

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2015 年 2 月 12 日 (12.02.2015)



(10) 国际公布号
WO 2015/018176 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07D 221/14 (2006.01) *G01N 21/64* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) *A61K 31/473* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2014/000333
- (22) 国际申请日: 2014 年 3 月 27 日 (27.03.2014)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201310338266.2 2013 年 8 月 6 日 (06.08.2013) CN
- (71) 申请人: 中国科学院大连化学物理研究所 (DALIAN INSTITUTE OF CHEMICAL PHYSICS, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国辽宁省大连市沙河口区中山路 457 号杜伟, Liaoning 116023 (CN)。
- (72) 发明人: 杨凌 (YANG, Ling); 中国辽宁省大连市沙河口区中山路 457 号, Liaoning 116023 (CN)。 崔京南 (CUI, Jingnan); 中国辽宁省大连市甘井子区凌工路 2 号, Liaoning 116024 (CN)。 葛广波 (Ge, Guangbo); 中国辽宁省大连市沙河口区中山路 457 号, Liaoning 116023 (CN)。 吕侠 (LV, Xia); 中国辽宁省大连市沙河口区中山路 457 号, Liaoning 116023 (CN)。 冯磊 (FENG, Lei); 中国辽宁省大连市甘井

子区凌工路 2 号, Liaoning 116024 (CN)。 刘兆明 (LIU, Zhaoming); 中国辽宁省大连市沙河口区中山路 457 号, Liaoning 116023 (CN)。

- (74) 代理人: 沈阳晨创科技专利代理有限责任公司 (SHENYANG CHENCHUANG TECHNICAL PATENT AGENT LTD); 中国辽宁省沈阳市浑南新区沈营路 3 号瑞宝国际花苑 2 号楼 1 单元 5-1 室, Liaoning 110013 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,

[见续页]

(54) Title: SPECIFIC FLUORESCENT PROBE OF GLUCURONOSYLTRANSFERASE UGT1A1 AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 葡萄糖醛酸转移酶 UGT1A1 的特异性荧光探针及其应用

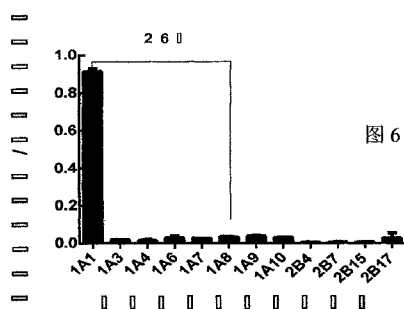
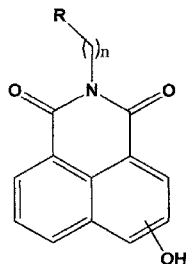


图 6 / Fig. 6



(1)

(57) Abstract: Disclosed is the use of a compound as shown by formula (1) for a specific fluorescent probe of glucuronosyltransferase UGT1A1.

(57) 摘要: 一种式 (1) 所示化合物用于葡萄糖醛酸转移酶 UGT1A1 的特异性荧光探针的应用。

WO 2015/018176 A1



RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, **本国际公布:**

CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, — 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
TG)。

根据细则 4.17 的声明:

— 发明人资格(细则 4.17(iv))

说明书

葡萄糖醛酸转移酶 UGT1A1 的特异性荧光探针及其应用

技术领域

本发明属于生物医药技术领域，具体涉及一种葡萄糖醛酸转移酶 UGT1A1 的特异性荧光探针底物及其应用。

背景技术

葡萄糖醛酸转移酶（Uridine diphosphate-glucuronosyltransferase, UGT）超家族是机体内最重要的 II 相药物代谢酶，以 S_N2 反应机制催化亲脂性化合物与辅因子尿苷二磷酸葡萄糖醛酸（UDPGA）的葡萄糖醛酸（GA）结合，从而增加底物的亲水性，使其能更有效地从尿或胆汁中排出体外。通常 UGT 酶介导的葡萄糖醛酸结合反应是机体的一个重要的解毒过程。许多内源性化合物，诱变剂，药物，以及它们的代谢产物都是 UGTs 的底物，如内源性物质，如胆红素和雌二醇，以及外源性物质 SN-38 和亚硝胺类化合物的脱毒都通过葡萄糖醛酸化途径来实现。

人体的 UGT 酶可以分为 4 个家族：UGT1, UGT2, UGT3 和 UGT8。其中 UGT1 和 UGT2 家族各成员在内源性及外源性物质代谢中发挥了重要作用。目前，已被鉴定的人源 UGT 亚型有 18 个，其中包括 UGT1A 中的 9 个（UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A5, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9, 1A10）以及 UGT2B 中的 7 个亚型（UGT2B4, 2B7, 2B10, 2B15 和 2B17）。值得注意的是，UGT1A1, 1A4, 1A6, 1A9 在人肝脏中都有中等程度的表达，但 UGT1A3 在人肝脏中表达量极低，同时 UGT1A7,

UGT1A8 及 UGT1A10 仅在人肠道中表达。

UGT1A1 是催化毒性内源性物质胆红素葡萄糖醛酸化的酶，它介导的葡萄糖醛酸化反应是胆红素排除体外的必须步骤，和人体健康的关系最为密切。已有国内外大量研究证实 UGT1A1 的基因突变使得胆红素葡萄糖醛酸化的能力全部或部分的缺失进而影响胆红素的代谢，从而导致严重的高胆红素血症如 Crigler-Najjar 综合症和 Gilbert's 综合症 (Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.2000. 40:581-616)。同时 UGT1A1 也是多种临床药物，如 Etoposide、SN-38 (抗癌药物伊立替康的活性代谢产物) 的主要代谢酶，且 UGT1A1 的活性缺失已被证实和伊立替康的毒性相关 (J.Clin.Oncol.2006. 24:4534-8)。因此，开展 UGT1A1 酶活的个体差异研究对于临床个性化安全用药有着重要意义。此外，部分临床药物会抑制 UGT1A1，从而减少机体对胆红素的代谢清除能力，引起血液中胆红素的上升，进而导致高胆红素血症或加剧 Crigler-Najjar 综合症和 Gilbert's 综合症患者的病情。目前国内外制药巨头在药物开发过程中，需要在体外评估各候选新药抑制 UGT1A1 的能力。因此，开发高效、灵敏的特异性 UGT1A1 探针底物对于高效筛选 UGT1A1 抑制剂，及定量测定生物体系内 UGT1A1 的活性至关重要。

由于 UGT1A 亚家族中的各亚型具有相似的氨基酸序列，其底物通常相互交叠，各亚型酶鲜有特异性的底物。目前，已报道的 UGT1A1 的探针底物有 3 个，分别是胆红素，雌二醇和依托泊甙。虽然胆红素的单酶选择性较高，但其化学稳定性差、检测灵敏度低。而雌二醇和

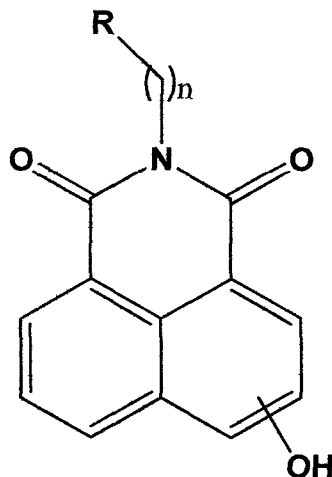
依托泊甙的单酶选择性并不高且需借助 LC-MS/MS 等昂贵分析仪器才能实现产物的定量分析。因此，开发选择性高的 UGT1A1 的特异性荧光探针底物及其配套的高通量检测方法具有重要的实用价值。

本发明中 1,8-萘酰亚胺类化合物具有代谢产物单一(仅生成一个单葡萄糖醛酸化产物)、代谢酶高选择性(主要由 UGT1A1 代谢)、底物及代谢产物易于检测且灵敏度高等特点。

发明内容

本发明的目的在于提供一种葡萄糖醛酸转移酶 UGT1A1 的特异性荧光探针底物及其应用，该特异性荧光探针底物和葡萄糖醛酸化产物的荧光发射波长具有明显差异，且产物的荧光量子产率更高更易检测。利用该探针反应可对多种生物体系中 UGT1A1 的分布和功能进行定量评价。

本发明提供了一种葡萄糖醛酸转移酶 UGT1A1 的特异性荧光探针底物，该探针底物可被 UGT1A1 特异性催化生成相应的 O-葡萄糖醛酸化产物，其结构通式如式(1)所示，该底物具有 1,8-萘酰亚胺类结构，其中 R 为-COOH、苯甲酸、-SO₃H 等有机酸性基团中的一种，n 为 2~10。



式 (1)

本发明还提供了所述葡萄糖醛酸转移酶 UGT1A1 的特异性荧光探针底物的应用，采用上述式 (1) 化合物作为 UGT1A1 亚酶的特异性底物，进行葡萄糖醛酸化结合反应，通过定量检测单位时间内的底物消除率或其葡萄糖醛酸化产物的生成率来定量测定不同生物体系（包括重组表达 UGT1A1 单酶、人或动物组织制备液、各类组织细胞等生物体系）中 UGT1A1 的活性；具体测定方法为：

——体系中以 1,8-萘酰亚胺类化合物作为特异性探针底物；底物浓度选择 $1/10 \sim 10 K_m$ ；单点测定时底物浓度优选 K_m 。

——在 Tris-HCl 缓冲液中，反应温度为 20°C 至 60°C 之间，优选 37°C 为最优反应时间；孵育体系 pH 介于 5.5~10.5 之间，优选 pH7.4 为最优反应 pH 值；

——反应时间为 0~140 分钟，确保以上底物相应的葡萄糖醛酸化产物达到定量限且底物转化率不超过 20% 时终止反应；

——测定单位时间内底物减少量或葡萄糖醛酸化产物生成量作为 UGT1A1 活性的评价指标。

本发明提供的葡萄糖醛酸转移酶 UGT1A1 的特异性荧光探针底物的应用,该探针底物及其葡萄糖醛酸化产物均具有荧光属性,且两者具有不同的光学属性,可采用荧光检测器同时实现底物及产物的快速、灵敏检测;葡萄糖醛酸化产物及底物荧光检测条件分别为:激发波长 362, 450 nm, 最大发射波长为 450, 564 nm (如图 4 所示)。

该特异性探针底物为比率型荧光探针,其在 UGT1A1 活性检测过程不易受生物体系基质及杂质的干扰,可用于各种重组 UGT1A1、人及动物组织制备液及各类组织细胞中 UGT1A1 酶活的定量测定;同时也可作为在体及动物整体 UGT1A1 的探针底物,评估胆红素代谢酶 UGT1A1 的个体及种属差异。该探针底物及葡萄糖醛酸化代谢产物的荧光检测方法还可用于 UGT1A1 抑制剂的快速筛选及抑制能力的定量评价。

采用重组葡萄糖醛酸 UGT1A1 单酶,肝微粒体孵育体系进行考察,通过相关性分析,特异性抑制实验,重组单酶代谢反应,以及酶反应动力学几方面的证据,证明 1,8-萘酰亚胺类化合物可特异性的经葡萄糖醛酸 UGT1A1 代谢(如图 9 所示),生成羟基的葡萄糖醛酸化产物。进一步采用各种哺乳动物的新鲜提取的肝细胞、原代培养肝细胞、肝切片、肝灌流等代谢评价体系进行考察,发现该代谢反应具有非常良好的特异性。

作为高特异性的葡萄糖醛酸 UGT1A1 单酶的荧光探针底物,该化合物可以用来检测 UGT1A1 的活性,尤其适合用于对细菌、昆虫细胞、哺乳动物细胞以及酵母菌克隆表达体系生产的 UGT1A1 的酶

活测定，以及多种哺乳动物组织器官来源的微粒体、S-9 等制备物中 UGT1A1 的活性标定。

选用本发明所述葡萄糖醛酸 UGT1A1 单酶的特异性探针底物检测葡萄糖醛酸 UGT1A1 单酶体外活性具有以下突出优势：

(1) 高特异性：1, 8-萘酰亚胺类化合物可被葡萄糖醛酸 UGT1A1 单酶高特异性地代谢成一个代谢产物，即羟基的葡萄糖醛酸化产物。

(2) 廉价易得：1, 8-萘酰亚胺类化合物可经化学合成获得，合成工艺简单易行，荧光方法检测成本低。

(3) 高灵敏度：具有 1, 8-萘酰亚胺母核结构的化合物均具有良好的荧光发射光谱特性（450~700nm），且该底物及其葡萄糖醛酸化代谢产物具有不同的荧光发射光谱特征，能较好的进行区分检测，同时可通过比率型标准曲线的建立进行定量测定，UGT1A1 单酶的检测下限为 50 ng。

附图说明

图 1. 1, 8-萘酰亚胺类化合物的结构通式；

图 2. N-(3-羧丙基)-4-羟基-1, 8-萘酰亚胺的 ^1H -NMR 谱图；

图 3. N-(3-羧丙基)-4-羟基-1, 8-萘酰亚胺的 ^{13}C -NMR 谱图；

图 4. N-(3-羧丙基)-4-羟基-1, 8-萘酰亚胺及其葡萄糖醛酸化代谢产物的紫外吸收光谱图（分别在 362 nm 和 450 nm 有最大吸收）；

图 5. 14 例 HLM 对 N-(3-羧丙基)-4-羟基-1, 8-萘酰亚胺的代谢图；

图 6. N-(3-羧丙基)-4-羟基-1, 8-萘酰亚胺的人 UGT 重组单酶筛选试验结果；

图 7. 葡萄糖醛酸化代谢产物的生成量随孵育时间变化的线性拟合;

图 8. N-(3-羧丙基)-4-羟基-1, 8-萘酰亚胺 UGT1A1 单酶检测下限;

图 9. N-(3-羧丙基)-4-羟基-1, 8-萘酰亚胺被 UGT1A1 葡萄糖醛酸化的代谢通路;

图 10. N-(3-羧烷基)-4-羟基-1, 8-萘酰亚胺的合成路线。

具体实施方式

下面的实施例将对本发明予以进一步的说明,但并不因此而限制本发明。

实施例 1. N-(3-羧烷基)-4-羟基-1, 8-萘酰亚胺的合成路线

(1) 化合物 1 的合成

将 4.2 mmol 4-氨基丁酸加入到含有 1 g(3.61 mmol) 4-溴-1, 8 萘酐的 50 ml 乙醇溶液中, 70-80 °C 反应过夜后, 加入 200 ml 水, 析出大量固体, 过滤, 真空干燥得到米黄色固体 N-(3-羧丙基)-4-溴-1, 8-萘酰亚胺, 产率 80-90%。

(2) 化合物 2 的合成

将 800 mg 化合物 1 与 2.54 g 碳酸钾置于 100 ml 单口瓶中, 加入 30 ml 甲醇, 60-70°C 反应过夜后, 冷却, 用 1 M 的盐酸将 pH 调至酸性, 析出大量黄色固体, 过滤, 大量水洗, 真空干燥得到黄色固体 N-(3-羧丙基)-4-甲氧基-1, 8-萘酰亚胺, 产率 80-90%。

(3) 化合物 3 的合成

将 300 mg 化合物 2 置于 25 ml 两口瓶中, 氩气保护下加入 10 ml

55-58%氢碘酸水溶液，120-130℃搅拌过夜后，加大量水稀释，过滤，用水洗涤至滤液为中性，真空干燥得到黄色固体，产率 60-70%。N-(3-羧烷基)-4-羟基-1,8-萘酰亚胺（化合物 3），该化合物的氢谱碳谱见图 2 和图 3，氢碳化学位移如下：

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ = 11.87 (s, 1H), 8.54 (dd, J =8.3, 1.1, 1H), 8.48 (dd, J =7.3, 1.1, 1H), 8.37 (d, J =8.2, 1H), 7.84-7.70 (m, 1H), 7.17 (d, J =8.2, 1H), 4.07 (t, J =6.9, 2H), 2.29 (t, J =7.4, 2H), 2.01-1.71 (m, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) 23.59, 31.82, 39.33, 110.32, 113.05, 122.22, 122.75, 125.91, 129.21, 129.61, 131.46, 133.89, 160.61, 162.52, 164.20, 174.42. HRMS $[\text{M}+\text{H}]^+$ 300.0866, found 330.0864.

注：化合物 1、2、3 的结构如图 10 所示。

实施例 2. 体外测定人重组 UGT 单酶的选择性

(1) 预先准备 95 μl UGT 代谢反应体系，包括 pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲液 (50 mM)、重组人 UGT 各单酶 (0.06 mg/ml)，N-(3-羧丙基)-4-羟基-1,8-萘酰亚胺终浓度为 10 μM ，于 37℃ 条件下震荡预孵 3 分钟；

(2) 向反应体系中加入 5 μl 浓度为 40 mM（终浓度 2 mM）的 UDPGA 起始反应；

(3) 30 分钟后，加入 100 μl 冰乙腈，剧烈震荡后，终止反应；

(4) 用高速冷冻离心机在 4℃，20,000 $\times g$ 的条件下，高速离心 20 分钟后，取上清，进行荧光检测 (E_x =362 nm, E_m =450 nm)；重组人 UGT1A1 酶的选择性最高约是其它单酶的 25 倍左右（图 6）。

实施例 3. 体外抑制试验测定人肝微粒体和 UGT1A1 的 IC_{50}

(1) 预先准备 190 μl 人肝微粒体和 UGT1A1 代谢反应体系, 包括 pH 7.4 的 Tris-Hcl 缓冲液 (50 mM)、人肝微粒体 (0.25 mg/ml)、UGT1A1 (0.06 mg/ml), N-(3-羧丙基)-4-羟基-1, 8-萘酰亚胺终浓度为 10 μM , 不同浓度的原人参三醇于 37°C 条件下震荡预孵 3 分钟;

(2) 向反应体系中加入 10 μl 浓度为 40 mM 的 UDPGA 起始反应;

(3) 30 分钟后, 加入 200 μl 冰乙腈, 剧烈震荡后, 终止反应;

(4) 用高速冷冻离心机在 4°C, 20,000 $\times$ g 的条件下, 高速离心 20 分钟后, 取上清, 进行荧光检测 ($E_x=362\text{ nm}$, $E_m=450\text{ nm}$); 计算其对人肝微粒体和 UGT1A1 的 IC_{50} 值分别为 6.5 μM 和 2.9 μM 。

实施例 4. 不同个体来源肝微粒体中 UGT1A1 的活性定量评估

(1) 选取 14 例人肝微粒体 (HLM) 稀释至 10 mg/ml, 准备 UGT1A1 代谢反应体系, 包括 pH 7.4 的 Tris-Hcl 缓冲液 (50 mM)、人肝微粒体 (0.25 mg/ml)、UGT1A1 (0.06 mg/ml), N-(3-羧丙基)-4-羟基-1, 8-萘酰亚胺终浓度为 20 μM , 于 37°C 条件下震荡预孵 3 分钟;

(2) 向反应体系中加入 10 μl 浓度为 40 mM 的 UDPGA 起始反应;

(3) 30 分钟后, 加入 200 μl 冰乙腈, 剧烈震荡后, 终止反应;

(4) 用高速冷冻离心机在 4°C, 20,000 $\times$ g 的条件下, 高速离心 20 分钟后, 取上清, 进行荧光检测 ($E_x=362\text{ nm}$, $E_m=450\text{ nm}$), 将所获荧光强度代入标准曲线后得到 14 例人肝微粒体 (HLM) 对 N-(3-羧丙基)-4-羟基-1, 8-萘酰亚胺的代谢速率 (图 5)。

实施例 5. UGT1A1 检测下限测定

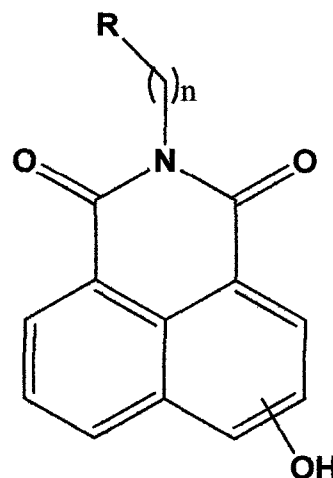
实验在酶标仪上使用 96 孔板进行测定, N-(3-羧丙基)-4-羟基-1, 8-萘酰亚胺 10 μ M, 尿苷二磷酸葡萄糖醛酸 2 mM, 十二烷基聚乙二醇醚 1 mg/ml, MgCl_2 5 mM, UGT1A1 单酶 20 ng/ml~500 ng/ml, pH 7.4 的 Tris-Hcl 缓冲液 50 mM, 总体积为 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 下孵育 5 h 后通过酶标仪分析, 每组的平均值与不加 UGT1A1 的对照组比较, 结果如图 8, 表明 50 和 100 ng 的 UGT1A1 有统计学意义 ($P < 0.05$), 确定 UGT1A1 的检测下限为 50 ng。

实施例 6. UGT1A1 时间标准曲线测定

实验在酶标仪上使用 96 孔板进行测定, N-(3-羧丙基)-4-羟基-1, 8-萘酰亚胺 10 μ M, 尿苷二磷酸葡萄糖醛酸 2 mM, 十二烷基聚乙二醇醚 1 mg/ml, MgCl_2 5 mM, UGT1A1 单酶 0.01 mg/ml~0.09 mg/ml, pH 7.4 的 Tris-Hcl 缓冲液 50 mM, 总体积为 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 下孵育 140min, 每隔 10 分钟酶标仪分析, 产物的荧光强度比底物的荧光强度的比值与孵育时间做标准曲线, 每条标准曲线的 $R^2 > 0.99$, 表明标准曲线线性范围宽广如图 7, 可准确定量 UGT1A1 的含量。

权利要求书

1、一种葡萄糖醛酸转移酶 UGT1A1 的特异性荧光探针底物，其特征在于：该探针底物可被 UGT1A1 特异性催化生成相应的 O-葡萄糖醛酸化产物，其结构通式如式（1）所示，该底物具有 1,8-萘酰亚胺类结构，其中 R 为 -COOH、苯甲酸、-SO₃H 中的一种，n 为 2~10。



式（1）

2、一种权利要求 1 所述葡萄糖醛酸转移酶 UGT1A1 的特异性荧光探针底物的应用，其特征在于：采用上述式（1）化合物作为 UGT1A1 亚酶的特异性底物，进行水解反应，通过定量检测单位时间内的底物消除率或其葡萄糖醛酸化产物的生成率来定量测定不同生物体系中 UGT1A1 的活性。

3、按照权利要求 2 所述葡萄糖醛酸转移酶 UGT1A1 的特异性荧光探针底物的应用，其特征在于：所述体外孵育反应条件为：底物浓度介于 $1/10 \sim 10 K_m$ 之间；孵育体系 pH 介于 5.5~10.5 之间；反应温度介于 20~60℃ 之间。

4、按照权利要求 2 所述葡萄糖醛酸转移酶 UGT1A1 的特异性荧光探针底物的应用，其特征在于：所述的生物体系为重组表达 UGT1A1 单酶、人或动物组织制备液、各类组织细胞。

5、按照权利要求 2 所述葡萄糖醛酸转移酶 UGT1A1 的特异性荧光探针底物的应用，其特征在于：所述底物消除率或产物的生成率低于 20%。

6、按照权利要求 2 所述葡萄糖醛酸转移酶 UGT1A1 的特异性荧光探针底物的应用，其特征在于：该探针底物及其葡萄糖醛酸化产物均具有荧光属性，且两者具有不同的光学属性，可采用荧光检测器同时实现底物及产物的快速、灵敏检测；葡萄糖醛酸化产物及底物荧光检测条件分别为：激发波长 362，450 nm，最大发射波长为 450，564 nm。

7、权利要求 2 所述葡萄糖醛酸转移酶 UGT1A1 的特异性荧光探针底物的应用，其特征在于：该探针底物还可用于 UGT1A1 抑制剂的快速筛选及抑制能力的定量评价。

8、权利要求 1 所述葡萄糖醛酸转移酶 UGT1A1 的特异性荧光探针底物的应用，其特征在于：该探针底物也可作为在体及动物整体 UGT1A1 的探针底物，评估胆红素代谢酶 UGT1A1 的个体及种属差异。

说明书附图

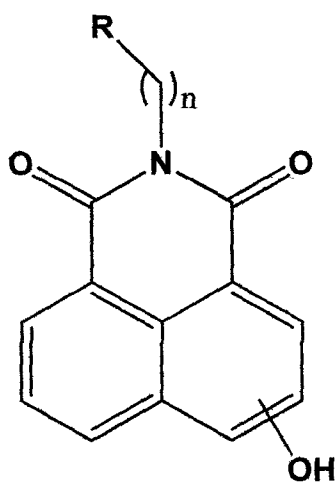


图 1

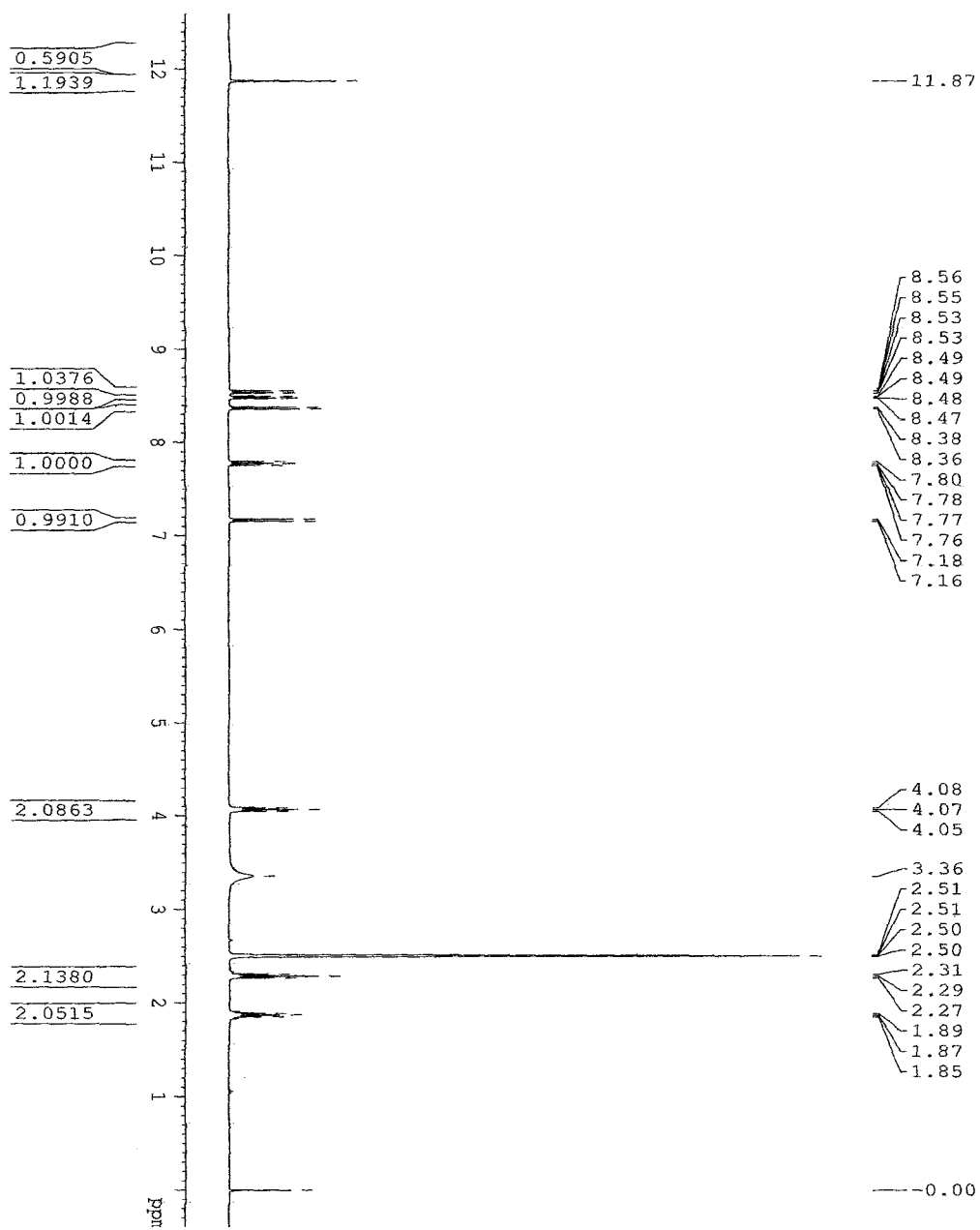


图 2

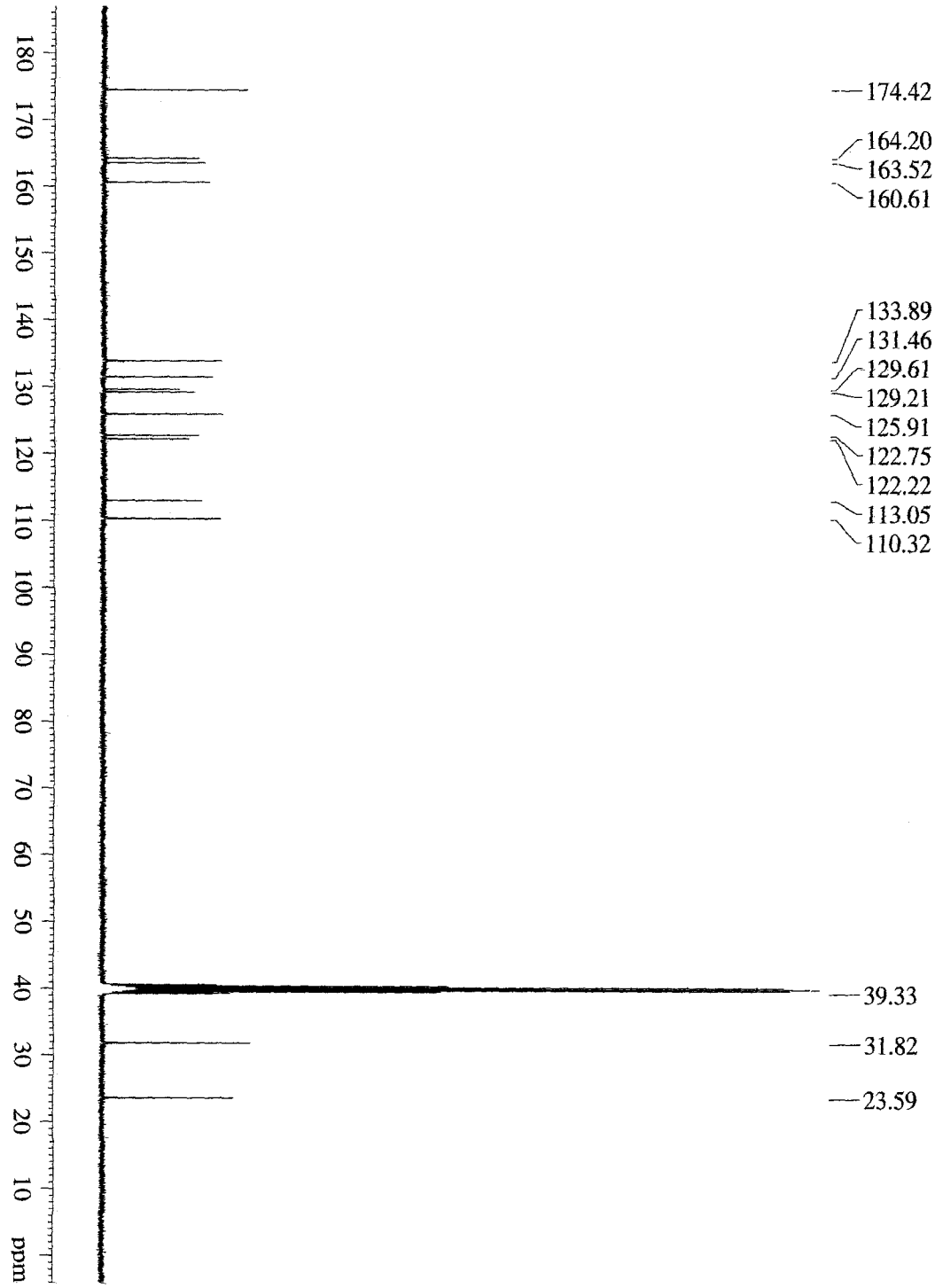


图 3

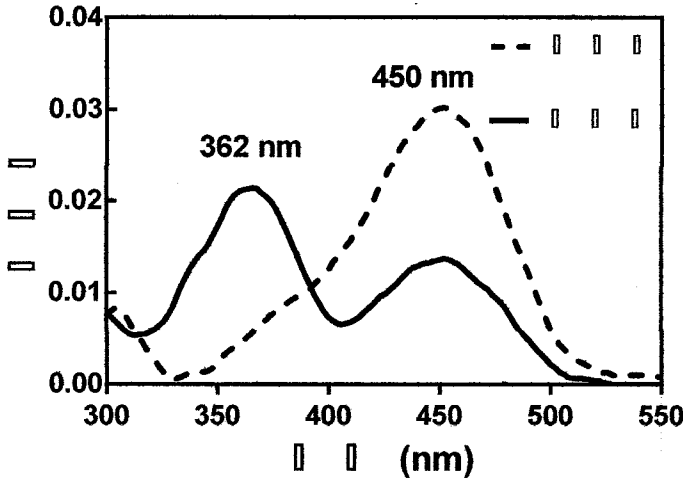


图 4

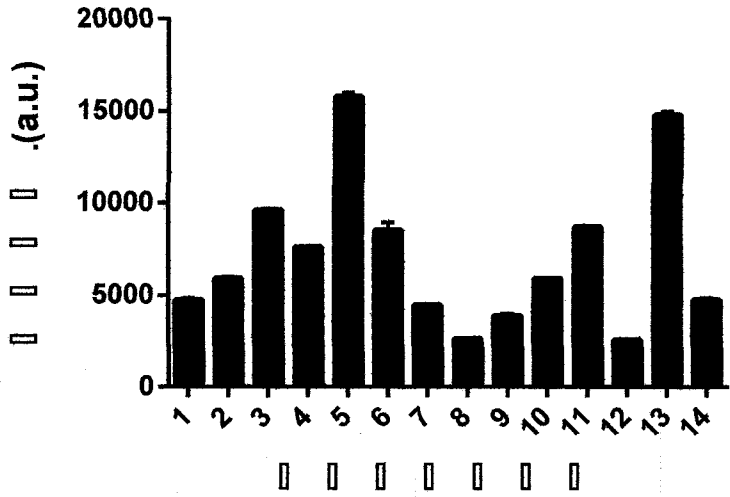


图 5

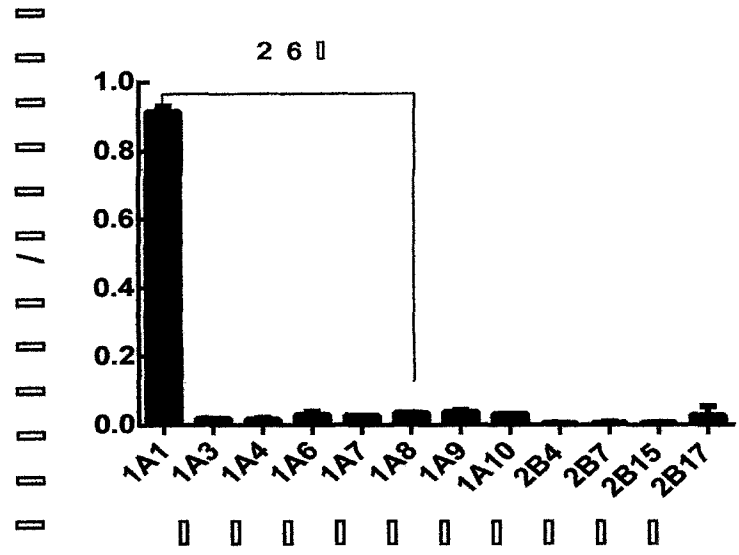


图 6

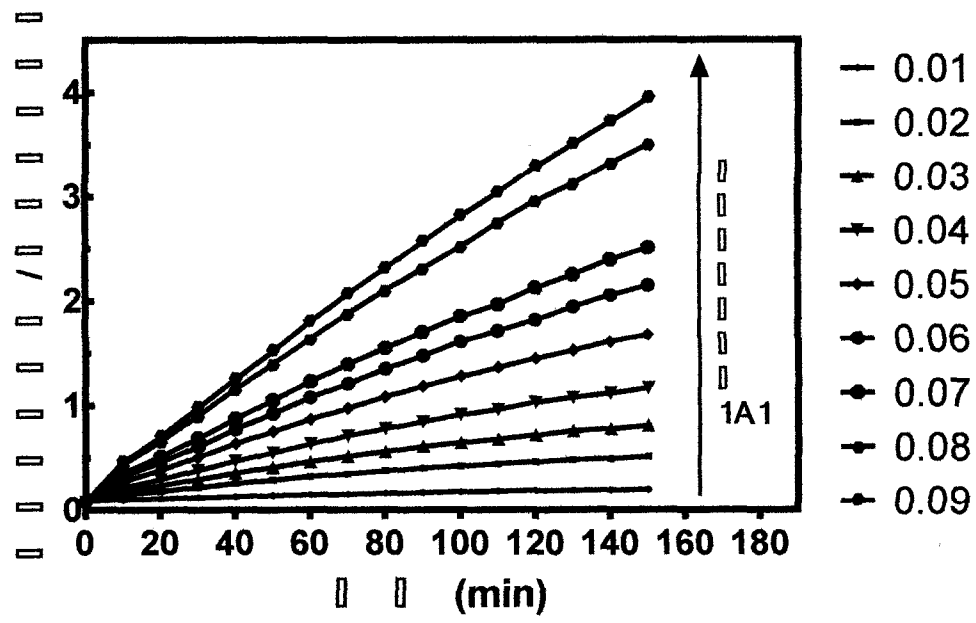


图 7

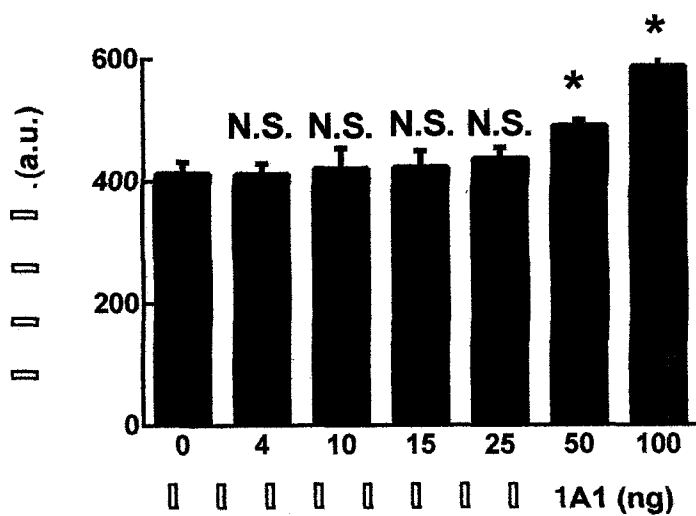


图 8

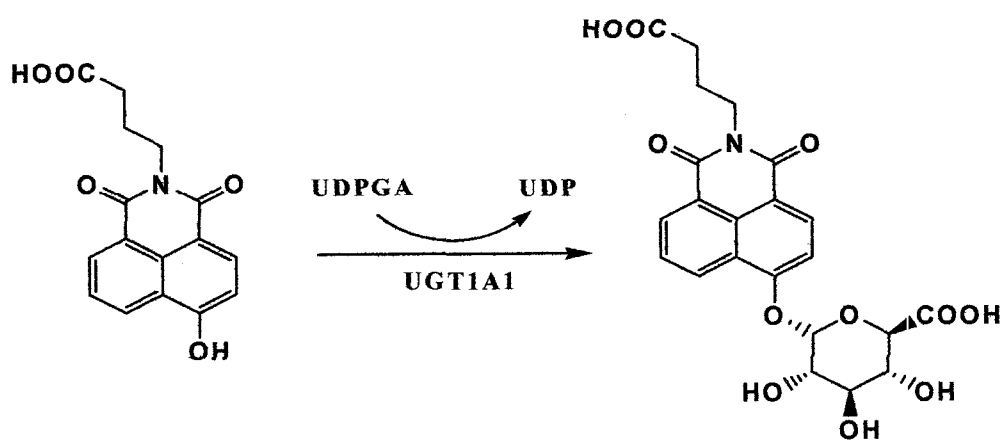


图 9

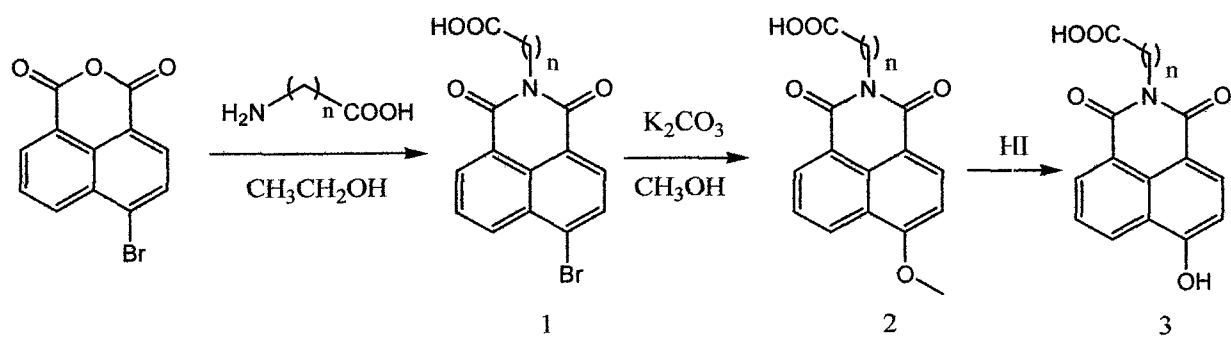


图 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2014/000333

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D 221/14 (2006.01) i; C12Q 1/68 (2006.01) i; G01N 21/64 (2006.01) i; A61K 31/473 (2006.01) i;
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D 221/-; C12Q 1/-; G01N 21/-; A61K 31/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT, WPI, EPODOC, CNKI, CA, STN, ISI Web of Knowledge: dalian chemical physics of chinese academy of sciences, yang ling, cui jingnan, ge guangbo, lv xia, feng lei, liu zhaoming, glucuronic acid, UGT, benzo 2w isoquinoliny, naphthalimide, fluorescent probe

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 0170675 A2 (METHYLGENE, INC.) 27 September 2001 (27.09.2001) compound 250a, and the abstract	1
A	WO 0170675 A2 (METHYLGENE, INC.) 27 September 2001 (27.09.2001) compound 250a, and the abstract	2-8
X	JP 5291027 A (MITSUBISHI CHEM. IND. LTD.) 01 August 1977 (01.08.1977) description, page 1 and 2	1
A	JP 5291027 A (MITSUBISHI CHEM. IND. LTD.) 01 August 1977 (01.08.1977) description, page 1 and 2	2-8
X	REGISTRY. "RN 743366-63-4" ACS on STN, page 1, 12 September 2004 (12.09.2004)	1
X	REGISTRY. "RN 618408-31-4" ACS on STN, page 1, 19 November 2003 (19.11.2003)	1
X	REGISTRY. "RN 618408-24-5" ACS on STN, page 1, 19 November 2003 (19.11.2003)	1

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 22 May 2014 (22.05.2014)	Date of mailing of the international search report 25 June 2014 (25.06.2014)
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer WANG, Xian Telephone No. (86-10) 61648347

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2014/000333

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 0170675 A2	27 September 2001	EP 1280764 B1	24 November 2010
		CA 2404002 A1	27 September 2001
		AT 489360 T	15 December 2010
		US 7288567 B2	30 October 2007
		AU 4870101 A	03 October 2001
		WO 0170675 A3	31 October 2002
		EP 1280764 A2	05 February 2003
		DE 60143520 D1	05 January 2011
		JP 2003528074 A	24 September 2003
		US 2009181971 A1	16 July 2009
		US 2002115826 A1	22 August 2002
JP 5291027 A	01 August 1977	None	

A. 主题的分类		
C07D 221/14(2006.01)i; C12Q 1/68(2006.01)i; G01N 21/64(2006.01)i; A61K 31/473(2006.01)i		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
C07D 221/-; C12Q 1/-; G01N 21/-; A61K 31/-		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
CNPAT, WPI, EPODOC, CNKI, CA, STN, ISI Web of Knowledge:中科院大连化学物理所, 杨凌, 崔京南, 葛广波, 吕侠, 冯磊, 刘兆明, 葡萄糖醛酸, 荧光探针, 萘酰亚胺, UGT, benzo 2w isoquinoliny, naphthalimide, fluorescent probe		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	WO 0170675A2 (METHYLGENE, INC.) 2001年 9月 27日 (2001 - 09 - 27) 化合物250a, 摘要	1
A	WO 0170675A2 (METHYLGENE, INC.) 2001年 9月 27日 (2001 - 09 - 27) 化合物250a, 摘要	2-8
X	JP 5291027A (MITSUBISHI CHEM. IND. LTD.) 1977年 8月 01日 (1977 - 08 - 01) 说明书第1-2页	1
A	JP 5291027A (MITSUBISHI CHEM. IND. LTD.) 1977年 8月 01日 (1977 - 08 - 01) 说明书第1-2页	2-8
X	REGISTRY. "RN 743366-63-4" ACS on STN, 第第1页卷, 2004年 9月 12日 (2004 - 09 - 12),	1
X	REGISTRY. "RN 618408-31-4" ACS on STN, 第第1页卷, 2003年 11月 19日 (2003 - 11 - 19),	1
X	REGISTRY. "RN 618408-24-5" ACS on STN, 第第1页卷, 2003年 11月 19日 (2003 - 11 - 19),	1
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期
2014年 5月 22日		2014年 6月 25日
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 中国		王险
传真号 (86-10)62019451		电话号码 (86-10)61648347

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2014/000333

检索报告引用的专利文件		公布日 (年/月/日)	同族专利		公布日 (年/月/日)
WO	0170675A2	2001年 9月 27日	EP	1280764B1	2010年 11月 24日
			CA	2404002A1	2001年 9月 27日
			AT	489360T	2010年 12月 15日
			US	7288567B2	2007年 10月 30日
			AU	4870101A	2001年 10月 03日
			WO	0170675A3	2002年 10月 31日
			EP	1280764A2	2003年 2月 05日
			DE	60143520D1	2011年 1月 05日
			JP	2003528074A	2003年 9月 24日
			US	2009181971A1	2009年 7月 16日
			US	2002115826A1	2002年 8月 22日
JP	5291027A	1977年 8月 01日	无		