

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610169336.6

[51] Int. Cl.

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/60 (2006.01)

G01N 21/25 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

A61B 5/00 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 7 月 4 日

[11] 公开号 CN 1991367A

[22] 申请日 1998.8.3

[21] 申请号 200610169336.6

分案原申请号 98810086.X

[30] 优先权

[32] 1997.8.12 [33] GB [31] 9716962.7

[71] 申请人 诺金欧洲公司

地址 荷兰阿姆斯特丹

[72] 发明人 C·O·米尔斯

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘冬 赵苏林

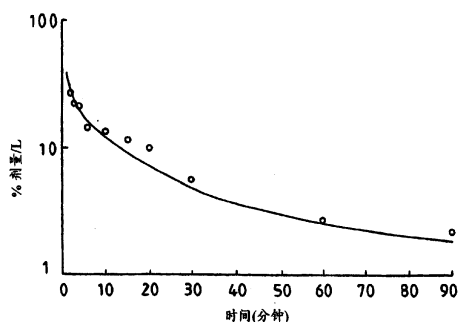
权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图 1 页

[54] 发明名称

肝功测试

[57] 摘要

测定患者肝功的方法，其中包括下述步骤：(i) 将有效量的有色或荧光胆汁酸衍生物静脉内给到患者体内后，处理流过患者肝脏并且在一系列时间间隔采集的一系列血样；和(ii) 通过下述步骤测定每一血样中所述胆汁酸衍生物的颜色或荧光强度：(a) 处理血样以获得含有所述胆汁酸衍生物的血浆，(b) 测定血浆中所述胆汁酸衍生物的颜色或荧光强度，和(c) 将在步骤(b)中获得的测定结果拟合，以获得血浆清除曲线，将所得血浆清除曲线与从具有已知肝功的个体中获得的血浆清除曲线进行比较，以测定出所述患者的肝功。



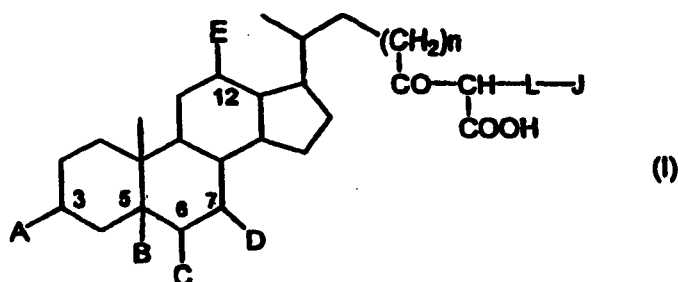
1. 有色或荧光胆汁酸衍生物在用于测定肝功的诊断药物制备中的应用。

2. 权利要求 1 的应用，其中所述诊断药物是静脉给药用诊断药物。

3. 权利要求 2 的应用，其中所述诊断药物是根据所述有色或荧光胆汁酸衍生物的血浆清除率测定肝功的诊断药物。

4. 权利要求 1-3 任一项的应用，其中所述胆汁酸衍生物包含 (a) 甾族部分，其具有 (i) 至少一个独立地选自未保护 3-羟基、未保护 7-羟基和未保护 12-羟基的未保护取代基、和 (ii) 通过酰胺键连接在该甾族部分侧链上的未保护羧基；和 (b) 将被靶向递送到肝脏中的活性部分，所述活性部分连接在 α -碳原子上，其中该 α -碳原子是相对于所述未保护羧基而言的。

5. 权利要求 1-3 任一项的应用，其中所述胆汁酸衍生物具有通式 (I) 所示结构：



其中 A 选自 α -OH 和 β -OH；B 选自 α -H 和 β -H；C 选自 -H、 α -OH 和 β -OH；或者 B 和 C 一起形成双键；D 选自 -H、 α -OH 和 β -OH；E 选自 -H、 α -OH 和 β -OH；L 是连接部分；J 是所述有色或荧光部分；且 n 是 0 或 1。

6. 权利要求 5 的应用，其中 J 是或包括荧光素、若丹明、或其它发荧光部分。

7. 权利要求 5 的应用，其中连接部分在其与活性部分 J 相连的末端是 N-末端，并且 L 选自：

- $(\text{CH}_2)_n\text{NH}$ ，其中 n 是 3 或 4，

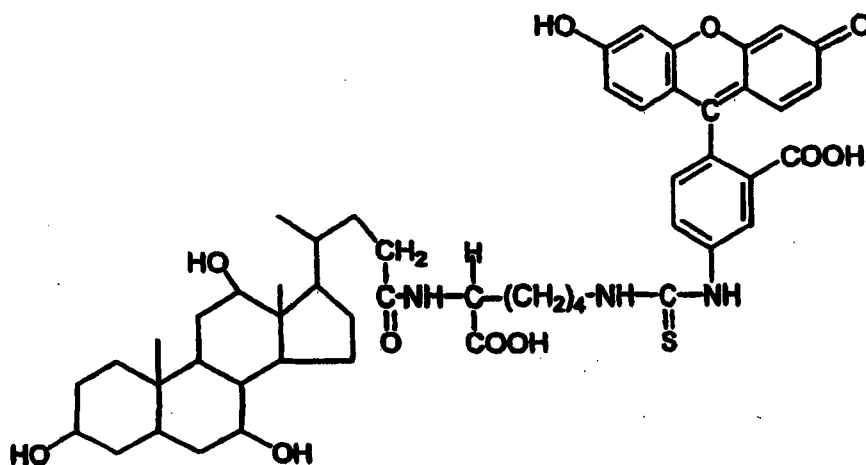
- $(\text{CH}_2)_4\text{NH}-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}-$ ，和 - $(\text{CH}_2)_2-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}-$ 。

8. 权利要求 5 的应用，其中通式 (I) 中的 -NH-CH(COOH)-L-衍

生自选自下述化合物的化合物：S-腺苷高半胱氨酸、S-腺苷蛋氨酸、S-氨基咪唑-4-甲酰胺、天冬酰胺、尸胺、胱胺、瓜氨酸、二氨基庚二酸、2,4-二氨基丁酸、半胱胺、谷酰胺、3-羟基犬尿氨酸、犬尿氨酸、腐胺和负霉素。

9. 权利要求 4 的应用，其中所述胆汁酸衍生物上的甾族部分基于选自下述化合物的酸：胆酸、鹅脱氧胆酸、脱氧胆酸、猪脱氧胆酸、猪胆酸、 α -鼠胆酸、 β -鼠胆酸、 ω -鼠胆酸、去甲胆汁酸、石胆酸、3 β -羟基胆烯酸、乌索脱氧胆酸和别胆酸。

10. 权利要求 4 的应用，其中所述荧光胆汁酸衍生物是具有下述结构的胆酰赖氨酰荧光素：



其中赖氨酰基和荧光素是通过硫代酰氨基-C(S)NH-连接在一起的。

肝功测试

本申请为分案申请，原申请的申请日为 1998 年 8 月 3 日，申请号为 98810086.X (PCT/GB98/02322)，发明名称为“肝功测试”。

技术领域

本发明涉及测定肝功的方法（即能在测试病人中鉴定肝脏疾病的性质）。

背景技术

摄取和胆汁分泌胆汁酸是重要的肝脏功能，在几种实质型和胆汁郁积型肝炎中，观察到血清胆汁酸浓度升高。已经有人显示，在患有不同肝病的患者中，在削弱的血浆清除率和肝脏机能不良之间有很好的相关性的天然胆汁酸[Korman 等人《新英格兰医学杂志》(New Eng. J. Med.) (1975) 292, 1205]和放射标记胆汁酸[Horak 等人《胃肠病学》(Gastroenterology) (1976) 71, 809]从血浆中的快速清除。P.-H. Ekdahl 等人[《原子光》(Atomlight) (1966) No. 56, 1-5 Coden, ATLGA4, XP002063328]公开了 C^{14} 标记的胆酸在肝功测试中的应用，其中是用匀浆的人肝脏样本来评价结合胆酸的能力。然而，所有这些方法都需要复杂的操作，并且在后两种情况下，需要使用放射性化合物。

J. M. Crawford 等人[《生物化学与生物物理学学报》(Biochim. Biophys. Acta), 1991, 1085(2), 223-34]公开了荧光丹酰化的胆汁盐衍生物在测定甾环中羟基对肝细胞转移和胆汁分泌的影响中的应用。

US 4848349 公开了用于诊断和研究的荧光标记的胆汁酸。其中一种所述应用是间接测定肝脏血流量，该应用包括，在一段时间内取样，并分析标记的胆汁酸从血浆中清除的速率以测得肝脏血流量。

US 4264514 公开了测定血清样本中结合胆汁酸水平的分析法，该测试是这样进行的：将血清样本与对血清样本内其中一种结合胆汁酸显特异性的抗血清、和含有已被标记或标志的相同结合胆汁酸的试剂混合，以将抗血清的抗体与样本中特异性结合胆汁酸和被标记的结合

胆汁酸结合；将结合有抗体的物质与未结合抗体的物质分离开，然后在任一分离部分中测定被标记衍生物的水平，这样就能通过与标准比较而测定出样本中特异性胆汁酸结合物的量。其中还公开了使用荧光化学品、放射性同位素或电子自旋共振化学品来标记或标志结合胆汁酸的可能性。然而，该方法操作起来相当昂贵并且复杂，因为对于样本中测定的每一种结合胆汁酸，它都既使用特异性抗血清，又使用特异标记的结合胆汁酸。

C.O. Mills 等人在《生物化学与生物物理学学报》(Biochimica et Biophysica Acta), 1115(1991), 151-156 中描述了对荧光胆汁盐-胆酰赖氨酰荧光素的研究，其中在大鼠中对胆汁动力学和肝提取进行了体内和体外研究。其中指出了胆酰赖氨酰荧光素的胆输出和肝提取与天然胆汁酸胆酰甘氨酸的胆输出和肝提取之间的类似性，并且提出，通过在肝病患者中采集血样，使用胆酰赖氨酰荧光素可以非侵入性地测定肝脏血流量。他们从这些研究中还提出，合适的胆汁酸可用于将药物靶向递送到肝脏中而同时保持其物理化学性质。

发明内容

本发明的目的是提供可克服或减轻上述缺点的测定肝功的方法。

本发明提供了测定患者肝功的方法，其中包括下述步骤：

(i) 将有效量的有色或荧光胆汁酸衍生物静脉内给药到患者体内后，处理（使用）流过患者肝脏并且在一系列时间间隔采集的一系列血样；和

(ii) 通过下述步骤测定每一样本中所述胆汁酸衍生物的颜色或荧光强度：

(a) 处理血样以获得含有所述胆汁酸衍生物的血浆，

(b) 测定血浆中所述胆汁酸衍生物的颜色或荧光强度，和

(c) 将在步骤(b)中获得的测定结果拟合，以获得血浆清除曲线，将所得血浆清除曲线与从具有已知肝功的个体中获得的血浆清除曲线进行比较，以测定出所述患者的肝功。

本发明还涉及有色或荧光胆汁酸衍生物在制备用于通过下述方法来测定肝功的诊断剂中的应用，其中所述方法包括下述步骤：

(i) 将有效量的含有所述有色或荧光胆汁酸衍生物的诊断剂静脉

内给到患者体内，

(ii) 进行完步骤(i)后，在一系列时间间隔采集流过患者肝脏的血样，和

(iii) 通过下述步骤测定每一样本中所述胆汁酸衍生物的颜色或荧光强度：

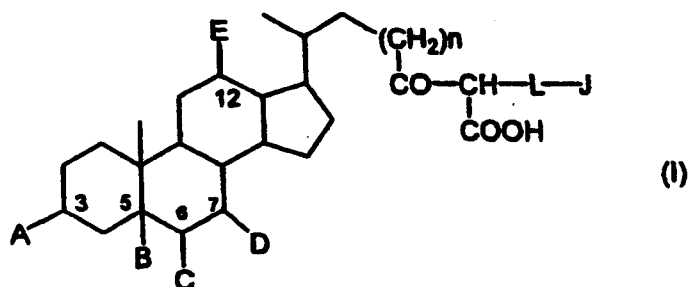
(a) 处理血样以获得含有所述胆汁酸衍生物的血浆，

(b) 测定血浆中所述胆汁酸衍生物的颜色或荧光强度，和

(c) 将在步骤(iii)(b)中获得的测定结果拟合，以获得血浆清除曲线，将所得血浆清除曲线与从具有已知肝功的个体中获得的血浆清除曲线进行比较，以测定出所述患者的肝功。

本发明胆汁酸衍生物优选包含具有未保护的 3-羟基、7-羟基或 12-羟基取代基或所述取代基的任意组合、和通过酰胺连接在该甾族部分侧链上的未保护羧基的甾族部分，和将被靶向递送到肝脏中的活性部分，所述活性部分连接在 α -碳上，其中该 α -碳是相对于所述未保护羧基而言的。

所述化合物优选具有通式(I)所示结构：



其中 A 是 α -OH 或 β -OH；B 是 α -H 或 β -H；C 是-H、 α -OH 或 β -OH；或者 B 和 C 一起形成双键；D 是-H、 α -OH 或 β -OH；E 是-H、 α -OH 或 β -OH；L 是连接部分；J 是所述有色或荧光部分；且 n 是 0 或 1。

J 优选是或包括荧光素、若丹明、或其它发荧光部分。

连接部分在其与活性部分 J 相连的末端优选是 N-末端，L 可以是：

$-(CH_2)_nNH$ ，其中 n 是 3 或 4，

$-(CH_2)_4NH-(CH_2)_3NHC(=NH)NH-$ ，或

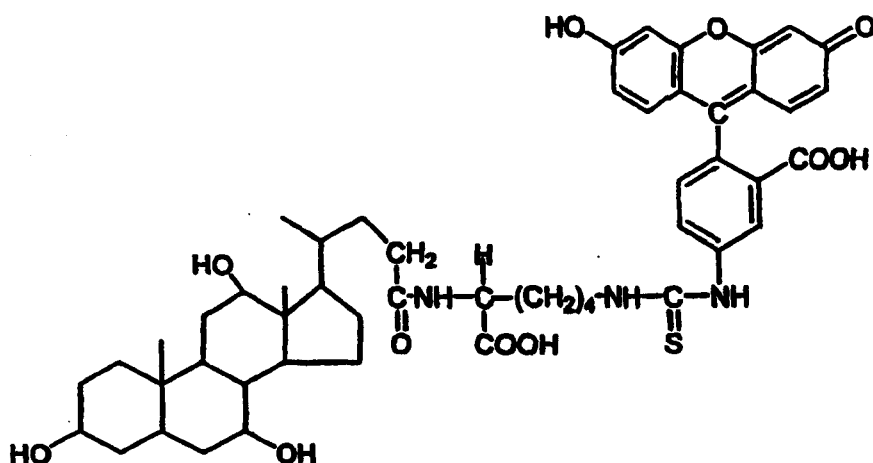
$-(CH_2)_2-CH(OH)CH_2NH-$ 。

或者， $-NH-CH(COOH)-L-$ 可以衍生自 S-腺苷高半胱氨酸、S-腺苷蛋

氨酸、S-氨基咪唑-4-甲酰胺、天冬酰胺、尸胺、胍胺、瓜氨酸、二氨基庚二酸、2,4-二氨基丁酸、半胱胺、谷酰胺、3-羟基犬尿氨酸、犬尿氨酸、腐胺或负霉素。或者，当活性部分丁有一个氨基和/或丁具有疏水性时，可使用酸性氨基酸来代替上述化合物。

本发明胆汁酸衍生物的甾族部分优选基于胆酸、鹅脱氧胆酸、脱氧胆酸、猪脱氧胆酸、猪胆酸、 α -鼠胆酸(muricholic acid)、 β -鼠胆酸、 ω -鼠胆酸、去甲胆汁酸、石胆酸、3 β -羟基胆烯酸、乌索脱氧胆酸、别胆酸(5 α -胆-24-烷酸)等。

本发明荧光胆汁酸衍生物最优选为具有下述结构的胆酰赖氨酰荧光素(CLF):



其中赖氨酰基和荧光素是通过硫代酰氨基-C(S)NH-连接在一起的。过去该化合物简称为“CLF”，在下文中，“CLF”就代表该化合物。

在动物模型中，胆汁酸的赖氨酰荧光素类似物表现出包括肝摄取在内的与天然胆汁酸很相似的几种物理和生理特性[Saraswat 等人的 Gut (1995) 36 (Suppl. 1), A18]。

本发明方法的步骤(a)可通过将样本离心来完成。

对于荧光胆汁酸衍生物，步骤(a)优选还包括将血蛋白从血浆中分离出，例如通过将甲醇加到血浆中来使蛋白沉淀，然后再离心来分离出血蛋白。如果不分离出血蛋白，它们就会与荧光胆汁酸衍生物形成复合物，并熄灭荧光，因此就会使荧光测定结果人为降低和易变。

在步骤(a)和(b)之间，可能还需要包括将血浆稀释的步骤。

优选将本发明有色或荧光胆汁酸衍生物以盐水溶液的形式注射，

所述溶液的体积优选为 $1\text{ cm}^3 - 10\text{ cm}^3$ 。

剂量优选为至少 0.02 mg/kg 体重，优选为 $0.02 - 0.5\text{ mg/kg}$ 体重。

已经发现，在一组肝脏正常的人、一组肝硬化患者、和一组脂肪肝患者之间，在注射 CLF 后 30 分钟采集的样本中，血清荧光强度表现出最高的差别值。因此，测定注射后约 30 分钟采集的样本，并与用至少一个标准所获得的血清荧光强度值进行比较，以获得肝功指示可能是特别有利的。

因此，另一方面，本发明提供了测定患者肝功的方法，其中包括下述步骤：

(i) 将有效量的有色或荧光胆汁酸衍生物静脉内给药到患者体内后，处理（使用）流过患者肝脏并且在预定时间间隔采集的血样；和

(ii) 通过下述步骤测定该样本中所述胆汁酸衍生物的颜色或荧光强度：

(a) 处理血样以获得含有所述胆汁酸衍生物的血浆，

(b) 测定血浆中所述胆汁酸衍生物的颜色或荧光强度，和

(c) 将在步骤 (b) 中获得的测定结果与至少一个标准进行比较，以测定出所述患者的肝功。

除了步骤 (c) 以外，所采用的操作可以与在包括处理与测定在给药后一系列时间间隔采集的多个样本的方法中使用的操作相同。

附图说明

下面将通过关于附图的实施例来描述本发明的实施方案，其中：

附图 1 表示，健康志愿者的胆酰赖氨酰荧光素（CLF）血浆清除曲线，

附图 2 表示，健康个体和患有不同原因肝脏机能不良的患者的 CLF 血浆清除曲线。

具体实施方式

按照在别的文献中 [Mills 等人的《生物化学与生物物理学学报》(Biochi. Biophys. Acta), (1991)1115, 151] 描述的方法合成 CLF，将其灭菌并测试是否存在热原。

用 6 个年龄在 30 - 53 岁之间的健康志愿者（1 名女性，5 名男性）

进行研究。禁食过夜后让受试者仰卧。采集出最初的基础血样后，用 15 秒将 CLF 以 0.02 mg/kg 体重(b.w.)的剂量在生理盐水中静脉注射。在第 2、3、4、6、10、15、20、30、60 和 90 分钟，从肘前对面静脉中采集出静脉血样，置于凝胶和锂肝素容器（商品名为 Vacutainers，由 Becton Dickinson Vacutainer Systems 出售）中。然后将血样离心，取出 0.5 ml 等分试样的血浆，并加到 3.5 ml 甲醇中以沉淀出血浆蛋白，然后再次离心。用甲醇将上清液（1 ml）稀释至 3 ml，然后用分光计（Perkin Elmer LS5B Luminescence Spectrometer）测定荧光度。

从表示下述公式的校准曲线中推出 CLF 浓度 ($\mu\text{g/ml}$):

$$y = 2566x - 52.6$$

其中 y 代表在 490 nm 激发波长处（在 520 nm 发射）测定的以荧光单位表示的荧光度，x 代表以 $\mu\text{g/ml}$ 为单位的 CLF 的浓度。由具有已知 CLF 浓度的溶液的荧光度测定值将校准曲线校准，然后进行线性回归分析。

将以百分之给药剂量/升血浆表示的非线性血浆清除曲线拟和成三指数模型。用下述公式计算第一相 ($t_{1/2}$ 第一相)、第二相 ($t_{1/2}$ 第二相) 和第三相 ($t_{1/2}$ 第三相) 的半衰期 ($t_{1/2}$ 时间):

$$t_{1/2 \text{ 第一相}} = 0.693/k_1 \quad t_{1/2 \text{ 第二相}} = 0.693/k_2 \quad t_{1/2 \text{ 第三相}} = 0.693/k_3$$

其中 k_1 、 k_2 和 k_3 分别是用下述公式计算的:

$$C_t = Ae^{-k_1t} + Be^{-k_2t} + Ce^{-k_3t}$$

其中:

C_t 是在时间 t 时 CLF 的浓度,

A、B 和 C 是在 $t = 0$ 时每一清除相的截距。

k_1 、 k_2 和 k_3 是 3 个清除相的分数清除速率。

所得血浆清除曲线如附图 1 所示。

CLF 的活性部分（胆酰甘氨酸和荧光素）在人体中已有广泛应用。胆酰甘氨酸是人体内的天然初级胆汁盐，静脉内注射荧光素血管造影术通常用在眼科检查中。本发明的优点在于，能使用非常少量的 CLF。作为比较，在静脉注射剂中常规应用的甘氨酸胆酸盐例如 Vit K₁ 或安定的剂量比可在本发明中使用的 CLF 的剂量要高约 300 倍，荧光素在眼

底荧光素血管造影术中的剂量要高 400 倍。

CLF 的血浆清除曲线呈现成 3 个清除相。第一清除相、第二清除相和第三清除相的 $t_{1/2}$ 分别为 1.7 ± 0.9 分钟、 6.7 ± 1.6 分钟和 68 ± 17 分钟。在 Cowen 等人[《胃肠病学》(Gastroenterology) (1975) 68, 1567]报道的放射标记的胆酰甘氨酸的数据中, 第一和第二指数的 $t_{1/2}$ 分别是 1.7 ± 0.1 分钟和 7 ± 0.1 分钟。其中是将胆酰甘氨酸拟合成基于双指数模型的清除曲线, 都是现在认为采用三指数分析更合适 [Engelking 等人的《临床科学》(Clinical Science) (1979) 57, 499]。当以百分之给药剂量/升血浆表示时, 在 90 分钟时 CLF 的血浆保留值是 2.2%。

为了进一步测定所选剂量的适当性以及 CLF 的安全性, 在 5 个健康志愿者中, 注射 25 倍剂量的 CLF (0.5 mg/kg 体重)。注射后, 包括基本肝功测试的血清生化、电解质以及肾功能没有显著改变。表 1 表示了注射高剂量的 CLF 之前和之后, 标准肝功测试值和脲与肌酸酐的血浆浓度。虽然注射 CLF 后, 血浆碱性磷酸酶水平有一致降低, 但是这种差异不具有统计学上的显著意义 ($p = 0.06$)。

表 1. 在将 CLF 以 0.5 mg/kg 体重的剂量注射到 5 个健康个体之前和之后的肝功测试

测试	注射 CLF 之前	注射 CLF 之后	差异
胆红素 ($\mu\text{M/L}$)	10	11	NS ³
AST ¹ (U/L)	17	16	NS
AlkP ² (U/L)	148	134	$p = 0.06$
白蛋白 (g/L)	45	42	NS
脲 (mM/L)	4.4	4.3	NS
肌酸酐 ($\mu\text{M/L}$)	94	89	NS

1: AST = 天冬氨酸转氨酶

2: AlkP = 碱性磷酸酶

3: NS = 不显著

用上述 25 倍的增加剂量所获得的清除曲线证实, 肝脏清除率没有改变。这反映出 Korman 等人 (参见上文) 所观察到的天然胆汁酸的性质。然而, CLF 在本发明中所用的剂量远低于 Korman 等人所用的天然胆汁酸的剂量 (0.02 - 0.5 mg/kg 体重对 5 mM/kg 体重 (≈ 2.4 g/kg 体重))。按照 Thiordleifsson 等人 [Gut (1977) 18, 697] 提出的方法计

算出的 CLF 的分布体积为 2214 ± 147 ml, 这与其它人[Gilmore 等人的 Gut (1978) 19, 1110]所报道的放射标记的胆酰甘氨酸的分布体积值相似。

通过将第 60 分钟的荧光度与第 10 分钟的荧光度进行比较, 计算以百分比表示的上述结果。对于放射标记的胆酸 (Horak 等人, 参见上文), 健康志愿者在第 60 分钟的血浆保留值是 $8 \pm 1\%$, 而随后去世的暴发性肝衰竭 (FHF) 患者在第 60 分钟的血浆保留值是 71%, 随后仍幸存的 FHF 患者在第 60 分钟的血浆保留值是 60% (这两组之间的差异具有统计学上的显著意义)。对于本发明, 60 分钟后 $13.1 \pm 1.6\%$ 的荧光度百分比类似于在 Horak 的研究工作中从健康志愿者中获得的数据。表明 CLF 血浆清除与天然胆汁酸血浆清除非常类似的这些数据中可让人想起, 在健康个体和肝脏机能不良患者之间, CLF 的血浆清除率有显著性差异。附图 2 所示数据证实了这一点。附图 2 所示清除曲线表示健康个体 (i)、脂肪肝患者 (ii)、肝硬化患者 (iii) 和近期肝移植患者 (iv) (肝脏移植后 5 天) 的不同 CLF 清除速率。因此, 本发明不仅提供了测试患者肝功的有用方法, 而且还能诊断肝脏机能不良的病因。

在另一项实验中, 将 CLF 以 0.02 mg/kg 体重的剂量对下述 45 个受试者静脉给药: 肝硬化患者 ($n = 24$)、脂肪肝患者 ($n = 12$) 和 9 个健康志愿者。注射前开始采集血样, 在 60 分钟期间内每 10 分钟采集 1 次。通过荧光分光计测定血浆荧光度, 并比较每一组中在实验期间的剩余荧光度。每一注射前都进行常规肝功测试 (rLFT's)。

结果发现, 与健康受试者相比, 在肝硬化患者和脂肪肝患者中, CLF 血浆清除率显著降低。注射 CLF 后 30 分钟 ($\text{CLF}_{30 \text{ 分钟}}$), 在各分析组之间血清荧光度有最大差别值 (肝硬化患者对脂肪肝患者 - $p < 0.0001$; 肝硬化患者对健康对照组 - $p < 0.0001$; 脂肪肝患者对健康对照组 - $p < 0.0025$)。在检查脂肪肝患者的轻度异常的肝功方面, $\text{CLF}_{30 \text{ 分钟}}$ 比常规 LTF's 更灵敏。没有观察到副作用或副作用。

该 CLF 测试在这 3 个分析组之间区别得很清楚, 并且在检查轻度异常的肝功方面比 rLTF's 更灵敏。该测试安全、易于操作和分析, 因此是有用的和方便的肝功动力学测试。

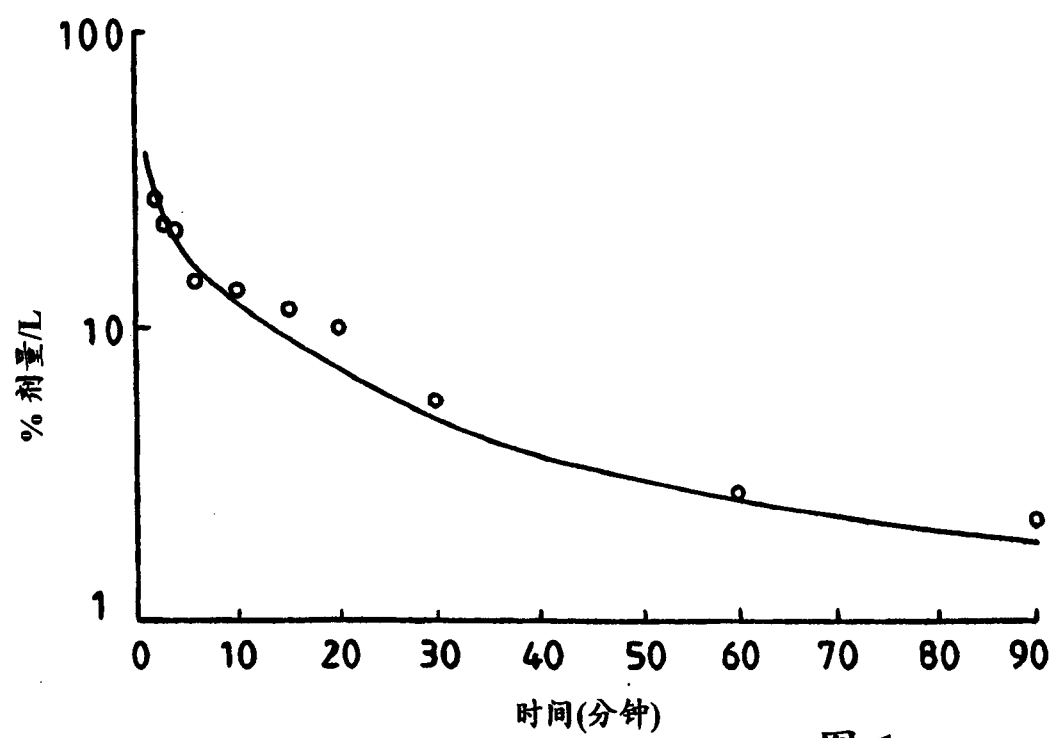


图 1

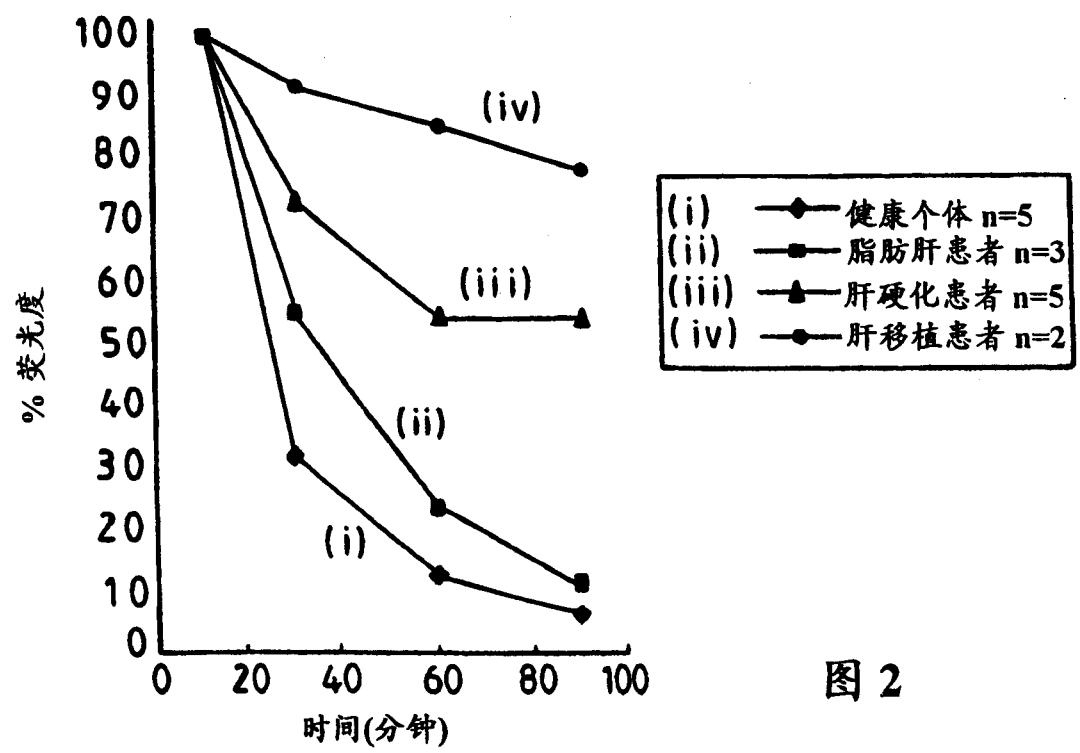


图 2