

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99813797.9

[43] 公开日 2002 年 1 月 16 日

[11] 公开号 CN 1331752A

[22] 申请日 1999.10.19 [21] 申请号 99813797.9

[30] 优先权

[32] 1998.10.20 [33] US [31] 60/104,918

[32] 1999.4.28 [33] US [31] 60/131,381

[86] 国际申请 PCT/US99/24356 1999.10.19

[87] 国际公布 WO00/23614 英 2000.4.27

[85] 进入国家阶段日期 2001.5.28

[71] 申请人 千年药物公司

地址 美国马萨诸塞

[72] 发明人 G·R·瓦迪 R·L·斯泰因

L·R·迪克 V·J·帕罗姆贝拉

E·S·莱特凯普 P·J·艾利奥特

J·亚当斯 T·A·麦克马克

S·J·布兰德

D·R·伯恩斯

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所

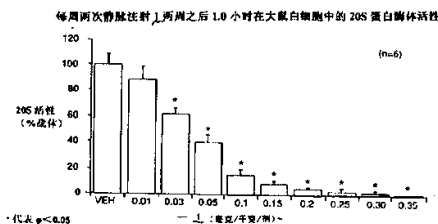
代理人 周中琦

权利要求书 6 页 说明书 32 页 附图页数 19 页

[54] 发明名称 监测蛋白酶体抑制剂药物作用的方法

[57] 摘要

本发明涉及测量生物样品中的蛋白酶体活性的方法。更特别地，本发明涉及监测体内给药蛋白酶体抑制剂后的药物作用的方法。本发明提供了监测药效学的药物作用和确定蛋白酶体抑制剂的给药方案的方法和试剂盒。本发明还提供了确定哺乳动物中基线蛋白酶体活性的方法。



ISSN 1008-4274

权利要求书

1. 一种监测蛋白酶体抑制剂在哺乳动物中的药效学的药物作用的方法，包括给该哺乳动物给药蛋白酶体抑制剂；在给药该蛋白酶体抑制剂之后的一个或更多指定的时刻从此哺乳动物采集一个或多个试验生物样品；测量该一个或多个试验生物样品中蛋白酶体的活性；确定该一个或多个试验生物样品蛋白酶体活性数量；比较试验生物样品中蛋白酶体活性数量与从未给药过蛋白酶体抑制剂的哺乳动物中所采集的参考生物样品中蛋白酶体活性数量。

2. 权利要求1的方法，其中生物样品选自血液、尿、器官和组织样品。

3. 权利要求1的方法，其中生物样品选自肿瘤活组织检查、皮肤活组织检查、结肠活组织检查、滑液、支气管液、肌肉细胞、血细胞和血细胞前体。

4. 权利要求2的方法，其中的生物样品是血液样品。

5. 权利要求4的方法，其中的血液样品是白细胞裂解物。

6. 权利要求4的方法，其中的生物样品是全血细胞裂解物。

7. 权利要求1的方法，其中的哺乳动物选自大鼠、小鼠、非人灵长类动物和人。

8. 权利要求7的方法，其中的哺乳动物是人。

9. 权利要求1的方法，其中的蛋白酶体活性是通过分析存在一种20S蛋白酶体活化剂时蛋白水解的速率来测量的。

10. 权利要求9的方法，其中的活化剂是SDS。

11. 权利要求10的方法，其中的生物样品是白细胞裂解物而SDS存在的浓度是大约0.035%。

12. 权利要求10的方法，其中的生物样品是全血细胞裂解物而SDS存在的浓度是大约0.05%。

13. 权利要求1的方法，其中分析糜蛋白酶活性。

14. 权利要求1的方法，其中分析胰蛋白酶活性。

15. 权利要求 1 的方法, 在其中相对于蛋白质浓度独立地对生物样品中蛋白酶体活性和参考样品中蛋白酶体活性进行归一化处理。

16. 权利要求 1 的方法, 在其中相对于细胞计数独立地对生物样品中蛋白酶体活性和参考样品中蛋白酶体活性进行归一化处理。

17. 权利要求 1 的方法, 在其中用蛋白酶体的第 1 种肽酶活性对蛋白酶体的第 2 种肽酶活性的比值独立地确定生物样品中蛋白酶体活性和参考样品中蛋白酶体活性。

18. 权利要求 17 的方法, 其中第 1 种肽酶活性是糜蛋白酶活性, 第 2 种肽酶活性是胰蛋白酶活性。

19. 权利要求 1 的方法, 其中的蛋白酶体抑制剂选自肽基醛类、乙烯基砒类、环氧酮类、肽基硼酸类和 lactacystin 类似物类。

20. 权利要求 19 的方法, 其中的蛋白酶体抑制剂是一种肽基硼酸。

21. 权利要求 20 的方法, 其中的蛋白酶体抑制剂选自:

N-乙酰基-L-亮氨酸- β -(1-萘基)-L-丙氨酸-L-亮氨酸 硼酸;

N-(8-喹啉)磺酰基- β -(1-萘基)-L-丙氨酸-L-亮氨酸 硼酸;

N-(吡嗪)羰基-L-苯丙氨酸-L-亮氨酸 硼酸;

β -(1-萘基)-L-丙氨酸-L-亮氨酸 硼酸; 和

N-(4-吗啉)羰基-[O-(2-吡啶甲基)]-L-酪氨酸-L-亮氨酸 硼酸。

22. 权利要求 21 的方法, 其中的肽基硼酸是 N-(吡嗪)羰基-L-苯丙氨酸-L-亮氨酸硼酸。

23. 权利要求 19 的方法, 其中的蛋白酶体抑制剂是一种 lactacystin 类似物。

24. 权利要求 23 的方法, 其中的 lactacystin 类似物选自 lactacystin, clasto-lactacystin β -内酯和 7-乙基-clasto-lactacystin β -内酯和 7-正-丙基-clasto-lactacystin β -内酯。

25. 权利要求 24 的方法, 其中的 lactacystin 类似物是 7-正-丙

基-clasto- lactacystin β -内酯。

26. 一种给蛋白酶体抑制剂确定给药方案的方法，包括给此哺乳动物给药蛋白酶体抑制剂；给药蛋白酶体抑制剂以后的在一个或多个指定的时间从哺乳动物采集一个或多个试验生物样品；测量该一个或多个试验样品中蛋白酶体活性；确定一个或多个试验生物样品中蛋白酶体活性的量；将试验生物样品中蛋白酶体活性的量与从没有给药过蛋白酶体抑制剂哺乳动物所采集的参考生物样品中蛋白酶体活性的量做比较，并选择今后要给药蛋白酶体抑制剂的给药量和给药频率。

27. 权利要求 26 的方法，其中的生物样品选自血液、尿、器官和组织样品。

28. 权利要求 26 的方法，其中生物样品选自肿瘤活组织检查、皮肤活组织检查、结肠活组织检查、滑液、支气管液、肌肉细胞、血细胞和血细胞前体。

29. 权利要求 27 的方法，其中的生物样品是血液样品。

30. 权利要求 29 的方法，其中的血液样品是白细胞裂解物。

31. 权利要求 29 的方法，其中的血液样品是全血细胞裂解物。

32. 权利要求 26 的方法，其中的哺乳动物选自大鼠、小鼠、非人灵长类动物和人。

33. 权利要求 32 的方法，其中的哺乳动物是人。

34. 权利要求 26 的方法，其中的蛋白酶体活性是通过分析存在 20S 蛋白酶体活化剂时蛋白质水解的速率来测量的。

35. 权利要求 34 的方法，其中的活化剂是 SDS。

36. 权利要求 35 的方法，其中的生物样品是白细胞裂解物并且 SDS 的存在浓度大约为 0.035%。

37. 权利要求 35 的方法，其中的生物样品是全血细胞裂解物并且 SDS 的存在浓度大约为 0.05%。

38. 权利要求 26 的方法，其中的蛋白酶体活性是糜蛋白酶活性。

39. 权利要求 26 的方法，其中的蛋白酶体活性是胰蛋白酶活性。

40. 权利要求 26 的方法，其中生物样品中蛋白酶体活性和参考样

品中蛋白酶体活性相对于蛋白质浓度单独进行归一化处理。

41. 权利要求 26 的方法，其中生物样品中蛋白酶体活性和参考样品中蛋白酶体活性地相对于细胞计数单独进行归一化处理。

42. 权利要求 26 的方法，其中生物样品中蛋白酶体活性和参考样品蛋白酶体活性单独用蛋白酶体中第 1 种肽酶活性对蛋白酶体中第 2 种肽酶活性的比值来确定。

43. 权利要求 42 的方法，其中第 1 种肽酶活性是糜蛋白酶活性而第 2 种肽酶活性是胰蛋白酶活性。

44. 权利要求 26 的方法，在其中选择蛋白酶体抑制剂的给药剂量和给药频率以避免过度的蛋白酶体抑制。

45. 权利要求 44 的方法，其中过度的蛋白酶体抑制引起毒性效应。

46. 权利要求 26 的方法，在其中选择蛋白酶体抑制剂的给药剂量和给药频率以使生物样品中蛋白酶体抑制不超过大约 95%。

47. 权利要求 26 的方法，在其中选择蛋白酶体抑制剂的给药剂量和给药频率从而获得治疗上有用的蛋白酶体抑制。

48. 权利要求 47 的方法，在其中选择蛋白酶体抑制剂的给药剂量和给药频率从而在生物样品中获得至少 15%的蛋白酶体抑制。

49. 权利要求 47 的方法，在其中选择蛋白酶体抑制剂的给药剂量和给药频率从而在生物样品中获得至少 20%的蛋白酶体抑制。

50. 权利要求 47 的方法，在其中选择蛋白酶体抑制剂的给药剂量和给药频率从而在生物样品中获得至少 30%的蛋白酶体抑制。

51. 权利要求 47 的方法，在其中选择蛋白酶体抑制剂的给药剂量和给药频率从而在生物样品中获得至少 40%的蛋白酶体抑制。

52. 权利要求 47 的方法，在其中选择蛋白酶体抑制剂的给药剂量和给药频率从而在生物样品中获得至少 50%的蛋白酶体抑制。

53. 权利要求 47 的方法，在其中选择蛋白酶体抑制剂的给药剂量和给药频率从而在生物样品中获得大约 50%-大约 80%的蛋白酶体抑制。

54. 权利要求 26 的方法，其中的蛋白酶体抑制剂选自肽基醛类、

肽基硼酸类和 lactacystin 类似物类。

55. 权利要求 54 的方法，其中的蛋白酶体抑制剂是一种肽基硼酸。

56. 权利要求 55 的方法，其中的肽基硼酸选自：

N-乙酰基-L-亮氨酸- β -(1-萘基)-L-丙氨酸-L-亮氨酸硼酸；

N-(8-喹啉)磺酰基- β -(1-萘基)-L-丙氨酸-L-亮氨酸硼酸；

N-(吡嗪)羰基-L-苯丙氨酸-L-亮氨酸 硼酸；

β -(1-萘基)-L-丙氨酸-L-亮氨酸 硼酸；和

N-(4-吗啉)羰基-[O-(2-吡啶甲基)]-L-酪氨酸-L-亮氨酸 硼酸。

57. 权利要求 56 的方法，其中的肽基硼酸是 N-(吡嗪)羰基-L-苯丙氨酸-L-亮氨酸 硼酸。

58. 权利要求 54 的方法，其中的蛋白酶体抑制剂是一种 lactacystin 类似物。

59. 权利要求 58 的方法，其中 lactacystin 类似物选自 lactacystin, clasto- lactacystin β -内酯, 7-乙基-clasto- lactacystin β -内酯和 7-正-丙基-clasto- lactacystin β -内酯。

60. 权利要求 59 的方法，其中的 lactacystin 类似物是 7-正-丙基-clasto- lactacystin β -内酯。

61. 一种监测哺乳动物中基线蛋白酶体活性的方法，包括从哺乳动物采集一个或多个生物样品；测量一个或多个生物样品中蛋白酶体的活性；和确定一个或多个生物样品中蛋白酶体活性的数量。

62. 权利要求 61 的方法，其中的哺乳动物被鉴定为患有疾病或病理状态。

63. 权利要求 61 的方法，进一步包括比较从该哺乳动物采集的生物样品中的蛋白酶体活性数量与从未患有该疾病或病理状态的哺乳动物采集的参考生物样品中的蛋白酶体活性数量。

64. 权利要求 63 的方法，其中从患有疾病或病理状态的哺乳动物采集的生物样品的蛋白酶体活性数据，在与参考生物样品的蛋白酶体活性数据比较之前，与患有相同疾病或病态的其它哺乳动物采集的生

物样品的蛋白酶体活性数据组合。

65. 权利要求 64 的方法，进一步包括选择将要给患有该疾病或病况的哺乳动物给药的蛋白酶体抑制剂的给药剂量和给药频率。

66. 权利要求 64 的方法，进一步包括确定患有该疾病或病态的哺乳动物的诊断和预后。

67. 权利要求 61-66 的任何一项的方法，其中的哺乳动物是人。

68. 权利要求 61 的方法，其中的哺乳动物已经给药过一种药物。

69. 权利要求 68 的方法，其中的药物不是蛋白酶体抑制剂。

70. 权利要求 68 的方法，其中从已经给药过一种药物的哺乳动物所采集生物样品的蛋白酶体活性数据，在与参考生物样品的数据比较之前，与从已给药过该药物的其它哺乳动物所采集生物样品的数据组合。

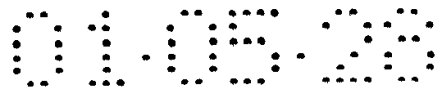
71. 权利要求 68 的方法，进一步包括确定将要给已经给药过该药物的哺乳动物给药蛋白酶体抑制剂的给药剂量和给药频率。

72. 权利要求 68-71 中任何一项的方法，其中的哺乳动物是人。

73. 一种用于测量生物样品中蛋白酶体活性的试剂盒，包括制备生物样品的工具和测量蛋白酶体活性的工具。

74. 权利要求 73 的试剂盒，其中的哺乳动物是人。

75. 权利要求 73 的试剂盒，其中的生物样品是血液、尿或组织活组织检查样品。



说明书

监测蛋白酶体抑制剂药物作用的方法

发明背景

发明领域

本发明涉及测量生物样品中蛋白酶体活性的方法。更特别地，本发明涉及在体内给药一种蛋白酶体抑制剂后监测药物作用的方法。

相关技术概述

26S 蛋白酶体是具有多种催化活性的蛋白酶，负责真核细胞内大多数细胞内蛋白质的转变，包括损伤、氧化或错误折叠蛋白的水解性降解，以及各种细胞功能所必需的关键调节蛋白的加工或降解 (Ciechanover, 细胞 (Cell) 79:13-21 (1994)); Coux 等, 生物化学年评 (Ann. Rev. Biochem.) 65:801-847 (1995); Goldberg 等, 化学与生物学 (Chemistry & Biology) 2:503-508 (1995))。蛋白质底物首先通过与多个小蛋白分子泛素共价连接而标记为降解。所产生的被多重泛素化的蛋白质然后被 26S 蛋白酶体识别和降解。

构成 26S 蛋白酶体催化核心的是 20S 蛋白酶体，一个分子量大约为 700 kDa 的多亚基复合物。Coux 等 (生物化学年评 (Ann. Rev. Biochem.) 65:801-847 (1995)) 教导：20S 蛋白酶体并不独自降解被泛素化的蛋白质，但是的确具有多种肽酶活性。基于底物偏好性，Coux 等将这些活性鉴定为糜蛋白酶样、胰蛋白酶样、后-谷氨酰水解酶，偏好支链氨基酸，偏好中性小氨基酸。Coux 等还教导：可以通过各种体外处理诱导 20S 蛋白酶体活性的引人注目的活化，例如加热到 55℃，与碱性多肽、十二烷基硫酸钠 (SDS)、盐酸胍或脂肪酸孵育，对水透析，或者通过生理调节剂例如 PA28 或 PA700。McCormack 等 (生物化学 (Biochemistry) 37:7792-7800 (1980)) 教导：有许多肽底物，包括 Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC, Z-Leu-Leu-Arg-AMC 和 Z-Leu-Leu-Glu-2NA, 被 20S 蛋白酶体剪切，其中 Suc 是 N-琥珀酰基，AMC 是 7-氨基-4-

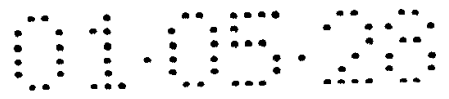
甲基香豆素，2NA 是 2-萘胺。

泛素-蛋白酶体途径在许多生理过程发挥重要作用。Deshaies (细胞生物学趋势 (Trends in Cell Biol.) 5:428-434 (1995)) 和 Hoyt (细胞 (Cell) 91:149-151 (1997)) 教导: 细胞周期蛋白质, 包括细胞周期蛋白、细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶抑制剂、肿瘤抑制蛋白, 的受调控的蛋白水解是控制的细胞循环进展所必须的, 这些蛋白质的水解通过泛素-蛋白酶体途径发生。Palombella 等在 WO 95/25533 中教导: 转录因子 NF- κ B 的活化依赖于蛋白酶体所介导的一种抑制性蛋白 I κ B- α 的降解, NF- κ B 自身在调控参与免疫和炎症应答的基因中发挥关键作用。Goldberg 和 Rock 在 WO 94/17816 公开了通过泛素-蛋白酶体途径对细胞蛋白进行连续转变在抗原呈递中发挥重要的作用。

在发挥重要生理功能的同时, 泛素-蛋白酶体途径还介导蛋白质的不当降解或加速蛋白质降解, 这表现为病态例如肿瘤、炎症性疾病或自身免疫病的结果或原因, 在这些疾病中正常的细胞过程变得失去调控。另外, Goldberg (美国专利 5,340,736 号 (1994)) 教导: 与诸如癌症、慢性传染病、发热、肌肉废用(萎缩)、神经损伤、肾衰竭以及肝衰竭相关的恶病质和肌肉消耗起因于泛素-蛋白酶体途径蛋白质降解增加。Gonzales 等 (实验医学杂志 (J. Exp. Med.) 184: 1909 (1996)) 教导: 在原生动物门寄生虫成熟期间发生的细胞骨架再组织是蛋白酶体依赖性的。

因此, 对蛋白酶体活性的抑制提供了一种在这些或其它由蛋白酶体蛋白质水解功能所直接或间接介导的病况中用于治疗性介入的很有希望的新方法。Goldberg 等 (化学与生物学 (Chemistry & Biology) 2:503-508 (1995)) 教导: 在人类疾病的动物模型中蛋白酶体抑制剂能阻断体内炎症应答。

发明人正在开发治疗炎症和自身免疫病以及癌症的蛋白酶体抑制剂。我们已经发现, 如果给哺乳动物给药一种蛋白酶体抑制剂, 仔细选择给药方案以避免过度的蛋白酶体抑制是必要的。典型地, 新候选药物的给药方案可通过测量生物样品中药物浓度以及设定剂量和给药



频率来确定，从而获得所期望的药物水平(参见，例如，基础药物动力学手册，Ritschel 著，第 4 版，药物情报公开公司，伊利诺州汉密尔顿，(1992) [Handbook of Basic Pharmacokinetics, Fourth Edition, Drug Intelligence Publications, Inc., Hamilton, IL, 1992])。发明人已发现这些标准程序并不适用于蛋白酶体抑制。因此，本领域需要监测蛋白酶体抑制剂药物作用的灵敏方法。

本发明简要概述

本发明提供监测蛋白酶体抑制剂药物作用的灵敏方法。发明人惊讶地发现，是生物样品中的蛋白酶体活性的离体分析而不是药物浓度，提供了一种监测蛋白酶体抑制剂药效学的药物作用的有用方法，而且这些数据为选择今后将要给药的蛋白酶体抑制剂的给药量和给药频率提供了指导。

在第一个方面，本发明提供一种监测哺乳动物中蛋白酶体抑制剂药效学的药物作用的方法，包括给哺乳动物给药蛋白酶体抑制剂；在给药蛋白酶体抑制剂以后一个或多个指定的时间从该哺乳动物采集一个或多个试验生物样品；测量试验生物样品中蛋白酶体活性；确定试验生物样品中蛋白酶体活性的量；用从没有给药过蛋白酶体抑制剂哺乳动物中所采集的生物样品作为参照，比较试验生物样品和参照生物样品中蛋白酶体活性的量。

在第二个方面，本发明提供一种确定蛋白酶体抑制剂给药方案的方法，包括给哺乳动物给药蛋白酶体抑制剂；在给药蛋白酶体抑制剂以后一个或多个指定时间从该哺乳动物采集一个或多个试验生物样品；测量试验生物样品中蛋白酶体活性；确定试验生物样品中蛋白酶体活性的量；用从没有给药过蛋白酶体抑制剂的哺乳动物所采集的生物样品作为参照，比较试验生物样品和参照生物样品中蛋白酶体活性的量；选择今后要给药的蛋白酶体抑制剂的给药量和给药频率。

在第三个方面，本发明提供一种确定哺乳动物，包括人，基线蛋白酶体活性的方法，包括从哺乳动物采集一个或多个生物样品；测量该生物样品中蛋白酶体活性；以及确定该生物样品中蛋白酶体活性的

量。在一个优选的实施方案中，哺乳动物患有疾病或病理状态。在另一个优选实施方案中，已给哺乳动物给药一种药物。在特定的实施方案中，本方法进一步包括确定要给哺乳动物给药的蛋白酶体抑制剂的给药量和给药频率。

在第四个方面，本发明提供一种测量来自哺乳动物的生物样品中蛋白酶体活性的试剂盒，本试剂盒包括制备生物样品的工具和测量蛋白酶体活性的工具。在特定的优选实施方案中，哺乳动物是人。在其它的特定实施方案中，生物样品是血液、尿或者活组织检查样品。

附图简述

图 1 是 7 例人类志愿者白细胞中 20S 蛋白酶体活性的图解表示。

图 2 是 7 例人类志愿者白细胞中每日 20S 蛋白酶体活性的图解表示。

图 3 是静脉给药 N-(吡嗪)羧基-L-苯丙氨酸-L-亮氨酸硼酸 (boronic acid) (1) 后 1.0 小时后鼠白细胞中 20S 蛋白酶体活性的图解表示。

图 4 是静脉给药 1 后 24 小时鼠白细胞中 20S 蛋白酶体活性的图解表示。

图 5 是静脉给药 1 后 1.0 小时大鼠白细胞中 20S 蛋白酶体活性的图解表示。

图 6 是静脉给药 1 后 24 小时大鼠白细胞中 20S 蛋白酶体活性的图解表示。

图 7 是静脉给药 1 后 48 小时后大鼠白细胞中 20S 蛋白酶体活性的图解表示。

图 8 是每周两次静脉注射给药 1 连续两周后 1.0 小时后大鼠白细胞中 20S 蛋白酶体活性的图解表示。

图 9 是静脉给药 1 后 1.0 小时灵长类动物白细胞中 20S 蛋白酶体活性的图解表示。

图 10 是静脉给药 1 后 72 小时灵长类动物白细胞中 20S 蛋白酶体活性的图解表示。

图 11 是糜蛋白酶(\square)和胰蛋白酶(\diamond)活性对 1 浓度的函数的图解表示, 其中显示 1 完全抑制糜蛋白酶活性但引起胰蛋白酶活性活化。

图 12 是比较从兔网状细胞所纯化的 20S 蛋白酶体的蛋白酶体抑制百分数与糜蛋白酶活性对胰蛋白酶活性比值的曲线图。

图 13 是比较大鼠白细胞裂解物的蛋白酶体抑制百分数与糜蛋白酶活性对胰蛋白酶活性比值的曲线图。

优选实施方案详述

本发明涉及监测生物样品中蛋白酶体活性的方法。更特别的, 本发明涉及在体内给药蛋白酶体抑制剂之后药物作用的监测方法。这里所引用的专利申请、专利和参考文献表示本领域的知识, 因此将其作为参考文献完整地并入本发明。在不一致时, 本公开内容优先。

本发明人惊讶地发现, 是生物样品中蛋白酶体活性的离体分析而不是药物浓度提供了监测蛋白酶体抑制剂药效学药物作用的方法, 而且这个数据为选择今后将要给药的蛋白酶体抑制剂的给药量和给药频率提供了指导。

本发明提供监测蛋白酶体抑制剂药物作用的灵敏方法。蛋白酶体抑制剂是有希望的用于治疗直接由蛋白酶体蛋白水解功能所介导病症例如肌肉消耗, 或者间接通过蛋白酶体所加工或降解的蛋白质例如转录因子 NF- κ B 和细胞周期调节蛋白所介导病症的新治疗性药物。本发明人已经证明蛋白酶体抑制剂在许多动物肿瘤模型和炎症模型上的体内效能。然而, 本发明人也发现过度的蛋白酶体抑制剂引起毒性效应, 包括致死性。尽管不愿意局限于任何理论, 本发明人相信这些毒性效应主要是基于蛋白酶体功能的多效性的性质的机制且由该性质产生。

因此蛋白酶体抑制剂的安全给药要求密切监测药物水平以及仔细选择给药方案以避免给药过量。在本领域中典型的是通过测量血浆中母体药和/或其代谢产物的量来监测药物水平(例如, 参见, 基础药物动力学手册, Ritschel 著, 第 4 版, 药物情报公开公司, 汉密尔顿, 伊利诺州, 1992 年[Handbook of Basic Pharmacokinetics, Fourth Edition, Drug Intelligence Publications, Inc., Hamilton, IL,

1992])。药物水平测量值对于时间的函数提供了药物动力学曲线，其中参数例如药峰浓度(C_{max})、半寿期($t_{1/2}$)、药时曲线下面积(AUC)、分布容积(V_d)。然而，本发明人已经发现这些标准方法不适用于蛋白酶体抑制剂。在动物中静脉给药治疗量蛋白酶体抑制剂后数分钟内，在血浆房室中实际上检测不到药物。尽管不愿意局限于理论，本发明人仍然相信蛋白酶体抑制剂在血管系统和组织被细胞内蛋白酶体快速螯合。因此，血浆中循环药物测量值在总体上低估了现存生物活性药物的量。因此迫切需要能更准确地反映蛋白酶体的真实药效曲线的替代方法。

就本发明而言，将会使用下列定义：

“蛋白酶体抑制剂”指任何能直接或间接地抑制 20S 或 26S 蛋白酶体或其活性的物质。这种抑制优先是特异性的，也就是说，蛋白酶体抑制剂在低于产生另外一个无关生物学效应必需的浓度抑制蛋白酶体活性。优选地，抑制蛋白酶体所必需蛋白酶体抑制剂浓度至少比产生无关生物学活性所必需浓度低 2 倍，更优选地是至少低 5 倍，甚至更优选地是至少低 10 倍，最优选地是至少低 20 倍。本发明中所使用蛋白酶体抑制剂的非限制性的实例包括肽醛类(参见，例如 Stein 等 1995 年 9 月 21 日公开的 WO 95/24914; Siman 等 1991 年 9 月 19 日公开的 WO 91/13904; Iqbal 等，医药化学杂志(J. Med. Chem.) 38:2276-2277(1995))、乙烯砷类(参见，例如，Bogyo 等，美国国家科学院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)94:6629(1995))、 α' ， β' - 环氧酮类(参见，例如，Spaltenstein 等，四面体快报(Tetrahedron Lett.) 37:1343 (1996))、肽硼酸(参见，例如，Adams 等，1996 年 5 月 9 日公开 W096/13266; Siman 等 1991 年 9 月 19 日公开的 W091/13904) 和 lactacystin 及 lactacystin 类似物(参见，例如，Fenteany 等，美国科学院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 94:3358(1994); Fenteany 等 1996 年 10 月 19 日公开的 W096/32105)，其中每一个都作为参考文献完整地并入本发明。

“生物样品”指任何取自动物的体液、器官或组织样品。在采集

样品时动物可以是死亡或者存活的。动物优选哺乳动物，这个术语包括人。

“试验生物样品”指取自已经给药过蛋白酶体抑制剂的动物的生物样品。

“参考生物样品”指取自没有给药过蛋白酶体抑制剂的动物的生物样品，包括已经以书写、可读或电子形式制定或保存的统计学或过去的参考样品。“可读形式”包括可以能为机器或技师所理解具有特定意义的任何形式。

“标准样品”指一种包括已知量或恒定量 20S 或 26S 蛋白酶体活性的样品。这样品可以包括纯化或部分纯化的蛋白酶体，或者它可以包括一种含有蛋白酶体的生物样品。

“蛋白酶体活性”指任何与 20S 或 26S 蛋白酶体相关的蛋白水解活性或肽酶活性。

“肽”指一种由彼此通过肽键在线性排列中相互连结的氨基酸残基的线性排列所组成的分子。在本发明中，这些肽可以包括从大约 3 到大约 500 个氨基酸残基，可以进一步包括二级、三级或四级结构，此外，分子间连结可以通过，但是并不限于，共价键(例如通过二硫键连结)或者通过整合作用、静电相互作用、疏水相互作用、氢键、离子-偶级子相互作用，偶级子-偶级子相互作用或上述方式的任意组合。

在第一个方面，本发明提供一种监测蛋白酶体抑制剂在哺乳动物中的药效学药物作用的方法，包括哺乳动物给药蛋白酶体抑制剂；给药蛋白酶体抑制剂后在指定的一个或多个时间从动物采集一个或多个试验生物样品；测量生物样品或各生物样品蛋白酶体活性；确定生物样品或各生物样品蛋白酶体活性的量；比较试验生物样品和取自没有给药过蛋白酶体抑制剂哺乳动物参考生物样品中蛋白酶体活性的量。

从哺乳动物采集的生物样品包括，但是不限制于，血液、尿、器官和组织样品。根据发明的这一个方面，优选生物样品是血液、更优选的是血细胞裂解物。细胞裂解可以通过标准程序完成。在特定的优选实施方案中，生物样品是全血细胞裂解物。Kahn 等(生物化学生物

物理通讯(*Biochem. Biophys. Res. Commun.*)214:957- 962(1995)和 Tsubuki 等(欧洲生化学会联合会快报 (*FEBES Lett.*), 344:229-233 (1994))公开了红细胞含有内源性蛋白质性的蛋白酶体抑制剂。因此即使小量红细胞对生物样品的污染就可能干扰分析。然而, 本发明人已经发现当存在大约 0.05%浓度的 SDS 时, 内源性蛋白酶体抑制剂被灭活, 从而允许对红细胞裂解物和全血细胞裂解物进行可靠地分析。在这个 SDS 浓度下, 全部蛋白酶体活性都归因于 20S 蛋白酶体。尽管纯化的 20S 蛋白酶体在 0.05%SDS 下表现出不良的稳定性, 但是细胞裂解物中 20S 蛋白酶体活性在这些条件却是稳定的。就经济和样品制备的难易而言, 用全血细胞裂解物中进行分析的能力提供了显著优势。

在其它特定的优选实施方案中, 生物样品是白细胞裂解物。血细胞分离的方法在本领域中是公知的(Rickwood等, 分析生物化学(*Anal. Biochem.*) 123:23-31(1982));Fotino 等, 临床实验室科学年刊(*Ann. Clin. Lab. Sci.*) 1:131(1971)), 并且在实施例中有进一步的描述。对细胞分离有用的商业化产品包括, 但不限于, Ficol-Paque® (Pharmacia Biotech)和 NycoPrep™ (Nycomed)。在一些情况下, 白细胞裂解物比全血细胞裂解物提供更好的数据重现性, 因此在那些情况下它可能是优选的生物样品。

在样品制备方面的差异能够通过向数据处理过程引进一个归一化步骤来校正。在特定的优选实施方案, 样品中的蛋白酶体活性可以相对于样品中蛋白质含量进行归一化处理(比活方法)。可利用标准程序, 包括但不限于, Bradford 分析和 Lorry 方法确定样品中全部蛋白质含量。在其它特定的优选实施方案中, 样品中蛋白酶体活性可以相对于细胞计数进行归一化处理。这个实施方案在某些环境中可能是优选的实施方案, 例如临床环境, 在此环境中很容易使用自动化细胞计数仪。

蛋白酶体抑制剂经常表现出对蛋白酶体中的一种肽酶活性具有优先抑制, 超过对其它蛋白酶体肽酶活性的抑制。本发明人已经认识到这种差异抑制提供了一种以蛋白质含量或细胞计数为基础的归一化程序的可替换的方法。因此, 在特定的特别优选的实施方案中, 蛋白酶

体抑制用蛋白酶体中一种肽酶活性与另一种肽酶活性的比值来确定。在实施例中，提供了用本发明的这个实施方案确定蛋白酶体抑制的理论方程的推导过程。为了使本发明的这个实施例可以操作，研究所用的蛋白酶体抑制剂必须能优先抑制一种肽酶活性，（此种抑制）超过对其它至少一种肽酶活性的抑制。所要研究的肽酶活性，以及因此的所要使用的合适的肽底物的选择取决于所研究的抑制剂。例如，对于抑制剂 N-(吡嗪)羧基-L-苯丙氨酸-L-亮氨酸 硼酸(1)，蛋白酶体抑制优先确定为糜蛋白酶活性与胰蛋白酶活性的比值。糜蛋白酶活性被 1 完全抑制，然而胰蛋白酶活性在相同的浓度范围内却被 1 活化。

用于采集生物样品的哺乳动物优选大鼠、小鼠、狗、猪、兔、除人以外的灵长类动物，或人。除人以外的灵长类动物包括，但是不限于，食蟹猴、狨猴、黑猩猩和狒狒。哺乳动物更优选地是人，最优选地是正使用蛋白酶体抑制剂进行治疗的人。治疗可以发生在医院背景或者门诊的基础上。人优选是正在经受由泛素-蛋白酶体途径所介导蛋白质不当降解或者蛋白降解加速所引起病症的患者。在一个优选实施方案中，该病症选自 HIV 感染；恶病质；原生动物门寄生虫病例如疟疾；细胞增殖性疾病例如肿瘤、牛皮癣和再狭窄；和炎症疾病。炎症疾病包括但是不限于，骨-和类风湿性关节炎；炎症肠炎，包括溃疡性结肠炎和局限性回肠炎；脓毒症；移植排斥；哮喘；以及局部缺血或再灌注损伤，包括中风和心肌梗塞。在特定的优选实施方案中，人是指癌症病人或者正患有或具有发展成局部缺血或再灌注损伤风险的病人。

本发明的肽醛蛋白酶体抑制剂优选地包括 Stein 等在 1995 年 9 月 21 日所公开的 W095/24914 中或 Siman 等在 1991 年 9 月 19 日所公开的 W091/13904 中公开的那些，将两者作为参考文献完整地并入本发明。

在本发明中使用的硼酸或酯类化合物优选地包括 Adams 等在 1996 年 5 月 9 日所公开的 W096/13266 或 Siman 等在 1991 年 9 月 19 日所公开的 W091/13904 中公开的那些，以参考文献形式将两者完整地并入本

发明。

在本发明中使用的硼酸(boronic acid)化合物,更加优选地选自:
 N-乙酰基-L-亮氨酸- β -(1-萘基)-L-丙氨酸-L-亮氨酸 硼酸;
 N-(8-喹啉)磺酰基- β -(1-萘基)-L-丙氨酸-L-亮氨酸 硼酸;
 N-(吡嗪)羰基-L-苯丙氨酸-L-亮氨酸 硼酸;
 β -(1-萘基)-L-丙氨酸-L-亮氨酸 硼酸;和
 N-(4-吗啉)羰基-[O-(2-吡啶基甲基)]-L-酪氨酸-L-亮氨酸硼酸。

在本发明中使用的 lactacystin 和 lactacystin 类似物化合物优选地包括在 Fenteany 等 1996 年 10 月 17 日公开的 W096/32105 中公开的那些化合物,以参考文献的形式将其完整地并入本发明。lactacystin 类似物更优选地从 lactacystin, clasto-lactacystin β -内酯, 7-乙基-clasto-lactacystin β -内酯和 7-正-丙基-clasto-lactacystin β 内酯中选择。最优选地,该 lactacystin 类似物是 7-正丙基-clasto-lactacystin β -内酯。

蛋白酶体抑制剂可以用任何途径给哺乳动物用药,包括皮内、腹膜内、皮下、关节腔内、口服、鞘内、鼻内、动脉内、静脉内、局部、或直肠(给药)。在特定的优选实施方案中,蛋白酶体抑制剂可以通过瘤内注射给药。肠胃外用药可以用大丸剂(bolus)或输注提供。目前优选静脉或腹膜内途径给药。蛋白酶体抑制剂可以单次给药或重复给药。重复给药可以按照每月一次到每日数次的频率给药。如下所讨论,本发明的方法对确定适合于一种特定蛋白酶体抑制剂的给药量和给药频率是有用的。

生物样品中蛋白酶体活性可用任何适于确定 20S 或 26S 蛋白酶体活性的分析方法测量。(参见,例如,McCormack 等,生物化学(Biochemistry) 37:7792-7800(1998); Driscoll 和 Goldberg,生物化学杂志(J. Biol. Chem.) 265:4789(1990);Orlowski 等,生物化学(Biochemistry) 32:1563(1993))。优选地,向反应混合物提供一种具有可检测的标记的底物,随后通过底物的消失或一种切割产物的出现来监测底物的蛋白水解性切割。标记物检测可以用,例如,荧光测

量、比色法或放射性测量分析实现。

用于确定 26S 蛋白酶体活性优选的底物，包括但不限于，溶菌酶、 α -乳清蛋白、 β -乳球蛋白、胰岛素 b-链和鸟氨酸脱羧酶。如果要测量 26S 蛋白酶体活性，底物优选是泛素化的或者反应混合物应该优选进一步包括泛素和泛素化酶。

更优选的底物是长度小于 10 个氨基酸的肽。在一个优选的实施方案中，肽底物含有一个可以切割的荧光标记并可通过荧光测量监测此标记的释放。根据本发明的这个实施方案，优选底物的非限制性的实例包括 N-(N-羧基苄氧羰基亮氨酸亮氨酸精氨酸)-7-氨基-4-甲基香豆素 (Z-Leu-Leu-Arg-AMC), N-(N-苄甲酰基缬氨酸甘氨酸精氨酸)-7-氨基-4-甲基香豆素 (Bz-Val-Gly-Arg-AMC), N-(N-羧基苄氧羰基亮氨酸亮氨酸精氨酸)-2-萘胺 (Z-Leu-Leu-Glu-2NA), 或 N-(N-琥珀酰亮氨酸亮氨酸缬氨酸酪氨酸)-7-氨基-4-甲基香豆素 (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC)。在特定的优选实施方案中，反应混合物进一步包括一种 20S 蛋白酶体活化剂。优选的活化剂包括 Coux 等(生物化学年评(Ann. Rev. Biochem.) 65:801-847(1995))所教导的那些活化剂，优选 PA28 或十二烷基硫酸钠(SDS)。

分析当中每日之间的差异可能起因于如下因素，例如缓冲溶液的差异、操作者差异、设备性能差异和温度差异。可相对于一种包括已知量或恒定量蛋白酶体活性的标准蛋白酶体样品对生物样品和参考样品中蛋白酶体活性进行标准化，使这些差异达到最小。在特定的优选实施方案中，标准蛋白酶体样品包括纯化的 20S 蛋白酶体，更优选从真核生物纯化的 20S 蛋白酶体。20S 蛋白酶体的来源并不是至关重要的，它包括但不限于，哺乳动物，后者包括但不限于兔。在特定的优选实施方案中，20S 蛋白酶体是从兔网状细胞纯化的。在其它的特定实施方案中，标准样品是一种生物样品，包括但不限于血液样品。生物样品优选是全血细胞裂解物，更加优选从人采集的全血细胞裂解物，又优选没有接受过蛋白酶体抑制剂给药的人。

将试验生物样品中所测量的蛋白酶体活性与从没有给药过蛋白酶

体抑制剂哺乳动物所采集参考生物样品的测量数值作比较。在某些优选实施方案中，试验生物样品和参考生物样品各自独立地包括从一组正在接受治疗的哺乳动物，优选小鼠，所汇集的许多样品。在其它优选实施方案中，试验生物样品和参考生物样品每一个都包括从哺乳动物个体采集的单个样品。目前，检测个体样品是优选的，除了由于哺乳动物的小体积所致的不可行外。在某些优选实施方案中，通过汇集来自个体试验生物样品或个体参考生物样品的数据获得一个统计学样本。

在某些优选实施方案中，在开始蛋白酶体抑制剂治疗前从治疗的哺乳动物采集参考样品。为使哺乳动物间差异的影响最小，目前优选对高等哺乳动物进行这个实施方案。目前，对蛋白酶体抑制剂药物作用的临床监测优选包括本发明的这个实施方案，每个病人作为自己的基线对照。

与参考样品比较，生物样品中蛋白酶体活性的下降指示采集生物样品时蛋白酶体抑制剂的体内效应。在某些优选实施方案中，在给药蛋白酶体抑制剂之后多个时间点采集生物样品。在这些实施方案中，生物样品中蛋白酶体活性的测量值为蛋白酶体抑制剂活在体内的效应程度和持续时间提供了指示。在其它特定的优选实施方案中，在一个或多个时间点从一种哺乳动物采集多个生物样品。在这个实施方案中，生物样品中蛋白酶体活性的测量值为蛋白酶体抑制剂在哺乳动物体内的分布提供了指示。

蛋白酶体活性测量值差异的潜在来源包括个体间差异，单一个体中蛋白酶体活性随时间波动，以及白细胞和红细胞中蛋白酶体活性的差异。所有这些差异的来源都可能影响基于比活的对蛋白酶体抑制测定。相反地，基于蛋白酶体中一种肽酶活性对另一种(肽酶活性)的比值蛋白酶体抑制测定，可能显示更好的一致性。

在第二个方面，本发明提供一种确定蛋白酶体抑制剂给药方案的方法，包括给哺乳动物给药蛋白酶体抑制剂；在给药蛋白酶体抑制剂之后一个或多个指定时刻从哺乳动物采集一个或多个试验生物样品；

测量试验样品或各试验样品中蛋白酶体活性；确定试验样品或各试验样品中蛋白酶体活性的量；将试验样品中蛋白酶体活性的量与从没有给药过蛋白酶体抑制剂哺乳动物所采集参考样品的活性量做比较；以及选择今后将要给药的蛋白酶体抑制剂的给药量和给药频率。

根据发明的这个方面，优选实施方案正如第一个方面所述。

给药量优选地以 mg/kg 或 mg/m² 为基础确定。今后将要给药的哺乳动物可能与采集生物样品或样品的哺乳动物相同，或者也可能是不同的哺乳动物。在某些实施方案中，可以重复前面所述及的步骤。例如，在临床场合，由于对从患者所采集的生物样品中蛋白酶体活性的反复监测，所以可以反复或连续地调节给药量和给药频率。

在特定的优选实施方案中，为避免蛋白酶体的过度抑制而选择蛋白酶体抑制剂的给药量和给药频率。在某些实施方案中，蛋白酶体过度抑制引起毒性效应，毒性效应包括但不限于，呕吐、腹泻、血容量减少、低血压和死亡。优选地，选择蛋白酶体抑制剂给药量和给药频率，从而使此后任何生物样品中蛋白酶体的抑制不会超过大约 95%。

在其它特定的优选实施方案中，选择蛋白酶体抑制剂的给药量和给药频率，从而获得对治疗有用的蛋白酶体抑制。优选的对治疗有用的蛋白酶体抑制引起一种对治疗有利的抗肿瘤、抗炎症、抗病毒或抗寄生虫效应。优选地，选择蛋白酶体抑制剂的给药量和给药频率，从而使此后生物样品中蛋白酶体抑制达到至少大约 15%，优选大约 20%，更优选地大约 30%，甚至更优选地是大约 40%，还更优选地是 50%，最优选地是大约 50-大约 80%，尽管在某些情况下优选高达 95% 的蛋白酶体抑制。

在特定的优选实施方案中，从疾病局灶采集生物样品。在一个优选实施方案中，生物样品包括肿瘤或肿瘤细胞，优选地从一个癌症患者采集。在这个实施方案中，优选地通过在患者中所出现肿瘤的活组织检查采集生物样品。在另一个优选的实施方案中，生物样品包括来自患有血细胞增殖病的患者的血细胞或血细胞前体。在另一个优选实施方案中，通过牛皮癣患者的皮肤活组织检查采集生物样品。在还一

个优选的实施方案中，通过炎症肠炎患者结肠活组织检查采集生物样品。在又一个优选的实施方案中，生物样品包括滑液，优选来自关节炎患者的(滑液)。在再一个优选实施方案中，生物样品包括肌肉细胞，优选来自恶病患者的(肌肉细胞)。在又一个优选实施方案中，生物样品包括支气管液，优选来自哮喘患者的(支气管液)。

在第三个方面，本发明提供一种确定哺乳动物基线蛋白酶体活性的方法，包括从哺乳动物采集一个或多个生物样品；测量该生物样品或各生物样品中蛋白酶体活性；确定生物样品或各生物样品中蛋白酶体活性的量。在特定的实施方案中，本方法进一步包括确定要给哺乳动物给药的蛋白酶体抑制剂的给药量和给药频率。

根据本发明这一方面中，优选的实施方案如以上在第一个方面和第二个方面所描述的。

在根据本发明这一方面的一个优选实施方案中，哺乳动物患有疾病或疾病状态。本发明人考虑在特定疾病状态下，活体内蛋白酶体活性会变化。重要的是在开始给药蛋白酶体抑制剂治疗之前鉴定与蛋白酶体活性正常值的偏差。在基线蛋白酶体活性高于正常值的地方，可能必需一个高于正常给药量的蛋白酶体抑制剂给药量。相反的，在蛋白酶体活性低于正常数值的地方，可能必需一个低于正常给药量的蛋白酶体抑制剂给药量。

在特定的优选实施方案中，将从患有疾病或疾病状态哺乳动物所采集生物样品的蛋白酶体活性数据与从患有相同疾病或病况的其它哺乳动物所采集生物样品的蛋白酶体活性数据合并。然后将合并后的蛋白酶体活性数据与从没有患过疾病或病况哺乳动物或各哺乳动物所采集参考生物样品的蛋白酶体活性数据做比较。在本发明这个方面中，本方法允许用统计学确定疾病或病况对体内蛋白酶体活性所具有的效应，如果有的话。在特定的优选实施方案中，本方法进一步包括确定给患有疾病或病态状况的哺乳动物给药蛋白酶体抑制剂的给药量和给药频率。将要给药蛋白酶体抑制剂的患病哺乳动物可能与用来确定基线蛋白酶体活性的哺乳动物相同，或者也可能是患有相同疾病或病况

的其它不同哺乳动物。

在其它的特定的优选的实施方案中，根据本发明这一方面的方法进一步包括为哺乳动物确定诊断和预后。发明人考虑蛋白酶体活性在导致相似症状的不同疾病状态之间可以区分。相似的，依据基线蛋白酶体活性水平可以将患有特定疾病的哺乳动物分成亚群。本发明人考虑本发明的方法对于将基线蛋白酶体活性和疾病后果关联起来将会有用，对于以相关数据为基础确定哺乳动物个体的预后将会有用。

在另一个优选的实施方案中，哺乳动物已经给药过一种药物。出于各种目的而给药的药物可能会影响蛋白酶体活性水平，或者是直接地影响，例如通过抑制蛋白酶体，或者是间接影响，例如通过影响代谢途径或影响底物利用度。本发明提供监测这些效应和预测药物-药物相互作用的方法。在特定的优选实施方案中，蛋白酶体活性是在从开始给药蛋白酶体抑制剂给哺乳动物治疗之前就已经接受过药物治疗的哺乳动物所采集的生物样品中测量的。本方法进一步包括确定将要给药蛋白酶体抑制剂的给药量和给药频率。

在其它特定实施方案中，合并从药物治疗过哺乳动物所采集生物样品获得的蛋白酶体活性数据和从给药相同药物治疗过的其它哺乳动物所采集生物样品获得的蛋白酶体活性数据。然后将合并后数据与从没有给药过该药物的哺乳动物或各哺乳动物所采集的参考生物样品的蛋白酶体活性数据做比较。本发明的这个方面中的方法允许用统计学确定药物在活体内对蛋白酶体活性所具有的影响，如果有的话。在特定的优选实施方案中，本方法进一步包括确定将给已经用该药物治疗过的哺乳动物给药蛋白酶体抑制剂的给药量和给药频率。将要给其给药蛋白酶体抑制剂的已经用该药物治疗过的哺乳动物可以与用来测量基线蛋白酶体活性的哺乳动物相同，也可以是已经用相同药物治疗过的不同哺乳动物。

在第四个方面，本发明提供一种测量从哺乳动物采集的生物样品中蛋白酶体活性的试剂盒，本试剂盒包括制备生物样品的工具和测量蛋白酶体活性的工具。在特定的优选实施方案中，哺乳动物是人。在

其它特定的优选实施方案中，生物样品是血液、尿、或活组织检查样品。

以下实施例进一步说明本发明特定优选实施方案，且在本质上是非限制性的。

实施例

实施例 1:

N-(吡嗪)羧基-L-苯丙氨酸-L-亮氨酸 硼酸(1)在大鼠和灵长类动物上的药物动力学

大鼠

在 Sprague-Dawley 大鼠(140-280 克)上进行 N-(吡嗪)羧基-L-苯丙氨酸-L-亮氨酸 硼酸(1)单剂静脉给药的药理学研究。将动物分为 3 组(第 1 组和第 2 组每种性别各 6 只动物，第 3 组每种性别各 9 只动物)。第 1, 2 和 3 组动物按相同给药体积分别接受 0.03, 0.1 或 0.3mg/kg 的 1。

在给药前和给药后第一天大约 10 分钟、30 分钟、1 小时、3 小时、和 24 小时从动物颈静脉收集血液样品(约 1.0ml)。用色谱/质谱(LC/MS/MS)法分析样品中 1。在大鼠血浆和全血中 1 分析定量的下限确定在 2.5ng/mL。

单次静脉给药之后，只有当血浆或全血中 1 的水平在 0.3mg/kg 给药水平上时才可以测量。观察到的 C_{max} 在第一个时间点出现；因此，估计到达药峰浓度的时间在雄性和雌性大鼠中都 ≤ 10 分钟。雄性一般具有稍高于雌性的药峰浓度(C_{max})和药物浓度-时间曲线下面积(AUC_{0-t})值。雄性血浆和全血的 C_{max} 值分别是 51.8 和 22.7 ng/mL，在雌性中分别是 36.9 和 19.1 ng/mL。雄性血浆和全血 AUC_{0-t} 值分别是 14.0 和 18.6 ng·h/mL，雌性分别是 12.9 和 17.7 ng·h/mL。因为在终末期内 1 的水平发生波动，所以不可能估计消除半寿期($t_{1/2}$)。观察结果提示 1 被快速地从血液中清除。

灵长类动物

在灵长类动物上所进行寻找范围的研究中，给药后 2 小时测定血

液和血浆中 1 的水平。单次静脉给药给两食蟹猴给药 1 (1 雄性, 3.3kg; 1 雌性, 2.3kg)。每只猴子接受两次单给药 (第 1 天 0.1mg/kg 和第 8 天), 给药体积为 1.0mL/kg。载体是 0.1%抗坏血酸/2%乙醇/98%盐水 (0.9%)。本工作由 Conance Laboratories Inc., Madison, WI 完成。

第 1 天和第 8 天给动物静脉用药后大约 2 小时, 从每只动物收集血液。血液和血浆样品贮存在冰箱中维持于 $-20 \pm 10^{\circ}\text{C}$, 直至用于分析试验物质含量。

用色谱/质谱 (LC/MS/MS) 方法分析样品中的 1。在猴血浆和全血中 1 分析定量的下限确定在 2.5 ng/mL 处。给药 0.1 mg/kg 的 1 之后 2 小时, 血浆中 1 的浓度不到 2.5 ng/mL (雄性和雌性); 全血中 1 的浓度在雄性中是 3.72 ng/mL, 在雌性中是 3.86 ng/mL。给药 0.3 mg/kg 的 1 之后 2 小时, 血浆中 1 的浓度是 4.64 ng/mL (雌性) 和 6.44 ng/mL (雄性); 全血中 1 的浓度是 10.6 ng/mL (雌性) 和 9.01 ng/mL (雌性)。

实施例 2: 制备外周血白细胞裂解物用于体外测量 20S 蛋白酶体活性

本制备程序适用于从哺乳动物, 特别是大鼠、小鼠、狗、猪、兔、除人之外的灵长类动物或人所采集的血液样品。从收集血液样品分离外周血白血细胞, 贮存在 -70°C 直至用于测试。为避免因为存在内源蛋白酶体抑制剂对分析造成的干扰, 严格排除血红细胞是很重要的。

程序

将必需量的血液收集到含有抗凝剂的试管。就人受试者和灵长类动物而言, 需要约 5 mL 血液; 就大鼠而言, 约需要 4 mL 血液; 就小鼠而言, 需要从 5 只小鼠中每一只都采集约 1 mL 血液, 将 5 个血液样品汇集在一起以提供大约 5 mL 血液;

血液样品用无菌盐水 1:1 稀释, 在 14 × 75 mm 聚苯乙烯试管中将血液-盐水混合物按 2:1 血液: Nycoprp™ 置于 Nycoprp™ 分离介质上层 (GIBCO BRL Products)。样品在室温下 500 ×g 离心约 30 分钟。去除顶层, 保留位于顶层和底层之间 2~3 mm 的细胞带。用移液管将剩余的细胞带转移到清洁离心管中。用 3 mL 冷磷酸盐缓冲盐溶液洗涤细胞

带，4℃下 400 ×g 离心 5 分钟。倾弃上清，用 ~ 1 mL 冷磷酸盐缓冲盐溶液重新悬浮。将悬液转移到 1.5 mL Eppendorf 小量离心管，4℃下 6600 ×g 小量离心约 10 分钟。吸除上清，将细胞小团贮存在 -70℃ ± 10℃。

实施例 3: 测量外周血白细胞中 20S 蛋白酶体活性的分析方法比活方法

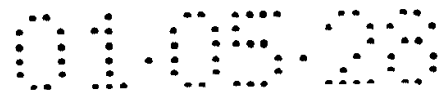
本分析方法以游离 20S 颗粒的 SDS-诱导性糜蛋白酶样活性为基础。使用荧光分析测量 20S 蛋白酶体水解小肽底物中一个酰胺键的速率。缺乏和存在抑制剂时这个速率的测量值能够确定抑制剂结合该酶的程度。本分析方法用来测量哺乳动物外周血白细胞中 20S 蛋白酶体的活性，特别是大鼠、小鼠、狗、猪、兔、除人以外的灵长类动物，或人受试者。

缩写和定义

AMC	7-氨基-4-甲基香豆素
DMF	二甲基甲酰胺
BSA	牛血清白蛋白
DMSO	二甲亚砜
DTT	二硫苏糖醇
EDTA	乙二胺四乙酸二钠
HEPES	N-(2-羟乙基)哌嗪-N-2-(乙磺酸);用 NaOH 调节 pH
Hgb	血红蛋白
SDS	十二烷基硫酸钠, 以下任意一种: SDS-级: 99%十二烷基硫酸钠 十二烷基-级: ~70%十二烷基硫酸钠, 有十四烷基和十六烷基硫酸盐残留
TMB	3, 3', 5, 5' -四甲基联苯胺
WBS	白细胞
Ys 底物	N-(N-琥珀酰-亮氨酸-亮氨酸-缬氨酸-酪氨酸)-7-氨基-4-甲基香豆素 (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC) (Bachem)
MilliQ 水	用反渗透或离子交换纯化并进一步用 Millipore MilliQ Plus UF 水纯化系统(或相当的系统) 处理所生产的电阻率大于 16M $\Omega \cdot \text{cm}$ 的水

程序

将 Ys 底物在 DMSO 中溶解成 6mM. 在玻璃瓶中制备 2% (2 g/100 mL) SDS 的 MilliQ 水溶液。制备 Ys 底物缓冲液, 含有 20 mM HEPES, 0.5 mM EDTA, 0.035% SDS, 1% DMSO 和 60 μM Ys 底物。Ys 缓冲液的最终 pH 为 8.0。



依据文献(McCormack 等, 生物化学(Biochemistry) 37:7792-7800 (1998))的程序从兔网状细胞制备纯化的20S蛋白酶体标准品,用20 mM HEPES/0.5 mM EDTA (pH7.8)按9:1(v/v)稀释。

向5 μ L 20mM AMC的DMF贮存液中加入2mL DMF。将所产生溶液按1:25用DMSO稀释从而制备2 μ M AMC溶液。在荧光分光光度计上记录Ys底物缓冲溶液的零值(λ_{em} =440nm; λ_{ex} =380nm)。用总共5次,每隔30秒钟向2 mL Ys底物缓冲液中加入5 μ L AMC,产生一条AMC为0-50 pmol的校准曲线。每次加入之后进行一次荧光分光光度读数,激发光带宽为10nm,发射光带宽为20nm。该斜率是荧光分光光度计校正值。

20S蛋白酶体标准品用20 mM HEPES/0.5 mM EDTA (pH7.8)中按1:10稀释,形成12 μ g/mL的贮存液,置于冰上。向含有2mL Ys底物缓冲液的杯中加入10 μ L标准的20S蛋白酶体溶液,允许反应进行10分钟。在荧光分光光度计上测量最大线性斜率,提供Ys底物缓冲液和分析条件校正值(Ys校正)。本数值除以荧光分光光度计校正值,从而提供标准20S蛋白酶体的标准化活性。

如同实施例1中所述制备白细胞,向每一样品加入200 μ L 5 mM EDTA裂解白细胞。允许这些样品在冰上放置至少15分钟。

使用商品化试剂盒按照标准的程序对试验样品进行Bradford蛋白质分析(测量总蛋白质含量)和血红蛋白分析。如果血红蛋白的含量大于总蛋白的10%,就不能确定白细胞20S蛋白酶体活性的准确测量值。在这种情形下,样品应该按全血细胞裂解物处理。

在37 $^{\circ}$ C下向含有2 mL Ys底物缓冲液的透明小杯中加入10 μ L试验样品,允许反应进行10分钟。在10分钟内实现20S蛋白酶体的完全活化。4分钟之后直到10分钟,读数得到的结果一致。测量数据的最大线性斜率至少1分钟。如果速率不到1 pmol AMC/sec,使用20 μ L试验样品重复测量。

试验样品中蛋白酶体活性数值依据如下公式计算:

$$20S \text{ 活性} = \frac{\text{速率 (FU/min)} * \text{荧光计校准值 (pmol/FU)}}{0.0001 * \text{WBC 蛋白 (mg)} * 60 \text{ s/min} * \text{Ys 校准值 (pmol/s)}}$$

为使分析可以被认为是有效的,在样品中存在的血红蛋白必须小

于总蛋白质的 10%，一式三份的 20S 蛋白酶体活性数值的标准偏差必须不大于 3%。

实施例 4：将糜蛋白酶活性与胰蛋白酶活性比值和蛋白酶体抑制剂产生的抑制百分数联系起来的方程的推导

假定 k_c 和 k_t 分别为标准分析条件下(没有抑制剂)糜蛋白酶和胰蛋白酶位点的表观速率常数：

$$v_c = k_c[20S]_t \quad (1)$$

$$v_t = k_t[20S]_t \quad (2)$$

这里的 $[20S]$ = 总蛋白酶体浓度

如果存在可引起 E·I 复合物形成的蛋白酶体调节剂时，糜蛋白酶和胰蛋白酶位点的速率常数可以被结合到一个还没有被鉴定位点的单个调节剂分子改变。这种效应可以用 $\beta_c k_c$ 和 $\beta_t k_t$ 代表。

在这里 $\beta = 0$ 表示由调节剂引起的总抑制

(也就是说 E·I 复合物无活性)

$\beta < 1$ 表示部分抑制

(也就是说 E·I 复合物活性小于 E)

$\beta = 1$ 表示无抑制

(也就是说 E·I 复合物具有与 E 相同的活性)

且 $\beta > 1$ 表示活化

(也就是说 E·I 复合物活性大于 E)

在受调节的蛋白酶体的一个给定分数 (f) 下

$$v_c = k_c[20S]_t(1-f) + \beta_c k_c[20S]_t(f) \quad (3)$$

$$v_t = k_t[20S]_t(1-f) + \beta_t k_t[20S]_t(f) \quad (4)$$

$$\text{则 } \frac{v_c}{v_t} = \frac{k_c}{k_t} \left(\frac{1-f+\beta_c f}{1-f+\beta_t f} \right) \text{ 和} \quad (5)$$

$$f = \frac{\left(\frac{k_c}{k_t} - \frac{v_c}{v_t} \right)}{\frac{k_c}{k_t} - \frac{v_c}{v_t} + \beta_t \frac{v_c}{v_t} - \beta_c \frac{k_c}{k_t}} \quad (6)$$

参数 k_c/k_t 是一个可通过实验确定的常数, 至少在一种个体内是这样的, 还可能在跨物种间(也是这样的)。 k_c/k_t 依赖于糜蛋白酶和胰蛋白酶活性的分析条件, 但不依赖于抑制剂的本性。参数 β_c 和 β_t 是特定抑制剂的常数。因为抑制剂-酶复合物活性一定发生与游离酶活性差异的变化, 所以预期它们对分析条件的依赖性远低于 k_c/k_t 。如果 $\beta = 0$ 或 1, 预期 β 对分析条件没有依赖性。一旦知道特定的一套分析条件和抑制剂下的 k_c/k_t , β_c 和 β_t , 就能够用一个粗样品中糜蛋白酶和胰蛋白酶活性来计算受调节的蛋白酶体的分数。

在 N-(吡嗪)羧基-L-苯丙氨酸-L-亮氨酸硼酸的特定例子中, $\beta_c = 0$, 所以

$$\frac{v_c}{v_t} = \frac{k_c}{k_t} \left(\frac{1-f}{1-f+\beta_t f} \right) \quad (8)$$

可以推导类似的方程来表示蛋白酶体抑制对于蛋白酶体的任意两个肽酶活性比值的函数。

实施例 5: 测量外周白细胞中 20S 蛋白酶体活性的分析糜蛋白酶对胰蛋白酶活性的比值

本分析建立在游离 20S 蛋白酶体颗粒的 SDS-诱导性糜蛋白酶样活性和胰蛋白酶样活性的基础上。它使用荧光分光光度计分析来测量 20S 蛋白酶体水解一种小肽底物中酰胺键的速率。因为 20S 蛋白酶体的某些抑制剂完全抑制糜蛋白酶样活性而活化胰蛋白酶样活性, 结合了这种抑制剂的 20S 蛋白酶体的百分数可以直接用糜蛋白酶样活性和胰蛋白酶样活性的比值来确定。

缩写和定义

除了在实施例 3 中所提出的定义之外, 还给药到如下定义:

Rs 底物 N-(N-苯甲酰基缬氨酰甘氨酸精氨酸)-7-氨基-4-甲基香豆素

(Bz-Val-Gly-Arg-AMC) (Bachem)

程序

如实施例 3 中所述制备 Ys 底物缓冲液。

Rs 底物缓冲液在 DMSO 中溶解成 10 mM。制备 Rs 底物缓冲液, 它

含有 20 mM HEPES, 0.5 mM EDTA, 0.6% DMSO 和 60 μ M Rs 底物。

根据文献 (McCormack 等, 生物化学 (Biochemistry) 37:7792-7800 (1998)) 程序所制备的来自兔网状细胞的纯化的 20S 蛋白酶体标准用 20 mM HEPES/0.5 mM EDTA (pH7.8) 按 1:9 (v/v) 稀释。

如实施例 3 中所述, 进行荧光分光光度计校正。

如实施例 3 中所述, 进行 Ys 底物缓冲液校正。

用 Rs 底物缓冲液替换 Ys 底物缓冲液, 以类似的方式进行 Rs 底物缓冲液的校正。

在 37°C 下向含有 2 mL Ys 底物缓冲液的透明小杯中加入 10 μ L 试验样品, 允许反应进行 10 分钟。在 10 分钟内完成 20S 蛋白酶体的完全活化。4 分钟之后直到 10 分钟, 读数获得一致的结果。测量数据的最大线性斜率至少 1 分钟。如果速率小于 1 pmol AMC/sec, 就用 20 μ L 试验样品重复测量。

在 37°C 下向含有 2 mL Rs 底物缓冲液的透明小杯中加入 20 μ L 试验样品, 并允许反应进行 10 分钟。在 10 分钟内完成 20S 蛋白酶体的完全活化。4 分钟之后直至 10 分钟, 读数获得一致的结果。测量最大线性斜率至少 1 分钟。如果速率小于 1 pmol AMC/sec, 就用 20 μ L 试验样品在 800 μ L Rs 缓冲液中重复测量。

然后按照如下方程计算抑制百分数 (%I):

$$\%I = \frac{100 * \left(\frac{k_c}{k_t} - \frac{v_c}{v_t} \right)}{\left(\frac{k_c}{k_t} - \frac{v_c}{v_t} + \beta_t \frac{v_c}{v_t} \right)} \quad (9)$$

在这里, v_c = (糜蛋白酶解的速率 (FU/s) / 所分析样品的体积);

v_t = (胰蛋白酶解的速率 (FU/s) / 所分析样品的体积);

k_c/k_t = 在给药蛋白酶体抑制之前从受试者所采集的 1-3 个基线样品的 v_c/v_t 平均值。

β_t = 决定于蛋白酶体抑制剂的滴定的活化因数。就蛋白酶体抑制剂 1 而言, 在人样品中 $\beta_t = 1.28$ 。

实施例 6: 制备外周全血细胞裂解物用于体外测定 20S 蛋白酶体活性

将所需量的血液收集到一支含有抗凝剂的试管中。典型地, 需要 1 mL 血液。将血液转移到 1.5 mL Eppendorf 小量离心管中, 在 4℃ 下 6000 ×g 小量离心约 10 分钟。吸去血浆, 用一定体积 (~0.5 mL) 的冷磷酸盐缓冲液按 1:1 重新悬浮细胞团。细胞悬液再在 4℃ 下 6600 ×g 小量离心约 10 分钟。吸去上清, 将 10 μL 细胞团转移到一支 1.5 mL Eppendorf 小量离心管中, 加入 0.5 mL 5 mM EDTA。剩余细胞团在 -70℃ 保存。

在本分析中使用这种样品 10-20 μL (典型的蛋白质浓度是 5 mg/mL)。

实施例 7: 测量外周全血细胞中 20S 蛋白酶体活性的分析试验糜蛋白酶样活性对胰蛋白酶样活性的比值

缩写和定义

使用在实施例 3 和 5 中所提出的缩写和定义。

程序

在 DMSO 中将 Y_s 底物溶解成 6 mM。在玻璃瓶中制备 2% SDS (2 g/100 mL) 的 MilliQ 水溶液。制备 Y_s 底物缓冲液, 含有 20 mM HEPES, 0.5 mM EDTA, 0.05% SDS, 1% DMSO 和 60 μM Y_s 底物。Y_s 缓冲液的最终 pH 是 8.0。

在 DMSO 中将 R_s 底物溶解成 10 mM。制备 R_s 底物缓冲液, 含有 20 mM HEPES, 0.5 mM EDTA, 0.6% SDS, 0.6% DMSO 和 60 μM R_s 底物。R_s 缓冲液的最终 pH 是 8.0。

如实施例 6 中所述制备标准全血细胞裂解物, 并用 20 mM HEPES/0.5 mM EDTA (pH7.8) 按 1:9 稀释。

用标准的全血细胞裂解物代替 20S 蛋白酶体标准, 如实施例 3 中所述进行荧光分光光度计校正。

用标准的全血细胞裂解物代替 20S 蛋白酶体标准, 如实施例 3 中所述进行 Y_s 底物缓冲液的校正。

用 Rs 底物缓冲液代替 Ys 底物缓冲液，以类似的方式进行 Rs 底物缓冲液的校正。

在 37℃ 下向含有 2 mL Ys 底物缓冲液的透明小杯中加入含有 60 μg 蛋白质的试验样品，允许反应进行 10 分钟。在 10 分钟内完成 20S 蛋白酶体的完全活化。4 分钟之后直到 10 分钟，读数获得一致的结果。测量数据的最大线性斜率至少 1 分钟。如果速率小于 1 pmol AMC /sec，就将试验样品的量提高到含有 120 μg 蛋白质重复测量。

在 37℃ 下向含有 2 mL Rs 底物缓冲液的透明小杯中加入含有 60 μg 蛋白质的试验样品，并允许反应进行 10 分钟。在 10 分钟内完成 20S 蛋白酶体的完全活化。4 分钟之后直至 10 分钟，读数获得一致的结果。测量数据的最大斜率至少 1 分钟。如果速率小于 1 pmol AMC /sec，就用 120 μg 试验样品重复测量。

然后按照如下方程计算抑制百分数 (%I)：

$$\% I = \frac{100 * \left(\frac{k_c}{k_t} - \frac{v_c}{v_t} \right)}{\left(\frac{k_c}{k_t} - \frac{v_c}{v_t} + \beta_t \frac{v_c}{v_t} \right)} \quad (9)$$

在这里， v_c = (糜蛋白酶解的速率 (FU/s) / 所分析样品的体积)；

v_t = (胰蛋白酶解的速率 (FU/s) / 所分析样品的体积)；

k_c/k_t = 在给药蛋白酶体抑制之前从受试者所采集的 1-3 个基线样品的 v_c/v_t 平均值。

β_t = 决定于蛋白酶体抑制剂滴定的活化系数。就蛋白酶体抑制剂 1 而言，在人样品中 $\beta_t = 1.28$ 。

实施例 8：人类志愿者外周血白细胞中的蛋白酶体活性水平 方法

在 10 周时间内在从数个人类志愿者采集血液样品 (每次大约 2 mL) 5 次。收集以后，用 Nycoprep™ 从各血液样品中分离白细胞。产生的小团在设定好维持于 -60℃ -80℃ 的冰箱中贮存，直至试验那天。在每次所收集的样品一起进行试验，每个样品做两个重复进行试验。

20S 蛋白酶体活性通过测量样品蛋白酶水解一种荧光素 (AMC) 标记的肽底物的速率来确定, 并用裂解物中蛋白质的量对活性进行归一化处理。向含有 2 mL 分析反应缓冲液 (溶于 1.0%DMSO 中的 20 mM HEPES, 0.5 mM EDTA, 0.035% SDS, 60 μ M Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC) 和磁性搅拌棒的透明小杯中加入 5 μ L 样品。将这个小杯置于荧光分光光度计上并维持在 37 $^{\circ}$ C, 同时通过监测可检测荧光的增加来测量水解 AMC 的量 5 分钟 ($\lambda_{em}=440\text{nm}$; $\lambda_{ex}=380\text{nm}$)。对开始反应后 3-5 分钟之间收集的数据的反应进程曲线进行线性回归, 给出以荧光单位/秒 (FU/sec) 表示的水解速率。分别用改良的 Bradford 分析 (Pierce) 和血球蛋白特异性酶解为基础的分析 (Sigma) 方法确定蛋白质和血球蛋白的浓度。通过扣除红细胞所贡献蛋白质的量 (从血红蛋白浓度估计) 来校正样品中所测量蛋白质的总量。用如下方程确定样品中 20S 蛋白酶体的活性:

$$20S \text{ 蛋白酶体活性 (pmoles AMC/sec/mg 蛋白)} = \frac{(\text{FU/sec}) / (5 \times 10^{-6} \text{ mL})(\text{蛋白 } \mu\text{g/mL})}{C}$$

在这里, C=使荧光量等于与游离 AMC 浓度 (FU/pmol AMC) 的转换系数。
结果和讨论

所测出的各人类志愿者 20S 蛋白酶体活性的平均值是 15.33-40.04 pmol AMC/sec/mg 蛋白质 (表 1 和图 1)。贯穿各试验日所发现的活性列于图 2。在该群体中所发现的 20S 蛋白酶体活性的平均值是 29.97 ± 0.80 pmol AMC/sec/mg 蛋白质。

表 1: 人类志愿者中的 20S 蛋白酶体活性水平

志愿者	20S 蛋白酶体活性 (pmol AMC/sec/mg 蛋白质)	
	平均值 \pm SEM	范围
A	31.05 \pm 2.13	26.32-35.77
B	32.77 \pm 1.88	27.94-40.04
C	29.33 \pm 1.93	23.29-34.62
D	30.90 \pm 1.87	26.69-34.04
E	33.91 \pm 2.00	31.69-37.15
F	29.66 \pm 2.01	22.78-34.66
G	23.07 \pm 2.11	15.33-31.17
群体 平均值	29.97 \pm 20.80	15.33-40.04

实施例 9: 给药 N-(吡嗪)羧基-L-苯丙氨酸-L-亮氨酸硼酸 (1) 后所分离的白细胞和组织中暂时的 20S 蛋白酶体活性

一般程序

研究期间每日制备 1 的给药剂型。从贮存液制备稀释(溶液)。1 的贮存液用 98% 的盐水 (0.9%), 2% 乙醇和 0.1% 抗坏血酸制备。用相同赋形剂制备稀释(溶液)。

从 Taconic Farm (Germantown, NY) 获取雌性 CD2-F1 小鼠 (18-20 克), 雌性 BALB/c 小鼠 (18-20 克), 雌性 Wistar 大鼠 (150-200 克) 和雄性 Sprague-Dawley 大鼠 (250-450 克)。开始研究之前观察动物至少一周, 进行一般健康检查。这些研究中所用动物都无症状的。在聚碳酸酯笼子饲养, 小鼠每笼 5 只, 大鼠每笼 3 只。在观察和研究期间使用 Corn Cob 褥草 (AND-1005; Farmers Exchange, Framingham, MA)。控制荧光发光从而自动提供各大约 12 小时的光和暗交替的周期。每日主要控制和记录温度和湿度, 读数分别在 $21 \pm 2^\circ\text{C}$ 和 $45 \pm 5\%$ 之间。在全部观察和研究期间, 标准啮齿动物食物的小团 (#5001, Purina, St.

Louis, MO) 随意可得。水瓶随意提供剑桥市自来水。没有发现预期会干扰研究的食物和水污染。

用载体静脉 (IV) 注射药物, 所用给药体积为小鼠每只 $100 \mu\text{L}$ 或大鼠 1.0 mg/kg 。给对照组给药载体 (98% 的盐水 (0.9%), 2% 乙醇和 0.1% 抗坏血酸)。用单个 IV 快注一次或数次给药给动物 1。表现出半死活性的动物用 CO_2 吸入法将其安乐地处死。

IV 给药 1 之后, 在各时间点抽取血液并分离外周血白细胞。单给药 1 之后, 在小鼠外周血白细胞中所测定的离体 20S 蛋白酶体活性

在两个合并的研究中, 给雌性 CD2-F1 小鼠 (18-20 克) 和雌性 BALB/c 小鼠 (18-20 克) 单静脉给药 1 ($0.1-0.3 \text{ mg/kg}$, 给药体积为 $100 \mu\text{L}$)。载体是 98% 的盐水 [0.9%], 2% 乙醇, 0.1% 抗坏血酸。用药后 1.0 和 24 小时收集血液样品。因为 20S 蛋白酶体活性试验所必需的血液体积, 同时处死各组中 5 只小鼠, 将血液合并以产生各单一数据点。

对所有剂量组在静脉给药 1 之后 1 小时, 20S 蛋白酶体活性有一个显著的剂量-相关的下降 ($p < 0.05$), 在 24 小时开始恢复 (图 4)。这些研究表明, 单次静脉注射给药 1 之后, 小鼠外周血白细胞中 20S 蛋白酶体活性有剂量-依赖性的可逆转的抑制。

单次静脉给药 1 之后, 在大鼠外周血白细胞中所确定的离体 20S 蛋白酶体活性

在 4 个合并的研究中, 给雌性 Wistar 大鼠 (150-200 克) 单次静脉给药 1 ($0.03-0.0 \text{ mg/kg}$, 给药体积为 1.0 mg/kg)。载体是 0.1% 抗坏血酸/2% 乙醇/98% 盐水 (0.9%)。在给药 1 后 1.0, 24 和 48 小时收集血液样品。

在静脉给药 1 后 1 小时, 20S 蛋白酶体活性有一个显著 ($p < 0.05$) 的剂量-相关的下降 (图 5)。给药后 24 小时, 20S 蛋白酶体活性的剂量-相关下降较小, 但在较高剂量组 (0.2 m/kg) 中仍然显著 ($p < 0.05$) (图 6)。在给药后 48 小时的时候, 20S 蛋白酶体抑制剂不再有显著的下降 (图 7)。

这些研究表明, 在单次静脉注射 1 之后大鼠外周血白细胞中 20S 蛋白酶体活性有一种剂量-依赖性的且可以逆转的抑制。在大鼠上观察到 20S 蛋白酶体活性水平有较慢的回归基线速率, 可能表示在小鼠上代谢更快。

重复静脉给药 1 之后, 在大鼠外周血白细胞中所确定的离体的 20S 蛋白酶体活性

如果每日静脉给药 1 连续用 7 天, 最后一次给药之后 24 小时观察到 20S 蛋白酶体活性有一种剂量相关的下降。对于 ≥ 0.05 mg/kg 的剂量观察到显著的抑制。7 个每日静脉给药之后 24 小时所观察到 20S 蛋白酶体抑制的程度大于单次静脉给药之后 24 小时所观察到抑制的程度, 这可能反映了每日给药 1 对其生物学靶位-蛋白酶体的累积效应。

对于隔日静脉给药 1 连续给药 14 天(的给药方案), 在最后一次给药之后 24 小时观察到 20S 蛋白酶体抑制剂有一种显著的剂量相关性下降。在剂量 ≥ 0.2 mg/kg 的组中, 20S 蛋白酶体活性的剂量相关性下降是显著的 ($p < 0.05$)。对每周 1 次静脉给药 1 连续给药 8 周(的给药方案), 在最后一次给药后 24 小时观察到 20S 蛋白酶体活性有一种显著的剂量相关的下降 ($p < 0.05$)。在剂量 ≥ 0.1 mg/kg 的剂量组中, 20S 蛋白酶体活性的降低是显著的 ($p < 0.05$)。

在附加的重复给药研究中, 用每周两次静脉给药 (0.01-0.35 mg/kg/day, 给药体积为 1.0mL/kg) 连续两周给药 1 (这样的方式) 来处理雄性 Sprague-Dawley 大鼠 (250-450 克; $n=6$ /组)。载体是 0.1% 抗坏血酸/2% 乙醇/98% 盐水 (0.9%)。为了评价 20S 蛋白酶体活性, 在最后一次给药之后 1.0 小时收集血液样品。

当每周给药 1 共两周时, 在最后给药后 1.0 小时观察到 20S 蛋白酶体活性的剂量相关性下降(图 8)。对于所有剂量 ≥ 0.03 mg/kg 的给药组, 20S 蛋白酶体活性的降低是显著的 ($p < 0.05$)。

结果表示重复剂量给药 1 在大鼠白细胞中诱发 20S 蛋白酶体活性发生剂量相关性的下降。在每日 1 次或隔日 1 次给药 1 时, 20S 蛋白酶体活性抑制的程度大于单次给药之后所见到的程度。如果增加 1 的

给药间隔从而允许(蛋白酶体活性)恢复的话(例如,每周一次的给药方案),那么抑制的程度就等于单次给药 1(的给药方案)。这种药效曲线支持 1 每周两次给药(的给药方案),其中观察到暂时性抑制。

重复静脉给药 1 之后,在大鼠组织中所测定的离体的 20S 蛋白酶体活性

在两项研究中,给雌性 Wistar 大鼠(150-200 克)单次静脉给药 1(0.03, 0.1 和 0.3 mg/kg, 给药体积为 1.0 mL/kg)。载体是 0.1%抗坏血酸/2%乙醇/98%盐水(0.9%)。为了评价 20S 蛋白酶体活性,在给药之后 1.0, 24 和 48 小时从肝和脑收集组织样品。

静脉给药 1 之后 1.0 小时在大鼠肝中 20S 蛋白酶体活性有一种显著的剂量相关性下降($p < 0.05$)。给药后 24 小时,20S 蛋白酶体活性的剂量相关性下降较小,但在高剂量组 0.3 mg/kg 中仍然是显著($p < 0.05$)。在给药后 48 小时,大鼠肝中的 20S 蛋白酶体活性已经回到基线。肝中 20S 蛋白酶体活性抑制程度回到基线水平(的速度)比外周血白细胞所观察到的快。在脑组织中没有观察到 20S 蛋白酶体抑制,反映出没有 1 穿透进入该组织。

在第 3 项研究中,给雄性 Sprague-Dawley 大鼠(250-450 克)单次静脉给药 1(0.1 和 0.3 mg/kg, 给药体积为 1.0 mL)。载体是 0.1%抗坏血酸/2%乙醇/98%盐水(0.9%)。为了评价 20S 蛋白酶体活性,在给药之后 1.0 小时收集血液和组织样品。从脑、结肠、肝、肌肉(腓肠肌)、前列腺和睾丸中收集组织。

静脉给药 1 之后 1 小时,在外周血白细胞、结肠、肌肉(腓肠肌)、前列腺中观察到 20S 蛋白酶体活性有一个显著的剂量依赖性下降($p < 0.05$)。在脑和睾丸中没有观察到 20S 蛋白酶体抑制,反映出没有 1 穿透进入这些组织。

静脉给药之后 1 小时,各组织中 20S 蛋白酶体抑制,除脑和睾丸外,都相似于外周血白细胞所观察到的。

单次静脉给药 1 之后,在灵长类动物中所测定的离体的 20S 蛋白酶体活性

将雄性和雌性食蟹猴(2.2-3.5kg)分为四组(5/性别/组)。每组接受0(载体对照),0.045,0.067,或0.100 mg/kg/次单次静脉注射1,给药体积为0.3 mL/kg,每周两次连续4周(第1,5,8,12,15,19,22和26天)。载体是0.1%抗坏血酸/2%乙醇/98%盐水(0.9%)。在第27天处理结束时,处死来自对照组、低剂量组和中剂量组的三只雄性,高剂量组两只雄性和各组的三只雌性,两只动物/性别/组被指定为恢复动物,接受处理4周,随后两周恢复;在第41天将它们处死。

在处理之前、在第1,8,15和22天给药后1.0小时和第5,12,19和26天给药前1.0小时、以及在第31,34,38和41天(恢复处死的动物),收集血液用于20S蛋白酶体活性的确定。还在第26天接受8次给药之后处于垂死状态下被处死之前从高剂量雄性收集血液用于20S蛋白酶体活性确定。

给药后1.0小时白细胞20S蛋白酶体活性的确定揭示在接受随后给药之前,已经恢复72小时的酶活性有一个显著的剂量依赖性的下降(图9和10)。发现在第26天处死的垂死动物在其白细胞中有低的残余20S蛋白酶体活性。

这些数据支持每周两次给药1的治疗计划,因为20S蛋白酶体水平在给药之间恢复。

实施例10: (N-(吡嗪)羧基-L-苯丙氨酸-L-亮氨酸硼酸)(1)对于来自兔网织细胞的纯化的20S蛋白酶体的糜蛋白酶和胰蛋白酶活性的效应

根据已发表的程序从兔网织细胞纯化20S蛋白酶体(McCormack等,生物化学(Biochemistry)37:7792-7800(1998))。如实施例3和5中所述,使用浓度递增的蛋白酶体抑制剂1进行糜蛋白酶和胰蛋白酶分析。数据列于图11。

实施例11: 来自兔网织细胞的纯化的20S蛋白酶体中糜蛋白酶活性对胰蛋白酶活性比值与抑制百分数之间的关联性

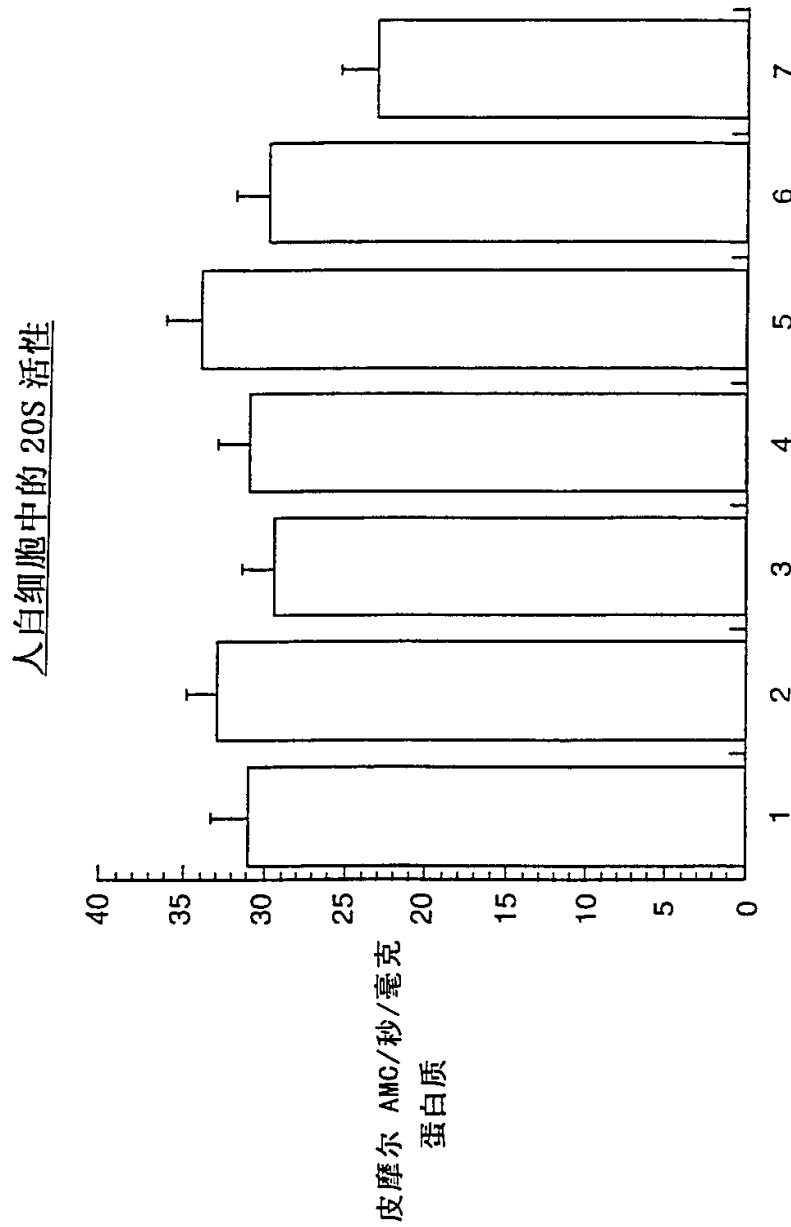
根据已发表的程序制备来自兔网状细胞的纯化20S蛋白酶体(McCormack等,生物化学(Biochemistry)37:7792-7800(1998))。

如实施例 3 和 5 中所述, 使用浓度递增的蛋白酶体抑制剂 1 进行糜蛋白酶和胰蛋白酶分析。数据拟合到 $v_c/v_t=k_c/k_t*(1-f)/(1-f+\beta_t*f)$, 在这里 $k_c/k_t=2.88\pm 0.03$, $\beta_t=1.38\pm 0.05$, 而 $\%I=f*100$ (图 12)。

实施例 12: 大鼠白细胞裂解物中抑制百分数与糜蛋白酶活性对胰蛋白酶活性比值之间的关联性

如实施例 3 和 5 中所述, 使用浓度递增的蛋白酶体抑制剂 1 进行糜蛋白酶和胰蛋白酶分析。如实施例 10 进行数据拟合, 得 $k_c/k_t=1.76\pm$ 和 $\beta_t=1.1\pm 0.2$ (图 13)。

说明书附图



受试者
图 1

1号受试者人白细胞中的20S活性

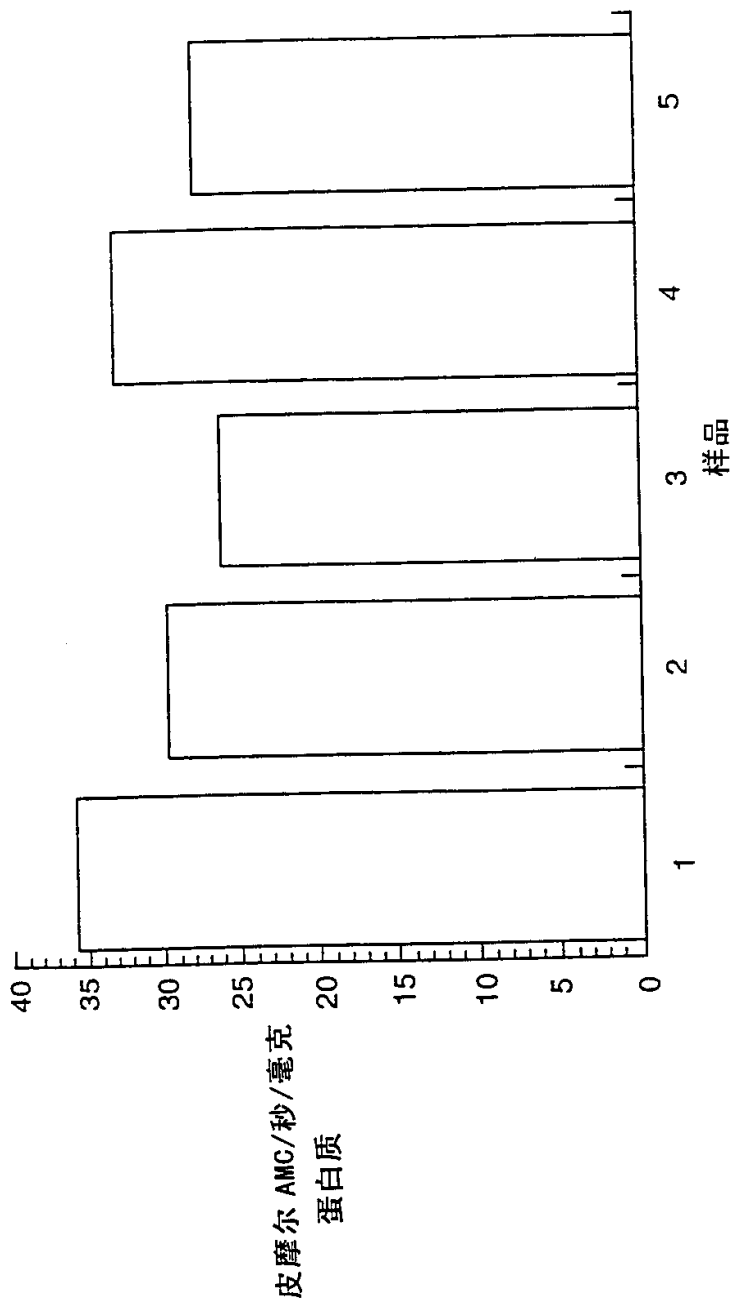


图 2A

2号受试者人白细胞中的20S活性

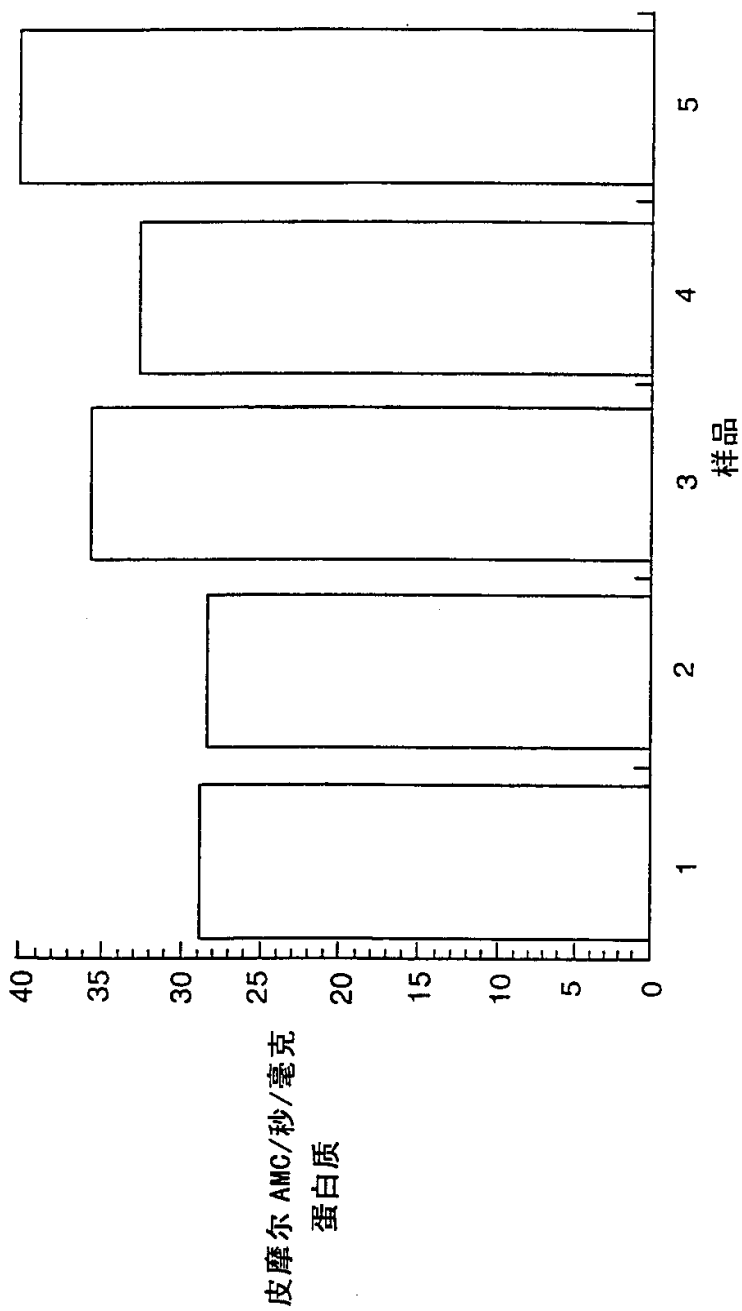


图 2B

3号受试者人白细胞中的20S活性

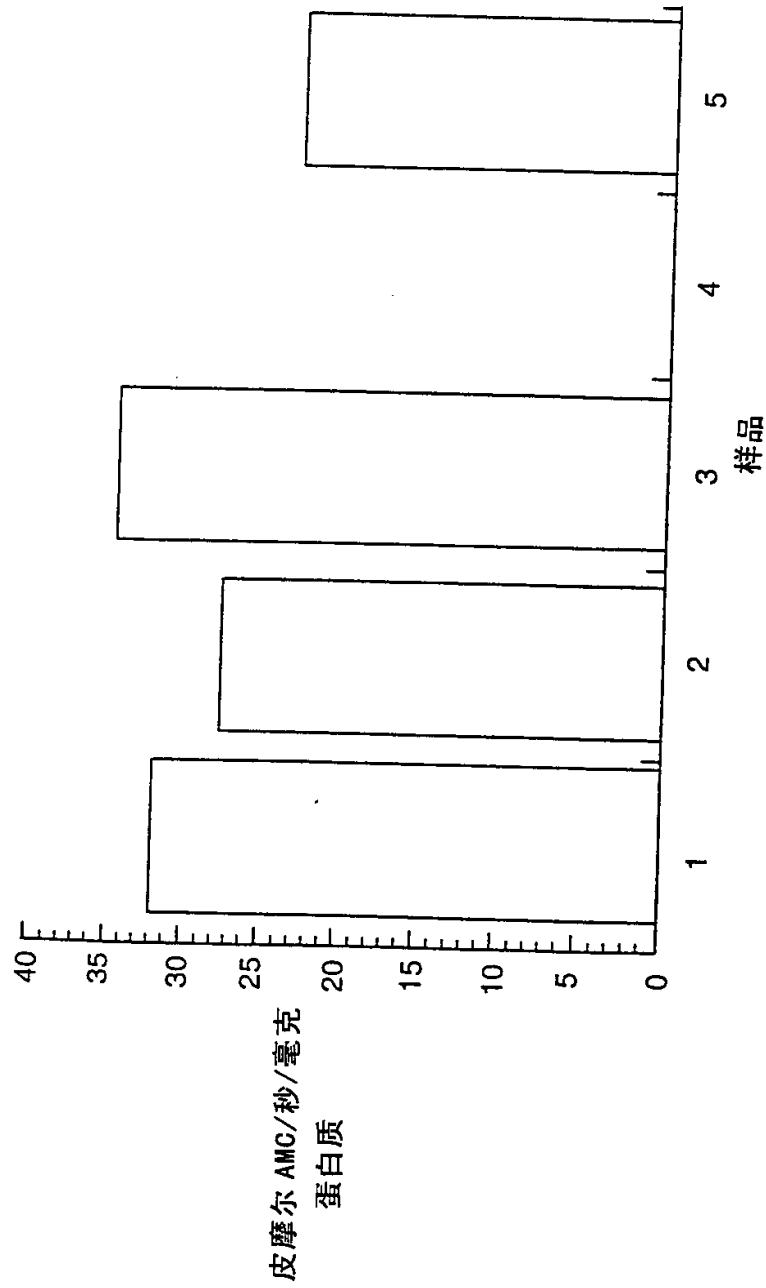


图 2C

4号受试者人白细胞中的20S活性

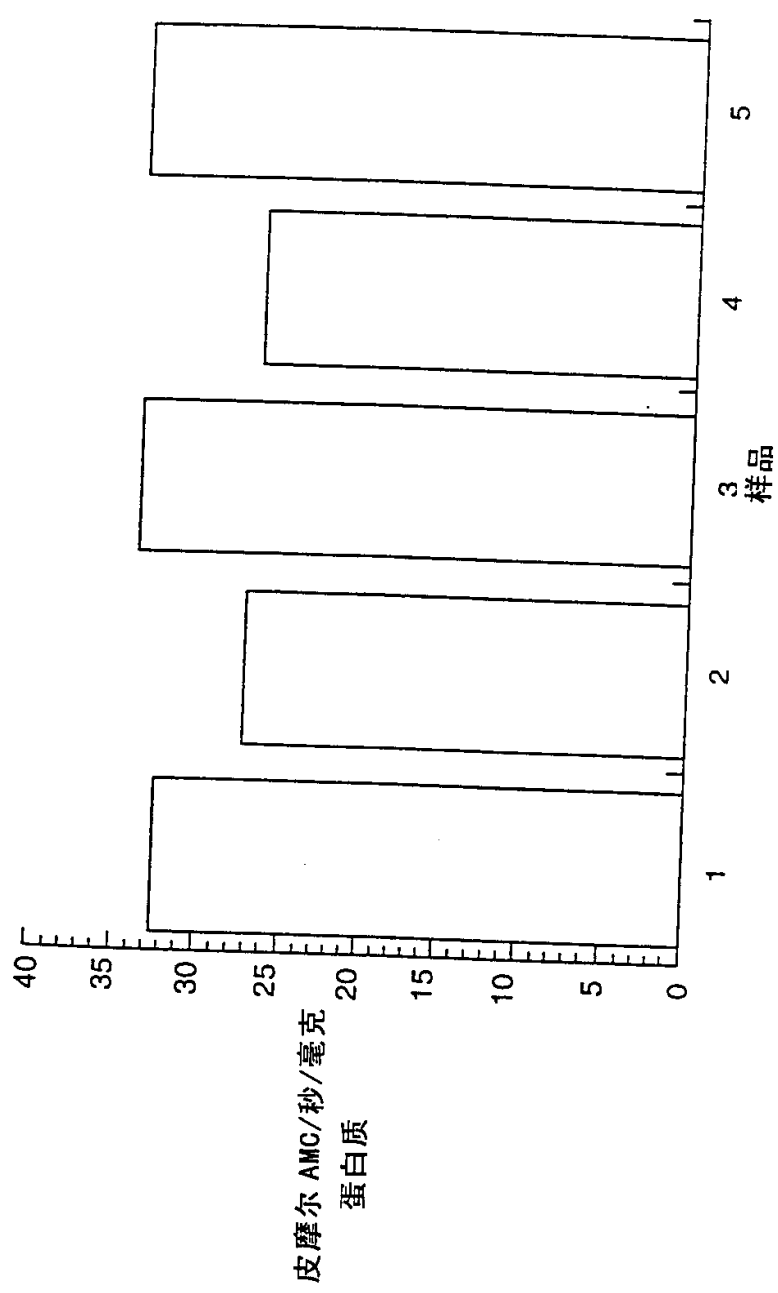


图 2D

5号受试者人白细胞中的20S活性

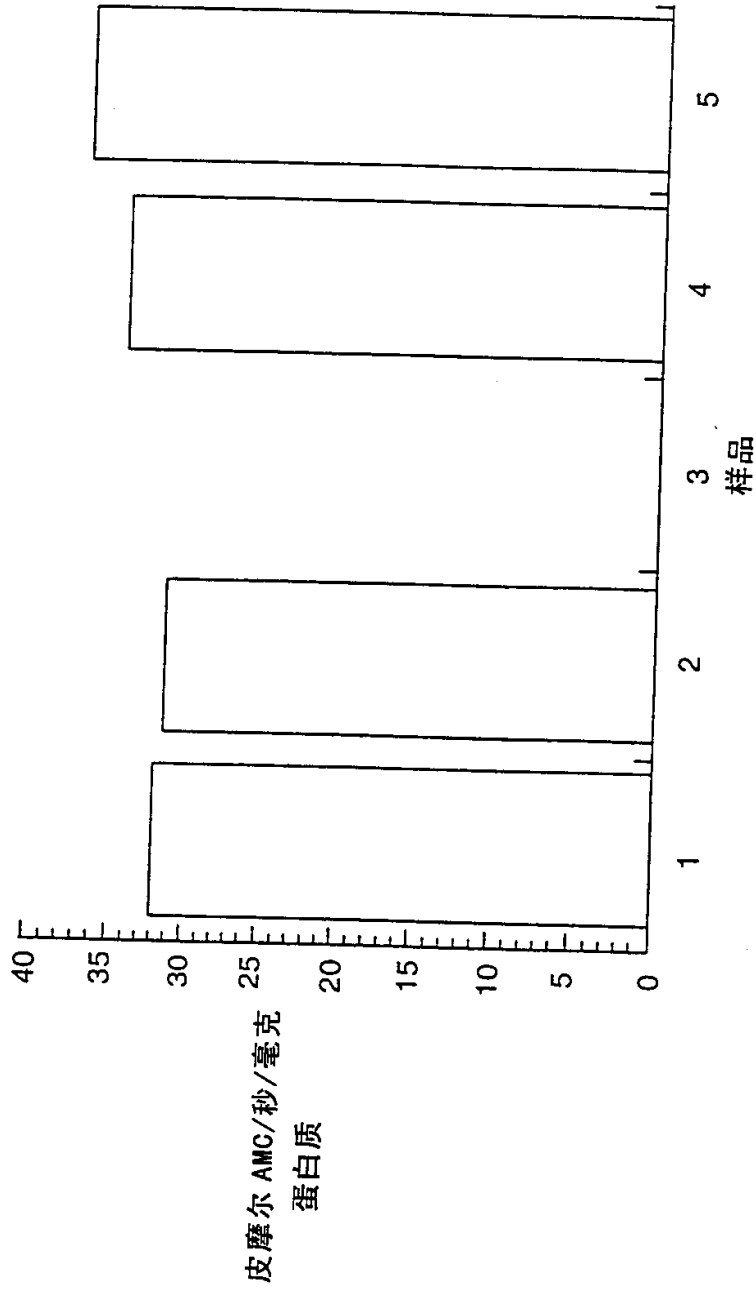


图 2E

6号受试者人白细胞中的20S活性

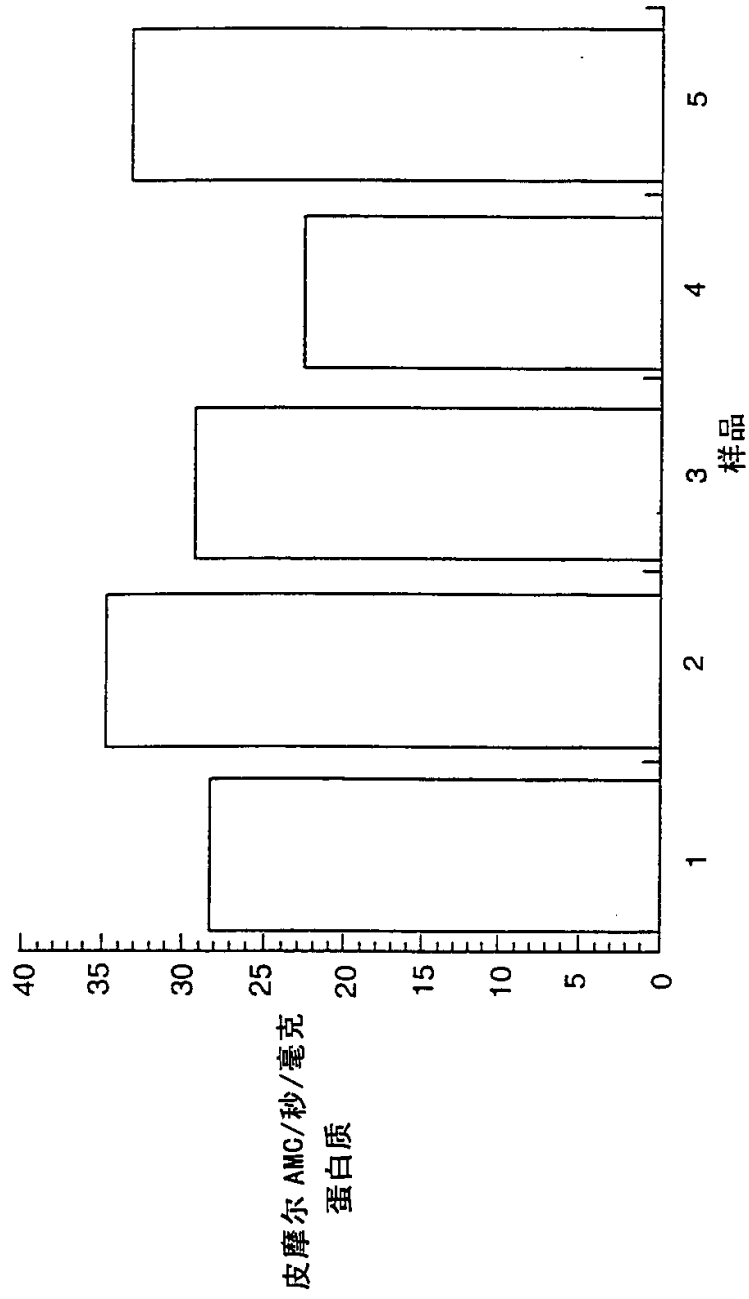


图 2F

7号受试者人白细胞中的20S活性

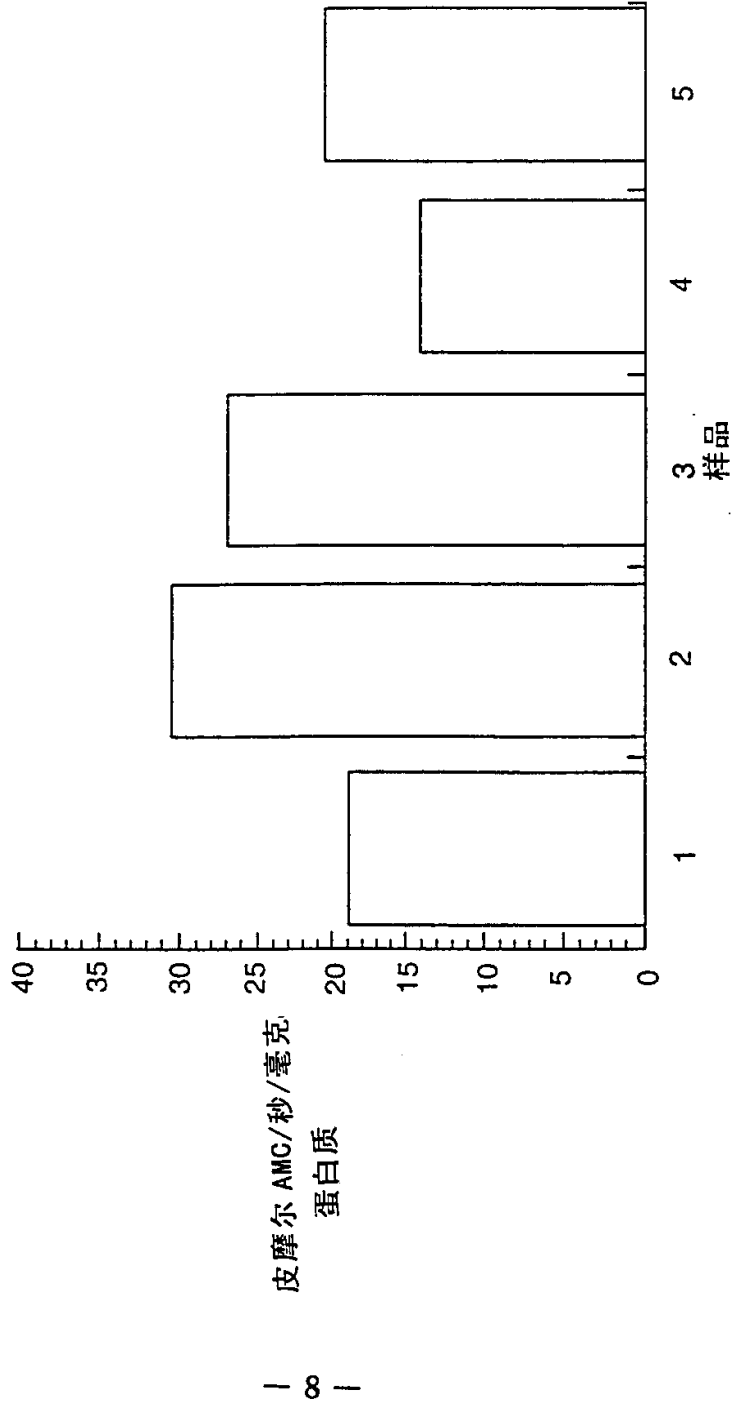
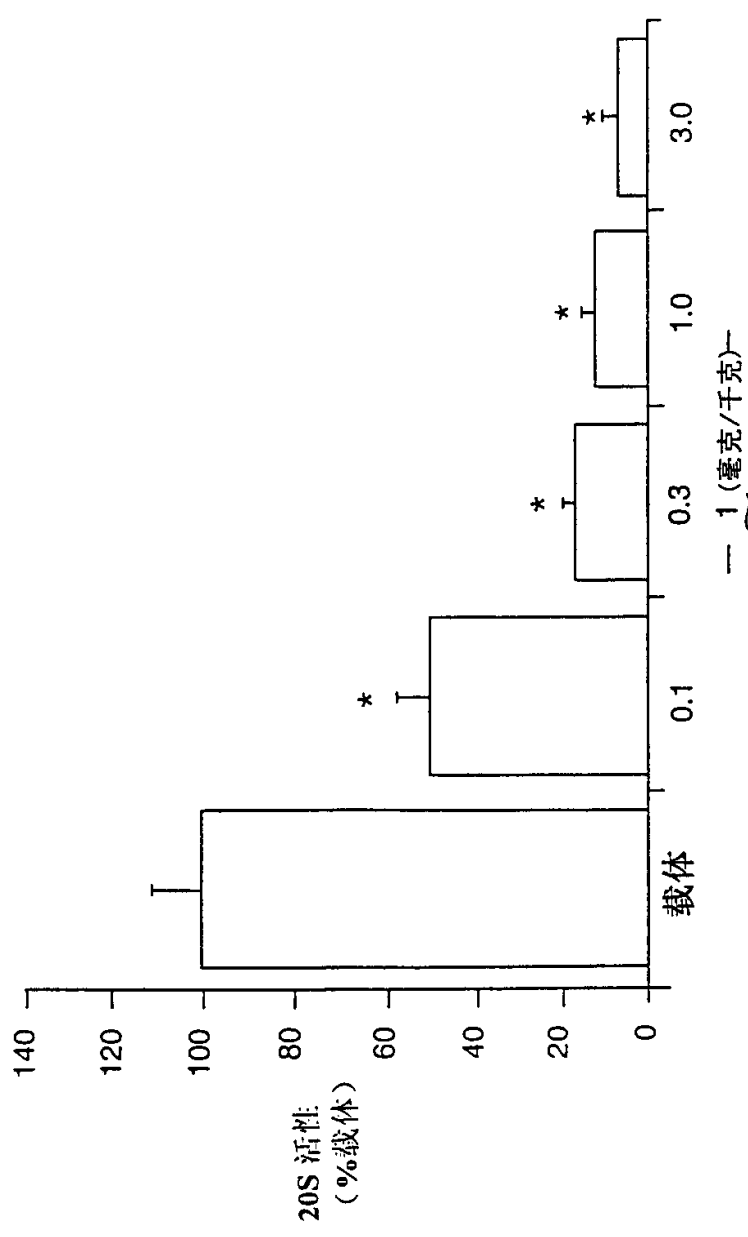


图 2G

单次IV给药1之后1.0小时在所分离的小鼠白细胞中的20S蛋白酶体活性



n=5/组 *代表 p<0.05

图 3

单次 IV 给药 1_μ 之后 24.0 小时在所分离的小鼠白细胞中的 20S 蛋白酶活性

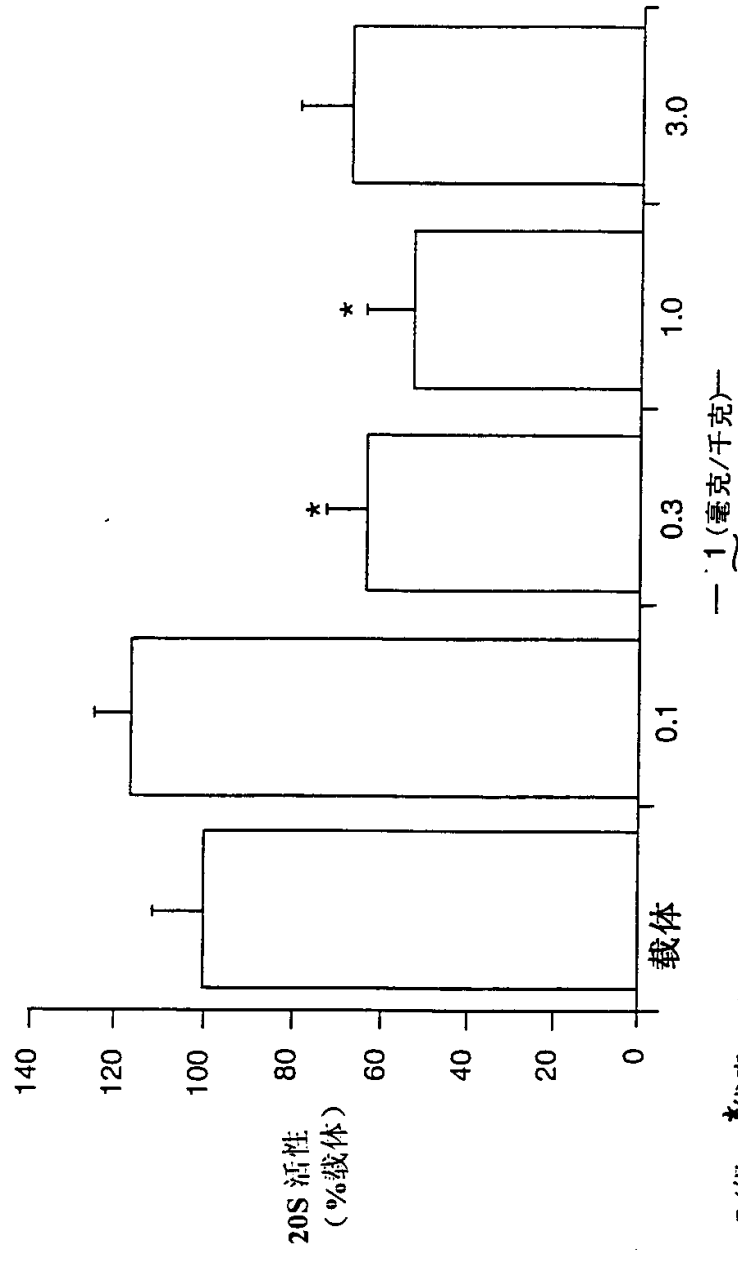


图 4

单次 IV 给药 1 之后 1.0 小时在所分离的大鼠白细胞中的 20S 蛋白酶体活性

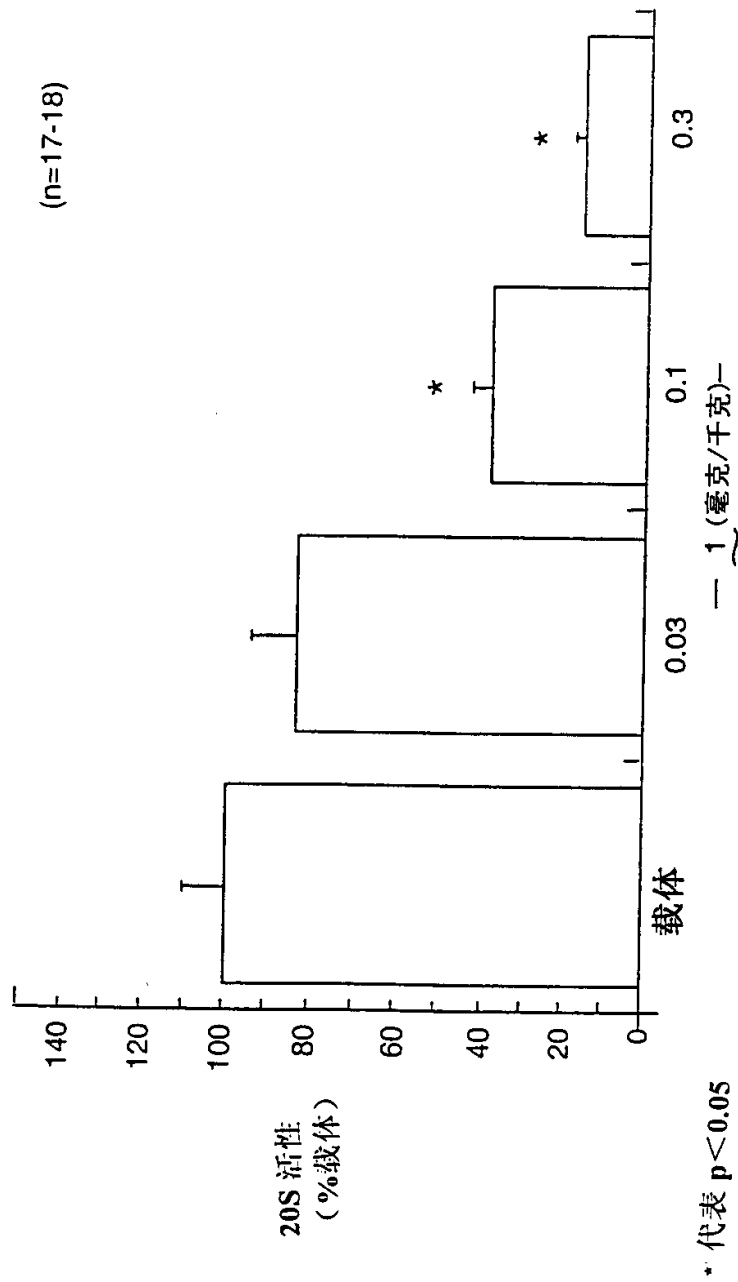


图 5

单次 IV 给药 1_u 之后 24 小时在所分离的大鼠白细胞中的 20S 蛋白酶活性

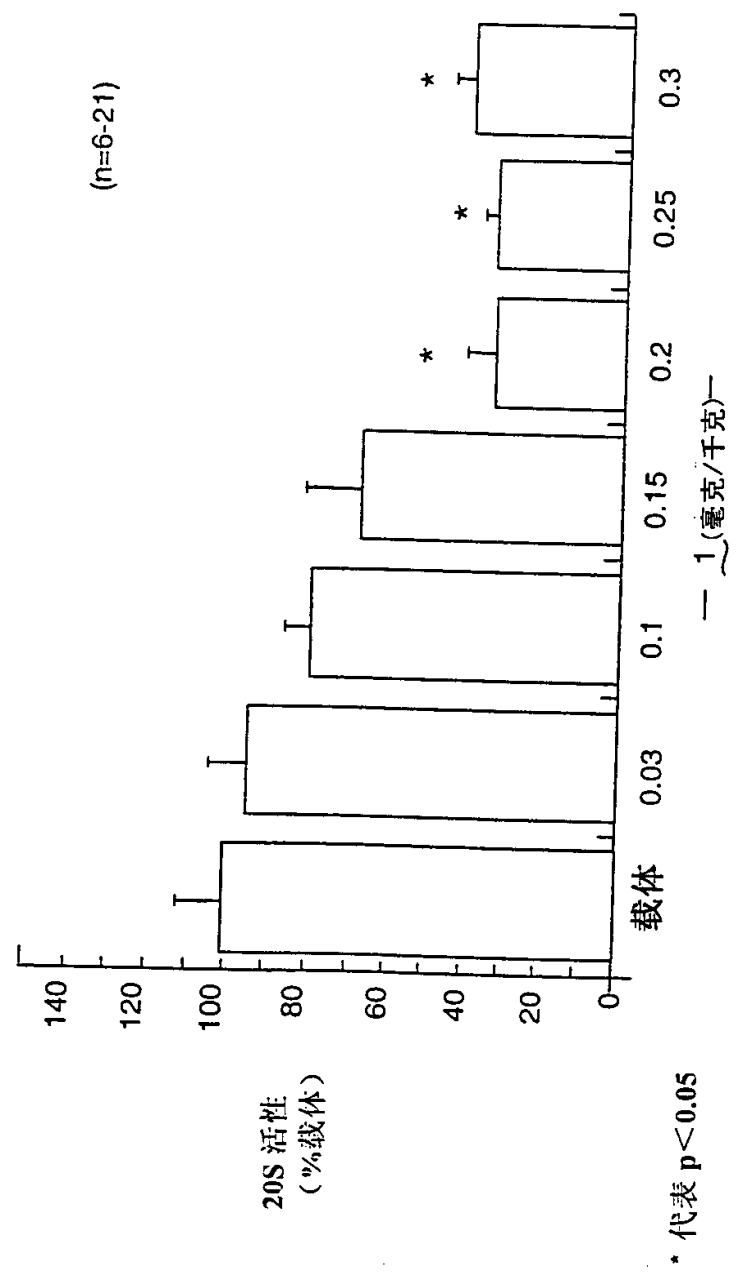


图 6

单次 IV 给药 1 之后 48 小时在所分离的大鼠白细胞中的 20S 蛋白酶体活性

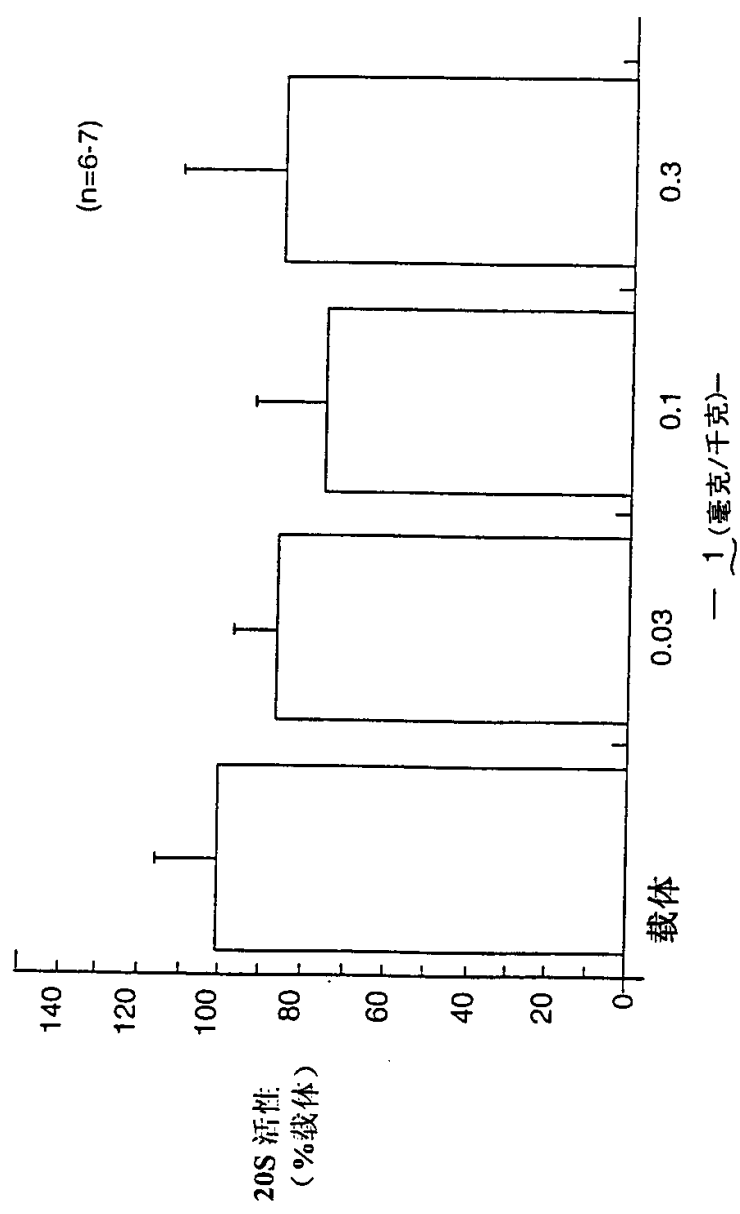


图 7

每周两次静脉注射 1 两周之后 1.0 小时在大鼠白细胞中的 20S 蛋白酶活性

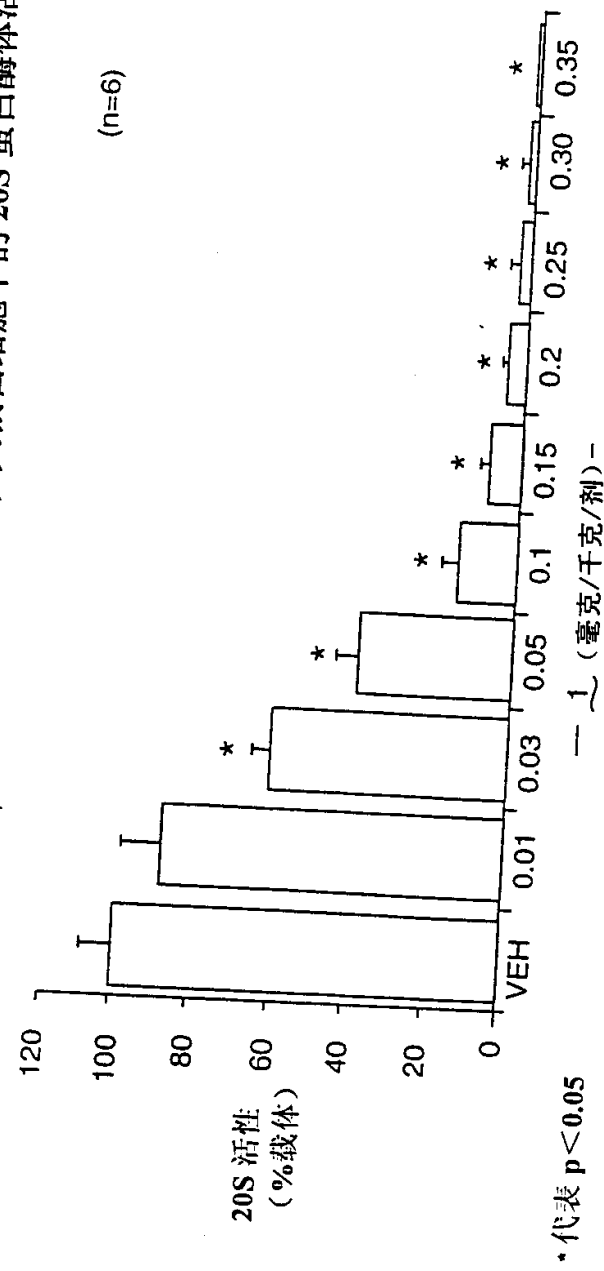


图 8

静脉注射 1.1 次之后 1.0 小时在灵长类动物白细胞中的 20S 蛋白酶体活性

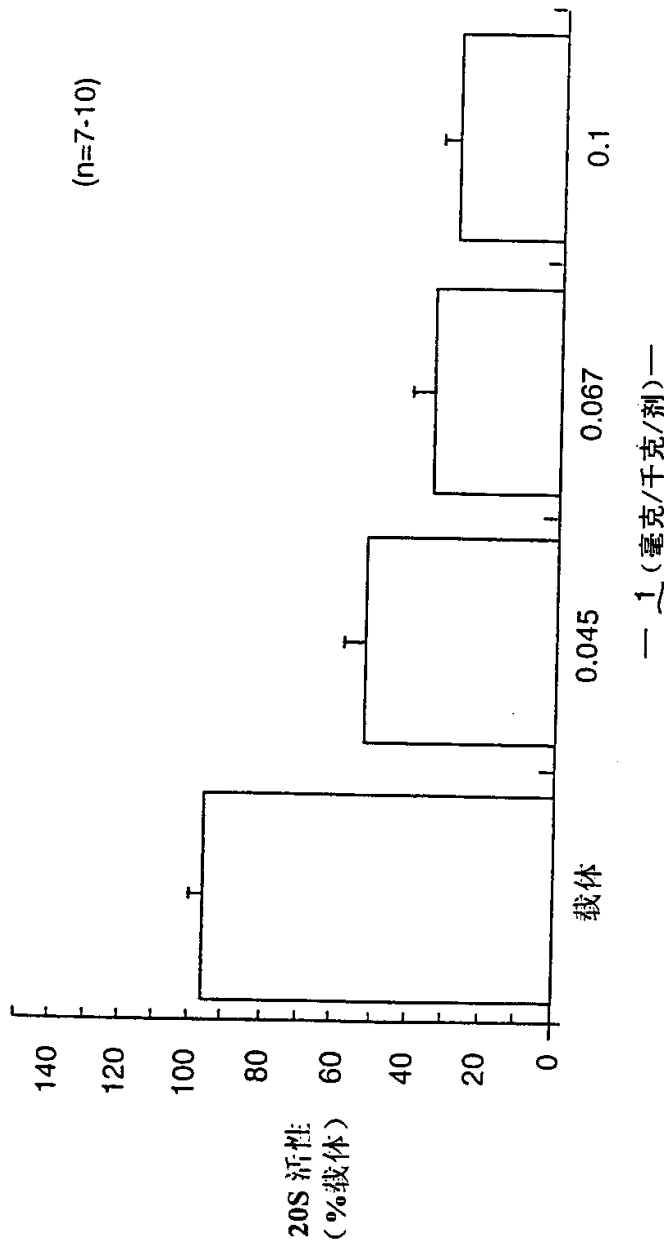


图 9

静脉注射 1 之后 3-4 在灵长类动物白细胞中的 20S 蛋白酶活性

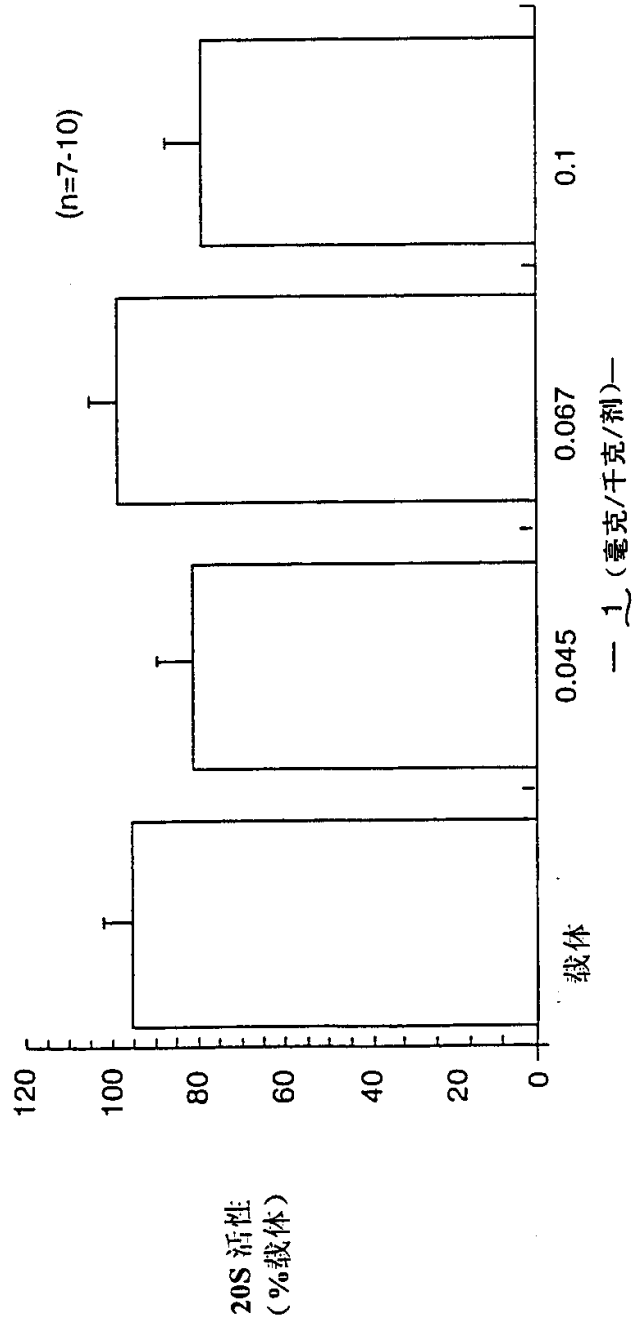


图 10

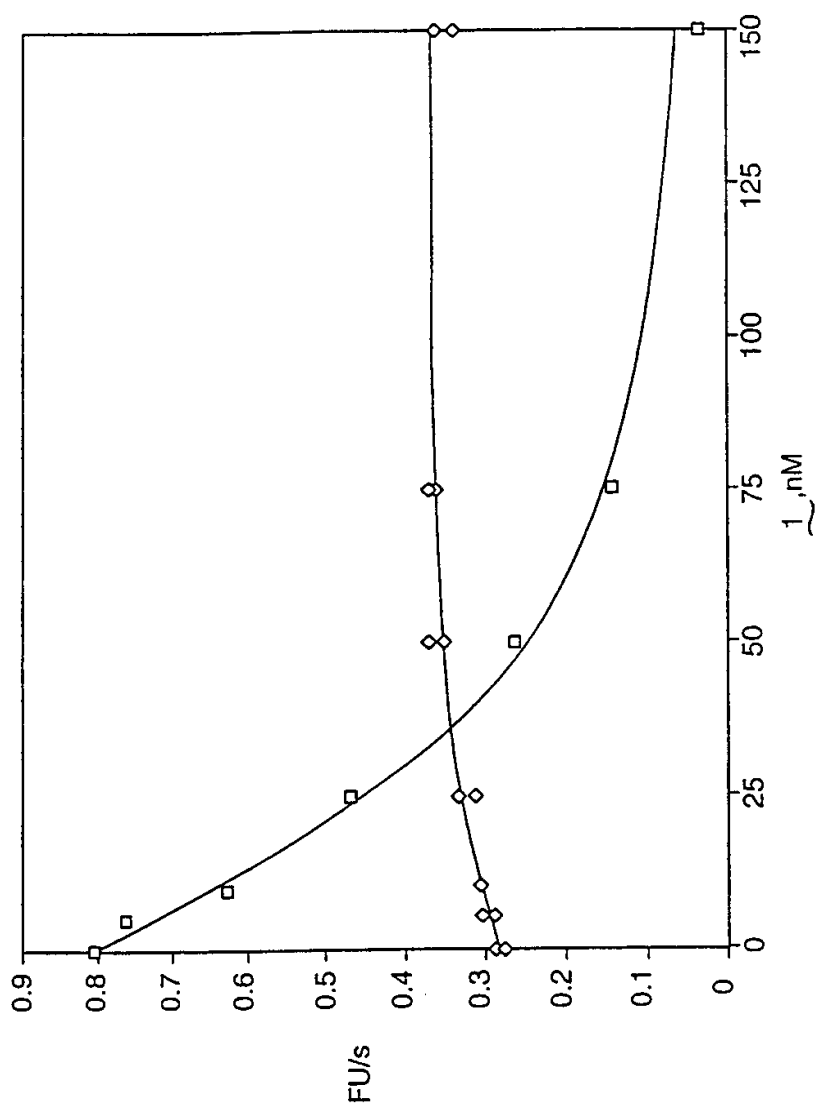


图 11

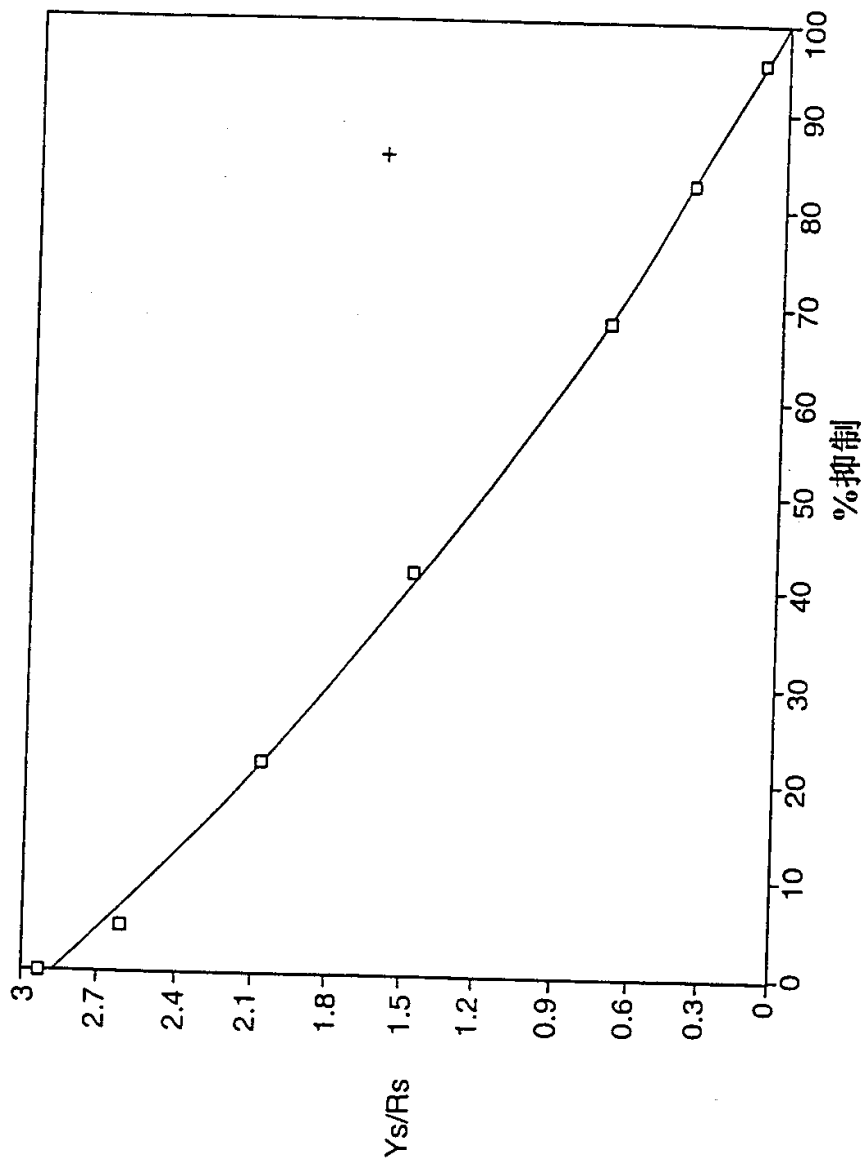


图 12

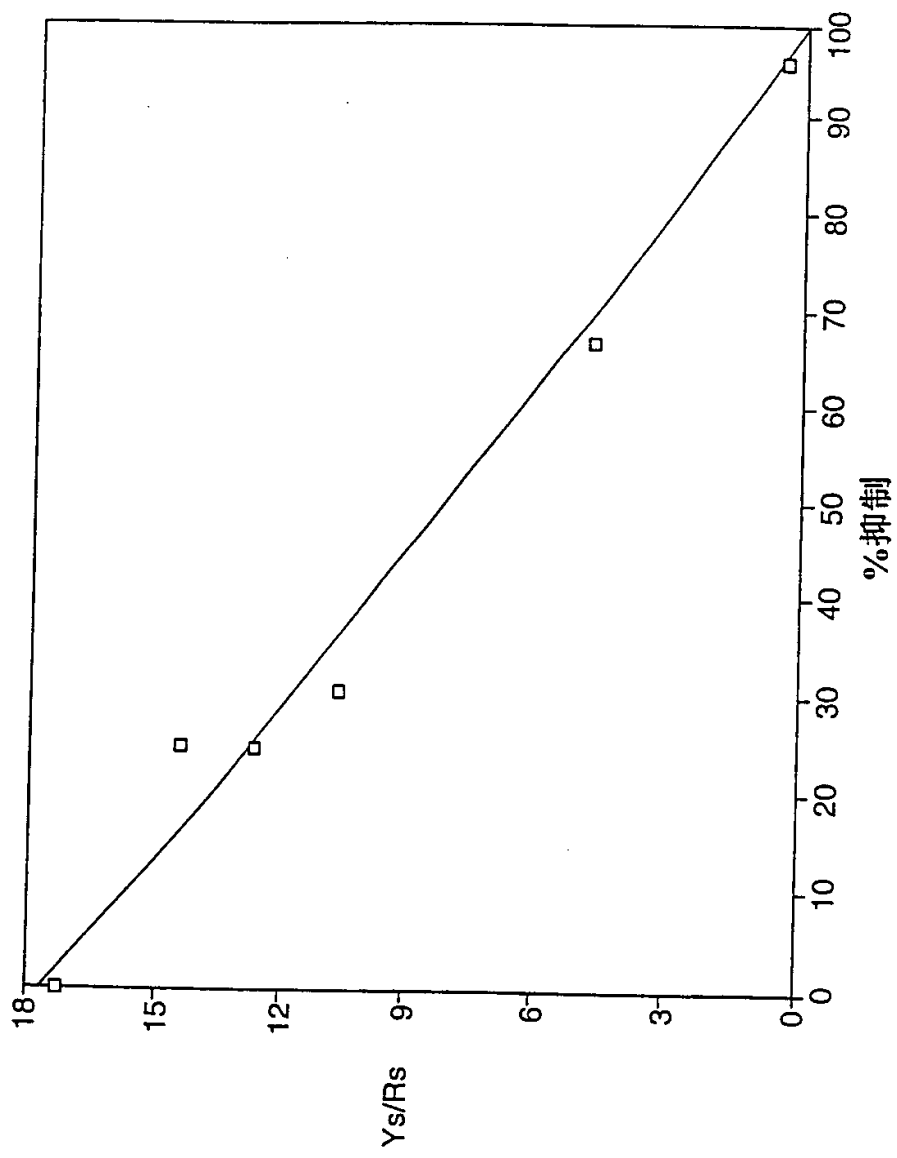


图 13