

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200510025838.7

[51] Int. Cl.

C07K 14/47 (2006.01)
A61K 31/385 (2006.01)
A61K 31/095 (2006.01)
A61K 38/06 (2006.01)
A61K 31/616 (2006.01)
A61K 31/197 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 1 月 7 日

[11] 公开号 CN 101337987A

[51] Int. Cl. (续)

A61K 31/185 (2006.01)

A61P 27/12 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

[22] 申请日 2005.5.16

[21] 申请号 200510025838.7

[71] 申请人 中国人民解放军第二军医大学

地址 200433 上海市杨浦区翔殷路 800 号第
二军医大学长海医院中心实验室

[72] 发明人 李闻捷 张 军 刘梦蕾

[74] 专利代理机构 上海光华专利事务所

代理人 余明伟

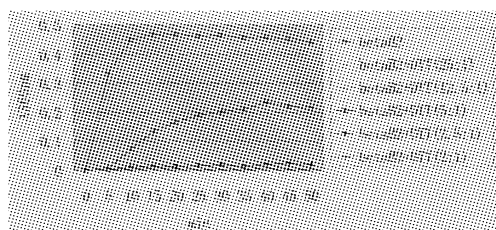
权利要求书 5 页 说明书 45 页 附图 2 页

[54] 发明名称

一种用于抗白内障的靶蛋白

[57] 摘要

本发明涉及一种能够用于抗白内障的靶蛋白及其用途。发明人根据晶体蛋白的时相改变,发现了表达特殊及分布特殊的晶体蛋白 βB_2 随机体老化进程的变化规律,确定其为抗白内障的更为合适的靶蛋白,并发现二硫苏糖醇是能够有效抑制 βB_2 等晶体蛋白受热变性的物质,进而以该靶蛋白为靶点,以二硫苏糖醇及其组合物为原料制备相应的抗白内障产品。白内障疾病已成为影响中国人口生活质量的重要致病原因,本发明确定 βB_2 为靶蛋白,应用广泛,为研制新药提供了方向;已开发的产品预防为主,联合用药,药物外用,提供了一种新的药物来源,是预防、诊断和治疗晶体蛋白变性或白内障及其相关疾病的有效产品,能够产生显著的社会效益和经济效益。



1. 一种用于抗白内障的靶蛋白，其特征在于，该靶蛋白是晶体蛋白 βB_2 。
2. 根据权利要求 1 所述的用于抗白内障的靶蛋白，其特征在于，所述的抗白内障是指预防、诊断、检测、保护、治疗和研究晶体蛋白变性及其相关疾病或白内障及其相关疾病。
3. 根据权利要求 2 所述的用于抗白内障的靶蛋白，其特征在于，所述的白内障及其相关疾病包括各类白内障疾病及其相关疾病中的一种或多种。
4. 根据权利要求 3 所述的用于抗白内障的靶蛋白，其特征在于，所述的白内障及其相关疾病是老年性白内障及其相关疾病中的一种或多种。
5. 根据权利要求 4 所述的用于抗白内障的靶蛋白，其特征在于，所述的白内障及其相关疾病是皮质性白内障及其相关疾病中的一种或多种。
6. 根据权利要求 1~5 任一项所述的用于抗白内障的靶蛋白在晶体蛋白 βB_2 作为靶蛋白来制备相应的抗白内障产品的应用。
7. 根据权利要求 6 所述的用于抗白内障的靶蛋白，其特征在于，所述的抗白内障产品是用于预防、诊断、检测、保护、治疗和研究晶体蛋白变性及其相关疾病或白内障及其相关疾病的产品。
8. 根据权利要求 7 所述的用于抗白内障的靶蛋白，其特征在于，所述的抗白内障产品是包括相应的以 βB_2 为靶蛋白的药物、试剂或者食品中的一种或多种。
9. 根据权利要求 8 所述的用于抗白内障的靶蛋白，其特征在于，所述的抗白内障产品是相应的以 βB_2 为靶蛋白的药物。
10. 根据权利要求 6 所述的用于抗白内障的靶蛋白，其特征在于，所述的抗白内障产品是采用以二硫苏糖醇为原料或以二硫苏糖醇的组合物为原料制备相应的抗白内障产品，所述的二硫苏糖醇是能够有效抑制 βB_2 晶体蛋白受热变性的物质。
11. 根据权利要求 10 所述的用于抗白内障的靶蛋白，其特征在于，所述的原料中还包括阿司匹林、赖氨酸、牛磺酸或维生素中的一种或多种，含量范围是 10%~30%。
12. 根据权利要求 10 所述的用于抗白内障的靶蛋白，其特征在于，所述的组合物的配方是：11mmol/L~111mmol/L 阿司匹林、12mmol/L~120mmol/L 赖氨酸、0.25mmol/L~2.5mmol/L 二硫苏糖醇。
13. 根据权利要求 12 所述的用于抗白内障的靶蛋白，其特征在于，所述的组合物的配方是：11mmol/L 阿司匹林、12mmol/L 赖氨酸、0.25mmol/L 二硫苏糖醇，或者是：111mmol/L 阿司匹林、120mmol/L 赖氨酸、2.5mmol/L 二硫苏糖醇。
14. 根据权利要求 10 所述的用于抗白内障的靶蛋白，其特征在于，所述的组合物的

配方是：11mmol/L~111mmol/L 牛磺酸、23mmol/L~230mmol/L 赖氨酸、0.25mmol/L~2.5mmol/L 二硫苏糖醇、11mmol/L~111mmol/L 阿司匹林。

15. 根据权利要求 14 所述的用于抗白内障的靶蛋白，其特征在于，所述的组合物的配方是：11mmol/L 牛磺酸、23mmol/L 赖氨酸、2.5mmol/L 二硫苏糖醇、11mmol/L 阿司匹林，或者是：111mmol/L 牛磺酸、230mmol/L 赖氨酸、2.5mmol/L 二硫苏糖醇、111mmol/L 阿司匹林。

16. 根据权利要求 10 所述的用于抗白内障的靶蛋白，其特征在于，所述的组合物的配方是：11mmol/L~111mmol/L 牛磺酸、12mmol/L~120mmol/L 赖氨酸、0.25mmol/L~2.5mmol/L 二硫苏糖醇。

17. 根据权利要求 16 所述的用于抗白内障的靶蛋白，其特征在于，所述的组合物的配方是：11mmol/L 牛磺酸、12mmol/L 赖氨酸、2.5mmol/L 二硫苏糖醇，或者是：111mmol/L 牛磺酸、120mmol/L 赖氨酸、0.25mmol/L 二硫苏糖醇。

18. 根据权利要求 10 所述的用于抗白内障的靶蛋白，其特征在于，所述的组合物的配方是：11mmol/L~111mmol/L 牛磺酸、12mmol/L~120mmol/L 赖氨酸、0.25mmol/L~2.5mmol/L 二硫苏糖醇、11mmol/L~111mmol/L 谷胱甘肽。

19. 根据权利要求 18 所述的用于抗白内障的靶蛋白，其特征在于，所述的组合物的配方是：11mmol/L 牛磺酸、12mmol/L 赖氨酸、2.5mmol/L 二硫苏糖醇、111mmol/L 谷胱甘肽，或者是：111mmol/L 牛磺酸、120mmol/L 赖氨酸、2.5mmol/L 二硫苏糖醇、111mmol/L 谷胱甘肽。

20. 根据权利要求 10 所述的用于抗白内障的靶蛋白，其特征在于，所述的组合物的配方是：11mmol/L~111mmol/L 阿司匹林、12mmol/L~120mmol/L 赖氨酸、0.25mmol/L~2.5mmol/L 二硫苏糖醇、11mmol/L~111mmol/L 谷胱甘肽。

21. 根据权利要求 20 所述的用于抗白内障的靶蛋白，其特征在于，所述的组合物的配方是：11mmol/L 阿司匹林、12mmol/L 赖氨酸、0.25mmol/L 二硫苏糖醇、111mmol/L 谷胱甘肽，或者是：111mmol/L 阿司匹林、120mmol/L 赖氨酸、0.25mmol/L 二硫苏糖醇、11mmol/L 谷胱甘肽。

22. 根据权利要求 10 所述的用于抗白内障的靶蛋白，其特征在于，所述的组合物的配方是：11mmol/L~111mmol/L 牛磺酸、23mmol/L~230mmol/L 赖氨酸、0.25mmol/L~2.5mmol/L 二硫苏糖醇、11mmol/L~111mmol/L 谷胱甘肽、11mmol/L~111mmol/L 阿司匹林。

23. 根据权利要求 22 所述的用于抗白内障的靶蛋白，其特征在于，所述的组合物的配方是：11mmol/L 牛磺酸、23mmol/L 赖氨酸、0.25mmol/L 二硫苏糖醇、11mmol/L 谷胱

甘肽、11mmol/L 阿司匹林，或者是：111mmol/L 牛磺酸、230mmol/L 赖氨酸、2.5mmol/L 二硫苏糖醇、11mmol/L 谷胱甘肽、111mmol/L 阿司匹林。

24. 根据权利要求 7 所述的用于抗白内障的靶蛋白，其特征在于，所述的抗白内障产品是采用以二硫苏糖醇为原料或以二硫苏糖醇的组合物为原料制备相应的抗白内障产品，所述的二硫苏糖醇是能够有效抑制 βB_2 晶体蛋白受热变性的物质。

25. 根据权利要求 24 所述的用于抗白内障的靶蛋白，其特征在于，所述的原料中还包
括阿司匹林、赖氨酸、牛磺酸或维生素中的一种或多种，含量范围是 10%~30%。

26. 根据权利要求 24 所述的用于抗白内障的靶蛋白，其特征在于，所述的组合物的
配方是：11mmol/L~111mmol/L 阿司匹林、12mmol/L~120mmol/L 赖氨酸、0.25mmol/L~
2.5mmol/L 二硫苏糖醇。

27. 根据权利要求 24 所述的用于抗白内障的靶蛋白，其特征在于，所述的组合物的配
方是：11mmol/L~111mmol/L 牛磺酸、23mmol/L~230mmol/L 赖氨酸、0.25mmol/L~
2.5mmol/L 二硫苏糖醇、11mmol/L~111mmol/L 阿司匹林。

28. 根据权利要求 24 所述的用于抗白内障的靶蛋白，其特征在于，所述的组合物的
配方是：11mmol/L~111mmol/L 牛磺酸、12mmol/L~120mmol/L 赖氨酸、0.25mmol/L~
2.5mmol/L 二硫苏糖醇。

29. 根据权利要求 24 所述的用于抗白内障的靶蛋白，其特征在于，所述的组合物的
配方是：11mmol/L~111mmol/L 牛磺酸、12mmol/L~120mmol/L 赖氨酸、0.25mmol/L~
2.5mmol/L 二硫苏糖醇、11mmol/L~111mmol/L 谷胱甘肽。

30. 根据权利要求 24 所述的用于抗白内障的靶蛋白，其特征在于，所述的组合物的
配方是：11mmol/L~111mmol/L 阿司匹林、12mmol/L~120mmol/L 赖氨酸、0.25mmol/L~
2.5mmol/L 二硫苏糖醇、11mmol/L~111mmol/L 谷胱甘肽。

31. 根据权利要求 24 所述的用于抗白内障的靶蛋白，其特征在于，所述的组合物的
配方是：11mmol/L~111mmol/L 牛磺酸、23mmol/L~230mmol/L 赖氨酸、0.25mmol/L~
2.5mmol/L 二硫苏糖醇、11mmol/L~111mmol/L 谷胱甘肽、11mmol/L~111mmol/L 阿司匹
林。

32. 根据权利要求 8 所述的用于抗白内障的靶蛋白，其特征在于，所述的抗白内障产
品是采用以二硫苏糖醇为原料或以二硫苏糖醇的组合物为原料制备相应的抗白内障产品，
所述的二硫苏糖醇是能够有效抑制 βB_2 晶体蛋白受热变性的物质。

33. 根据权利要求 32 所述的用于抗白内障的靶蛋白，其特征在于，所述的原料中还包
括阿司匹林、赖氨酸、牛磺酸或维生素中的一种或多种，含量范围是 10%~30%。

34. 根据权利要求 32 所述的用于抗白内障的靶蛋白，其特征在于，所述的组合物的

配方是：11mmol/L～111mmol/L 阿司匹林、12mmol/L～120mmol/L 赖氨酸、0.25mmol/L～2.5mmol/L 二硫苏糖醇。

35. 根据权利要求 32 所述的用于抗白内障的靶蛋白，其特征在于，所述的组合物的配方是：11mmol/L～111mmol/L 牛磺酸、23mmol/L～230mmol/L 赖氨酸、0.25mmol/L～2.5mmol/L 二硫苏糖醇、11mmol/L～111mmol/L 阿司匹林。

36. 根据权利要求 32 所述的用于抗白内障的靶蛋白，其特征在于，所述的组合物的配方是：11mmol/L～111mmol/L 牛磺酸、12mmol/L～120mmol/L 赖氨酸、0.25mmol/L～2.5mmol/L 二硫苏糖醇。

37. 根据权利要求 32 所述的用于抗白内障的靶蛋白，其特征在于，所述的组合物的配方是：11mmol/L～111mmol/L 牛磺酸、12mmol/L～120mmol/L 赖氨酸、0.25mmol/L～2.5mmol/L 二硫苏糖醇、11mmol/L～111mmol/L 谷胱甘肽。

38. 根据权利要求 32 所述的用于抗白内障的靶蛋白，其特征在于，所述的组合物的配方是：11mmol/L～111mmol/L 阿司匹林、12mmol/L～120mmol/L 赖氨酸、0.25mmol/L～2.5mmol/L 二硫苏糖醇、11mmol/L～111mmol/L 谷胱甘肽。

39. 根据权利要求 32 所述的用于抗白内障的靶蛋白，其特征在于，所述的组合物的配方是：11mmol/L～111mmol/L 牛磺酸、23mmol/L～230mmol/L 赖氨酸、0.25mmol/L～2.5mmol/L 二硫苏糖醇、11mmol/L～111mmol/L 谷胱甘肽、11mmol/L～111mmol/L 阿司匹林。

40. 根据权利要求 9 所述的用于抗白内障的靶蛋白，其特征在于，所述的抗白内障产品是采用以二硫苏糖醇为原料或以二硫苏糖醇的组合物为原料制备相应的抗白内障产品，所述的二硫苏糖醇是能够有效抑制 β B₂ 晶体蛋白受热变性的物质。

41. 根据权利要求 40 所述的用于抗白内障的靶蛋白，其特征在于，所述的原料中还包括阿司匹林、赖氨酸、牛磺酸或维生素中的一种或多种，含量范围是 10%～30%。

42. 根据权利要求 40 所述的用于抗白内障的靶蛋白，其特征在于，所述的组合物的配方是：11mmol/L～111mmol/L 阿司匹林、12mmol/L～120mmol/L 赖氨酸、0.25mmol/L～2.5mmol/L 二硫苏糖醇。

43. 根据权利要求 42 所述的用于抗白内障的靶蛋白，其特征在于，所述的组合物的配方是：11mmol/L 阿司匹林、12mmol/L 赖氨酸、0.25mmol/L 二硫苏糖醇，或者是：111mmol/L 阿司匹林、120mmol/L 赖氨酸、2.5mmol/L 二硫苏糖醇。

44. 根据权利要求 40 所述的用于抗白内障的靶蛋白，其特征在于，所述的组合物的配方是：11mmol/L～111mmol/L 牛磺酸、23mmol/L～230mmol/L 赖氨酸、0.25mmol/L～2.5mmol/L 二硫苏糖醇、11mmol/L～111mmol/L 阿司匹林。

45. 根据权利要求 44 所述的用于抗白内障的靶蛋白, 其特征在于, 所述的组合物的配方是: 11mmol/L 牛磺酸、23mmol/L 赖氨酸、2.5mmol/L 二硫苏糖醇、11mmol/L 阿司匹林, 或者是: 111mmol/L 牛磺酸、230mmol/L 赖氨酸、2.5mmol/L 二硫苏糖醇、111mmol/L 阿司匹林。

46. 根据权利要求 40 所述的用于抗白内障的靶蛋白, 其特征在于, 所述的组合物的配方是: 11mmol/L~111mmol/L 牛磺酸、12mmol/L~120mmol/L 赖氨酸、0.25mmol/L~2.5mmol/L 二硫苏糖醇。

47. 根据权利要求 46 所述的用于抗白内障的靶蛋白, 其特征在于, 所述的组合物的配方是: 11mmol/L 牛磺酸、12mmol/L 赖氨酸、2.5mmol/L 二硫苏糖醇, 或者是: 111mmol/L 牛磺酸、120mmol/L 赖氨酸、0.25mmol/L 二硫苏糖醇。

48. 根据权利要求 40 所述的用于抗白内障的靶蛋白, 其特征在于, 所述的组合物的配方是: 11mmol/L~111mmol/L 牛磺酸、12mmol/L~120mmol/L 赖氨酸、0.25mmol/L~2.5mmol/L 二硫苏糖醇、11mmol/L~111mmol/L 谷胱甘肽。

49. 根据权利要求 48 所述的用于抗白内障的靶蛋白, 其特征在于, 所述的组合物的配方是: 11mmol/L 牛磺酸、12mmol/L 赖氨酸、2.5mmol/L 二硫苏糖醇、111mmol/L 谷胱甘肽, 或者是: 111mmol/L 牛磺酸、120mmol/L 赖氨酸、2.5mmol/L 二硫苏糖醇、111mmol/L 谷胱甘肽。

50. 根据权利要求 40 所述的用于抗白内障的靶蛋白, 其特征在于, 所述的组合物的配方是: 11mmol/L~111mmol/L 阿司匹林、12mmol/L~120mmol/L 赖氨酸、0.25mmol/L~2.5mmol/L 二硫苏糖醇、11mmol/L~111mmol/L 谷胱甘肽。

51. 根据权利要求 50 所述的用于抗白内障的靶蛋白, 其特征在于, 所述的组合物的配方是: 11mmol/L 阿司匹林、12mmol/L 赖氨酸、0.25mmol/L 二硫苏糖醇、111mmol/L 谷胱甘肽, 或者是: 111mmol/L 阿司匹林、120mmol/L 赖氨酸、0.25mmol/L 二硫苏糖醇、11mmol/L 谷胱甘肽。

52. 根据权利要求 40 所述的用于抗白内障的靶蛋白, 其特征在于, 所述的组合物的配方是: 11mmol/L~111mmol/L 牛磺酸、23mmol/L~230mmol/L 赖氨酸、0.25mmol/L~2.5mmol/L 二硫苏糖醇、11mmol/L~111mmol/L 谷胱甘肽、11mmol/L~111mmol/L 阿司匹林。

53. 根据权利要求 52 所述的用于抗白内障的靶蛋白, 其特征在于, 所述的组合物的配方是: 11mmol/L 牛磺酸、23mmol/L 赖氨酸、0.25mmol/L 二硫苏糖醇、11mmol/L 谷胱甘肽、11mmol/L 阿司匹林, 或者是: 111mmol/L 牛磺酸、230mmol/L 赖氨酸、2.5mmol/L 二硫苏糖醇、11mmol/L 谷胱甘肽、111mmol/L 阿司匹林。

一种用于抗白内障的靶蛋白

技术领域

本发明涉及医药、食品和饮料技术领域，具体地说是涉及一种能够用于制备相关产品的靶蛋白及其用途，更具体地说是涉及一种能够用于抗白内障的靶蛋白及其用途。

背景技术

(一) 白内障的研究概况

1、概述

白内障是最常见的致盲原因之一，是严重影响人类健康的常见病、多发病。临床研究表明，在各类白内障病例中，由老化所引起的老年性白内障占有绝大部分的比例。

老年性白内障为双眼病，但两眼发病可有先后。根据白内障开始形成的部位，老年性白内障分为皮质性白内障(cortical cataract)、核性白内障(nuclear cataract)和囊性白内障(subcapsular cataract)，其中皮质性白内障是老年性白内障最常见的类型。

老年性白内障是老年人视力下降的主要原因，该病主要表现为在晶体老化过程中逐渐出现变性浑浊，又称变性白内障。在美国85岁以上的老年人中，患病率约占95%。

全世界特别是中国，面临人口快速增长的巨大压力及老龄化趋势加重的严峻局面，更加需要大力加强对白内障发病机理及影响因素的研究，以努力控制和减缓由此带来的白内障发病率上升的趋势。

2、白内障的形成原理及其病因学研究进展

晶状体的功能是将光线聚焦到视网膜上产生视觉。晶状体的主要成分是水 and 蛋白质，晶状体干重的80%~90%是蛋白质，所述的蛋白质包括 α 、 β 及 γ 三大族晶体蛋白。

晶状体的透明度是由恒定的水分含量、高浓度的蛋白质以及复杂的新陈代谢来保持的，即每种蛋白质的结构和它们彼此之间的相互作用是维持晶状体透明性的分子基础；也就是说，晶体蛋白的有序排列是维持晶状体空间结构的物质基础，即如果晶体蛋白组成发生改变，则会影响、破坏此种正常结构。

在晶状体发育成长过程中，晶体蛋白受机体自身自然老化及诸多外界因素的影响，会发生不同的修饰变性，晶体蛋白的质和量会发生改变，水溶性成份不断转变为水不溶性成分，影响其水溶性，进而影响晶状体的正常结构和透光性，最终导致老年性白内障的形成。也就是说，在人体衰老的过程中，一旦晶状体中的蛋白质结构受到破坏，则晶状体由清澈

透明变为混浊不透明，进而影响晶状体的正常结构及透光性，并逐步演变为老年性白内障。

晶状体的透光性主要是取决于晶状体中水溶性蛋白组分的质和量，尤其是几种主要的结构蛋白如 βB_2 （定义可参见文献：Aarts HJ, Lubsen NH, Schoenmakers JG. Crystallin gene expression during rat lens development. Eur J Biochem, 1989, 183(1): 31-36）、 $\gamma_{5,6}$ （ γC , γD ）、 $\gamma_{1,4}$ 、 $\gamma_{2,3}$ 和伴侣蛋白 αA_2 及 αB_2 。水溶性晶体蛋白的质和量的改变，直接影响晶体的透光性以及白内障的形成。

因此，维持晶状体的透光性，一方面，需保持晶状体中足够的水溶性蛋白的量，这主要取决于机体内部晶体蛋白的基因不遭受突变，能够实施正常表达即可，如需要某种晶体蛋白进行高表达或低表达，则可采用基因工程方法，激活或抑制相应的基因；另一方面，需要尽力遏制、减缓晶体蛋白由水溶性蛋白向水不溶性蛋白的转变。

晶体的透光性不仅需要足够量的水溶性成份来维持，而且还需要考虑晶状体的特殊代谢方式：晶体蛋白自生成之日起，不断被后生成的晶体蛋白向晶体的核心部挤压，并储存在不同的晶体结构层。因此，无论水溶性蛋白组分还是水不溶性组分，均无法代谢到体外。不过水溶性成份的积累有助于构建晶体从内到外层的正常结构；而水不溶性成份的渐次积累，则会逐渐增大晶体的光散射，不利于透光性，也就是说，它是老年性白内障形成的物质基础。

哺乳动物自出生后，由于晶体暴露在外，易受体内外多种因素的影响而发生变异。综合文献相关晶体蛋白的结构特点，研究发现影响其蛋白结构的主要因素为翻译后修饰（posttranslational modification，简称：PTM），即许多晶体蛋白在翻译后可通过酶的催化或在酶控制下反应而发生的修饰，其主要包括糖基化、氧化、氨甲酰化、磷酸化、乙酰化、羟基化、脱酰胺、消旋和切除作用等。晶状体蛋白质周围存在许多活性分子，包括糖、来源于尿中的氰酸盐、糖皮质激素和具有活性的其他代谢产物等，这些均可在非酶环境下攻击蛋白质。

3、白内障的治疗现状

白内障是世界性致盲性疾病。临床诊疗方面，目前对于白内障的唯一有效治疗手段是外科手术。尽管白内障手术已日臻完善，但不可避免的手术并发症和社会经济问题仍十分严重，如手术后数年内后发性白内障、继发性青光眼或角膜损伤等发生率较高，通常难以根除。

寻找有效的预防和药物治疗方法，早期控制白内障，仍然是该领域的研究热点。预防和药物治疗白内障主要有两种途径，即减少白内障发病的危险因素和应用抗白内障药物。

与白内障发病相关的主要危险因素有糖尿病、青光眼、近视、长期应用皮质类固醇、严重腹泻、紫外线辐射、大量饮酒和吸烟等。Taylor 等总结为 6 个“D”，即阳光辐射、饮

食、药物、糖尿病、脱水和原因不明。减少这些可能的危险因素是一种积极的预防手段。

在药物应用方面，现已研制出数十种药物用于临床，用于维持晶体的透光性延缓或治疗白内障。由于缺乏对于白内障生成机理的完善依据，研制并仍在使用的诸多药物，仍存在不少的缺陷，例如有效率较低、针对性差等。因此，虽然名目繁多的抗白内障药物在各国广泛应用，但是尚存在很多问题。白内障的药物治疗仍然面临着严峻的挑战：尽管有数十种抗白内障药物已被广泛临床使用，但证明其有效性的直接证据甚少。

由于白内障的发生是各种因素综合的结果，其发病原因还没有定论。当前，各科研组织多是针对某一发病因素，或是对抗发病过程中眼的某些生理生化变化进行抗白内障药物的研究开发。如今已经用于白内障治疗的药物主要有以下几类：

①醛糖还原酶抑制剂(ARIS)是第一类被系统地研究并进行临床实验的抗白内障药物，使用该药物是基于 1962 年提出的渗透压学说和早期糖尿病性大鼠晶状体以及高糖孵育环境下，晶状体中大量的山梨醇沉积的证据。

代表药物有卡他林(Catalin)和法可立辛(Phacolysin)，通过抑制晶状体中多元醇的积累，起到缓解糖性白内障的作用，同时二者与晶体蛋白的结合力都很强，可保护晶体蛋白不受因色氨酸代谢异常而产生的醌亚氨酸的损伤；但临床应用及实验室验证表明，ARIS 治疗糖性白内障并非有效，而且 ARIS 的副作用严重，其药物机制“名不符实”。

②针对白内障发生的自由基氧化学说而开发的抗氧化药物抗氧化的药物品种很多，包括谷胱甘肽、牛磺酸、维生素 E、维生素 C、β 胡萝卜素，以及带有还原性巯基的各类化合物等。

谷胱甘肽和药物前体：随着老化和白内障的形成，晶状体中谷胱甘肽的水平降低，故增加谷胱甘肽会有益于治疗白内障。谷胱甘肽是一种三肽(γ 谷氨酰胺、半胱氨酸、氨基乙酸)，它在晶状体中的水平将会被三肽自身、或者一种药物前体如酯、或者被氨基酸组分激活。谷胱甘肽可抑制糖基化。许多实验采用谷胱甘肽的酯和它的二肽前体，抑制各种实验性白内障的形成，但一般要比诱发白内障的因子同时或提前使用，可能的原因是简单地减少诱发因子的攻击或影响该因子的吸收。例如，谷胱甘肽单异丙基酯或提前一小时应用谷胱甘肽和 γ 谷氨酰胺 半胱氨酸酯，可抑制 Buthionine Sulphonimine 诱导的白内障的发生；较亚硒酸钠提前 30 分钟应用谷胱甘肽和单异丙基酯，可减少硒性白内障的发生；在 X 射线辐射大鼠前注射半胱氨酸、硫脲、谷胱甘肽和半胱胺可减少辐射的副作用；X 射线辐射大鼠一天后，谷胱甘肽单异丙基酯能保护 X 射线辐射诱导的白内障形成。

半胱氨酸是谷胱甘肽限制性底物，故使用半胱氨酸(或药物前体)可抑制白内障，如果能减少巯基或双巯基团，双硫化合物是较好的抗白内障药物。但目前临床试验甚少。

牛磺酸：牛磺酸可抑制半乳糖性白内障，阻止晶状体蛋白的糖基化和氧化。若饮食中

增加牛磺酸替代品，可减少由于晶状体细胞的损害导致的 γ 晶体蛋白向玻璃体的渗漏，被认为是一种较好的抗氧化剂和抗白内障药物。

牛磺酸是一种磺基氨基酸，在人体中大量存在，其具有抗氧化作用，能保护细胞和组织免受氧化损伤。晶状体具有蓄积牛磺酸的能力，在晶状体中牛磺酸约占非蛋白质水解氨基酸的50%，是晶状体中重要的氨基酸。随着白内障病程的发展，晶状体中牛磺酸的含量显著降低。国内外的一些研究小组近年来进行了一系列系统研究，发现牛磺酸对亚硒酸钠性白内障的抑制作用与其抗氧化特性有关，而牛磺酸能够预防或延缓糖尿病性白内障的作用机制主要为：抗氧化作用；膜稳定作用；降血糖作用；渗透压调节作用。牛磺酸的抗氧化作用和渗透压调节作用对白内障的防治具有一定的可行性。

由美国国家眼科研究所资助的大规模年龄相关性眼病研究（简称：AREDS），对5000例进行为期5~10年的随访调查，目的是揭示大剂量抗氧化剂和锌添加剂的摄入对年龄相关性眼病包括白内障的防治作用。最近的报道对年龄55~80岁的3640例，长期服用维生素类药物的情况进行调查，平均随访6.3年，结果建议55岁以上有可疑年龄相关性黄斑变性，应服用抗氧化剂，如维生素C、维生素E、 β 胡萝卜素和锌，但大量摄入营养仅可提供很有限的抗白内障作用。

抗氧化剂越来越多的试验证实了，在白内障发生发展中，氧化损伤作用是各个层次上生理生化变化的枢纽，所以对各种抗氧化剂的研究成为抗白内障药物开发的焦点。日本学者研究了一系列还原性硫醇衍生物，发现它们可与游离基快速反应，阻断谷胱甘肽被氧化，恢复晶状体的正常状态。其中，双硫伦（Disulfiram，简称：DSF）是这类药物中具有较高活性的一种前体药物，脂溶性的DSF透过角膜上皮后，可以转化为其单体二乙二硫氨基甲酸（Diethyldithiocarbamateacid，简称：DDC）发挥抗白内障作用，对于急性硒性大鼠白内障模型具有明显的延缓白内障发生发展的作用，并能减轻氧化造成的损伤。

但是，单纯应用维生素类对于抗氧化剂的预防和治疗白内障的作用有限，临床资料缺乏可比性。

③针对因眼组织能量新陈代谢失调，特别是制造不足而导致的白内障而开发的能量补充剂，主要含有维生素B₁、B₂、B₆、烟酰胺、腺嘌呤核苷、琥珀酸、遍多酸、维生素C、维生素E、ATP、儿茶酚、细胞色素C等成分。

④针对钙离子过多引起的白内障而应用于白内障治疗的Ca离子拮抗剂维拉帕米，能够阻断细胞钙离子的内流，降低白内障眼组织中的钙离子的浓度。

⑤针对Mallard反应为发病机理的药物，如布洛芬、DETAPAC等。

⑥中草药制剂，如八味地黄丸、珍珠明目液及雪叶莲挤压汁和美国金缕梅的浸出液等；

⑦氨基酸制剂Phakan，含有谷氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、精氨酸、肌醇、盐酸吡哆醛

等。

⑧阿司匹林

阿司匹林是二十世纪最伟大的发明之一，作为治疗药物不断有新的用途出现。研究表明，阿司匹林也具有抗白内障的作用。通过动物实验研究阿司匹林的作用机理，认为阿司匹林抗白内障机制有4种：(A)抑制非酶性蛋白质糖基化，即阿司匹林与晶体蛋白中赖氨酸残基结合，阻止葡萄糖与赖氨酸的非酶性糖基化反应，并可防止晶体蛋白聚合物形成；

(B)抑制晶体蛋白的氨基甲酰化，阿司匹林的乙酰基与晶体蛋白的氨基酸基团结合，阻断了氨基酸残基甲酰化反应，使蛋白分子表面的正常电荷配布免遭破坏，从而维持了晶体蛋白的正常结构；(C)抑制脂质过氧化，阿司匹林的乙酰基可优先夺取晶体蛋白的活性氨基位点，避免了脂质过氧化给晶体带来的损害；(D)阿司匹林通过抑制膜上的环氧化酶使晶体细胞膜上的钙通道失活，从而防止晶体蛋白多肽链的聚合反应。

阿司匹林类药物廉价方便，副作用较少，有潜在的治疗老年性白内障的临床应用价值，但该药物适应症甚广，有部分病人对该药有依赖性，长期较大剂量的口服亦会有副作用，如临床个案发现，长期大剂量应用阿司匹林会导致胃出血。

⑨糖基化抑制剂

蛋白质糖基化学说—糖基化反应。此学说的核心是还原糖醛基与蛋白质中自由氨基（赖氨酸或精氨酸的 NH_2 或蛋白质分子的N端游离的 -NH_2 ）发生非酶性糖基化反应（Maillard反应），生成含Schiff氏碱基对的中间产物，在经过一系列缓慢的Amadori结构重排后，形成有酮胺结构特征的各种Amadori产物，再经脱水和分子重排后，最终形成有荧光和蛋白质交联特性的各种糖基化终产物（简称：AGE）。

糖基化抑制剂——氨基胍：氨基胍（aminoguanidine）是一种亲核胍的衍生物，70年代认为可抑制糖基化末端产物的形成以及抑制二胺氧化酶、一氧化氮合成酶和过氧化氢酶活性。近年的研究表明，氨基胍、1,3—二氨基胍和甲基氨基胍可抑制醛糖还原酶。但在半乳糖性白内障模型中，这3种化合物并无醛糖还原酶抑制剂的作用。氨基胍是糖基化抑制剂，被用于糖尿病并发症的治疗，包括白内障，它能够与糖基化的化合物结合，在糖基化各个时期抑制早期和晚期糖基化产物。氨基胍可抑制轻度糖尿病性大鼠晶状体的混浊，可降低链脲佐菌素诱导糖尿病大鼠主动脉、肾小球和肾小管血液中荧光值，减少尿中白蛋白的分泌，但不能降低肾皮质已升高的山梨醇水平。氨基胍的主要作用是抑制糖基化，而不是改变生物化学过程。氨基胍还可抑制钙依赖的Calpain（内肽酶）蛋白水解酶介导的晶状体蛋白质的水解，阻止遗传性Shumiya大鼠白内障。该药物已用于临床试验，其衍生物和清除糖基化交联因子正在研究中。

⑩Calpain 抑制剂

硒性白内障是快速、有效和重复性良好的白内障模型，已广泛应用于白内障发病机制和评价抗白内障药物的研究。蛋白质水解酶诱导的晶体蛋白的切除作用，特别是钙依赖的 Calpain 蛋白水解酶 LP82 和 M Calpain 的激活，在该白内障发病中起重要作用。Calpain 蛋白水解酶抑制剂 E64 可延迟大鼠硒性白内障的形成，但必须在亚硒酸钠应用前；E64 在离体孵育晶状体中可抑制晶状体的混浊，其它还包括 E64D 和 SJ A6017 等。但重要的问题是在白内障晶状体中尚未发现 Calpain 诱导的局部晶体蛋白的水解。钙依赖的 Calpain 蛋白水解酶在幼鼠晶状体中的含量远远超过了人的含量，所以它与人白内障的发病存在不同的机制。Calpain 抑制剂主要是实验室研究结果，尚无临床资料。

糖基化抑制剂、谷胱甘肽和药物前体、相分离抑制剂和 Calpain 抑制剂等的研究虽有较大进展，但仍需要临床研究的进一步验证。此外，还有许多有希望成为抗白内障的药物正在开发和研制中。

4、白内障治疗药物研究的发展趋势

白内障的发生是多因素共同作用而导致的综合结果，其病理变化是多水平多层次的。随着研究手段的不断提高，对白内障发病机理的研究也将日益深入，同时对治疗白内障药物的开发针对性也就越强。理想的白内障治疗药物应该能够恢复晶体的正常代谢和促进晶体混浊的吸收，但至今为止尚无一个药能够达到上述要求，尽管如此，任何有希望的抑制白内障发病的措施都显示出研究的价值，而世界医学的传统宝库还有待我们去开发。

现临床上多种用于治疗白内障的药物，由于缺乏对于白内障生成机理的完善依据，使仍在广泛使用的诸多药物存在不少缺陷：有些效率较低、针对性差，有些还有较大的副作用。为此，亟待进一步探明白内障发病机理、找出影响晶体透光性的易感蛋白，作为治疗和预防白内障的有效靶点，设计有针对性的药物，以达延缓晶体老化和预防、治疗白内障的目的。

（二）二硫苏糖醇的研究概况

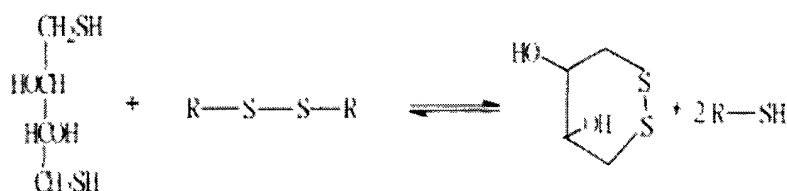
二硫苏糖醇（dithiothreitol，简称：DTT，分子量 154），全称：1，4-二巯基-DL-苏糖醇（1,4- dithio- DL-threitol）。

二硫苏糖醇为白色针状结晶，微吸潮，易溶于水、乙醇、丙酮、乙酸乙酯、氯仿和乙醚；在 37℃、0.67Pa 时能升华；熔点 43~43℃，沸点 125~130℃（0.27kPa）；在空气中缓慢氧化。二硫苏糖醇一般以玻管瓶密封包装，4℃干燥保存。

二硫苏糖醇是常用还原剂，可还原蛋白内及蛋白分子间的二硫键，目前一般作为蛋白质巯基保护剂，用于蛋白质二硫键的裂解和顺序分析。

例如，针对胱氨酸中的二硫键，后者在维持蛋白质分子的正常构象中起着重要作用，并在稳定蛋白质的构象上起很大的作用；破坏蛋白质的二硫键，一般都会使其三维结构松

散及生物活性减弱或丧失。氧化剂和还原剂都可打开二硫键。使用还原剂如巯基化合物 (R-SH) 也能打开二硫键, 生成半胱氨酸残基及相应的二硫化物: 这里常使用的还原剂有巯基乙醇 (mercaptoethanol), 二硫苏糖醇 (dithiothreitol, 缩写为 DTT) 等, 其中最有用的是二硫苏糖醇及其异构体二硫赤藓糖醇 (dithioerythritol)。反应中, 二硫苏糖醇形成一个含分子内二硫键的稳定六元环, 因此平衡向右方移动。反应如下:



三氧化二砷 (arsenic trioxide, As_2O_3) 是中药吡霜的主要有效成分, 具有强烈的毒性, 应用三氧化二砷治疗白血病的研究成果, 被称是中国医生对世界血液学研究的一大贡献。该药对肿瘤细胞有诱导分化和促进凋亡作用, 研究表明, 加入巯基保护剂二硫苏糖醇等可抑制其诱导细胞凋亡的作用。

有报道称, 不同浓度二硫苏糖醇对急性运动小鼠心、肝、肾组织脂质过氧化水平均有影响: 不同浓度二硫苏糖醇均具有抗脂质过氧化作用, 但不同浓度 DTT 对不同组织在不同时期的脂质过氧化水平影响不同。

经文献检索等, 迄今为止, 尚未发现有依据白内障生成机理, 而确定新的较好的靶蛋白, 也未见 DTT 对于晶体蛋白功能的研究报道, 同时未发现有以该新发现的靶蛋白为靶点、应用效果较好的活性成分或产品用于预防、诊断、检测、保护、治疗和研究白内障及其相关疾病方面的报道。

发明内容

本发明所需要解决的技术问题是公开了一种用于抗白内障的靶蛋白, 以及其用途, 即以该靶蛋白为靶点设计或寻找出合适的活性化合物或者组合物, 以克服现有技术存在的上述缺陷。

也就是说, 本发明意在探索晶体蛋白变性规律、明确白内障的生成机理, 寻求能够用于抗白内障的靶蛋白, 进而以该靶蛋白为目标, 制备相关的抗白内障产品。

所述的抗白内障是指预防、诊断、检测、保护、治疗和研究晶体蛋白变性及其相关疾病或白内障及其相关疾病, 所述的白内障及其相关疾病包括各类白内障疾病及其相关疾病, 优选老年性白内障 (包括皮质性白内障、核性白内障和囊性白内障等中的一种或多种) 及其相关疾病, 进一步优选皮质性白内障及其相关疾病。

所述的抗白内障产品是指用于预防、诊断、检测、保护、治疗和研究晶体蛋白变性及

其相关疾病或白内障及其相关疾病的产品，是包括相应的以 βB_2 为靶蛋白的药物、试剂或者食品等中的一种或多种，优选相应的以 βB_2 为靶蛋白的药物。

(一) 技术构思

自主开发创新药物是中国目前的一项紧迫任务，中国医药学具有悠久的历史，在预防和治疗疾病方面也积累了丰富的经验，因此寻找有效的活性成分或者其组合物是一条有效的途径，也是中国创新药物研制的优势之所在。

在白内障疾病的病因学研究方面，特别是以往在有关晶体蛋白受不同外界因素影响的研究方面，对晶体蛋白发生质和量的改变，大多不作细分，如宏观描述 β 晶体蛋白。但是，发明人认为，晶体蛋白随老化进程，不同组分应该有不同的表达趋势、消长规律不一，不细分落实到具体蛋白，则难以定向研究各自晶体蛋白的特性。

晶状体的老化是一种不可避免的自然生理进程，即随着年龄的增长，晶状体逐渐老化。但是，我们仍然可以通过探讨老年性白内障的形成机理，采用合理的控制方法或治疗手段，延缓晶状体的老化进程。有关白内障的病因学研究，尚远远滞后于临床需要。

本发明就是通过对白内障疾病的系统研究，特别是通过研究晶状体各主要晶体蛋白随老化进程的时相性改变研究，即晶体蛋白的水溶性及水不溶性组分随机体老化的时相性改变，发现了晶体蛋白溶解性的变化规律，即晶体蛋白水溶性及水不溶性组分的消长变化规律，着重探讨在此过程中特殊晶体蛋白的表达及其生理、生化特性，筛选可致晶状体变性及诱发老年性白内障的易感蛋白，确定能够用于抗白内障的靶蛋白；研究该靶蛋白对晶状体老化及诱发老年性白内障发生的作用机理，正确判断老化的进程，为探索稳定晶体蛋白正常结构及透光性的有效措施，并据此设计合理的抗靶蛋白变性的产品奠定理论和物质基础，从而实现延缓晶体老化及白内障特别是老年性白内障发生的目标。

(二) 确定能够用于抗白内障的靶蛋白的理论设想与研究基础

1、概述

晶状体的功能是将光线聚焦到视网膜上产生视觉。晶状体的主要成分是水 and 蛋白质，它的透明度是由恒定的水分含量、高浓度的水溶性蛋白质以及晶体蛋白的正确结构和复杂的新陈代谢来保持的。晶状体干重的 80%~90% 是蛋白质，每种蛋白质的结构和它们彼此之间的相互作用是维持晶状体透明性的分子基础。 α 族晶体蛋白具有特殊的分子伴侣 (Molecular Chaperone) 作用，对于维持晶状体的正常结构起着关键作用；另外以 βB_2 为代表的高含量的晶体结构蛋白亦对晶状体的结构及其正常透光性起着举足轻重的作用。

所谓分子伴侣，是指一类能够介导其它蛋白质的正确折叠和装配，以保护该蛋白质的活性，但它本身却不是有功能的最终装配产物的组成成分。但是， α 族晶体蛋白是一种特殊的具有分子伴侣作用的蛋白，它不仅具有分子伴侣活性，而且也是晶体中最重要的结构

蛋白之一。

α 族晶体蛋白的含量在老化过程中变化趋势，直接影响其分子伴侣活性的改变；随着老化进程，通常 α 族晶体蛋白分子伴侣作用减弱，而在白内障晶体中，则显现大量 α 族晶体蛋白转变为非水溶性的高分子量交联聚合物。

本发明根据前期的研究结果，努力筛选出晶体中最易遭受变性影响的晶体蛋白组分为靶蛋白，可以根据靶蛋白的结构特点，进一步设计保护性产品，以达延缓晶体老化及预防、治疗老化性白内障的目的。

本发明根据晶体蛋白的时相改变，发现了表达特殊及分布特殊的晶体蛋白 βB_2 随机体老化进程的变化规律，即水溶性 $\beta B_2/\alpha A_2$ 数值在大鼠老化进程中呈现渐进性升高，水不溶性 $\beta B_2/\alpha A_2$ 数值亦随大鼠老化进程而升高，但升高的幅度不及水溶性成分。寻找那些含量大，且对于外界因素更为敏感的晶体蛋白作为靶蛋白；也就是说，抑制 βB_2 晶体蛋白由水溶性向水不溶性的转变是延缓、治疗老年性白内障的有效途径，即确定了 βB_2 是更为合适的靶蛋白。

本发明从该靶蛋白的生物化学结构特征着手，研究物理、化学等因素诱导晶体蛋白变性的机理；并据此研制抗靶蛋白变性的化合物，此化合物可作为能够保护晶体蛋白不受或少受促变异影响的外用药物；该化合物能够采用脂质体作为晶体角膜的导入体；并先期用于硒（亚硒酸钠 Na_2SeO_3 ）诱导的 SD 大鼠白内障模型，模拟老年性白内障的病理变化，裂隙灯每日观察、记录晶体透光性改变进程，观察疗效；进而探讨临床应用的前景，期望该化合物能够对于延缓和治疗老年性白内障，尤其针对大部分初发期的老年性白内障治疗产生积极影响。

根据文献检索、实验研究和临床实践，发明人发现由针对该靶蛋白的化合物及其组合物制备的抗白内障产品具有显著的效果。

2、实验结果

（1）晶体蛋白中 βB_2 相对含量最高； αA_2 、 αB_2 则是晶体中两种重要的伴侣蛋白（Chaperone）。

（2）通常赖氨酸基团（简称：Lys）是最易遭受糖基化修饰的部位，蛋白所含 Lys 的多少，与糖基化的易感性有密切联系；而半胱氨酸（简称：Cys）则是遭受氧化修饰的敏感部位，所含 Cys 数目，亦与氧化修饰的易感性有密切联系。

（3）蛋氨酸（简称：Met）及丝氨酸（简称：Ser）基团也是容易遭受氧化修饰的部位，规律性不及 Lys。

3、含量较高的大鼠晶体蛋白氨基酸组成分析

见：表 1。

表 1、大鼠主要水溶性晶体蛋白氨基酸组成分析

晶体蛋白	Cys 数量	Cys 含量	Lys 数量	Lys 含量	Met 数量	Met 含量	Ser 数量	Ser 含量	总氨基酸数量
βB_2	2	0.98	13	6.34	4	1.95	19	9.27	205
αA	1	0.58	7	4.05	2	1.16	23	13.29	173
αB	0	0	10	5.71	3	1.71	17	9.71	175
βA_2	7	3.55	5	2.54	2	1.02	21	10.66	197
βA_3	8	4.52	7	3.95	4	2.26	15	8.47	177
βB_1	4	1.61	8	3.21	6	2.41	17	6.83	249
βB_3	3	1.42	9	4.27	2	0.95	17	8.06	211
βA_1	8	4.04	8	4.04	7	3.54	16	8.08	198
γD	7	4.02	1	0.57	7	4.02	12	6.9	174
γC	9	5.17	4	2.3	7	4.02	15	8.62	174

4. βB_2 蛋白表达特性（变化规律）

（1）大鼠主要水溶性晶体蛋白随老化进程呈时相性改变

①时相性改变：伴随大鼠老化进程，18 种主要晶体蛋白组分，其中 7 种蛋白的相对含量呈现明显时相改变：

- （A）晶体蛋白相对含量呈升高趋势的有 βB_2 、 αB_2 、 αA_2 ；
- （B）呈降低趋势的有 β_7 （ β_1 ）、 β_8 、 $\gamma_{2,3}$ 、 $\gamma_{5,6}$ （ γC ， γD ）；
- （C）大致保持稳定的主要有 βA_1 、 βA_3 、 βB_5 ；
- （D）其它主要晶体蛋白改变规律性不强。

②主要晶体蛋白定量分析结果：

- （A） βB_2 相对含量随老化呈年龄依赖性升高（ $r=0.938$, $p<0.01$ ）。
- （B）伴侣蛋白 αA_2 及 αB_2 相对含量随老化呈渐进性升高（ $r=0.890$, $p<0.05$ ； $r=0.930$, $p<0.01$ ）。
- （C） βB_2 相对含量随晶体老化的变化趋势与伴侣蛋白 αA_2 及 αB_2 呈显著正相关（ $r=0.949$, $p<0.01$ ； $r=0.986$, $p<0.01$ ）。
- （D） $\beta B_2/\alpha A_2$ 比值（ $n=10$ ）在大鼠老化进程中呈渐进性升高。

③主要晶体蛋白定性分析结果：

- （A）各年龄组大鼠水溶性蛋白 RQ 值大致持平。
- （B）晶体蛋白的翻译后修饰自大鼠出生 8 周后，便已明显可见。
- （C）进入中老年后，水溶性 γ 组分大量丢失。

研究结果启示， βB_2 相对含量随老化呈“反常”年龄依赖性升高的现象，该结果不同于以往 β 族蛋白水溶性成份随老化逐渐下降的观点。

（2）大鼠主要非水溶性晶体蛋白随老化进程呈时相性改变

①尿溶晶体蛋白 βB_2 随老化进程均呈渐进性升高；而主要伴侣蛋白组分 αA_2 的相对含量则大致保持稳定。

② αA_2 、 βB_2 尿溶性成分随老化变化幅度不及水溶性成份中明显。

③尿溶性晶体蛋白 αA_2 的翻译后修饰产物 αA_1 自大鼠 8 周龄起，呈极显著增加。

④ αB_2 的翻译后修饰产物 αB_1 ，自大鼠 8 周龄起亦呈显著增加。

⑤ βB_2 自大鼠 8 周龄起出现明显降解产物，表现在 βB_2 蛋白点下方出现多个蛋白点，且增长幅度远大于在水溶性中的表现。

⑥ γ 组分进入老龄后，有较明显的下降趋势。

研究结果表明， βB_2 组分在非水溶性（或称：尿素溶，简称：WIP）成分中，亦呈现大幅升高趋势。

但是， βB_2 的两种升高趋势，对于晶体蛋白的透光性却具有截然不同的作用：前者水溶性成份的升高，有助于维持晶体的正常结构和良好的透光性；而后者非水溶性成分的升高则是一种有害因素的积累，晶体中此种 WIP 含量的渐次积累，是影响晶体透光性和诱发老年性白内障的主要途径。

5、上述蛋白表达特性的意义

（1）晶体蛋白随机体老化进程，受外界因素影响，其晶体蛋白将在水溶性与水不溶性之间发生重新分布：某些蛋白无论在水溶性还是在水不溶性组分，均呈现高水平（ βB_2 、 αA_2 、 αB_2 ），但在两相中升高幅度不尽一致；而有些蛋白则随老化大量从水溶性转变为水不溶性（ βB_2 之外的其他 βL 组分、 βL 及 γ 族）。

（2）综合晶体蛋白在水溶性及尿溶性组分中的分布结果，可见 βB_2 同 β 族其他组分，尤其是 βL 组分（ βA_2 ， βA_3 ， βB_3 ）有明显不同：①水溶性组分中，进入中老年后（大鼠 8 个月~1.5 年），除 βB_2 及 βA_1 外，其余组分均呈下降；②而在尿溶部分，几乎所有 βL 组分，均在 8 周后呈大幅升高趋势，反映了 βL 族成分随老化进程，易受外界因素影响，大量成分由水溶性变为水不溶性。

（3） βB_2 晶体蛋白作为晶体中相对含量最大的组分之一，即可在水溶性组分高水平，又能够以更快的幅度转化为水不溶性的成分，强烈提示控制该蛋白由水溶性向水不溶性的转变，将是影响晶体结构及透光性的决定因素之一。

（4）自大鼠 8 周龄起，“伴侣蛋白” αA_2 、结构蛋白 βB_2 及其两种伴侣蛋白的翻译后修饰产物 αA_1 和 αB_1 均显著升高，突出反映了大鼠进入成年期后，水不溶性晶体蛋白的分布发生明显的量变和质变；亦提示进入成熟期后，晶体遭受内部及外界负面影响的机率增大，晶体蛋白变性程度增加；进入老年阶段后，甚至会出现剧增现象。因此，应尽早注意采取合适的措施，保护晶体蛋白少受变性影响。

(三) 靶蛋白的确定

根据大鼠 βB_2 随老化进程的变化规律, 即水溶性 $\beta B_2/\alpha A_2$ 数值在大鼠老化进程中呈现渐进性升高, 水不溶性 $\beta B_2/\alpha A_2$ 数值亦随大鼠老化进程而升高, 但升高的幅度不及水溶性成分的规律, 就可以确定 βB_2 能够作为控制、延缓晶状体自然老化及老年性白内障发生的有效靶蛋白。

1、 α 族晶体蛋白具有分子伴侣蛋白作用: α 族晶体蛋白对于维持其他晶体蛋白的稳定性具有积极作用 (Bloemendal H, de Jong W, Jaenicke R, et al. Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins. *Prog Biophys Mol Biol*. 2004 Nov; 86(3): 407-485 和 Augusteyn RC. alpha-crystallin: a review of its structure and function. *Clin Exp Optom*. 2004 Nov; 87(6): 356-366); 遭受翻译后修饰的 α 族晶体蛋白的分子伴侣作用会大大下降 (Bloemendal H, de Jong W, Jaenicke R, et al. Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins. *Prog Biophys Mol Biol*. 2004 Nov; 86(3): 407-485 和 Hook DW, Harding JJ. The effect of modification of alpha-crystallin by prednisolone-21-hemisuccinate and fructose 6-phosphate on chaperone activity. *Dev Ophthalmol*. 2002; 35: 150-160)。有文献报道: 晶体蛋白遭受糖基化修饰的难易顺序依次为: $\alpha > \beta > \gamma$ (van Boekel MA, Hoenders HJ. Glycation of crystallins in lenses from aging and diabetic individuals. *FEBS Lett*. 1992 Dec 7; 314(1): 1-4 和 Swamy MS, Abraham A, Abraham EC. Glycation of human lens proteins: preferential glycation of alpha A subunits. *Exp Eye Res*. 1992 Mar; 54(3): 337-345), 其主要原因之一, 在于 αA 、 αB 分别含有较多的赖氨酸 (简称: Lys) 残基 (分别为 7 个、10 个, 表 1)。通常大多数活化的 Lys 基团是糖基化的攻击目标 (Ahmed N, Thornalley PJ, Dawczynski J, et al. Methylglyoxal-derived hydroimidazolone advanced glycation end-products of human lens proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003 Dec; 44(12): 5287-5292 和 Biemel KM, Friedl DA, Lederer MO. Identification and quantification of major maillard cross-links in human serum albumin and lens protein. Evidence for glucosepane as the dominant compound. *J Biol Chem*. 2002 Jul 12; 277(28): 24907-24915); 糖基化修饰使天然蛋白变性, 高级结构被破坏, 易发生聚合, 使 α 族的分子伴侣降低; 但是, αA 、 αB 晶体蛋白的最大优势在于含有最少量的半胱氨酸 (简称: Cys) 基团 (分别含 1 个, 0 个 Cys; Cys 含有极易被氧化的巯基), 不被氧化形成分子内二硫键。此外, α 族晶体蛋白作为分子伴侣蛋白, 大量用于与非天然 β 及 γ 晶体蛋白的结合 (Bloemendal H, de Jong W, Jaenicke R, et al. Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins. *Prog Biophys Mol Biol*. 2004 Nov; 86(3): 407-485), 有利于维持后两种晶体蛋白一定程度分子聚合物的水溶性。因此, 有文献建议将 α 族晶体蛋白作为白内障, 尤其是皮质性白内障 (老年性白内障的主要类型之一) 治疗的靶蛋白 (Bloemendal H, de Jong W, Jaenicke R, et al. Ageing and vision: structure, stability and function

of lens crystallins. *Prog Biophys Mol Biol*. 2004 Nov; 86(3): 407-485)。

2、现有文献大多提示： γ 族晶体蛋白在晶状体中主要作用，是以所谓惰性充填物的形式，维持晶状体的坚实、椭圆形的基本形状 (Bloemendal H, de Jong W, Jaenicke R, et al. Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins. *Prog Biophys Mol Biol*. 2004 Nov; 86(3): 407-485 和 Norledge BV, Hay RE, Bateman OA, et al. Towards a molecular understanding of phase separation in the lens: a comparison of the X-ray structures of two high Tc gamma-crystallins, gammaE and gammaF, with two low Tc gamma-crystallins, gammaB and gammaD. *Exp Eye Res*. 1997 Nov; 65(5): 609-630)，以及维持晶体蛋白的短程有序结构、保持晶状体的透光性 (Bloemendal H, de Jong W, Jaenicke R, et al. Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins. *Prog Biophys Mol Biol*. 2004 Nov; 86(3): 407-485 和 Basak A, Bateman O, Slingsby C, et al. High-resolution X-ray crystal structures of human gammaD crystallin (1.25 Å) and the R58H mutant (1.15 Å) associated with aculeiform cataract. *J Mol Biol*. 2003 May 16; 328(5): 1137-1147)；具有较强的抗热变性及其他修饰的能力；在水溶性成份中常以单体形式存在 (Bloemendal H, de Jong W, Jaenicke R, et al. Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins. *Prog Biophys Mol Biol*. 2004 Nov; 86(3): 407-485)，而非 α 及 β 族晶体蛋白所表现的多聚体甚至高聚体形式存在；在几种白内障病理条件下， γ 族晶体蛋白常表现为选择性渗出 (Cenedella RJ, Augusteyn RC. On the composition and origin of the urea-soluble polypeptides of the U18666A cataract. *Curr Eye Res*. 1990 Sep; 9(9): 805-818) 或合成减少 (Ueda Y, Duncan MK, David LL. Lens proteomics: the accumulation of crystallin modifications in the mouse lens with age. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002 Jan; 43(1): 205-215)，而不是以水不溶性成分沉积于晶状体中。

3、 βB_2 作为 β 族中的特殊成分，具有诸多特性：一方面含量最高 (Bloemendal H, de Jong W, Jaenicke R, et al. Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins. *Prog Biophys Mol Biol*. 2004 Nov; 86(3): 407-485 以及：李闻捷, Joseph-Fu SC. 大鼠主要水溶性晶体蛋白在老化进程中的时相变化[J]. *中国病理生理杂志*, 2004, 20 (1): 22-26)；另一方面，无论在水溶性或水不溶性成份中，均保持高浓度；此外， βB_2 晶体蛋白含有最多的赖氨酸残基(简称: Lys, 13 个, 见: 表 1)，容易遭受糖基化修饰 (Ahmed N, Thornalley PJ, Dawczynski J, et al. Methylglyoxal-derived hydroimidazolone advanced glycation end-products of human lens proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003 Dec; 44(12): 5287-5292 和 Biemel KM, Friedl DA, Lederer MO. Identification and quantification of major maillard cross-links in human serum albumin and lens protein. Evidence for glucosepane as the dominant compound. *J Biol Chem*. 2002 Jul 12; 277(28): 24907-24915)，蛋白所含 Lys 的多少，与糖基化的易感性有密切联系；同时， βB_2 晶体蛋白分子结构含有 2 个半胱氨酸 (简称: Cys, 见: 表 1)，而 Cys 则是遭受氧化修饰的敏感部位 (Chen SJ, Sun TX, Akhtar NJ, et al. Oxidation of human lens

recombinant alphaA-crystallin and cysteine-deficient mutants. J Mol Biol. 2001 Jan 26; 305(4): 969-976 和 Hanson SR, Chen AA, Smith JB, et al. Thiolation of the gammaB-crystallins in intact bovine lens exposed to hydrogen peroxide. J Biol Chem. 1999 Feb 19; 274(8): 4735-4742), 所含 Cys 数目, 亦与氧化修饰的易感性有密切联系。在一定条件下, Cys 可被氧化形成分子内二硫键, 或与其他 β 族成分交换亚基, 形成杂合二聚体及分子间二硫键 (Bloemendal H, de Jong W, Jaenicke R, et al. Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins. Prog Biophys Mol Biol. 2004 Nov; 86(3): 407-485)。文献结果表明 βB_2 晶体蛋白稳定性差 ($\gamma > \alpha > \beta$) (Bloemendal H, de Jong W, Jaenicke R, et al. Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins. Prog Biophys Mol Biol. 2004 Nov; 86(3): 407-485 和 Macdonald JT, Purkiss AG, Smith MA, et al. Unfolding crystallins: The destabilizing role of a {beta}-hairpin cysteine in {beta}B2-crystallin by simulation and experiment. Protein Sci. 2005 May; 14(5): 1282-1292), 是最易遭受变性修饰的成分之一。

4、综合分析 α 、 β 、 γ 三类晶体蛋白的特征以及本发明的实验结果: 本发明得出的重要结论在于: 相对于 α 晶体蛋白 (Bloemendal H, de Jong W, Jaenicke R, et al. Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins. Prog Biophys Mol Biol. 2004 Nov; 86(3): 407-485), βB_2 是更为脆弱的晶体蛋白成分, 更加适合作为白内障尤其是老年性白内障预防、诊断、检测、研究和治疗的靶蛋白。

本发明的目的是要提供一种靶蛋白, 为白内障尤其是老年性白内障的预防、诊断、检测、保护、治疗和研究提供更有效的、更有针对性的靶点, 针对该靶蛋白能够制备出用于预防、诊断、检测、保护、治疗和研究白内障及其相关疾病的产品。

综上所述, 本发明对 βB_2 进行了理论探索和实验研究, 发现 βB_2 水平对于预防、诊断、检测、保护、治疗和研究白内障及其相关疾病具有极为重要的作用。因此, 可针对 βB_2 制备抗白内障产品, 优选药物和食品, 进一步优选以本发明的 βB_2 为靶蛋白而制备的药物。

(四) 靶蛋白的用途

本发明发现 βB_2 是预防、诊断、检测、保护、治疗和研究晶体蛋白变性及白内障特别是老年性白内障的易感蛋白, 并确定 βB_2 为靶蛋白, 还对靶蛋白 βB_2 的用途进行了进一步的、多方面的理论探讨、实验研究和产品开发, 即以该靶蛋白为靶点, 设计和寻找活性化合物或组合物, 用于制备相应的抗白内障产品。

据此寻找到新型的抗晶体蛋白变性及老年性白内障的化合物或组合物, 该化合物或组合物具有很强的临床应用前景, 能够有效延缓晶体老化, 特别适用于预防、治疗老年性白内障。

本发明经研究发现, 二硫苏糖醇是能够有效抑制 βB_2 等晶体蛋白受热变性的物质; 并且, 在已受热变性的 βB_2 晶体蛋白及其他多种蛋白溶液中, 加入适量的 DTT 溶液, 还可以

降低蛋白受热后变性程度。也就是说, DTT 的适量加入, 可以有效抑制 βB_2 晶体蛋白的受热聚集变性作用, 为抗晶体蛋白变性产品的研制, 奠定了良好基础, 并具有创新性。

从另外一个角度来看, 本发明能够采用以二硫苏糖醇为原料制备相应的抗白内障产品, 或者是能够采用以二硫苏糖醇的组合物为原料制备相应的抗白内障产品。

根据增加效果、剂型应用等实际情况的需要等, 在上述的原料中还可以进一步增加阿司匹林、赖氨酸、牛磺酸或维生素(如维生素 C、维生素 E 等)等组分中的一种或多种, 含量范围是 10%~30%, 并根据用法、用途和使用的实际需要在医药专业的许可范围内进行适当调整。

或者是采取预防为主措施: 自然老化是一项不可避免的生理过程, 我们无法阻止老化进程对于晶状体正常功能的负面影响, 晶体蛋白的明显变性修饰发生于生命周期的较早期(发生于 SD 大鼠出生后第 6~8 周(Ueda Y, Duncan MK, David LL. Lens proteomics: the accumulation of crystallin modifications in the mouse lens with age. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2002 Jan; 43(1): 205-215 以及: 李闻捷, Joseph-Fu S.-C. 晶体蛋白 βB_2 对眼晶体老化的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20(10): 1905-1907); 因此, 对于老年性白内障的治疗, 应以预防为主; 此外, 可以创造条件, 增强自我防护措施, 寻找延缓晶状体老化、维持晶状体正常功能的方法、步骤, 提早预防, 人在中年起, 即需努力关注、维护晶体蛋白少受各种变性修饰。

或者是采用药物外用的办法: 老年性白内障不同于其他机体内部器官的疾患, 晶状体透过前房房水及角膜, 极易与外界环境、物质起作用。因此, 对于老年性白内障的预防及治疗, 外用药物可以方便、直接地发挥作用; 用药量少、副作用低。

此外, 为进一步提高疗效, 还加入现有治疗白内障的单一或多种有效成分, 进行联合用药。

(五) 技术特长

本发明对白内障的预防、诊断、检测、保护、治疗和研究等方面进行了多方面的理论探讨和实验研究。

本发明通过实验研究结果, 证实蛋白变性等影响晶状体透光性的不利因素, 自成年早期便逐年增加, 故需尽早防治, 预防为主; 用药方便, 眼药水为主, 随时可用; 适应人群广泛, 包括中老年易感人群, 血糖高及糖尿病患者易罹患其他类型的白内障人群, 高原地区紫外线强烈地区居民, 易受强紫外线照射、高发皮质性白内障, 直接面对高温物品人群如炼钢炉前工等, 高热易致晶体蛋白热变性。

本发明根据有关晶体蛋白的时相改变研究结果, 发现了表达特殊及分布特殊的晶体蛋白 βB_2 随老化进程的变化规律, 选择 βB_2 作为靶蛋白, 而抑制 βB_2 晶体蛋白由水溶性向水不溶性的转变, 是延缓、治疗老年性白内障的有效途径。

本发明针对性强,通过实验研究结果,证实蛋白变性等影响晶状体透光性的不利因素,自成年的早期便逐年增加,故需以 βB_2 为主要靶蛋白,兼顾其他;并尽早防治,预防为主。

白内障疾病已成为影响中国人口生活质量的重要致病原因,本发明的靶蛋白 βB_2 是研制预防、诊断、保护和治疗白内障等方面产品特别是治疗白内障疾病药物的理论探索和物质基础,积极适应了现代健康、医疗需求,以及科研领域的工作需要和人性化服务的需要,能够产生显著的社会效益和经济效益。

同时,本发明还有针对性地深入研究二硫苏糖醇,并对二硫苏糖醇进行了优选和拓展,对二硫苏糖醇的药用用途进行开发,能够用于保护蛋白及药物载体;二硫苏糖醇以 βB_2 为主要靶蛋白,既具有晶体蛋白受热聚集变性的作用,又是有效的自由基清除剂,另外还可增加组合物的渗透能力;副作用小,外用为主;药物释放快,所需剂量小,符合预防为主的原则,目前尚无能够使晶状体代谢恢复正常和使混浊吸收的药物。

二硫苏糖醇药理作用较强,性质稳定,使用制备的制剂质量稳定,预防、诊断、检测、保护、治疗和研究白内障及其相关疾病的效果明显,故其更适于预防、诊断、检测、保护、治疗和研究白内障及其相关疾病产品的工业化生产,为预防、诊断、检测、保护、治疗和研究白内障及其相关疾病提供了一种新的药物来源。

(六) 水溶性晶体蛋白在老化进程中的变化趋势的实验研究

采用双向电泳法研究水溶性晶体蛋白在老化进程中的变化趋势,可以从宏观上检测晶体蛋白的量变规律,有助于寻找和聚焦在此过程中发生异常变化的晶体蛋白,并进而探讨其与晶体老化及其老年性白内障发生的内在关联性,为研究抗晶体蛋白变性及维持晶状体的透光性提供可靠的实验依据。

利用高精度的双向电泳分析方法,不仅可以将晶体蛋白分成 α 、 β 及 γ 三大族,还可以将每个蛋白族区别出不同的蛋白亚基或组分,大大有益于逐一探讨不同晶体蛋白的性质与功能。

故此,本发明,采用常规动物饲养及蛋白质生物化学提取方法,采集SD大鼠不同年龄段(从出生第1天至第8天,2周,8周,8个月及1.5年)的完整眼晶体;分别提取不同年龄段大鼠晶状体中的水溶性晶体蛋白;双向电泳,染色,脱色(并在实践中,研制了新型凝胶蛋白的染色、脱色方法),用扫描仪对凝胶上主要蛋白质斑点进行定量分析;并按文献编码方式命名主要晶体蛋白组分,分析其相对含量变化规律;归纳出了4种晶体蛋白的时相变化模式,并发现了 βB_2 晶体蛋白的异常高表达。

1、材料和方法

(1) 试剂:两性载体(ampholine pH3.5~10.0)购自Pharmacy公司;丙烯酰胺(acrylamide)、N,N'-甲叉双丙烯酰胺(bisacrylamide)、疏水膜(polyvinylidene difluoride,

PVDF) 及电泳蛋白标准(商品号: 161-0367) 购自 Bio-Rad 公司; 其余试剂均购自 Sigma 公司。

(2) 实验仪器: 扫描系统采用图像密度仪[Video densitometer, 应用软件为 Bio-scanner VGA(1) Camera Hi-Res2-D Scanning, (2) Hi-Res View & Process 2-D Data Zeineh, 美国]; 等电聚焦采用多用电泳仪 (Multiphor II, LKB 公司, 瑞典); SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 采用微量蛋白分析系统 (Mini Protein 3 System, Bio-Rad 公司, 美国)。

(3) 动物准备: 常规饲养出生后 1 d、8d、2 周、8 周、8 个月及 1.5 年的 SD 大鼠, 每组 (6~20) 只, 分别由美国新泽西医学及牙科大学 (UMDNJ) 动物中心及第二军医大学动物中心提供。

(4) 晶体蛋白提取缓冲液:

①晶体蛋白提取储存液: (0.4M 磷酸盐缓冲液, 1.0M NaCl, 0.2%NaN₃, PH6.8) 10.8g NaH₂PO₄, 45.64g Na₂HPO₄, 58.4g NaCl, 2.0g NaN₃, 1M EDTA, 加水至 1L。

②晶体蛋白提取应用液:

使用前用蒸馏水将储存液 1: 10 稀释, 并加入 3mM (0.21ml/L) 的 2-巯基乙醇, 和 0.025mM (4ml/L) 的 PMSF。

(5) 晶体蛋白柱层析缓冲液:

同晶体蛋白提取应用液。

(6) 等电聚焦 (IEF) 相关试剂的配制:

①电极液: 阳极为 1M H₃PO₄(85%浓磷酸 6.8mL 加蒸馏水至 100mL); 阴极为 1M NaOH (4g NaOH 加蒸馏水至 100mL)。

②固定液: 5%磺基水杨酸, 10% (或 15%) 三氯乙酸。

③上样缓冲液: 9M 尿素, 1%2-巯基乙醇。

(7) SDS-PAGE 相关试剂的配制:

①0.8%的琼脂糖: 0.8g 琼脂糖, 25mL Tris-HCl (0.5M PH6.8), 1.0ml 10%SDS, 加蒸馏水至 100mL。用前高温融化后灌胶用。

②考马斯亮兰 R-250 染色液: 10% (v/v) 乙酸, 0.025% (w/v) 考马斯亮兰 R-250, 蒸馏水定容至 1L。混合 1h 后, 用 Whatman 1 号滤纸过滤, 室温保存 (还能够改用发明人所改进的染液及脱色方法, 已发表论文)。

③5×电泳缓冲液: 0.125M Tris 碱 (15.1g), 0.96M 甘氨酸 (72.0g), 0.5% SDS (5.0g), 加蒸馏水至 1L。使用前稀释至 1×SDS 电泳缓冲液。

④样品缓冲液: 25mL (0.5M PH6.8), 1.0mL 10%SDS, 加蒸馏水至 96mL, 使用前加入 4%的 2-巯基乙醇。

(8) 晶状体的采集:

将大鼠用 CO₂ 或断颈法处死, 仔细剥离眼晶状体, 置于 Whatman 3MM 滤纸上轻轻沾去污物, 分别将眼晶状体储存于 -80℃ 备用 (6 个月内使用)。

但对于刚出生 1 天的大鼠, 眼晶状体发育尚未十分完备, 晶体外层囊膜韧性较差, 而晶体内部的纤维结构骨架刚性不足。操作稍有不慎, 即易导致外层囊膜的破裂, 使晶体蛋白散落, 而无法进行下一步提取工作; 另外, 对于老年性晶体 (如出生 1.5 年的大鼠), 则会由于晶体膜蛋白的修饰变性, 使晶体膜的脆性增加, 易使细胞膜破裂; 同时, 在老年化的眼晶体中, 积聚了大量的分子量聚合物 (简称: HMW) 及其它修饰变性成分, 伴随晶状体核逐渐浓缩、扩大, 影响了晶状体的弹性, 操作时也需要多加小心。取出晶状体后, 小心置于湿度适中的 Whatman 3MM 滤纸上, 沾去污物备用。

(9) 晶体蛋白的分离和纯化:

对应各大鼠实验组, 每次实验根据晶体大小分别取 1~4 对眼晶状体, 质量约 (50~70) mg, 溶化后加入 1ml 0.04mol/L、pH6.8 的磷酸盐缓冲液 (含 0.1mol/L NaCl, 1mmol/L EDTA, 3mmol/L β -巯基乙醇), 用玻璃匀浆器 (Dounce 匀浆器) 研磨, 10000×g 离心 20 min 取上清; 将沉淀物重复上述步骤共 3 次, 合并上清测定蛋白浓度; 部分上清液经柱 (SephadexG-200) 分离, 部分可直接用于双向电泳分离; 剩余沉淀物留作水不溶性 (8M 尿素) 蛋白成分的提取用。

(10) 晶体蛋白柱层析:

Sephadex G-200, 常规操作, 第一次分离后, 将各个蛋白收集峰分别再次行层析分离。

(11) 晶体蛋白浓度测定:

参照 Lowry 方法。

(12) 等电聚焦 (双向电泳第 1 项):

参考文献进行操作, 上样量为 70 μ g。

①**配胶:** 尿素 7.2 g, 两性载体 1.5 ml, 丙稀酰胺/Bis 溶液 3.5 ml, 双蒸水 8.0 ml, 将尿素溶解混匀后, 用双蒸水定容至 20ml。负压抽真空 15 分钟后加入 TEMED 15ul 以及 10% AP 50ul, 轻轻混匀后立即倒入 20ml 的一次性注射器内 (应避免产生气泡)。

②**灌胶:** 先将两层玻璃板按照 “下层板—支持膜 (Gel Bond PAG Film, 亲水面向上)—上层板” 的顺序固定好, 然后将注射器内的溶液缓缓注入支持膜与上层玻璃板之间, 使胶与支持膜结合在一起。

③**凝固:** 灌好的胶板可室温静置过夜凝固, 但要注意周围的湿度, 防止胶干燥皱缩。

④**取胶:** 待胶完全凝固后, 从槽子的一角轻轻翘起, 然后缓慢的将整个上层玻璃板取下, 取出支持膜。

⑤等电聚焦准备：将已制备好的上述凝胶连同支持膜放于电泳仪的冷却板上，分别在阴极、阳极处放置一条用 1M NaOH(-)及 1M H₃PO₄ 浸泡过的滤纸条，并在胶的阴极附近依次放置 4×5mm 小滤纸片，供上样用。按每个滤纸片上样 70~90ug/10~20ul 的蛋白质。

⑥等点聚焦：500V 30min 使滤纸中的样品完全进入胶中之后，升电压至 650V，此后，每隔 5min 电压上调 50V，直至电压升至 1200V。维持 1200V 电泳 1~1.5h 后，取下上样滤纸片（样品已渗入凝胶），继续 1200V 电泳 4h，使电流值尽量小，2~3mA。

⑦固定及保存：仔细取下胶及支持膜，放入固定液中固定 15~30 分钟，取出，用蒸馏水反复冲洗干净，通风橱自然风干，置于保鲜膜内-20℃保存。

（13）SDS-PAGE 电泳（双向电泳第 2 项）：

SDS-PAGE 的胶浓度为 12% T，交联度为 2.67% C，常规操作制备分离胶及浓缩胶；将第一项等点聚焦样品支持膜取出，按照上样部位及电泳方向，裁成宽 0.8×长 7.0cm 的第二项上样条，缓冲液中浸泡 10min，按与第一项电泳方向成 90°方向，置于 SDS-PAGE 的浓缩胶中，进行第二项垂直电泳；电泳完毕，取下凝胶，分别行染色、脱色，待扫描定量检测。

每组大鼠的晶体蛋白至少电泳 10 次以上。

（14）凝胶蛋白扫描定量检测：

凝胶经考马斯亮蓝 G250 染色并经适当脱色后，用图像密度仪扫描，并用 2-D 图谱分析软件进行分析（Zeineh, 美国）：选体积较大、蛋白集中、灰度最深的点作为参照点（该点灰度值视为最大），以无蛋白处的凝胶黑度作为背景，测定主要晶体蛋白的体积及灰度等项指标，给出相对定量值（relative quantity, RQ）。

（15）电印迹：

采用半干式电印迹方法，并采用发明人自行改进的一种新型的半干式电印迹方法，提高了转移效率和质量。

（16）双向电泳分析大鼠晶体蛋白的命名原则：

国际上混用两种命名方式，一种是由英国 Ranaekers, F 及美国 Joseph-Fu S. C 等人所采用的方式；另一种是以美国人 David, L. L 等人为代表的方式。从近几年国际有关眼科学的多份杂志所采用的命名方式看，后一种命名方式正被越来越多的人采用。本发明所用晶体蛋白命名，除将核心研究内容 β B₂ 晶体蛋白按照 David L. L 等人的方式命名，以便于文献检索外；其余命名均仍沿用 Joseph-Fu S.C 教授等人的命名方式；同时也便于采用 Joseph-Fu 实验室的电泳模式进行双向分析。

2、结果

（1）8 周鼠龄晶体蛋白柱层析：

Sephadex G-200 柱（直径 2×高 45cm）层析分离，将水溶性晶体蛋白（10~20mg），分成 α 、 β 、 γ 3 大类、5 个分离峰：以洗脱组分出现的先后顺序，依次为 α 、 β H、 β L₁、 β L₂ 及 γ 峰。

（2）大鼠不同年龄组水溶性晶体蛋白双向电泳图谱：

按文献，将晶体蛋白提取液进行等电聚焦，大鼠晶体蛋白按等电点（pI）不同可分成 5~8 个条带；切下等电聚焦凝胶条带（每条约 8mm 宽，7cm 长，未经染色），微型 SDS-PAGE 分析；结果显示，经等电聚焦的一个条带（等电点相同）又进一步分成多个相对分子质量不等的蛋白斑点；凝胶经考马斯亮蓝 G250 染色后，作蛋白半定量扫描检测，不同年龄组晶体蛋白扫描读数值总和大致相同，各组数据均取 10 次电泳测定均值。

注意： β B₂ 在 Joseph-Fu S.-C 的系统中被命名为 β B₄。

（3）晶体蛋白柱层析不同组分所含主要成分：

将各个收集峰分别作双向电泳分析，最后将各个组电泳结果叠加，可将晶体蛋白分成三大类（ α 、 β 、 γ ），每大类中又分成不同的亚型，极个别可疑的蛋白点，通过 Western Blot 分析确认结果与分布情况。

（4）时相改变：

本部分研究发现，伴随大鼠老化进程，18 种主要晶体蛋白组分，其中 7 种蛋白的相对含量呈现明显时相改变：

- ①晶体蛋白相对含量呈升高趋势的有 β B₂、 α B₂、 α A₂；
- ②呈降低趋势的有 β 7（ β 1）、 β 8、 γ 2、3、 γ 5、6（ γ C， γ D）；
- ③大致保持稳定的主要有 β A₁、 β A₃、 β B₅；
- ④其它主要晶体蛋白改变规律性不强。

（3）主要晶体蛋白定量及统计学分析（SPSS 11.0 软件）

- ① β B₂ 相对含量随老化呈年龄依赖性升高（ $r=0.938$, $p<0.01$ ）。
- ② 伴侣蛋白 α A₂ 及 α B₂ 相对含量随老化呈渐进性升高（ $r=0.890$, $p<0.05$ ； $r=0.930$, $p<0.01$ ）。
- ③ β B₂ 相对含量随晶体老化的变化趋势与伴侣蛋白 α A₂ 及 α B₂ 呈显著正相关（ $r=0.949$, $p<0.01$ ； $r=0.986$, $p<0.01$ ）。
- ④ β B₂ 相对分子质量约 24000，等电点约 6.4，是 β 族晶体蛋白中含量最高的一种蛋白成分，在大鼠老化进程中相对含量升高幅度最大。
- ⑤ α A₂ 相对分子质量约 20000，等电点约 4.9，是具有分子伴侣（Molecular Chaperone）作用的主要晶体蛋白，维持晶状体结构稳定，老化进程中亦呈轻度升高，相对含量始终处于高水平。

⑥ $\beta B_2/\alpha A_2$ 比值 ($n=10$) 在大鼠老化进程中呈渐进性升高。

(5) 主要晶体蛋白定性分析:

①各年龄组大鼠水溶性蛋白 RQ 值大致持平。

②晶体蛋白的翻译后修饰自大鼠出生 8 周后, 便已明显可见。

③进入中老年后, 水溶性 γ 组分大量丢失。

3、讨论

α 晶体蛋白分子量最小, 在非变性的柱层析分离时, 通常以 ($\alpha A-\alpha B$) 高聚体 (约 40 个亚基, 分子量 30~120 万 KD) 的形式存在。故分子筛作用下, 首先被洗脱下来; 其次才是表观分子量较小的 βH 组分 (6~8 个亚基), 以及 βL_1 组分 (介于 βH 和 βL_2 组分的聚合程度之间) 和 βL_2 晶体蛋白组分 (均质或异质二聚体; homodimer/heterodimer); 最后洗脱下来的是单体 (monomer) γ 组分。

不同年龄段晶体蛋白水溶性成份 RQ 值在总体大致持平的情况下, 各年龄段晶体蛋白的主要区别在于不同组分蛋白的构成及相互比例不同, 反映出晶体的发育完善程度及晶体蛋白的水溶性成分随老化修饰变性及丢失程度的不同, 是直接影响晶体透光性和折射率的物质基础。

晶体蛋白的翻译后修饰尤其是 β 族自大鼠出生 8 周后, 便已明显可见。该结果与国外近年报道的大鼠晶体蛋白的翻译后修饰始自出生后 6 周的结论十分相近, 只不过, 两家所选的检测点不同; 但是, 国外的文献, 所选检测点较少, 并且时间跨度比本文范围短的多。

进入中老年后, 水溶性 γ 组分大量丢失。 γ 族晶体蛋白在晶体中的作用, 主要是起结构蛋白作用, 维持晶体的基本外形及其内部功能; 进入中老年后, 水溶性成分的大量丢失, 可能与该组分的选择性丢失至晶体的玻璃体或合成能力下降有关。

本发明还发现不同的晶体蛋白在生长发育的不同阶段, 其表达量会有重大差异; 而且, 不同晶体蛋白的变化趋势不尽相同。因此, 研究晶体蛋白变化, 不易笼统表述 α 、 β 或 γ 晶体, 而应当具体落实到各个蛋白组分, 如 αA_2 、 αB_2 及 βB_2 等。

βB_2 水溶性成份随老化进程呈渐进性升高的启示: 该发现与以往有些研究报道不同。主要在于, 过去有些文献研究晶体蛋白, 不细分 β 族蛋白具体成分, 得出了 β 族晶体蛋白水平随老化而逐渐下降结论; 而在本实验中则发现 βB_2 随老化进程其相对含量非降反而升高。原因在于不同晶体蛋白可呈现不同的时相性改变; 此外, 晶体结构蛋白基因也可发生改变。一个已知基因在哺乳动物整个一生中并不总处于活性状态, 晶体蛋白基因的相对表达是可以改变的。

发现 βB_2 相对含量随老化呈“反常”年龄依赖性升高的现象, 该发现既不同于以往 β 族蛋白水溶性成份随老化逐渐下降的观点。

(七) 非水溶性晶体蛋白在老化进程中的变化趋势的实验研究

正常成熟的晶状体(简称: lens), 形如双凸透镜, 富有弹性, 是由晶状体囊膜和晶状体纤维组成。其中, 囊膜为一层透明而具有弹性的均质玻璃膜, 由囊膜上皮细胞分泌产生, 包围晶体; 晶状体纤维则是晶体的主要成分, 由赤道部上皮细胞向前后伸展、延长而成, 其排列短程有序(Short-range order), 形似浓稠液体或玻璃体, 这样的排列, 导致晶体透明、透光。

晶状体囊和晶状体纤维均含有一定量的水不溶性蛋白成分, 主要是构成晶状体囊的膜蛋白和晶状体纤维的骨架蛋白, 以此维持晶状体的形态及其他物理和光学特性; 而水溶性晶体蛋白则是晶体透明介质的主要成份, 并且也是晶体纤维细胞内的水溶性成分, 对于维持晶体的透光性及折射能力起重要作用, 尤其水溶性 α 族蛋白具有伴侣蛋白作用, 扶助晶体纤维搭建网格结构以及维持 β 及 γ 族晶体蛋白成分在晶体介质中的短程有序。

随着老化进程, α 族蛋白的伴侣蛋白作用逐渐下降, 大量 α 、 β 族蛋白成分, 因受翻译后修饰的影响, 蛋白质间发生交联或聚集, 首先形成水溶性的高分子量(简称: WS-HMW)聚合物, 进而逐渐演变为水不溶性(简称: WI)的成份, 并在晶体内累积, 直至形成大小不一的光散射中心, 影响晶体的透光性和折射能力, 成为诱发老年性白内障的物质基础。

为了进一步了解在水溶性成份中表达十分特殊的 βB_2 和 α 族蛋白在水不溶相中的改变, 我们采用与上述相类似的研究方法, 收集眼晶体, 首先提取水溶性晶体蛋白(简称: WSP); 随后在已提取过水溶性晶体蛋白的沉淀物中, 加入8M的尿素缓冲液, 进一步提取水不溶性蛋白组分(尿素溶性蛋白, 简称: USP), 双向电泳分析, 获得了一些新发现。

结果表明, βB_2 在水不溶相中亦呈高水平, 反映出该蛋白的易变性以及对于维持晶体透光性和折射能力的重要性, 同时还提示 βB_2 在水溶相中的高水平, 可能是以 βB_2 单组分、二聚体以及高分子聚合物(简称: HMW)形式存在的, 因为后者容易进一步转变为水不溶性成分, 使USP成分升高; 另外, 对于以往文献中报道的某些现象, 如 α 族蛋白的伴侣蛋白作用随老龄化而逐渐下降等, 也提供了实验解释: “伴侣蛋白” α 族成分随着老化进程, 亦会大量出现在USP组分中, 并且最主要的伴侣蛋白 αA_2 自中年后, 呈现出大量衍生物, 反映出伴侣蛋白遭受变性程度加大, 使其分子伴侣作用逐渐下降。

同时观测水溶性及水不溶性组分的分布规律, 两相中的结果相辅相成, 有助于进一步验证、完善老年性白内障形成的机理。

本发明对晶体蛋白分析多用定性描述; 仅定量检测了上述表达特殊的 βB_2 及另一种主要“伴侣蛋白” αA_2 。

1、材料和方法

(1) 试剂: 两性载体(ampholine pH3.5~10.0)购自Pharmacy公司; 丙烯酰胺

(acrylamide)、N, N' -甲叉双丙烯酰胺 (bisacrylamide)、疏水膜 (polyvinylidene difluoride, PVDF) 及电泳蛋白标准 (商品号: 161-0367) 购自 Bio-Rad 公司; 其余试剂均购自 Sigma 公司。

(2) 实验仪器: 扫描系统采用成像仪 Fluor-S Multiimager (Bio-Rad, 美国) 及 2-D 图谱分析软件 (Quantity one-4.20, Bio-Rad, 美国); 等电聚焦采用多用电泳仪 (Multiphor II, LKB 公司, 瑞典); SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 采用微量蛋白分析系统 (Mini Protein 3 System, Bio-Rad 公司, 美国)。

(3) 动物准备: 常规饲养出生后 1 天 (简称: d)、8d、2 周、8 周、8 个月及 1.5 年的 SD 大鼠, 每组 (6~20) 只, 分别由美国新泽西医学及牙科大学 (简称: UMDNJ) 动物中心及第二军医大学动物中心提供。

(4) 8M 尿素缓冲液: 8M 尿素, 含 4% CHAPS, 3% 二巯基乙醇, 40 mM Tris 碱, pH 6.8~7.2。

(5) 晶状体的采集: 将大鼠用 CO₂ 或断颈法处死, 仔细剥离眼晶状体, 置于 Whatman 3MM 滤纸上轻轻沾去污物, 分别将取眼晶状体储存于 -80℃ 备用。

但对于刚出生 1 天的大鼠, 眼晶状体发育尚未十分完备, 晶体外层囊膜韧性较差, 而晶体内部的纤维结构骨架刚性不足。操作稍有不慎, 即易导致外层囊膜的破裂, 使晶体纤维及内容物散落, 而无法进行下一步提取工作; 另外, 对于老年性晶体 (如出生 1.5 年的大鼠), 则会由于晶体囊膜存在不同程度的变性和灶性变薄区, 容易造成液化的晶体皮质透过囊膜; 同时, 在老年化的眼晶体介质中, 积聚了大量的分子量聚合物 (简称: HMW) 及其它修饰变性成分, 伴随晶状体核逐渐浓缩、扩大, 影响了晶状体的弹性, 操作时需要格外小心, 勿伤及囊膜。取出晶状体后, 小心置于潮湿度适中的 Whatman 3MM 滤纸上, 轻轻沾去污物备用。

(6) 尿溶性晶体蛋白的提取:

在提取完水溶性晶体蛋白成分得沉淀物中, 加入 0.5ml 8M 尿素缓冲液, 至于冰上, 用玻璃匀浆器 (Dounce 匀浆器) 研磨, 10000×g 离心 20 min 取上清; 将沉淀物重复上述步骤共 3 次, 合并上清测定蛋白浓度; 部分上清液经柱 (Sephadex G-200) 分离, 部分可直接用于双向电泳分离; 剩余残留沉淀物还可再留作水不溶性 (简称: WI) 蛋白成分的提取用。

(7) 尿溶性晶体蛋白浓度测定 (参考文献: 半定量考马斯亮蓝 R-250 滤纸点样法):

- ① 0.1% (W/V) 考马斯亮蓝 R-250 染液 (65 份去离子水, 25 份异丙醇, 10 份醋酸)。
- ② 裁剪滤纸至合适大小, 并用铅笔在滤纸上轻轻划出点样点 (直径 2~3mm)。
- ③ 配制浓度梯度 (20~200ug) 的蛋白质 (牛血清白蛋白) 标准液。
- ④ 用微量加样器, 分 5 次每次 1ul, 将各浓度标准液加到滤纸所对应的位置 (待液体

渗入滤纸后、晾干，再进行随后的加样，保持点样点尽量小)。

⑤点样完毕，将滤纸浸没于上述染液中，持续 15~30min，用去离子水漂洗干净，完全晾干。

⑥用打孔器（直径 4~5mm），将干燥后的蛋白质斑点取下，按不同浓度梯度依次放入带盖的 10ml 玻璃瓶中，加入 0.1% SDS 溶液 2ml，摇床 40~100rpm 转速充分洗脱（1~2h）。

⑦将不同浓度的蛋白标准品，于 595nm 处比色，用不含蛋白处的同等大小的滤纸浸泡液作为零对照，绘制标准曲线。

⑧将待测尿溶性晶体蛋白组分稀释不同倍数，每种浓度至少重复 3 次以上；用同样步骤检测，与上述标准曲线比较，即可得到待测样品的大致浓度。

（8）双向电泳操作：等电聚焦及 SDS-PAGE 电泳程序，同上文所述。

等点聚焦每个条带的上样量仍为 70 μ g；SDS-PAGE 电泳仍采用 Mini-Gel 系统；染色、脱色方法同第一部分；每组大鼠的晶体蛋白至少电泳 10 次以上；。

（9）双向电泳凝胶扫描定量：

SDS-PAGE 凝胶经考马斯亮蓝 G250 染色并适当脱色后，用 Fluor-S Multiimager（Bio-Rad, 美国）成像仪及 2-D 图谱分析软件（Quantity one-4.20 Bio-Rad, 美国），进行扫描定量。选体积较大、蛋白集中、灰度最深的点作为参照点（该点灰度值视为最大），以无蛋白处的凝胶黑度作为背景，测定主要晶体蛋白的体积及灰度等项指标，给出相对定量值（relative quantity, RQ）。

（10）晶体蛋白的命名：尿素溶性成分的双向电泳图谱中，各晶体蛋白的命名方式同第一部分中的说明。尤需注意本发明重点讨论的 βB_2 晶体蛋白，在 Joseph-Fu SC 命名体系中被称作 βB_4 。

2、结果

（1）不同年龄（自出生 1 天~1.5 年）大鼠尿素溶性晶体蛋白的双向电泳图谱：

获得了与水溶性晶体蛋白双向电泳图谱基本相同的电泳图谱；但是，不同年龄段晶体蛋白组分的分布，与在水溶相中不同。

（2）双向电泳定量分析：

尿溶晶体蛋白 βB_2 随老化进程均呈渐进性升高；而主要伴侣蛋白组分 αA_2 的相对含量则大致保持稳定。

（3）双向电泳定性分析：

① αA_2 、 βB_2 尿溶性成分随老化变化幅度不及在水溶性成份中明显。

②尿溶性晶体蛋白 αA_2 的翻译后修饰（Deamidation）产物 αA_1 自大鼠 8 周龄起，呈

极显著增加。

③ αB_2 的翻译后修饰（脱酰胺）产物 αB_1 ，自大鼠 8 周龄起亦呈显著增加。

④ βB_2 自大鼠 8 周龄起出现明显降解（Truncated）产物，表现在 βB_2 蛋白点下方出现多个蛋白点，且增长幅度远大于在水溶性中的表现。

⑤ γ 组分进入老龄后，有较明显的下降趋势。

3、讨论

双向电泳结果可见：部分大鼠水不溶性晶体蛋白随老化进程，同样伴有时相性改变。尤其是 αA_2 及 βB_2 ，无论在水溶性还是在尿溶性成分的分布中，均呈高水平。反映出此两种晶体蛋白作为晶状体中主要成分，在维持晶体正常结构与功能方面，具有重要作用：一方面， α 组分可通过与晶体膜以及细胞骨架蛋白相结合，起维持晶状体形状、弹性及透光功能等特性；另一方面， β 晶体蛋白则在构建晶体蛋白的短程有序（short-range order）、保持晶状体的透光性方面具有重要作用；此外，这两种晶体蛋白代谢活跃，均容易从水溶性转变为水不溶性，但是，这两种转变的方式不同： βB_2 的转化是由于该蛋白易受翻译后的修饰变性，是一种被动过程，而 α 族蛋白的转化则是在发挥分子伴侣的过程中，为保护其他晶体蛋白少受变性影响，尤其是，在其他类晶体蛋白已经遭受某种变性影响时，水溶性受到影响， α 族蛋白则会主动与其结合，维持 HMW 的水溶性，表现出某种主动接受攻击的自我牺牲境界。

βB_2 成分大幅升高的提示：一方面 βB_2 水溶性成分的增加，可以部分弥补其他 β 族组分水溶性成份下降给晶体造成的不利影响，有助于维持晶体透光性，尤其是维持其折射率；但在尿溶性成分中 βB_2 亦呈快速升高趋势，则反映出随老化进程 βB_2 水溶性的升高，有可能是以水溶性高分子量聚合物（简称：WS-HMW）方式存在的，而 WS-HMW 容易进一步转化为水不溶性成分，综合提示 βB_2 晶体蛋白对于老年性白内障的发生具有密切关系，似为白内障病因学的敏感蛋白！

大鼠自 8 周龄起，“伴侣蛋白” αA_2 、结构蛋白 βB_2 及其两种伴侣蛋白的翻译后修饰产物 αA_1 和 αB_1 均显著升高的现象，突出反映了大鼠进入成年期后，水不溶性晶体蛋白的分布发生明显的量变和质变；亦提示进入成熟期后，晶体遭受内部及外界负面影响的机率增大，晶体蛋白变性程度增加；进入老年阶段后，甚至会出现剧增现象。因此，应尽早注意采取合适的措施，保护晶体蛋白少受变性影响。

大鼠进入老龄（1.5 年）后， γ 组分有较明显的下降趋势表明，水溶相中 γ 组分在老龄化时所呈大量下降，并非是由于转化为水不溶性成分所致，而是可能通过在白内障形成后所常出现的所谓选择性渗出（Selective leakage）至玻璃体有关；大量 γ 组分的丢失，与晶状体的结构破坏亦有重要关联。

以上二部分的研究结果还说明：在大鼠老化（出生 1 天到 1.5 年）进程中，水溶性晶体蛋白总量未见明显改变，提示当水溶性晶体蛋白总量发生明显下降时，白内障似已达较严重程度。另外，大鼠老化进程中其水不溶性晶体蛋白总量变化较大，主要表现为自大鼠出生至幼年期（1 天~2 周）总的水不溶性蛋白含量均较低；接近成熟期（第 8 周起）时，其水不溶性晶体蛋白含量呈渐进性升高。据此推定：①随着老化进程，大鼠部分水溶性晶体蛋白（尤其 β 组分）受变性修饰，易聚合成高分子化合物，演变为水不溶性；②在严重白内障发生之前，新生的晶体蛋白可补充由于水不溶性蛋白的渐进性累积所造成的水溶性蛋白成分的损失，使水溶性晶体蛋白总量保持相对稳定。③当晶状体老化到一定程度，新生晶体蛋白的量不足以弥补由于水不溶性蛋白形成加快所造成的水溶性蛋白的损失，使晶状体结构发生明显改变，导致不透明性，诱发白内障。

综合晶体蛋白在水溶性及尿溶性组分中的分布结果，可见 βB_2 同 β 族其他组分，尤其是 βL 组分（ βA_2 , βA_3 ; βB_3 ）有明显不同：

①水溶性组分中，进入中老年后（大鼠 8 个月~1.5 年），除 βB_2 及 βA_1 外，其余组分均呈下降，与文献报道该组蛋白成分抗热变性能较低、容易发生非特异性热聚集（2~8 聚合体），最终导致水不溶性晶体蛋白的形成相符；

②而在尿溶部分，几乎所有 βL 组分，均在 8 周后呈大幅升高趋势，反映了 βL 族成分随老化进程，易受外界因素影响，大量成分由水溶性变为水不溶性；

③ βB_2 晶体蛋白在水溶性及水不溶性两项中的分布特点，反映出该蛋白分布的两重性，控制其在水溶性中的含量、努力延缓向水不溶性成分的转化，对于老年性白内障的预防及治疗具有重要作用。

总之，哺乳动物自出生后，由于晶体所在的眼球暴露在外，晶状体又位于眼球前段，各种有害因素易于影响晶状体的正常代谢，使晶状体蛋白质发生变性，不溶性蛋白相应增多，透明晶状体出现混浊，发生白内障；防止晶体蛋白水溶性成份的减少以及水不溶性成份的增加，是防止和延缓老年性白内障的必由之路。

晶体蛋白伸展（Unfolding）可以导致蛋白之间的错误装配（wrong assembleis）或改变相互关系，进而导致老年性白内障的形成（Bloemendal H, de Jong W, Jaenicke R, et al. Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins. Prog Biophys Mol Biol. 2004 Nov; 86(3): 407-485 和 Macdonald JT, Purkiss AG, Smith MA, et al. Unfolding crystallins: The destabilizing role of a {beta}-hairpin cysteine in {beta}B2-crystallin by simulation and experiment. Protein Sci. 2005 May; 14(5): 1282-1292); 但是，对于处于较为严重的老年性白内障时，大量晶体蛋白处在由水溶性低聚体向水不溶性高聚体的转化过程中，并已在晶体皮质中积聚了较多的水不溶性晶体蛋白成分。尝试加入 DTT（常用还原剂，可以还原蛋白之间的二硫键，造成蛋白多肽的伸展（Carver JA, Lindner RA, Lyon C, et al. The interaction of

the molecular chaperone alpha-crystallin with unfolding alpha-lactalbumin: a structural and kinetic spectroscopic study. J Mol Biol. 2002 May 3; 318(3): 815-827 和 Singh R, Rao ChM. Chaperone-like activity and surface hydrophobicity of 70S ribosome. FEBS Lett. 2002 Sep 11; 527(1-3): 234-238), 推测反而可以起到缓解晶体蛋白进一步形成不溶性高聚合体的倾向, 有助于维持晶体蛋白的水溶性; 我们的第三部分实验证实了这一点, 并提示外用该中性化合物, 将有助于晶体蛋白的抗受热变性, 起到延缓晶体老化及维持晶状体正常功能的作用, 对于预防和治疗老年性白内障具有积极作用。

βB_2 基因为晚期基因 (Bloemendal H, de Jong W, Jaenicke R, et al. Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins. Prog Biophys Mol Biol. 2004 Nov; 86(3): 407-485); βB_2 晶体蛋白在出生后逐步增加, 属于继发性纤维成分的代表之一; 因此, βB_2 晶体蛋白主要处在外围皮质的晶状体纤维中, 外用抗晶体蛋白变性的药物, 容易发挥作用。

本发明确定的新的用于抗白内障的靶蛋白, 综合考虑了晶体蛋白变性的主要途径, 抓住主要易感蛋白 βB_2 , 并将其作为靶蛋白, 针对性强, 具有较强的创新性和临床应用潜在价值。

本发明积极研究开发易感蛋白 βB_2 作为靶蛋白的用途, 设计的新型的用于制备抗白内障产品的二硫苏糖醇, 综合考虑了晶体蛋白变性主要途径, 抓住主要易感蛋白 βB_2 作为靶蛋白, 针对性强; 二硫苏糖醇外用为主, 使用方便, 具有较强的创新性和临床应用潜在价值。

白内障疾病已成为影响中国人口生活质量的重要致病原因, 本发明二硫苏糖醇安全低毒, 其原料来源丰富、价廉, 制备工艺简单, 且使用范围较广, 因此容易推广应用, 研制预防、诊断、保护和治疗白内障等方面产品特别是治疗白内障疾病的药物, 能够在较短的时间内产生显著的社会效益和经济效益。

总之, 本发明开发二硫苏糖醇的新用途, 积极适应了现代健康、医疗需求, 以及科研领域的工作需要和人性化服务的需要, 是用于预防、诊断、检测、保护、治疗和研究白内障及其相关疾病等方面的安全原料。

附图说明

图 1 是表示 βB_2 晶体蛋白与其它几种蛋白受热聚集变性比较;

图 2 是表示不同 βB_2 晶体蛋白含量对于 ADH 受热聚集效应的影响;

图 3 是表示不同 DTT 含量对于 ADH 受热聚集效应的影响;

图 4 是表示不同 DTT 含量对 βB_2 晶体蛋白受热聚集效应的抑制作用。

具体实施方式

本发明系统研究了晶状体变性以及白内障的发生机理,提供了一种能够用于抗白内障的靶蛋白,为医疗行业和相关行业如食品、饮料等领域制备相关产品打下了基石。

本发明在 βB_2 的用途方面进行了深入研究和产品开发,通过研究现有物质二硫苏糖醇的新的药理作用,以 βB_2 为靶点,提供了一种能够用于制备白内障及其相关疾病的预防、诊断、保护、研究和治疗等产品的原料,便于医疗行业和相关行业如食品、饮料等领域的安全使用。

(一) 白内障动物模型

1、先期用于硒(亚硒酸钠 Na_2SeO_3)诱导的SD大鼠白内障模型(Blunt DS, Takemoto L. Inhibition of selenite cataract by S-diethylsuccinyl glutathione isopropyl ester. Curr Eye Res. 2000 Apr; 20(4): 341-345),模拟老年性白内障的病理变化,裂隙灯每日观察、记录晶体透光性改变进程,观察疗效;

2、用半乳糖诱导SD大鼠糖性白内障模型(Huang WQ, Zhang JP, Fu SC. Differential effects of galactose-induced cataractogenesis on the soluble crystallins of rat lens. Exp Eye Res. 1990 Jul; 51(1): 79-85)。

通过上述的白内障动物模型,设计针对保护 βB_2 靶蛋白的产品特别是药物,观察对于老年性白内障及糖性白内障的预防、诊断、检测、保护、治疗和研究的作用,进一步验证和探讨该靶蛋白对于白内障预防、诊断、检测、保护、治疗和研究的应用前景特别是临床应用前景,期望该靶蛋白能够为延缓和治疗老年性白内障及糖性白内障,尤其针对大部分初发期的老年性白内障带来积极的影响。

(二) 针对 βB_2 设计抗糖基化的产品

抗糖基化修饰是 βB_2 最主要的保护措施之一:根据糖基化作用机理,在抗晶体蛋白变性的组合物中,加入一定量的阿司匹林(Hennis A, Wu SY, Nemesure B, et al. Risk factors for incident cortical and posterior subcapsular lens opacities in the Barbados Eye Studies. Arch Ophthalmol. 2004 Apr; 122(4): 525-530 和 Harding JJ. Viewing molecular mechanisms of ageing through a lens. Ageing Res Rev. 2002 Jun; 1(3): 465-479)和游离的赖氨酸(Sulochana KN, Punitham R, Ramakrishnan S. Beneficial effect of lysine and amino acids on cataractogenesis in experimental diabetes through possible antiglycation of lens proteins. Exp Eye Res. 1998 Nov; 67(5): 597-601 和 Ramakrishnan S, Sulochana KN, Punitham R. Free lysine, glycine, alanine, glutamic acid and aspartic acid reduce the glycation of human lens proteins by galactose. Indian J Biochem Biophys. 1997 Dec; 34(6): 518-523)以及谷氨酸、丙氨酸(Ramakrishnan S, Sulochana KN, Punitham R. Free lysine, glycine, alanine, glutamic acid and aspartic acid reduce the glycation of human lens proteins by galactose. Indian J Biochem Biophys. 1997 Dec; 34(6):

518-523 和 Ramakrishnan S, Sulochana KN, Punitham R, et al. Free alanine, aspartic acid, or glutamic acid reduce the glycation of human lens proteins. *Glycoconj J*. 1996 Aug; 13(4): 519-523)、吡哆醛-氨基胍 (Chen AS, Taguchi T, Sugiura M, et al. Pyridoxal-aminoguanidine adduct is more effective than aminoguanidine in preventing neuropathy and cataract in diabetic rats. *Horm Metab Res*. 2004 Mar; 36(3): 183-187) 以及锗¹³² (Unakar NJ, Tsui J, Johnson M. Effect of pretreatment of germanium-132 on Na(+)-K(+)-ATPase and galactose cataracts. *Curr Eye Res*. 1997 Aug; 16(8): 832-837) 等, 均具有一定的抑制糖基化的作用。

阿司匹林: 阿司匹林 (Aspirin; 或乙酰水杨酸, Acetylsalicylic acid, 分子量 186.16) 是二十世纪最伟大的发明之一, 作为治疗药物不断有新的用途出现。研究表明, 阿司匹林具有抗白内障的作用。通过动物实验研究阿司匹林的作用机理, 认为阿司匹林抗白内障机制有 4 种: (1) 抑制非酶性蛋白质糖基化, 即阿司匹林与晶体蛋白中赖氨酸残基结合, 阻止葡萄糖与赖氨酸的非酶性糖基化反应, 并可防止晶体蛋白聚合物形成; (2) 抑制晶体蛋白的氨基甲酰化, 阿司匹林的乙酰基与晶体蛋白的氨基酸基团结合, 阻断了氨基酸残基甲酰化反应, 使蛋白分子表面的正常电荷配布免遭破坏, 从而维持了晶体蛋白的正常结构; (3) 抑制脂质过氧化, 阿司匹林的乙酰基可优先夺取晶体蛋白的活性氨基位点, 避免了脂质过氧化给晶体带来的损害; (4) 阿司匹林通过抑制膜上的环氧化酶使晶体细胞膜上的钙通道失活, 从而防止晶体蛋白多肽链的聚合反应。

游离氨基酸: 赖氨酸 (Lysine, 分子量 146) 和谷氨酸是正常晶体中存在的游离氨基酸, 在白内障时含量降低, 由于它们自身易被糖化可以有效地清除晶体内的葡萄糖, 从而竞争性抑制晶体蛋白的糖化作用。Ramakrishnan 等发现游离丙氨酸和天门冬氨酸也有相似作用。它们与其它的抑制剂相比, 由于无毒性, 因而更具进一步实验和研究的意义。

氨基胍: 氨基胍 (Aminoguanidine) 是一种亲核胍的衍生物, 70 年代认为可抑制糖基化末端产物的形成以及抑制二胺氧化酶、一氧化氮合成酶和过氧化氢酶活性。近年的研究表明, 氨基胍、1,3-二氨基胍和甲基氨基胍可抑制醛糖还原酶。氨基胍可抑制晶体糖化产生的 Amadori 产物上的碳酰基的反应性, 从而抑制晚期糖化产物生成和蛋白的交联。

锗¹³² (Germanium, ¹³²Ge): Unakar 等对半乳糖性白内障的研究中, 发现 ¹³²Ge 氨基酸衍生物可抑制晚期糖化产物的形成, 并可逆转糖化蛋白成溶解状态或阻止白内障的发生。

抗糖基化修饰的物质, 是包括阿司匹林和游离氨基酸、谷胱甘肽和药物前体、吡哆醛-氨基胍、1,3-二氨基胍、甲基氨基胍或锗¹³² 等中的一种或多种, 所述的游离氨基酸是包括赖氨酸、谷氨酸、丙氨酸或天门冬氨酸等中的一种或多种, 优选阿司匹林或赖氨酸等中的一种或多种。

配方及其使用方法如下:

其中之一的配方是：11mmol/L~111mmol/L（即：2048mg/L~20477mg/L）阿司匹林、12mmol/L~120mmol/L（即：1752mg/L~17520mg/L）赖氨酸、0.25mmol/L~2.5mmol/L（即：38mg/L~385mg/L）DTT；

由阿司匹林、游离赖氨酸和 DTT 为组合物，如果配成外用滴眼液，则每天 1~3 次，每次 1 滴。

其中之二的配方是：11mmol/L~111mmol/L（即：1376mg/L~13765mg/L）牛磺酸、23mmol/L~230mmol/L（即：3358mg/L~33580mg/L）赖氨酸、0.25mmol/L~2.5mmol/L（即：38mg/L~385mg/L）DTT、11mmol/L~111mmol/L（即：2048mg/L~20477mg/L）阿司匹林；

由阿司匹林、牛磺酸、游离赖氨酸和 DTT 为组合物，如果配成外用滴眼液，则每天 3~5 次，每次 1 滴。

（三）针对 βB_2 设计抗氧化的产品

增强抗氧化能力是保护 βB_2 的另一项重要措施：加入一定量牛磺酸（Kilic F, Bhardwaj R, Caulfeild J, et al. Modelling cortical cataractogenesis 22: is in vitro reduction of damage in model diabetic rat cataract by taurine due to its antioxidant activity? Exp Eye Res. 1999 Sep; 69(3): 291-300 和 Anthrayose CV, Shashidhar S. Studies on protein and taurine in normal, senile and diabetic cataractous human lenses. Indian J Physiol Pharmacol. 2004 Jul; 48(3): 357-360）以及还原性谷胱甘肽（Lou MF. Redox regulation in the lens. Prog Retin Eye Res. 2003 Sep; 22(5): 657-682）、阿司匹林等，可以大幅度降低晶体蛋白被氧化的程度。

牛磺酸：牛磺酸（氨基乙磺酸，Taurine，分子量 125.14）可抑制半乳糖性白内障，阻止晶状体蛋白的糖基化和氧化。若饮食中增加牛磺酸替代品，可减少由于晶状体细胞的损害导致的 γ 晶体蛋白向玻璃体的渗漏，被认为是一种较好的抗氧化剂和抗白内障药物。

牛磺酸是一种磺基氨基酸，在人体中大量存在，其具有抗氧化作用，能保护细胞和组织免受氧化损伤。晶状体具有蓄积牛磺酸的能力，在晶状体中牛磺酸约占非蛋白质水解氨基酸的 50%，是晶状体中重要的氨基酸。随着白内障病程的发展，晶状体中牛磺酸的含量显著降低。牛磺酸能够预防或延缓糖尿病性白内障的作用机制主要为：抗氧化作用、膜稳定作用、降血糖作用、渗透压调节作用。牛磺酸的抗氧化作用和渗透压调节作用对白内障的防治具有一定的可行性。

谷胱甘肽：随着老化和白内障的形成，晶状体中谷胱甘肽（Glutathione，简称：GSH，分子量 308.33）的水平降低，故增加谷胱甘肽会有益于治疗白内障。谷胱甘肽可抑制糖基化，许多实验采用谷胱甘肽的酯和药物前体如它的二肽前体，抑制各种实验性白内障的形成，但一般要比诱发白内障的因子同时或提前使用，可能的原因是简单地减少诱发因子的攻击或影响该因子的吸收。

GSH 是晶状体中重要的抗氧化防御屏障。小热休克蛋白家族成分（sHSP，主要包括 α

A、 α B 等)通过降低细胞内活性氧水平,提高细胞内 GSH 含量而增加晶状体的抗氧化能力。

抗氧化作用的物质,是包括牛磺酸、阿司匹林或还原性谷胱甘肽等中的一种或多种,优选牛磺酸。**配方及其使用方法如下:**

其中之一的配方是:11mmol/L~111mmol/L(即:1376mg/L~13765mg/L)牛磺酸、12mmol/L~120mmol/L(即:1752mg/L~17520mg/L)赖氨酸、0.25mmol/L~2.5mmol/L(即:38mg/L~385mg/L) DTT;

由牛磺酸、游离赖氨酸和 DTT 为组合物,如果配成外用滴眼液,则每天1~3次,每次1滴。

其中之二的配方是:11mmol/L~111mmol/L(即:1376mg/L~13765mg/L)牛磺酸、12mmol/L~120mmol/L(即:1752mg/L~17520mg/L)赖氨酸、0.25mmol/L~2.5mmol/L(即:38mg/L~385mg/L) DTT、11mmol/L~111mmol/L(即:3392mg/L~33916mg/L) GSH;

由牛磺酸、游离赖氨酸、DTT 和 GSH 为组合物,如果配成外用滴眼液,则每天3~5次,每次1滴。

(四) 针对 β B₂ 设计抗热变性的产品

增强蛋白抵抗受热聚集变性能力是保护 β B₂ 的第三项重要措施:本发明研究发现,DTT 的适量加入,可以有效抑制 β B₂ 晶体蛋白的受热聚集变性作用,为抗晶体蛋白变性组合物的研制,奠定了良好基础,并具有创新性。

二硫苏糖醇:二硫苏糖醇(Dithiothreitol,简称:DTT,分子量154)是常用还原剂,可还原蛋白内及蛋白分子间的二硫键;但在我们实验中,发现该化合物可有效抑制 β B₂ 等晶体蛋白的受热变性;并且,在已受热变性的 β B₂ 晶体蛋白及其他多种蛋白溶液中,加入适量的 DTT 溶液,还可以降低蛋白受热后变性程度。

抗热变性能力的物质,是包括二硫苏糖醇(简称:DTT)等中的一种或多种,优选二硫苏糖醇。

配方及其使用方法如下:

其中之一的配方是:11mmol/L~111mmol/L(即:2048mg/L~20477mg/L)阿司匹林、12mmol/L~120mmol/L(即:1752mg/L~17520mg/L)赖氨酸、0.25mmol/L~2.5mmol/L(即:38mg/L~385mg/L) DTT、11mmol/L~111mmol/L(即:3392mg/L~33916mg/L) GSH;

由阿司匹林、游离赖氨酸、DTT 和 GSH 为组合物,如果配成外用滴眼液,则每天3~5次,每次1滴。

其中之二的配方是:11mmol/L~111mmol/L(即:1376mg/L~13765mg/L)牛磺酸、23mmol/L~230mmol/L(即:3358mg/L~33580mg/L)赖氨酸、0.25mmol/L~2.5mmol/L(即:

38mg/L~385mg/L) DTT、11mmol/L~111mmol/L (即: 3392mg/L~33916mg/L) GSH、11mmol/L~111mmol/L (即: 2048mg/L~20477mg/L) 阿司匹林;

由阿司匹林、牛磺酸、游离赖氨酸、DTT 和 GSH 为组合物, 如果配成外用滴眼液, 则每天 3~5 次, 每次 1 滴。

(五) 二硫苏糖醇的具体使用

本发明的另外一个目的是提供一种用于预防、诊断、检测、保护、治疗和研究白内障及其相关疾病的产品, 包括相应的药物、试剂、食品等中的一种或多种, 优选药物。

本发明通过药理活性筛选证明, 二硫苏糖醇是预防、诊断、检测、保护、治疗和研究白内障及其相关疾病的合适产品。

1、二硫苏糖醇及其组合物的使用方法与要求

本发明二硫苏糖醇可以单独或与其它活性组分再进一步联合使用, 包括用于制备用于预防、诊断、检测、保护、治疗和研究白内障及其相关疾病的产品, 包括相应的药物、试剂、食品等, 尤其是药物。

在具体使用方面, 本发明二硫苏糖醇能够单独使用, 还能够与其他许多化学物质一起使用。无论这些化学物质是否具有生物活性或具有治疗疾病的功能, 包括辅助功能如协同放大作用、拮抗或缓解组合物的副作用等, 这些化学物质是包括医药学上可接受的载体、食品、天然产物、化学合成药物或人类用药等中的一种或多种; 优选包括医药学上可接受的载体或者食品等中的一种或多种; 进一步优选医药学上可接受的载体。

本文使用的“医药学上可接受的载体”包括任何和所有的生理适用的溶剂、分散介质、胞衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂或吸收延迟剂等中的一种或多种。医药学上可接受载体的例子包括一种或多种的水、盐水、磷酸缓冲盐水、葡萄糖、甘油或乙醇等及其组合物中的一种或多种。在许多情况下, 在该组合物中最好包括等渗剂, 例如, 糖、诸如甘露醇、山梨醇、山梨醇的多元醇或氯化钠等中的一种或多种。医药学上可接受载体还可以包含少量的辅助物质, 例如润湿剂或乳化剂、防腐剂或缓冲液等中的一种或多种, 它们增强了该组合物的有效期或效力。

从具体的分类上看, 所说的医药学上可接受的载体是指医药学领域常规的药物载体, 包括赋形剂, 如淀粉或水等中的一种或多种; 润滑剂, 如甘油或硬脂酸镁等中的一种或多种; 崩解剂, 如微晶纤维素等; 填充剂, 如淀粉或乳糖等中的一种或多种; 粘接剂, 如预胶化淀粉、糊精、纤维素衍生物、藻酸盐、明胶或聚乙烯吡咯烷酮等中的一种或多种; 渗透压调节剂, 如葡萄糖、蔗糖、山梨醇或甘露醇等中的一种或多种; 稀释剂, 如水等; 崩解剂, 如琼脂、碳酸钙或碳酸氢钠等中的一种或多种; 吸收促进剂, 如季铵化合物等; 表面活性剂, 如十六烷醇等; 吸附载体, 如高岭土或皂粘土等中的一种或多种; 润滑剂,

如滑石粉、硬脂酸钙、硬脂酸镁或聚乙二醇等中的一种或多种；另外，还可以在组合物中加入其它辅剂，如香味剂或甜味剂等中的一种或多种。

例如，将二硫苏糖醇溶解、混悬或乳化于适宜的水性溶剂中（例如，蒸馏水、生理盐水或格林溶液等中的一种或多种）或油性溶剂中（例如，植物油例如橄榄油、芝麻油、棉籽油、玉米油或丙二醇等中的一种或多种）中，即可制得注射制剂，其中溶剂中可含有分散剂（例如，聚山梨酯 80、聚氧乙烯硬化蓖麻油 60、聚乙二醇、苯甲醇、氯代丁醇或苯酚等中的一种或多种）、渗透压调节剂（例如，氯化钠、甘油、D9-甘露糖、D-山梨醇或葡萄糖等中的一种或多种）。在这种情况下，如有必要，可加入添加剂，例如增溶剂（例如，水杨酸钠或醋酸钠等中的一种或多种）、稳定剂（例如，人血清白蛋白等）、止痛剂（例如，苯甲醇等）等。

本发明二硫苏糖醇还可以以组合物的形式联合使用，特别是与用其它化学物质如药物对动物尤其是哺乳动物包括人或其他动物进行治疗所用的组合物或者是类似的组合物。所述哺乳动物，包括人、小鼠、大鼠、羊、猴、牛、猪、马、兔、犬、黑猩猩、狒狒、猿、猕猴或恒河猴等中的一种或多种，优选人、小鼠、大鼠、猴、猪、兔或犬等中的一种或多种，进一步优选人、大鼠或猴等中的一种或多种。例如，可以将本发明组合物加入适于给与受治疗者的药用组合物中。通常，该药用组合物包含本发明组合物和药学上可接受的载体。

二硫苏糖醇特别是其药物组合物可以有各种形式，包括例如液体、半固体和固体等剂型形式中的一种或多种；其中所说的药物组合物包括治疗有效量的组合物为活性成分，以及一种或多种医药学上可接受的载体。

该药物组合物可以采用本领域公知的常规生产方法制成各种剂型，例如使活性成分与一种或多种载体混合，然后将其制成所需的剂型。所述的剂型包括片剂、胶囊剂、颗粒剂、混悬剂、乳剂、溶液剂、糖浆剂或注射剂等中的一种或多种，采取口服或注射（包括静脉注射、静脉滴注、肌肉注射或皮下注射等中的一种或多种）、粘膜透析等中的一种或多种给药途径进行白内障及其相关疾病的预防、诊断、检测、保护、治疗或科学研究。

该药物组合物一般必须无菌且在生产储存条件下稳定。可以将该组合物配制成溶液、微乳液、分散液、脂质体或其它适合于高药物浓度的有序结构。通过将所需量的该组合物与所需上述成分的一种或组合一起加入适当的溶剂中并接着进行除菌过滤制备无菌注射液。一般而言，通过将该组合物加入含有基本分散介质和所需的上述其它成分的无菌溶媒中制备分散液。在用于制备无菌注射液的无菌粉剂的情况下，推荐的制备方法是真空干燥和冷冻干燥剂。例如，通过诸如卵磷脂的包衣、在分散液的情况下通过保持所需颗粒大小和通过使用表面活性剂，可以保持溶液的适当流动性。通过在该组合物中包括延迟吸收的

药剂（例如单硬脂酸盐或明胶）可以达到注射组合物的延长吸收。

用于患者时，本发明所述的二硫苏糖醇剂量为 $5\sim 20\text{mg/kg}\cdot\text{d}$ ，该剂量或用量通常根据患者或使用者的年龄和体重以及身体状况或患者症状的状况来决定。

本发明二硫苏糖醇及其药用组合物可以包括“治疗有效量”或“预防有效量”的二硫苏糖醇。“治疗有效量”是指在必要的剂量和时间下有效达到所需治疗效果的量。二硫苏糖醇的治疗有效量可以根据诸如个体的病况、年龄、性别和体重以及该组合物在该个体引起所需反应的能力等因素而变化。治疗有效量亦指该组合物的有益治疗效果超过其任何毒性或有害效果的量。“预防有效量”是指在必要剂量和时间下有效达到所需预防效果的量。因为预防剂量用于患病前或疾病早期的受治疗者，预防有效量通常小于治疗有效量。二硫苏糖醇的治疗或预防有效量的典型的非限制性范围是 $5\sim 20\text{mg/kg}$ ，更优选为 $5\sim 10\text{mg/kg}$ 。应注意，剂量值将根据欲减轻的疾病类型和严重性变化，也就是说用于患者时，二硫苏糖醇的剂量或用量，通常根据患者或使用者的年龄和体重以及身体状况或患者症状的状况来决定。另外，应理解，对于任何特定受治疗者，应随着时间根据个体需要和给与或监督给与所述二硫苏糖醇的人的专业判断调整特定剂量制度，并且本文设定的剂量范围仅为例证性的，并不会限制要求保护的二硫苏糖醇的范围或实践。

也就是说，需要根据治疗的对象、给药途径、所治疗疾病和状况等，变化二硫苏糖醇的每次和/或每日的剂量或用量。例如，经静脉给予哺乳动物，尤其是成年人（如体重 60kg ），所述二硫苏糖醇的单剂量约为 $50\sim 200\text{mg}$ ，优选约 100mg ，优选每日给药 $1\sim 3$ 次。可以调整剂量单位，以提供最佳所需反应（例如，治疗或预防应答）。例如，可以单次大剂量给药，可以在一段时间内给予几个均分量或根据治疗情况的迫切性按比例降低或增加剂量。配制易于给药和剂量统一的剂量单位形式的非肠道组合物尤其有利。本文使用的剂量单位形式，指适于欲治疗的哺乳动物受治疗者的单元剂量的物理分离单位；每个单位含有预定量的计算用于与所需药用载体一同产生所需治疗效果的活性物组合物。本发明的剂量单位形式的规格，由以下确定并直接取决于以下（a）该组合物的独特特征和欲达到的特定治疗或预防效果，和（b）在混合这种用于治疗个体敏感性组合物的技术中的内在限制。

2、二硫苏糖醇及其组合物的药物剂型和给药途径

本发明所述的二硫苏糖醇及其组合物制备的用于预防、诊断、检测、保护、治疗和研究白内障及其相关疾病的产品，其中按照饮料、食品技术领域要求制备的产品能够用于预防、保护和治疗白内障及其相关疾病；按照医药技术领域要求制备的产品能够用于患者的治疗或保健，既能够单独直接用于制备治疗或保健的药物，也能够与许多化学物质进行混合或组合，直接或间接用于制备治疗或保健的药物。这里所述的化学物质与本节上文中所述的相同。

在本发明中，所需物料包括本发明的原料、上述配套使用的化学物质等，均应根据实际情况和需要，采用食品级或药用级的物料。

本发明所述的二硫苏糖醇及其药物组合物，可以用本领域已知的各种方法给药，尽管在许多治疗用途中推荐的给药途径/给药方式是眼药水外用或经球旁注射法行眼内注射法给药。但是，技术人员会理解给药途径/给药方式随所需的结果而变化。在某些具体实施中，该活性化合物可以与保护该化合物免于快速释放的载体一同制备，例如空释制剂，包括移植植物传递系统、透皮贴传递系统或微囊传递系统等中的一种或多种。此外，还可以使用生物可降解的、生物相容性聚合物，例如乙烯乙酸乙酯、聚酐、聚羟基乙酸、胶原蛋白、聚正酯或聚乳酸等中的一种或多种。制备这种制剂的许多方法均已申请专利或一般为本领域技术人员所知（参见例如 Sustained and Controlled release Drug Delivery Systems, J.R.Robinson 编辑，Marcel Dekker, Inc., 纽约，1978）。

本发明二硫苏糖醇及其药物组合物，通常通过眼药水外用或经球旁注射法行眼内注射法给药等中的一种或多种方式，施用于需要这种治疗的患者。

例如，导入途径如下：

(1) 眼药水外用 1：二硫苏糖醇既有抗晶体蛋白交联的作用，又可帮助组合物的其他成分顺利透过晶状体的角膜上皮，并进一步部分渗透到晶状体内层，对较新形成的继发性晶状体纤维起作用；延缓形成水不溶性高分子聚合物，增强晶状体抵抗修饰、变异的能力；维护晶体蛋白的水溶性及晶状体的透光性。

(2) 眼药水外用 2：二硫苏糖醇还可通过与脂质体载体相配伍，形成渗透能力更强的导入药物的方式。含脂质体作为介质，便于将药物渗透过角膜上皮，并进一步渗透于晶状体作用，帮助晶状体内层已形成高分子聚合物（简称：HM）的蛋白成分缓解相互交联的压力，部分恢复水溶性状态；协助新生成的 βB_2 等蛋白增强抵抗修饰、变异的能力，维护蛋白的水溶性及晶状体的透光性。

(3) 球旁注射法：对于较为严重的老年性白内障患者，亦可采用经球旁注射法行眼内注射法，缓解症状。

如果要用于口服时，可将其制成常规的固体制剂如片剂、粉剂、粒剂或胶囊等中的一种或多种。在实施时，本发明二硫苏糖醇可以与例如惰性稀释剂或可同化的食用载体一同口服。二硫苏糖醇（和其它成分，如果需要）亦可以包于硬或软壳明胶胶囊、压制成片剂或直接加入受治疗者的膳食中。关于口服治疗给药，可以将二硫苏糖醇与赋形剂一起加入并以可食片剂、颊含片剂、锭剂、胶囊、悬液、糖浆或糯米纸囊剂等等中的一种或多种形式使用。

为了以非肠道给药之外给予本发明二硫苏糖醇，可能需要用防止其失活的材料对该组

合物包衣或与该组合物一同给予。亦可以将补充的活性化合物加入该组合物中。在具体实施时,将本发明二硫苏糖醇与一种或多种可以用于治疗疾病的其它治疗药物共配制和/或共给予。这种联合使用,可以优越地利用较低剂量的该给予的治疗药物,因此避免可能的毒性或与各种单一疗法相关的并发症。

如果要制成液体制剂如水剂、油悬浮剂或其它液体制剂中的一种或多种,如糖浆、酏剂或酞剂等中的一种或多种;用于肠胃外给药时,可将其制成注射用的溶液剂、水剂或油性悬浮剂等中的一种或多种。

以上所述的使用形式中,优选的形式是滴眼剂或注射剂等中的一种或多种,进一步优选滴眼剂外用给药。

本发明的主要适合对象是中老年人群,选择滴眼剂用于预防,则每天滴眼一次,抑制蛋白变性、延缓晶体老化、控制老年性白内障于初发期。

综上所述,本发明对二硫苏糖醇进行了理论探索,经过大量的实验研究特别是长期的药理学试验,发现所述及的二硫苏糖醇有显著的预防、诊断、检测、保护、治疗和研究白内障及其相关疾病的活性。因此,二硫苏糖醇特别是其药物组合物可用于制备抗白内障产品,优选药物和食品,进一步优选以本发明组合物为原料制备而成的药物。

在本发明中,以上所述的具体实施方式和以下的实施例是为了更好地阐述本发明,并不是用来限制发明的范围。

下面通过实施例对本发明作详细描述。

实施例 1、热诱导变性实验

本发明用热诱导变性实验,分析 βB_2 的生物化学特性;探讨 βB_2 的受热变性的敏感性程度、 βB_2 对于其它蛋白受热聚集变性的影响(类比 α 族晶体蛋白的分子伴侣作用)以及特殊化合物二硫苏糖醇对于 βB_2 晶体蛋白热变性的保护作用。

(一) 材料和方法

1. **试剂:**乙醇脱氢酶(简称:ADH)、DTT 购自Sigama 公司; βB_2 晶体蛋白为本室自行表达、纯化。

2. **仪器:**Bio-Rad Smartspec3000型光度计;DK-60型电热恒温水槽;1.0ml石英比色杯(下部为狭缝池,0.5ml即可比色检测)。

3. 蛋白溶液配制:

(1) 0.4mg/ml ADH、DTT、Lysozyme、牛血清白蛋白(简称:BSA) 溶液配制:分析天平准确称取化合物纯品,用0.1M PBS缓冲液溶解并定容;用市售蛋白定量检测试剂盒检测比对。

(2) 0.4mg/ml βB_2 晶体蛋白溶液配制:本室自行表达、纯化的 βB_2 晶体蛋白溶液,采

用上述同种市售蛋白定量检测试剂盒定量测定。

(3) 以上述蛋白浓溶液为基础，稀释成不同浓度并按实验要求配成不同混合液。

4. 检测：分别将蛋白溶液以及蛋白混合液各0.5ml，加入1.0ml石英杯中，以未加热前液体的吸光度调整零点；样品置于50℃恒温水槽，保温5min，取出立即检测溶液吸光度（简称：OD）改变；依次循环保温、检测，持续50~60min；仪器可以同时选择设定三个波长（参照有关文献，本实验设定为360nm；450nm；532nm）进行检测。

（二）结果

1、 β B₂晶体蛋白热不稳定性及与其它几种蛋白受热聚集变性程度比较：

(1) β B₂晶体蛋白50℃孵育5min后，即发生较明显混浊，表现为受热变性的高敏感特性。

(2) ADH相对于 β B₂晶体蛋白热变性程度稍差，但远不及BSA及Lysozyme稳定。

(3) BSA及Lysozyme在50℃孵育50min，基本未发生明显变性（见：表2、图1）。

表2、 β B₂晶体蛋白与其它几种蛋白受热聚集变性比较

时间 (min)	A360nm			
	betaB ₂ (0.2mg)	ADH (0.2mg)	Lysozyme (0.2mg)	BSA (0.2mg)
0	0	0	0	0
5	0.404	0.035	0.003	0.001
10	0.635	0.104	0.005	0.001
15	0.744	0.167	0.005	0.001
20	0.828	0.256	0.009	0.003
25	0.87	0.346	0.01	0.008
30	0.908	0.4	0.011	0.002
35	0.914	0.423	0.014	0.005
40	0.912	0.437	0.017	0.005
45	0.9	0.438	0.014	0.008
50	0.914	0.432	0.016	0.008

2、 β B₂晶体蛋白对于ADH受热聚集效应的影响：

(1) β B₂晶体蛋白以及ADH有关的五种蛋白溶液，在50℃加热至10min左右，均开始出现混浊，OD值开始明显升高（见：表3）。

(2) 加入 β B₂晶体蛋白对ADH热聚集产生协同促进作用（见：图2）。

(3) β B₂晶体蛋白浓度对于ADH热聚集作用具有剂量依赖性，加入 β B₂量越大越容易导致ADH溶液快速出现蛋白沉淀及两相分离（见：图2）。

3、DTT对于ADH受热聚集效应的影响（筛选对 β B₂晶体蛋白的保护性化合物）：

(1) ADH的热稳定性较 β B₂晶体蛋白强，50℃加热10min后，吸光度开始增加，但

远低于βB₂晶体蛋白的吸光度增加值（见：表4、图3）。

（2） DTT对于ADH受热聚集效应具抑制作用：相应减少吸光度值及延长出现峰值的时间（见：表4、图3）。

（3） DTT对于ADH受热聚集效应具剂量依赖性：ADH：DTT为5：1时，已可极有效抑制ADH受热变性（见：表4、图3）。

表3、不同βB₂晶体蛋白含量对于ADH受热聚集效应的影响

时间 (min)	A360nm				
	betaB ₂ (0.2mg)	ADH (0.2mg)	ADH+betaB ₂ (0.026mg)	ADH+betaB ₂ (0.052mg)	ADH+betaB ₂ (0.1mg)
0	0	0	0	0	0
5	0.471	0.112	0.165	0.333	0.808
10	0.583	0.339	0.591	0.762	0.949
15	0.667	0.481	0.644	0.706	0.831
20	0.678	0.502	0.652	0.409	0.509
25	0.742	0.502	0.595		0.369
30	0.741	0.502	0.368		
35	0.742	0.455			
40	0.745				
45	0.74				
50	0.762				
55	0.759				
60	0.76				

表4、不同DTT含量对于ADH受热聚集效应的影响

时间 (min)	A360nm		
	ADH	ADH+DTT (10: 1)	ADH+DTT (5: 1)
0	0	0	0
5	0.035	0.023	0.013
10	0.104	0.052	0.022
15	0.167	0.098	0.028
20	0.256	0.134	0.039
25	0.346	0.164	0.062
30	0.4	0.199	0.066
35	0.423	0.23	0.083
40	0.437	0.257	0.099
45	0.438	0.281	0.111
50	0.432	0.29	0.135

4、DTT对于β B₂晶体蛋白受热聚集效应的影响：

- (1) β B₂晶体蛋白溶液受热5min，即发生明显变性；受热15min时，吸光度达最大值；其后吸光度逐渐下降，并出现蛋白小颗粒与缓冲液水相的缓慢相分离（见：表5、图4）。
- (2) DTT对于β B₂晶体蛋白溶液的热变性效应具有有效的抑制作用：一方面，表现为相应的吸光度值减小；另一方面，表现在延迟蛋白与水相的相分离时间（见：表5、图4）。
- (3) DTT对于β B₂晶体蛋白溶液的热变性效应具有剂量依赖性：β B₂与DTT含量比值为25：1时，抑制效应较低，已基本接近单纯β B₂水平；当比值为12.5：1～ 5：1范围内，可有效抑制β B₂热变性；当比值为2.5：1时，DTT可保护β B₂晶体蛋白在50℃孵育50min后，仍未见明显热变性聚集作用，蛋白溶液保持清亮、透明（见：表5、图4）。

表5、不同DTT含量对于βB₂晶体蛋白受热聚集效应的影响

时间 (min)	A360nm					
	βB2	βB2+DTT	βB2+DTT	βB2+DTT	βB2+DTT	βB2+DTT
		(25: 1)	(12.5: 1)	(5: 1)	(2.5: 1)	(2: 1)
0	0	0	0	0	0	0
5	0.332	0.045	0.051	0.007	0.002	0.004
10	0.449	0.284	0.151	0.073	0.01	0.003
15	0.467	0.391	0.173	0.135	0.014	0.009
20	0.468	0.405	0.191	0.168	0.014	0.005
25	0.463	0.412	0.208	0.188	0.017	0.003
30	0.465	0.417	0.225	0.201	0.02	0.003
35	0.457	0.427	0.243	0.211	0.014	0.004
40	0.455	0.425	0.242	0.236	0.021	0.007
45	0.452	0.429	0.244	0.221	0.024	0.004
50	0.44	0.42	0.246	0.217	0.018	0.003

(三) 讨论

文献报道，β L组分的晶体蛋白（主要包括：β A_{1/3}、β A₂、β A₄及β B₂、β B₃），易受热变性，若没有α族晶体蛋白的伴侣蛋白保护，置于50℃孵育10分钟，即可导致蛋白变性（Hejtmancik JF, Wingfield PT, Sergeev YV. Beta-crystallin association. Exp Eye Res. 2004 Dec; 79(6): 377-383; Bateman OA, Sarra R, van Genesen ST, et al. The stability of human acidic beta-crystallin oligomers and hetero-oligomers. Exp Eye Res. 2003 Oct; 77(4): 409-422），表现为发生热聚集及散射光强度的增加；β B₂作为β族蛋白中的主要成分（Bloemendal H, de Jong W, Jaenicke R, et al. Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins. Prog Biophys Mol Biol. 2004 Nov; 86(3): 407-485），现有文献中有的报道十分稳定（Zhang Z, David LL, Smith DL, et al. Resistance of human betaB2-crystallin to in vivo modification. Exp

Eye Res. 2001Aug; 73(2): 203-211; Zhang Z, Smith DL, Smith JB. Human beta-crystallins modified by backbone cleavage, deamidation and oxidation are prone to associate. Exp Eye Res. 2003 Sep; 77(3): 259-272), 而更多地则认为 βB_2 十分不稳定 (Srivastava OP, Srivastava K. βB_2 -crystallin undergoes extensive truncation during aging in human lenses. BRC, 2003Jan; 301(1): 44-49; Miesbauer LR, Zhou X, Yang Z, et al. Post-translational modifications of water-soluble human lens crystallins from young adults. J Biol Chem. 1994 Apr 29; 269(17): 12494-12502; Sathish HA, Koteiche HA, McHaourab HS. Binding of destabilized betaB2-crystallin mutants to alpha-crystallin: the role of a folding intermediate. J Biol Chem. 2004 Apr 16; 279(16): 16425-16432)。在本发明的实验条件下, βB_2 表现为极易受热聚集变性、 βB_2 的加入还对 ADH 等蛋白的热不稳定性产生明显协同促进作用。但值得注意的是, 该组分同其他蛋白组分之间的相互比例, 将对蛋白的热变性程度产生重大影响。

从晶体蛋白结构考虑, 似乎也支持 βB_2 的热不稳定性。因为, 在所有 β 族晶体蛋白中, βB_2 所含的半胱氨酸 (Cys) 数量最少 (仅有3个), 而其他 β 族成分含 Cys 数量 (4~8 个 Cys) 均超过 βB_2 , Cys 基团含有极易被氧化的巯基, 在受热环境中易遭受氧化修饰, 形成二硫键, 导致蛋白质间的交联, 影响其水溶性, 并容易导致热聚集, 从而表现出热不稳定性。

βB_2 保持其水溶性的重要性在于: 作为 β 族晶体蛋白中含量最多的一种结构蛋白, 保持其水溶性不仅有利于维持晶状体的透光性, 而且通过与其他 β 晶体蛋白分子间亚基交换, 有助于保持其他 β 族晶体蛋白成分的水溶性 (Bloemendal H, de Jong W, Jaenicke R, et al. Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins. Prog Biophys Mol Biol. 2004 Nov; 86(3): 407-485; Zhang Z, Smith DL, Smith JB. Human beta-crystallins modified by backbone cleavage, deamidation and oxidation are prone to associate. Exp Eye Res. 2003 Sep; 77(3): 259-272)。

本实验研究的最重要的发现, 在于加入适量 (βB_2 : DTT 为 12.5: 1~5: 1 范围内) 的 DTT 可以有效抑制 βB_2 的热聚集变性; 而抑制 βB_2 晶体蛋白从水溶性向水不溶性的转变, 则是抑制老年性白内障的有效措施之一。

实施例 2、针对靶蛋白设计的产品配方之一

牛磺酸	11mmol/L (即: 1376mg/L)
赖氨酸	12mmol/L (即: 1752mg/L)
二硫苏糖醇	2.5mmol/L (即: 385mg/L);

由牛磺酸、游离赖氨酸和二硫苏糖醇为组合物, 如果配成外用滴眼液, 则每天 1~3

次，每次1滴。

实施例3、针对靶蛋白设计的产品配方之二

牛磺酸	111mmol/L（即：13765mg/L）
赖氨酸	120mmol/L（即：17520mg/L）
二硫苏糖醇	0.25mmol/L（即：38mg/L）；

由牛磺酸、游离赖氨酸和二硫苏糖醇为组合物，如果配成外用滴眼液，则每天1~3次，每次1滴。

实施例4、针对靶蛋白设计的产品配方之三

阿司匹林	11mmol/L（即：2048mg/L）
赖氨酸	12mmol/L（即：1752mg/L）
二硫苏糖醇	0.25mmol/L（即：38mg/L）；

由阿司匹林、游离赖氨酸和二硫苏糖醇为组合物，如果配成外用滴眼液，则每天1~3次，每次1滴。

实施例5、针对靶蛋白设计的产品配方之四

阿司匹林	111mmol/L（即：20477mg/L）
赖氨酸	120mmol/L（即：17520mg/L）
二硫苏糖醇	2.5mmol/L（即：385mg/L）；

由阿司匹林、游离赖氨酸和二硫苏糖醇为组合物，如果配成外用滴眼液，则每天1~3次，每次1滴。

实施例6、针对靶蛋白设计的产品配方之五

牛磺酸	11mmol/L（即：1376 mg/L）
赖氨酸	23mmol/L（即：3358 mg/L）
二硫苏糖醇	2.5mmol/L（即：385mg/L）
阿司匹林	11mmol/L（即：2048mg/L）；

由阿司匹林、牛磺酸、游离赖氨酸和二硫苏糖醇为组合物，如果配成外用滴眼液，则每天3~5次，每次1滴。

实施例7、针对靶蛋白设计的产品配方之六

牛磺酸	111mmol/L（即：13765mg/L）
-----	------------------------

赖氨酸 230mmol/L (即: 33580mg/L)

二硫苏糖醇 2.5mmol/L (即: 385mg/L)

阿司匹林 111mmol/L (即: 20477mg/L);

由阿司匹林、牛磺酸、游离赖氨酸和二硫苏糖醇为组合物, 如果配成外用滴眼液, 则每天3~5次, 每次1滴。

实施例8、针对靶蛋白设计的产品配方之七

阿司匹林 11mmol/L (即: 2048mg/L)

赖氨酸 12mmol/L (即: 1752mg/L)

二硫苏糖醇 0.25mmol/L (即: 38mg/L)

谷胱甘肽 111mmol/L (即: 33916mg/L);

由阿司匹林、游离赖氨酸、二硫苏糖醇和谷胱甘肽为组合物, 如果配成外用滴眼液, 则每天3~5次, 每次1滴。

实施例9、针对靶蛋白设计的产品配方之八

阿司匹林 111mmol/L (即: 20477mg/L)

赖氨酸 120mmol/L (即: 17520mg/L)

二硫苏糖醇 0.25mmol/L (即: 38mg/L)

谷胱甘肽 11mmol/L (即: 3392mg/L);

由阿司匹林、游离赖氨酸、二硫苏糖醇和谷胱甘肽为组合物, 如果配成外用滴眼液, 则每天3~5次, 每次1滴。

实施例10、针对靶蛋白设计的产品配方之九

牛磺酸 11mmol/L (即: 1376mg/L)

赖氨酸 12mmol/L (即: 1752mg/L)

二硫苏糖醇 2.5mmol/L (即: 385mg/L)

谷胱甘肽 111mmol/L (即: 33916mg/L);

由牛磺酸、游离赖氨酸、二硫苏糖醇和谷胱甘肽为组合物, 如果配成外用滴眼液, 则每天3~5次, 每次1滴。

实施例11、针对靶蛋白设计的产品配方之十

牛磺酸 111mmol/L (即: 13765mg/L)

赖氨酸 120mmol/L (即: 17520mg/L)

二硫苏糖醇 2.5mmol/L (即: 385mg/L)

谷胱甘肽 111mmol/L (即: 33916mg/L);

由牛磺酸、游离赖氨酸、二硫苏糖醇和谷胱甘肽为组合物, 如果配成外用滴眼液, 则每天3~5次, 每次1滴。

实施例 12、针对靶蛋白设计的产品配方之十一

牛磺酸 11mmol/L (即: 1376mg/L)

赖氨酸 23mmol/L (即: 3358mg/L)

二硫苏糖醇 0.25mmol/L (即: 38mg/L)

谷胱甘肽 11mmol/L (即: 3392mg/L)

阿司匹林 11mmol/L (即: 2048mg/L);

由阿司匹林、牛磺酸、游离赖氨酸、二硫苏糖醇和谷胱甘肽为组合物, 如果配成外用滴眼液, 则每天3~5次, 每次1滴。

实施例 13、针对靶蛋白设计的产品配方之十二

牛磺酸 111mmol/L (即: 13765mg/L)

赖氨酸 230mmol/L (即: 33580mg/L)

二硫苏糖醇 2.5mmol/L (即: 385mg/L)

谷胱甘肽 11mmol/L (即: 3392mg/L)

阿司匹林 111mmol/L (即: 20477mg/L);

由阿司匹林、牛磺酸、游离赖氨酸、二硫苏糖醇和谷胱甘肽为组合物, 如果配成外用滴眼液, 则每天3~5次, 每次1滴。

实施例 14、针对靶蛋白设计的产品配方的组合物制备滴眼液的方法

取上述得到针对靶蛋白设计的产品配方的组合物 45g, 加入猪胆膏 20g、马来酸氯苯那敏 0.5g、鱼腥草素钠 8g, 加入蒸馏水稀释 10 倍, 滤去不容物, 装瓶, 灭菌, 封口即得组合物滴眼液。

实施例 15、二硫苏糖醇滴眼液的制备

取二硫苏糖醇 45g, 加入猪胆膏 20g、马来酸氯苯那敏 0.5g、鱼腥草素钠 8g, 加入蒸馏水稀释 10 倍, 滤去不容物, 装瓶, 灭菌, 封口即得组合物滴眼液。

实施例 16、二硫苏糖醇粉针剂的制备

取二硫苏糖醇 30g，加入右旋糖苷 30g，加 500ml 注射用水，搅拌使其溶解；加注射用水至 2000ml，加 3.0g 针用活性炭，充分搅拌 30 分钟；脱炭过滤；用 0.22μm 微孔滤膜过滤；灌装到无菌的西林瓶中，每瓶 2ml，半轧塞；冷冻干燥，再压塞轧盖即可。

实施例 17、二硫苏糖醇粉针剂的制备

(1) 处方

注射用二硫苏糖醇	150g
甘露醇	400g
注射用水	加至 10000ml
<hr/>	
共制成	10000 瓶

(2) 制备工艺

按以上处方称取处方量二硫苏糖醇，加入到适量注射用水中，搅拌使其溶解；加入处方量甘露醇，搅拌使完全溶解，加注射用水至全量；加入液体量的 0.1%针用活性炭，充分搅拌 30 分钟；脱炭过滤；用 0.22μm 微孔滤膜过滤；灌装，半轧塞；冷冻干燥，压塞轧盖。共制得 9735 瓶，成品率为 97.35%。

实施例 18、二硫苏糖醇粉针剂的制备

取二硫苏糖醇 60g，加 500ml 注射用水，搅拌使其溶解；加注射用水至 1000ml，加 1g 针用活性炭，充分搅拌 30 分钟；脱炭过滤；用 0.22μm 微孔滤膜过滤；冷冻干燥得无菌粉末，分装成 1000 瓶。

实施例 19、二硫苏糖醇粉针剂的制备

取二硫苏糖醇 40g，加入乳糖 50g，加 100ml 注射用水，搅拌使其溶解；加注射用水至 1000ml，加 1.5g 针用活性炭，充分搅拌 30 分钟；脱炭过滤；用 0.22μm 微孔滤膜过滤；喷雾干燥得无菌粉末，分装成 1000 瓶。

实施例 21、二硫苏糖醇小针剂的制备

取二硫苏糖醇 5g，加 100ml 注射用水，搅拌使其溶解；加注射用水至 1000ml，用 0.22μm 微孔滤膜过滤；分装灌封，每瓶 10ml，灭菌即可。

实施例 22、二硫苏糖醇小针剂的制备

取二硫苏糖醇 10g，加入丙二醇 30g，加 200ml 注射用水，搅拌使其溶解；加注射用水至 1000ml，加 1.5g 针用活性炭，充分搅拌 30 分钟；脱炭过滤；用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤；分装灌封，每瓶 5ml，灭菌即可。

备注：在本发明的图、表中的beta均表示： β ；

BSA均表示：牛血清白蛋白；

ADH均表示：乙醇脱氢酶；

Lysozyme均表示：溶菌酶；

DTT均表示：二硫苏糖醇；

Min均表示：分钟；

A360nm均表示：波长在360纳米（简称：nm）处。

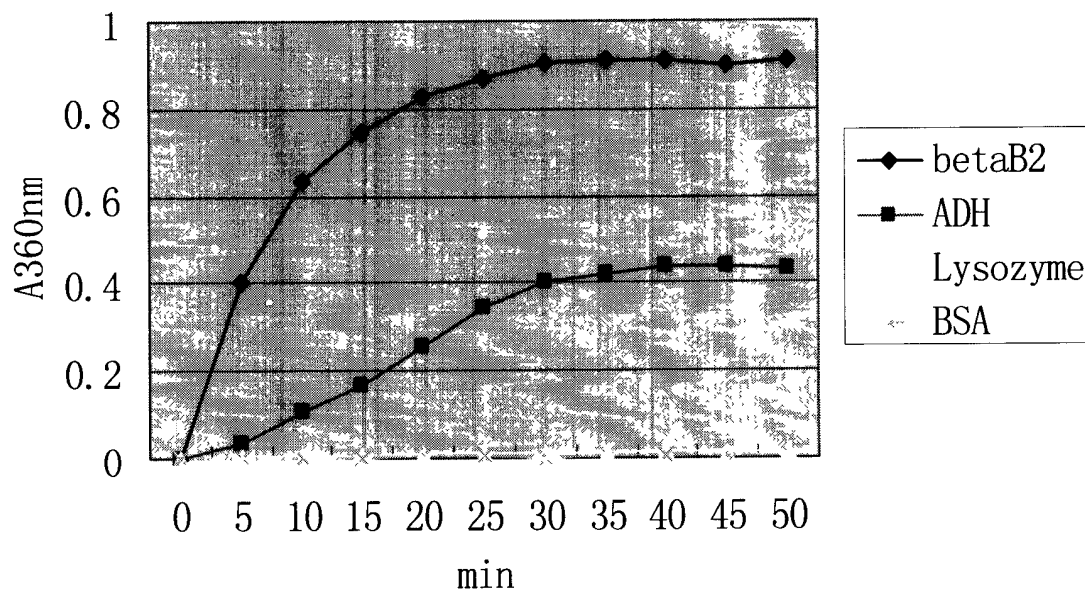


图 1

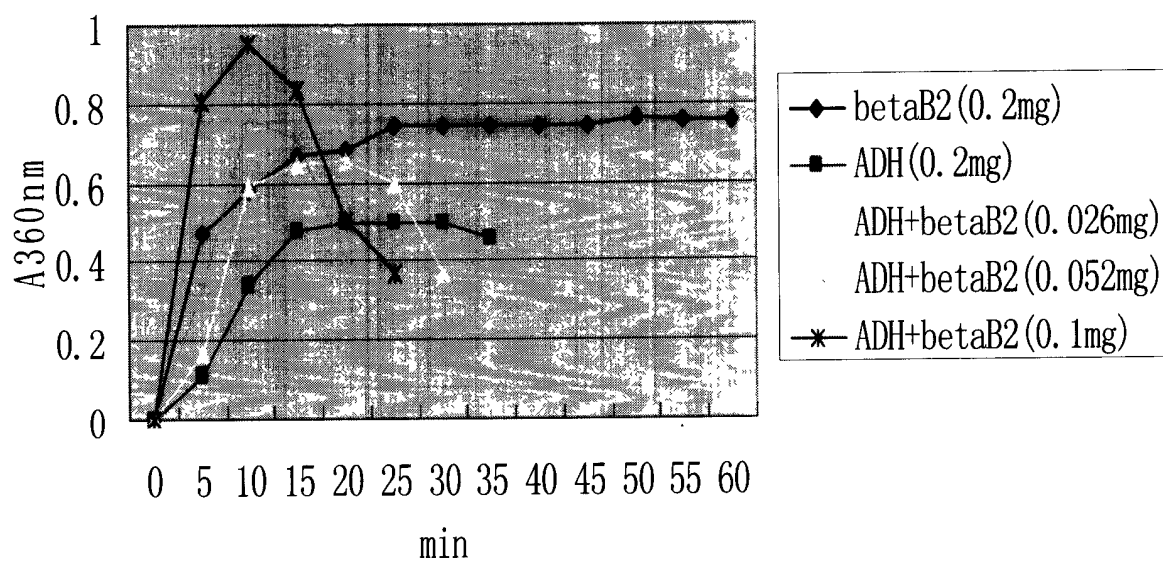


图 2

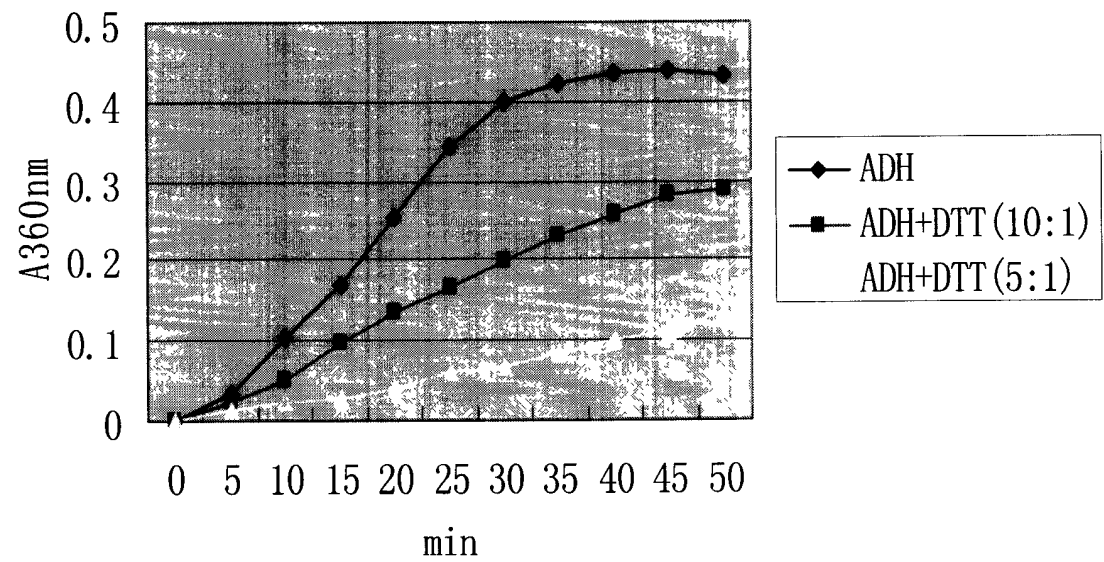


图 3

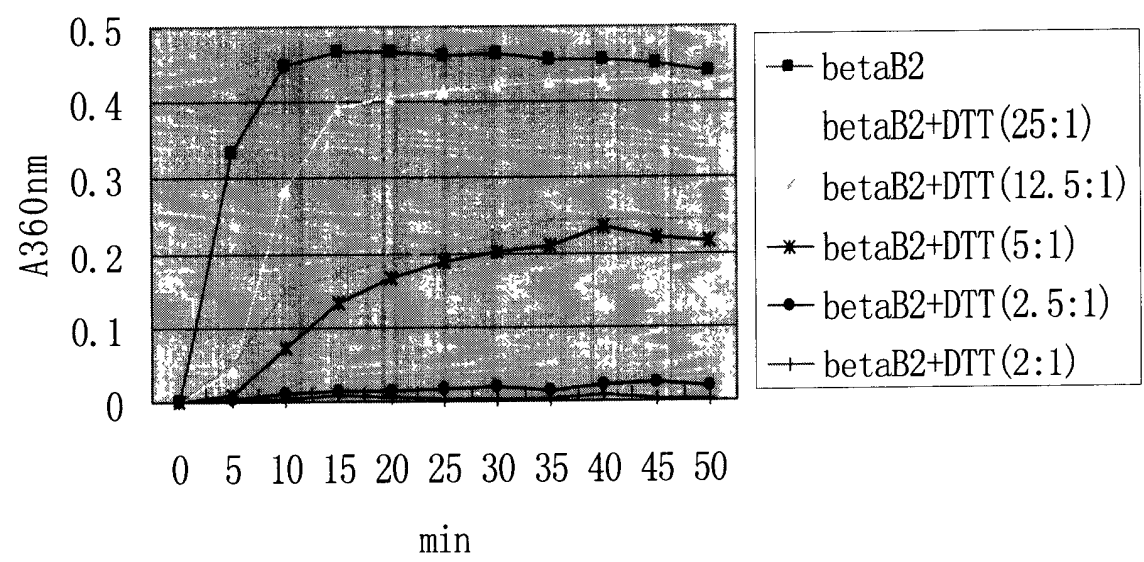


图 4