



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 96121930.0

[43]公开日 1997 年 6 月 18 日

[11] 公开号 CN 1151894A

[22]申请日 96.10.12

[30]优先权

[32]95.10.13[33]JP[31]291993 / 95

[71]申请人 千寿制药株式会社

地址 日本大阪府

[72]发明人 井上惠里

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张元忠

权利要求书 2 页 说明书 28 页 附图页数 5 页

[54]发明名称 药物组合物

[57]摘要

本发明涉及含有作为活性成分的诱导晶状体细胞损伤免疫反应之晶状体抗原或能够表达诱导晶状体细胞损伤免疫反应的晶状体抗原之微生物的药物组合物。本发明的含有作为活性成分的晶状体抗原或能够表达所述抗原之微生物的药物组合物对抗晶状体蛋白质抗体滴度的升高显示出明显的抑制作用。因此，它极有可能有效地治疗或预防白内障，并阻止白内障的发生。所以，本发明组合物对于白内障患者和白内障的潜在患者非常有用。

权 利 要 求 书

1 .一种药物组合物, 该组合物含有作为活性成分的诱导晶状体细胞损伤免疫反应的晶状体抗原。

2 .权利要求1 的药物组合物, 该组合物是一种抑制抗晶状体蛋白质抗体增加的抑制剂。

3 .权利要求1 或2 的药物组合物, 其中所述晶状体抗原含有其氨基酸序列是序列表中SEQ ID NO: 1 所示的至少2 -6 位氨基酸的表位。

4 .权利要求1 或2 的药物组合物, 其中所述晶状体抗原含有其氨基酸序列为序列表中SEQ ID NO: 8 所示的至少1 6 2 -1 6 6 位氨基酸的表位。

5 .权利要求1 -4 中任一药物组合物, 其中所述晶状体抗原是晶状体晶状蛋白或晶状体膜肽。

6 .权利要求1 或2 的药物组合物, 其中的活性成分是动物晶状体匀浆或晶状表皮细胞的匀浆。

7 .一种药物组合物, 该组合物含有作为活性成分的能够表达诱导晶状体细胞损伤免疫反应的晶状体抗原之微生物。

8 .权利要求7 的药物组合物, 该组合物是一种抑制抗晶状体蛋白质抗体增加的抑制剂。

9 .权利要求7 或8 的药物组合物, 该组合物为适于肠道内施用的剂型。

1 0 .权利要求1 -9 中的任一药物组合物, 该组合物是治疗、 预防或延缓白内障发生的药剂。

1 1 .一种抑制抗晶状体蛋白质抗体增加的方法, 该方法包括施用选自由诱导晶状体细胞损伤免疫反应之晶状体抗原和能够表达诱导晶状体细胞损伤免疫反应的晶状体抗原之微生物组成的组的活性成分。

1 2 .权利要求1 1 的方法, 其中所述晶状体抗原含有其氨基酸序列为序列表中SEQ ID NO: 1 所示至少2 -6 位氨基酸的表位。

1 3 .权利要求1 1 的方法, 其中所述晶状体抗原含有其氨基酸序列为序列表中SEQ ID NO: 8 所示至少1 6 2 -1 6 6 位氨基酸。

1 4 .权利要求1 1 的方法, 其中所述晶状体抗原是晶状体晶状蛋白或晶状体膜肽。

1 5 .权利要求1 2 的方法, 其中所述晶状体抗原是晶状体晶状蛋白或晶状体膜肽。

1 6 .权利要求1 3 的方法, 其中所述晶状体抗原是晶状体晶状蛋白或晶状体膜肽。

1 7 .权利要求1 1 的方法, 其中的活性成分是动物晶状体匀浆或晶状体表皮细胞的匀浆。

1 8 .权利要求1 1 的方法, 其中的活性成分是能够表达诱导晶状体细胞损伤免疫反应的晶状体抗原之微生物, 并且是适于肠道内施用的剂型。

1 9 .一种治疗, 预防或阻止白内障发生的方法, 该方法包括施用选自由诱导晶状体细胞损伤免疫反应之晶状体抗原和能够表达诱导晶状体细胞损伤免疫反应的晶状体抗原之微生物组成的组的活性成分。

2 0 . 选自由诱导晶状体细胞损伤免疫反应之晶状体抗原和能够表达诱导晶状体细胞损伤免疫反应的晶状体抗原之微生物组成的组的活性成分在制备抑制抗晶状体蛋白质抗体增加的抑制剂上的用途。

2 1 .权利要求2 0 的用途, 其中所述晶状体抗原含有其氨基酸序列为序列表中SEQ ID NO: 1 所示的至少2 -6 位氨基酸的表位。

2 2 .权利要求2 0 的用途, 其中所述的晶状体抗原含有其氨基酸序列为序列表中SEQ ID NO: 8 所示的至少1 6 2 -1 6 6 位氨基酸的表位。

2 3 .权利要求2 0 -2 2 的任意一个的用途, 其中所述晶状体抗原是晶状体晶状蛋白或晶状体膜肽。

2 4 .权利要求2 0 的用途, 其中的活性成分是动物晶状体匀浆或晶状体表皮细胞匀浆。

2 5 .权利要求2 0 的用途, 其中的活性成分是能够表达诱导晶状体细胞毒性免疫反应的晶状体抗原之微生物, 并且是适于肠道内施用的剂型。

2 6 .权利要求2 0 -2 5 中的任意一个用途, 其中的抑制剂是用于治疗、预防或延缓白内障发生的药剂。

说明书

药物组合物

本发明涉及含有以晶状体 (lens) 抗原或能够表达所述抗原之微生物作为活性成分的药物组合物。更确切地说, 本发明涉及抗晶状体蛋白抗体增加之抑制剂。本发明进一步涉及用于治疗、预防或阻止白内障的药剂。

白内障是一种与各种因素引起晶状体变得不透明而致视力逐渐丧失有关的严重疾病。它表现出因晶状体混浊所引起的视力障碍症状。

白内障目前通过施用各种药物来治疗。但是, 这类药物的应用并非完全令人满意, 其部分原因是因为还没有彻底阐明白内障的病因学。所以, 白内障的治疗在当今最终依靠手术疗法。所述的外科手术治疗包括将晶状体核和晶状体皮质从晶状体膜内摘除, 或者从眼睛中剜除整个混浊晶状体。然而, 外科手术治疗通常产生并发症, 而且这些并发症是病人难以承受的, 因为即使目前技术水平的外科技术进行手术也不可避免地要切开和缝合晶状体皮质。

总之, 白内障的病因学还未得到完全地阐述, 而其用于治疗的药剂又不令人满意。外科手术治疗对病人会伴随产生极大的负担。

因此, 本发明的目的是提供用于治疗白内障等的新药物组合物。

根据本发明现已发现, 施用能诱导晶状体细胞损伤性免疫反应的晶状体抗体 (这类抗原在下文有时被简称为本发明的晶状体抗原) 引起血浆中抗晶状体蛋白抗体增加的抑制作用。如下文所述的实施例1 和2 所示, 白内障是由于晶状体蛋白质所致自身免疫产生晶状体上皮细胞损害引起的。因此, 本发明的晶状体蛋白质或能够表达所述抗体的微生物适用于治疗、预防或阻止白内障发生。

因此, 本发明提供了含有以能够诱导晶状体细胞损伤性免疫反应之晶状体抗原作为活性成分的药物组合物; 确切地说, 提供了抗晶状体蛋白质抗体增加的抑制剂。更具体地说, 本发明提供了包括含有具有序列表中SEQ ID NO: 1 所描述的2 -6 号氨基酸之氨基酸序列或序列表中SEQ ID NO: 8 所描述的162 -166 号氨基酸之氨基酸序列的表位的晶状体抗体之药物组合物。具体地说, 所提供的药物组合物中晶状体抗原是晶状体晶状蛋白或晶状体膜肽。本发明的晶状体膜肽包括存在于晶状体膜中或膜上的所有肽,

并且包括构成晶状体膜蛋白的肽或存在于晶状体膜中的受体。

本发明还进一步提供了以动物晶状体匀浆作为活性成分的药物组合物。

本发明还提供了含有以能够表达诱导晶状体细胞损害性免疫反应之晶状体抗原的微生物作为活性成分的药物组合物；具体地说，提供了抗晶状体蛋白质抗体增加的抑制剂，更确切地说，提供了含有适于肠道施用形式之所述活性成分的药物组合物。

本发明还提供了用于治疗、预防和阻止白内障发生的上述药物组合物。

本发明还提供了抑制抗晶状体蛋白抗体增加的方法，包括施用选自由诱导晶状体细胞损伤性免疫反应之晶状体抗原和能够表达诱导晶状体细胞损伤性免疫反应之晶状体抗原的微生物组成的组的活性成分。

本发明还提供了将选自由诱导晶状体细胞损伤免疫反应之晶状体抗原和能够表达诱导晶状体细胞损伤性免疫反应之晶状体抗原的微生物组成的组的活性成分用于制备抗晶状体蛋白质抗体增加的抑制剂。

图1 (A) 和1 (B) 为显示用 β_{H} 晶状蛋白对小鼠进行初始免疫后的第5周之晶状体上皮细胞的光学显微镜照片。

图2 是表示用ELISA法测得的初始免疫后第5周小鼠血清（被稀释10,000倍）中的抗 β_{H} -晶体蛋白抗体滴度的图示。

图3 是表示用ELISA法测得从免疫前的26天至初次免疫的当天口服晶状体匀浆的小鼠在初次免疫后的第2、3、4或5周血清（稀释10,000倍）中的抗 β -晶状蛋白抗体滴度的图示。

图4 是表示ELISA法测得从免疫前的26天至初次免疫后的34天口服晶状体匀浆的小鼠在初次免疫后的第2、3、4或5周血清（稀释10,000倍）中的抗 β -晶状蛋白抗体滴度的图示。

图5 是表示用ELISA法测得从初次免疫的当天至初次免疫后的34天口服晶状体匀浆的小鼠在初次免疫后的第2、3、4或5周血清（稀释10,000倍）中的抗 β -晶状蛋白抗体滴度的图示。

在本发明中，晶状体抗原是指晶状体中的抗原物质或与所述抗原物质具有相同抗原决定簇（表位）的物质。其实例包括存在于晶状体组织中的蛋白质，如晶状体晶状蛋白（如 α 、 β 和 γ 晶状蛋白）、晶状体膜蛋白[如主要膜内在蛋白（MIP）和表皮上皮蛋白（EEP）]和晶状体膜上受体的组成肽。它

们可以是天然存在的，或者是合成的。天然存在的物质可以是分离的，或是含有所述分离物的物质。这类含有分离物的物质包括例如晶状体匀浆和晶状体上皮细胞匀浆。

天然存在的晶状体抗原不限于衍生物方面，但可以是衍生于哺乳动物（如人、牛、马、猪和羊）或能够表达晶状体抗原的微生物。

晶状体晶状蛋白是能诱导晶状体细胞损伤性免疫反应的典型晶状体抗原。在用晶状蛋白进行免疫前和/或后给哺乳动物施用本发明的晶状体抗原导致免疫耐受，后者能够抑制血清中抗晶状体蛋白质抗体滴度的升高。在下面的实验性实施例7中详细地描述了抑制作用。

本发明的晶状体抗原的表位并没有特别的限制，只要它具有提供产生晶状体细胞损伤性抗体之免疫原性的氨基酸序列。具体的例子包括序列表中S E Q I D N O: 1 所描述的氨基酸序列（2 - 6 位氨基酸）和序列表中S E Q I D N O: 8 所描述的氨基酸序列（1 6 2 - 1 6 6 位氨基酸）。具有这类氨基酸序列的肽包括来源于晶状体的人 β -晶状蛋白和大肠杆菌、沙门氏杆菌及酵母的拓扑异构酶、大麦条纹镶嵌型病毒的17KD蛋白、流感病毒的HF-1蛋白和非晶状体来源的其它物质。表位的鉴定在下文的实验性实施例3和4中有详细描述。

在本发明中，术语“微生物”是包括病毒在内的广义微生物。具体的例子包括原核细胞（如细菌和放线菌）和真菌（如丝状真菌、酵母、粘液菌、担子菌和接合菌）、一些藻类、原生动物、病毒等。这些不仅包括野生的，而且包括用已知的重组技术人工进行构建的。其典型的例子包括感染性微生物，如细菌（如脑膜炎双球菌、霍乱弧菌和大肠杆菌）和病毒（如EB病毒和巨细胞病毒），因为由其表达的蛋白具有与人晶体蛋白相同的表位。

所述微生物可以是减毒的，并用于本发明。用本身已知的方法可以进行微生物减毒，例如加热和福尔马林处理。

利用基因重组技术人工获得的微生物包括用含有编码本发明晶状体抗原肽之DNA的重组载体转化的宿主微生物。宿主微生物可以是例如细菌（如大肠杆菌、芽胞杆菌属微生物和乳酸菌）或酵母。掺入了所述DNA的重组载体不受任何特别的限制，只要其能在上述各种宿主中复制或自我繁殖，并在所述宿主中表达所掺入的DNA。这类例子包括质粒DNA和噬菌体DNA。具体的

例子包括p UC18、p UC19、p SP64等在E. coli表达的质粒载体；在枯草杆菌中表达的p PL608、p AM α 1等和在酵母中表达的YEp51、p AAH5、p YE4等。作为噬菌体表达载体，其例证有 λ gt11、ZAPII等。

本发明的药物组合物可以是例如抑制抗晶状体蛋白抗体增加的抑制剂，或是治疗、预防或阻止白内障发生的药剂。

晶状体抗原可以通过一般用于配制制剂的常规方法制备成适于施用的制剂。当所述药物组合物用于口服时，该制剂要求以适合于消化道吸收的形式提供。

口服固体制剂的例子包括片剂、胶囊、颗粒、粉剂等。这些制剂可以含有根据本发明所加入的各种成分，例如结合剂（如糖浆、阿拉伯胶、明胶、山梨醇、黄蓍胶和聚乙烯吡咯烷酮）；赋形剂（如乳糖、玉米淀粉、磷酸钙、山梨醇和甘氨酸）；润滑剂（如硬脂酸镁、滑石、聚乙二醇和硅石）；分解剂（disintegrators）（如马铃薯淀粉）；增润剂（如十二烷基硫酸钠）；分散剂；增稠剂；调味剂；乳化剂等。片剂可用已知方法包衣。

当固体制剂中所含晶状体抗原的量依服用次数、是否存在其它有效成分等的不同而不同时，一般是0.1 - 500 mg / 片。

口服液体制剂可以例如是水性或油性悬液溶液、糖浆或酏剂。液体制剂可以含有常用的添加剂，如悬浮剂（例如山梨醇糖浆、甲基纤维素、糖浆、明胶、羟乙基纤维素、羧甲基纤维素和硬脂酸铝胶）；乳化剂（例如卵磷脂和脱水山梨醇-油酸）；非水性载体（例如杏仁油、分馏的椰子油、油酯、丙二醇和乙醇）；保存剂等。

当液体制剂中所含晶状体抗原的量依服用次数、是否存在其它有效成分等的不同而变化时，一般是1 mg - 100 g / 100 ml。

口服制剂可以是在使用时溶于适当载体（如水）中的固体制剂。

当药用组合物是供静脉内用的制剂时，可将pH调节剂、缓冲液、稳定剂、保存剂、增溶剂等在必要时加入晶状体抗原中，该混合物经常规方法制成静脉内用制剂。

本发明的晶状体抗原可以口服（包括肠内施用、胃内施用和吸入）或胃肠外施用（例如静脉内施用）。在抗原的剂量随着血清中抗晶状体蛋白抗体的滴度、白内障进展程度、疾病的严重程度、耐药性等不同而变化时，成人每天口

服的抗原量一般是 $0.1\text{ mg} - 10\text{ g}$ ，优选 $1\text{ mg} - 1\text{ g}$ ，更优选是 $10\text{ mg} - 100\text{ mg}$ 。它可以单剂施用或多剂施用。根据施用的途径将制剂制备成最适宜的形式。

因为晶状体抗原是生物组分，所以，其毒性低，并且很少引起副作用。

当本发明的晶状体抗原来源于微生物时，可以施用所述微生物本身。具体地说，它可以以肠内制剂的形式施用，并且特别是施用至小肠内。

所述微生物可以以适于在制剂中保持稳定计数并且易于由肠道吸收的口服制剂来提供，其可以是固体剂型或液体剂型。在制剂中维持稳定计数的方法即是稳定所述微生物的方法，包括例如在无水介质中分散微生物、向制剂中加入稳定剂、包被微生物等，这可以根据剂型作适当选择。

固体制剂的例子包括颗粒剂、粉剂、片剂、胶囊剂等。这类制剂依制剂的不同可以含有适当的成分，如结合剂（例如聚乙烯吡咯烷酮、羟丙基纤维素、蔗糖脂肪酸酯、阿拉伯胶、明胶和支链淀粉），赋形剂（如乳糖和玉米淀粉）；润滑剂（如硬脂酸镁、滑石、聚乙二醇和硅石）；分解剂（如马铃薯淀粉）；湿润剂（如十二烷基硫酸钠）；辅剂等。

为了制备肠衣制剂和稳定微生物，例如下述包衣可以优先用于固体制剂。

包衣剂可以是本身已知的脂溶性物质，例如合成和半合成物质（如羧甲基纤维素、羧甲基纤维素邻苯二甲酸酯和Endragit）；天然物质，如片胶；异相烯酸与丙烯酸乙酯的共聚物和异丁烯酸与异丁烯酸甲酯的共聚物的混合物等。

可以含有稳定剂以稳定微生物。稳定剂的例子包括聚乙烯吡咯烷酮、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸钠、精氨酸钠等。

在固体制剂中微生物的量可以根据服用次数、是否存在其它有效成分或其它有效成分的其它方面不同而变化时，其稳定计数一般是 $10^3 - 10^{10}$ 细胞/片。

口服液体制剂的例子包括水性或油性悬液、溶液、糖浆、糊剂、凝胶、酏剂等。生产这类制剂的方法包括将悬浮剂（如精氨酸或其钠盐）、加工过的淀粉（如糊精、果胶、角叉菜胶）（carrageenan）、刺槐豆胶、瓜耳胶、鳕鱼胶、合成生物聚合胶（xanthane gum）、明胶等加入到含微生物的水或溶液中和将微生物和脂的脂质体、乳剂或微团等形式的复合物分散于溶液中等。微生物在液体制剂中稳定也是优选的，特别优选的是微生物无效地分散于制剂

中。

所述液体制剂可以含有常规添加剂，如悬浮剂、乳化剂、非水性载体、保存剂、佐剂等。

在液体制剂中的微生物量可以根据施用次数、是否存在其它有效成分或其它有效成分的其它方面等的不同而变化时，其可行性量一般是 $1 \times 10^3 - 5 \times 10^{10}$ 细胞/100 ml。

所述口服制剂可以是在使用时溶解于适宜载体中（如水）的固体制剂。

在所述能表达本发明晶状抗原之微生物的量随血清中抗晶状体蛋白质抗体的滴度、白内障进展程度、疾病的严重程度、耐药性以及所述抗原的表达效率等的不同而变化时，成人每天的微生物粗物质重量一般是1 mg - 100 g，优选10 mg - 10 g，更优选的是100 mg - 1 g，可以单剂或多剂施用。根据施用途经可将所述制剂制成最适宜的剂型。

下文所描述的实验性实施例2 和7 有力地证明了本发明的晶状体抗原和能表达本发明晶状体抗原的微生物具有治疗、预防或阻止白内障发生作用的可能性。

借助下面的实施例本发明得以进一步详细地说明，本发明的效果通过实验实施例阐明。这些仅仅是实施例而已，并不在任何意义上限制本发明的范围。

实验实施例1

通过用晶状体匀浆或晶状蛋白进行免疫诱导晶状体表皮细胞损伤

将Lewis大鼠（雌性，一年龄）分成二组（每组4 只大鼠），并用晶状体匀浆乳剂（第一组）或 β -晶状蛋白（第二组）和完全福氏佐剂（CFA）免疫5 次。结果，初次免疫后的21 天在第1 组和第2 组所有动物中都观察到了严重的晶状体表皮细胞损伤。仅仅给予磷酸缓冲盐溶液（PBS）-CFA 乳剂注射的对照组中，大鼠的眼组织与那些未经处理大鼠的相同。由上述结果可见，晶状体组成成分，尤其是晶状蛋白，特别是 β -晶状蛋白是诱导晶状体表皮细胞损伤的有效免疫原。

实验实施例2

通过用 β -晶状蛋白进行免疫增加血清的抗晶状蛋白抗体和诱导晶状体表皮细

胞损伤

所述抗原局限为单一的 β_{H} -晶状蛋白。用其免疫小鼠。

纯化的 β_{H} -晶状蛋白 (Sigma) 溶解于PBS中, 与CFA以1:1的比例制成乳剂, 并调终浓度为1 mg/ml。用所述乳剂 (100 μ l/动物) 免疫小鼠 (C57BL, 雌性, 6月龄)。初次免疫后, 每隔一周进行4次加强注射, 除了用不完全福氏佐剂 (IFA) 代替CFA外, 加强免疫的程序与上述相同。初始免疫后的第5周, 从小鼠取血。处死小鼠, 并摘除眼球供组织病理学检查用。

实验1

制备被摘除眼球的光学显微镜切片, 并进行晶状体表皮细胞的评价。结果, 在被免疫的小鼠眼组织中观察到了晶状体表皮细胞损伤 (图1)。

实施例2

利用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定所收集血清中抗 β_{H} 晶体蛋白抗体的滴度。 β_{H} -晶状蛋白抗原以10 μ g/ml的浓度被固定在96孔微量滴定板上。封闭后, 将免疫小鼠的血清稀释 10^3 - 10^6 倍, 与抗原反应。清洗后, 将碱性磷酸酶结合的羊抗鼠IgG作为第二抗体进行反应。清洗后, 通过对硝基苯磷酸 (pNPP) 底物溶液的显色测定抗体滴度。结果, 免疫小鼠血清中抗 β_{H} -晶状蛋白抗体的滴度远高于未处理小鼠和用PBS-佐剂乳剂免疫的小鼠 (图2)。

由上述结果可见, 晶状体表皮细胞损伤似乎伴随着抗 β_{H} -晶状蛋白抗体滴度的升高。换句话说, 这些结果清楚地表明, 由于自身免疫所致的晶状体表皮细胞损伤与白内障的发病机理有关。

实验实施例3

鉴定人 βA_3 -晶状蛋白的表位

实验1

利用常规方法合成组成已知氨基酸序列之人 βA_3 -晶状蛋白的15种寡

肽 (19 氨基酸残基, 序列如表1), 并进行 βA_3 - 晶状蛋白和各个寡肽的竞争抑制试验。

作为抗原, β - 晶状蛋白 (含大约10% βA_3 - 晶状蛋白) 以10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度固定于微量滴定板上。印迹之后, 加入 β - 晶状蛋白单克隆抗体 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 和各个寡肽, 该混合物与抗原反应。清洗后, 将碱性磷酸酶结合的羊抗鼠 IgG 作为第二抗体进行反应。清洗后, 通过底物 pNPP 的显色测定针对抗原的肽竞争抑制活性。结果1号肽表现出对 βA_3 - 晶状蛋白强的抑制活性。这表明 βA_3 - 晶状蛋白与抗体的结合位点 (表位) 存在于 N 端19 氨基酸残基 (1号肽)。

表 1
人 βA_3 - 晶状蛋白部分肽对 βA_3 - 晶状蛋白 - 抗体
结合的抑制作用 (1)

肽编号	氨基酸序列 ¹⁾	位置 ²⁾	结合抑制作用
1	METQAEQQELETLP TKMA	1-19	+++
2	TTKMAQTNP TPGSLGPWKI	15-33	-
3	GPWKITIIDQENFQGRME	29-47	-
4	GKRMEFTSSCPNV SERSFD	43-61	-
5	ERSFDNVR SJKVESGAWIG	57-75	-
6	GAWIGYEHTSFCGQQFILE	71-89	-
7	QFILERGEYPRWDAWSGSN	85-103	-
8	WSGSNAYHMERLMSFRPFC	99-117	-
9	FRPFCSANH KESKMTIFEK	113-131	-
1 0	TIFEKENFIGRQWEISDDY	127-145	-
1 1	ISDDYPSLQAMGWFNNEVG	141-159	-
1 2	NNEVGSMKIQSGAWVCYHY	155-173	-
1 3	VCYHYLGYRGYQYILKCDH	169-187	-
1 4	LKCDHHEGDYKHWREWGSH	183-201	-
1 5	EWGSHAQTSQIQSIRRIQQ	197-215	-

1) 氨基酸用I U P A C - I U B 委员会对生物的化学命名推荐的单字母符号表示。

2) 序列表S E Q I D N O: 1 的氨基酸数

3) + + +: < 2 5 0 μ g 肽对结合抑制5 0 %

+ +: > 2 5 0 μ g 、 < 5 0 0 μ g 肽对结合抑制5 0 %。

+: 7 5 0 0 μ g 、 < 7 5 0 μ g 肽对结合抑制5 0 %。

-: 无结合抑制作用

实验2

将 βA_3 -晶状蛋白的N端区(1号肽)切成6或7个残基的更小单位,以合成三种肽(16、17和18号肽),将其以实验1相同的方式与 βA_3 -晶状蛋白进行竞争性抑制试验。结果,只有16号肽具有 βA_3 -晶状蛋白结合抑制作用(表2)。由此可见,16号肽上(序列:METQAE)存在表位。

表 2
人 βA_3 -晶状蛋白部分肽对 βA_3 -晶状蛋白-
抗体结合的抑制作用(2)

肽编号	氨基酸序列 ¹⁾	位置 ²⁾	结合抑制作用 ³⁾
1	METQAEQQELETLPITKM	1-18	+++
16	METQAE	1-6	++
17	QQELET	7-12	-
18	LPTTKMA	13-19	-

+) 氨基酸用IUPAC-IUB委员会对生物化学命名推荐的单字母符号表示。

2) 序列表SEQ ID NO: 1 的氨基酸数

3) +++: < 250 μ g 肽对结合抑制50%

++: > 250 μ g、< 500 μ g 肽对结合力抑制50%。

+: > 500 μ g、< 750 μ g 肽对结合力抑制50%。

-: 无结合抑制作用

实验3

为了鉴别 βA_3 -晶状蛋白表位的最小单位,用异亮氨酸残基取代16号肽6个氨基酸残基中的一个残基,得到16号肽的6种类似物(91-24号肽)。用如实验1相同的方法进行 βA_3 -晶状蛋白与上述肽的竞争性抑制试验。结果,与16号肽相比,除了19号肽以外的5种16号肽类似物都对 βA_3 -晶状蛋白与抗体的结合表现出较低的抑制活性,只有19号肽象16号肽一样,对 βA_3 -晶状蛋白与抗体的结合产生强的抑制作用(表3)。这些结果表明,除了第一位甲硫氨酸外,16号肽的5个连续氨基酸残基(序列ETQAE)是 βA_3 -晶状蛋白的表位。

表 3
人 βA_3 - 晶状蛋白部分肽类似物对 βA_3 - 晶状蛋白 -
抗体结合的抑制作用

肽编号	氨基酸序列 ¹⁾ 、 ²⁾	结合抑制作用 ³⁾
1 6	METQAE	++
1 9	IETQAE (2)	++
2 0	METQAE (3)	+
2 1	METQAE (4)	+
2 2	METQAE (5)	+
2 3	METQIE (6)	+
2 4	METQAE (7)	-
P B S (对照)		-

+) 氨基酸以I U P A C - I U B 委员会对生物化学命名推荐的单字母符号表示。

2) 括号中的数字表示被描述的序列所在的序列表S E Q I D 编号。

3) +++: < 2 5 0 μ g 肽对结合抑制5 0 %

++: > 2 5 0 μ g、< 5 0 0 μ g 肽对结合抑制5 0 %。

+: > 5 0 0 μ g、< 7 5 0 μ g 肽对结合抑制5 0 %。

-: 无结合抑制作用

实验实施例4

鉴定人 βB_2 - 晶状蛋白的表位

利用常规方法合成组成具有已知氨基酸序列的人 βB_2 - 晶状蛋白的17种寡肽 (17个氨基酸残基, 序列如表4所示), 以实验性实施例3中实验1的相同方法进行 βB_2 - 晶状蛋白与各个寡肽的竞争性抑制试验。结果, 38号肽对 βB_2 - 晶状蛋白的结合具有强抑制作用。这表明 βB_2 - 晶状蛋白与其抗体的结合部位 (表位) 存在于38号肽的17个氨基酸残基。

表 4
人 βB_2 - 晶状蛋白部分肽对 βB_2 - 晶状蛋白 -
抗体结合的抑制作用

肽编号	氨基酸序列 ¹⁾	位置 ²⁾	结合抑制作用 ³⁾
2 5	MASDHQTQAGKPQSLNP	1-17	-
2 6	QSLNPKIIIFEQENFQG	13-29	-
2 7	ENFQGHSELNGPCPNL	25-41	-
2 8	PCPNLKETGVEKAGSVL	37-53	-
2 9	AGSVLVQAGPWVGYEQA	49-65	-
3 0	GYEQANCKGEQFVFEKG	61-77	-
3 1	VFEKGEYPRWDSWTSSR	73-89	-
3 2	WTSSRRTDSLSSLRPIK	85-101	-
3 3	LRPIKVDSQEHKIILYE	97-113	-
3 4	IILYENPNFTGKKMEII	109-125	-
3 5	KMEIIDDDVPSFHAHGY	121-137	-
3 6	HAHGYQEKVSSVRVQSG	133-149	-
3 7	RVQSGTWVGYPGYRG	145-161	-
3 8	PGYRGLQYLLEKGDYKD	157-173	+++
3 9	GDYKDSSDFGAPHPQVQ	169-185	-
4 0	HPQVQSVRRIRDMQWHQ	181-197	-
4 1	RIRDMQWHQRGAFHPSN	189-205	-

1) 氨基酸用I U P A C -I U B 委员会对生物化学命名法推荐的单字母符号表示。

2) 序列表S E Q I D N O: 1 的氨基酸编号

3) + + +: < 2 5 0 μ g 肽对结合抑制5 0 %

+ +: > 2 5 0 μ g、< 5 0 0 μ g 肽对结合抑制5 0 %。

+: 5 0 0 μ g、< 7 5 0 μ g 肽对结合抑制5 0 %。

-: 无结合抑制作用

合成由截断 (dividing) 具有 βB_2 - 晶状蛋白部分序列的38号肽所得的肽, 并用与实验实施例3的实验2所用的相同方法将表位区进一步局限, 而且, 以实验实施例3的实验3中的方法鉴定 βB_2 - 晶状蛋白表位的最小单位。结果发现, 表位是 βB_2 - 晶状蛋白氨基酸序列 (SEQ ID NO: 8) 的162-166位氨基酸的连续5个氨基酸残基 (序列: LQYLL)。

实验实施例5

用与人 βA_3 - 晶状蛋白具有相同表位的非晶状体来源肽诱导晶状体表皮细胞损伤和交叉反应

利用Gene Bank数据库检索具有 βA_3 - 晶状蛋白相同表位的非晶状体来源的肽, 即具有ETQAE氨基酸序列的肽。结果, 发现例如大肠杆菌、沙门氏杆菌、酵母和病毒等微生物蛋白质具有所述氨基酸序列 (表5)。

此外, 检索非晶状体来源的肽与人晶状蛋白除所述表位序列外的序列同源性, 以证实来源于表6所示三种动物的肽与晶状蛋白的同源序列。

表 5

与人 βA_3 晶状蛋白有相同表位的非晶状体来源的蛋白质

微生物	蛋白质
大肠杆菌	拓扑异构酶 ¹⁾
酵母	拓扑异构酶
沙门氏杆菌	拓扑异构酶
(B S M V)	1 7 K D 蛋白质
流感病毒	H F - 1 蛋白质

1) 大肠杆菌的拓扑异构酶含有该实验实施例所用肽I 的氨基酸序列 (G L T E T Q A E A I L E, 序列表 S E Q I D N O: 9)。

表 6

除了人 βA_3 - 晶状蛋白的表位序列外与人晶状蛋白有
序列同源性的非晶状体来源的肽

生物体	含有与晶状蛋白同源序列的肽的部分氨基酸 序列 ¹⁾ 、 ²⁾ 、 ³⁾
科赛奇病毒	<u>MQYHYLGR</u> <u>TGYT</u> (10)
线虫 (C.elegans)	<u>DFATIFEK</u> <u>NAFL</u> (11) [肽 II]
狒狒内源病毒	<u>QKLGPWKRP</u> <u>VAY</u> (12) [肽 III]

1) 氨基酸用UIPAC - IUB委员会对生物化学命名法推荐的单字母符号表示。

2) 划线的序列与人 βA_3 - 晶状蛋白同源。

3) 括号中的数字表示所述序列所在序列表的SEQ ID编号。

用表5中所列的大肠杆菌拓扑异构酶部分氨基酸序列(肽I)或表6中所示的两种肽(肽II、肽III)免疫小鼠,并检测抗体滴度。

将小鼠(B6C3,雌性,一年龄)分成4组(每组包括2只),以100 μ g/动物用肽I - III中的一种免疫。初次免疫后,每隔两周进行两次加强注射。用与实验实施例2中相同的方法制备抗原和佐剂和乳剂,并用于免疫。初次免疫后的5周,从小鼠取血。处死小鼠,摘除眼球。用与实验性实施例2相同的方法经ELISA检测抗体滴度,制备眼组织的光学显微镜切片。

并对晶状体表皮细胞进行评价。

结果, 所有用肽I (包括 βA_3 - 晶状蛋白表位) 免疫的小鼠都表现出轻度晶状体表皮细胞损伤。从用肽I 免疫的小鼠采集的血清表现出与 β - 晶状蛋白的交叉反应 (表7)。另外两种肽没有诱导晶状体表皮细胞损伤, 也未表现出与 β - 晶状蛋白的交叉反应。

表 7
用含晶状蛋白同源序列的肽免疫的小鼠中晶状体表皮
细胞的损伤和血清的抗晶状蛋白抗体滴度

抗原	抗体滴度	晶状体表皮细胞损伤的频率 (%)
肽I	1 / 1 0 , 0 0 0	1 0 0
肽II	1 / 5 0 0	0
肽III	1 / 5 0 0	0
P B S	1 / 5 0 0	0
(对照)		

1) 抗体滴度表示为当405 nm的吸光度为空白值的两倍时切片的稀释比例。

实验实施例6

能够表达诱导晶状体表皮细胞损伤的 β - 晶状蛋白的重组大肠杆菌

大鼠 βB_2 - 晶状蛋白cDNA (Aaits, H. J. et al., Eur. J. Biochem., 183: 31-36, 1989) 被亚克隆至市售的表达载体pK

K223-3(Pharmacia Biotech 制造), 并用所述重组载体转化大肠杆菌 J M 1 0 5 (Pharmacia Biotech 制造)以在宿主 E . C o l i 中表达 βB_2 - 晶状蛋白。在含 $30 \mu g / m l$ 氨苄青霉素的 L B 培养基中于 $37^\circ C$ 培养所述转化细胞 24 小时。利用以 pKK223-3 转化的 E . c o l i J M 1 0 5 作对照进行下述实验。

将小鼠 (B 6 C 3 , 雌性, 一年龄) 分成 2 组 (每组包括 4 只), 用能表达 βB_2 - 晶状蛋白的重组 E . c o l i $\beta - B_2$ - p K K (1, 000 $\mu g / 0.2 ml$) 免疫。初次免疫后, 每两周进行 2 次加强注射 (1, 000 $\mu g / 动物$)。每两周用裂隙灯检查晶状体。初次免疫后的第 7 周, 从小鼠采血, 并用实验实施例 2 中相同的方法经 E L I S A 检测交叉反应。

小鼠和大鼠的 β - 晶状蛋白多肽序列非常相似, 而且 βA_3 - 晶状蛋白和 βB_2 - 晶状蛋白表现出包括表位部分在内的 90 % 或 90 % 以上的高同源性。

用能表达 βB_2 - 晶状蛋白的 E . c o l i $\beta - B_2$ - pKK 免疫的所有小鼠都在初次免疫后的第 7 周表现出晶状体表皮细胞损伤。用能表达 βB_2 - 晶状蛋白的 E . c o l i 免疫的小鼠之淋巴结细胞显示与 β - 晶状蛋白的交叉反应 (表 8)。而且, 这些小鼠血清中的抗 βB_2 - 晶状蛋白抗体增加。相反, 用对照 E . c o l i J M 1 0 5 (不能表达 βB_2 - 晶状蛋白) 免疫的小鼠没有显示淋巴细胞的交叉反应或血清抗体滴度的增加。对照组小鼠的晶状体未显示异常。上述结果证明, E . c o l i 表达的自身抗原破坏免疫耐受并诱导晶状体表此的细胞损伤。

表 8

用表达 β - 晶状蛋白的重组 E . c o l i 免疫的小鼠中晶状体
 表皮的细胞损伤和血清的抗晶状蛋白抗体滴度

抗原	抗体滴度	晶状体表皮细胞损伤频率 (%)
能表达		
β B ₂ - 晶状蛋白 的 E . c o l i β - B ₂ p k k	1 / 2 , 0 0 0	1 0 0
不能表达		
β B ₂ - 晶状蛋白 的 E . c o l i J M 1 0 5	1 / 5 0 0	0

1) 抗体滴度表示为当 4 0 5 n m 的吸光度为空白值的两倍时切片的稀释比例。

实验性实施例 7

抑制经口服晶状体匀浆免疫的小鼠血清中抗 β 晶状蛋白抗体的增加

实验 1

雄性和雌性 C 5 7 B L 小鼠 (1 5 - 1 6 月龄) 被分成晶状体组和 B S A 组, 用牛晶状蛋白免疫之。用磷酸缓冲的盐溶液 (P B S) 将牛晶状体制成匀浆, 使蛋白含量为 2 0 m g / m l , 从初次免疫前 2 6 天至初次免疫的当天, 每 4 天给晶状体口服晶状体匀浆 0.2ml/动物(4mg/动物)一次。作为对照蛋白, 牛血清白蛋白(BSA)被溶解于 PBS 中至浓度为 20mg/ml, 并以与晶状体组相同的方式给 BSA 组口服。

实验 2

雄性和雌性 C57BL 小鼠(15-16 月龄)被分成 PBS 组、晶状体组和 BSA 组,用牛晶状蛋白免疫之。以与实验 1 中相同的方式在初次免疫的当天至初次免疫后的 34 天中每 4 天给晶状体组和 BSA 组进行口服。PBS 组给予口服 PBS (0.2ml/动物)。

实验 3

雄性和雌性 C57BL 小鼠(15-16 月龄)被分成 PBS 组、晶状体组和 BSA 组,用牛晶状蛋白免疫之。以与实验 1 中相同的方式在初次免疫的当天至初次免疫后的 34 天中每 4 天给晶状体组和 BSA 组进行口服。

从牛晶状体中分离 β -晶状蛋白,并以 1 : 1 的比例与 C F A 制成乳剂。自实验 1 - 3 小鼠的尾部经皮下施用 β -晶状蛋白 (1 mg /ml , 0 .1 mg /动物) 免疫。初次免疫后,每两周给予两次加强注射。对于加强免疫而言,除了用 I F A 代替 C F A 外,其余同上述程序。初次免疫后的每隔一周,从小鼠采血,并以与实验性实施例 2 的相同方式经 E L I S A 测定血清中抗 β -晶状蛋白的抗体滴度。

关于每个实验,初次免疫后第 3、4 和 5 周的血清抗抗原 (β -晶状蛋白) 抗体滴度表示于图 3 - 5 中。用 β -晶状蛋白免疫的 C 5 7 B L 小鼠的血清抗体滴度在实验 1 - 3 的初次免疫后第 3 和 4 周升高,最高的峰值出现于初次免疫后的第 5 周。在实验 2 中,小鼠于初次免疫前后进行口服。服用晶状体匀浆的晶状体组抗体滴度在初次免疫后第 4 和 5 周明显地低于 B S A 组 (对照组)。

(图 4), 在实验 1 中,小鼠在初次免疫前进行口服,而在实验 3 中,小鼠在初次免疫后进行口服。晶体组的抗体滴度通常比 B S A 组的要低 (图 3 和 5)。

由上述结果证明,在用 β -晶状蛋白免疫前和/或后施用晶状体匀浆抑制血清抗抗原抗体滴度的升高,最好在免疫前开始施用本发明的制剂,并在甚至是免疫后继续施用,以使抗体滴度的升高被显著抑制。

配方实施例 1

[片剂配方]

重组酵母 (啤酒酵母) ¹⁾	8 0 %
晶状蛋白纤维素	1 %
乳糖	1 0 %
玉米淀粉	5 %

无水磷酸钙	2 %
羟丙基纤维素	1 %
硬脂酸镁	1 %

总计	1 0 0 %
----	---------

1) 利用市售酵母转化试剂盒 (Yeast Starter Kit , Bio-Rad)通过转化酵母以使能够表达晶状蛋白而制备。

根据上述配方用常规方法制备片剂, 并利用常规方法应用肠包衣, 以产生肠包衣性。

本发明的含有作为活性成分的晶状体抗原或能够表达所述抗原的微生物的药物组合物对于抗晶状体蛋白质抗体滴度的升高表现出明显的抑制作用。因此, 它极可能用于有效地治疗或预防白内障并延缓白内障发生。所以, 本发明组合物对于白内障患者和白内障的潜在患者极为有用。

[序 列 表]

SEQ ID NO: 1

序列长度: 2 1 5

序列类型: 氨基酸

拓扑学: 线性

分子类型: 蛋白质

序列

Met	Glu	Thr	Gln	Ala	Glu	Gln	Gln	Glu	Leu	Glu	Thr	Leu	Pro	Thr	Thr			
																5	10	15
Lys	Met	Ala	Gln	Thr	Asn	Pro	Thr	Pro	Gly	Ser	Leu	Gly	Pro	Trp	Lys			
																20	25	30
Ile	Thr	Ile	Tyr	Asp	Gln	Glu	Asn	Phe	Gln	Gly	lys	Arg	Met	Glu	Phe			
																35	40	45
Thr	Ser	Ser	Cys	Pro	Asn	Val	Ser	Glu	Arg	Ser	Phe	Asp	Asn	Val	Arg			
																50	55	60
Ser	Leu	Lys	Val	Glu	Ser	Gly	Ala	Trp	Ile	Gly	Tyr	Glu	His	Thr	Ser			
																65	70	75
Phe	Cys	Gly	Gln	Gln	Phe	Ile	Leu	Glu	Arg	Gly	Glu	Tyr	Pro	Arg	Trp			
																85	90	95
Asp	Ala	Trp	Ser	Gly	Ser	Asn	Ala	Tyr	His	Met	Glu	Arg	Leu	Met	Ser			
																100	105	110
Phe	Arg	Pro	Phe	Cys	Ser	Ala	Asn	His	Lys	Glu	Ser	Lys	Met	Thr	Ile			
																115	120	125
Phe	Glu	Lys	Glu	Asn	Phe	Ile	Gly	Arg	Gln	Trp	Glu	Ile	Ser	Asp	Asp			
																130	135	140
Tyr	Pro	Ser	Leu	Gln	Ala	Met	Gly	Trp	Phe	Asn	Asn	Glu	Val	Gly	Ser			
																145	150	155
Met	Lys	Ile	Gln	Ser	Gly	Ala	Trp	Val	Cys	Tyr	His	Tyr	Leu	Gly	Tyr			
																165	170	175
Arg	Gly	Tyr	Gln	Tyr	Ile	Leu	Lys	Cys	Asp	His	His	Glu	Gly	Asp	Tyr			
																180	185	190
Lys	His	Trp	Arg	Glu	Trp	Gly	Ser	His	Ala	Gln	Thr	Ser	Gln	Ile	Gln			
																195	200	205
Ser	Ile	Arg	Arg	Ile	Gln	Gln												
																210	215	

SEQ ID NO: 2

序列长度: 6

序列类型: 氨基酸

拓扑学: 线性

分子类型: 肽

序列

Ile Glu Thr Gln Ala Glu
5 6

SEQ ID NO: 3

序列长度: 6

序列类型: 氨基酸

拓扑学: 线性

分子类型: 肽

序列

Met Ile Thr Gln Ala Glu
5 6

SEQ ID NO: 4

序列长度: 6

序列类型: 氨基酸

拓扑学: 线性

分子类型: 肽

序列

Met Glu Ile Gln Ala Glu
5 6

SEQ ID NO: 5

序列长度: 6

序列类型: 氨基酸

拓扑学: 线性

分子类型: 肽

序列

Met	Glu	Thr	Gln	Ala	Glu
				5	6

SEQ ID NO: 6

序列长度: 6

序列类型: 氨基酸

拓扑学: 线性

分子类型: 肽

序列

Met	Glu	Thr	Gln	Ala	Glu
				5	6

SEQ ID NO: 7

序列长度: 6

序列类型: 氨基酸

拓扑学: 线性

分子类型: 肽

序列

Met	Glu	Thr	Gln	Ala	Ile
				5	6

SEQ ID NO: 8

序列长度: 205

序列类型: 氨基酸

拓扑学: 线性

分子类型: 蛋白质

序列

SEQ ID NO: 9

序列长度: 12

序列类型: 氨基酸

拓扑学: 线性

分子类型: 肽

序列

Gly	Leu	Thr	Glu	Thr	Gln	Ala	Glu	Ala	Ile	Leu	Glu
				5					10		12

SEQ ID NO: 10

序列长度: 12

序列类型: 氨基酸

拓扑学: 线性

分子类型: 肽

序列

Met	Gln	Tyr	His	Tyr	Leu	Gly	Arg	Thr	Gly	Tyr	Thr
				5					10		12

SEQ ID NO: 11

序列长度: 12

序列类型: 氨基酸

拓扑学: 线性

分子类型: 肽

序列

Asp	Phe	Ala	Thr	Ile	Phe	Glu	Lys	Asn	Ala	Phe	Leu
				5					10		12

SEQ ID NO: 12

序列长度: 12

序列类型: 氨基酸

拓扑学: 线性

分子类型: 肽

序列

Gln	Lys	Leu	Gly	Pro	Trp	Lys	Arg	Pro	Val	Ala	Tyr
				5					10		12

(接附图)

说明书附图



未处理

图 1(A)



用 β_H 晶体蛋白免疫

图 1(B)

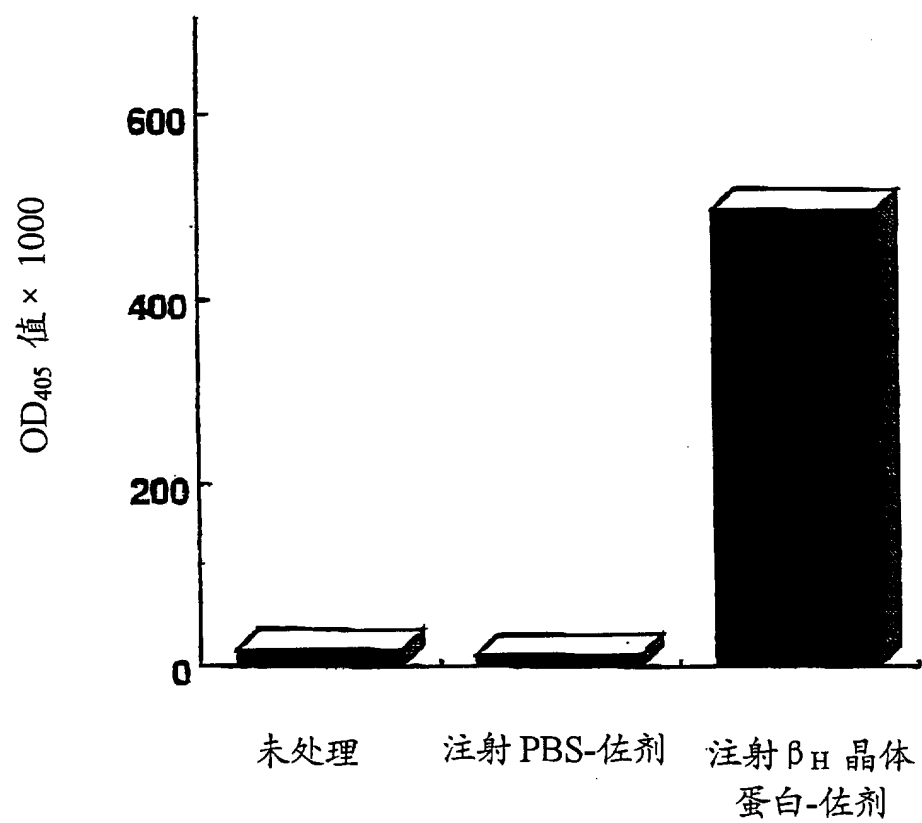


图 2

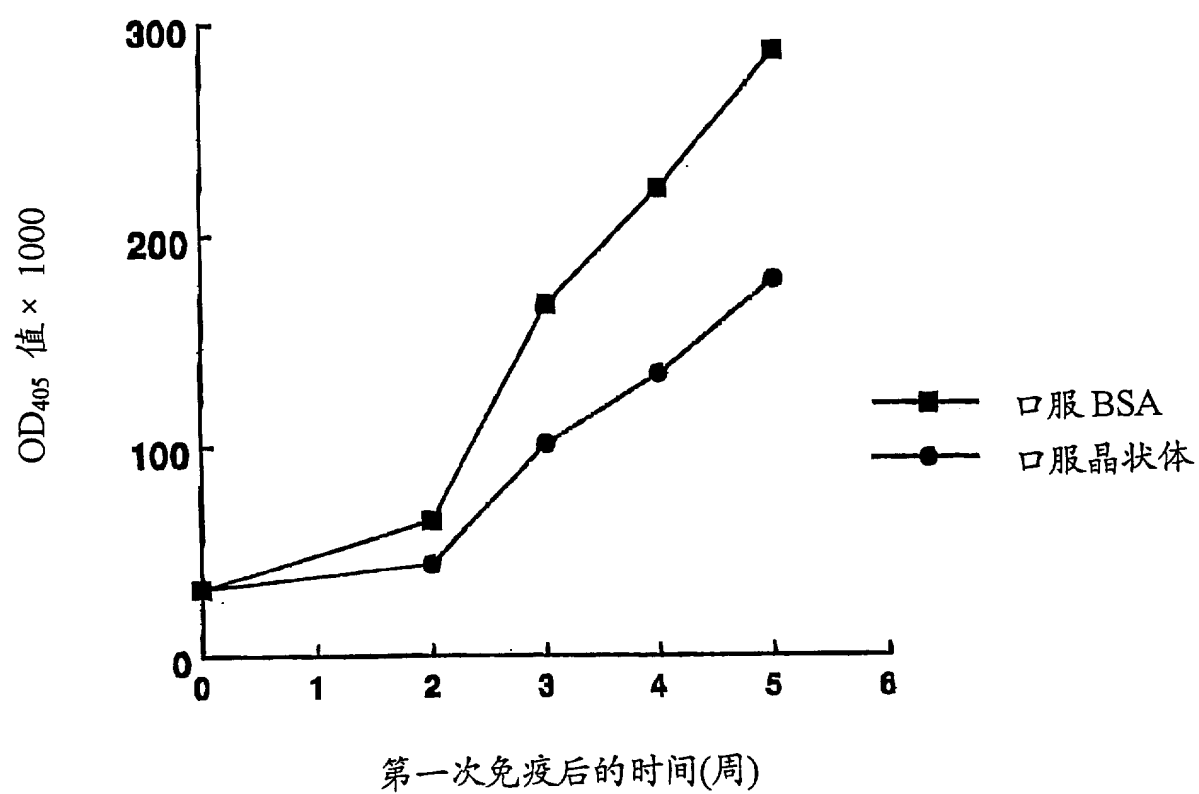


图 3

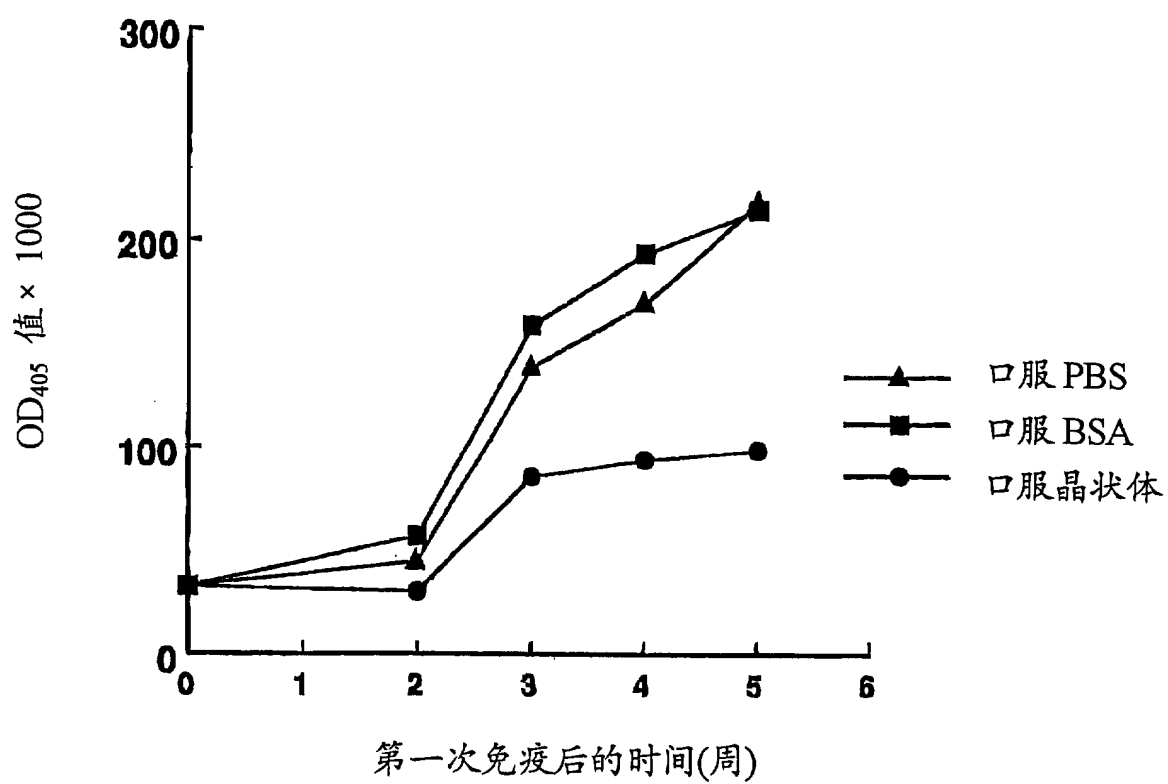


图 4

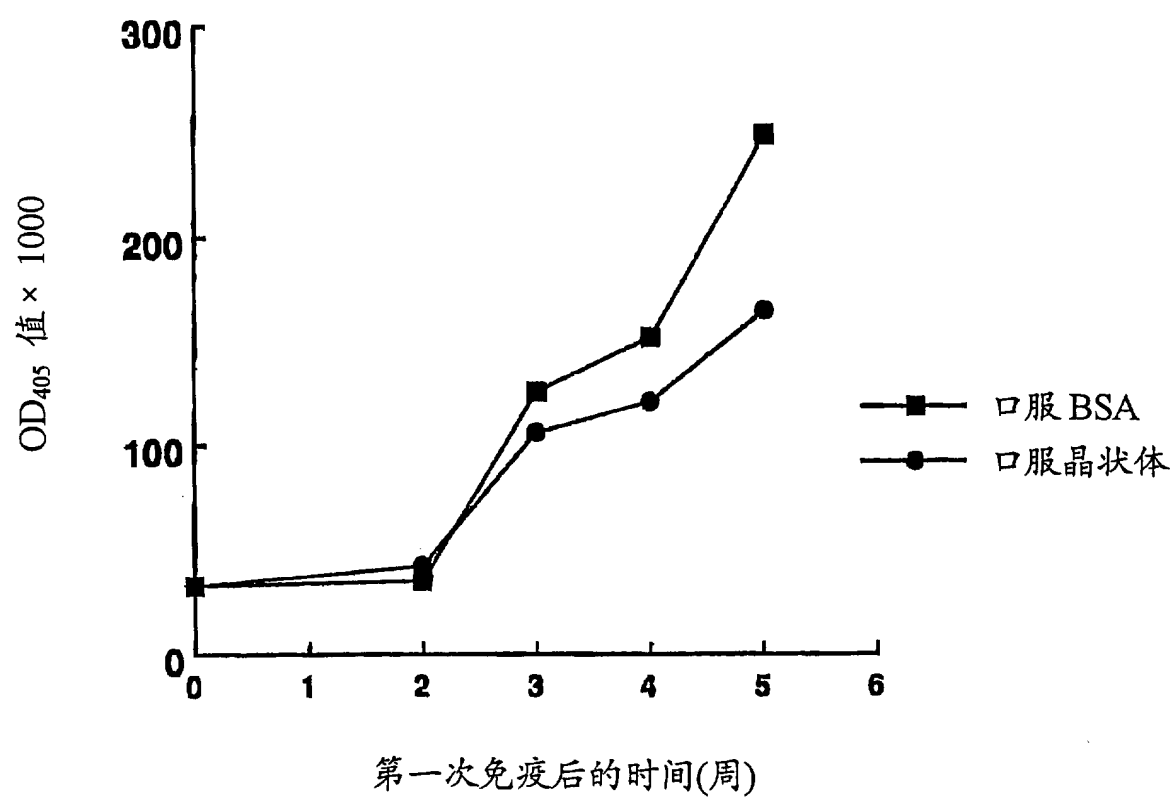


图 5