



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1620304 B

(45) 授权公告日 2010.06.23

(21) 申请号 02828115.2

(22) 申请日 2002.12.18

(30) 优先权数据

60/340,273 2001.12.18 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2004.08.16

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2002/040457 2002.12.18

(87) PCT申请的公布数据

W02003/051313 EN 2003.06.26

(73) 专利权人 布拉西卡化学保护研究基金会股份有限公司

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 X·高 A·T·丁科瓦-科斯特瓦  
P·塔拉雷

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

代理人 周承泽

(51) Int. Cl.

A61K 36/00(2006.01)

A61K 31/70(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1469711 A, 2001.08.21, 说明书第4页第26-27行, 第5页第14-29行, 第7页第23-结尾.

审查员 雷耀龙

权利要求书 1 页 说明书 17 页 附图 4 页

(54) 发明名称

通过谷胱甘肽和 II 型解毒酶预防和治疗氧化应激症

(57) 摘要

本发明总的涉及通过给予施用药学上有效量的化合物治疗氧化应激症的领域,其中所述化合物能提高动物组织中谷胱甘肽细胞内水平或至少一种 II 型解毒酶的细胞内水平。本发明也涉及通过给予能提高受试者中谷胱甘肽细胞内水平或至少一种 II 型解毒酶细胞内水平的药学上有效量的化合物,保护受试者抵御氧化应激症的领域。本发明还涉及用于治疗氧化应激症的药物组合物。

1. 能提高患者患病组织中谷胱甘肽细胞内水平或至少一种 II 型解毒酶细胞内水平的药学上有效量的化合物在制备治疗氧化应激症用的药剂中的用途,其中,所述化合物选自异硫氰酸酯和芥子油甙,所述氧化应激症选自视网膜变性和皮肤老化。

2. 如权利要求 1 所述的用途,其中所述异硫氰酸酯是莱菔硫烷。

3. 能提高患者患病组织中谷胱甘肽细胞内水平或至少一种 II 型解毒酶细胞内水平的药学上有效量的化合物在制备保护患者抵抗氧化应激症用的药剂中的用途,其中,所述化合物选自异硫氰酸酯和芥子油甙,所述氧化应激症选自视网膜变性和皮肤老化。

4. 如权利要求 3 所述的用途,其中所述异硫氰酸酯是莱菔硫烷。

5. 能提高患者患病组织中谷胱甘肽细胞内水平或至少一种 II 型解毒酶细胞内水平的药学上有效量的化合物在制备保护患者视网膜抵抗光氧化用的药剂中的用途,其中,所述化合物选自异硫氰酸酯和芥子油甙。

6. 如权利要求 5 所述的用途,其中所述异硫氰酸酯是莱菔硫烷。

## 通过谷胱甘肽和 II 型解毒酶预防和治疗氧化应激症

[0001] 本申请要求于 2001 年 12 月 18 日提交的美国临时申请系列第 60/340,273 号的优先权,其内容纳入本文作参考。

### 发明领域

[0002] 本发明总的涉及通过给予药学上有效量的化合物治疗氧化应激症的领域,所述化合物能提高动物细胞中谷胱甘肽或至少一种 II 型解毒酶的细胞内水平。本发明也涉及通过给予能提高动物细胞中谷胱甘肽或至少一种 II 型解毒酶细胞内水平的药学上有效量的化合物,保护动物抵御氧化应激症的领域。本发明还涉及可用来治疗氧化应激症的药物组合物。

[0003] 本发明背景

[0004] 氧以及尤其是其称为活性氧类 (ROS) 的部分还原产物的毒性,通常被称为氧化应激。它起源于细胞氧化和抗氧化过程的不平衡。氧化应激十分复杂,涉及各种病理和慢性变性过程,包括发生癌症、动脉粥样硬化、炎症、老化、神经变性症、白内障、视网膜变性、药物作用和毒性,组织缺血后的再灌注损伤,以及抗感染防御。见,例如 Gao X, Dinkova-Kostova AT, Talalay P. (2001) Proc Natl Acad Sci USA., 98(26):15221-6, 其内容纳入本文作参考。在 Gao 等 2001, 同上的第 15226 页中所列举的出版物内容也纳入本文作参考。

[0005] 哺乳动物细胞通过产生 ROS 作为正常有氧代谢的一部分,而产生了它们自身的氧化应激,并且发育形成了精细和重叠的机制来对抗这些危害 (Halliwell, B. 和 Gutteridge, J. M. C. (1999) Free Radicals in Biology and Medicine Oxford University Press, New York, 页 1-36)。然而,此保护性机制不完全有效,尤其在氧化应激增强时。发展增强这些防御方法的需要反映在人们普遍的对于植物为基础的抗氧化剂的消费和可察觉的对于健康的益处之中,例如抗坏血酸维生素 C、维生素 E、类胡萝卜素和多酚 (Pokorny, J., Yanishlieva, M. 和 Gordon, M. (2001) Antioxidants in food: practical applications. Woodhead Publishing, Ltd., Cambridge, U. K.)。这些直接的抗氧化剂能中和自由基和其他化学氧化剂,但在这些反应中被消耗。需要其他的化合物来保护受试者抵御氧化应激症,以及治疗患此类疾病的受试者。

[0006] 本发明概述

[0007] 本发明涉及治疗需要治疗氧化应激症的受试者的方法,该方法包括受试者能提高其患病组织中谷胱甘肽或至少一种 II 型解毒酶水平的药学上有效量的化合物。所述化合物可以是异硫氰酸酯例如莱菔硫烷 (sulforaphane) 或芥子油甙。所述氧化应激症可以是视网膜变性、老年性痴呆症或衰老。所述 II 型解毒酶可以是 UDP-葡萄糖苷酰转移酶、磺基转移酶、苯酚-O-甲基转移酶、儿茶酚-O-甲基转移酶、组胺 N-甲基转移酶、烟酰胺 N-甲基转移酶、硫代嘌呤甲基转移酶、巯基甲基转移酶、N-乙酰转移酶、O-乙酰转移酶、酰基-CoA 合成酶、酰基-CoA:氨基酸 N-酰基转移酶、氨酰-tRNA 合成酶、谷胱甘肽合成酶、 $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸合成酶、谷胱甘肽 S-转移酶、醌还原酶、血红素加氧酶、硫氰酸酶、谷胱甘肽还原酶、谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶和过氧化物歧化酶。

[0008] 本发明涉及保护受试者抵御氧化应激症的方法,该方法包括给予受试者药学上有效量的能增加受试者细胞中谷胱甘肽或至少一种 II 型解毒酶的化合物。所述化合物可以是异硫氰酸酯例如莱菔硫烷或芥子油甙。所述氧化应激症可以是视网膜变性、早老性痴呆病和衰老。所述 II 型解毒酶可以是 UDP-葡萄糖苷酰转移酶、磺基转移酶、苯酚-O-甲基转移酶、儿茶酚-O-甲基转移酶、组胺 N-甲基转移酶、烟酰胺 N-甲基转移酶、硫代嘌呤甲基转移酶、巯基甲基转移酶、N-乙酰转移酶、O-乙酰转移酶、酰基-CoA 合成酶、酰基-CoA:氨基酸 N-酰基转移酶、氨酰-tRNA 合成酶、谷胱甘肽合成酶、 $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸合成酶、谷胱甘肽 S-转移酶、醌还原酶、血红素加氧酶、硫氰酸酶、谷胱甘肽还原酶、谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶和过氧化物歧化酶。

[0009] 类似地,本发明涉及保护受试者免受眼变性的方法,该方法包括给予受试者能提高其患疾病组织中谷胱甘肽或至少一种 II 型解毒酶细胞内水平的药学上有效量的化合物。所述化合物可以是异硫氰酸酯例如莱菔硫烷或芥子油甙。所述氧化应激症可以是视网膜变性、早老性痴呆症病或衰老。所述 II 型解毒酶可以是 UDP-葡萄糖苷酰转移酶、磺基转移酶、苯酚-O-甲基转移酶、儿茶酚-O-甲基转移酶、组胺 N-甲基转移酶、烟酰胺 N-甲基转移酶、硫代嘌呤甲基转移酶、巯基甲基转移酶、N-乙酰转移酶、O-乙酰转移酶、酰基-CoA 合成酶、酰基-CoA:氨基酸 N-酰基转移酶、氨酰-tRNA 合成酶、谷胱甘肽合成酶、 $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸合成酶、谷胱甘肽 S-转移酶、醌还原酶、血红素加氧酶、硫氰酸酶、谷胱甘肽还原酶、谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶和过氧化物歧化酶。

[0010] 相似的,本发明涉及保护受试者免受光氧化作用的方法,该方法包括给予受试者能提高其组织中谷胱甘肽或至少一种 II 型解毒酶细胞内水平的药学上有效量的化合物。所述受试者组织可以是皮肤或视觉器官,例如眼睛。

[0011] 本发明也涉及用于治疗氧化应激症的组合物,该组合物含有药学赋形剂和药学上有效量的能提高谷胱甘肽或至少一种 II 型解毒酶细胞内水平的化合物。

[0012] 附图的简要说明

[0013] 图 1. 莱菔硫烷 (0-5  $\mu$ M) 诱导的 II 型酶保护了成人视网膜色素上皮 (ARPE-19) 细胞免受甲萘醌 (0-250  $\mu$ M) 毒性的影响。上图,一系列莱菔硫烷浓度时细胞部分死亡 (fa) 的甲萘醌浓度函数。中图,通过中位数作用图分析数据。显示上述浓度为中位数作用浓度 (Dm)。对于莱菔硫烷浓度 5.00、2.50、1.25 和 0.63  $\mu$ M,其述 Dm 值分别为 134.2、122.9、109.9、98.6  $\mu$ M。下图,是典型的 96-孔微量滴定板,显示了莱菔硫烷保护人 ARPE-19 细胞抵抗甲萘醌毒性的作用。紫色强度是用于测定细胞活力的还原性 MTT 甲腈。

[0014] 图 2. 比较接触甲萘醌毒性作用 2 小时后用一系列浓度的莱菔硫烷 (0-5  $\mu$ M) 处理人 ARPE-19 细胞 24 小时的效果。左图,细胞毒性表达为作用浓度中位数 (Dm)。中图,表达为毫微 mol/mg 胞液蛋白质的谷胱甘肽浓度。右图,醌还原酶特异活性,表达为毫微 mol/min/mg 胞液蛋白质。莱菔硫烷浓度和其他三个变量之间的多元变量回归相关的 p 值均 < 0.01。

[0015] 图 3. 通过表达为作用浓度中位数 (Dm,  $\mu$ M) 的莱菔硫烷 (SF) 延长保护 ARPE-19 细胞对抗甲萘醌的毒性。甲萘醌的毒性在诱导后立即 (时间 = 0)、24、48、96 和 120 小时后测定。注意此种保护作用持续上升 24-48 小时,然后在接下来的 48 小时中下降。

[0016] 图 4. 醌还原酶 (QR)、6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (G6PD)、谷胱甘肽还原酶 (GR) (毫微 mol/min/mg 胞液蛋白质) 的持续诱导,以及接触莱菔硫烷 24 小时后 [0, 0 (▲), 0.625 (□)]

和  $2.5 \mu\text{M}(\cdot)$ ] 人 ARPE-19 细胞中 GSH 水平 (表达为毫微  $\text{mol}/\text{mg}$  胞液蛋白质) 的上升。

[0017] 图 5. 保护人 ARPE-19 细胞对抗甲萘醌 (62, 125, 200  $\mu\text{M}$  两小时)、叔丁基过氧化氢 (0.5, 0.75, 1mM 16 小时)、4-羟基壬烯醛 (6.25, 12.5, 25  $\mu\text{M}$  4 小时) 以及过氧化亚硝酸盐 (1, 2, 4mM 2 小时) 的毒性, 作为先前接触 0-2.5  $\mu\text{M}$  莱菔硫烷 24 小时的函数。直方图显示细胞活力是氧化剂和莱菔硫烷诱导剂二者浓度的函数。前面的、中间的 and 后面的直方图分别指氧化剂的最高、中等和最低浓度。

[0018] 图 6. 用莱菔硫烷 (0-2.5  $\mu\text{M}$  24 小时) 处理保护人角化细胞 (HaCaT) 对抗叔-丁基过氧化氢物 (0.313, 0.625, 1mM 8 小时) (左) 的氧化性细胞毒性, 以及小鼠白血病 (L1210) 细胞对抗甲萘醌 (15.6, 31.3, 62.5  $\mu\text{M}$  两小时) (右) 的氧化性细胞毒性。表 1 显示获自中位数作用图中的 Dm 和 m 值。直方图的前面、中间和后面部分分别指氧化剂的最高、中等和最低浓度。

[0019] 优选实施方案的详细描述

[0020] 本发明涉及治疗需要治疗氧化应激症的受试者的方法, 该方法包括给予受试者能提高其患病组织中谷胱甘肽或至少一种 II 型解毒酶水平的药学上有效量的化合物。

[0021] 许多人类慢性疾病与氧化应激相关, 但在一些解剖部位, 这种氧化应激受光或照射而加剧。一种常见的“解剖部位”是皮肤, 其中紫外线光是皮肤癌的一种致病因素。另外的一个例子是参与视沉环路的视黄醛分子导致的眼睛视网膜的持续损伤。这些多聚不饱和化合物可起氧化剂的作用 (例如“光氧化剂”), 它们产生活性氧的能力受到合适波长的 UV 光而明显增加。所以我们研究是否可通过莱菔硫烷诱导 II 型酶而消除所有反式-视黄醛联合 UV 光的细胞毒作用。以下所述实施例 6, 阐述了这种保护功能。在这个方面, 本发明设想可通过视黄醛的代谢产物、衍生物及其变体, 例如“顺式-视黄醛” (例如 11-顺式-视黄醛同功型), 联合光, 尤其是 UV 光, 如本发明先前所述, 来消除任何细胞毒作用。

[0022] 本本文所用, 名词受试者用于指动物, 优选哺乳动物, 包括人类或非人类。此名词受试者用来表示需要治疗氧化应激症的受试者。名词“疾病”、“病”和“病症”都可以互换使用。

[0023] 本发明可以用来治疗需要治疗氧化应激症的受试者, 受试者的患病细胞或组织中可能存在异常水平的谷胱甘肽或任何 II 型酶。这些异常水平可以是偶然的或是氧化应激症的症状。词组“氧化应激症”, 如本文所用, 是由于可导致细胞死亡的细胞氧化剂原和抗氧化过程失平衡所造成。氧化应激十分复杂, 涉及许多病理和慢性变性过程, 包括发生癌症、动脉粥样硬化、炎症、老化、神经变性症、白内障、视网膜变性、药物作用和毒性, 组织缺血后的再灌注损伤, 以及抗感染防御。

[0024] 本发明设想的治疗可用于先前存在氧化应激症的病人, 或用于先前有氧化应激症倾向的病人。此外, 本发明的方法可用来纠正病人氧化应激症所引起的细胞或生理异常。

[0025] 如本文所用, 名词药剂或化合物指任何能提高细胞内谷胱甘肽或 II 型酶水平的化学物质。

[0026] 如本文所用, “药学上有效的剂量”指能有效引起具有临床意义的细胞反应的量, 但不会引起过高水平的副作用。

[0027] 本发明涉及提高细胞内谷胱甘肽 (GSH) 水平, 作为预防或治疗氧化应激症的方法。GSH 是一种包括甘氨酸、半胱氨酸和谷氨酸的三肽, 其中谷氨酸通过  $\gamma$ -羧基与半胱氨

酸相连（这和正常肽中的  $\alpha$ -羧基连接相反）。GSH 是一种机体结合于生物异源物质（外来化学物质或化合物）的解毒肽，它可以使生物异源物质更具有亲水性，这样就促进了它们从体内排泄出来。GSH 的合成包括两步骤的反应，第一步由  $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸合成酶催化。谷胱甘肽合成酶催化第二步反应。反过来，GSH 结合于生物异源物质受谷胱甘肽 S-转移酶（也称 GSH 转移酶）催化，此酶可以是相同（同型二聚体）或不同（杂二聚体）亚单位的二聚体，虽然一些杂二聚体确实存在。到目前为止，至少已经鉴定到四类 GSH 转移酶，每一类中具有两型或多型亚单位。大多数 GSH 转移酶存在于细胞溶质中（或可溶性的），这意味着可在细胞溶质中发现它们，但至少有两种微粒体 GSH 转移酶存在。根据诸如氨基酸相似性和生物活性这些因素，该领域普通技术人员可能知道和认识存在的许多类型 GSH 转移酶，同样也有一些尚没有被鉴定。因此，如本文所用，词组“细胞内 GSH 的增加”或“细胞内 GSH 的升高”指 GSH 三肽本身，同样它的合成和结合于生物异源物质都是受酶催化的。

[0028] 本发明也涉及一种能增加细胞内至少一种 II 型解毒酶水平的方法。词组“II 型解毒酶”和“II 型酶”本文可以互换使用。如本文所用，II 型酶是参与 II 型反应的酶，II 型反应可导致生物异源物质的生物转化并 / 或预防氧化应激。总的来说，II 型反应通常包括一种分子结合于生物异源物质，从而增加该生物异源物质的亲水性。这种更具亲水性的结合的生物异源物质，与未结合的生物异源物质相比，可以更容易从体内排泄出来。有 6 种类型的 II 型结合反应：包括葡萄糖醛酸化、硫酸盐化、甲基化、乙酰化、结合氨基酸和结合谷胱甘肽。硫氰酸酶催化的反应（硫离子转移至氰化物形成硫氰化物）在本文也被认为是 II 型反应。

[0029] 简而言之，葡萄糖醛酸化是生物异源物质转化的主要途径，包括葡萄糖苷酸结合于此生物异源物质。此反应由 UDP-葡萄糖苷酰转移酶 (UDPGT) 催化，此酶存在有许多形式。这些多形式的酶由几种不同的基因编码。该领域普通技术人员可能认识和知道不同形式的 UDPGT，以及它们所催化的反应。

[0030] 硫酸盐化是生物异源物质转化的一条途径，包括硫酸盐结合此生物异源物质。此反应受磺基转移酶催化，此酶已经鉴定到一打以上的形式。该领域普通技术人员可能认识和知道不同形式的磺基转移酶，以及它们所催化的反应。

[0031] 甲基化是生物异源物质转化的一条途径，包括甲基结合于此生物异源物质。有三种不同的甲基化反应，根据生物异源物质上甲基化原子类型的不同。这三种甲基化反应可发生在硫 (S)、氧 (O) 和氮 (N) 上，每个反应都由一组不同的酶催化。O- 的甲基化受酚-O- 甲基转移酶 (POMT) 或儿茶酚-O- 甲基转移酶 (COMT) 催化。据信 COMT 是由一个单独的基因编码，它至少有两种不同的等位基因变体。N- 甲基化受组胺-N- 甲基转移酶或烟酰胺-N- 甲基转移酶催化。S- 甲基化由至少两种酶催化，包括硫代嘌呤甲基转移酶 (TPMT) 和巯基甲基转移酶 (TMT)。该领域普通技术人员可能认识和知道不同形式的甲基转移酶，以及它们所催化的反应。

[0032] 乙酰化是生物异源物质转化的一条途径，包括乙酰基结合于此生物异源物质。有两种不同的乙酰化反应，根据生物异源物质上乙酰化原子类型 (O 和 N) 的不同。两种乙酰化反应可能或可能有受一组相同的酶催化。N- 乙酰化受 N- 乙酰基转移酶 (NAT) 催化，这种酶在人中有两种形式。这二形式由两种不同的基因编码。O- 乙酰化受 O- 乙酰基转移酶催化，但也可受 NAT 催化。该领域普通的技术人员可能认识和知道不同形式的乙酰基转移酶，

以及它们所催化的反应。

[0033] 结合氨基酸是生物异源物质转化的一条途径,包括氨基酸结合于此生物异源物质。氨基酸结合于生物异源物质有两种基本途径。第一种反应包括含有羧酸的生物异源物质。这种反应通过酰化 -CoA 合成酶催化 CoA 结合于生物异源物质形成硫酯。此硫酯然后通过酰化 -CoA:氨基酸 N- 转移酶结合于此氨基酸。生物异源物质结合于氨基酸的第二条基本途径包括含有芳香酰胺的生物异源物质。此反应包括用氨酰 -tRNA- 合成酶激活氨基酸。被激活的氨基酸接着与生物异源物质上的芳香酰胺起反应,从而形成活性的 N- 酯。该领域普通的技术人员可能认识和知道不同类型的催化氨基酸结合于生物异源物质的酶,以及它们所催化的反应。

[0034] 醌还原酶 (QR) 被认为是一种 II 型酶,因为它具有保护功能 (Prochaska 等, *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*, 195-211 (1991)), 它和其他 II 型酶同样被诱导,并受到与那些控制谷胱甘肽转移酶相似的增强子元件所调节 (Favreau 等, *J. Biol. Chem.* 266 :4556-4561 (1991))。

[0035] 血红素加氧酶 (HO), 也被认为是一种 II 型酶,它能催化血红素转化为胆绿素,后者接着被还原为胆红素。因此 HO 酶能催化产生胆红素,胆红素本身是一种强抗氧化剂。此外,HO 酶受到能诱导其他 II 型酶的许多相同化合物的诱导。

[0036] 其它 II 型酶的例子包括,但不局限于诸如谷胱甘肽还原酶、谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶和过氧化物歧化酶等酶。

[0037] 本发明涉及提高患病组织中至少一种 II 型酶的水平。本发明中设想的化合物有可能仅仅提高一种 II 型酶或一种以上 II 型酶的水平。如本文所用,词组“II 型酶水平的提高”用来指与对照水平 (非 - 激活) 相比,细胞中存在的 II 型酶的量增加。

[0038] 如本文所用,名词患病组织可用于指体外培养的单个细胞,或切离组织的全部或一部分。患病组织也可用来指受试者中经历变性过程的组织,或相同器官中没有受到变性过程影响的组织。正常组织可能和或可不和变性组织相毗邻。

[0039] 作为一种优选的实施方案,本发明方法中所用的能增加谷胱甘肽或任何 II 型酶的化合物选自异硫氰酸盐和芥子油甙。

[0040] 异硫氰酸盐是含硫氰酸根 (SCN<sup>-</sup>) 部分的化合物,不难为该领域普通技术人员所鉴定。异硫氰酸盐的例子包括,但不局限于莱菔硫烷或其类似物。异硫氰酸盐类似物的描述和配制见美国重新发布的专利 36,784 中所述,其内容纳入本文作参考。在一优选实施方案中,本发明所用的莱菔硫烷类似物包括 6- 异硫氰酰 -2- 己酮、外 -2- 乙酰 -6- 异硫氰酰降冰片烷、外 -2- 异硫氰酰 -6- 甲磺酰降冰片烷、6- 异硫氰酰 -2- 己醇、1- 异硫基 -4- 二甲基磷酰丁烷、外 -2- (1' - 羟乙基) -5- 异硫氰酰降冰片烷、外 -2- 乙酰 -5- 异硫氰酰降冰片烷、1- 异硫氰酰与甲磺酰戊烷、顺式 -3- (甲磺酰) 环己基甲基异硫氰酸酯和反式 -3- (甲磺酰) 环己基甲基异硫氰酸酯。

[0041] 本领域熟知的芥子油甙是异硫氰酸盐的前体。芥子油甙很容易被该领域普通技术人员所认识和知道,其综述见于 Fahey 等 *Phytochemistry*, 56 :5-51 (2001), 其内容纳入本文作参考。

[0042] 本发明设想的其他化合物包括已知能诱导 (增加) II 型酶水平的化合物。优选的,这些化合物包括白藜芦醇、奥替普拉、二甲基富马酸盐、2 (3) - 叔 - 丁基 -4- 羟基苯甲醚、3,

5-二-叔-丁基-4-羟基甲苯及其类似物。

[0043] 如本文所用,词组“增加或减少表达”用于指编码酶的基因转录率的增加或减少,这分别导致了每种基因 mRNA 水平的升高或降低。此词组也用于指细胞中蛋白质或酶水平的不依赖于转录率的升高或降低。例如,编码所述蛋白质的 mRNA 降解率的升高,虽然转录率无变化,也可能导致细胞中蛋白质水平的下降。

[0044] 本发明也提供一种用于治疗氧化应激症的组合物,其包括种药物赋形剂和能提高谷胱甘肽或至少一种 II 型解毒酶细胞内水平的药学上有效量的化合物。

[0045] 在一优选实施方案中,本发明的组合物包括选自异硫氰酸盐和芥子油甙的制剂。在一更优选实施方案中,本发明的组合物包括莱菔硫烷或莱菔硫烷类似物。

[0046] 在另一优选实施方案中,本发明的组合物包括选自 6-异硫氰酰-2-己酮、外-2-乙酰-6-异硫氰酰降冰片烷、外-2-异硫氰酰-6-甲磺酰降冰片烷、6-异硫氰酰-2-己醇、1-异硫氰酰-4-二甲基膦酰丁烷、外-2-(1'-羟乙基)-5-异硫氰酰降冰片烷、外-2-乙酰-5-异硫氰酰降冰片烷、1-异硫氰酰-5-甲磺酰戊烷、顺式-3-(甲磺酰)环己基甲基异硫氰酸酯和反式-3-(甲磺酰)环己基甲基异硫氰酸酯的制剂。

[0047] 还有另一优选实施方案中,本发明的组合物包括选自白藜芦醇、奥替普拉、二甲基富马酸盐、2(3)-叔-丁基-4-羟基苯甲醚、3,5-二-叔-丁基-4-羟基甲苯及其类似物的制剂。

[0048] 在其他优选实施方案中,本发明的组合物可通过增加谷胱甘肽或任何 II 型酶的水平而治疗变性疾病,可用它于提高选自 UDP-葡萄糖醛酰基转移酶、磺基转移酶、苯酚-O-甲基转移酶、儿茶酚-O-甲基转移酶、组胺 N-甲基转移酶、烟酰胺 N-甲基转移酶、硫代嘌呤甲基转移酶、巯基甲基转移酶、N-乙酰基转移酶、酰化-CoA 合成酶、酰化-CoA:氨基酸 N-乙酰基转移酶、氨酰-tRNA 合成酶、谷胱甘肽合成酶、 $\gamma$  谷氨酰半胱氨酸合成酶、谷胱甘肽 S-转移酶、醌还原酶、血红素加氧酶、硫氰酸酶等的水平。

#### [0049] 给药的制剂和方法

[0050] 提供的本发明的一种药物组合物,包括本发明用于治疗氧化应激症的制剂以及药学上可接受的运载体或赋形剂。这种制剂可人工合成或从天然来源获得。如果制剂获自天然来源,可能不需要将其与药学上可接受的运载体或赋形剂组合在一起。一种典型的天然来源是芸苔叶菜种子,选自甘蓝 (acephala)、芥蓝 (alboglabra)、葡萄孢属 (botrytis)、桦 (costata)、甘蓝 (gemmifera)、gongylode、粟 (italica)、髓木 (medullosa)、狗尾草 (palmifolia)、ramosa、sabauda、sabellica 和 selensia 各类。其他典型天然来源是十字花科幼苗。

[0051] 本发明还设想应用可在体内转化为本发明治疗化合物的前体药物 (Silverman, R. B., "The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action," Academic Press, Ch. 8 (1992))。这种前体药物可用于改变治疗化合物的生物分布或药物代谢动力学。例如,一种阴离子,如硫酸根或磺酸根,可用甲基或苯基酯化,从而产生硫酸酯或磺酸酯。当给予受试者此硫酸酯或磺酸酯时,该酯受酶催化或非酶催化切割,而暴露阴离子基团。这种酯可以是环状的,例如,环状硫酸酯或磺内酯,或两种或多种阴离子部分可通过一连接基团酯化。可用一种分子酯化阴离子基团(例如甲酰氧酯),这种分子被切割扣产生一种中间化合物,后者随之分解产生活性化合物。而且,阴离子部分可和一种能在体内被主动运输的基团

酯化,或被靶器官选择性摄取。可选择能使该治疗部分特异性靶向特定器官的酯,见以下对于运载体部分的描述。

[0052] 所述药物组合物可以口服、鼻内、胃肠外、系统内、腹膜内、局部、口腔给药,或口腔或鼻腔喷雾。“药学上可接受的运载体”指的是,但不局限于:无毒性的固体、半固体或液体填充剂,稀释剂、胶囊包囊的材料或任何类型的制剂辅助物。本文所用的名词“胃肠外”指给药的方式,包括静脉内、肌肉内、腹膜内、胸骨内、皮下和关节内注射和输液。

[0053] 本发明胃肠外注射的药物组合物可含有药学上可接受的无菌水或非水溶液,分散液、悬浮液或乳液,以及可在应用前重建无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。合适的水或非水运载体、稀释剂、溶剂或运载剂包括水、乙醇、多元醇(例如丙三醇、丙烯二醇、聚乙二醇等等),羧甲基纤维素和它们合适的混合物,植物油(例如橄榄油),和可注射的有机酯例如油酸乙酯。合适的流动性可用包衣材料例如卵磷脂维持,可用表面活性剂维持分散液中所需的颗粒大小。

[0054] 本发明的组合物也可含辅佐剂,例如但不局限于:防腐剂、保湿剂、乳化剂和分散剂。微生物的作用可通过加入各种抗菌和抗真菌药物,例如对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、山梨酸苯酚等而确保。也可能需要加入等渗剂,例如糖、氯化钠等。加入延迟吸收试剂,例如单硬脂酸铝和明胶,可导致可注射形式药物的延长吸收。

[0055] 在一些实施例中,为了延长所述药物的作用,需要减慢皮下或肌肉内注射的吸收。这个可以通过应用水溶性差的晶体非晶态物质的液去悬浮液而实现。随后该药物的吸收率取决于其溶解率,进而可能取决于晶体的大小和晶体的形式。或者,经胃肠外施用的药物形式的延迟吸收可通过将该药物溶解或悬浮于-油性运载剂中而实现。

[0056] 可注射的贮存形式可通过在生物可降解的聚合物例如聚交酯-聚糖脂中形成药物的微胶囊包囊基质而制备。依赖于药物和聚合物的比例,以及所用具体聚合物的特性,可以控制药物的释放率。其他生物可降解的聚合物包括聚(正酯)和聚(酐)。贮存的可注射制剂也是通过将药物装在和机体组织相容的脂质体或微胶囊中而制备的。

[0057] 可注射的制剂可通过,例如能保留细菌的过滤器过滤除菌,或加入无菌固体组合物形式的杀菌剂,这种组合物在应用之前可以溶解或分散于无菌水或其他无菌可注射介质中。

[0058] 口服给药的固体剂型包括但不限于:胶囊、片剂、丸剂、粉末和颗粒。在这种固体剂型中,所述活性化合物至少和一种药学上可接受的赋形剂或运载体混合,例如柠檬酸钙或磷酸二钙和/或 a) 填充剂或增容剂例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和硅酸, b) 粘合剂例如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯树胶, c) 湿润剂例如甘油, d) 崩解剂例如琼脂、碳酸钙、土豆或木薯淀粉、苜蓿某些硅酸盐和碳酸钠, e) 溶解延迟剂例如石蜡, f) 吸收增速剂,例如四价铵化合物, g) 保润剂例如乙酰乙醇和甘油单硬脂酸酯, h) 吸附剂例如高岭土和斑脱土, I) 润滑剂例如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、硫酸月桂醇钠以及它们的混合物。在胶囊、片剂和丸剂的例子中,所述剂型还包括缓冲剂。

[0059] 相似类型的固体组合物也可被用作软和硬填充明胶胶囊的填充剂,这类胶囊采用例如乳糖或牛奶糖以及高分子量的聚乙二醇等赋形剂。

[0060] 固体剂型的片剂、糖衣丸、胶囊、丸剂和颗粒可用包衣和衣壳,例如肠衣和其他药

物配制领域中熟知的包衣制备。它们可任选的含有乳浊剂,也可以是一种组合物,其能任选的以延迟方式仅仅在或优先在肠道的某部分释放此活性成分。可采用的包埋组合物包括聚合物和蜡。

[0061] 此活性化合物也可以是装入微胶囊的形式,如果合适,可含有上述的一种或多种赋形剂。

[0062] 口服给药的液体剂型包括但不限于药学上可接受的乳剂、溶液、悬浮液、糖浆和酞剂。除了此活性化合物,液体剂型可包含该领域常用的惰性稀释剂,例如水或其他溶剂,但溶剂和乳化剂,例如普通酒精、异丙醇、碳酸乙酯、醋酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲替甲酰胺、油(具体是,棉籽、落花生、玉米、胚芽、橄榄、蓖麻和芝麻油),甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和山梨聚糖脂肪酸酯以及它们的混合物。

[0063] 除了惰性稀释剂,口服组合物也包含辅佐剂,例如保湿剂、乳化和悬浮剂,甜味剂、调味品和芳香剂。

[0064] 除了此活性化合物,悬浮液可包含悬浮剂,例如乙氧基异硬脂醇、聚氧乙烯山梨糖醇和山梨糖醇酯,微晶纤维素、偏氢氧化铝、斑脱土、琼脂和黄芪胶以及它们的混合物。

[0065] 局部给药包括皮肤或粘膜给药,包括肺和眼睛的表面。眼睛给药可以用该领域技术人员熟知的多种方法,包括滴眼、泡沫、聚合组合物、凝胶、可植入的时间-释放组合物、口服剂型、可注射剂型、相变形式、软膏、乳膏、固体植入物。

[0066] 局部给药包括那些吸入的组合物,可配制成压制的或不压制的干粉末。在非压制粉末组合物中,以精细分割形式的此活性成分可与较大的药学上可接受的惰性运载体混合应用,此种运载体包含的微粒直径大小可大至 100  $\mu\text{m}$ 。合适的惰性运载体包括糖例如乳糖。理想的,至少 95% 重量的此活性成分微粒的有效微粒大小在 0.01-10  $\mu\text{m}$  之间。

[0067] 另外,所述组合物可被压缩并包含压缩气体,例如氮或液化气体推进剂。液化推进剂介质以及整个组合物优选所述活性成分实际上不溶解于其中。所述压缩的组合物也可含有表面活性剂。此表面活性剂可以是液体或固体非-离子表面活性剂,或可是固体离子表面活性剂。优选采用钠盐形式的固体离子表面活性剂。

#### [0068] 给药

[0069] 普通技术人员知道,本发明制剂的有效量可凭经验确定,并可采用纯净形式,或制剂可以药学上可接受的盐、酯或前体药物的形式存在。可将所述制剂给予需要治疗神经病的受试者,此药物组合物可和一种或多种药学上可接受的赋形剂联合应用。我们明白,当给予病人时,本发明试剂或组合物的每日总剂量可由主治医生在合理的医学判断范围内决定。对于具体病人来说具体的治疗有效剂量水平取决于许多因素:要获得的细胞反应的类型和程度;所用的具体制剂或组合物的活性;所用的具体制剂或组合物;病人的年龄、体重、总体健康状况、性别和饮食;给药的时间和途径,药物的排泄率;治疗的持续时间;和该具体制剂联合或同时应用的药物;以及医学领域熟知的因素。例如,该领域技术中知道起始时给药的剂量水平低于获得理想治疗作用所需的水平,并且逐渐增加剂量直到获得理想的作用。

[0070] 例如,口服 0.05 至 10mg/kg/天剂量级别的所述化合物,优选 0.1-7.5mg/kg/天,更优选 0.1-2mg/kg/天,最优选 0.5mg/kg/天,每天给药一次,或分几次给药,每天 2-4 次可获得满意结果。对于胃肠外给药,例如通过静脉滴注或输注,可采用 0.01 至 5mg/kg/天

的剂量级别,优选 0.05 至 1mg/kg/天,更优选 0.1 至 1mg/kg/天的剂量。因此对于病人来说,每天合适的剂量级别是 2.5-500mg 口服,优选 5-250mg 口服,更优选 5-100mg 口服;或者 0.5-250mg 级别静滴,优选 2.5-125mg 静滴,更优选 2.5-50mg 静滴。

[0071] 也可按病人特异性方式安排剂量,以提供预先确定的血药浓度,如该领域所接受的技术和常规(HPLC是优选的)测定的那样。因此,可按照 HPLC 的测定调整病人的课题以获得规律性的血药浓度,达到 50-1000ng/ml,优选 150-500ng/ml。

[0072] 相关领域的普通技术人员不难明白,对本文所述的方法和应用可进行其他合适的修改和改进组不脱离本明或其任何实施方案的范围。

[0073] 以下实施例仅仅是为了阐述本发明,而不能认为是以任何方式限制本发明。

## 实施例

[0074] 视网膜细胞对于氧化损害特别敏感(Cai, J., Nelson, K. C., Wu, M., Stern-berg, P. 和 Jones, D. P. (2000) *Prog. Retinal Eye Res.* 19, 205-221, 2000; Winkler, B. S. Boulton, M. E., Gottsch, J. D. 和 Sternberg, P. (1999) *Molecular Vision* 5, 32-42.)。为了模拟生理上发生的氧化应激类型,我们选择以下四种氧化剂:甲萘醌、叔-丁基过氧化氢、4-羟基壬烯醛和过氧化亚硝酸盐。这些制剂引起氧化损害的机制和细胞如何保护自己不受这种损害是十分不同的,正如以下所述。

[0075] 实施例中,用莱菔硫烷处理 ARPE-19 细胞,它是一种从花椰菜分离出来的异硫氰酸酯,以它的 2 型诱导活性为基础,到目前为止它是最强的天然 2 型酶诱导剂(Fahey, J. W., Zhang, Y. 和 Talalay, P. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 10367-10372; Zhang, Y., Talalay, P., Cho, C. G. 和 Posner, G. H. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 2399-2403; and Zhang, Y., Kensler, T. W., Cho, C. C., Posner, G. H. 和 Talalay, P., (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 3147-3150)。莱菔硫烷能同等诱导 2 型解毒酶家族和相关蛋白质,并通过诱导  $\gamma$  谷氨酰半胱氨酸合成酶提高 GSH 水平,此酶是 GSH 生物合成的限速酶(Mulcahy, R. T., Wartman, M. A., Bailley, H. H. 和 Gipp, J. J. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 7445-7454)。

[0076] 通过中位数作用方程对细胞活力的测定进行分析,Chou 和 Talalay, (1984) *Adv. Enzyme Regul.* 22, 27-55, 这是为了获得以细胞毒性-浓度曲线数据点为基础的中位数作用浓度(Dm)。然后将每种氧化剂的 Dm 值与已经用一定范围浓度的莱菔硫烷处理的细胞的 Dm 值作比较,从而产生了保护力的定量测定。

[0077] 莱菔硫烷不能直接与自由基或 ROS 起反应:它的“抗氧化性”功能对于它诱导 2 型酶的能力来说是次要的,因此它是一种“间接的抗氧化剂”。保护作用的大小依赖于氧化应激物和诱导物二者的浓度。值得注意的是,和大多数直接抗氧化剂的作用不一样,此间接抗氧化剂的状态在莱菔硫烷不再存在后能持续数天。

[0078] 在与保护性实验相同的条件下,从接触过莱菔硫烷的细胞提取物上获得了 2 型酶和 GSH 水平的平行测定。当以 Dm 值的增加定量的保护程度与这些 2 型标记物的升高相比较时,观察到了明显的紧密相关性。综合看来,这些结果建立了抗氧化应激的保护力与莱菔硫烷由于 2 型酶和 GSH 的升高所致的间接抗氧化作用的定量相关关系。

[0079] 材料和方法

[0080] 化学制剂叔-丁基过氧化氢、3-morpholinolonydnonimine (SIN-1)、甲萘醌亚硫酸

氢钠（甲萘醌）和 3-[4,5-二甲基噻唑-2-yl]-2,5-联苯四唑溴化物 (MTT)，全反式-视黄醛均购自 Sigma (St. Louis, MO)。4-羟基壬-2-烯醛 (4-hydroxynon-2-enal) 从 Cayman 化学公司获得 (Ann Arbor, MI)，合成的莱菔硫烷 [1-异硫氰酸盐-(4R,S)-(甲磺酰)丁烷] 得自 LKT 实验室 (St. Paul, MN)。

[0081] 细胞培养成年人视网膜色素上皮细胞 (ARPE-19, TCC 目录第 CRL-2302 号) 从 American Type Culture Collection 获得 (Manassas, VA)。这些细胞的结构和功能特性与体内同类视网膜细胞相似 (Dunn, K. C., Aotaki-Keen, A. E., Putkey, F. R. 和 Hjelmeland, L. M. (1996) *Exp. Eye Res.* 62, 155-159)。将它们培养于等体积的 Dulbecco's 改良的 Eagle's 培养基 (DMEM) 和 Ham's F12 培养基 +10% 胎牛血清的混合液中，该胎牛血清已于 55°C 与 1% (w/v) 的木炭加热 90 分钟。

[0082] 人皮肤角化细胞 (HaCaT) 得自 Dr. G. Tim Bowden, Arizona Cancer Center, Tucson, AZ 并培养不含 8% 胎牛血清的 Eagle's 基础培养盐中 (EMEM)，此培养基已用 Chelex 树脂 (Bio-Rad, Hercules, CA) 处理过而除去了  $Ca^{2+}$  (Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A. 和 Fusening, N. E. (1998) *J. Cell Biol.* 106, 761-771)。将小鼠 L1210 白血病细胞, Dr. Joseph G. Cory 的赠品, East Carolina State University, Greenville, NC, 培养于加有 10% 马血清的 RPMI 1640 培养基中。所有培养物在 37°C 5% CO<sub>2</sub> 的湿空气中培养。从 Life Technologies 获得这些培养基和血清 (Rockville, MD)。

[0083] 莱菔硫烷诱导 2 型反应所有的实验都在 96-孔微滴定板中实施。以 10,000 细胞/孔接种 ARPE-19 和 HaCaT 细胞，并在加入莱菔硫烷之前培育 24 小时，而 L1210 细胞 (5,000 细胞/孔) 在莱菔硫烷处理之前不培育。用同源的培养基稀释二甲基亚砷配制莱菔硫烷 (5mM) 溶液，使最终诱导剂浓度为 0.16-5.0  $\mu$ M。最终的 DMSO 浓度体积百分比  $\leq$  0.1%。

[0084] 氧化剂的选择叔-丁基过氧化氢物与脂质过氧化氢的不同在于水溶性，但与过氧化氢不一样，它不能被过氧化氢酶的过氧化作用所代谢。它的失活主要是通过 GSH 的直接还原和 GSH 的谷胱甘肽转移酶促还原 (Hurst, R., Bao, Y., Jemth, P., Mannervik, B. 和 Williamson, G. (1998) *Biochem J.* 332, 97-100)。甲萘醌导致坏死性细胞死亡是通过参与氧化循环，通过去除巯基和细胞内毒性水平钙的累积产生过氧化物和更多的活性氧类，(Smith, M. T., Evans, C. G., Thor, H. 和 Orrenius, S. (1985) 摘自 *Oxidative stress*, (H Sies, 编辑) Academic Press, London, 91-113)。这些过程的相关毒物学重要性也许取决于组织和局部情况。甲萘醌的一种重要解毒机制是受 NAD(P)H:醌还原酶 1 (QR) 促进的对氢醌的两电子专性还原作用 (Dinkova-Kostova, A. T. 和 Talalay, P. (2000) *Free Radical Biol. Med.* 29, 231-240)。这种基因已经被破坏的小鼠对于甲萘醌的毒性要敏感得多 (Radjendirane, V., Joseph, P., Lee, Y.-H., Kimura, S., Klein-Szanto, A. J. P., Gonzalez, F. J. 和 Jaiswal, A. K. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 7382-7389)。

[0085] 4-羟基壬烯醛是高细胞毒性和基因毒性的烯醛 (alkenal) 产生自聚合不饱和脂肪酸，例如花生四烯酸的过氧化反应，它的组织丰富性被广泛的用作脂质过氧化反应的指数 (Prior, W. A. 和 Porter, N. A. (1990) *Free Radical Biol. Med.* 8, 541-543; Esterbauer, H., Schauer, R. J. 和 Zollner, H. (1991) *Free Radical Biol. Med.* 11, 81-128)。4-羟基壬烯醛解毒的主要途径是通过谷胱甘肽转移酶与 GSH 结合，从而形成硫醚氨酸 (Alary,

J., Bravais, E., Cravedi, J.P., Debrauwer, L., Rao, D. 和 Bories, G. (1995) *Chem. Res. Toxicol.* 8, 34-39; Hubatsch, I., Ridderstorm, M. 和 Mannervik, B. (1998) *Biochem J.* 330, 175-179)。

[0086] 过氧化亚硝酸盐是比过氧化物或一氧化氮强得多的氧化剂, 由于这些分子非常迅速的结合而在细胞中形成。虽然一氧化氮能保护细胞免遭凋亡用, 但过氧化亚硝酸盐是毒性大得多的制剂并能攻击许多细胞成分, 能与巯基、铁-硫中心以及锌指起反应, 它启动了脂质的过氧化反应。它也能通过过氧化物歧化酶催化的反应硝化酪氨酸 (Estevez, A. G., Spear, N., Pelluffo, H., Kamaid, A., Barbeito, L. 和 Beckman, J. S. (1999) *Methods Enzymol.* 301, 393-402)。过氧化亚硝酸盐也许能通过多种机制产生细胞氧化应激。

[0087] 聚积的证据证明长期暴露于阳光在一些变性疾病中起到了作用, 例如衰老相关的斑变性 (AMD)。因此, 我们已经进行了保护人 RPE 细胞免受由全-反式-视黄醛 (它存在于人视网膜中并且是视沉环路的一种重要组分) 介导的光氧化损害实验。

[0088] 用氧化剂处理将叔-丁基过氧化氢 (1M) 和 4-羟基壬烯醛 (25mM) 溶解在 DMSO 中, 并在微滴定板孔中加入系列稀释液之前用无血清培养基稀释 1000 倍。DMSO 的最终浓度因此不到 0.1% (体积比)。将甲萘醌亚硫酸氢钠 (0.5M) 和 SIN-1 (0.5M) 溶解并加入到 PBS 中。使 APRE-19 细胞接触甲萘醌 2 小时, 接触叔-丁基过氧化氢 16 小时, 用 PBS 洗涤, 用 MTT 试验测定细胞活力。使 ARPE-19 细胞接触过氧化亚硝酸盐 2 小时, 接触 4-羟基壬烯醛 4 小时, 然后将细胞在无血清培养基中分别培育 22 和 20 小时, 用 PBS 洗涤, 并测定细胞活力。对于过氧化亚硝酸盐和 4-羟基壬烯醛需要增加培育时间, 以引起最大的细胞毒性。

[0089] 细胞毒性的测定通过 MTT 还原分光光度法测定细胞活力 (Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. 和 Mitchell, J. B. (1987) *Cancer Res.* 47, 936-942)。在指定的培养期后丢弃培养基, 用微滴定板清洗器将细胞用 PBS 清洗 3 次 (Ultrawash Plus, Dynex Technologies, Chantilly, VA)。每个孔加入 150  $\mu$ l 用无血清培养基配的 MTT 溶液 (0.5mg/ml)。37°C 温育滴板 2 小时, 弃去 MTT 溶液, 每孔加入 100  $\mu$ l 的 DMSO, 在旋转混合器上以 200rpm 振摇板 5 分钟。用微滴定板读数器测定各孔的 555nm 吸光度 (Spectra Max Plus, Molecular Devices, Sunnyvale, CA)。然后将在每种诱导剂和氧化剂浓度时被还原 MTT 的吸光度与未处理过的只加入运载体的对照细胞作比较, 所述运载体是用于莱菔硫烷 (DMSO) 和甲萘醌 (DMSO 或 PBS) 溶解的。各次实验, 采用 3 块相同的 96-孔板, 计算吸光度平均值、这些平均值的标准误差和它们的变异系数。变异系数范围从 0.6% -16.5%。变异系数的平均值处理和未处理细胞相似, 平均值是  $7.2 \pm 4.2\%$ 。

[0090] 细胞毒性的定量分析采用计算机程序根据中位数方程进行剂量-效益分析, (Chou, T. C. 和 Hayball, M. (1996) *CalcuSyn for Windows 3.1 and 95: multiple dose effect analyzer and manual for IBM-PC*, Biosoft, Cambridge, U. K)。此方程为:  $f_a/f_u = [D/D_m]^m$ , 其中  $f_a$  是受氧化剂影响的细胞组分,  $f_u$  是未受影响的组分 (即  $1-f_a$ ),  $D$  是产生效应  $f_a$  所需要的氧化剂剂量,  $D_m$  是产生 50% 效应所需氧化剂的浓度, 即当  $f_a = f_u$  时, 斜率  $m$  是剂量反应曲线的 S 形态的一种衡量, 因而是协同性的一种衡量。通过并于该氧化剂  $\log D$  的  $\log$  作图 ( $f_a/f_u$ ) 分析这些结果。此计算机程序提供了曲线的斜率 ( $m$ ), 以及线性的吻合度 ( $r^2$ )。

[0091] 细胞裂解物的制备加入洋地黄皂昔溶液 (2mM EDTA 中 0.8mg/ml 的洋地黄皂昔, pH

为 7.8), 37°C 温育 20 分钟, 25°C 轻微振摇 20 分钟, 并 4°C 1,500xg 离心 20 分钟裂解细胞。

[0092] 谷胱甘肽分析在 96-孔微滴定板中进行谷胱甘肽还原酶-偶联试验, 通过被还原的 5,5'-二硫代二-2-硝基苯甲酸 (DTNB) 测定总的谷胱甘肽 (氧化的和还原的) (Ritchie, J. P., Jr. Skowronski, L., Abraham, P. 和 Leutzinger Y. (1996) Clin. Chem. 42, 64-70)。简言之, 将 30  $\mu$ l 裂解物和 60  $\mu$ l 12.5% 的冷偏磷酸混合, 4°C 存放 10 分钟, 并 4°C 1,500xg 离心 20 分钟。在一块新的平板中, 将各样品的 50  $\mu$ l 上清液组分与 50  $\mu$ l 的 1.26mM DTNB、50  $\mu$ l 的 200mM 磷酸钠、pH7.55mM EDTA 以及 50  $\mu$ l 含有 3.1 单位/ml 的酵母谷胱甘肽还原酶 (Sigma, St. Louis, MO) 混合。25°C 温育 5 分钟后, 各孔中加入 50  $\mu$ l 0.72mM 的 NADPH, 并在 412nm 处测定初始反应速率。每次试验包括纯 GSH 的标准曲线。

[0093] 酶试验所有测定都于 25°C 96-孔微滴定板中进行, 用微滴定板读数器监测反应速率。用我们实验室开发的方法测定上清液组分的 QR 活性 (Fahey, J. W., Zhang, Y. 和 Talalay, P. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 10367-10372; Prochaska, H. J., Santamaria, A. B. 和 Talalay, P. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 2394-2398)。将该反应速率与用二辛可宁酸 (bicinchoninic acid) 试剂测定的蛋白质浓度相关联而获得比活性 (Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T. Mallia, K., Gratner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. 和 Klenk, D. C. (1985) Anal. Biochem. 150, 76-85)。总 QR 活性的双香豆素可抑制组分在 ARPE-19、HaCaT 和 L1210 细胞中贡献了整个观察到的速率的 90% 以上。通过将 50  $\mu$ l 细胞裂解物和 25  $\mu$ l 11mM 的 NADPH、25  $\mu$ l 1GSSG (20mg/ml) 以及 150  $\mu$ l 150mM pH7.5 的磷酸钠混合测定了谷胱甘肽还原酶的活性。初始反应速率在 340nm 处获得 (Carlberg, I. 和 Mannervik, B. (1985) Methods Enzymol. 113, 484-490)。通过将 50  $\mu$ l 细胞裂解物和 200  $\mu$ l 含 2.0mM 6-磷酸葡萄糖、20mM MgCl<sub>2</sub> 以及 150  $\mu$ l M NADP 的试验缓冲液混合测定了 6-磷酸葡萄糖脱氢酶。初始反应速率在 340nm 处测定 (Kornberg, A. 和 Horecker, B. L. (1955) Methods Enzymol. 1, 323-327)。

#### [0094] 实施例 1

[0095] 甲萘醌对于人视网膜色素上皮细胞毒性以及莱菔硫烷保护作用的定量测定

[0096] 针对培养在 96-孔微滴定板中的 ARPE-19 细胞, 开发了一种定量测定氧化剂毒性和莱菔硫烷保护作用的标准化高度可重复性系统。图 1 阐述了培育之前 24 小时 0-5  $\mu$ M 浓度的莱菔硫烷对接触 0-250  $\mu$ M 甲萘醌 2 小时后 ARPE-19 细胞毒性的保护作用, 图 1 显示细胞毒性对于浓度增加甲萘醌的 S-形关系曲线 (图中绘出了杀伤细胞组分, 或受影响的组分 = fa)。当甲萘醌的浓度最高时, 几乎没有细胞存活, 但先用莱菔硫烷处理保护了一大部分细胞免于氧化死亡。检查了整个浓度范围, 随着氧化剂甲萘醌的浓度升高, 细胞存活降低, 而且随着莱菔硫烷浓度升高, 细胞存活增加, 见图中所示 (图 1)。

[0097] 用 Chou 和 Talalay, (1984) Adv. Enzyme Regul. 22, 27-55 的中位数作用方程分析数据, 提供了: (a) 测定各每组实验条件下的氧化剂毒性, 表示为中位数作用浓度 (Dm); (b) 这些数据遵循质量作用原理, 此原理是中位数方程的理论基础, 即对数图 (fa/fu) r<sup>2</sup> 值的数量级和 logD 相关; (c) Hill 类型系数 (m), 曲线的 S 形态的一种衡量, 因此是导致该生物学终点 (细胞死亡) 之过程之间协同性的一种衡量。上述数据 (图 1) 的中位数作用图是平行和线性图家族 (5 图的平均 r<sup>2</sup> = 0.976 ± 0.016), 平均斜率 (m) 为 3.44 ± 0.22 (显示于表 1)。这些高斜率表明导致甲萘醌细胞毒性的过程是高度协同的。值得注意的是, Dm 值

从基础条件下的  $72.2 \mu\text{M}$  甲萘醌无症状升高至已经用  $5 \mu\text{M}$  莱菔硫烷处理 24 小时细胞的  $134.2 \mu\text{M}$ 。在间隔许多周后进行的两种其它实验中,对照  $D_m$  值分别为  $65.5$  和  $69.0 \mu\text{M}$ ,所以十分一致。

[0098] 表 1 也显示了用甲萘醌、叔-丁基过氧化氢、4-羟基壬烯醛或过氧化亚硝酸盐处理的 ARPE-19、HaCaT 细胞或 L1210 细胞实验的结果。在上述条件下通过 MTT 还原测定,测定了细胞的活力。 $D_m$  值获自关于每种莱菔硫烷浓度时的  $\log$  氧化剂浓度的一系列  $\log(fa/fu)$  图。 $m$  值是这些图的斜率, $r^2$  是线性相关系数。

[0099] 表 1 通过中位数作用方程分析莱菔硫烷保护人视网膜色素上皮细胞 (ARPE-19)、角化细胞 (HaCaT) 和小鼠白血病 (L1210) 细胞免受甲萘醌、叔-丁基过氧化氢、4-羟基壬烯醛或过氧化亚硝酸盐的毒性影响。

[0100]

氧化剂	莱菔硫烷( $\mu\text{M}$ )	$D_m(\mu\text{M})$	m	$r^2$
<b>ARPE-19 细胞</b>				
甲萘醌	0.00	72.2	3.35	0.952
	0.63	98.6	3.69	0.979
	1.25	110	3.49	0.983
	2.50	123	3.58	0.994
	5.00	134	3.12	0.972
叔-丁基	0.00	95.8	2.52	0.923
过氧化氢物	0.63	140	2.17	0.964
	1.25	163	1.79	0.980
	2.50	165	1.26	0.953
4-羟基壬烯醛	0.00	8.70	2.85	0.885
	0.63	14.1	2.51	0.931
	1.25	25.8	2.78	0.981
	2.50	26.8	2.51	0.933
过氧化亚硝酸盐	0.00	1440	6.07	0.958
	0.63	2780	6.30	0.984
	1.25	2820	6.19	0.982
	2.50	2890	6.62	0.977
<b>HaCaT 细胞</b>				
叔-丁基	0.00	63.5	0.899	0.955
过氧化氢	0.63	113	0.894	0.965
	1.25	166	0.921	0.971
	2.50	200	0.768	0.974
<b>L1210 细胞</b>				
甲萘醌	0.00	12.2	0.725	0.967
	0.16	19.6	0.864	0.986
	0.31	26.5	1.00	0.987
	0.63	36.2	1.17	0.977

[0101] 实施例 2

[0102] 莱菔硫烷保护 ARPE-19 免受甲萘醌的毒性作用和升高谷胱甘肽水平以及醌还原

酶比活性之间的相关性

[0103] 测定了已经用 0-5.0  $\mu$ M 莱菔硫烷处理 24 小时的 ARPE-19 细胞胞液中 QR 的比活性和 GSH 的浓度,测定条件与上面用于测定甲萘醌毒性 Dm 值时相同。正如所期望的,二种 2 型诱导指示剂都随着接触的莱菔硫烷浓度高而升高(图 2)。这些反应与莱菔硫烷浓度线性相关( $r^2$  分别 = 0.995 和 0.935)。更重要的是,多元回归分析显示莱菔硫烷浓度和 QR 活性以及 GSH 水平和 Dm 值之间有高度相关性( $p$  分别 = 0.0095, 0.0004, 0.0038)。因此在莱菔硫烷提供的免受甲萘醌毒性保护作用的程度上和 QR 活性以及 GSH 水平升高之间,有高度明显的量化关系,强烈提示这些变量的改变是有因果相关的。

#### [0104] 实施例 3

[0105] 莱菔硫烷提供了对甲萘醌氧化应激的延长抗氧化保护作用

[0106] 由于莱菔硫烷和其他异硫氰酸盐一样,通常不参与氧化/还原反应,它的抗氧化机制一定是间接的,可能通过 2 型蛋白质的诱导。因此,看来莱菔硫烷的保护作用应可能是催化性的并能在去除诱导剂后持续数天(和同源蛋白质的半衰期相关),而不象直接抗氧化剂(例如抗坏血酸,生育酚),它们在原子基团猝灭反应之中被消耗掉。因此用两种浓度的莱菔硫烷(0.625 和 2.5  $\mu$ M)处理 ARPE-19 细胞 24 小时,然后将它们在没有胎牛血清的培养基中再培育 96 小时(为了使得细胞生长的并发症最小以及鉴别细胞质量的增加对于特定生物化学指标作用的难度最小化)。评价了三组相同的平板在接触莱菔硫烷(2 小时)后即刻和间隔 24 小时的甲萘醌毒性。对照细胞甲萘醌的中位数作用浓度(Dm)是 66.8  $\mu$ M,用 0.625 和 2.5  $\mu$ M 莱菔硫烷处理的细胞 Dm 值分别是 69.2 和 94.5  $\mu$ M。对照细胞的抵抗力 48 小时保持不变,而用莱菔硫烷处理的细胞对甲萘醌的抵抗力在这期间继续升高,在随后的 48 小时下降,最终接近对照细胞的水平(图 3)。

[0107] 这些实验确定了在诱导处理 24 小时结束时,莱菔硫烷所产生的保护作用在培养物中,保持或超过至少 3 天(图 3)。以相同方式处理的细胞胞液中,QR、6-磷酸葡萄糖脱氢酶和谷胱甘肽还原酶的比活性,在去除培养基中的莱菔硫烷后持续升高 48 小时,然后在随后的 48-72 小时内保持高水平(6-磷酸葡萄糖脱氢酶和谷胱甘肽还原酶)或略微下降(QR)。用 2.5  $\mu$ M 莱菔硫烷处理 24 小时后 GSH 的水平增加大约 50%,另 24 小时保持在这个水平,然后在随后的 96 小时中下降至对照细胞水平。值得注意的是,在接触莱菔硫烷 24 小时然后保持在无血清培养基中数天的 ARPE-19 细胞中,此种保护状态维持基本上升高,与较高的 GSH 水平以及升高的 2 型酶标记物相平行。

#### [0108] 实施例 4

[0109] 莱菔硫烷保护 ARPE-19 细胞免受叔-丁基过氧化氢、过氧化亚硝酸盐以及 4-羟基壬烯醛的氧化应激的影响

[0110] 用一定浓度范围(0, 0.625, 1.25 和 2.5mM)的莱菔硫烷处理 ARPE-19 细胞 24 小时,同样提供了对与甲萘醌作用机制不同的其他氧化剂的保护作用。因此,叔-丁基过氧化氢(0.5-1.0mM 16 小时)、过氧化亚硝酸盐(产生自 SIN-1, 0.25-4.0mM 2 小时)以及 4-羟基壬烯醛(1.56-25  $\mu$ M 4 小时)的细胞毒性也用莱菔硫烷处理而明显缓解。这种保护作用,象对抗甲萘醌的保护一样,取决于氧化剂和莱菔硫烷二者的浓度(图 5 和表 1)。

[0111] 对于通过中位数作用方程更为详细的检查保护作用,揭示:(a) 这些氧化剂细胞毒性的斜率  $m$  相当不同(叔-丁基过氧化氢、4-羟基壬烯醛以及过氧化亚硝酸盐的平均值

分别为 1.93、2.66 和 6.29), 与甲萘醌的  $m$  值不同 (3.45); (b) 相当浓度的莱菔硫烷提供的抗不同氧化剂的保护作用的程度范围为 2- 至 3- 倍。

[0112] 实施例 5

[0113] 保护人角化细胞 (HaCaT) 和小鼠白血病细胞 (L1210) 抵抗氧化应激反应

[0114] 为了研究由 2 型诱导产生保护作用的普遍性, 分别分析了用莱菔硫烷处理 24 小时对于叔 - 丁基过氧化氢和甲萘醌对人角化细胞 (HaCaT) 和小鼠白血病细胞 (L1210) 毒性的影响。令人感举的是, 这些细胞系中二种氧化剂的中位数作用图的斜率在 0.8-1.2 之间, 表明导致这些细胞系中细胞死亡的过程之间缺乏明显的协同性。这与同一氧化剂对于 ARPE-19 细胞的作用相当不同 (表 1)。因此, 看来致死过程之间的协同性取决于细胞系。然而, 在非转化的人角化细胞系和高度新生性小鼠白血病细胞系中观察到的基本保护作用表明, 莱菔硫烷提供的保护作用是一种更普遍的现象, 不限于视网膜色素上皮细胞。

[0115] 实施例 6

[0116] 保护人 ARPE 细胞抵抗全 - 反式 - 视黄醛和暴露 365nm 光所诱导的光氧化攻击

[0117] 为了研究莱菔硫烷抵抗全 - 反式 - 视黄醛和光暴露介导的光氧化损害, 用 0-100  $\mu$  M 的全 - 反式 - 视黄醛处理细胞 2 小时, 并用 0-5  $\mu$  M 的莱菔硫烷培育 24 小时后, 暴露于 365nm 光 20 分钟。表 2 显示细胞活力是光氧化剂和莱菔硫烷浓度的函数。例如, 当用 50  $\mu$  M 的全 - 反式 - 视黄醛处理细胞时, 细胞活力 (对照的 9.4, 11.7, 15.2 和 27.4%) 取决于莱菔硫烷的浓度 (分别是 0.0, 1.25, 2.5 和 5.0  $\mu$  M)。

[0118] 表 2: 在照光和黑暗中接触全 - 反式 - 视黄醛并用莱菔硫烷预处理的视网膜上皮细胞的存活率 (%)

[0119]

	全-反式-视黄醛 ( $\mu\text{M}$ )					
	100	50	25	12.5	0	对照
莱菔硫烷						
( $\mu\text{M}$ )						
暴露于 365nm 的光						
0.00	3.1	9.4	41.9	83.6	100.6	100.5
1.25	3.4	11.7	54.4	95.4	100.0	100.7
2.50	5.2	15.2	63.8	96.5	100.6	97.4
5.00	8.2	27.4	72.2	103.4	100.4	101.4
黑暗中						
0.00	75.0	96.8	97.6	96.3	97.1	99.1
1.25	74.7	98.4	97.7	96.3	96.6	96.7
2.50	75.6	99.9	98.3	101.5	99.4	99.5
5.00	84.6	106.8	104.8	104.6	103.1	105.6

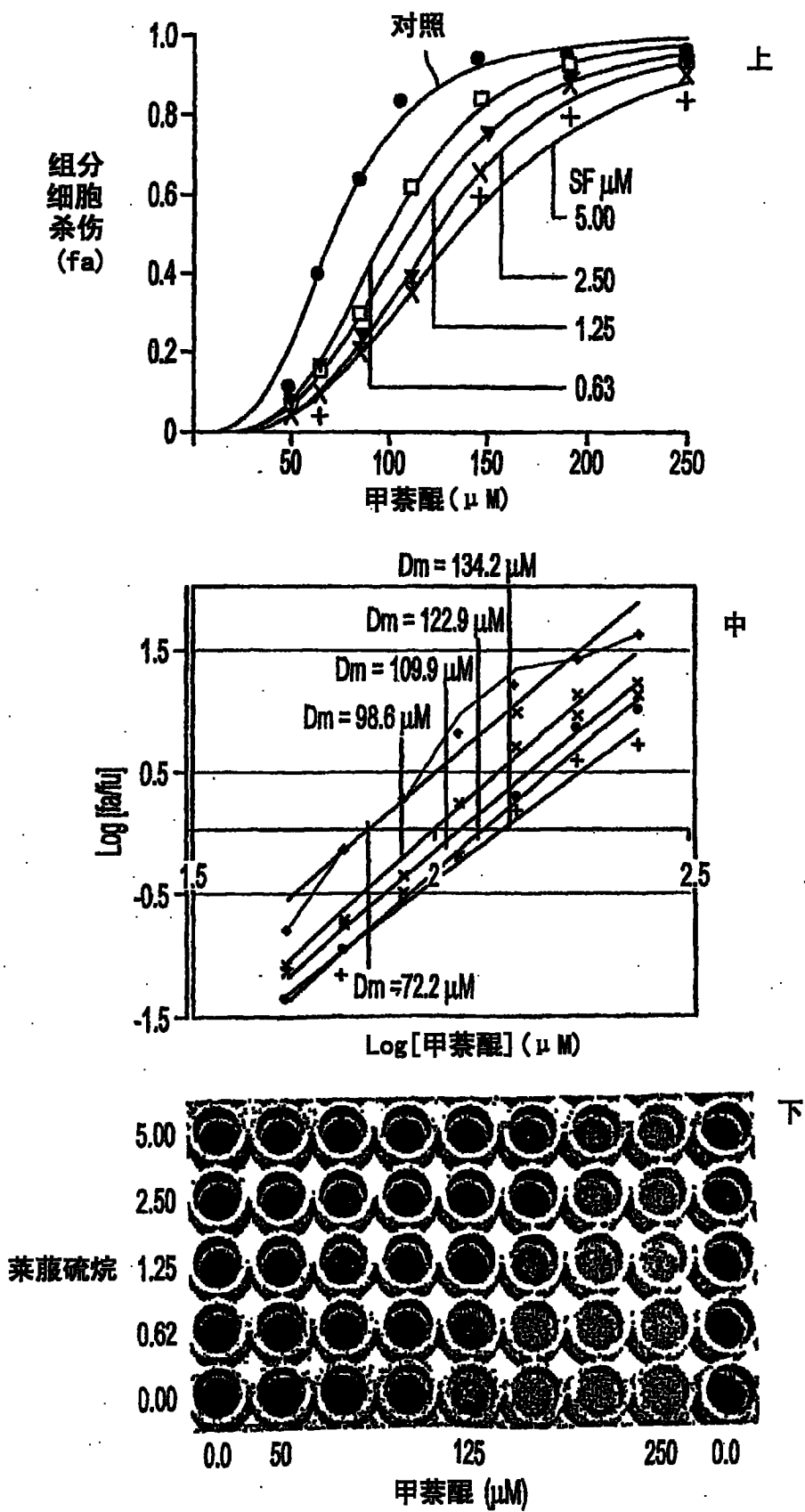


图 1

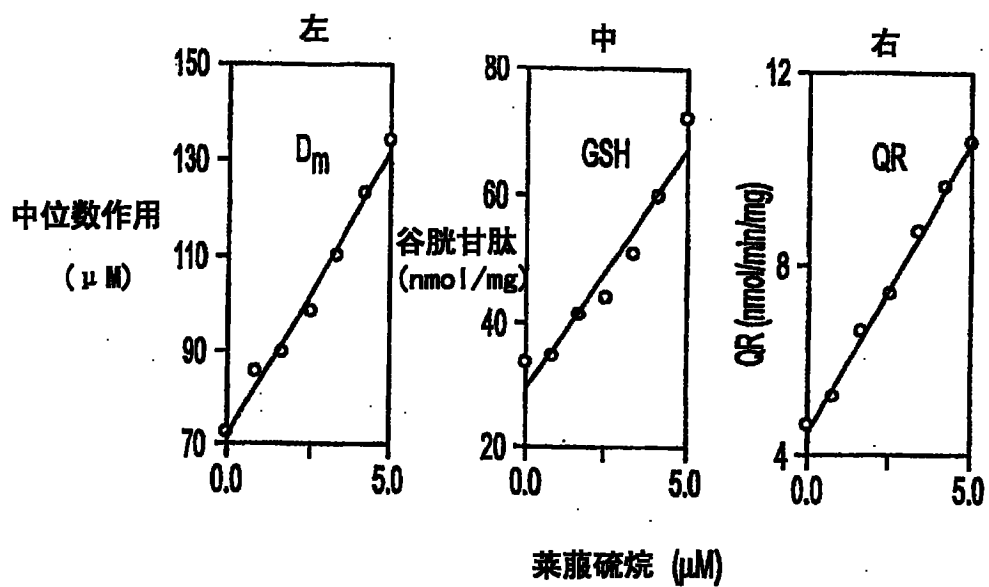


图 2

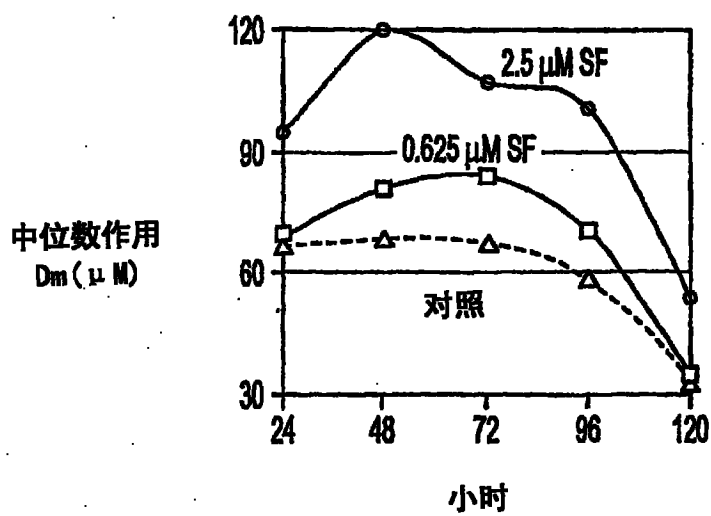


图 3

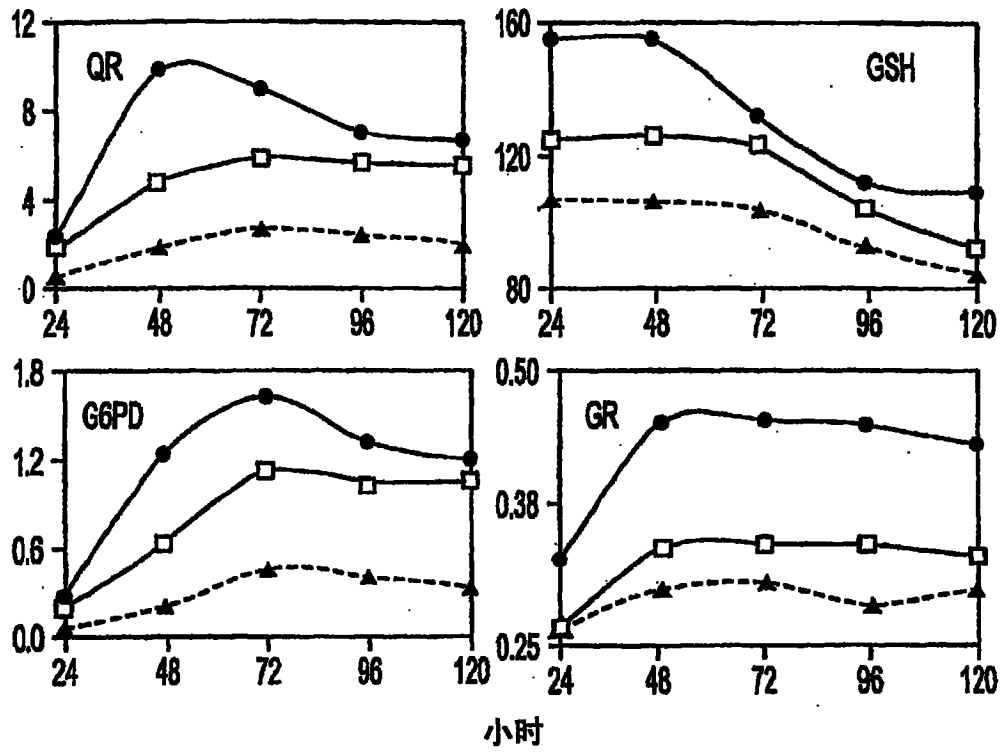


图 4

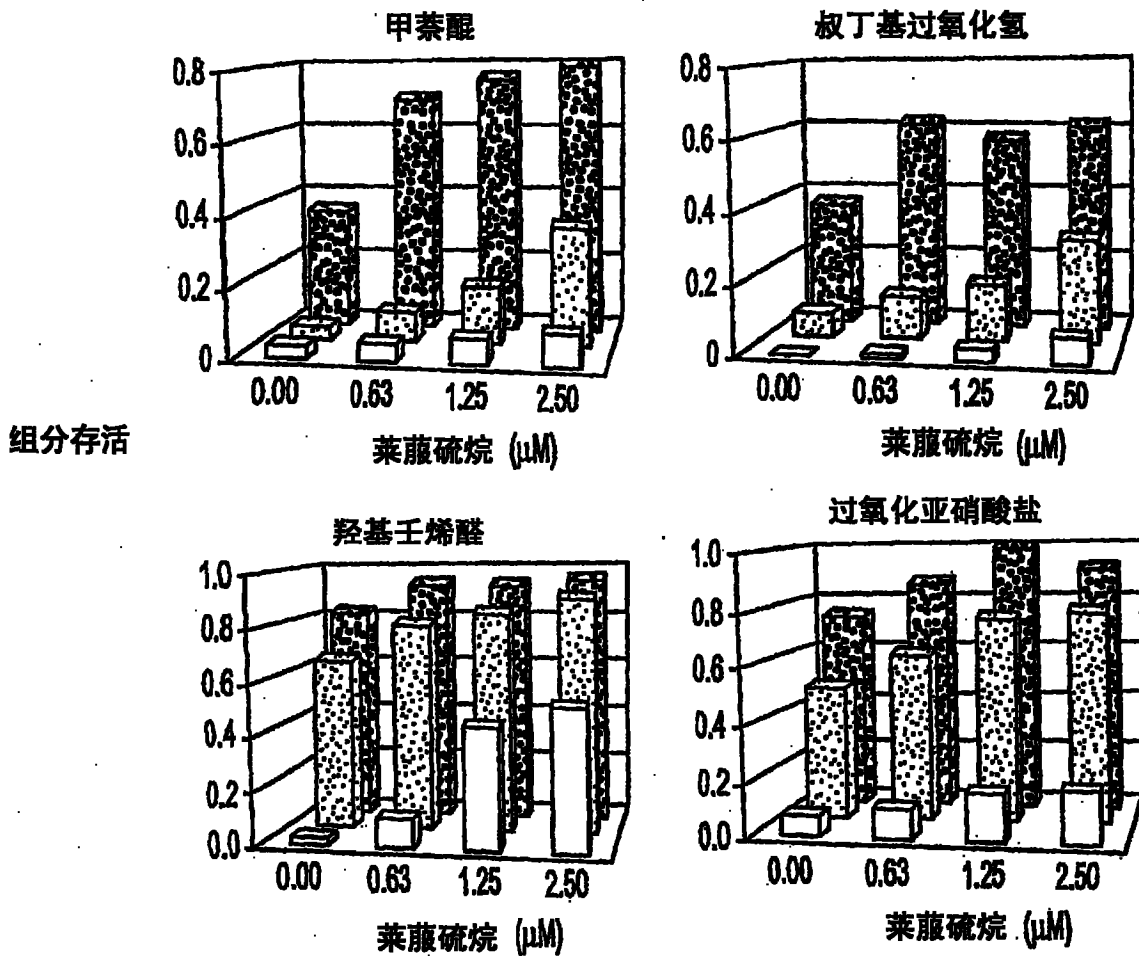


图 5

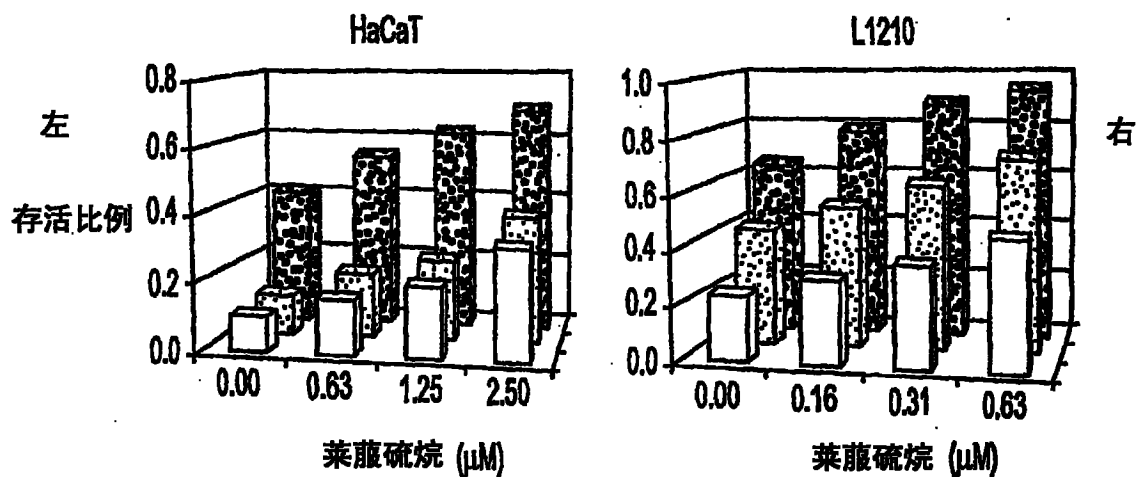


图 6