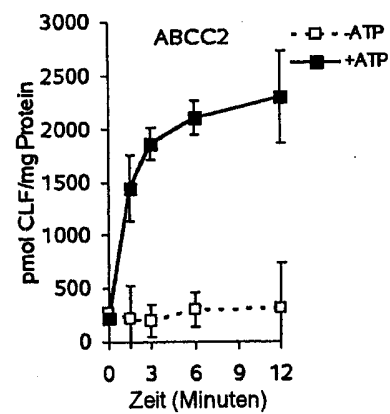


Fig. 4F

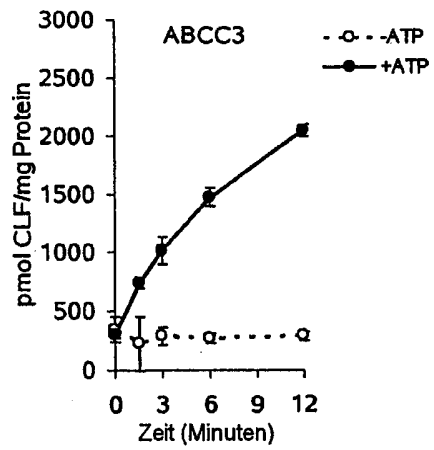


Fig. 4G

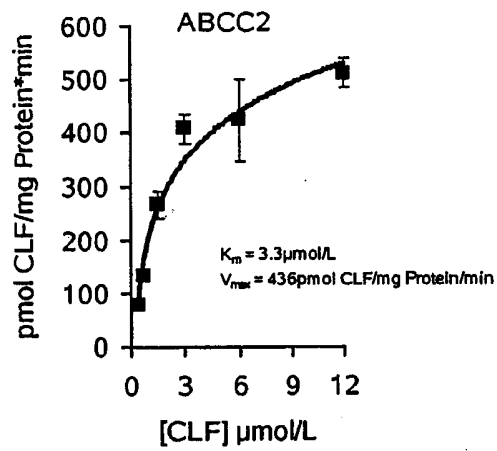


Fig. 4H

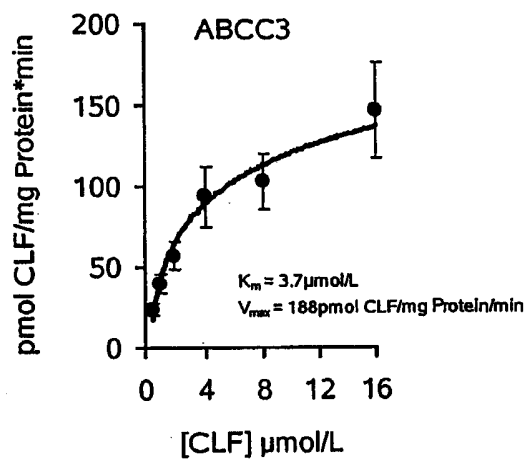


Fig. 5A

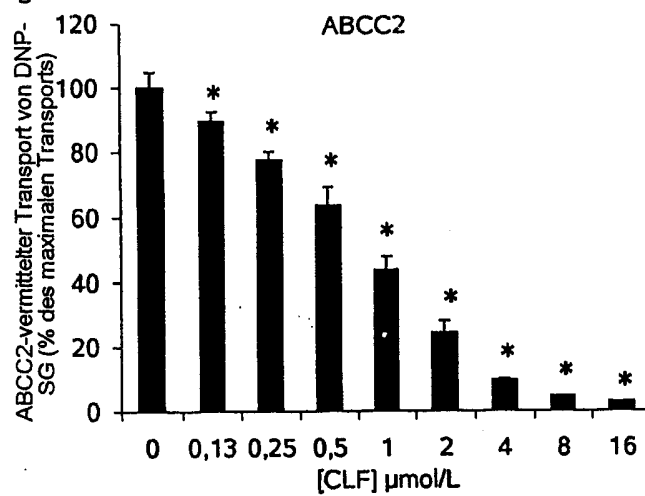


Fig. 5B

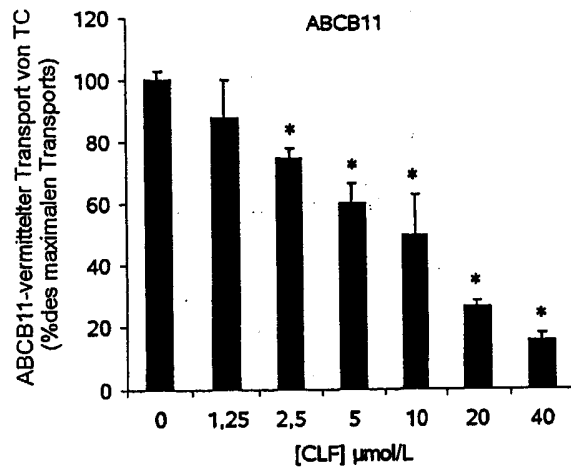


Fig. 6

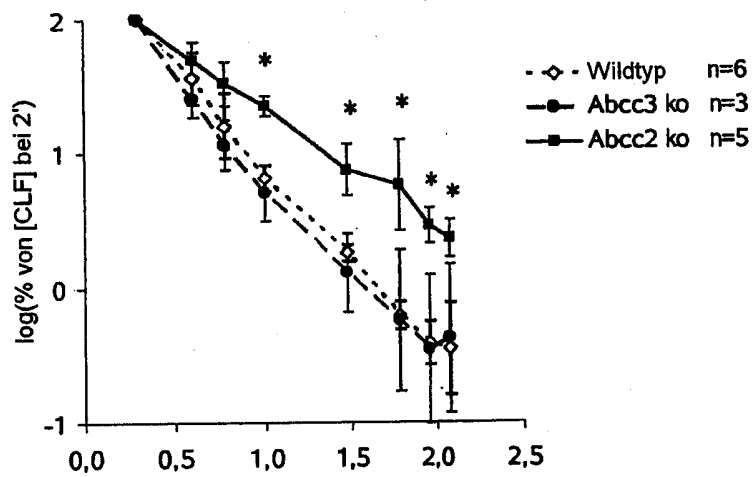


Fig. 7A

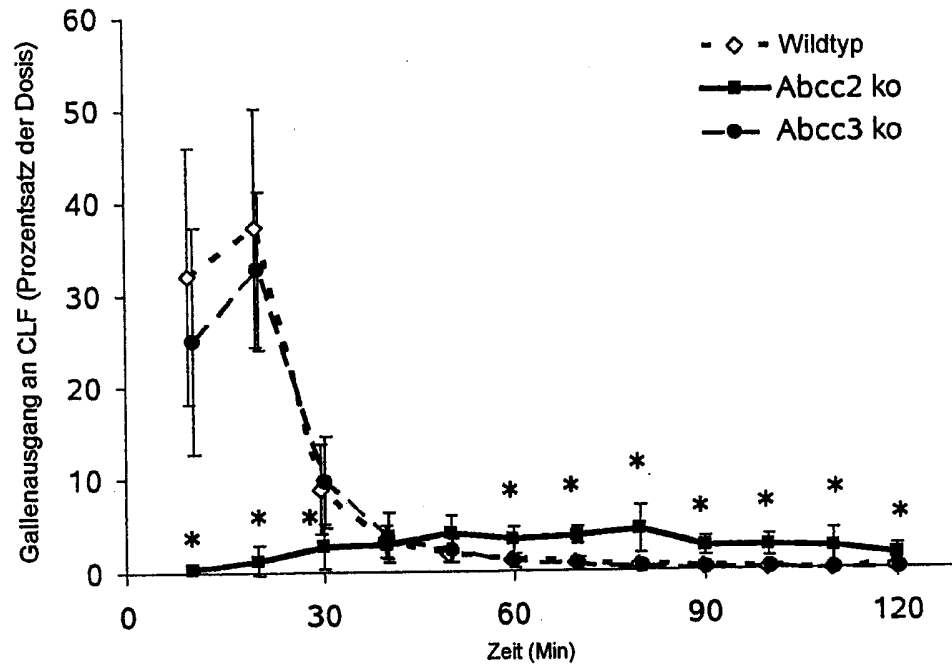


Fig. 7B

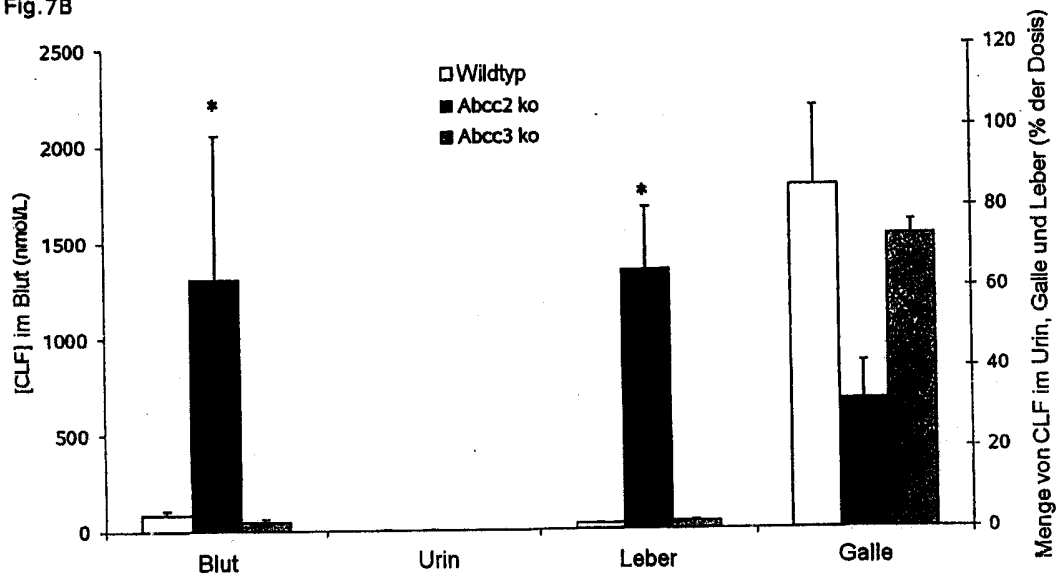
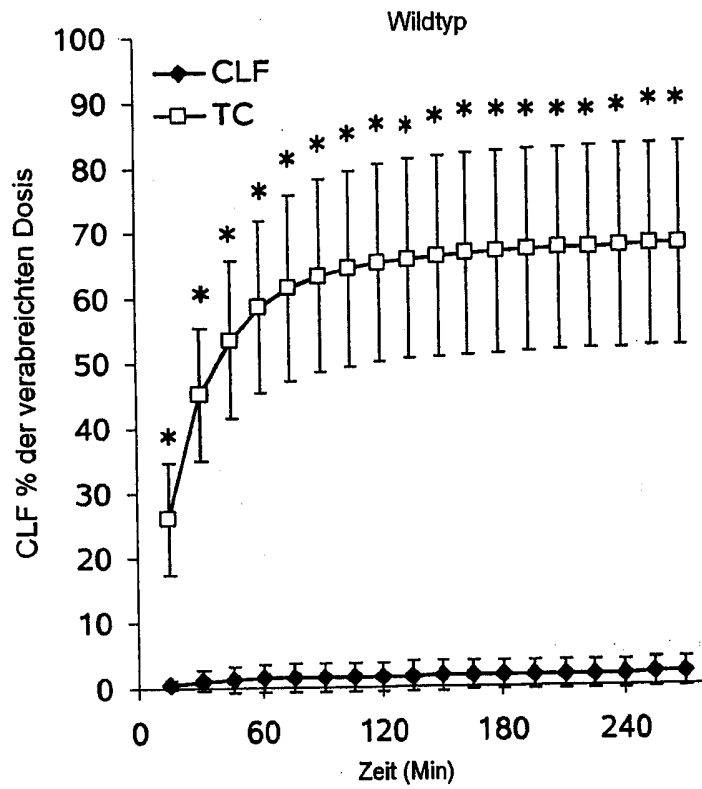


Fig. 8



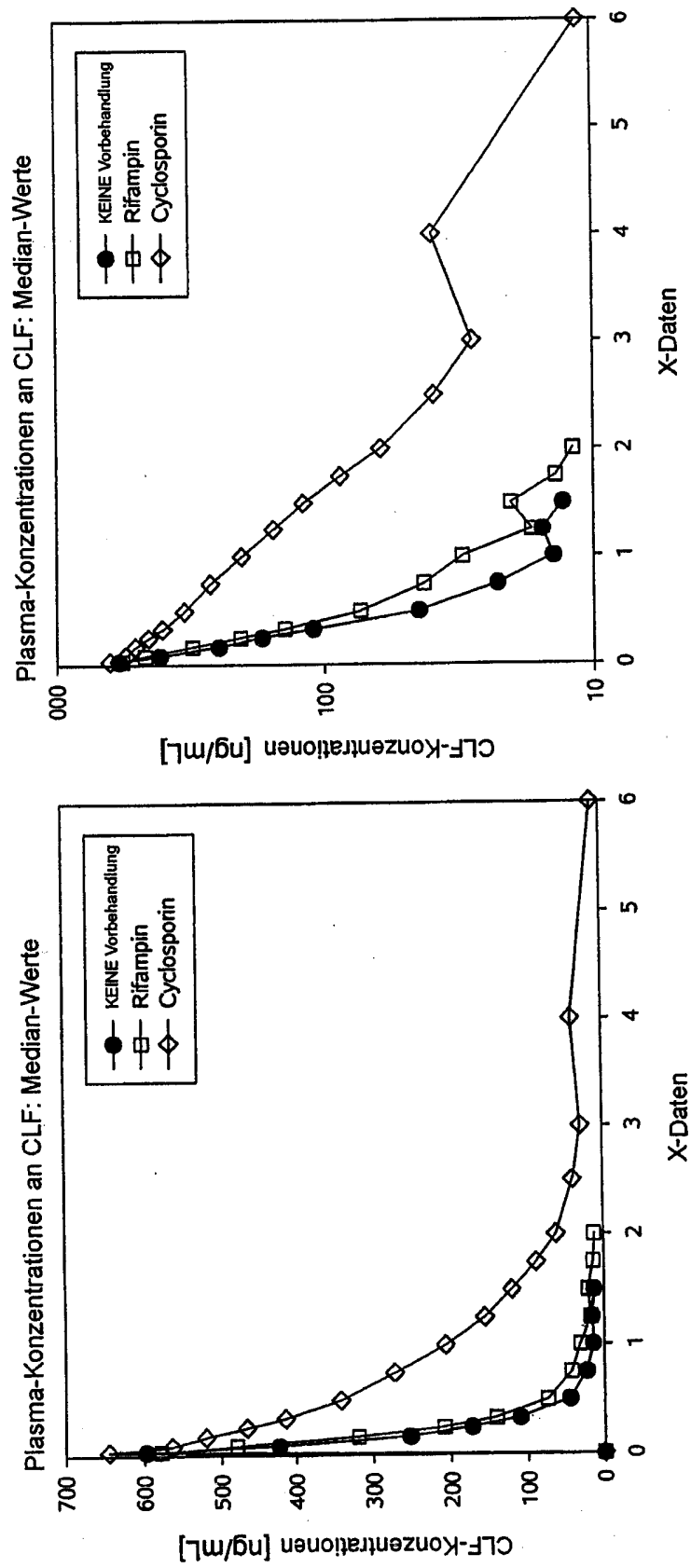


Fig. 9

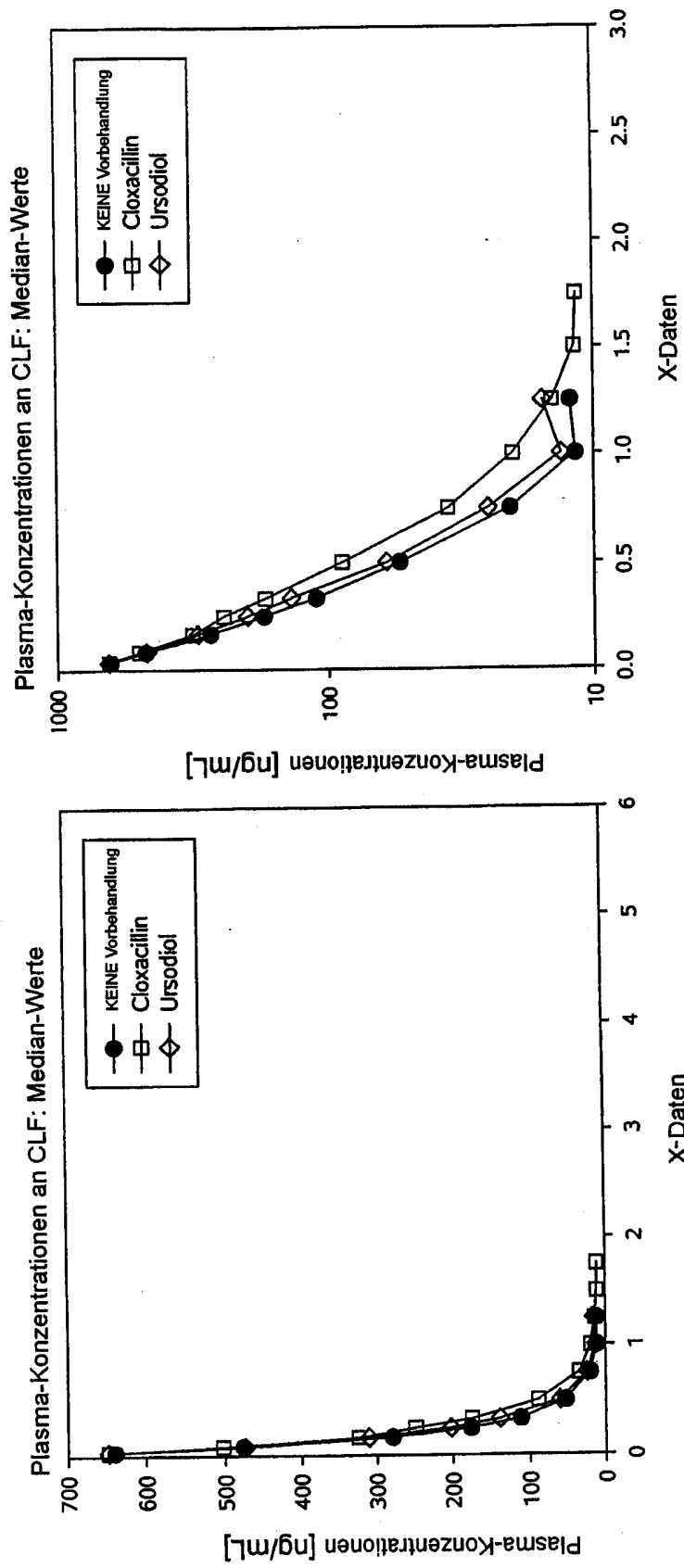


Fig. 10



Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß IPC ⁸ : G01N 33/49 (2006.01); G01N 33/68 (2006.01); C07J 9/00 (2006.01)
Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß ECLA: G01N 33/49, G01N 33/68V, C07J 9/00
Recherchierter Prüfstoß (Klassifikation): G01N
Konsultierte Online-Datenbank: Wpi, Epodoc, Embase, NPL, Medline, Pubmed, Internet,
Dieser Recherchenbericht wurde zu den am 15. Mai 2009 eingereichten Ansprüchen 1-21,24 erstellt.

Kategorie ⁷⁾	Bezeichnung der Veröffentlichung: Ländercode, Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum, Textstelle oder Figur soweit erforderlich	Betreffend Anspruch
X	WO1999/007325A1 (NORGINE LTD) 18. Februar 1999 (18.02.1999) <i>*Ganzes Dokument*</i> --	1-21,24
X	WO1997/006829A1 (UNIV BIRMINGHAM) 27. Februar 1997 (27.02.1997) <i>*Ganzes Dokument*</i> --	1-21,24
X	WO2000/001297A1 (HOEFT ANDREAS) 13. Jänner 2000 (13.01.2000) <i>*Seite 1 ff, Ansprüche*</i> --	1-21,24
A	US2005048464A1 (TIAN XIANBIN et al.) 3. März 2005 (03.03.2005) <i>*[0055], [0062], [0090], [0099]*</i> --	1-21,24
A	EP1290976A2 (PULSION MEDICAL SYS AG) 12. März 2003 (12.03.2003) <i>*Ganzes Dokument*</i> --	1-21,24
A	WO1998/040106A1 (MALLINCKRODT MEDICAL INC) 17. September 1998 (17.09.1998) <i>*Ganzes Dokument*</i> --	1-21,24

Datum der Beendigung der Recherche:
8. Oktober 2009

☒ Fortsetzung siehe Folgeblatt

Prüfer(in):
Dr. GÖRNER

⁷⁾ Kategorien der angeführten Dokumente:

- X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: der Anmeldungsgegenstand kann allein aufgrund dieser Druckschrift nicht als neu bzw. auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden.
- Y Veröffentlichung von Bedeutung: der Anmeldungsgegenstand kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren weiteren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist.

- A Veröffentlichung, die den **allgemeinen Stand der Technik** definiert.
- P Dokument, das von Bedeutung ist (Kategorien X oder Y), jedoch nach dem **Prioritätstag** der Anmeldung veröffentlicht wurde.
- E Dokument, das von besonderer Bedeutung ist (Kategorie X), aus dem ein **älteres Recht** hervorgehen könnte (früheres Anmeldedatum, jedoch nachveröffentlicht, Schutz ist in Österreich möglich, würde Neuheit in Frage stellen).
- & Veröffentlichung, die Mitglied der selben **Patentfamilie** ist.

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung: Ländercode, Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum, Textstelle oder Figur soweit erforderlich	Betreffend Anspruch
A	EP0298122A1 (SUMITOMO ELECTRIC INDUSTRIES) 11. Jänner 1989 (11.01.1989) <i>*Ganzes Dokument*</i>	1-21,24
A	WO2001/019238A1 (BO CHEN) 22. März 2001 (22.03.2001) <i>*Ganzes Dokument*</i>	1-21,24