



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101541357 B

(45) 授权公告日 2012. 07. 04

(21) 申请号 200780038883. 3

US 20040060866 A1, 2004. 04. 01, 全文 .

(22) 申请日 2007. 10. 29

CN 2810611 Y, 2006. 08. 30, 全文 .

(30) 优先权数据

0621452. 2 2006. 10. 27 GB

Sambit Sen M. D. et al. Emerging

indications for albumin dialysis. 《American journal of gastroenterology》. Blackwell

(85) PCT申请进入国家阶段日

Publishing, 2005, 第 100 卷 (第 2 期), 468-475.

2009. 04. 17

审查员 薛林

(86) PCT申请的申请数据

PCT/GB2007/004126 2007. 10. 29

(87) PCT申请的公布数据

W02008/050148 EN 2008. 05. 02

(73) 专利权人 UCL 商业有限公司

地址 英国伦敦

(72) 发明人 内森·戴维斯 拉吉夫·加兰

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51) Int. Cl.

A61M 1/34 (2006. 01)

(56) 对比文件

W0 2004082737 A2, 2004. 09. 30, 全文 .

权利要求书 1 页 说明书 24 页 附图 9 页

(54) 发明名称

肝病的治疗

(57) 摘要

本发明提供了用于治疗患肝病个体的器械, 包含:(a) 从个体的血液中选择性地除去白蛋白的装置; 以及 (b) 从个体的血液中选择性地除去内毒素的装置。

1. 用于治疗患有肝病个体的器械,包含:
用于从个体的血液中选择性地除去白蛋白的装置;
用于从个体的血液中选择性地除去内毒素的装置;以及
向所述个体的血液补充不是来自所述个体的白蛋白的装置,
其中所述用于从个体的血液中选择性地除去白蛋白的装置包含透析白蛋白的装置,所述透析白蛋白的装置包含孔径小于 100kDa 的膜。
2. 如权利要求 1 所述的器械,还包含:
从所述个体的血液中除去与白蛋白结合的毒素的装置。
3. 如上述权利要求 1 或 2 所述的器械,其用于体外使用。
4. 如上述权利要求 1 或 2 所述的器械,其中所述用于从个体的血液中选择性地除去白蛋白的装置包含能与白蛋白选择性结合的固相支持体。
5. 如上述权利要求 1 或 2 所述的器械,其中所述用于从个体的血液中选择性地除去内毒素的装置包含能与内毒素选择性结合的固相支持体。
6. 如权利要求 1 或 2 所述的器械,其中向所述个体的血液补充不是来自所述个体的白蛋白的装置中的白蛋白是药物级别的白蛋白。
7. 如上述权利要求 1 或 2 所述的器械,其中所述个体的血液在体外穿过设备。
8. 如上述权利要求 1 或 2 所述的器械,其中所述透析白蛋白的装置包含孔径大于 50kDa 的膜。

肝病的治疗

发明领域

[0001] 本发明涉及患肝病的个体的治疗。本发明还涉及治疗此类个体的方法以及用于此类治疗的系统和设备。

[0002] 发明背景

[0003] 据估计,仅在美国每年死于肝衰竭的人达 60,000 例,而与等待名单上的 1618,000 相比,供体库 (donor pool) 恒定,保持在大约 4000 例左右。等待名单上的受试者接受供体肝的几率,仅仅是 1/8,然而,没有可用来延长此类患者寿命的有效治疗。

[0004] 肝衰竭导致多器官功能障碍,死亡率处于 80% 的级别中。在肝硬化患者中,导致肝功能急性恶化的主要打击 (precipitant) 是感染。在此类患者中通常所观察到的感染的具体形式是自发的细菌性腹膜炎。即便治疗基础感染 (underlying infection),但未梢器官功能 (end-organ function) 的这种急性恶化仍将继续,通常观察到高达 40% 的死亡率。然而,感染后导致这种肝功能急性恶化的机制尚不清楚。

[0005] 发明概述

[0006] 本发明涉及肝病的治疗,并阐述了影响发病率和死亡率的两个至关重要的因素,即肝病患者的白蛋白结构、功能和水平的缺陷以及此类患者血液中内毒素水平的增加。

[0007] 因此,本发明提供了用于治疗患有肝病个体的器械,包含:

[0008] (a) 用于从个体血液中选择性地除去白蛋白的装置;以及

[0009] (b) 用于从个体血液中选择性地除去内毒素的装置;

[0010] 本发明还提供:

[0011] - 治疗患有肝病个体的方法,包括如下步骤:

[0012] (a) 从个体的血液中除去白蛋白;以及

[0013] (b) 降低个体血液中内毒素的水平。

[0014] - 治疗肝病的方法,包括使来自个体的血液与本发明的器械接触以便将白蛋白和内毒素从个体的血液中除去的步骤。

[0015] - 通过从血液中选择性地除去白蛋白和内毒素体外处理血液的方法,其中血液来自患有肝病的个体。

[0016] 附图简要说明

[0017] 图 1:发现缺血修饰白蛋白 (ischaemia modified albumin, IMA) 水平的增加与肝病的严重性有关。将值表示为每 g/L 血浆白蛋白的 IAM 吸光度单位, (平均值 + 或 -SEM)。

* = $p < 0.05$, *** = $p < 0.001$ 。

[0018] 图 2:(A) 对照、仅患有肝硬化患者和患有肝硬化 +AH 患者的静止氧化猝发 (resting oxidative burst), (B) 在对照、仅患有肝硬化患者和患有肝硬化 +AH 患者中,静止氧化猝发与用大肠杆菌体外 (ex vivo) 刺激后的氧化猝发之间的差异, (C) 荧光强度的几何平均值 (geometric mean offluorescence intensity, GMFI),作为由对照、仅患有肝硬化患者和患有肝硬化 +AH 患者的一个嗜中性粒细胞吞噬的细菌 (FITC 标记的大肠杆菌) 数目的测量值。上标表示统计上的显著差异。1 = 与对照相比有显著性。2 = 与肝硬化相

比有显著性。

[0019] 图 3 : (A) 接受者工作曲线 (receiver operating curve) 下的面积, 测定氧化猝发的测量在测定存活中的预测性用途。截止 $< 55\%$ 的静止猝发 (resting burst), 预测死亡的灵敏度为 75% , 特异性为 64% 。(B) 划分为高静止氧化猝发 ($> / = 55\%$) 或低静止氧化猝发 ($< 55\%$) 的患者的 Kaplan-Meier 存活曲线 (Kaplan-Meier survival curve) 和对数秩分析 (log-rank analysis)。

[0020]

天数	20	40	60	80
事项	4	5	10	12
处于风险	50	44	36	33

[0021] 图 4 : (A) 接受者工作曲线下的面积, 测定荧光强度几何平均值 (GMFI) 的测量在测定存活中的预测性用途。对于预测死亡而言, 截止 $< 295\%$ GMFI, 预测死亡的灵敏度为 86% , 特异性为 67% 。面积 = 0.80 ; 标准标准误差 (Std Errors) = 0.08 ; 显著性 = 0.02 ; 截止 = 42 ; 灵敏度 = 0.86 ; 特异性 = 0.70 。(B) 划分为低 GMFI (< 42) 或高 GMFI ($> / = 42$) 患者的 Kaplan-Meier 存活曲线和对数秩分析。

[0022]

天数	20	40	60	80
事项	4	4	5	5
处于风险	29	29	26	24

[0023] 图 5 : 患者全血和与患者血浆一起温育的正常嗜中性粒细胞的静止氧化猝发。高猝发患者的血浆也诱导了正常嗜中性粒细胞的高猝发, 而低静止猝发患者的血浆不能诱导正常嗜中性粒细胞的高猝发。WB 表示全血, NN 表示正常嗜中性粒细胞, PP 表示患者血浆, H 表示高静止猝发 ($> / = 55\%$), L 表示低静止猝发 ($< 55\%$)。* 与正常相比, $p = 0.002$ 。
** 与正常相比, $p = 0.0005$ 。

[0024] 图 6 : 通过将患者的嗜中性粒细胞与正常血浆一起温育, 静止氧化猝发的可逆性。PN 表示患者的嗜中性粒细胞, PP 表示患者的血浆, NP 表示正常血浆。

[0025] 图 7 : 通过与内毒素一起温育, 静止猝发的剂量依赖性增加。* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$ 。

[0026] 图 8 : 与内毒素一起温育不改变正常嗜中性粒细胞的吞噬作用, 但进一步降低了患者嗜中性粒细胞的吞噬作用。

[0027] 图 9 : 通过使血浆通过内毒素去除柱或将血浆与 CD14 抗体一起温育, 静止氧化猝发是可逆的。当使用低猝发患者的血浆或对照血浆时, 柱或 CD14 抗体不影响静止猝发。NN+PP H 对比 NN+PP H CD14 $p < 0.001$ 。NN+PP H 对比 NN+PP HB 柱 $p < 0.001$ 。

[0028] 图 10 : 通过使血浆通过内毒素去除柱或将血浆与 CD14 抗体一起温育, 吞噬作用的降低是可逆的。当使用低猝发患者的血浆或对照血浆时, 柱或 CD14 抗体不影响静止猝发。

NN+PP H 对比 NN+PP H CD14p = 0.04, NN+PP H 对比 NN+PP HB 柱 p = 0.03。

[0029] 图 11 :白蛋白替代系统的示例。

[0030] 图 12 :测量的血浆样品的内毒素水平,所述血浆是在实施例 3 中的实验终止时收集的 (T = 3 小时)。与所有其他的组相比,在盐水处理的动物中发现了显著较高的内毒素水平 ($p < 0.001$)。如图所示,根据制造商的说明书,该测定的检测限度是 0.5EU/ml。

[0031] 图 13 :在实施例 3 的实验终止时采集的血液样品中测量的水平:

[0032] A :白蛋白水平。BDL 手术后 4 周,发现白蛋白显著减少 (与未处理的动物相比, $**p < 0.01$),但在白蛋白治疗后显著增加 (与盐水组相比, $\#p < 0.05$, 曼 - 惠特尼 (Mann-Whitney) 检验)。

[0033] B :血浆 ALT 水平。与所有给予了盐水的动物相比,尽管治疗组的血浆 ALT 明显减少,但这些差异证明是不显著的。

[0034] C :血浆尿素浓度。发现接受白蛋白和多粘菌素 B 组合的动物与仅施用了白蛋白的组相比,具有显著较低的尿素水平 ($*p < 0.05$, 曼 - 惠特尼检验)。

[0035] 图 14 :贯穿实施例 3 研究时程的测量的平均动脉压 (mean arterial pressure, MAP)。尽管没有发现显著差异,但看起来好像接受白蛋白 / 多粘菌素 B 组合治疗的组与仅接受白蛋白的动物相比, MAP 增加,上述两组的 MAP 都高于盐水处理的组,该盐水处理的组 90 分钟后表现出明显恶化。

[0036] 图 15 :在整个实验期收集的动脉血液样品的嗜中性粒细胞活性。Y 轴表示响应细菌猝发的嗜中性粒细胞的百分比。可以看出,在研究结合期 (tie course),响应致病菌产生氧化猝发的嗜中性粒细胞的百分比既在白蛋白处理的组中又在和白蛋白 / 多粘菌素处理的组中进行性增加。在第 3 小时,在盐水处理的动物中,观察到轻微改善,但其低于其他的组,并且发现不显著。

[0037] 发明的详细描述

[0038] 在整个说明书中,词语“包含 (comprise)”和其诸如“包含 (comprised)”或“包含 (comprising)”等变化,应当理解为意指包括所述的元件、整体或步骤,或元件、整体或步骤组,但不排斥任何其他元件、整体或步骤或元件、整体或步骤组。

[0039] 在本说明书中对任何现有技术的引用,不是且不当认为是对现有技术澳大利亚或其他地方构成了常识的一部分这一点的认可或任何形式的提示。

[0040] 目前,患有肝病的患者特别是患有肝衰竭的患者可利用的治疗范围是有限的。对许多患者而言,唯一的选择就是移植,然而,还没有可用来延长此类患者寿命的有效治疗。因此需要找到可用于改善患肝病个体状况的治疗方案。

[0041] 白蛋白是在肝脏中产生的主要血浆蛋白。白蛋白承担多种功能,包括脂肪酸转运、金属螯合、药物结合和抗氧化剂活性。在肝病中,白蛋白浓度的降低是由于合成减少或者由较高的降解速率导致的。本发明人另外证明,在患有肝病的患者中,血液循环中白蛋白的比例在结构上是异常的。本发明人还发现,患有肝病的患者的缺血修饰白蛋白 (IMA) 的量与健康的对照受试者相比是增加的。一定比例的来自患有肝衰竭患者的白蛋白的功能能力受到永久破坏。

[0042] 因此,本发明一方面涉及从患有肝病的个体的血液中除去白蛋白。

[0043] 本文中的除去白蛋白既指除去存在于个体血液中的正常白蛋白,也指除去任何

结构上或功能上修饰形式的白蛋白。也就是说,优选地,本发明所用的除去白蛋白的装置不但能除去正常的天然存在的白蛋白,也能除去具有异常结构的白蛋白或经修饰的白蛋白。除去任何受损的或异常白蛋白,在治疗上也是有用的,因为受损的白蛋白功能很差并且与有破坏性的副作用有关。例如,除去白蛋白的装置也可除去与正常的未修饰的白蛋白相比,分子柔性(molecular flexibility)降低、脂肪酸结合亲和性降低、转运特性降低、转运效率减低和/或解毒能力降低的白蛋白。除去白蛋白的装置也可以除去具体修饰形式的白蛋白,如缺血修饰白蛋白(IMA)。利用常规技术如实施例1所述的技术,可以检测此类结构和功能修饰。特别是,利用自旋标记物(spin label)和电子顺磁共振光谱术(electronparamagnetic resonance spectroscopy),可评估白蛋白的功能性。通过检查白蛋白与金属原子的结合能力,可以检测 IMA 的存在。

[0044] 除去白蛋白也可通过除去与白蛋白结合的任何毒素而使血液解毒。即,除去白蛋白的装置也可因此除去血液中与白蛋白结合的毒素。

[0045] 优选地,从血液中除去白蛋白的装置选择性地除去白蛋白。即,白蛋白优先于血清中的其他物质如其他的蛋白而除去。优选地,从血液中除去的白蛋白的量显著地高于除去的其他血液成分的量。例如,在此方面,除去的组分以重量计超过 99%的是白蛋白,在此方面,除去的组分中 98%多、95%多、90%多、80%多、70%多、60%多或 50%多是白蛋白。在此,除去白蛋白包括除去本文所述的各种修饰形式的白蛋白。

[0046] 除去白蛋白的装置可以是能从血液中选择性地除去白蛋白的任何装置。

[0047] 一方面,利用与白蛋白结合的配体,选择性地除去白蛋白。配体可以是与白蛋白结合的任何分子。例如,已知许多活性染料(reactive dyes)与白蛋白结合。配体可以是抗体或其他与白蛋白特异性结合的亲和配体。通常,与白蛋白特异性结合的配体是如上文所述能从血液中选择性地除去白蛋白的配体。例如,配体能比血液的其他组分更牢固地与白蛋白结合。例如,配体可以是与人白蛋白特异性结合的抗体。配体可以是与对白蛋白具特异性的表位结合的抗体。配体可以是分子的组合,所述分子中的每一个都与白蛋白结合,如与白蛋白分子的不同部分结合的分子的组合。配体可以是多克隆抗体或与白蛋白上多个表位结合的抗体的混合物。此类组合方法可用于除去修饰形式的白蛋白,因为不同的抗体可以靶向白蛋白分子的不同部分。

[0048] 可针对白蛋白分子的具体表位产生抗体。例如,可以产生特异性地针对这些区域的抗体,预期所述区域在未修饰的和具体修饰形式的白蛋白中在结构上相似。

[0049] 出于本发明的目的,术语“抗体”,除非另有说明,包括与白蛋白结合的片段。此类片段包括 Fv、F(ab')₁ 和 F(ab')₂ 片段以及单链抗体。此外,抗体和其片段可以是嵌合抗体、CDR 移植抗体或人源化的抗体。

[0050] 用于本发明的抗体可通过任何适宜的方法产生。制备和表征抗体的方法在本领域内是公知的,参阅例如 Harlow and Lane(1988) "Antibodies :A Laboratory Manual (抗体:实验室手册)", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY。例如,抗体可通过在宿主动物中产生针对完整多肽或其片段例如其抗原表位(下文称为“免疫原”)的抗体来制备。

[0051] 产生多克隆抗体的方法包括,用免疫原使适宜的宿主动物如实验动物免疫,并从动物血清中分离免疫球蛋白。因此可用免疫原接种动物,随后从动物中除去血液,并纯化

IgG 组分。

[0052] 产生单克隆抗体的方法包括,使产生期望抗体的细胞永生。杂交瘤细胞可通过将来自接种动物的脾细胞与肿瘤细胞融合产生 (Kohler and Milstein (1975) Nature 256, 495-497)。

[0053] 产生期望抗体的永生细胞可通过常规方法选择。可将杂交瘤培养于培养物中或腹膜内注射用于形成腹水或进入同种异体宿主或免疫功能受损宿主的血流中。可以通过体外赋予人类淋巴细胞免疫性,随后用 EB 病毒 (Epstein-Barr virus) 转化淋巴细胞来制备人类抗体。

[0054] 对于产生单克隆和多克隆抗体两者,适宜的实验动物是山羊 (goat)、兔 (rabbit)、大鼠 (rat) 或小鼠 (mouse)。如果需要,免疫原可作为共轭物施用,在该共轭物中,免疫原是例如经由一个氨基酸残基的侧链偶联于适宜的载体。载体分子通常是生理学上可接受的载体。可分离获得的抗体,并且如果需要,进行纯化。

[0055] 当抗体或其他配体以优先的亲合性或高亲合性与其特异性的蛋白结合时,其特异性地与该蛋白结合,而与其他的蛋白基本上不结合或仅以低亲合性结合。即,如果抗体与白蛋白的结合比其与其他血液成分如血液中的其他蛋白的结合更牢固,则该抗体与该白蛋白特异性结合。如上文所解释的,结合特异性可以是这样的结合,即抗体与结构或功能上改变的白蛋白形式以及未修饰的白蛋白结合。优选地,抗体以与未修饰的白蛋白相同或基本上相同的结合亲合性与结构上或功能上改变的白蛋白形式结合。优选地,抗体以比其他的血液成分如血液中的其他蛋白更高的亲合性与修饰和未修饰的白蛋白形式两者结合。有关测定抗体特异性结合能力的竞争性结合或免疫放射分析的多种实验方案在本领域内是公知的 (参阅例如 Maddox et al, J. Exp. Med. 158, 1211-1226, 1993)。此类免疫分析通常涉及在特异性蛋白和其抗体之间形成复合物并测量复合物的形成。

[0056] 如果利用配体除去白蛋白,则可将该配体以附着于固相支持体的方式提供。可将配体固定于此类固相支持体上。适宜的固相支持体可以是柱的形式,血液可以流经该柱。适宜的固相支持体可以是例如有孔的足以允许血液通过的多孔材料如膜、颗粒床 (particle bed) 或过滤器。优选地,固相支持体具有大的表面积,以便使个体血液和附着于支持体的配体之间的接触面积最大化。固相支持体可采用可填入容器中的珠的形式,可将血液加入该容器或流经该容器。珠优选具有一定尺寸,当装入柱或过滤床 (filter bed) 中时,该尺寸足以允许足够的多孔性。各种不同的珠材料是本领域已知的。

[0057] 因此,根据本发明的除去白蛋白的装置可包含附着有或固定有能与白蛋白结合的配体的此类固相支持体或其组成。除去白蛋白的装置可包含使血液流过的容器,或其组成。容器可因此包含入口和出口。确定入口和出口的位置,以便流过容器的血液与本文所述的固相支持体接触。优选地,设计或选择除去白蛋白的装置,以使血液和固相支持体之间的接触面积最大化。多种此类设计方案在本领域内是已知的。例如,除去白蛋白的装置可以是装有珠的柱或过滤床,其中将白蛋白的配体固定于珠上。

[0058] 另一方面,白蛋白的除去可经由透析实现。这种方法也可导致除去与白蛋白一起透析的其他血液成分。通常,白蛋白应当是除去的主要成分。这种透析步骤可利用任何白蛋白透析系统。多种此类系统在本领域内是已知的。一种此类系统是分子吸附再循环系统 (molecular absorbance recirculating system, MARS)。可选的系统是通用单通道白蛋白

透析 (singlepass albumin dialysis, SPAD) 系统。这些系统利用 50kDa 的孔膜透析血液中的白蛋白。这种系统经特殊设计,可从患者的血液中除去白蛋白结合的毒素。

[0059] 作为这种系统的可选方式,也可利用较大孔的膜,以便将来自患者血液的白蛋白经由透析与新鲜的白蛋白进行主动交换。这允许在同一步骤中除去毒素和异常形式的白蛋白。如下文进一步所讨论的,这也允许将不是来自个体的新白蛋白导入血液中。

[0060] 其中 MARS 系统经改良以包括更大孔的膜的研究表明,与标准的 50kDa 孔的设备相比,对蛋白结合毒素的除去具实质改进。例如,可以使用孔径大于 50kDa、大于 60kDa、大于 70kDa、大于 80kDa、大于 90kDa 或大于 100kDa 的膜。膜的孔径可小于 60kDa、小于 75kDa、小于 100kDa 或小于 150kDa。

[0061] 取决于除去白蛋白所用的具体装置,其他的血液成分可与白蛋白一起除去。在一个实施方案中,可将与白蛋白一起除去的其他成分返回到个体的血液。待返回的成分可从已经被从血液中除去的白蛋白混合物中纯化,或由不是来自该个体的新鲜等同成分替代。

[0062] 从血液中除去白蛋白的各种方法在本领域内是已知的。例如,美国专利第 4,093,612 号公开了可用于从流体中除去白蛋白的活性染料组合物。根据该发明,此类组合物可用于从个体的血液中除去白蛋白。因此,这是基于与白蛋白特异性结合的化合物的选择性白蛋白捕集系统 (selective albumin trapping system)。这些化合物可以是例如美国专利第 4,093,612 号所述的活性染料,如汽巴蓝 (cibacron-blue),可以是能与白蛋白结合的其他分子,如白蛋白特异性抗体。

[0063] 因此,根据本发明,将白蛋白从患有肝病的个体的血液中除去。一方面,这种白蛋白可由不是来自该个体的新的白蛋白替代。新的白蛋白优选在结构上或功能上是正常的。即,新的白蛋白不包含或基本上不包含结构上或功能上修饰形式的白蛋白。如果从个体的血液中除去的白蛋白包含一种或多种修饰形式的白蛋白,则返回该个体血液的白蛋白优选与已被除去的白蛋白相比包含较少的修饰的白蛋白。例如,返回到个体血液的白蛋白可包含少于 50%、少于 30%、少于 20%、少于 10%、少于 5%或少于 1%的量的从该个体除去的修饰的白蛋白。优选地,返回个体的白蛋白不包含修饰的白蛋白或从个体中除去的一种或多种类型的修饰的白蛋白,例如无缺血修饰白蛋白 (IMA)。

[0064] 新的白蛋白可来自另一个个体,如未患有肝病的个体、未患有肝衰竭的个体或具有正常肝功能的个体。新的白蛋白可以是已被从个体中除去但已经进行清理或纯化而除去毒素和 / 或修饰的白蛋白分子的白蛋白。新的白蛋白通常比已从个体中除去的白蛋白具有更高比例的结构和功能上正常的白蛋白。新的白蛋白可以是药物级别的白蛋白。

[0065] 将这种新的白蛋白导入个体的血液中,确保个体具有适宜水平的循环白蛋白。其可直接替代除去的白蛋白,例如,可将与除去的白蛋白相同或等同量的白蛋白返回血液中。在这种系统中,用新白蛋白来有效交换个体的白蛋白。可选地,通过改变在此阶段导入的白蛋白的量,如果需要,可增加或降低血液中总的白蛋白浓度。导入血液中的白蛋白的量因此可大于或小于除去的白蛋白的量。例如,肝病可导致循环白蛋白的水平降低。这可导致较低的功能能力。根据本发明,导入患者血液中的新白蛋白的量,可大于除去的白蛋白的量。这可补充个体循环中白蛋白的水平。例如,导入的新白蛋白的量增加了血液中总白蛋白水平,所述水平与未患有肝病的个体中所观察到的水平相同或相似。

[0066] 可将新鲜的白蛋白引入个体的血液中,同时除去该个体的白蛋白。例如,通过透

析可实现白蛋白的交换。可选地,白蛋白除去和白蛋白返回的步骤可顺序或单独进行。例如,如果本发明在体外实施,则将个体的血液流经除去白蛋白的装置,随后将新鲜的白蛋白加入血液中。这可通过同一器械的不同部分实现。可选地,新鲜白蛋白的加入可单独进行。通常在将白蛋白从患者的血液中除去后,进行新鲜白蛋白的加入。

[0067] 在本文所述的其他研究中,本发明人证明,内毒素是患有肝病个体血液中的成分,其与这些患者的预后有关,例如他们对感染或器官衰竭的易感性、他们的致死性风险以及他们对某些治疗如免疫抑制的潜在反应性。

[0068] 本发明人发现,这些预后因素与患有肝病个体血液中嗜中性粒细胞的激活有关,并且这种激活与这些个体血浆中可传递因子的存在有关。因此,来自嗜中性粒细胞激活程度高的个体的血浆,能增加正常嗜中性粒细胞的激活水平。

[0069] 本发明人还发现,通过使正常的嗜中性粒细胞与内毒素接触,可实现相似的效果,并且从嗜中性粒细胞激活程度高的患者的血液中除去内毒素,可降低该血液中嗜中性粒细胞的激活水平。因此,认为除去内毒素可用于治疗嗜中性粒细胞处于激活状态的患有肝病的患者。通过恢复正常嗜中性粒细胞的功能,这些个体抵抗感染的能力可获得改善。

[0070] 因此,本发明也涉及从患者的血液中除去内毒素。除去白蛋白解决了解毒这一问题,除去内毒素涉及另一个减少免疫应答的问题。通过将这两种途径组合于单一器械或方法中,实现了肝病特别有效的治疗。

[0071] 优选地,从血液中除去内毒素的装置选择性地除去内毒素。即,内毒素优先于血液中的其他物质被除去。优选地,从血液中除去的内毒素的量显著地大于除去的其他血液成分的量。例如,在此方面,除去的成分按重量计,超过 99% 的是内毒素。在此方面,除去的成分中 98% 多、95% 多、90% 多、80% 多、70% 多、60% 多或 50% 多是内毒素。

[0072] 除去内毒素的装置可以是能从血液中选择性地除去内毒素的任何装置。

[0073] 一方面,利用与内毒素结合的配体可选择性地除去内毒素。配体可以是与内毒素结合的任何分子。例如,已知抗内毒素抗体、LPS 结合蛋白、多粘菌素 B、聚乙烯亚胺、精氨酸配体以及各种肽都与内毒素结合。配体可以是抗体或与内毒素特异性结合的其他亲和配体。例如,配体可以是与内毒素特异性结合的抗体。通常,与内毒素特异性结合的配体是如上文所述能从血液中选择性地除去内毒素的配体。例如,配体能比血液的其他组分更牢固地与内毒素结合。配体可以是与内毒素特异性的表位结合的抗体。配体可以是分子的组合,所述分子中的每一个都与内毒素结合,如与内毒素分子的不同部分或不同的内毒素分子结合的分子的组合。配体可以是多克隆抗体,或者与内毒素分子上多个表位结合或与不同内毒素结合的抗体的混合物。

[0074] 可以针对内毒素分子的特异性表位产生抗体。如上文有关白蛋白所述的,适宜的抗体类型是任何抗体类型,如抗体片段。

[0075] 通过任何方式如上文有关白蛋白结合抗体所述的实例,制备与内毒素结合的抗体。可分离获得的抗体,如果需要,进行纯化。

[0076] 当抗体或其他配体优先或高亲和性地与其特异性的蛋白结合时,其与该蛋白特异性地结合,而与其他蛋白基本上不结合或仅以低亲和性结合。即,其与内毒素的结合比与其他的血液成分如血液中的其他蛋白的结合更牢固。结合特异性可以是这样的结合,即其与不同形式的内毒素结合。优选地,其与多种形式的内毒素结合的亲和性高于与他血液成

分结合的亲和性。

[0077] 如果配体用于除去内毒素,则可将该配体以附着于固相支持体的方式提供。可将配体固定于此类固相支持体上。适宜的固相支持体是如上文有关白蛋白结合配体所讨论的支持体。

[0078] 因此,根据本发明除去内毒素的装置可包含附着有或固定有能与内毒素结合的配体的此类固相支持体或由其组成。除去内毒素的装置可包含使血液流过的容器,或由其组成。该容器因此可包括入口和出口。确定入口和出口的位置,以便流过容器的血液与本文所述的固相支持体接触。优选地,设计或选择装置,以使血液和固相支持体之间的接触面积最大化。多种此类设计方案在本领域内是已知的。例如,装置可以是装有珠的柱或过滤床,其中将白蛋白的配体固定于珠上。

[0079] 另一方面,可将药剂施用于个体以减少内毒素水平,而不是以物理方式从血液中除去内毒素。例如,可在功能上将血液中的内毒素中和而不是除去。中和内毒素的各种方法在本领域内是已知的。其包括向个体施用药剂,该药剂能选择性地除去内毒素或中和内毒素的活性。这可依赖宿主的免疫系统,辅助除去内毒素。例如,适宜的药剂可与内毒素结合,并允许个体的免疫系统从血液中清理内毒素-药剂复合物。减少循环内毒素水平的各种药剂是已知的,例如,抗内毒素抗体、白蛋白和 LPS 结合蛋白、LPS 中和 CD-14 抗体。

[0080] 取决于除去内毒素所用的具体装置,其他的血液成分可与内毒素一起除去。例如,除去内毒素的某些方法也可以除去血液中的其他毒素。这对患者是有利的。除去内毒素的某些方法也可以除去期望保持在血液中的其他血液成分。在此情况下,可将与内毒素一起除去的血液成分返回个体的血液。可从除去的内毒素混合物中纯化待返回的成分,或可以用不是来自该个体的新鲜等同成分来替代。

[0081] 从样品中除去内毒素的各种方法在本领域内已有记载。例如,EP-A-0129 786 记载了利用共价固定于聚苯乙烯纤维上的多粘菌素 B 从血液中除去内毒素。Falkenhagen 等 (Artificial Organs(1996)20 :420) 记载了利用聚乙烯亚胺包被的珠从血浆中除去内毒素。WO 01/23413 记载了用于从血液或血浆中选择性地除去内毒素的具有高度分散性的寡肽。US 5,476,715 记载了用于从样品中除去内毒素的材料,该材料包含具有具体粒径 (particle size) 和间距的、由丙烯酸和甲基丙烯酸的多聚体制备的多孔载体。Staubach 等 (Transfusion and Apheresis Science(2003)29 :93-98) 记载了吸附内毒素的设备,该设备基于固定的白蛋白。因此,有多种可用方法,用于从样品中除去内毒素。任何这些方法的任一种可用于本发明或适合用于本发明。熟练的技术人员能选择使用的适宜方法和条件。

[0082] 优选地,本发明的器械或方法有效实现循环血液内毒素水平的显著降低。例如,器械或方法可导致个体血液中内毒素水平降低至少 25%、至少 50%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 99% 或更多。

[0083] 本发明的这两个方面也是相关的。白蛋白能与血液中的内毒素结合。因此,白蛋白的除去也导致与白蛋白结合的一些内毒素的除去。此外,通过增加个体正常白蛋白的水平,血液中的白蛋白可以与循环内毒素再次结合,且可降低血液中游离内毒素的水平。然而,以这种方式实现的内毒素减少的量,相对较小,因此本发明优选利用单独的装置,用于 (a) 除去白蛋白,以及 (b) 减少内毒素水平。白蛋白除去和 / 或替代的这种作用可以补充减少内毒素的其他装置,并且有助于清理保留于个体血液中的内毒素。

[0084] 基于这些发现, 本发明人已经研发了用于治疗患有肝病个体的新方法和器械。这些包含用于从患有肝病个体的血液中除去白蛋白和内毒素两者的组件的组合。

[0085] 特别是本发明人已经开发了用于治疗患有肝病个体的器械, 该器械包含从个体的血液中选择性地除去白蛋白的装置以及从该个体的血液中选择性地除去内毒素的装置。优选地, 它们是两个单独的装置, 每个都针对实现这些作用之一。该器械也可包含向个体的血液供应不是来自该个体的新的白蛋白的装置。

[0086] 因此此类器械的使用, 可导致从个体的血液中除去白蛋白, 减少个体血液中内毒素水平, 并任选地将新的白蛋白导入个体的血液。这在许多方面都是有治疗益处的。从个体血液中除去内源性白蛋白可以除去与该白蛋白结合的有害的毒素, 也可以使异常的修饰形式的白蛋白从血液中除去。此类修饰形式通常具有降低的功能能力。选择性地导入新的白蛋白可用于以新鲜的白蛋白替代已经除去的白蛋白。优选地, 新鲜的白蛋白不包含于白蛋白分子结合的毒素, 且优选地, 新鲜的白蛋白是处于未修饰的形式。向血液中加入新鲜的白蛋白也可以用于补偿内源性白蛋白的水平, 其中由于肝病的原因, 这些内源性白蛋白的水平已降低。最后, 从患有肝病个体的血液中除去内毒素, 可有助于减少个体血液中嗜中性粒细胞的激活水平。这种嗜中性粒细胞激活的减少, 可导致感染、器官衰减以及死亡率的降低, 并且可改善个体对免疫抑制治疗和类固醇或抗生素治疗的反应性。

[0087] 本发明的方法和器械因此提供了治疗肝病的靶向途径, 提出了与此类疾病有关的多个因子, 并以多种方式使个体获益。

[0088] 因此, 本发明一方面涉及用于治疗患有肝病的个体的器械。该器械可包含许多组件, 所述组件可单独使用或组合使用。本发明的器械包含从个体的血液中选择性地除去白蛋白的装置以及从个体的血液中选择性地除去内毒素的装置, 或基本上由其组成。

[0089] 本文所述的任何装置可用于除去白蛋白或内毒素。一方面, 器械的单个组件既可用于除去白蛋白也可用于除去内毒素。通常, 器械的此类组件既包含除去白蛋白的装置又包含除去内毒素的装置。例如, 如果白蛋白和内毒素两者都通过与特异性配体结合而除去, 则对白蛋白具特异性的一种或多种配体以及对内毒素具特异性的一种或多种配体可一起用于器械的同一组件中。例如, 器械可包含如柱或过滤床的单个容器, 该柱或过滤床包含固定有两种配体的固相支持体。可将配体固定于不同的支持体或同一个支持体。因此可将白蛋白和内毒素从个体的血液中同时除去。

[0090] 可选地, 器械包括除去白蛋白和内毒素的单独装置。器械可包括能除去白蛋白的多于一个的装置和 / 或能除去白蛋白的多于一个的装置。

[0091] 器械可包含其他的组件。例如, 器械可包含向血液供应新的白蛋白即不是来自个体的白蛋白的装置。器械可用于体外使用。例如, 设计器械使来自个体的血液通过该器械, 从而在返回个体的身体前实现白蛋白的除去和内毒素的除去。

[0092] 两种可能的器械在图 11 中进行了举例说明。根据本文的讨论以及图 11 所列举的两种器械, 显然为了实现期望的效果, 可以以多种组合使用许多不同的组件。

[0093] 图 11 中第一个列举的器械的组件如下:

[0094] 1. 捕集白蛋白的装置。白蛋白捕集将白蛋白从患者的血液中选择性地除去。

[0095] 2. 用于实施白蛋白透析以除去毒素的装置。例如, 允许白蛋白交换的大孔 (大于 50kDa) 膜的使用, 通过允许患者的白蛋白与“清理”过滤器相互作用, 改善了毒素的除去。

[0096] 3. 清理白蛋白的过滤器。

[0097] 4. 内毒素除去组件。

[0098] 5. 新的白蛋白输注。

[0099] 图 11 中第二个列举的器械的组件如下：

[0100] 1. 细菌脂多糖捕集器。这是用于从患者的血液中除去 LPS/ 内毒素的装置。

[0101] 2. 用于实施白蛋白透析以除去毒素的装置。例如，图 11 中第一个例举的器械所讨论的。

[0102] 3. 清理白蛋白的过滤器。

[0103] 4. 白蛋白替代装置。例如，用于除去患者的白蛋白并用新鲜白蛋白替代的扩散梯度。

[0104] 5. 新的白蛋白输注。

[0105] 本发明也涉及利用本发明的器械治疗肝病的方法。例如，可将来自个体的血液与本发明的器械接触，以便将白蛋白和内毒素从血液中除去，并且，可将不是来自该个体的白蛋白任选地供应于血液。这种方法可体外实施，并且可将血液随后返回到该个体。

[0106] 本发明涉及治疗患有肝病个体的方法。该方法包含下列步骤，或基本上由其组成：(a) 从个体的血液中除去白蛋白；以及 (b) 降低个体血液中内毒素的水平。这可通过本文所述的任何方法或装置实现。该方法可体外实施。步骤 (a) 可利用透析实现。步骤 (a) 可利用能与白蛋白特异性结合的配体实现。步骤 (b) 可通过从血液中直接除去内毒素实现。步骤 (b) 可利用与内毒素特异性结合的配体实现。步骤 (b) 可通过向个体施用能降低血液中内毒素水平的治疗有效量的药剂实现。可利用上文所述的步骤 (a) 方法和步骤 (b) 方法的任何组合。任选地，该方法还包括将不是该个体的白蛋白导入该个体的血液中。

[0107] 本发明也涉及通过从血液中选择性地除去白蛋白和内毒素在体外处理血液的方法，其中血液来自患有肝病的个体。这一方法可通过本文所述的任何适宜装置来实现，并且可包含向血液中加入不是来自该个体的白蛋白的附加步骤。出于治疗目的，可将以此方式处理的血液返回到该个体，或用于其他目的。例如，在向不同的个体输血前，以此方式处理血液。

[0108] 根据本发明的待治疗的个体是患有肝病的个体。肝衰竭是肝病的最终阶段。取决于发作的快速性，肝衰竭分为多个类型。急性肝衰竭发展迅速，而慢性肝衰竭的发展可能需要数月或数年。根据定义，当肝患病且功能不佳以致脑病明显时，发生肝衰竭。任何渐进性肝病都可导致肝衰竭；实例包括：对乙醯氨基酚毒素、肝硬化、病毒性肝炎、肝转移癌。肝病的其他体征如黄疸、腹水、肝病性口臭以及凝血障碍表明，肝执行其正常生理功能有困难，但直到出现精神状态变化，才称为肝衰竭。

[0109] 患有肝病患者的预后难以评估，因为该状况具有许多因素。

[0110] 因此，待治疗的个体可以是肝代偿失调或表现出肝性脑病 (hepaticencephalopathy) 的个体。个体的肝可处于代偿期状态 (compensated state)。个体可以患有慢性肝病。个体可以患有肝硬化，例如，伴有或不伴有酒精性肝炎。个体可以患有急性肝衰竭。个体可以患有肝性脑病。

[0111] 急性和慢性肝病两者的发作都可以归因于异生素原因。例如，个体可能暴露于引起肝损伤的化学品、药物或某些其他药剂。个体对引起肝损伤的非处方药、处方药

以或“娱乐性”药有反应。个体可能已经服用了 Rezulin™(troglitazone(曲格列酮); Parke-Davis)、Serzone™(nefazodone(盐酸奈法唑酮); Bristol-Myers Squibb) 或认为引起肝损伤的其他药物。个体可能服用了过度剂量的具体药物或服用了超过推荐剂量的能引起肝损伤的药物。例如,个体可能已经服用了过度剂量的扑热息痛。个体可能已经解触了引起肝损伤的化学品,例如在工作的地方。例如,个体可能已接触如工业和农业环境下的化学品。个体可能已食用了含有能引起肝损伤的化合物的植物,特别是,在个体是动物如食草动物的情况下。例如,个体可能已食用了含有吡咯里西啶生物碱的植物如泽菊(ragwort)。

[0112] 药物相关的肝毒性,包含所有患有急性肝病(急性肝衰竭)的病例的 50%多。在美国和英国,对乙酰氨基酚(也称为扑热息痛和 N-乙酰基-p-氨基苯酚)毒性是急性肝衰竭最常见的原因。以治疗性剂量或适度过量剂量服用对乙酰氨基酚的长期适量至大量饮用酒精者,处于严重肝损伤且可能是急性肝衰竭风险中。酒精的饮用加强了对乙酰氨基酚的毒性作用。特异质药物(idiosyncratic drug)毒性也促进了急性肝衰竭。特异质药物毒性被认为是超敏性应答,其中,个体以药理异常方式响应药物。这种异常应答可导致急性肝衰竭。

[0113] 急性肝衰竭或慢性肝病可由感染致病性有机体引起。例如,肝病可归因于病毒感染。特别是,个体感染或可能已经感染了引起肝炎的病毒。个体可能患有慢性病毒肝炎。病毒可以是例如乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒或丁型肝炎病毒。在某些情况下,特别是如果个体患有病毒性肝炎时,该个体可能也感染了 HIV-I 或 II。个体可能患有 AIDS。个体可能已经感染或感染了引起肝病或其他有机体,特别是在生命周期的某些阶段存在于肝中的那些有机体。例如,个体可能有或可能已经有肝吸虫。

[0114] 个体可以患有导致慢性肝病或增加患慢性肝病风险的遗传性疾病。例如,个体可患有一种或多种肝性血色病(hepatic hemochromatosis)、肝豆状核变性(Wilson's disease)或 α -1-抗胰蛋白酶缺乏症(α -1-antitrypsin deficiency)。个体可患有引起肝结构或功能异常的某些遗传病症,这增加了肝纤维化的可能性。个体可以从遗传上倾向于发展自体免疫病症,该自体免疫病症损伤肝并因此促进了肝纤维化。

[0115] 慢性肝病可以是酒精诱导的。待治疗的男性或女性可能是或已经是酗酒者。他或她平均每周可能或可能已经饮用了 50 或更多单位的酒精、每周 60 或更多单位的酒精、每周 75 或更多单位的酒精以及甚至每周 100 或更多单位的酒精。一单位酒精的测量在国家与国家之间不同。在文本中,根据英国标准,一单位等于 8 克乙醇。

[0116] 男性或女性可能已经饮用此类级别的酒精达 5 年或更长、15 年或更长或 20 年或更长。个体可能已经饮用了此类级别的酒精达最多 10 年、最多 20 年、最多 30 年甚至最多 40 年。在酒精诱导的肝硬化的情况下,个体可以是年长者,例如 25 岁或更大、35 岁或更大、45 岁或更大甚至超过 60 岁。

[0117] 个体可以是雄性或者雌性。女性比男性更易于受酒精副作用的影响。女性在比男性更短的时间范围内且因更小量的酒精发展成酒精慢性肝病。看起来没有解释雌性酒精肝损伤易感性增加的单一因素,但激素对酒精代谢的影响可以起重要作用。

[0118] 因此,个体可以患有酒精性肝炎。酒精性肝炎的范围从具有异常实验室测试(abnormal laboratory tests)为唯一疾病指征的适度肝炎,到伴有并发症的严重肝功能障碍,所述并发症如黄疸(胆红素滞留引起的黄皮肤)、肝性脑病、腹水、出血性食管静脉曲张

张 (bleeding esophageal varices)、凝血异常和昏迷。

[0119] 个体可患有已知导致肝损伤的多种其他状况中的一种或多种,所述状况如原发性胆汁性肝硬化 (primary biliary cirrhosis)、自体免疫慢性活动性肝炎 (autoimmune chronic active hepatitis) 和 / 或血吸虫病 (寄生感染)。个体可患有或可能已患有胆道阻塞 (bile duct blockage)。在某些情况下,不知道肝病的根本原因。例如,个体可能已经被诊断为患有隐源性肝硬化 (cryptogenic cirrhosis)。因此,个体疑似患有上文所列的任何状况。

[0120] 诊断肝病如急性肝衰竭和肝性脑病的方法在本领域内是公知的,特别是对于本领域的临床医生和兽医而言。优选,个体将被例如医药专业人员或兽医专业人员诊断为已患有肝病和肝性脑病。个体可显示与肝病有关的一种或多种症状,如黄疸、腹水、皮肤变化、液体潴留 (fluid retention)、指甲变化、易于擦伤 (easy bruising)、鼻出血、食管静脉曲张,且在雄性个体中可患有胸部增大。个体可出现筋疲力尽 (exhaustion)、疲劳 (fatigue)、失去胃口、恶心、虚弱和 / 或体重减少。个体也可出现与肝性脑病有关的一种或多种症状,如一种或多种意识错乱、定向障碍、痴呆、恍惚、昏迷、脑水肿、多器官衰竭 (呼吸衰竭、心血管衰竭或肾衰竭)、肌肉坚硬 / 僵直、癫痫症或难语症 (speech impairment)。待治疗的个体可正在或未服用治疗肝病的其他药物。待治疗的个体可以处于发展为肝性脑病风险中。

[0121] 肝病可已经由或可由体检证实,所述体检包括诸如超声波的技术。可以已经采用肝活检来寻找纤维化、坏死细胞、细胞变性 (cellular degeneration) 和 / 或炎症的病灶以及肝病的其他特征。可能已经评估了个体的肝功能,以确定它是否在个体体内受到损伤。可以表征肝病的本质以及根本的原因。可以确定接触导致肝病的药剂的任何病史。

[0122] 待治疗的个体可处于肝性脑病事件风险中,例如,等待肝移植的患者、手术和 / 或门静脉高压症患者。处于肝性脑病事件风险中的患者是未曾遭受任何肝性脑病事件或在延长的一段时间 (约 12 周或更长) 内未遭受任何肝性脑病事件但患有产生肝性脑病事件风险的病症或医学状况的人。肝性脑病是特征为在患有肝病或肝功能障碍的患者中存在脑功能障碍的临床状况。在肝性脑病中,智力障碍 (mental disturbance) 的范围很广,从主要影响是生活质量下降的最轻障碍到导致昏迷和最终死亡的明显障碍。

[0123] 为本发明方法实施对象的个体可以是肝移植患者、遭受再灌注损伤 (reperfusion injury) 的个体 (如肝移植后移植物内发生的再灌注损伤)、或处于发展成多器官衰竭或已发展为多器官衰竭的患者。

[0124] 如果利用待施用于个体的药剂,降低内毒素水平,则可以多种剂量形式施用该药剂。因此,药剂可口服施用,例如,作为片剂 (tablets)、troches (药片)、锭剂 (lozenges)、水性或油性悬浮液、可分散的粉剂或颗粒。药剂也可以肠道外施用,或者皮下、静脉内、肌肉内、胸骨内、跨皮或通过输注技术施用。药剂也可以以栓剂的形式施用。医师能为每个具体患者确定所需的施途径。

[0125] 药剂的剂型取决于诸如以下的因素:药剂的确切性质、是否规定药物用途或兽医用途等。可将用于治疗肝病的药剂配制为供同时、单独或顺序使用。

[0126] 本发明中用于施用的药剂通常与药学上可接受的载体或稀释剂一起配制。药物载体或稀释剂可以是例如等渗液。例如,固体口服形式可含有如下物质以及活性化合物:稀释剂,如乳糖、葡萄糖、蔗糖、纤维素、玉米淀粉或马铃薯淀粉;润滑剂,如硅石、云母、硬脂酸、

硬脂酸镁或钙和 / 或聚乙二醇 ; 粘合剂 (binding agents), 如淀粉、阿拉伯树胶、明胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素或聚乙烯吡咯烷酮 ; 崩解剂 (disaggregating agents), 如淀粉、褐藻酸、海藻盐或羧甲淀粉钠 ; 沸腾混合物 (effervescing mixtures) ; 染料 ; 增甜剂 ; 润湿剂, 如卵磷脂、聚山梨醇酯、烷基硫酸盐 ; 以及通常, 药物剂型所用的无毒且药理学上无活性的物质。此类药物制剂可以已知的方式制造, 例如, 通过混合、成颗粒、成片剂、包糖衣或包膜过程。

[0127] 口服施用的液体分散剂 (liquid dispersions) 可以是糖浆、乳剂或悬浮液。糖浆可以含有例如蔗糖或具有甘油和 / 或甘露醇和 / 或山梨醇的蔗糖, 作为载体。

[0128] 悬浮液和乳剂可以含有例如天然树胶、琼脂、藻酸钠、果胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素或聚乙烯醇, 作为载体。用于肌肉内注射的悬浮液或溶液可含有下列物质以及活性化合物 : 药学上可接受的载体, 如无菌水、橄榄油、油酸乙酯, 乙二醇, 如丙烯乙二醇, 以及, 如果需要, 适当量的盐酸利多卡因。

[0129] 静脉内施用或输注的溶液可含有例如无菌水作为载体, 或优选地, 它们采用无菌、水性、等渗盐溶液的形式。

[0130] 根据各种参数特别是根据所用的物质、待治疗患者的年龄、体重和状况、施用途径以及所需的方案, 确定药剂的剂量。

[0131] 同样, 医师能确定任何具体患者所需的施用途径以及剂量。根据特异性抑制剂的活性、待治疗个体的年龄、体重和状况、变性的类型和严重性以及施用的频率和途径, 每日剂量通常是每 kg 体重约 0.1-50mg。优选地, 每日剂量水平是 5mg-2g。

[0132] 本说明书提到的所有出版物和专利申请代表本发明所述技术领域技术人员的水平。

[0133] 通过引用将所有出版物和专利申请并入本文的程度, 如同明确和单独地指出每个单一出版物或专利申请通过引用并入。

[0134] 尽管出于理解的目的, 以图解和实例的方式, 稍微详细地描述了前述发明, 但对本领域技术人员显然的是, 在附加的权利要求的范围内, 可做出某些变化和修饰。

[0135] 下列实施例说明了本发明。

[0136] 实施例

[0137] 实施例 1: 患有肝硬化患者的白蛋白研究

[0138] 我们旨在利用自旋标记物和电子顺磁共振光谱术进行严重性渐增的肝病的白蛋白功能性定性评估。将白蛋白的自旋标记物 16- 氮氧自由基硬脂酸 (16-doxil stearic acid, SL) 加入来自健康志愿者 (对照, $n = 5$)、稳定性良好的代偿期肝硬化受试者 (肝硬化的, $n = 5$) 以及患有急性或慢性肝衰竭 (acute or chronic liver failure, ACLF, $n = 10$) 患者的血浆。5 名患者用分子吸附剂再循环系统 (molecular adsorbents recirculating system, MARS, 4 段时间 (sessions) 处理, 以及 5 名用标准的医药疗法处理。MARS 前以及 MARS 7 天后, 进行测量。随后将乙醇的等分试样加入到标记的血浆样品中, 且每次加入后记录 EPR 光谱。对记录的光谱的分析提供了有关白蛋白构象和结合特性的信息。对于所测量的每个参数, 发现患者的白蛋白比健康的志愿者对照的白蛋白具有更低的功能能力。在肝衰竭中, 发现功能进一步降低。采用 MARS 治疗, 未观察到白蛋白状态变化。

	健康对照	稳定的肝硬化	ACLF
[0139] 分子的柔性(D _R) [≥]	4.706**	1.194	-1.613
脂肪酸结合(K _B) [≥8.5]	17.34*	4.888	1.375
构象稳定性(L ₂) [2.9]	2.939	2.335 ^{††}	1.301
转运性质(RTQ) [%]	84.60*	49.20 [†]	10.83
转运效率(RTE) [%]	87.00*	49.20	42.33
解毒能力(DTE) [%]	130.3*	49.80 [†]	4.000

[0140] 与稳定的肝硬化受试者相比, *, $p < 0.01$, 与 AoCLF, 0 天相比, [†], $p < 0.05$, ^{††}, $p < 0.01$ 。[] 内的值表示之前建立的正常健康对照值。

[0141] 本研究的结果清楚地显示, 患者的白蛋白在结构和功能上严重地受到损害, 其在肝衰竭中恶化。这些患者通常与血浆白蛋白浓度降低有关, 且这种因素组合将导致非常低的功能能力。尽管已表明 MARS 除去白蛋白结合毒素, 但其不能解释患者白蛋白性能低劣的根本问题。

[0142] 在此同一组患者中, 我们也检测了存在缺血修饰白蛋白 (IMA) 的血浆样品。通过检查白蛋白与金属原子结合的能力, 确定 IMA。在功能白蛋白中, 金属结合功能很高, 但氧化应激 (如缺血和再输注过程中所经历的) 后, 蛋白的结构受到破坏, 且与金属结合的能力减弱。

[0143] 在我们的患者组中, 我们发现, IMA 的量 (相对于血浆白蛋白含量, 参阅图 1) 在患有肝病的患者中, 与健康的对照受试者相比, 显著增加 ($p < 0.001$)。在稳定的肝硬化受试者和 ACLF 受试者间也发现了显著的增加, 再次表明白蛋白的进一步损伤与疾病的严重性增加有关。

[0144] 尽管, IMA 形成过程中产生的蛋白精确修饰仍然是研究的主题, 但已将区域鉴定为 N 末端 20 个氨基酸残基内。这非常有意义, 因为其明显不同于利用上文所述的 EPR 标记技术所检测的确定的脂肪酸结合位点, 并且表明, 存在许多与严重的肝病有关的翻译后修饰过程。

[0145] 实施例 2: 嗜中性粒细胞的功能研究

[0146] 我们研究的目的是系统地检测患有酒精性肝炎患者的基本的嗜中性粒细胞功能 (氧化猝发和吞噬作用), 并检测其与感染速率、器官衰竭和存活的关系。在体外研究中, 我们研究了嗜中性粒细胞功能缺陷是否归因于激素因素以及从血浆中除去内毒素是否恢复患者的嗜中性粒细胞功能。

[0147] 对于具有细胞的实验, 用全血或分离的嗜中性粒细胞 (以及患者的血浆) 进行 Phagoburst[®] 分析或 Phagotest[®] 分析 (Orpegen Pharma, Heidelberg, Germany)。对于所有的实验, 采取严紧防范措施, 通过无菌条件下操作并使用无内毒素的设备避免内毒素污染。

[0148] 方法

[0149] 患者的选择

[0150] 所有患者或他们的亲属都签订了知情同意书,并且本研究获得当地伦理委员会的许可。在有临床指征的经颈静脉肝活检时,筛查被确认具有酒精性肝硬化迹象的患者进行该研究。如果患者被确认具有表现为黄疸、腹水或肝性脑病 1 级或 2 级的酒精性肝硬化急性代偿失调 (acutedecompensation),且不存在感染微生物的迹象 (尿、血液、痰和腹水的常规培养),则包括他们。如果患者小于 18 或大于 75 岁,或在胃肠出血的三天内具有下列迹象:器官衰竭 (变力需要 (inotrope requirement)、肾衰竭 - 肌酸酐 > 150、肝性脑病 3 级或 4 级,需要机械通气,严重的心功能障碍)、低钠血症 (hyponatremia)、肝性 / 肝外恶性肿瘤 (hepatic/extra-hepaticmalignancy),或在加入本研究前,接受了任何免疫调节治疗,则将他们排除。

[0151] 研究的设计方案

[0152] 校正任何相关的电解液干扰或血容量不足后,采集血液样品,并用于常规生物化学、嗜中性粒细胞功能、细胞因子谱 (cytokine profile) 以及硫代巴比妥酸 (T-BARS/修饰的 MDA) 检测。将来自患者和健康志愿者的外周静脉血在无菌的条件下收集于无热原试管 (BD 肝素锂真空抗凝管 (Vacutainer Lithium-Heparin), 每个试管 60U, Beckton and Dickinson, Plymouth, UK) 中。对于具有细胞的实验,将血液保持在室温下;用于收集血浆时,将血液立即放置于冰上。离心后,将血浆在无热原的条件下等分到无内毒素的低温保存管 (cryotube, Corning Inc., Corning, NY) 中,并储存于 -80℃,直到进一步分析。用 100 μ L 全血或 50 μ L 分离的嗜中性粒细胞以及 50 μ L 血浆进行 **Phagoburst[®]** 或 **Phagotest[®]**。对于所有的实验,采取严紧预防措施,通过无菌操作和使用无内毒素设备避免内毒素污染。用常规方法评估胆红素、白蛋白、肝功能实验、血凝结参数、全血计数以及 C 反应蛋白 (C-reactive protein, CRP)。计算 Maddrey 辨识功能 (Maddrey' s discriminant function) 和 Pugh 评分 (Pugh score)。在超过 90 天的时间段内,对患者进行前瞻性地追踪研究。记录器官功能障碍的发生和死亡率。按常规方进行血液培养物的筛选,我们小组的策略是在大多数患者呈递时,使用预防性抗生素。

[0153] 嗜中性粒细胞

[0154] 在全血分析 (如下文所述) 中研究嗜中性粒细胞,或通过一步梯度离心 (如结果部分所示,参阅附件) 分离后研究嗜中性粒细胞。

[0155] 嗜中性粒细胞激活 (氧化猝发) 和吞噬作用:根据制造商的说明书,用 **Phagoburst[®]** 试剂盒 (Orpegen Pharma, Heidelberg, Germany) 测定嗜中性粒细胞的百分比,所述嗜中性粒细胞通过用经处理易受调理素作用的大肠杆菌刺激或不用任何刺激物刺激产生活性氧化剂。利用 FITC 标记的经处理易受调理素作用的大肠杆菌 (参见附件),用 **Phagotest[®]** (Orpegen Pharma, Heidelberg, Germany) 测量表现出吞噬作用以及单个细胞吞噬活性的嗜中性粒细胞的百分比。对嗜中性粒细胞正向和侧向散射特征 (图 2) 进行设门,随后分析 CD16 阳性细胞 - FITC 阳性细胞的百分比以及荧光强度几何平均值 (GMFI),所述百分比对应于经历吞噬作用的嗜中性粒细胞,所述荧光强度几何平均值对应于被一个细胞吞噬的细菌的数目。为了避免由于细菌的批次差异而导致的变异性,对于所用的每批新细菌,将结果根据至少 3 个健康对照样品的平均值进行标准化。将样品分析两次或三次。

[0156] 与内毒素一起温育

[0157] 制备 (大肠杆菌 0111 :B4 Lot 085K4068, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 内毒素, 作为 1mg/ml 的母液, 并用 PBS 新鲜稀释为指定的浓度。在进行 **Phagotest**[®] 或 **Bursttest**[®] 前, 将全血在水浴中 37°C 与各自浓度的内毒素一起温育 1 小时。

[0158] 从患者的柱中除去内毒素

[0159] 利用 **Detoxigel**[®]: 用含有由固定的多粘菌素 B 组成的内毒素除去凝胶的亲性和包装预填充柱 (Affinity-pack prepacked columns, Pierce Biotechnology, Rockford, IL), 从血浆样品中除去内毒素, 所述多粘菌素 B 与细菌脂多糖的脂质 A 部分结合。将 100 μ L 这种无内毒素的、稀释的血浆样品与 50 μ L 细胞悬浮液一起温育, 进行所示的 **Bursttest**[®] 或 **Phagotest**[®] (参阅附件)。

[0160] 利用 CD14 抗体: 在进行 **Bursttest**[®] 或 **Phagotest**[®] 前, 将 100 μ L 血浆和 50 μ L PBS 与 5 μ L 抗人 CD14 抗体 (克隆 11D18, Immunotools, Friesoythe, Germany) (已知中和 LPS) 一起温育 60 分钟。

[0161] 细胞因子

[0162] 利用商购装置 (BioSource International, Nivelles, Belgium), 测定血浆的 TNF α 、sTNF α R1、sTNF α R2、IL-6 以及 IL-8。

[0163] 丙二醛 (Malondialdehyde) 和前列腺素 F2 α

[0164] 利用本领域内已知的修饰的硫代巴比妥酸反应物分析法, 测定丙二醛 (MDA)。用商购的 EIA 试剂盒 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) 分析无 8- 异前列腺素的 F2 α 。

[0165] 统计学

[0166] 为了对两组进行比较, 如果适用, 进行卡方检验 (Chi-Square test)、t 检验 (t-test) 或曼-特尼检验 (Mann-Whitney test); 为了对多于两组进行比较, 如果适用, 使用 ANOVA 检验以及用于数据组 (data sets) 的 Turkey 事后分析 (两方差齐 (equal Variances)) 或 Dunnett C 事后分析 (无两方差齐)。为了评估诊断的准确性, 构建接受者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线, 计算曲线下的面积 (AUROC)。通过对数秩检验 (log rank test), 分析存活差异。Pearson 相关系数用来评估变量之间的关系。将结果表示为平均值 $\pm$ SEM。p < 0.05 认为是有意义的。

[0167] 结果

[0168] 患者特征

[0169] 在筛查的 72 名患者中, 包括了 63 名患者。与仅肝硬化相比, 利用改良的 NASH 评分系统 (肝硬化 +AH), 患者从组织学上被归为患有显著炎症的患者。与仅患有肝硬化的患者 (n = 40) 相比, 患有肝硬化 +AH 的患者 (n = 23) 的疾病更严重, 如更高的 MELD 和 Pugh 评分 (p < 0.001) 所证明的。患有肝硬化 +AH 的患者也具有显著升高的 CRP (p < 0.005)、白细胞 (p < 0.001)、胆红素 (p < 0.001) 以及凝血酶原时间 (p < 0.001)。患者的 TNF α 、IL6、IL8、sTNF α R1、sTNF α R2、MDA 和前列腺素 F2 α 水平明显比对照的高。患有肝硬化 +AH 的患者的 IL6、IL8 和 sTNF α R2 水平明显升高, 但对于 TNF α 、sTNF α R1 和氧化应激而言, 并未注意到有统计学意义的变化。未发现与疾病严重性相互关联。使用来自这些 63 名患者的血液或血浆进行体外实验。这些 63 名患者的基线临床数据, 并未明显不同于全队列 (the whole cohort)。表 1 表示所有患者以及具有高静止猝发和低静止猝发的亚组的基线特征

(见下文)。

[0170] 患有酒精性肝硬化患者的氧化猝发和吞噬作用

[0171] 在未受刺激的患者的嗜中性粒细胞中,与对照相比,嗜中性粒细胞的氧化猝发增加。来自所有患有酒精性肝硬化患者的嗜中性粒细胞的氧化猝发是健康对照的 5.6 倍 ($p < 0.001$)。与仅患有肝硬化的患者 ($p < 0.001$) 或对照 ($p < 0.001$, 图 2A) 相比,来自患有肝硬化 +AH 的嗜中性粒细胞的静止猝发明显升高。指示激发的 fMLP 刺激,与对照相比,在患有肝硬化 ($p = 0.01$) 和患有肝硬化 +AH ($p = 0.001$) 的患者中引起明显升高的氧化猝发,然而对于响应 PMA,组之间没有差别。静止猝发和 fMLP 应答之间的差异在患有肝硬化 +AH 的患者 (1.8 ± 4.7) 中比患有肝硬化的患者中 (22.4 ± 6.9 , $p = 0.02$) 明显更低,表明在患有肝硬化 +AH 的患者中加入 fMLP 不能增强细胞功能。而且,用大肠杆菌刺激后,与仅患有肝硬化的患者 ($p = 0.001$) 或对照 ($p < 0.001$, 图 2B) 相比,在肝硬化 +AH 患者中,来自静止水平的氧化猝发的相对增加显著地减少。

[0172] 通过荧光强度几何平均值 (GMFI) 测量吞噬能力,荧光强度几何平均值表示被一个细胞吞噬的细菌的数目。患有肝硬化 +AH 的患者吞噬的细菌明显少于对照 ($p = 0.031$, 图 2C)。吞噬至少一个细菌的细胞的百分比在组之间没有差异。

[0173] 氧化猝发和吞噬作用与感染、器官衰竭以及存活的相关

[0174] 17 名发展为器官衰竭,13 名 (所有经研究的患者的 21%) 在索引入 (index hospital admission) 院期间死亡。遇到的最常见的器官衰竭是肾脏衰竭,在患者中发现 15 名患有器官衰竭 (88%)、4 名发展为器官衰竭,作为多器官衰竭的一部分,需要通气和循环支持。90 天末,14 名患者 (22%) 死亡,47 名存活,2 名失去追踪。发现静止氧化猝发可预测 90 天的存活 (AUROC 0.77, $p = 0.003$, 图 3A) 和器官衰竭 (AUROC 0.76, $p < 0.001$)。对于预测死亡而言,截止 $< 55\%$ 的静止猝发具有 77% 的灵敏度、69% 的特异性。静止氧化猝发 $< 55\%$ 的患者的存活明显好于静止猝发 $\geq 55\%$ 的患者 ($p < 0.005$, 图 3B)。吞噬功能也预测存活 (AUROC 0.80, $p = 0.02$, 图 4A) 和器官衰竭 (AUROC 0.91, $p < 0.0001$)。在所研究的患者群体中低于标准的 42% 的 GMFI 具有预测死亡率的 86% 的灵敏度、70% 的特异性 (图 4B)。

[0175] 在 42 名患者 (66%) 中,临床上怀疑在入院过程中感染,尽管包括的患者中没有一个是评估嗜中性粒细胞功能时患有证实的感染。在上下文中应该考虑这些数据,因为一旦怀疑感染,我们的处理方案就必须使用光谱抗生素。在这些患者 (62%) 的 26 名患者中,证实培养物阳性感染。在 13 名中,发现多于一种有机体。在住院的早期,具有高静止猝发 ($> 55\%$) 的患者更可能发展为培养物阳性感染 (57% 对比 27%, 卡方 (chi-square) $p = 0.01$), 且多于一种有机体 ($n = 10$; 在具有低静止猝发的患者中 $n = 3$)。患有肝硬化 +AH 的患者更可能发展为培养物阳性感染 (65% 对比 28%, $p = 0.004$)。发展为培养物阳性感染的那些患者更可能发展到器官衰竭 ($p = 0.001$) 和死亡 ($p = 0.002$)。GMFI 低于 42% 的患者中的 67% 发展为培养物阳性感染,而 GMFI 高于 42% 的患者仅有 21% 发展为培养物阳性感染 ($p = 0.007$)。低 GMFI 的患者在住院早期出现了感染 (9 天对比 47 天, $p = 0.03$)。

[0176] 患者血浆以及正常血浆对嗜中性粒细胞氧化猝发的影响

[0177] 来自高静止猝发患者的血浆 ($> 55\%$; $n = 6$) 在正常嗜中性粒细胞 ($p = 0.005$) 中诱导静止猝发,而低静止猝发患者的血浆 ($< 55\%$; $n = 6$) 不能如此诱导 (图 5)。猝发

诱导作用可在混合血浆和细胞后立即检测,但在最多一个小时的温育后也可显示(结果未显示)。这种结果表明,在患者的血浆中存在使嗜中性粒细胞激活的可传递因子。

[0178] 当将在全血分析中分离的高静止猝发患者的嗜中性粒细胞与正常血浆一起温育时,与和患者自身的血浆一起温育的分离的嗜中性粒细胞相比,静止猝发显著降低($p = 0.02$;图 6)。这些实验表明,除去血浆中的因子能减少患者细胞的高静止猝发。

[0179] 患者的血浆以及正常血浆对吞噬作用的影响

[0180] 与来自低静止猝发患者的血浆一起温育的正常嗜中性粒细胞,不同于对照,而与来自高静止猝发患者的血浆一起温育的正常嗜中性粒细胞表现出 GMFI 减少 22% ($p = 0.03, n = 6$)。和与自身血浆一起温育的患者的嗜中性粒细胞相比,与正常血浆一起温育 60 分钟的患者的嗜中性粒细胞表现出吞噬作用增加 22% ($p = 0.03, n = 6$)。这些结果表明,吞噬功能的损伤可以归因于血清因子,该因子是可传递的并且是可逆的。

[0181] 内毒素对氧化猝发和吞噬作用的影响

[0182] 将来自 5 名健康志愿者的血液与浓度渐高的内毒素一起温育。静止猝发存在剂量依赖性增加 ($p < 0.0001$, 单因素 ANOVA 及 Turkey 事后分析)。通过将患者的嗜中性粒细胞与内毒素一起温育,相对 GMFI 减少了 20% ($n = 8, p = 0.02$, 图 8)。这些结果表明,内毒素以剂量依赖性方式激活正常嗜中性粒细胞,由此模拟通过与患者的血浆一起温育所观察的影响。

[0183] 从患者血浆中除去内毒素的影响

[0184] a. 利用去毒凝胶 (Detoxi-Gel) 柱:来自在全血分析中证明具有高静止猝发患者的血浆,能在正常的嗜中性粒细胞中诱导高静止猝发。无内毒素血浆(通过流经柱获得)在正常的嗜中性粒细胞中不诱导高静止猝发 ($p < 0.001, n = 9$)。来自低静止猝发患者的血浆 ($p = 0.91, n = 4$) 和正常血浆 ($p = 0.25, n = 3$) 未改变静止猝发(图 9)。与和未处理的血浆一起温育的细胞相比,从高静止猝发患者的血浆 ($n = 11$) 中除去内毒素使 GMFI 增加了 31% ($p = 0.03$)。来自低静止猝发患者的血浆 ($p = 0.16, n = 8$) 以及穿过柱的正常血浆 ($p = 0.85, n = 5$) 引起 GMFI 的任何变化(图 11)。这组实验表明,通过多粘菌素 B 除去内毒素逆转患者血浆的猝发诱导和吞噬作用降低作用。

[0185] b. 利用 LPS 中和抗体:与中和 LPS 的抗人 CD14 抗体一起温育,防止来自高猝发患者的血浆 ($p < 0.001, n = 7$) 诱导正常细胞高猝发。来自低猝发患者的血浆 ($p = 0.733, n = 8$) 或正常血浆 ($p = 0.25, n = 3$) 与抗体一起温育,未改变猝发(图 9)。来自高猝发的患者的血浆与 LPS 中和抗人 CD14 抗体一起温育,使 GMFI 增加了 20% ($p = 0.04, n = 11$),而当使用来自低猝发患者的血浆 ($p = 0.17, n = 8$) 或正常血浆 ($p = 0.78, n = 3$) 时,这种抗体未引起 GMFI 的任何变化(图 10)。这些发现支持内毒素负责诱导嗜中性粒细胞的高静止猝发的观点。

[0186] 表 1

[0187]

	全部(n=63)	低静止猝发(n=35)	高静止猝发(n=28)
死亡(%)	22	9	42
器官衰竭(%)	26	12	43
年龄(年)	50.3±1.3	52.4±2.0	47.8±1.6
肝功能			
胆红素(mmol/L)	151.2±20.9	104.8±21.8	199.8±34.8 ¹
PT (sec)	15.3±0.61	13.5±0.5	16.8±0.9 ¹
白蛋白(g/L)	29.8±1.1	32.7±1.3	28.8±1.3 ¹
Maddrey 辨识功能 (n=23, 患有 AH)	43.4±6.8	40.0±9.5	44.6±8.0
Pugh 评分	9.3±0.4	8.3±0.4	10.2±0.5 ¹
MELD	15.6±1.8	12.2±2.0	19.1±3.5
激发(响应 fMLP)	57.5±5.1	47.5±7.9 ²	89.1±3.2 ^{1,2}
细胞因子/炎症			
TNF α (pg/mL)	19,6±6.5	18,3±6.9	22,3±14.6
IL-6 (pg/mL)	49,4±14.9	21,9±7.9	106,1±39,6
IL-8 (pg/mL)	180.5±56.9	101,8±55.8	337,9±122,8
氧化应激			
MDA (Mm/L)	3.2±0.5	3.2±0.58	3.0±0.7
前列腺素 F2 α (pg/mL)	346.8±49.6	296.9±43.8	394.7±81.2

[0188] ¹ 与低猝发相比具有显著性[0189] ² 与对照相比具有显著性

[0190] 表 2

[0191]

	儿童 C(n = 27)	儿童 B(n = 26)	儿童 A(n = 10)	对照 (n = 13)
静止猝发%	67.0±6.5 ^{1,2,3}	38.2±7.2 ^{1,3}	36.0±9.0 ¹	8.9±2.7
刺激后猝发 - 静止猝发%	32.4±6.8 ^{1,2,3}	57.5±7.0 ^{1,3}	60.4±8.7 ¹	76.8±7.7
吞噬作用%	105.9±2.8 ^{1,2,3}	110.18±3.3	1075.5±	99.4±7.5
GMFI%	50.7±9.5 ¹	87.1±13.6	104.6±17.1	101.0±9.2

- [0192] 与对照相比, $1p < 0.05$
 [0193] 与儿童 B 相比, $2p < 0.05$
 [0194] 与儿童 A 相比, $3p < 0.05$
 [0195] 感染表
 [0196] 记录的受研究的患者的培养物阳性感染
 [0197]

高猝发					低猝发				
第一有机体			第二有机体		第一有机体			第二有机体	
患者	日	有机体	日	有机体	患者	日	有机体	日	有机体
1	4	EC	29	MRSA	2	16	EC		
4	14	EC	19	CNS	14	23	大肠杆菌		
5	9	CNS	34	EC	17	9	MRSA		
7	4	EC	10	CNS	23	15	金黄色葡萄球菌		
12	2	白色念珠菌 (<i>C. albicans</i>)			33	15	丙酸杆菌属 (<i>Propionibacterium</i>)	34	CNS
13	10	金黄色葡萄球菌(<i>St. aureus</i>)							
15	8	CNS							
20	5	EC	5	CNS					
35	6	EC							
36	4	CNS	4	EC					
45	2	CNS	3	CNS					
48	20	大肠杆菌							
61	6	白色念珠菌							
62	7	白色念珠菌	9	EC					

[0198] EC: 肠球菌属 (*Enterococcus*), MRSA: 甲氧苯青霉素抗性金黄色葡萄球菌 (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), CNS: 凝固酶阴性葡萄球菌 (*coagulase-negative Staphylococcus*), St.: 葡萄球菌属 (*Staphylococcus*), Str.: 链球菌属 (*Streptococcus*), C.: 念珠菌属 (*Candidia*)

[0199] 方法学

[0200] 嗜中性粒细胞的激活 (氧化猝发) 和吞噬作用

[0201] 根据制造商的说明书,用**Phagoburst[®]**试剂盒(Orpegen Pharma, Heidelberg, Germany)测定通过用经处理易受调理素作用的大肠杆菌刺激或无任何刺激物刺激而产生活性氧化剂的嗜中性粒细胞的百分比。简而言之,将100 μ l 肝素化的全血或分离的嗜中性粒细胞(如所示)与20 μ l 细菌、N-甲酸基甲二磺酰基-亮氨酸-苯丙氨酸(N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine, fMLP)、佛波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)一起或无任何刺激物的情况下37℃温育20分钟。通过二氢罗丹明123(Dihydrorhodamine 123)的加入和氧化,监控氧化猝发过程中活性氧化剂的形成。为了鉴定嗜中性粒细胞,将细胞用抗-CD16-PE抗体(**IOTest[®]**, Beckman Coulter)染色,并利用Cellquest[™]软件,通过荧光激活细胞分选术(fluorescence activated cell sorting, FACS), (Becton Dickinson FACScan, San Jose, CA.)进行分析。根据嗜中性粒细胞正向和侧向散射特性进行设门,并随后通过绿色荧光(FL-I)测量法,测定产生活性氧代谢物(reactive oxygen metabolites)的CD16阳性细胞的百分比。将样品分析三次或两次。静止猝发的分析间(interassay)变异系数(coefficient of variation, CV)为5.4%,经刺激的猝发的分析间CV为4.2%,静止猝发的分析内(intrassay)CV为4.7%,经刺激的猝发的分析内CV为2.4%。

[0202] 嗜中性粒细胞的吞噬作用

[0203] 利用FITC标记的、经处理易受调理素的作用的大肠杆菌,用**Phagotest[®]**(Orpegen Pharma, Heidelberg, Germany)测量表现出吞噬作用和单个细胞吞噬活性的嗜中性粒细胞的总百分比。将100 μ l 全血或分离的嗜中性粒细胞(如下文所示)与20 μ l 细菌37℃温育20分钟,而阴性对照样品置于冰上。为了鉴定嗜中性粒细胞,将细胞用抗-CD-16-PE抗体(**IOTest[®]**, Beckman Coulter)染色。根据嗜中性粒细胞的正向和侧向散射特性进行设门,并随后分析CD16阳性细胞-FITC阳性细胞的百分比以及荧光强度几何平均值(GMFI),所述百分比对应于经历吞噬作用的嗜中性粒细胞,所述荧光强度几何平均值对应于被一个细胞吞噬的细菌的数目。为了避免细菌批次变异性导致的对结果的曲解,对于所用的每批新细菌,将结果基于至少3个健康对照样品的平均值进行标准化。将样品分析三次或两次。吞噬作用百分比的分析间CV为6.8%,GMFI的为10.1%,吞噬作用百分比的各自分析内CV位4.1%,GMFI的为1.6%。

[0204] 嗜中性粒细胞的分离

[0205] 将4ml全血分层于5ml密度梯度分离液(Polymorphoprep)(Axis-Shield, Oslo, Norway)上,室温下400g离心30分钟。从第二界面收获嗜中性粒细胞,并用PBS(Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)洗涤。在Thoma-血球计(Thoma-hemocytometer)中计数嗜中性粒细胞,并以50 μ l 中 5×10^6 个细胞的浓度重悬浮于PBS中。用50 μ l 细胞悬浮液和50 μ l 血浆进行一次分析。通过台盼蓝拒染法(Trypan blue exclusion),检测变异性,其超过98%。

[0206] 内毒素除去柱

[0207] 用含有由固定的多粘菌素B组成的内毒素除去凝胶的亲水性包装预填充柱,从血浆样品中除去内毒素,所述多粘菌素B与细菌脂多糖的脂质A部分结合。室温下,用脱氧胆酸钠(Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)使柱再生、用无菌水洗涤并用补充了50IU/ml 肝素(Multipharm, Wexham, UK)的0.9%无菌氯化钠平衡。用PBS将血浆样品1:1稀

释,并施加于柱上,并在丢弃空的后,将样品收集于无热原的样品试管中。将 150 μ L 这种无内毒素的、稀释的血浆样品与 50 μ L 细胞悬浮液一起温育,并如所述进行Bursttest[®]或Phagotest[®]。

[0208] 细胞因子

[0209] 利用商购的装置 (BioSource International, Nivelles, Belgium), 根据制造商的说明书, 测定乙二胺四乙酸抗凝结的血浆样品的 TNF α 、sTNF α R1、sTNF α R2、IL-6 和 IL-8。检测细胞因子的较低限度是 3pg/mL。分析内变异系数为 5.4% -6.4%。在对照中, IL-6 和 IL-8 是不可检测的。

[0210] 实施例 3: 白蛋白施用和细菌内毒素隔离在代偿失调的肝硬化啮齿动物模型中的作用

[0211] 这项研究的目的是检测白蛋白和 / 或内毒素除去在代偿失调肝硬化 (decompensated cirrhosis) 啮齿动物模型中是否有益。在此模型中, 通过输注细菌内毒素 (脂多糖, LPS), 研究了继发于肝硬化的其他身体损伤, 所述细菌内毒素通常用于激发感染作用。

[0212] 方法

[0213] 所有的研究按照基于动物法案 1986 的内政部指导方针 (Home Office guidelines under the Animals in Scientific Procedures Act 1986) 进行。雄性 SD 大鼠 (Sprague-Dawley rats, 230-280g, Charles Rivers Ltd.) 可自由食用标准的啮齿动物食物和饮水, 明暗周期 12 小时、19-23°C, 湿度约为 50%。

[0214] 麻醉下通过在腹部正中作一切口, 进行胆管结扎 (bile duct ligation, BDL)。在 BDL 组中, 分离普通胆管, 用 3-0 丝线进行三重结扎, 并在结扎间切断。BDL 后, 所有动物的体重继续增加, 并且可与未处理的对照相比。总死亡率小于 10%, 且手术后 36 小时内发生。

[0215] 手术后 24-26 天内, 对动物实施安乐死, 并将留置插管插入左颈动脉和右颈静脉内。动脉管路 (arterial line) (Biopac Systems, Goleta, CA, USA) 用于连续监控血压、采集血液样品, 静脉管路用于连续输注流体。

[0216] 所有 BDL 动物接受超过 20 分钟的 LPS 静脉内输注 (1mg/Kg, 克雷白氏肺炎菌 (*Klebsiella pneumoniae*), Sigma, Poole, UK.), 随后连续输注 (10mls/Kg/hour): i) 盐水; ii) 溶于盐水的白蛋白 (1.5g/Kg, Zenalab, BPL, Elstree, UK); iii) 多粘菌素 B (2mg/Kg, Sigma, Poole, UK); 或 iv) 白蛋白加多粘菌素 B (如上), 达手术后 3 小时的总实验时间。在 0、1、2 和 3 小时, 收集动脉样品, 进行嗜中性粒细胞功能分析。

[0217] 在麻醉情况下通过放血处死动物, 并采集血液进行分析。所有的研究在 BDL 后 25-8 天在肝组织上进行, 在每一组中, 4 只动物用于最后分析。

[0218] 在试验末, 将血液收集于冰冷的无菌试管 (BD Vacutainer system, Becton Dickinson, UK) 内, 冰上放置后, 离心 (3000rpm, 4°C, 10 分钟), 以分离血浆, 随后将血浆在分析前储存于 80°C。

[0219] 根据制造商的说明书, 利用商购的用 Tecan Sunrise 96 孔板读数器 (Tecan, Austria) 测量的 Endosafe 系统 (Charles Rivers Laboratories, Cedex, France), 分析血浆内毒素的含量 (参阅, 例如 Stadlbauer et al J. Hepatol 2007; 47: 726-727)。还利用 Cobas Integra 400 实验分析仪 (Roche Diagnostics, Sussex, UK), 测量了血浆白蛋白含

量、ALT 和脲。

[0220] 根据制造商的说明书,利用 FACScanto 流式细胞仪,使用 Phagoburst 分析试剂盒 (Orpegen, Heidelberg, Germany),测量嗜中性粒细胞的功能 (参阅,例如 Mookerjee et al Hepatology 2007 ;46 :831-840)。

[0221] 用上述方法,利用 Graphpad Prism 软件包 (Graphpad, Ca, USA),进行统计学分析。

[0222] 结果

[0223] 由图 12 可以看出,3 小时后,内毒素在盐水处理动物的血浆中很容易检测。在给予了仅多粘菌素 B 或与白蛋白组合的多粘菌素的组中,发现内毒素水平低于分析的检测限度。发现小量内毒素存在于仅白蛋白处理的组中,尽管与盐水处理的动物相比,这仍然是小部分 ($p < 0.001$)。尽管已知白蛋白具有与白蛋白结合的能力,但未发现在施用的剂量与多粘菌素一样有效。

[0224] 已知由于进行中的肝损伤,BDL 动物具有显著减少的血浆白蛋白浓度。发现施用白蛋白显著增加测量的血浆白蛋白水平 (与盐水组相比, $p < 0.05$),达 25%。尽管发现这仍然显著低于从未处理的健康动物收集的样品 ($p < 0.01$,图 13A)。

[0225] 尽管预料 DBL 动物具有增加的转氨酶水平 (ALT,图 13B),但指出发现每个治疗组具有更低的 ATL 得分仍令人感兴趣。尽管由于组内变化,发现这些差异不显著,但看起来内毒素恶化了潜在的肝脏疾病状态,除去内毒素对于肝脏是有利的。

[0226] 与未处理的健康动物相比,所有组的都是升高的,但发现与仅白蛋白组相比,白蛋白 / 多粘菌素组中的脲水平显著降低 ($p < 0.05$,图 13C)。在仅有多粘菌素的组中,也观察到脲水平降低。

[0227] 图 14 表示测量的平均动脉压数据,其是在整个研究期收集的。可以看出,仅有盐水的组在第一个 90 分钟内维持最初的压力,之后,观察到渐进性恶化。白蛋白和白蛋白 / 多粘菌素这两组在整个研究期维持血压,白蛋白 / 多粘菌素动物在 3 小时时表现出压力升高。应当指出,认为在研究开始时,所有 BDL 动物是低血压的,因为麻醉大鼠的正常 MAP 是约 120mmHg。

[0228] 由图 15 可以看出,在白蛋白和白蛋白 / 多粘菌素这两组中,嗜中性粒细胞响应致病菌的能力有渐进性的改善,且白蛋白 / 多粘菌素的联合治疗,具有明显更好的响应。在盐水处理的动物中没有变化。在该图中,未包括仅有多粘菌素的组,因为凝血不规则阻止了呈现的有代表性的样品大小。也测量了自发性嗜中性粒细胞活性,尽管在这些样品中未观察到组间差异。

[0229] 讨论

[0230] 显然,向建立的大鼠肝硬化模型施用白蛋白有利于预防暴露于细菌毒素后的急性恶化。而且,这些作用通过加入与内毒素结合并除去内毒素的增效药剂得到改善。

[0231] 在图 12 中,从系统中除去可测量的内毒素仅在用多粘菌素 B 处理的组中实现,尽管仅有白蛋白的组的确达到了大量减少。可能是进一步增加白蛋白剂量会进一步降低血浆内毒素水平,然而,选择的这种剂量反应了给予住院病人的典型量,并非针对 LPS 特异性结合。还不清楚发挥阴性生理应答,系统内需要多少游离内毒素。

[0232] 尽管,如所预料的,白蛋白的施用使测量的血浆水平显著增加,但仍然发现低于健康动物的水平。尽管期望住院患者在连续的日期内接受这种治疗,但在这项研究中,我们的

目的是提供白蛋白的典型治疗日剂量。可能这些动物内的现有白蛋白已经受到疾病过程的破坏,因而提供新的“健康”的白蛋白对动物具有实质的代谢益处。

[0233] 由于进行中的肝损伤,预计发现所有 BDL 动物的 ATL 水平增加,然而,看起来好像施用内毒素导致治疗组中得到改善的肝脏状态进一步恶化。尽管由于组内变化,发现这些差别不显著,但看起来用多粘菌素 B 治疗在预防肝进一步损伤中是最有效的。

[0234] 脉水平是蛋白分解引起的合成过程以及肾脏排泄体内废物的能力这两者的反映。令人感兴趣的是,在仅由白蛋白和白蛋白 / 多粘菌素处理的组之间,观察到显著差异。与盐水组相比,白蛋白处理的动物表现出脉水平轻微增加,这反映了施用的蛋白的量。有意思的是,接受组合治疗的动物的血浆脉水平显著较低。血浆脉的这种减少与在这些动物中观察到的平均动脉压水平的改善有关(图 15)。如上文所述,发现所有这些 BDL 动物是低血压的,已知低血压引起肾脏血流减少,因此导致功能降低。通过提高系统压力,即便是小幅度提高,都可能因此对肾脏血流和排泄功能产生有益效果。

[0235] 总之,发现向肝硬化动物施用白蛋白,改善动物的状态并预防诱发的代偿失调的许多症状。而且,加入除去内毒素的药剂显著改善白蛋白的作用。

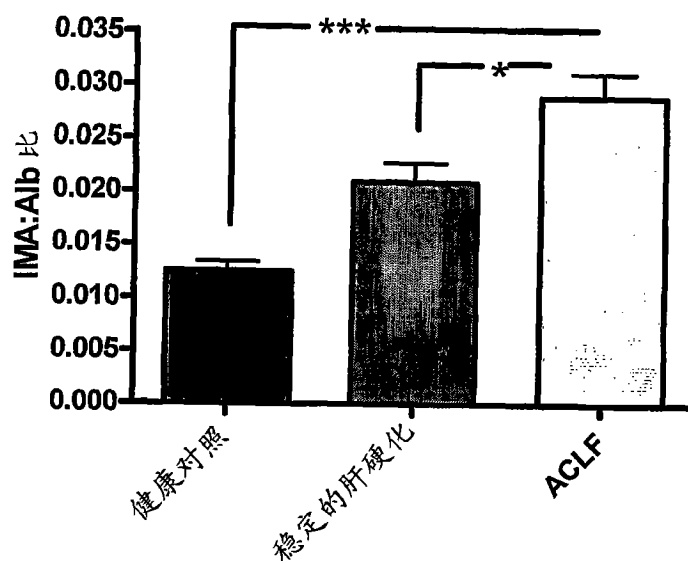


图 1

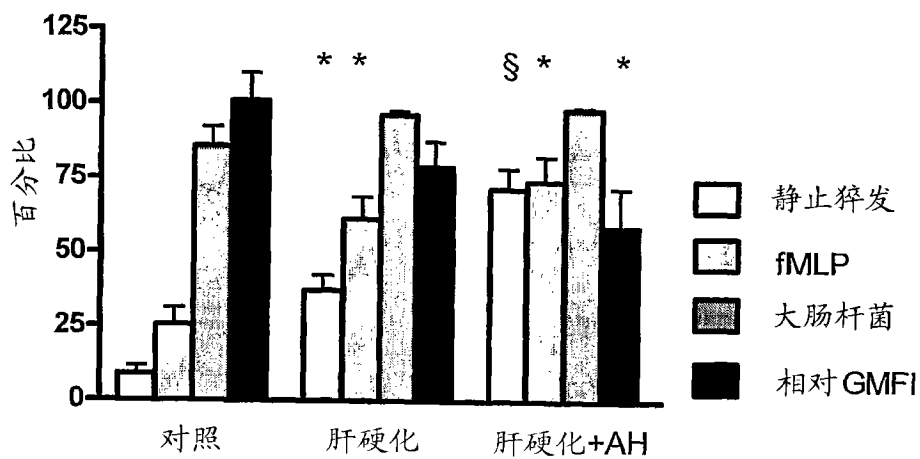


图 2

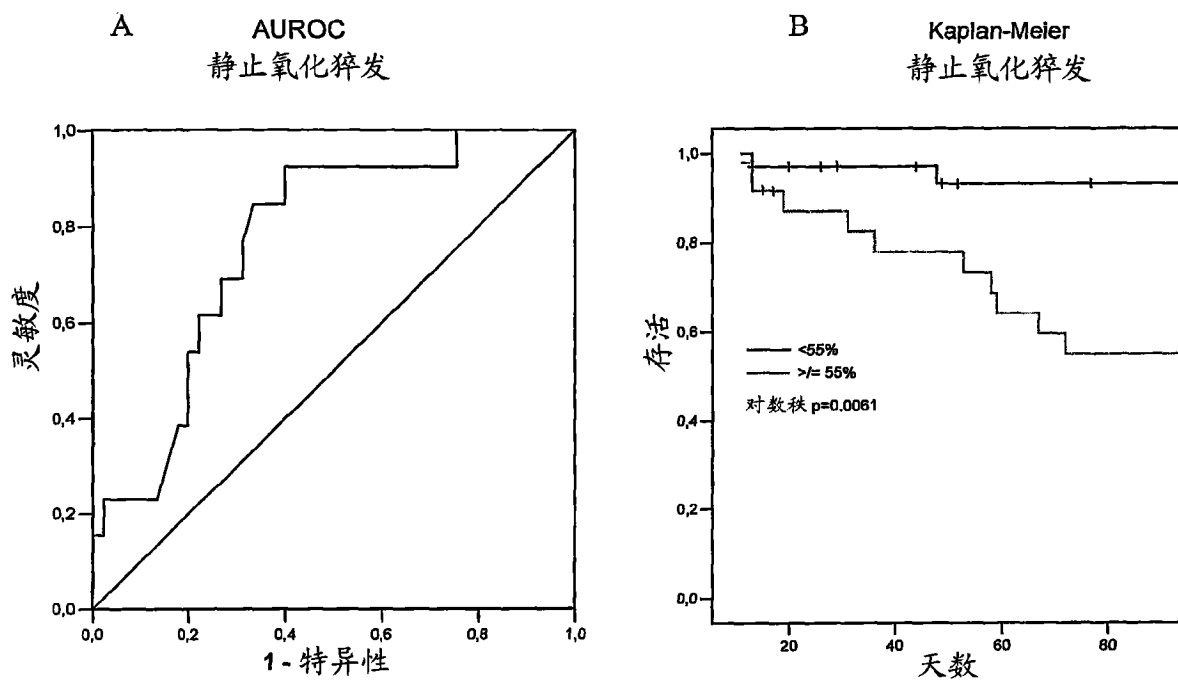


图 3

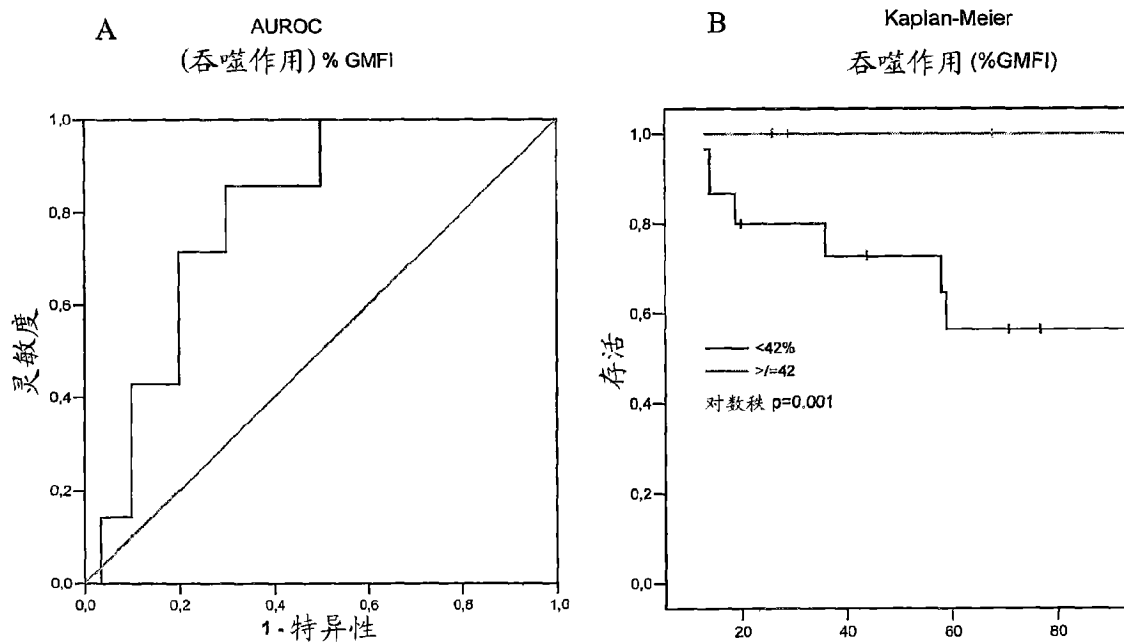


图 4

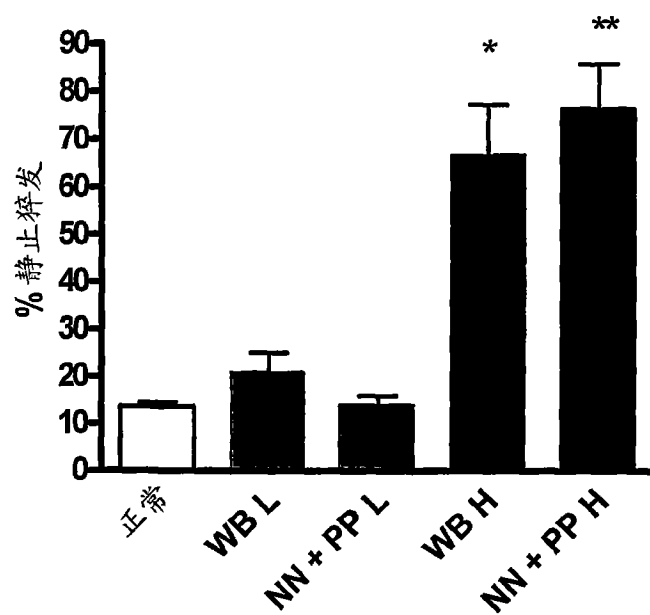


图 5

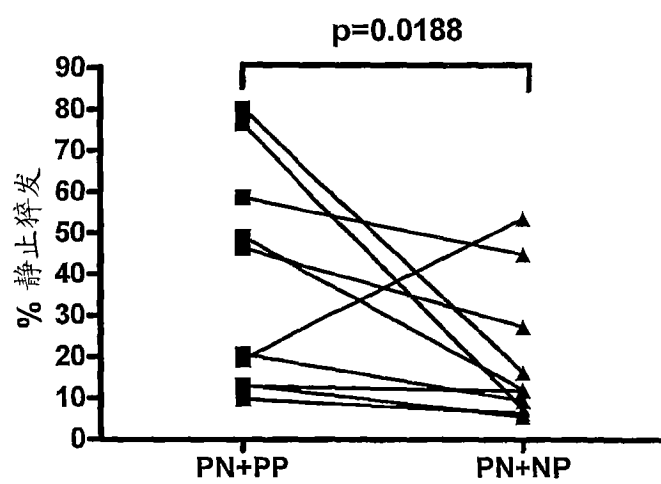


图 6

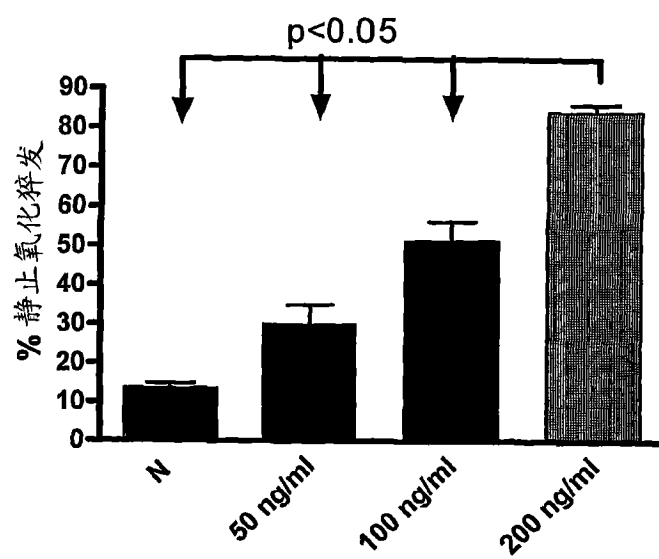


图 7

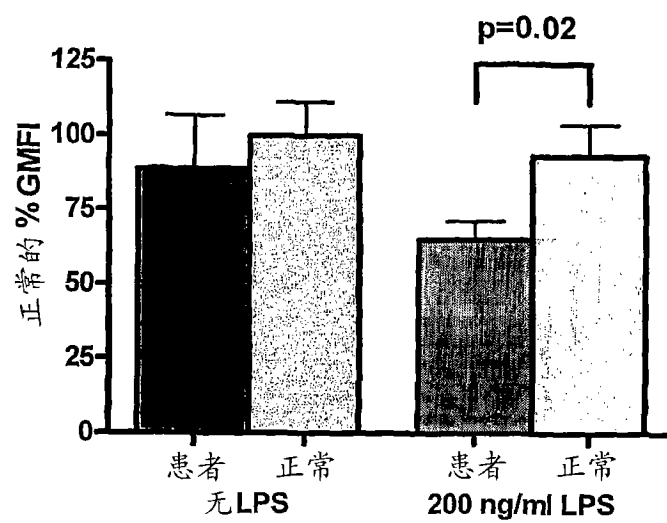


图 8

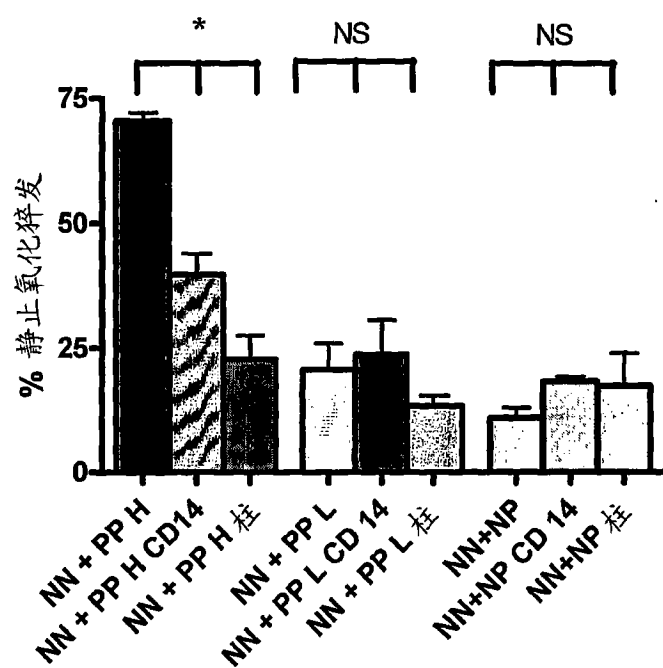


图 9

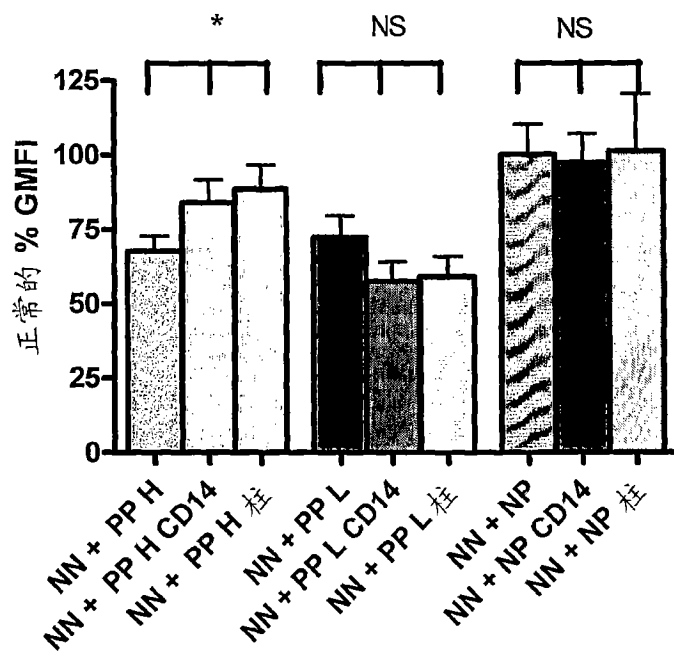


图 10

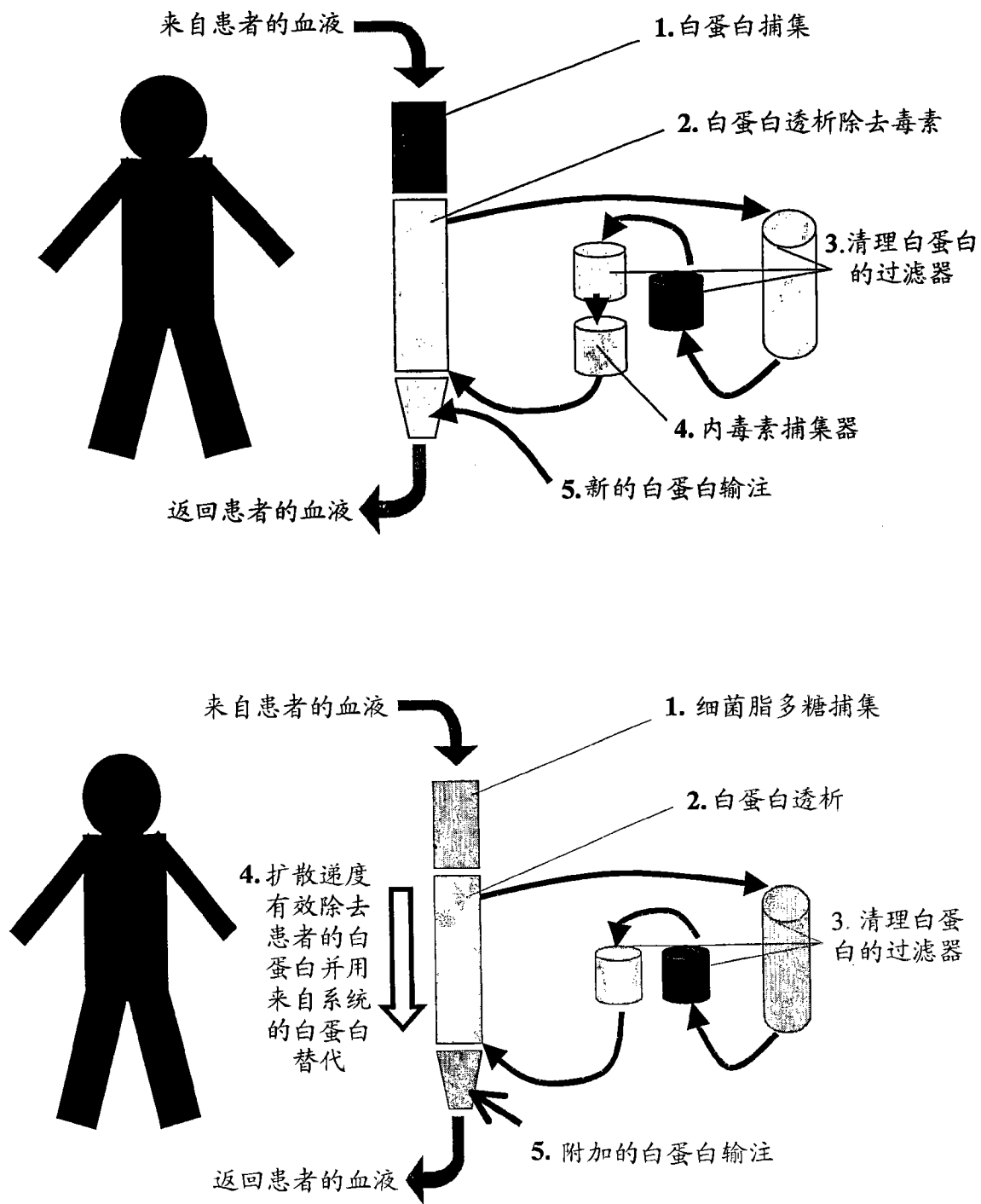


图 11

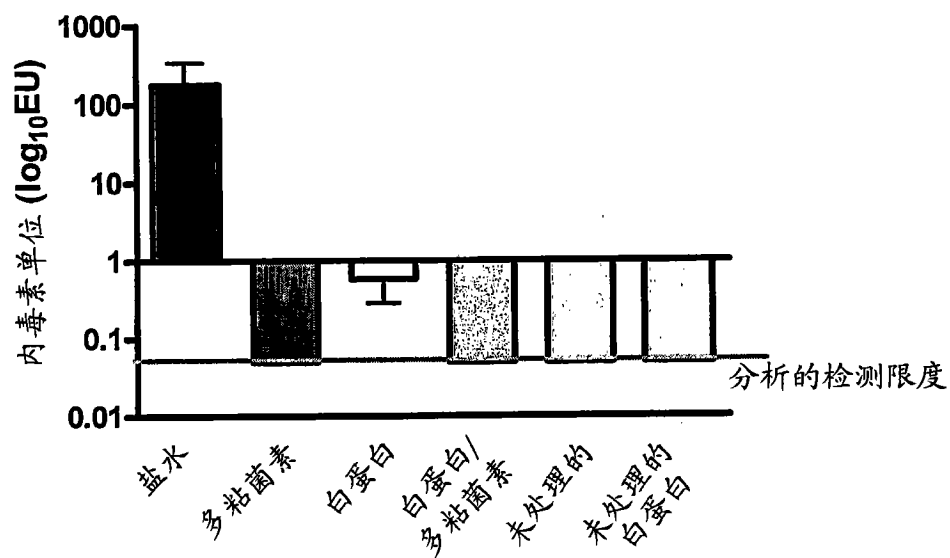


图 12

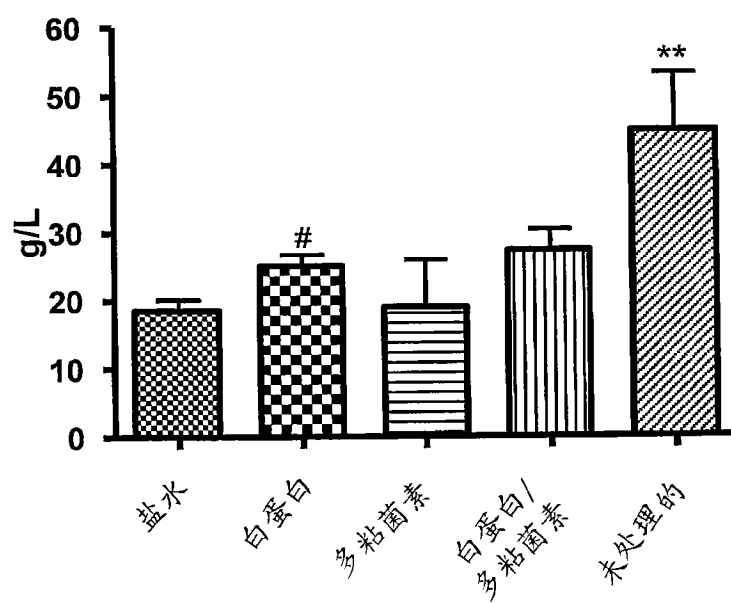


图 13A

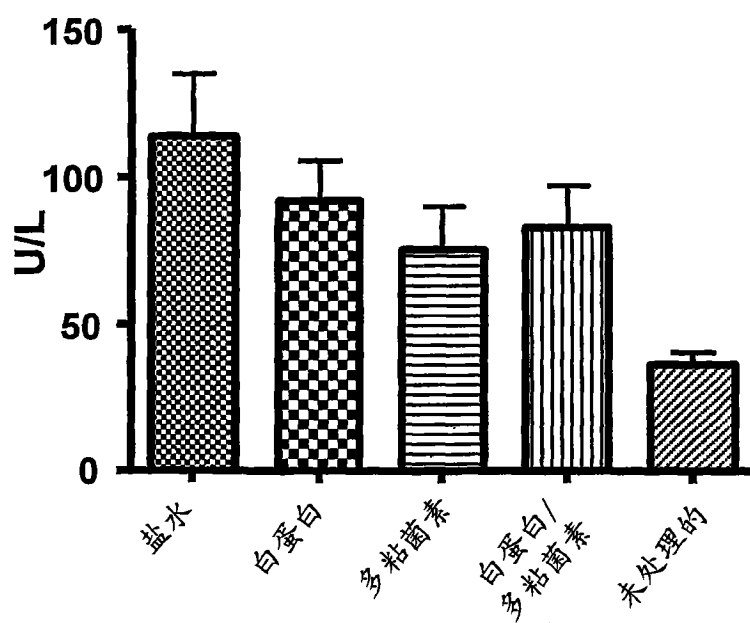


图 13B

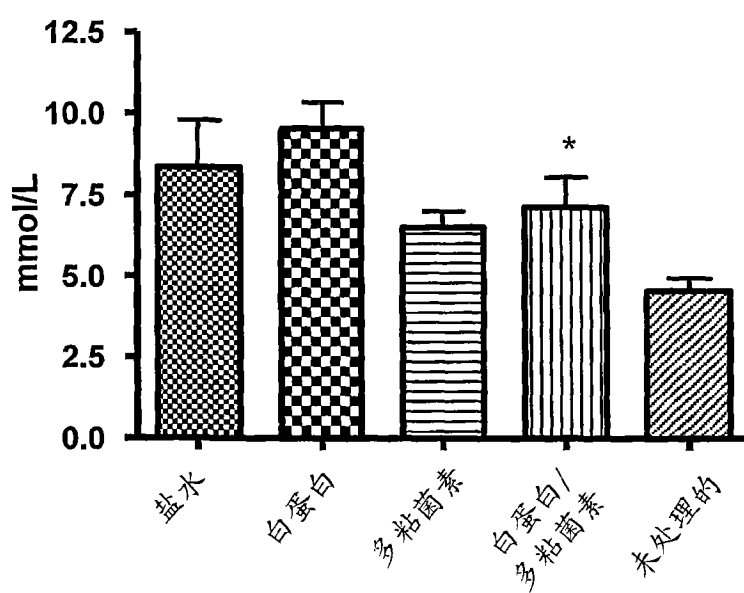


图 13C

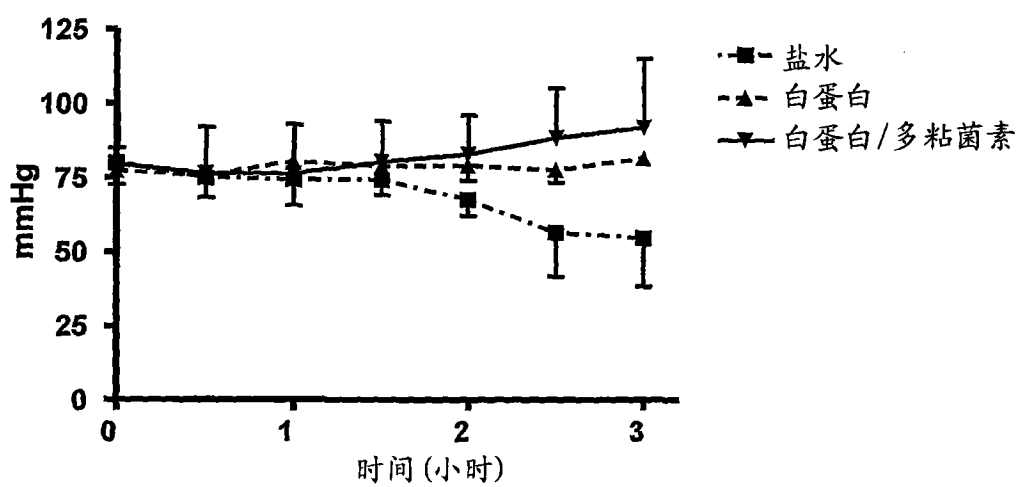


图 14

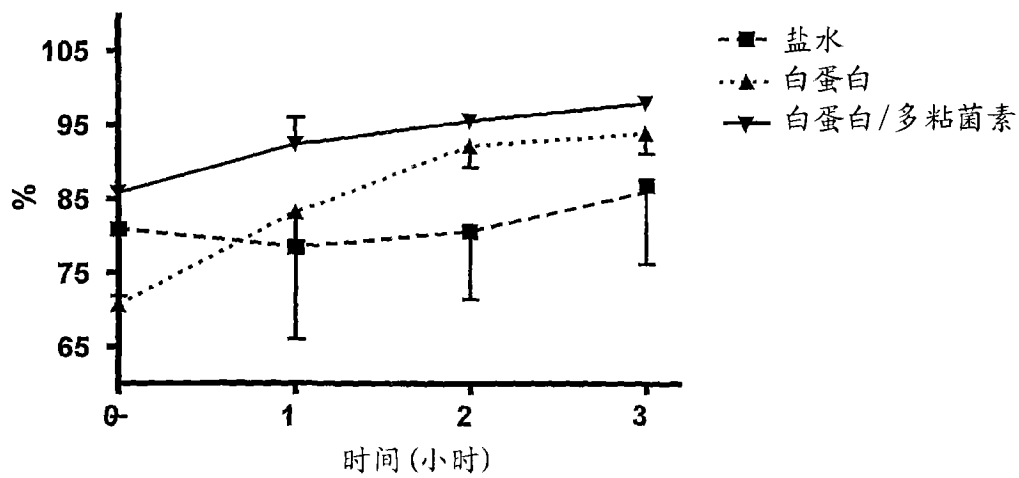


图 15