(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108135964 B
(45)授权公告日 2023.02.17

(21)申请号 201680048745.2
(22)申请日 2016.06.20
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108135964 A
(43)申请公布日 2018.06.08
(30)优先权数据
62/182,229 2015.06.19 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.02.22
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/038381 2016.06.20
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2016/205804 EN 2016.12.22
(73)专利权人 分子防御公司
地址 美国纽约州
(72)发明人 哈里·B·德莫普洛斯
凯文·戴维斯
(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
专利代理师 郑霞
(51)Int.Cl.
A61K 38/06(2006.01)
A61K 47/22(2006.01)
A61K 31/195(2006.01)
A61K 45/06(2006.01)
(56)对比文件
US 5204114 A,1993.04.20
US 2002117180 A1,2002.08.29
WO 9829101 A1,1998.07.09
WO 9829101 A1,1998.07.09
US 5204114 A,1993.04.20
审查员 闫华玉

权利要求书2页 说明书59页

(54)发明名称

谷胱甘肽制剂和使用方法

(57)摘要

本发明涉及谷胱甘肽治疗或预防病毒、细菌、化学和核物质，或者治疗或预防由放射性元素释放引起的对人体的辐射损伤的用途。优选的制剂是口服剂型，其中被抗坏血酸稳定的还原型谷胱甘肽在受控的湿度和温度条件下包装，以确保产生电荷转移复合物，该复合物确保一致的包装、包装过程中不明显的氧化和随后的正常储存，以及对于人类而言的高口服生物利用度。

CN 108135964 B

1.一种药学上可接受的谷胱甘肽制剂,其包含:

至少100 mg粉末形式的还原型谷胱甘肽;

至少50 mg粉末形式的结晶抗坏血酸,其相对于所述还原型谷胱甘肽以至少50重量%的量存在;

所述还原型谷胱甘肽和结晶抗坏血酸各自在25℃或更低的温度下、在20%或更低的相对湿度下平衡;并且

所述平衡的还原型谷胱甘肽和结晶抗坏血酸在干燥气体冲洗下混合,以获得还原型谷胱甘肽与结晶抗坏血酸颗粒彼此摩擦生电且静电缔合的均匀混合物,其中所述均匀混合物具有中和净电荷。

2.根据权利要求1所述的制剂,其包含至少250 mg还原型谷胱甘肽和至少125 mg结晶抗坏血酸。

3.根据权利要求1所述的制剂,其包含至少500 mg还原型谷胱甘肽和至少250 mg结晶抗坏血酸。

4.根据权利要求1所述的制剂,其中所述平衡的还原型谷胱甘肽和结晶抗坏血酸在氮气冲洗下混合。

5.根据权利要求1所述的制剂,其中所述平衡的还原型谷胱甘肽和结晶抗坏血酸在无氧冲洗下混合。

6.根据权利要求1所述的制剂,其中所述制剂包含至少95重量%的还原型谷胱甘肽和结晶抗坏血酸。

7.根据权利要求1所述的制剂,其包含至少75重量%的还原型谷胱甘肽和结晶抗坏血酸。

8.根据权利要求1所述的制剂,其主要由胶囊中的还原型谷胱甘肽和结晶抗坏血酸组成。

9.根据权利要求1所述的制剂,其主要由普通胶囊内的还原型谷胱甘肽、结晶抗坏血酸和额外的活性成分组成。

10.一种配制药物谷胱甘肽的方法,其包括:

提供至少100 mg颗粒形式的还原型谷胱甘肽,其在25℃或更低的温度下用相对湿度为20%或更低的空气平衡;

提供至少50 mg颗粒形式的结晶抗坏血酸,其在25℃或更低的温度下用相对湿度为20%或更低的空气平衡;

在干燥气体冲洗下混合所述平衡的还原型谷胱甘肽和结晶抗坏血酸,所述结晶抗坏血酸相对于所述还原型谷胱甘肽以至少50重量%的量存在,以实现所述还原型谷胱甘肽和所述结晶抗坏血酸的摩擦生电,其中所述还原型谷胱甘肽的颗粒与所述结晶抗坏血酸的颗粒静电缔合,以形成具有中和的净电荷的均匀混合物;以及

在缺氧气体冲洗下包装所述均匀混合物于包装中。

11.根据权利要求10所述的方法,其中所述包装包含单位剂量形式胶囊。

12.根据权利要求11所述的方法,在所述胶囊中包含100-500 mg还原型谷胱甘肽和50-250 mg结晶抗坏血酸。

13.根据权利要求11所述的方法,在所述胶囊中包含至少500 mg还原型谷胱甘肽和至

少250 mg结晶抗坏血酸。

14.根据权利要求10所述的方法,其中所述干燥气体冲洗包括干燥氮气气体冲洗。

15.根据权利要求10所述的方法,其中所述均匀混合物包含至少95重量%的还原型谷胱甘肽和结晶抗坏血酸。

16.一种单位剂量形式的药学上可接受的谷胱甘肽制剂,其包含:

至少100 mg颗粒状还原型谷胱甘肽;

至少50 mg颗粒状结晶抗坏血酸,其相对于所述还原型谷胱甘肽以至少50重量%的量存在;

胶囊,其适于含有所述还原型谷胱甘肽和所述结晶抗坏血酸的至少250 mg静电缔合的均匀混合物;

所述还原型谷胱甘肽和结晶抗坏血酸各自在低于25℃的温度下、在20%或更低的相对湿度下在混合之前进行平衡;并且

所述平衡的还原型谷胱甘肽和结晶抗坏血酸在干燥气体冲洗下混合,以获得具有中和净电荷的、均匀的摩擦生电的混合物,其中还原型谷胱甘肽和结晶抗坏血酸颗粒静电缔合,在干燥氮气下包装。

17.根据权利要求16所述的单位剂量形式的药学上可接受的谷胱甘肽制剂,其包含250-500 mg还原型谷胱甘肽和125-250 mg结晶抗坏血酸,不含任何氧化剂成分。

18.根据权利要求16所述的单位剂量形式的药学上可接受的谷胱甘肽制剂,其中所述制剂不向人提供硫醇气味。

19.根据权利要求16所述的单位剂量形式的药学上可接受的谷胱甘肽制剂,其进一步包含抗病毒剂、抗生素剂、高血糖剂、抗氧化剂、促氧化剂、抗毒剂、一氧化氮前体、前列腺素前体、抗炎剂和免疫调节剂中的至少一种。

谷胱甘肽制剂和使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及谷胱甘肽用于治疗和/或预防多种状况的用途。

背景技术

[0002] 普遍存在的三肽L-谷胱甘肽(GSH)(γ-谷氨酰基-半胱氨酰基-甘氨酸)是一种众所周知的生物抗氧化剂,实际上被认为是高等生物体的主要细胞内抗氧化剂。当被氧化时,它形成二聚体(GSSG),其可以在具有谷胱甘肽还原酶的器官中再循环。谷胱甘肽可通过钠依赖性谷氨酸泵通过膜转运。Tanuguchi,N.等人编,Glutathione Centennial,Academic Press,New York(1989)。谷胱甘肽广泛分布于自然界,包括酵母细胞、植物生命体和动物。它在人体中由两种不同的酶以相同的方式制成,这与理解谷胱甘肽的性质有关(12)。

[0003] GSH被两种酶在数千种生命形式中以同样的方式“弯曲”,并且已经长时间演化以专门定位其关键巯基。为了比较,单独的半胱氨酸的巯基过度暴露并且是过度反应性的,并且高半胱氨酸的巯基更是如此,从而产生高度破坏性的硫自由基,该硫自由基在同型半胱氨酸血症中破坏内皮。当口服时,N-乙酰半胱氨酸(NAC)会在胃中失去N-乙酰基,从而在人体中导致不受控制的氧化和一系列毒性。

[0004] GSH的性质来源于其受控的反应性,其维持生理学上有利的氧化还原电位的能力,其在所有亚细胞区室中的抗氧化性质,热谷胱甘肽转运蛋白在细胞膜和线粒体上的存在,以及这些性质由以下酶支持的事实,这些酶:(i)合成GSH;(ii)扩增特定性质,如GSH过氧化物酶和S转移酶;以及(iii)在GSH使用后恢复GSH的酶,GSH还原酶。谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)在被称为铁死亡(ferroptosis)的过程中的活性丧失导致基于脂质的活性氧(ROS),特别是脂质过氧化氢的积累。

[0005] GSH直接或间接地在许多重要的生物现象中起作用,包括蛋白质和DNA的合成、转运、酶活性、代谢以及保护细胞免受自由基介导的损伤。GSH是负责维持体内适当氧化状态的主要细胞抗氧化剂之一。GSH由大多数细胞合成,并且也在饮食中提供。已显示GSH将氧化的生物分子再循环回其活性、还原形式。由于用于控制还原型和氧化型GSH的相互转化的现有机制,例如通过向生物体施用GSH,还原型GSH水平的改变将倾向于使生物体的细胞转变为更加还原的氧化还原电位。同样,使生物体经受氧化应激或自由基会使细胞转变为更加氧化的电位。众所周知,某些细胞过程对氧化还原电位是响应性的。在成人中主要由肝脏,较小程度上由骨骼肌、红细胞和白细胞从氧化型GSSG产生还原型GSH。每天产生的8-10克谷胱甘肽中约有80%是由肝脏产生的,并通过血流分布到其他组织。

[0006] 细胞中GSH的缺乏可导致过量的自由基,这导致大分子分解、脂质过氧化、毒素积聚,最终导致细胞死亡。由于GSH在预防这种细胞氧化中的重要性,因此GSH不断供应给组织。然而,在某些情况下,GSH的正常生理供应不足、分布不充分或局部氧化需求太高以至于不能阻止细胞氧化。在某些情况下,GSH的产生和需求是不匹配的,导致生物体水平上的水平不足。在其他情况下,某些组织或生物过程消耗GSH,使得细胞内水平受到抑制。在任一情况下,通过增加GSH的血清水平,可以将增加的量导入细胞内。在细胞摄取促进的转运系统

中，驱动摄取的浓度梯度增加。

[0007] 对于所有营养物，进食或经口摄入营养物通常被认为是增加其体内水平的理想方法。因此，口服GSH治疗的尝试是已知的。本发明人先前的工作表明了通过空腹口服给药的有效施用。参见U.S.6,159,500和以下所示，其中每一个明确地通过引用并入本文。另见:9,308,234;9,062,086;9,040,082;8,911,724;8,592,392;8,361,512;8,349,359;8,252,325;8,147,869;8,114,913;7,951,847;7,709,460;RE40,849;7,449,546;7,449,451;7,378,387;RE39,705;7,078,064;6,896,899;6,835,811;6,586,404;6,423,687;6,350,467;6,262,019;6,204,248;6,197,749;6,159,500;9,265,808;9,229,014;9,149,451;9,144,570;8,981,139;8,950,583;8,734,316;8,709,406;8,679,530;8,602,961;8,591,876;8,575,218;8,518,869;8,507,219;8,501,700;8,435,574;8,426,368;8,303,949;8,221,805;8,217,084;8,217,006;8,178,516;8,093,207;8,067,537;7,923,045;7,763,649;7,723,327;7,691,901;7,615,535;7,592,449;7,579,026;7,521,584;7,407,986;7,396,659;7,384,655;7,375,133;7,371,411;7,345,091;7,320,997;7,317,008;7,279,301;7,241,461;7,238,814;7,179,791;7,169,412;7,145,025;7,094,550;7,049,058;7,045,292;6,949,382;6,896,899;6,764,693;6,709,835;6,596,762;6,586,404;6,511,800;6,444,221;6,423,687;6,395,494;6,350,467;6,346,547;6,312,734;6,262,079;6,251,920;6,204,248;6,197,789;6,166,090;6,159,500;6,069,167;5,847,007;5,770,609;5,595,722;5,545,569;5,326,757;5,204,114;4,859,668;20160082029;2015028393;2014027144;2014019385;2014014171;20130317072;20120244235;20110151030;20110129523;20100291196;20090311350;20090042822;20080234380;20070065497;20070053970;20070026090;20070004035;20060105972;20060008544;20060008543;20050226942;20050222046;20050090553;20040105894;20040071770;20030211491;20030129262;20020136763;20020002136;20140256760;20140045874;20120245343;20160158308;20160068904;20150246018;20150209316;20150038577;20150030668;20140271923;20140271816;20140100283;20130202681;20130129815;20120244212;20120141608;20120135068;20120087994;20120021073;20110305752;20110111002;20110077194;20100316700;20100291196;20100233297;20100233193;20100166846;20100166796;20090176715;20090068253;20070053970;20060099244;20050239886;20050222046;20050130905;20050123628;20040157783;20040022873;20020182585;20020136763;20010000784。参见，www.fda.gov/ucm/groups/fdagov-public/@fdagov-foods-gen/documents/document/ucm264131.pdf。

[0008] GSH的代谢

[0009] GSH的合成取决于直接从饮食或半胱氨酸供应的，或通过转硫途径从甲硫氨酸间接供应的半胱氨酸的可用性。GSH的合成和代谢由γ-谷氨酰循环的酶控制。GSH通过γ-谷氨酰半胱氨酰合成酶(反应1)和GSH合成酶(反应2)的连续作用在细胞内合成。后一种酶的作用被GSH反馈抑制。GSH(及其氧化形式，GSSG)的分解由γ-谷氨酰转肽酶催化，该酶催化γ-谷氨酰基部分向接受体如含SH的氨基酸、某些二肽和GSH本身的转移(反应3)。GSH的细胞周转与GSH形式的跨细胞膜的转运相关，在细胞膜中发现了大多数转肽酶。在这种转运过程中，GSH与γ-谷氨酰转移酶(也称为转肽酶)相互作用形成γ-谷氨酰氨基酸，后者被转运

到细胞内。细胞内γ-谷氨酰氨基酸是γ-谷氨酰环转移酶(反应4)的底物,该酶将这些化合物转化成相应的氨基酸和5-氧代-L-脯氨酸。5-L-氧代脯氨酸向L-谷氨酸的ATP依赖性转化由细胞内酶5-氧代-脯氨酸肽酶催化(反应5)。该转肽酶反应中形成的半胱氨酰甘氨酸被二肽酶裂解(反应6)。这六个反应构成了γ-谷氨酰循环,该循环解释了GSH的合成和酶促降解。

[0010] 所述循环中的两种酶也在S-取代的GSH衍生物的代谢中起作用,该衍生物可以通过GSH与某些亲电子化合物的反应非酶促地形成,或通过GSH S-转移酶而形成(反应7)。这类缀合物的γ-谷氨酰基部分通过γ-谷氨酰转肽酶的作用而去除(反应3),该反应是由γ-谷氨酰氨基酸形成促进的反应。得到的S-取代的半胱氨酰甘氨酸被二肽酶裂解(反应6A),产生相应的S-取代的半胱氨酸,后者可以经历N-乙酰化(反应8)或额外的转肽反应以形成相应的γ-谷氨酰基衍生物(反应3A)。

[0011] 细胞内GSH被含硒GSH过氧化物酶转化为其氧化的二聚体形式(GSSG),GSH过氧化物酶催化H_2O_2和其他过氧化物的还原(反应9)。GSH也通过转氢作用转化成GSSG(反应10)。GSSG还原成GSH由广泛分布的使用NADPH的酶GSSG还原酶介导(反应11)。也已经报道了GSH到GSSG的胞外转化;整个反应需要O_2并导致形成H_2O_2(反应12)。GSSG也通过GSH与自由基的反应而形成。GSH依赖性抗氧化系统由GSH加以下两种酶组成:GSH过氧化物酶和GSH还原酶。随着该系统的运行,GSH在其氧化形式(GSSG)和还原形式(GSH)之间循环。

[0012] 在含有不饱和脂肪酸的脂质的过氧化过程中形成的脂质过氧化氢,不是被通常的GSH过氧化物酶还原,而是被专门设计用于处理磷脂中的过氧化脂肪酸的特殊酶还原。这种被称为磷脂过氧化氢GSH过氧化物酶的酶是可将H_2O_2和脂质过氧化氢两者还原成相应氢氧化物(分别为水和脂质氢氧化物)的蛋白质。与磷脂过氧化氢GSH过氧化物酶不同,普通GSH过氧化物酶不能作用于脂质过氧化氢。

[0013] GSH的转运

[0014] 哺乳动物细胞中的细胞内GSH水平在0.5-10mM的范围内,而在血浆中通常发现μM浓度。细胞内GSH通常是超过99%的还原形式(GSH)。正常的健康成人肝脏每天合成8-10克GSH。通常,从肝脏到血浆中有明显的GSH流动。参与GSH的器官间转运的主要器官是肝脏和肾脏,它是清除循环GSH的主要器官。据估计占净血浆GSH周转的50-67%。数名研究者已经发现,在通过肾脏的单次通过期间,80%或更多的血浆GSH被提取出来,大大超过了肾小球滤过可达到的量。尽管过滤后的GSH通过刷状缘酶γ-谷氨酰转移酶和半胱氨酰甘氨酸二肽酶的作用逐步降解,但GSH的其余部分似乎通过存在于基底侧膜中的无关的、Na+依赖性系统转运。从肝细胞转运的GSH与小导管细胞的转肽酶相互作用,并且由小导管内皮大量重吸收代谢物。在大鼠中,在肝静脉和胆汁中分别出现约12和4nmol/g/min的GSH。

[0015] GSH以四种形式存在于血浆中:还原型GSH(GSH),氧化型GSH(GSSG),具有半胱氨酸的混合二硫化物(CySSG),和通过SH键结合的蛋白质(GSSPr)。GSH等价物的分布与(半)胱氨酸的分布明显不同,并且当在生理浓度下添加GSH或半胱氨酸时,发生快速再分布。GSH等价物在大鼠血浆中的分布为70.0%结合的蛋白质,其余30%分配如下:28.0% GSH,9.5% GSSG,和62.6%作为具有半胱氨酸的混合二硫化物。发现半胱氨酸等价物的分布为23%结合的蛋白质,其余77%分布如下:5.9%半胱氨酸,83.1%胱氨酸,和10.8%作为具有GSH的混合二硫化物。血浆硫醇和二硫化物并不平衡,但似乎处于稳态,部分通过这些化合物在其

代谢的器官间阶段期间在组织间转运而保持稳态。大量与蛋白质结合的GSH和半胱氨酸提供了实质的缓冲，在分析GSH和半胱氨酸的瞬时变化时必须考虑到这种缓冲。这种缓冲可以防止瞬时的硫醇-二硫化物氧化还原变化，这种变化可影响血浆和质膜蛋白质的结构和活性。在红细胞中，GSH参与了维持血红蛋白以及酶和膜蛋白质的天然结构的反应。GSH存在于红细胞中的水平是血浆水平的1000倍。它起到抗毒性自由基的主要小分子抗氧化剂防御的作用，这种自由基是红细胞处理O_2不可避免的副产物。

[0016] GSH和免疫系统

[0017] 硫醇，特别是GSH，对淋巴细胞功能至关重要。混合淋巴细胞反应、T细胞增殖、T细胞和B细胞分化、细胞毒性T细胞活性和自然杀伤细胞活性需要足够浓度的GSH。已显示足够的GSH水平对于嗜中性粒细胞中的微管聚合是必需的。腹膜内施用的GSH增强了小鼠中细胞毒性T淋巴细胞的激活，并且发现饮食GSH改善衰老小鼠中GSH的脾状态，并增强T细胞介导的免疫应答。

[0018] 巨噬细胞的存在可以导致其附近的活化淋巴细胞的细胞内GSH水平大幅增加。巨噬细胞通过强大的膜转运系统消耗胱氨酸，并产生大量的半胱氨酸释放到细胞外间隙。已经证明，巨噬细胞GSH水平(因此，半胱氨酸等价物)可以被外源GSH增强。T细胞不能产生它们自己的半胱氨酸，并且T细胞需要它作为GSH合成的限速前体。有丝分裂刺激的淋巴细胞中的细胞内GSH水平和DNA合成活性被外源半胱氨酸强烈增加，但不被胱氨酸增加。在T细胞中，胱氨酸的膜转运活性是半胱氨酸的十分之一。因此，即使在健康的生理条件下，T细胞也具有半胱氨酸的低基线供应。巨噬细胞的半胱氨酸供应功能是使T细胞能从缺乏GSH的状态转变为富含GSH的状态的机制的重要部分。

[0019] 细胞内GSH浓度对T细胞活化的重要性已得到充分证实。已经报道，用GSH处理后，T细胞中的GSH水平升高；还不清楚这种增加是由于完整GSH的摄取还是通过细胞外分解、分解产物的转运以及随后的细胞内GSH合成。GSH减少10-40％可以完全抑制体外T细胞活化。已显示细胞内GSH的消耗在响应的早期阶段抑制有丝分裂诱导的核大小转化。半胱氨酸和GSH消耗也影响活化的T细胞的功能，如同种异体混合淋巴细胞培养后期的循环T细胞克隆和活化的细胞毒性T淋巴细胞前体细胞。IL-2依赖性T细胞克隆中的DNA合成和蛋白质合成，以及预活化CTL前体细胞的持续生长和/或其功能性分化为细胞毒性效应细胞，对GSH消耗非常敏感。

[0020] 发现小鼠细胞毒性T淋巴细胞的生理活性的体内激活在响应的晚期被腹膜内(i.p.)GSH增强，但在响应的早期不被其增强。在免疫后第三天注射GSH介导了细胞毒性活性的5倍增加。如通过伴刀豆球蛋白A刺激的老年大鼠脾细胞增殖的维持所证明的，膳食GSH补充可逆转大鼠免疫应答的年龄相关衰退。

[0021] GSH状态是防止氧化损伤的主要决定因素。GSH一方面通过减少由GSH过氧化物酶催化的反应中的过氧化氢和有机氢过氧化物，另一方面通过与能够诱导氧化应激的亲电子异生中间体缀合而起作用。肾小管的上皮细胞具有高浓度的GSH，这无疑是因为肾脏在毒素和废物消除中的功能，并且肾小管的上皮暴露于多种有毒化合物。从细胞外培养基转运到细胞中的GSH基本上保护从肠和肺分离的细胞免受叔丁基过氧化氢、甲萘醌或百草枯(paraquat)诱导的毒性。分离的肾细胞也转运GSH，其可以补充GSH的内源性合成以防止氧化损伤。也已报道，在外源性GSH的存在下，肝GSH含量上升，实际上增加一倍。这可能是由于

直接转运,如对于肠和肺泡细胞所报道的,或是通过细胞外降解、转运和细胞内再合成。

[0022] GSH的半胱氨酸部分的亲核硫原子充当保护细胞免受有毒亲电体诱导的有害作用的机制。GSH S-缀合物生物合成是药物和化学解毒的重要机制这一概念已经确立。底物的GSH缀合通常需要GSH和GSH-S-转移酶活性。具有特定但又重叠的底物特异性的多种GSH-S-转移酶的存在使酶系统能够处理众多的化合物。

[0023] 据认为,几类化合物通过GSH缀合物形成转化为毒性代谢物。已显示卤代烯烃、氢醌和醌通过与GSH形成S-缀合物而形成毒性代谢物。肾脏是通过该途径代谢的化合物的主要靶器官。对肾脏的选择性毒性是肾脏积累通过在近端肾小管细胞中加工S-缀合物而形成的中间体,并将这些中间体生物激活为毒性代谢物的能力的结果。

[0024] 将吗啡和相关化合物施用至大鼠和小鼠导致至多约50%的肝GSH损失。已知吗啡被吗啡6-脱氢酶活性生物转化为吗啡酮,吗啡酮是一种高度肝毒性的化合物,通过皮下注射,其在小鼠中的毒性是吗啡毒性的9倍。吗啡酮具有α,β-不饱和酮,后者允许形成GSH S-缀合物。该缀合物的形成与细胞GSH的损失相关。该途径代表了吗啡的主要解毒过程。GSH预处理在小鼠中防止吗啡诱导的致死性。

[0025] 共施用GSH大大阻止了甲基汞对小鼠神经母细胞瘤细胞的有害作用。GSH可与甲基汞复合,阻止其向细胞内的转运,并增加细胞抗氧化能力以防止细胞损伤。据认为,甲基汞通过微管蛋白SH的氧化且通过由于过氧化损伤引起的改变对细胞微管发挥其有害作用。GSH还防止其他重金属如镍和镉的中毒。

[0026] 由于其在肾脏解毒中的已知作用及其低毒性,GSH已被作为辅助疗法用于接受采用肾毒性药物如顺铂的癌症化疗的患者,以减少全身毒性。在一项研究中,在环磷酰胺给药前不久及之后,以两次2,500mg的分剂量,将GSH静脉内施用至患有晚期肿瘤疾病的患者。GSH被良好地耐受,并且不产生意料之外的毒性。缺乏膀胱损伤,包括显微镜性血尿,支持这种化合物的保护作用。其他研究表明,静脉内GSH与顺铂和/或环磷酰胺联合疗法的共施用减少了相关的肾毒性,同时没有不适当地干扰这些药物的所需的细胞毒性作用。

[0027] GSH在碱性或氧化环境中相对不稳定,并且不被胃吸收。据认为,GSH在口服给药后被吸收,如果是这样,则在十二指肠的后半部分和空肠开始处吸收。还认为,口服施用的谷胱甘肽往往会在胃中降解,并且特别是在碱性条件下被十二指肠中存在的脱硫酶和肽酶降解。尽管GSH可能降解,作为氨基酸转运,并在细胞中再合成,但也可能存在GSH转运至细胞内而不降解的情况;而实际上施用半胱氨酸或半胱氨酸前体可干扰这一过程。

[0028] 由于摩擦电效应,纯GSH形成保持静电荷的片状粉末,使加工和配制困难。粉末颗粒也可以具有类似于驻极体的静电极化。GSH是强还原剂,因此在氧气或其他氧化剂的存在下会发生自氧化。U.S.5,204,114提供了一种制备GSH片剂和胶囊的方法,其使用结晶抗坏血酸作为添加剂来减少干扰高速设备的摩擦电效应并将GSH保持在还原状态。GSH被很好地吸收,并且在经口摄入后0.5小时内开始分布到外周血单核细胞(PBMC)中。U.S.4,454,125中进而公开了某种结晶抗坏血酸。该结晶形式可用作机器润滑剂。抗坏血酸具有良好耐受、抗氧化性和降低GSH上的净静电荷的优点。

[0029] 许多疾病状态与GSH水平的降低具体相关。降低的GSH水平,无论是在特定器官中局部降低还是全身降低,都与许多临床上确定的疾病和疾病状态相关。这些包括HIV/AIDS、糖尿病和黄斑变性,所有这些都因为过度的自由基反应和GSH不足而进展。其他慢性状况也

可能与GSH缺乏相关，包括心力衰竭和血管成形术后的冠状动脉再狭窄。

[0030] 临床和临床前研究已经证明了一系列自由基病症与GSH水平不足之间的联系。糖尿病并发症可能是高血糖发作的结果，高血糖发作促进细胞酶的糖化，由此使GSH合成途径失活。GSH缺乏在糖尿病患者中发生，这解释了这些患者中白内障、高血压、闭塞性动脉粥样硬化的普遍性，以及对感染的易感性。

[0031] GSH通过与致癌亲电体形成GSH S-缀合物、阻止与DNA的反应以及与重金属如镍、铅、镉、汞、钒和锰的螯合络合物而起到解毒剂的作用。GSH也在多种药物如阿片剂的代谢中发挥作用。它已被用作采用肾毒性化疗药物如顺铂的治疗的辅助治疗，并且已经报道了预防多柔比星诱导的心肌病。GSH也是对乙酰氨基酚和乙醇(两种强效肝毒素)解毒中的重要因素。

[0032] GSH的药代动力学

[0033] 在大鼠中测定静脉内施用的GSH的药代动力学，并借助于开放性二室模型进行解释。在团注50-300mmol/kg GSH后，(i)GSH、(ii)氧化型GSH/GSSG、(iii)总硫醇和(iv)可溶性硫醇减去GSH的动脉血浆浓度升高，然后迅速非指数性下降，正如所预期的那样。随着剂量的增加，药物消除和血浆清除的速率常数从0.84mL/min增加到2.44mL/min。消除期的半衰期从52.4分钟降至11.4分钟。随着剂量的增加，表观分布体积和GSH渗入组织内的程度均减小(分别从3.78L/Kg至1.33L/Kg，以及作为k_{12}/k_{21}从6.0至0.51)。数据表明GSH被迅速消除。这主要是由于血浆中的快速氧化，而不是由于组织提取或体积分布的增加。因此，血浆GSH水平似乎被快速调节，身体可以借此将浓度维持在窄生理限度内。

[0034] 当向绵羊静脉内施用单剂量600mg GSH时，静脉血浆和肺淋巴中的GSH水平短暂升高。静脉血浆的平均浓度约为50mM，30分钟时达到峰值，45分钟后恢复至基线。15分钟时肺淋巴峰值水平约为100mM，30分钟后回到基线。在三小时观察期间，平均上皮衬液(ELF)水平是可变的，但是相比基线没有显示出显著增加。尿排泄迅速，15分钟时达到峰值水平。在血浆和肺淋巴中，GSH占总GSH(GSH加GSSG)的超过95％。在ELF中，基线GSH的75.4％处于还原形式，而尿液中59.6％以GSH存在。

[0035] 经口摄入的还原型GSH在大鼠模型中从小肠完整地吸收，特别是在空肠上部。值得注意的是，大鼠代谢与人类不同，因此大鼠研究的结果应在结果外推之前在人类中进行验证。在AIN-70半合成饮食中以大剂量液体(30mM)或混合液体(2.5-50mg/g)施用GSH后，大鼠中的血浆GSH浓度从15mM增加至30mM(11)。GSH给药后90-120分钟时GSH浓度最高，并且持续高水平3小时以上。GSH的氨基酸前体的施用对血浆GSH值没有或几乎没有影响，表明GSH分解代谢和再合成不能解释所见的GSH浓度增加。L-丁硫氨酸-[S,R]-砜亚胺(BSO)和阿西维辛对GSH合成和降解的抑制表明，血浆GSH增加主要是由于完整GSH的吸收，而不是GSH代谢物的吸收。GSH给药后血浆蛋白质结合的GSH也增加，时程类似于对于游离血浆GSH所观察到的时程。因此，膳食GSH可被完整吸收，并导致血浆GSH的大幅增加。

[0036] 在(i)禁食48小时的大鼠、(ii)用GSH消耗剂处理的小鼠和(iii)用扑热息痛(一种促进肝GSH消耗、继而肝中心小叶坏死的药物)处理的小鼠中，经口施用GSH增加了肝GSH水平。在这些实验中，动物经口管饲1000mg/kg体重的GSH。48小时禁食大鼠中的平均预处理值为3.0-3.1mmol/g新鲜肝组织。处理后的平均值分别为处理后2.5、10和24小时的5.8、4.2和7.0mmol/g新鲜肝组织。向小鼠给予口服剂量的GSH(100mg/kg)，在30、45和60分钟时测定血

浆中的GSH浓度，并在1小时后测定肝脏、肾脏、心脏、肺、脑、小肠和皮肤中的GSH浓度。在经口GSH给药30分钟内，血浆中的GSH浓度从30mM增加至75mM，这与GSH从肠腔到血浆的快速流出一致。在相同的时程中，在除了肺以外的大多数组织中没有获得超过对照值的增加。用GSH合成抑制剂BSO预处理的小鼠显著降低了GSH的组织浓度，并且向这些动物经口施用GSH导致肾脏、心脏、肺、脑、小肠和皮肤的GSH浓度的统计学显著增加，但肝脏浓度不显著增加。

[0037] 在10名健康人类志愿者中研究了GSH的动力学和对血浆和尿SH的作用。静脉内输注2000mg/m^2 GSH后，血浆中的总GSH浓度从17.5±13.4mmol/升(平均值±SD)升高至823±326mmol/升。外源GSH的分布体积为176±107Ml/Kg，消除速率常数为0.063±0.027/分钟，相当于14.1±9.2分钟的半衰期。输注后，血浆中的半胱氨酸从8.9±3.5mmol/升增加至114±45mmol/升。尽管半胱氨酸增加，但总(半)胱氨酸(即半胱氨酸、胱氨酸和混合二硫化物)的血浆浓度降低，提示半胱氨酸从血浆向细胞内的摄取增加。在输注后90分钟内，GSH和(半)胱氨酸的尿排泄分别增加了300倍和10倍。

[0038] 向正常健康志愿者给予口服剂量的GSH以确定饮食GSH是否可以提高血浆GSH水平。结果表明，在五名受试者中的四名中，口服剂量的GSH(15mg/kg)使人体内血浆GSH水平相对于基础浓度升高了1.5-10倍，平均值是正常血浆GSH水平的三倍。口服给药后1小时血浆GSH变成最大值，3小时后降至最大值的约1/2。等量的GSH氨基酸成分不能增加血浆GSH水平。与血浆蛋白质结合的GSH也增加，其时程与游离GSH所见的时程相同。

发明内容

[0039] 药物GSH安全、稳定、可快速生物利用，并补充在病毒感染、有毒化学物质暴露和辐射中不断丢失的GSH。它维持表达四种依赖于浓度的性质所需的细胞内水平。GSH疗法：(1)确保GSH可用性以支持从天花恢复所需的TH1免疫应答；(2)减缓导致累积组织毒性的NF-κB和炎性级联的活化和过表达；(3)生物化学中和反应性中间体，否则该中间体会引起细胞和组织毒性；(4)可使关键病毒蛋白质失去活性，并抑制复制。因此，GSH疗法可降低发病率，如HIV感染、其他痘病毒和丙型肝炎的人类和动物研究实例中所示。

[0040] 始终正常的细胞内GSH浓度有助于维持T辅助1和2(Th1和Th2)免疫应答模式的平衡。当GSH持续丢失时，恢复性GSH疗法迅速上调Th1，增强恢复所需的IFNγ和细胞介导的免疫，同时在急性病毒感染期间过表达时，下调IL-4(一种不利的Th2细胞因子)。GSH的这种有益作用(恢复应答所需的)已被证明可以抵抗其他危险的病毒，包括痘病毒。

[0041] 始终正常的细胞内GSH浓度还在细胞内设置了高还原氧化电位，这减慢了NFκB、TNFα、IL-1β、粘附分子、环加氧酶-2、基质金属蛋白酶和炎性级联的活化和过表达。该机制也被证明可以抵抗其他危险的病毒，包括痘病毒。

[0042] 生化中和反应：(a)GSH中和在病毒感染过程中持续产生的活性氧(ROS)和活性氮(RNS)，否则它们会损害细胞膜脂质、蛋白质和核酸，并且导致细胞和组织毒性；(b)GSH保护线粒体免受过氧化氢、生物能衰竭和加剧的凋亡过程的影响，该过程增加累积的组织毒性；(c)始终正常的细胞内GSH浓度有助于控制花生四烯酸的非酶促和酶促氧化。否则这些会导致来自脂质过氧化氢的反应性中间体(烷氧基LO• 和羟基 •OH)的组织破坏性过量。如GSH在针对HIV使用时所发生的那样，硫醇(-SH)部分能够进行翻译后蛋白质修饰，这可能会使感染期间合成的热力学不太稳定的病毒蛋白质失效。例如，可能受阻的天花病毒蛋白质包

括参与病毒复制的蛋白质，例如编码的病毒DNA拓扑异构酶，以及参与逃避宿主免疫防御的蛋白质。

[0043] 这四种性质包括GSH的主要临床药理学，因为它涉及降低天花感染的发病率，并且可能降低天花感染的死亡率。该药理学在其他情况下变宽。由于它们之间强烈相关，因此这四种性质的分类具有不明确的界限。

[0044] 树突细胞、巨噬细胞和淋巴细胞中的高正常GSH浓度迅速上调从病毒感染中恢复所需的Th1应答模式(例如，IL-12、IFNγ和特异性细胞介导的免疫)，并下调Th2应答模式(例如，IL-4、IL-10和体液免疫)。Th1和Th2应答模式必须进行平衡、定时和控制。为了最小化或从急性病毒感染如天花中恢复，宿主需要：IL-12，受控的IFNγ，特异性细胞毒性淋巴细胞，诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的表达伴随一氧化氮(•NO)产生的增加，有效的抗原加工和呈递，抗原加工细胞中充足的GSH浓度，以及Th2应答模式的下调。这些因素是主要的Th1应答模式，并依赖于树突细胞、巨噬细胞和淋巴细胞的GSH浓度。由于从病毒感染中恢复需要Th1细胞因子，因此使平衡偏向于Th1应答将是有益的，如同充足的GSH水平一样。在病毒感染期间并且在没有足够GSH的情况下，Th1与Th2应答之间的相互性质导致Th2优势，IL-4水平升高且Th1应答减少。临床后果包括感染延长、严重程度增加和潜在的致死性。如果GSH浓度下降，则巨噬细胞和患者特别危险。例如，在AIDS患者中，肺巨噬细胞中的GSH缺乏导致机会性微生物(通常不是人类病原体，例如卡氏肺囊虫(Pneumocystis carinii))的无拘束生长。HIV/AIDS是GSH减少所带来的灾难性后果的“典型”。

[0045] 当吸血雌性将病毒注入人体皮肤时，启动诸如寨卡病毒(ZIKV)、登革病毒(DENV)、埃博拉病毒(EV)、黄热病毒(YFV)、西尼罗病毒(WNV)、日本脑炎病毒(JE)、圣路易斯脑炎病毒、鄂木斯克出血热(OMF)、夸赛纳森林病(KFD)、墨累河谷脑炎病毒、Kunjin病毒、Kunjin病毒、蜱传脑炎、羊跳跃病病毒、Powassan病毒等虫媒病毒的节肢动物介导的传播。像黄病毒科的许多其他成员一样，ZIKV在伊蚊叮咬后传播。已知不同的细胞类型如表皮角质形成细胞、树突细胞或神经元是黄病毒的靶标。在ZIKV感染后，在成纤维细胞、角质形成细胞和未成熟树突细胞(iDC)中以时间依赖性方式观察到病毒复制，早在感染后24小时就有相当大比例的感染细胞，而所有细胞都能够产生传染性病毒体。多年来已知在iDC和巨噬细胞上高度表达的DC-SIGN允许登革病毒的附着和感染，从而促进病毒传播。

[0046] TIM家族由三种受体组成：TIM-1、TIM-3和TIM-4。TIM-1由Th2细胞和上皮细胞表达，而Th1细胞主要表达TIM-3。TIM-4的表达限于抗原呈递细胞。TIM受体具有不同的作用，如凋亡细胞的磷脂酰丝氨酸(PtdSer)依赖性吞噬细胞去除，或先天性和适应性免疫应答的调节。在用DENV、WNV或YFV感染后，TIM-1和TIM-4表达被高度调节。TIM-1受体在感染中的重要性通过使用沉默技术或阻断抗体得到证明。TAM受体家族由TYRO3、AXL和MER受体组成，这些受体是有助于调节免疫应答的蛋白质酪氨酸激酶。AXL和MER广泛表达，而TYRO3表达主要在中枢神经系统中观察到。最近描述了TAM受体介导细胞系和原代人细胞中的DENV、WNV和YFV进入。

[0047] 最近显示，DC-SIGN、TYRO3，尤其是AXL，在ZIKV进入人类皮肤细胞和在其中复制方面起重要作用。与已针对DENV感染所报道的相反，TIM-1和TIM-4受体似乎在ZIKV进入人类皮肤细胞中发挥较小作用，尽管已观察到TIM和TAM家族成员的协同作用。

[0048] 病毒感染后，细胞发生一系列抗病毒反应以限制病毒的传播，主要防御由先天性

和适应性免疫应答组成。初始应答由I型干扰素(IFN)的产生所提供。由模式识别受体(PRR),如Toll样受体(TLR)家族或RIG-I样受体,感知和介导由病毒表达的病原体相关分子模式(PAMP)的早期检测。在检测到PAMP后,各种信号传导途径的触发不仅导致IFN的直接分泌,而且导致数百个整合起来诱导细胞抗病毒状态的干扰素刺激基因(ISG)的表达。DENV和WNV感染已成为大量研究的主题,这些研究显示RIG-I、MDA5和TLR3传感器在针对这些病毒的宿主防御中起关键作用,从而导致1型IFN产生和ISG表达。以类似的方式,用ZIKV感染人成纤维细胞诱导RIG-I、MDA-5和TLR3以及ISG ISG15、OAS2和MX1的表达。而且,IRF7(一种与I型IFN基因上的启动子结合的转录因子)表达水平的增加证实了ZIKV感染的成纤维细胞对IFN-α和IFN-β的强烈诱导。此外,某些炎性趋化因子如CCL5的表达也在ZIKV感染时得到诱导。如AIM2和IL-1β转录物表达的增加所示,炎性体途径在ZIKV感染后似乎也被激活。

[0049] 不同的细胞过程可被黄病毒劫持以逃避细胞应答并促进病毒复制。感染后宿主立即建立快速的先天性免疫应答,包括I型IFN应答、诱导凋亡和自噬,以克服病毒感染。WNV能够避开检测或抑制IFN基因转录。另外,几种虫媒病毒如DENV和CHIKV可以颠覆自噬过程,以促进其自我复制和传播。众所周知,黄病毒能够重新排列宿主细胞膜,为其复制创造适当的环境,膜的主要来源是内质网。这些重新排列导致未折叠蛋白质应答(UPR)的激活,并同时在受感染的细胞中过表达自噬途径。被称为自噬体的双膜囊泡允许细胞质元件、蛋白质和细胞器的募集,并允许其降解。自噬可以在宿主对病原体的免疫中起积极或消极作用。在最后的机制中,病毒利用自噬途径来促进其自身复制。

[0050] ZIKV感染的成纤维细胞中自噬的第一条证据,由感染的成纤维细胞中特征性自噬体样囊泡的存在突出显示。然后,感染的成纤维细胞中自噬的诱导增加LC3(一种胞质微管相关分子)的产生。后者与病毒包膜蛋白共定位,提示自体吞噬泡是病毒复制的部位。在感染期间使用自噬体形成抑制剂显著减少了病毒拷贝数,而自噬诱导剂增加了病毒复制,表明自噬可能在ZIKV免疫逃避中起主要作用。自噬被GSH抑制,并且这在病毒繁殖周期中提供了显著的治疗干预。参见Hamel R等人,“Zika virus:epidemiology,clinical features and host-virus interactions,Microbes and Infection”(2016),dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2016.03.009。

[0051] 除了由Th1/Th2应答模式产生的直接T细胞活性外,IFNγ对诱导许多额外物质的影响在严重病毒感染如天花中有关,例如,(i)IFNγ在足够的GSH的保护下促进iNOS和•NO的产生,该GSH用来防止NO与氧自由基和脂质过氧化物的浪费、危险的反应;(ii)IFNγ诱导特异性趋化因子,Mig和Crg-2;(iii)激活组织蛋白酶S,一种有效的半胱氨酸蛋白酶;和(iv)导致用免疫蛋白酶体替代组成型蛋白酶体以供有效的抗原加工和呈递。这四种IFNγ依赖性,并且最终

[0052] 长期以来一直认为硫醇在Th1/Th2应答模式中是重要的。N-乙酰基-L-半胱氨酸(NAC)和GSH以剂量依赖性方式降低受刺激的外周血T细胞和T辅助(Th)0样和Th2样T细胞克隆产生人IL-4。这种效应与IL-4信使RNA转录的减少相关。他们发现这些硫醇在体外和体内也降低IL-4诱导的Ig的产生。GSH是细胞内氧化还原和细胞生理学其他方面的调节剂,作为Th1和Th2细胞因子应答模式的平衡和程度的关键。发现抗原呈递细胞中的GSH浓度决定Th1或Th2应答模式是否占优势。基本发现是GSH上调Th1和下调Th2细胞因子应答模式。用于消耗细胞内GSH的三种实验方法之一是乙醇。GSH和NAC通过优先下调IL-4有利于Th1应答。他

们还发现这些巯基下调了CD30的表达,CD30是一种属于TNF受体超家族的表面抗原,由活化的Th细胞表达,并且在Th2细胞中持续存在。当与人肺泡巨噬细胞(AM)一起温育时,GSH前体NAC提高了GSH/GSSG比,并增强了先前已经暴露于脂多糖(LPS)的AM的IL-12分泌。由于AM暴露于IFNγ增加了AM细胞中的GSH/GSSG,因此也显示了相互环。AM进一步暴露于IL-4降低了AM细胞中的GSH/GSSG。NAC:(i)增加流感病毒特异性淋巴细胞增殖,(ii)增加IFNγ产生;并且(iii)增强流感特异性CD8+CTL(细胞毒性淋巴细胞)的比活性。通过施用L-胱氨酸衍生物、马来酸二乙酯或L-丁硫氨酸-[S,R]-砜亚胺来体内应用NAC或GSH单乙酯和含有低GSH的巨噬细胞,可以开发具有高细胞内GSH浓度的巨噬细胞。高GSH巨噬细胞显示出升高的IL-12和•NO产生,IL-6和IL-10产生减少。低GSH巨噬细胞显示出升高的IL-6和IL-10产生以及减少的•NO和IL-12产生。在高GSH巨噬细胞的存在下,CD4(+)CD 44(-)幼稚Th 0细胞分化成Th1细胞,并且分化成具有低GSH巨噬细胞的Th2细胞。NAC下调T依赖性B细胞活化,并导致Th1极化,可能是通过下调IL-4产生。

[0053] 先前发现表达鼠IL-4的实验室构建的重组痘苗病毒单独地在免疫活性小鼠中是高毒性且清除不良的。这种IL-4毒性被IL-4与IFNγ的共表达所逆转,其中发生病毒清除并且存在低浓度的IL-4。这提示施用高剂量GSH可以克服由IL-4增强的病毒工程化痘病毒的致死性增加,因为GSH上调Th1细胞因子的产生,增加IL-12和IFNγ,并且可以降低IL-4的表达。与对照VV相比,经改造以表达鼠IL-4基因的重组痘苗病毒(VV)清除不良。与对照VV感染相比,在用IL-4增强的VV感染期间,细胞毒性T淋巴细胞大大减弱,但抗病毒抗体水平和NK活性在两组之间没有差异。表达VV的IL-4引起对通常用来清除病毒的IL-12、IFNγ和•NO产生的抑制。

[0054] IL-4影响呼吸道合胞病毒(RSV)表位特异性CTL有效性。与单独的VVM2蛋白相比,构建为共表达RSV M2蛋白和IL4的重组痘苗病毒(VV)感染导致M2特异性CTL活性降低,表明当呈递抗原时,IL-4的局部表达降低体内原代和记忆CD8(+)RSV特异性CTL应答的细胞裂解活性。如上所述,在病毒感染时GSH不足将产生相当于携带额外拷贝的IL-4基因的工程化病毒的结果。低GSH可能随以下因素而发生:年龄,仅在45岁以上,酒精、糖尿病、HIV感染以及暴露于环境毒素等。

[0055] 在此描述了IFNγ的一些主要作用,因为GSH上调Th1应答模式,这导致IFNγ活性增加。面对抗原呈递,在急性、危险的病毒感染中,宿主恢复将由于Th1应答模式的消逝或减少而严重受损,包括这四种IFNγ依赖性功能:

[0056] IFNγ抑制与细胞产生NO相关的小鼠巨噬细胞中的鼠痘病毒、痘苗病毒和单纯疱疹病毒-1(HSV-1)病毒的复制。IFNγ诱导NO合酶。IFNγ以剂量依赖性方式抑制痘苗病毒(VV)的生长。VV DNA合成被阻断并且与增加的活性氮中间体的产生相关。

[0057] 由IFNγ引起的iNOS的不受控制的诱导以及由此增加的NO产生可以导致更大的氧化负荷并引起硝化应激,这可能是由于胶质细胞培养物毒性对小胶质细胞中高GSH水平的抗性以及在i-NOS的诱导过程中对线粒体中Mn-SOD的上调。这将减轻总氧化负荷并节约GSH。

[0058] GSH通过防止NO与氧自由基和脂质过氧化物的虚假、浪费和危险反应,在保护NO生理学和抗微生物性质方面确实具有重要作用。简言之,GSH使正常、有益的NO功能达到最大。GSH也可以帮助延缓或防止铁死亡。

[0059] IFNγ的另一个功能是诱导特异性趋化因子。干扰素可诱导的趋化因子具有针对痘病毒的抗病毒作用。在C57 BL/6小鼠的痘苗病毒和鼠痘病毒感染过程中研究由IFNγ诱导的单核因子(Mig)和细胞因子应答基因(Crg-2)。趋化因子全身诱导。Mig和Crg-2诱导病毒清除。

[0060] IFNy上调组织蛋白酶S——一种对B细胞和树突细胞内MHC II类相关恒定链的完整加工至关重要的酶。组织蛋白酶S是一种半胱氨酸蛋白酶,并且具有抗原加工所必需的内切蛋白水解活性。

[0061] IFNγ诱导用免疫蛋白酶体替代组成型蛋白酶体,从而将这些多种蛋白酶引导至从蛋白质到抗原肽的有效抗原加工。蛋白酶体以不同的方式切割蛋白质,以帮助产生在主要组织相容性复合物I类分子上呈递的抗原肽。蛋白酶体决定该肽的C末端,而内质网或胞质溶胶中的特定肽酶则决定延伸肽的N末端。IFNγ通过诱导亮氨酸氨肽酶来刺激抗原肽N末端的蛋白酶体后修剪。因此,IFNγ不仅促进决定抗原肽C末端的蛋白酶体切割,而且可以(独立于蛋白酶体)通过诱导LAP(亮氨酸氨肽酶)来刺激其N末端的形成。

[0062] IFNγ表达三个蛋白酶体亚单位(低分子量蛋白质LMP2和LMP7,以及多催化性内肽酶复合物样1,MECL-1),以形成优化MHC I类抗原加工的免疫蛋白酶体。在所采用的模型中,它们显示乙型肝炎病毒细胞毒性T淋巴细胞表位的有效生成需要免疫蛋白酶体的结构特征。在对淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒或细菌单核细胞增生李斯特菌(Listeria monocytogenes)的免疫应答期间,免疫蛋白酶体在很大程度上替代肝脏中的组成型蛋白酶体。关键细胞如单核细胞/巨噬细胞、树突细胞和淋巴细胞中的GSH浓度易受酒精、毒素、氧化应激、身体压力/精神压力、感染、创伤、烧伤以及非细菌性和细菌性脓毒症的影响而迅速下降。结果Th1/Th2平衡转变为Th2优势,使回收变得困难。

[0063] 已经证明GSH和Th1/Th2转变对于期望的宿主防御和病毒清除参数至关重要的危险病毒的实例包括痘苗病毒、表达IL-4的重组VV、呼吸道合胞病毒、鼠痘病毒和单纯疱疹病毒-1。

[0064] GSH的主要性质是维持氧化还原电位,即还原相对于氧化的电势[GSH]/[GSSG]。这个比值在500的范围内。细胞中的正常[GSH]为5-10mM。GSH是细胞中还原氧化电位的主要决定因素,并且保护性地参与多种细胞活动,包括控制人类自然杀伤细胞中的细胞周期进程,以及对感染、化学暴露和其他有害因素的防御反应,这些因素例如是柴油机废气颗粒、老化、糖尿病和光氧化视网膜损伤。GSH浓度对氧化还原的影响以及随后对特定实体如NFκB家族、TNFα、细胞因子、COX-2和粘附分子的影响为术语“宿主因子”提供了实质性内容,也为其他治疗提供了方向,例如,提高GSH,同时保护患者免受化学毒素和其他对GSH有害的因素的影响。

[0065] 生物化学进化朝着稳定/可控的pH、pO_2、容量摩尔渗透压浓度和$[Na^+]/[K^+]$范围前进;这个过程也导致稳定/可控的氧化还原。当GSH浓度高时,氧化还原高。然后,它可以控制和减缓以下因子的过度活化:NFκB家族,氧化剂敏感性转录调节因子;促炎细胞因子;COX-2;粘附分子;和引起次级级联的TNFα和IL-1β。GSH的显著降低导致氧化还原的下降以及NFκB家族和其他因子的活化。

[0066] 化学毒素,包括工业毒素,与GSH发生化学计量反应。与硫醇的体内反应可导致GSH缺乏,从而导致细胞还原-氧化(氧化还原)状态的改变、细胞因子的释放和促进T辅助细胞2

表型。

[0067] 在开始时GSH不足并且仅能够少量产生IL-12和IFNγ并且排列天花特异性细胞毒性淋巴细胞的个体中，天花感染可能更严重。GSH不足和Th2表型优势可能是表面上看起来完全不同的人群中共同的因素，如果用现在的活疫苗接种天花，这些人群面临增加的并发症风险。

[0068] 在45岁以上的人中发生GSH浓度降低和氧化还原状态减弱，并且发生GSH/GSSG氧化还原的急剧下降，以及在整个年龄段(在血浆中)半胱氨酸/胱氨酸氧化还原状态随年龄的线性氧化，速率为0.16mV/年，GSH/GSSG氧化还原在45岁前未被氧化，随后以0.7mV/年的接近线性速率被氧化。与半胱氨酸相比，这相当于45岁后GSH氧化的四倍。在硫氧还蛋白转基因小鼠中腹膜内存在的巨噬细胞中的GSH/GSSG比例与年龄匹配的野生型(WT)小鼠进行比较，该WT小鼠具有：(i)细胞内氧化还原状态，和(ii)在衰老过程中Th1普遍性的持续维持。它们的GSH/GSSG、IFNγ、IL-10和IL-4的测量结果表示为IFNγ/IL-10和IFNγ/IL-4比例。在具有较高比例的GSH/GSSG、IFNγ/IL-10和IFNγ/IL-4的小鼠中，自身免疫病的发作具有有利的延迟，比较了在衰老过程中持续维持Th1普遍性的转基因小鼠与WT小鼠。

[0069] 在处理致死性的急性病毒感染时，重要的是不仅要考虑通过T细胞应答的获得性免疫，而且要考虑通过NK细胞的先天性免疫。对IL-2的NK应答是氧化还原调节的。IL-2依赖性细胞系NK3.3既不引入[3H]-胸苷，也不在缺乏巯基相关化合物L-胱氨酸和GSH的培养基中完成G1-S相变，尽管存在足够的IL-2。

[0070] 在病毒感染后，NFκB处于全局细胞应答的中心。高密度寡核苷酸微阵列可用来研究依赖于NFκB的呼吸道合胞病毒(RSV)感染诱导的基因的广度。用TNFα刺激细胞以激活NFκB，以及RSV感染，该RSV感染也激活NFκB。NFκB对于趋化因子、转录调节因子、调节翻译和蛋白水解的细胞内蛋白质以及分泌蛋白质的RSV诱导型表达而言是必需的。后者包括补体成分和生长因子调节物。在病毒感染后，NF-κB作用诱导全局细胞应答。揭示了氧化应激的促炎作用的分子机制。为了使基因信号传导网络中的转录因子结合DNA，DNA的解旋对于提供接近而言是必需的。这种接近需要DNA围绕其卷曲的组蛋白核心上的组蛋白残基的乙酰化/脱乙酰化。人肺泡上皮细胞系A549暴露于H_2O_2和TNFα引起的氧化应激，这导致GSH氧化成GSSG，以及在存在或不存在TSA(一种抑制组蛋白残基脱乙酰化和DNA解旋的物质)的情况下GSH的消耗。脱乙酰化是可逆的过程，并且由乙酰转移酶和脱乙酰酶控制。TSA抑制脱乙酰酶并增加组蛋白的乙酰化。H_2O_2和TNFa增强NFκB和AP-1的DNA结合，而TSA的加入增强了AP-1和NFκB结合的提高，并且还增加了超过H_2O_2和TNFα作用的IL-8释放。他们推断氧化剂H_2O_2和促炎介质TNF-a诱导组蛋白乙酰化，这与GSH水平降低以及AP-1和NF-κB活化增加相关，导致促炎性IL-8在肺泡上皮细胞中的释放增强。这表明了氧化应激的促炎效应的机制。氧化应激上调而抗氧化剂下调多效转录因子NFKB，增加的细胞GSH水平阻断NFκB活化并抑制TNF-α的释放。

[0071] 氧化应激具有作为从无症状人类免疫缺陷病毒(HIV)感染到获得性免疫缺陷综合征(AIDS)的疾病进展的辅因子的作用。氧化应激是通过NFκB活化对体外HIV复制的已知激活剂，其继而刺激HIV基因表达。通过类似的机制，TNFα也参与HIV感染的激活。暴露于该物质的细胞的TNF介导的细胞毒性与细胞内羟基自由基的产生有关。HIV感染和进展期间GSH的消耗支持氧化应激在HIV进展中的作用。已知GSH在调节T细胞免疫功能中起主要作用。氧

化应激也可以在细胞DNA损伤的发生中起重要作用，在这种情况下，可能与HIV相关的恶性肿瘤和疾病进展有关。氧化应激激活参与许多免疫调节基因和1型人类免疫缺陷病毒(HIV-1)长末端重复序列(LTR)激活的NFκB/Rel转录因子。他们检查了已建立的新型化合物(包括抗氧化剂、核糖核苷酸还原酶抑制剂和铁螯合剂)对TNF-α诱导的NFκB活化和HIV LTR介导的基因表达的影响。各种浓度的N-乙酰半胱氨酸(NAC)、吡咯烷二硫代氨基甲酸酯(PDTC)和Trimidox(TD)抑制Jurkat细胞中TNFα诱导的NFκB结合。在刺激之前用这些化合物预处理细胞防止IκBα降解。IκBα的磷酸化是其信号诱导的降解的前提条件，在这些细胞中被消除，表明氧化应激是NFκB激活途径中的必要步骤。在NAC和TD但非PDTC的存在下，Jurkat细胞中TNFα和HIV-1反式激活因子Tat对HIV-1LTR介导的基因表达的协同诱导被显著抑制。

[0072] 免疫低下的患者通常患有巨细胞病毒引起的血管病变。内皮细胞中高巯基氧化还原状态为CMV提供了屏障。人类免疫缺陷病毒和单纯疱疹病毒1感染已被认为是病毒感染与氧化应激之间的关系。高内源性巯基氧化还原状态可能有助于内皮细胞相对于CMV感染的明显屏障功能，并且氧化应激可促进血管壁的CMV感染。

[0073] IL-18具有显著增强用IL-12处理的成熟脾树突细胞中IFNγ产生的能力，当GSH细胞内浓度降低时，这种产生被消除。在巨噬细胞中观察到细胞内GSH剥夺的相同效应。

[0074] 幽门螺杆菌(H.pylori)感染激活NFκB和COX-2，并且二者都被GSH、NAC和吡咯烷二硫代氨基甲酸酯(也是硫醇抗氧化剂)抑制。氧化剂敏感的转录因子NFκB可在胃癌细胞中幽门螺杆菌刺激表达COX-2中发挥新的作用。

[0075] 趋化因子通过募集免疫活性细胞对炎性反应的进展至关重要。用硫醇抗氧化剂NAC处理大鼠减少了脂多糖(LPS)对NFκB的活化，并且充分减少细胞因子诱导的肺组织中的嗜中性粒细胞化学引诱物mRNA表达，以使肺灌洗嗜中性粒细胞计数减少6倍。TNFα诱导的巨噬细胞(CXC)趋化因子分泌比脂多糖诱导的巨噬细胞(CC)趋化因子分泌更依赖于NFκB表达。

[0076] 有助于白细胞-血管壁相互作用的粘附分子受到氧化还原调节，所述粘附分子参与粘附到真皮血管上、准备进入皮肤的天花病毒感染的单个核细胞。IL-4诱导人血管内皮细胞中单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)表达的氧化还原调节的机制。NAC和吡咯烷二硫代氨基甲酸酯(PDTC)。IL-4通过显著增加转录因子、信号转导子和转录激活子1(STAT1)DNA结合活性而诱导MCP-1基因表达，这种效应被PDTC减弱。IL-4通过诱导氧化应激来上调血管细胞粘附分子-1(VCAM-1)。PDTC或水杨酸钠抑制IL-4诱导的P-选择蛋白(由人内皮细胞产生的一种粘附分子)的表达。抗氧化剂对人表皮角质形成细胞中细胞间粘附分子-1(ICAM-1)的表达具有抑制作用。ICAM-1在炎性皮肤病过程中被人表皮角质形成细胞强烈表达。

[0077] 在感染天花的单个核细胞粘附到真皮血管后，它们通过内皮路面和通过真皮胶原以及表皮细胞的脱出最有可能像其他迁移性人单核细胞-树突细胞和浸润性癌细胞一样被基质金属蛋白酶(MMP)增强。这些是含有锌离子的内肽酶，它们是Ca^{2+}依赖性的并且目前构成21种MMP的家族。它们被金属蛋白酶的组织抑制剂(TIMP)抵消。

[0078] 发现来源于人单核细胞的树突细胞(CD)通过胞外基质的体外模型迁移——基质胶通孔迁移试验(Matrigel trans-well migration assay)。用IL-4/粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GC-CSF)衍生的未成熟DC和成熟DC由TNFα和经修饰的痘苗病毒Ankra(MVA)进行诱导。“成熟”的DC(由TNFα和MVA诱导)显示通过基质胶的迁移增加，该迁移被基质金属蛋白

酶(MMP)的抑制剂显著抑制。据推测,用GSH抑制TNFα表达可抑制MMP活性。基因信号传导通过炎性细胞因子IL-1和TNFα导致MMP-9表达。特定的蛋白激酶C同种型(PKC-ζ)被IL-1和TNFα诱导,并且阻断PKC-ζ活性消除由IL-1或TNFα诱导的MMP-9活性和基因表达。这些过程被证明是NFκB依赖性的,并且被MMP-9启动子中的NFκB结合位点突变完全阻止。

[0079] 血管内皮细胞中的MMP-9表达是氧化还原敏感的,并且高血糖症继发的氧化应激提供了使用抗氧化剂抑制MMP-9表达的基本原理。TNFα诱导氧化应激。在这种情况下,药物GSH可能是有益的。

[0080] 因此,当GSH下降时,氧化还原下降,导致NFκB激活、组蛋白残基的乙酰化和DNA的解旋,这增强了被易位至细胞核的NFκB和其他转录调节因子的接近,随后激活并表达促炎细胞因子、趋化因子、COX-2,以及遵循转录调节因子和增加的TNFα产生的次级级联。

[0081] 其中感染进展和累积组织毒性与GSH和氧化还原的下降有关的病毒感染的实例包括HIV/AIDS和呼吸道合胞病毒感染。

[0082] GSH与反应性中间体的生化中和反应分为三类:使活性氧(ROS)和活性氮(RNS)解毒,否则它们会损害细胞膜脂质、蛋白质和核酸并导致细胞和组织毒性;GSH保护线粒体免受H_2O_2、生物能衰竭和加剧的凋亡过程的影响,该过程增加累积的组织毒性;GSH及其伴侣酶防止花生四烯酸(脂质过氧化氢、过氧化物的分解、烷氧基自由基、羟基自由基、异类花生酸和类花生酸)的过度、不受控制的组织破坏性氧化。

[0083] 几种病毒感染提供了细胞内GSH浓度的改善重要性的实例,尽管疾病具有特定的差异,可归因于病毒蛋白质的差异,如允许早期逃避宿主防御的天花蛋白质,受影响的细胞、复制过程和宿主因素的差异。病毒最终确实遇到:(i)人体免疫系统;(ii)清除机制;和(iii)不同的炎症反应措施。一般而言,免疫接触和微生物清除机制涉及采用ROS的吞噬作用,通过RNS和通过凋亡的清除,而细胞因子如TNFα、IL-4和IFNγ通过信号传导途径直接和间接地引起ROS和RNS;例如,IL-4上调15种脂氧合酶中的12种,并下调GSH过氧化物酶以产生广泛的脂质过氧化氢衍生的ROS。在(i)响应的免疫系统细胞、(ii)直接受影响的细胞和(iii)旁观者细胞内的连续细胞内GSH浓度可以有所不同。ROS、RNS、促炎性细胞因子和花生四烯酸"代谢"的反应性副产物的不受控制的联合存在导致在非细菌脓毒症状态中以及在严重病毒感染如天花和流感流行中发现的"重度炎症反应综合征"。分子病理过程是定性共享的。

[0084] ROS和RNS导致大量累积的组织毒性,特别是因为它们引发快速的连锁反应,产生额外的毒性副产物。例如,活化的单核细胞/巨噬细胞实际上通过它们的15-脂氧合酶(ROS)产生二者,并且通常在相似的时间范围内通过IFNγ诱导iNOS(RNS)。结果,发生多种复杂的相互作用,并产生比初始一氧化氮更有害的活性氮,如过氧亚硝酸盐。

[0085] 人类免疫缺陷病毒(HIV)是早期研究的病毒之一,其中发现ROS(也称为"自由基")是感染、其分子病理学和进展中的重要因素。在无症状的HIV血清阳性个体中,观察到GSH的显著损失。血浆中的总GSH浓度和还原型GSH浓度约为正常个体的30%(并且在肺上皮衬液ELF中)约为对照的60%。因此,GSH免疫缺陷可促成HIV感染的进行性免疫功能障碍。HIV表面糖蛋白——纯化的gp120,能够诱导单核细胞花生四烯酸代谢物和白细胞介素1。对gp120的研究表明,这通过信号传导途径发生,而不是通过直接氧化发生。如关于HO_2/O_2^-与不饱和脂肪酸的反应性的研究所示,多不饱和物如花生四烯酸的直接氧化需要活性氧。自由基由

病理过程产生，然后攻击多不饱和物如花生四烯酸盐，引起连锁反应，该反应消耗组织抗氧化剂，并留下细胞和组织损伤的病理学痕迹。脂质过氧化物或脂质过氧化产物或组织抗氧化剂如GSH的损失是由现在被称为“氧化应激”的不受控制的破坏性自由基反应引起的组织损伤的有效指示/生物标志物。

[0086] 臭氧引起的氧化应激对巨噬细胞和肺组织的破坏性作用的实例，对于理解氧化应激所引用的、支持针对天花威胁和治疗的辅助GSH疗法的病毒研究是有意义的。如所预期的，肺表面活性剂磷脂中62.5、125和250ppb不饱和脂肪酰基的低水平臭氧暴露导致氧化应激，并产生生物活性产物，因为它通过坏死减少引发的巨噬细胞活力。这种损伤性氧化磷脂——1-棕榈酰基-2-(9^1-氧代-壬酰基)-甘油磷酸胆碱，不仅降低巨噬细胞活力，而且还诱导肺上皮样A549细胞中的凋亡，如通过TUNEL染色、核大小、胱天蛋白酶-3激活所评估的，其中线粒体脱氢酶活性的降低表明活力损失。

[0087] 在HIV感染中已证实氧化应激和GSH不足，以及随之发生的累积的组织毒性，以及AIDS的进展。在HIV-1感染患者的血浆中发现低浓度的酸溶性硫醇(半胱氨酸)。在慢性感染的单核细胞U1细胞系中研究了GSH(GSH)、GSH酯(GSE)和N-乙酰基-L-半胱氨酸(NAC)对诱导人免疫缺陷病毒(HIV)表达的影响，该U1细胞系是HIV潜伏期的细胞模型。U1细胞组成型地表达低水平的病毒，其可以被佛波醇12-肉豆蔻酸酯13乙酸酯(PMA)、TNF-α、IL-6和其他诱导物增加。GSH、GSE和NAC以剂量依赖性方式抑制由PMA、TNF-α或IL-6介导的HIV表达的诱导，不存在细胞毒性或细胞抑制效应。这有助于阐明细胞GSH与HIV表达之间的关系，提示采用硫醇的治疗在治疗HIV感染中具有价值。然而，制药实体采用硫醇对抗HIV/AIDS的尝试没有取得成功，因为当时的GSH尚不能生物获得。

[0088] 由HIV诱导的硫醇缺乏与T细胞功能障碍相关，因此一些人主张用N-乙酰半胱氨酸(NAC)治疗。NAC是GSH的前体，但需要肝脏合成，并可能涉及自身产生自由基的突发性代谢。GSH增强体内细胞毒性淋巴细胞的活化。氧化应激是疾病进展的辅助因素。外周血单个核细胞(PBMC)中的HIV-1表达被GSH阻断或大幅减少。这种抗HIV-1效应在这些培养物中持续至少35天，没有证据显示HIV-1表达显著增加。因此，用GSH单次脉冲暴露HIV-1感染的单核细胞/巨噬细胞导致HIV-1p24抗原水平的持续、浓度依赖性下降，以及逆转录酶活性，而在单核细胞/巨噬细胞中不产生可检测的细胞毒性。8E5是慢性HIV感染的，其GSH过氧化物酶活性也显著降低。HIV基因表达使得8E5细胞对15-过氧化氢二十碳四烯酸(15-HPETE)以及几种其他过氧化氢脂肪酸的杀伤敏感10倍，因为8E5细胞中的低GSH-过氧化物酶活性阻止了毒性15-HPETE(15-LOOH)转化为惰性15-羟基-二十碳四烯酸15-HETE(15-LOH)(81)。辅助GSH酶提供针对毒性15-HPETE的额外保护，该15-HPETE可经历过氧化物分裂[15-LOOH→15-LO•+•OH]并通过烷氧基自由基(LO•)和羟基自由基(•OH)开始自由基链反应。通过GSH过氧化物酶预先转化为15-HETE可以避免这种情况。脂质过氧化酶，如12/15-脂氧合酶，和氢过氧基脂质减少酶，如GSH-过氧化物酶，被白细胞介素4和13反向调节。这两种白细胞介素上调12/15脂氧合酶并下调磷脂羟基过氧化物GSH-过氧化物酶。

[0089] 最终结果是可以启动ROS病理学的危险脂质过氧化氢(LOOH)的积累。这有助于解释较早的文献中IL-4是启动自由基病理学的促氧化剂的观察结果。HIV gp120具有复杂的作用，并且在自由基生成方面放大了TNFα的活性。这继而激活NFκB，NFκB转位到细胞核并通过附接到长末端重复序列(LTR)上的结合位点来激活HIV前病毒DNA。这导致HIV的快速复

制。gp120蛋白通过p56 lck蛋白质酪氨酸激酶发挥其对GSH还原的作用，其“传送”增加自由基、氧化应激的信号。

[0090] 病毒性肝炎，特别是丙型肝炎，其特征部分地是，如在一些病毒感染中观察到的那样，引起显著的累积组织毒性的氧化应激。在HCV的情况下，ROS通常例如通过信号传导途径继发产生。

[0091] 丙型肝炎病毒核心蛋白与肿瘤坏死因子(TNF)受体1的胞质域结合。这导致ROS产生，这促进患者发病，并且如果随后发生凋亡，则可能导致肝脏进一步坏死和死亡。HCV核心蛋白通过TRADD和TRAF 2信号复合物激活c-Jun N端激酶，导致氧化应激。在无症状的HCV患者中发现氧化应激，并且在小鼠模型中发现氧化应激(无炎症)。在ROS与HCV疾病活动度之间存在关联。显然，在HCV感染中存在氧化应激的非炎性来源，包括HCV患者中高含量的脂质过氧化氢。在慢性HCV患者中存在铁蛋白和肝GSH异常。铁，特别是有机铁，是脂质过氧化和其他自由基连锁反应的有效催化剂。活性氧和活性氮如超氧化物和一氧化氮由流感中的炎性和气道上皮细胞释放到细胞外间隙中。这些分子可能会加剧流感病毒肺炎后的肺损伤。小鼠气道中细胞外超氧化物歧化酶(EC SOD)的增强表达可减弱流感肺炎的病理作用。将适应小鼠的香港A/68型流感病毒的非致死性原发感染在转基因(TG)EC SOD小鼠中的致病作用与非TG(野生型)同窝出生仔鼠进行比较。与野生型小鼠相比，EC SOD TG小鼠显示较低的肺损伤和炎症，如通过IFNγ诱导的显著钝化、支气管肺泡灌洗液中减少的细胞计数和总蛋白质、降低的肺亚硝酸盐/硝酸盐硝基酪氨酸水平和显著降低的肺病理学而测量的。这些结果证明，在肺的传导和远端气道中增强EC SOD，通过改善炎症和减轻氧化应激使流感引起的肺损伤减至最低。

[0092] 一氧化氮(•NO)是一种活性自由基，其体内半衰期(约10秒)略长于活性更强的自由基——超氧化物阴离子(•O_{2^-})和羟基(• OH)。•NO与分子氧共有溶解度特性，并且具有一定的非极性。分子氧在细胞膜的疏水性中间区的非极性环境内有约7倍的可溶性，将•NO和O_2放置在膜磷脂的脂肪酰基链的最敏感的可氧化区域，即不饱和键。在这些非极性膜中间区(烷氧基LO•和可移动的•OH)中的自由基反应不仅不利地影响脂质，而且不利地影响膜蛋白质的疏水性区段。这会导致酶的失活和其他膜大分子复合物的改变。与超氧化物和羟基自由基相比，一氧化氮的相对非极性结构及其略低的反应性性质提供具有约500μm或更大的“范围”的一氧化氮，因为其以50μm/秒扩散并具有据估计为10秒的体内半衰期。该范围的实际组织和分子病理学结果是对旁观者细胞的影响，在含有活化的单核细胞/巨噬细胞的组织(淋巴结、皮肤等)中，每个细胞的直径平均为15-25μm，这仅通过血细胞渗出(diapedesis)、携带天花或其他病毒以及加工一氧化氮、脂质过氧化氢和细胞因子等物质来实现。

[0093] •NO与O_2^-反应并形成有效的氧化剂——过氧亚硝酸盐($^-$OONO)。该反应的缺点有两方面：(i)NO的理想抗微生物作用丧失，和(ii)一系列生物分子被不加区别的氧化损伤。一种越来越被认为是氧化应激的指标/生物标志物的稳定氧化终产物是硝基酪氨酸，现在被视为一氧化氮衍生的氧化剂的一种独特的“分子指纹”。NO也与硫醇反应，通常是首先形成N_2O_3，其具有更直接的亚硝化性质，并且容易形成S-亚硝基硫醇。蛋白质的亚硝基化或亚硝化是一种普遍的反应，除SH基团外，其还可涉及其他亲核侧链，如羟基、胺和芳香碳。在生物分子的多个亲核中心进行亚硝基化的反应性和功能性后果代表了GSH疗法可以获得的另

一种干预。亚硝化反应在硫、氧、氮和芳香碳中心处持续。硫醇最具反应性，并且蛋白质三级结构的预亚硝化还原导致多硝基化，因为预亚硝化还原暴露了更多的游离硫醇。虽然一些多亚硝基化蛋白质如牛血清白蛋白(BSA)表现出生理性一氧化氮性质，如血管舒张和抗血小板活性，但酶的亚硝基化通常对酶活性具有不利影响。酶中的酪氨酸残基的亚硝基化导致磷酸化依赖性过程的潜在破坏。尽管发现酶的亚硝化和其活性中心处S-硝基的形成与恢复活性的巯基试剂可能可逆，但是其他蛋白质的亚硝化，特别是硝基酪氨酸的形成是致病的。尽管在动脉粥样硬化动脉中进行了研究，但单核细胞/巨噬细胞产生的炎性反应为其他地方的炎症提供了关于RNS病理学的有价值的信息。在许多情况下，基本的分子病理过程是相似的。

[0094] 病理学由以下方面引起：白细胞衍生的NAD(P)H氧化酶复合物引起的超氧化物过量，和由白细胞衍生的髓过氧化物酶同时消耗一氧化氮。最终结果是通过这种同时的以下双重作用而损害的NO生理作用：(i)通过形成过氧亚硝酸盐去除NO，和(ii)通过髓过氧化物酶活性消耗NO。活化的白细胞与它们的NAD(P)H氧化酶复合物和髓过氧化物酶加上产生一氧化氮的活化单核细胞/巨噬细胞的这种相同“混合物”在炎症和感染的部位发现，如在天花病变中。硝基酪氨酸的形成对于在GSH的第四性质下所讨论和参考的痘病毒DNA拓扑异构酶的抑制具有重要意义。除了影响这些拓扑异构酶SH酶的巯基反应的GSH之外，痘苗拓扑异构酶中还有一个关键的酪氨酸-274残基，它与DNA骨架形成3’-磷酸二酯键。如果NO攻击它(靶向蛋白质羟基(OH)、SH和其他部分)，则所得到的硝基酪氨酸可以有效地将拓扑异构酶转化为核酸内切酶，形成具有3’-磷酸封端产物的60bp双链体DNA。这种在痘病毒DNA拓扑异构酶的关键部位内产生致损硝基酪氨酸的潜力可能是实用的，正如在第4号性质中所讨论的那样，特别是如果存在足够的GSH以防止浪费地并且有害地形成阻止一氧化氮的有用功能的过氧亚硝酸盐。进一步描述的假设之一认为，GSH可以减少功能性二硫化物形成并减少拓扑异构酶中的链间和链内二硫键，由此使得半胱氨酸和Tyr-274可用于亚硝化反应。蛋白质的亚硝化涉及亲核侧链，如SH和OH。亚硝化和谷胱甘肽化对痘病毒拓扑异构酶可能是选择性的，因为单核细胞/巨噬细胞/树突细胞群体携带大量病毒载量，并且这种细胞群体产生大量的一氧化氮。在足够的GSH的存在下，ROS和RNS可以被缩减以允许S-亚硝基GSH的有序形成，S-亚硝基GSH是一种持久的、可扩散的NO供体，其为可用的并且在细胞内紧密接近于痘病毒DNA拓扑异构酶的Tyr-274的NO-敏感性羟基。GSH的第4号性质提供了更多详情。

[0095] 痘苗病毒的IL-4增强被IFNγ-NO介导的病毒清除所抑制。减少天花感染的发病率和死亡率需要增强和保持一氧化氮的抗病毒、微生物清除性质，但不需要RNS介导的病理学。足够的、一致的细胞内GSH浓度确实提供了防止过度ROS/RNS反应所需的平衡、效力和安全性，否则这些反应会耗尽GSH，然后导致组织毒性持续恶化。这些巨噬细胞的活力在其实验条件下通过暴露于释放NO的化合物S-亚硝基-N-乙酰青霉胺(SNAP)而减弱。当这些巨噬细胞中的GSH浓度实验性降低时，细胞活力进一步降低。然而，当硫醇NAC用作预处理时，巨噬细胞得到保护。

[0096] 提高GSH水平减弱了暴露于NO供体S-亚硝基-N-乙酰半胱氨酸(SNAC)后肌细胞CK(肌酸激酶)活性的下降。另一方面，当肌细胞中GSH水平降低时，由SNAC引起的肌酸激酶的S-亚硝化得到增强并且酶活性降低。过氧亚硝酸盐在人静脉内皮细胞和大鼠主动脉平滑肌细胞中具有细胞毒性作用。GSH减弱过氧亚硝酸盐诱导的线粒体呼吸形成硝基酪氨酸蛋白

质氧化DNA单链断裂的抑制和核酶聚(ADP-核糖)合酶的活化。当实验性地降低GSH浓度时，过氧化亚硝酸盐诱导的细胞毒性恶化。NO和ROS的协同毒性通过形成过氧亚硝酸盐而发生，而其他细胞毒性剂适合于被抗氧化酶抑制。

[0097] 产生胰岛素的RINm5F细胞是针对细胞因子介导的毒性而生物工程改造的。过氧化氢酶、GSH过氧化物酶和Cu/Zn SOD是保护性的，显然是因为在实验中使用的细胞因子的信号级联中生成的ROS的失活。GSH有效地防止由分别通过iNOS和NADPH氧化酶在小胶质细胞中同时生成的NO和$\cdot O_2^-$形成过氧亚硝酸盐。连续产生一氧化氮的小胶质细胞中的过亚硝酸盐形成相当有限。然而，超氧化物产生酶NADPH氧化酶的激活在数分钟内显著增加(过氧亚硝酸盐)。因此超氧化物是过氧亚硝酸盐形成的限制因素。GSH显著降低过氧亚硝酸盐的形成，但抗坏血酸盐不能。

[0098] 硫醇氧化还原状态控制线粒体中的膜转运系统。线粒体内的三种主要氧化还原活性因子是呼吸链的电子转运蛋白、蛋白质硫醇和基质GSH。它们通过NADPH的可用性而相互关联，NADPH是GSH还原酶的辅因子，其对维持线粒体内GSH的氧化还原状态是必需的。游离SH基团，如在还原型GSH中，对于线粒体内膜中所有代谢物载体的活性是必不可少的，否则，广泛的硫醇氧化导致：转运活性的抑制，和线粒体内跨膜电位(Δψ[μm])的耗散——这是在线粒体相关凋亡过程中观察到的早期潜在可逆事件，生物能衰竭——这也是作为Δψ[μm]耗散的一部分的早期事件，以及线粒体膜通透性的增加——线粒体相关凋亡过程中的后续事件。

[0099] 线粒体GSH浓度高于胞质溶胶中的浓度，分别为10mM和7mM。由于线粒体因缺少两种酶(γ-谷氨酰半胱氨酸合酶和谷胱甘肽合酶)而不能合成GSH，其通过被ATP刺激的高亲和力组分(Km，约60μM;Vmax，约0.5nM/min/mg蛋白质)和较低亲和力组分逆着浓度梯度转运至线粒体基质中。线粒体中对GSH的需要是其催化活性，以还原由作用于超氧化物阴离子的MnSOD产生的H_2O_2。由于没有过氧化氢酶在线粒体中产生或转运到线粒体内，因此线粒体GSH是必不可少的。在所有细胞、血浆和红细胞的胞质溶胶中，超氧化物歧化酶(以CuZn SOD的形式)与过氧化氢酶一起作用以防止H_2O_2的累积。在没有过氧化氢酶或GSH的催化活性的情况下，H_2O_2会积累，最终产生高度有害的羟基自由基(•OH)。其后果可导致战略细胞的生物能衰竭和加剧的凋亡过程。GSH消耗与生物能衰竭有关，随后发展为凋亡过程。GSH消耗会降低细胞对内源性氧化剂的缓冲能力，并且其可能设置对持续线粒体功能的时间限制，从而间接对总ATP水平和膜完整性的限制。

[0100] 胸腺细胞表现出线粒体Δψ[μm]的中断，以及接近同时的非氧化GSH的消耗。他们认为这代表了两步凋亡过程的第一步。Δψ[μm]的损失代表生物能衰竭以及降低的ATP合成。这个状态可以向后续凋亡过程进展，作为第2步。凋亡过程有时会使患者受益，如在癌细胞以及可能带有微生物的细胞的根除中，只要细胞片段中被非感染细胞吞噬的微生物不具传染性或快速使其不具传染性即可。在痘苗病毒感染的巨噬细胞(鼠系J774.G8)中的凋亡过程包括线粒体膜电位的变化。痘苗病毒(VV)感染显示早期基因表达，其似乎是凋亡诱导所需的，而晚期基因表达则不是。巨噬细胞中VV诱导凋亡诱导线粒体膜电位降低，并且与Bcl-2家族的抗凋亡成员Bcl-x(L)水平改变相关。尽管猴痘不易在人之间传播，但它与天花、痘苗和牛痘一起导致具有相似之处的皮肤损伤。下呼吸道上皮作为主要靶点，但扁桃体中的淋巴组织和下颌淋巴节的累及提示这些淋巴组织早期感染。病理学表明病毒通过单核

细胞相关病毒血症的广泛淋巴传播，单核吞噬细胞树突细胞系统是淋巴组织内的主要靶点，并且还可以提供进入其他系统部位的手段。猴痘感染的病变。所有部位均坏死。所选病变的末端脱氧核苷酰转移酶介导的三磷酸脱氧尿苷缺口末端标记(TUNEL)染色表明，淋巴和上皮组织内的细胞死亡大部分是由于凋亡。基于病理学和病毒学相似性(猴痘、痘苗、牛痘和天花是正痘病毒(orthopox)属的成员，并可感染人类并引起皮肤病变)，似乎天花病变也部分由于凋亡过程而发展。

[0101] 认为在天花中发生的分子病理过程会对GSH浓度产生影响：(a)诱导iNOS，NO产生增加，(b)产生超氧化物，(c)形成过氧亚硝酸盐，(d)消耗GSH的ROS和RNS的连锁反应，(e)TNFα相关的氧化应激，Cox-2的诱导，花生四烯酸氧化增加，(g)参与感染和炎症部位的吞噬作用的巨噬细胞的氧化爆发，以及相关的级联。根据细胞内GSH的损失，在天花感染中诱导的凋亡过程的类型将包括由GSH损失驱动的类型以及在线粒体和胞质溶胶中氧化还原减少的类型。Penninger总结了线粒体的作用，包括Δψ[m]，线粒体通透性转换孔(PT)，导致细胞色素c和凋亡诱导因子释放的外线粒体膜完整性的破坏，以及包括GSH在内的几种修饰因子的时间方面。

[0102] 在线粒体中发现显著量的前胱天蛋白酶原-3。Jurkat细胞研究表明，前胱天蛋白酶-3处于线粒体内与“分子伴侣”蛋白质的凋亡前复合物中。在用丁硫氨酸砜亚胺消耗GSH的其他凋亡研究中，在预防或减缓凋亡中至关重要的Bcl-2蛋白质被降解。本研究中向细胞添加GSH的有益作用不是GSH的直接作用，而可能是预防Bcl-2蛋白的降解。当Fas触发人类活化嗜中性粒细胞中的凋亡时，通过用外源GSH增加细胞内GSH水平可以抑制随后的凋亡过程。Fas诱导的嗜中性粒细胞凋亡的信号传导可以用氧化还原敏感的方式进行抑制。

[0103] 单价硫醇反应性化合物抑制由其模型系统在胸腺细胞中诱导的凋亡，此外，关键的硫醇可能位于线粒体基质中。超氧化物阴离子的过度生成、线粒体内膜化合物的氧化、非氧化型GSH的消耗是各种凋亡模型所需的。GSH转运蛋白在质膜和线粒体上的存在已被很好地描述，并且这些提供了分子/细胞手段来确保施用的GSH的细胞内和线粒体内分布。

[0104] GSH通过GSH过氧化物酶和GSH S-转移酶帮助控制花生四烯酸的氧化，由此降低脂质过氧化氢、异类花生酸和类花生酸，它们可以是过度促炎的并且不利地产生凋亡和免疫抑制。关于术语，类花生酸包括通过酶形成的前列腺素、血栓烷、白三烯和脂氧素，而异类花生酸是由自由基反应驱动的非酶促形成的异构体。GSH过氧化物酶和S-转移酶是保护性的，并且通常在脂质过氧化氢可以扩大细胞损伤之前将其分解。但是，它们需要GSH，GSH可能在严重感染过程中受到几种因素诱导的氧化应激的损害，例如活化的巨噬细胞的氧化爆发，超氧化物的过度生成，TNFα产生的氧化应激，伴有花生四烯酸氧化增加的Cox-2诱导，以及伴有氮氧化物和亚硝化GSH形成增加的iNOS诱导。

[0105] 磷酸甘油酯的甘油骨架的C-2通常被酯化成多不饱和脂肪酰基链，如花生四烯酸酯，并且C-2酯可以被磷脂酶A2(PLA2)作用，由此释放游离的花生四烯酸酯。这些多不饱和物自发地或通过环氧合酶和脂氧合酶酶促地高度经历过氧化作用，这是因为由于其C-H键因键合电子在“一串”四至五个碳上的分布而被活化，它们的不饱和(双键键合)碳是未缀合的，即被插入的被分类为α亚甲基的单键键合碳隔开。因此，从α-亚甲基碳上去除氢容易通过分子氧自由基而发生，留下立即被其他活化物质攻击的碳自由基，最终产物通常是附接到碳上的氢过氧化物(-OOH)(LOOH)。这些脂质过氧化物是不稳定的并且经历分裂，产生可

以攻击其他α亚甲基碳的烷氧基和羟基自由基[LOOH→LO•+•OH]。花生四烯酸酯和其他多不饱和物的过氧化可以在膜和胶束内发生，并且它们的分裂产物可以引发细胞毒性的连锁反应，该反应改变膜结构并且还攻击膜蛋白质和膜相关DNA。有许多对照能保护细胞免受猖獗的脂质过氧化作用，包括固有的膜结构，通常低水平的PLA_2活性，亲脂性抗氧化剂，和在其可经历分裂前分解LOOH的酶，如GSH过氧化物酶和GSH S-转移酶。

[0106] VV已经被生物改造为表达IL-4。在一个实例中，单独地或与IL-4组合地(vv M2/IL-4)表达呼吸道合胞病毒表位(M2)的重组VV变得更难以清除，不能深入地引发抗病毒细胞毒性淋巴细胞反应，并更快地杀死感染的实验动物。过表达的IL-4在急性病毒感染中的这些不利作用可以在没有生物工程化的情况下发生。老化、糖尿病、先前暴露于化学毒素或在严重感染过程中导致的细胞内GSH浓度不足会使免疫应答模式偏向于Th2途径，并导致IL-4的不利上调和增加的表达。急性病毒感染期间的IL-4缺陷包括环氧合酶(COX-2)和脂氧合酶(5-、12-、15-)的上调，其导致脂质过氧化氢(LOOH)的过量形成，并且同时下调分解LOOH的保护性酶(GSH过氧化物酶和GSH S-转移酶)。IL-4的这种反向调节的人外周单核细胞研究显示这些调节过程也在体内发生。花生四烯酸加氧酶和磷脂过氧化氢GSH过氧化物酶活性在系统性过表达IL-4的转基因小鼠的各种组织中进行测定。在肺、脾、肾和心脏中，当转基因小鼠与近交对照比较时，检测到花生四烯酸加氧酶活性的增加。磷脂过氧化氢GSH过氧化物酶活性在转基因动物的肺、肝和脾中受损。来源于15-脂氧合酶活性的15-HPETE和几种其他过氧化氢脂肪酸对于慢性HIV感染的T细胞系(8E5)是致死性的，因为8E5 T细胞系中固有的GSH过氧化物酶活性显著降低。因此，当IL-4通过病毒工程化过表达时，或者GSH浓度不足致使T辅助细胞应答模式偏向于Th2时，可通过上调12-和15-脂氧合酶产生增加量的12-和15-HPETE而导致氢过氧自由基的致死性累积。由于相关的GSH过氧化物酶已经被IL-4下调，所以这些不能被减少为毒性较低的12-和15-HETE。另外，在急性炎症和NFκB活化过程中，Cox-2得到诱导。在其模型系统中，GSH、N-乙酰半胱氨酸和吡咯烷二硫代氨基甲酸酯(PDTC)可以抑制Cox-2的诱导。

[0107] 有效补充和维持细胞内浓度的GSH治疗应该能够下调由于过度有利的Th2应答模式而产生的IL-4，并且还纠正可在超过45岁的人中、糖尿病患者中、化学暴露者中以及严重的压倒性感染者中产生Th2细胞因子的GSH不足。GSH治疗的结果可包括12-和15-脂氧合酶的下调、GSH过氧化物酶的上调以及NFκB级联的下调，该级联包括Cox-2的诱导。这些有利的生化结果将有助于预防和减少与天花感染相关的细胞和组织毒性。

[0108] Th2细胞因子在促成优先在Th2细胞中表达的一组磷脂酶A2(PLA2)表达的压倒性感染期间造成额外的缺点。通过在细胞膜任一侧的水相与作为膜的浓缩脂相的界面处进行界面催化活性，PLA2释放花生四烯酸。PLA2酶在哺乳动物细胞中在结构上是多样的，并且对不同条件有反应。发现一组PLA2可被细胞因子如IL-1、TNFα和IL-6诱导，并被抗炎性糖皮质激素抑制。鉴定了与Th1克隆和细胞相比，在鼠Th2克隆和体外分化的小鼠CD4 Th2细胞中选择性表达的新的一组PLA2(第XII组，特别是GXII-2PLA2)。与Th1细胞相比，抗-CD3刺激上调Th2细胞中的GXII PLA2。这种新的PLA2组将通过释放即刻第二信号和产生下游类花生酸来增强Th2细胞的反应性。如果Th2应答模式在严重感染期间上调，因为如前所述GSH浓度已被多种因素影响，特定PLA2在Th2中的增强的催化活性将加速累积的细胞和组织毒性。

[0109] 最后，不会还原为其相应的LOH的脂质过氧化氢(LOOH)产生有毒的致凋亡产物，包

括4-羟基壬烯醛(HNE)。LOOH产物HNE诱导显著的组织损伤和凋亡。在单核细胞-巨噬细胞的特定实验模型中,GSH通过HNE缀合来防止巨噬细胞死亡,从而使其无毒,这是GSH的这种中和反应性中间体的性质的最后一个例子,所述中间体否则会引起细胞和组织毒性。GSH可以预防和减少由多种途径产生的细胞毒性和组织毒性,这些途径虽然不同,但由于带有来自γ谷氨酰基残基的两性离子的GSH的仔细定位的巯基,其具有共同的被GSH改善的能力。

[0110] 正如使用GSH对抗HIV所发生的,GSH的巯基部分能够安全地进行翻译后蛋白质修饰,该修饰可以使得在感染期间合成的热力学不太稳定的病毒蛋白质失活。可能受阻的天花蛋白质包括参与病毒复制的那些蛋白质,特别是编码的病毒DNA拓扑异构酶,以及参与逃避宿主免疫防御的那些蛋白质。

[0111] 半胱氨酸残基和氨基酸序列是决定蛋白质的折叠构象以用于结构和功能应用的主要因素。正常细胞花费相当大的"努力",因为它形成了对特定蛋白质具有必需的热力学稳定性的分子内和链间键的二硫化物。一些蛋白质二硫化物必须容易接近才能经历允许调节酶、有序信号传导和响应性受体的氧化还原变化。还有一些其他蛋白质是为了快速更新而设计的,并且必须易于解折叠和拆解以准备替换。

[0112] 正常宿主蛋白质的折叠受到复杂的、受控的相互作用的指导,该相互作用稳定了最终的折叠状态。除了氨基酸序列之外,还有许多因素影响折叠,包括[H+]和酶,如蛋白质二硫键异构酶(PDI)、肽基丙基异构酶(PPIase)和分子伴侣。PDI加速动力学捕获的中间体中的二硫键交换,改组这些二硫键直到达到最稳定的蛋白质构型。PDI将这种改组加速了数千倍。由于肽键几乎总是处于反式构型,所以PPI酶加速从顺式到反式的异构化。分子伴侣抑制蛋白质中间体的不适当的分子间相互作用,直接消耗ATP来解开被捕获的中间体。这些步骤对于蛋白质稳定性是必需的,并且需要相当多的能源以及PDI、PPI和分子伴侣。

[0113] 热休克蛋白(HSP33)是一种非常有效的分子伴侣,它本身依赖于二硫键。Hsp 33具有六个半胱氨酰残基。当它们呈化学还原形式时,Hsp33失活并且不显示折叠辅助活性。然而,在诸如过氧化氢等氧化环境下,Hsp 33变为活性的并且恢复其在内质网容易堵塞的蛋白质折叠亚细胞区室内解开被捕获的蛋白质/多肽中间体的功能。质谱法(基质辅助激光解吸/电离MS,MALDI-MS)证实H_2O_2激活Hsp 33伴随着与Hsp33形成两个分子内二硫键:Cys(232)-S-S Cys(234)和Cys(265)-S-S(268)。还强调了半胱氨酰残基的可及性。例如,当Hsp33有活性时,六个半胱氨酰残基之一的Cys(239)很难接近,并且尽管暴露于H_2O_2仍保持还原,并且因此不与第六个半胱氨酰Cys(141)反应,这是对化学修饰高度反应性的,证明了其他因素如氨基酸序列和其他氨基酸/肽基性质在蛋白质折叠中也很重要。

[0114] 在非恶性、未感染的真核细胞中,相当多的消耗ATP的"质量控制"进入二硫化物。相比之下,痘病毒蛋白质合成在感染细胞内的细胞质聚集区内进行,并且不具有有序测试其蛋白质二硫化物的热力学稳定性的益处,也没有可靠的、足够的ATP供应来支持正在进行的三组"测试"蛋白质(蛋白质二硫键异构酶、肽基脯氨酰异构酶和分子伴侣)的合成。这为GSH在天花的关键蛋白质硫醇的安全还原和/或谷胱甘肽化中的翻译后选择性提供了基础,没有细胞毒性,特别是DNA拓扑异构酶和逃避蛋白质。

[0115] 在一些病毒感染的宿主细胞如单核细胞/巨噬细胞内的氧化还原环境通常较低,这继发于GSH在抑制由以下物质产生的反应性中间体中的过度利用:TNFα;NADPH氧化酶;由诱导的COX-2过量产生的脂质过氧化氢的均裂分裂(LOOH→LO•+•OH)产生的烷氧基和羟

基自由基;和伴随iNOS诱导的活性氮(RNS)。HIV和其他感染中的低GSH浓度促进了有利于在受感染的单个核细胞/巨噬细胞内合成的病毒蛋白质中的二硫键形成和广泛蛋白质折叠的氧化环境。当GSH氧化还原减少时,HIV复制速率很快,触发对NFκB的氧化还原敏感的激活,NFκB继而通过长末端重复序列(LTR)上的NFκB结合位点激活核整合的HIV前病毒DNA。预期HIV蛋白质将其半胱氨酰残基在该氧化环境中作为二硫化物结合。

[0116] 研究了编码的HIV TAT蛋白,其特异性激活从病毒长末端重复序列的转录,该蛋白质与强还原剂的预温育显著抑制其活性。这些结果提示,TAT的半胱氨酸残基参与分子内二硫键的形成。外源性GSH强烈抑制病毒感染性出芽和从慢性感染的细胞(巨噬细胞或淋巴细胞)释放病毒颗粒,以及选择性减少富含链内二硫键的主要包膜糖蛋白gp120的表达,因此可能对还原剂如GSH的作用敏感。GSH可干扰病毒复制的后期阶段,类似于暴露于1型疱疹病毒(DNA病毒)或仙台病毒(RNA病毒)的细胞,表明GSH对病毒复制的抑制与包膜糖蛋白的选择性抑制有关。

[0117] 细胞内GSH含量对人巨噬细胞中的HIV复制有影响。体外HIV-1感染诱导人巨噬细胞中胞内还原型GSH的显著减少。在感染时观察到这样的减少,这相当于从感染的细胞中最大程度地释放病毒,并且与细胞毒性无关。用BSO(丁硫氨酸砜亚胺)处理巨噬细胞显著增加了上清液中的HIV产量。外源GSH强烈抑制p24 gag蛋白的产生以及病毒感染性。GSH抗病毒作用发生在病毒复制的后期,并且与特别富含二硫键的特定糖蛋白如gp120的选择性减少有关。除了HIV TAT蛋白和gp120中的二硫键参与外。

[0118] HIV-1蛋白酶的两个保守半胱氨酸可能参与调节蛋白酶活性。二谷胱甘肽化野生型蛋白酶(Cys-67-SSG,Cys-95-SSG)和单谷胱甘肽化蛋白酶突变体(C67A,Cys-95-SSG和C95A,Cys-67-SSG)是巯基转移酶(谷氧还蛋白)的潜在底物。在低巯基转移酶浓度(5nM)下,脱谷胱甘肽化几乎仅发生在Cys-95-SSG。使用明显更多的巯基转移酶(100nM)时,Cys-67-SSG部分脱谷胱甘肽化,但速率仅为Cys-95-SSG还原的20%。用巯基转移酶处理二谷胱甘肽化蛋白酶不仅恢复了蛋白酶活性,而且产生了相对于完全还原形式具有3至5倍的比活性的酶制品。结果暗示巯基转移酶在调节和/或维持中的作用。

[0119] HIV的Gp120蛋白不仅作为病毒附接至CD4+受体的手段,而且还放大毒性细胞因子TNFα(引起自由基反应和体重减轻)的活性。TNFα还激活NFκB,NFκB进而刺激HIV复制。因此,gp120蛋白增强TNFα,TNFα激活NFκB并增加HIV复制。gp120蛋白改变细胞的氧化还原状态,并增加H_2O_2产生,确保蛋白质中的二硫键形成。gp120的这种活性引起GSH的减少和氧化型GSSG的增加。gp120蛋白通过p56 1ck蛋白酪氨酸激酶发挥这些作用,该酪氨酸激酶传递增加自由基氧化应激的信号。在这些HIV研究中,其中关键的HIV二硫键被生物化学还原,对HIV不利,但没有发现明显的细胞毒性。在其他HIV研究中,其中添加外源性GSH并且病毒抑制明显,在体外对GSH的持续抗HIV作用进行了35天的具体观察,没有在单核细胞/巨噬细胞中产生可检测的细胞毒性。

[0120] 拓扑异构酶是针对需要分离链的过程(例如转录、重组和复制)切割超螺旋双链DNA的一条或两条链的SH蛋白。这是通过切割DNA的一条或两条链以及DNA断裂的再连接来完成的。有许多拓扑异构酶,而这些酶的发现者之一James Wang已经进一步描述了它们。其中两个主要类别是仅切割一条链的I型拓扑异构酶和切割两条链的II型。在II型拓扑异构酶切割DNA(需要ATP)之后,每个经切割的DNA链的5'-磷酸末端通过连接到活性位点处的特

定酪氨酸残基而保持附接至该酶。因此，经切割的DNA的两个末端保持“锚定”于拓扑异构酶。否则，两个经切割的末端将自由旋转并大量干扰DNA的拓扑结构和功能。拓扑异构酶已经成功地用于对抗细菌的抗生素以及对抗癌症的化疗剂。关于抗生素的使用，原核生物中的DNA旋转酶(150)比真核生物中的DNA旋转酶更敏感。喹诺酮类抗生素是强大的药物，特别是抑制拓扑异构酶II(DNA旋转酶)和拓扑异构酶IV。与人细胞相比，拓扑异构酶对病毒抑制剂的不同敏感性的概念是相关的。所有拓扑异构酶的特定弱点是它们通过产生短暂的双链断裂来修饰DNA的拓扑结构的复杂作用机制。拓扑异构酶的双重功能，即催化和再连接，需要结合并影响拓扑异构酶的亚单位间相互作用以实现“全局”效应的半胱氨酰残基的未受阻反应性。

[0121] 这些半胱氨酰残基是可接近的并且已被靶向。醌型抑制剂描述如下。除了这些蛋白质硫醇的反应性和可接近性之外，活性位点Tyr-274可以充当由载有病毒的活化巨噬细胞产生的一氧化氮的靶标。在受感染的产生一氧化氮的巨噬细胞内硝基酪氨酸的形成可以被GSH作用增强：(a)由于分子内和链间二硫键被还原和/或谷胱甘肽化，所以还原蛋白质二硫键和/或使游离蛋白质硫醇发生谷胱甘肽化允许一定的解折叠；拓扑异构酶的亚单位部分地取决于链间二硫键来实现其催化和再连接的双重作用；和(b)防止过氧亚硝酸盐形成并由此维持一氧化氮对于Tyr-274亚硝化的可用性；亚硝基GSH自发形成并充当“有序”的一氧化氮供体。

[0122] 替换痘苗DNA拓扑异构酶的活性位点酪氨酸将该酶转化成位点特异性核酸内切酶。通常，该酶的Tyr-274通过3’-磷酸二酯键与DNA中的特定磷酸连接。VV拓扑异构酶在双链体DNA的识别位点形成共价蛋白质-DNA中间体。核苷酸通过3’-磷酸二酯键与酶的Tyr-274连接。在裂解双链体DNA时，Tyr-274被谷氨酸、半胱氨酸或组氨酸置换保持酶促活性，但由于不形成3’-磷酸二酯键，所以不发生再连接，它需要Tyr-274的OH。突变置换的产物是在识别位点用3’-磷酸封端的核酸内切酶切割的60bp双链体DNA。随着病毒蛋白质半胱氨酰残基的生化还原或其谷胱甘肽化，活性位点酪氨酸Try-274可能暴露并可用于亚硝化反应，从而形成硝基酪氨酸。GSH减少活性氮(RNS)的异常反应，并保护一氧化氮，使得过氧亚硝酸盐不太可能形成，并且更多可用于抗病毒蛋白质亚硝化。

[0123] 由于病毒处于被感染的活化的单个核细胞/巨噬细胞内，其现在继iNOS诱导而产生增加的一氧化氮，因此存在这些细胞内的病毒拓扑异构酶在形成硝基酪氨酸中的选择性的量度，从而安全地抑制该酶。

[0124] 多种硫醇反应性化合物(包括与硫醇反应的醌类)和其他三种有效的硫醇反应性试剂(N-乙基马来酰亚胺(NEM)；双硫仑(disulfiram)；和有机二硫化物[2,2’-二硫代双(5-硝基吡啶)])对拓扑异构酶II的硫醇烷基化可以中断“全局”活动。所有这些都导致了拓扑异构酶II介导的DNA切割。拓扑异构酶起到核酸内切酶的作用。事实上，这些试剂通过使用所有半胱氨酸残基均被替代为丙氨酸的突变酵母TOP2(无半胱氨酸TOP2)而与拓扑异构酶中的半胱氨酰残基发生不利反应。这种替代完全消除了硫醇反应性醌类诱导的TOP2介导的DNA切割。在一些情况下，拓扑异构酶半胱氨酰残基可被硫醇化物质例如GSH接近，该物质可以使可及的半胱氨酸发生谷胱甘肽化，如关于HIV的前一小节所示。拓扑异构酶II-DNA复合物上的硫醇残基被暴露并被萘醌烷基化，从而提供了由醌类引起的拓扑异构酶II中毒的仿生模型。拓扑异构酶II是用于确定氯化联苯的醌代谢物(环境污染物)反应性的含SH的酶的

模型系统。这些醌与GSH的结合平行于它们与拓扑异构酶II中的蛋白质SH基团的结合，并且这是所观察到的通过PCB代谢产生的DNA链断裂的可能机制。拓扑异构酶半胱氨酰残基可能是可接受的，并且易受外源性GSH的影响，可能更易被病毒拓扑异构酶损伤，类似于一些细菌拓扑异构酶抑制剂，如喹诺酮类抗生素与许多细菌的拓扑异构酶II(DNA旋转酶)。

[0125] 形成分子内和链间二硫键，以将蛋白质折叠成其最佳构型，通过“质量控制”测试在正常情况下进行，如以前描述的PDI、PPI酶、分子伴侣、用于分子伴侣的丰富的ATP以及对于这些“质量控制”蛋白质的合成。与之相比，病毒蛋白质，例如HIV Tat、gp120和蛋白酶，一般在低于最佳的条件下产生，因为被激活且响应性的病毒感染的细胞的细胞内环境是混乱的，具有受损的生物能和宿主应答，包括来自NFκB诱导的iNOS的一氧化氮。除非转向形成过氧亚硝酸盐，否则NO可用于与酪氨酰残基和半胱氨酰残基形成加合物，当病毒蛋白质作为新生多肽链而形成时，这些残基相对更暴露。在活化的、感染的单个核细胞/巨噬细胞内，在这些新生链中形成硝基酪氨酸和亚硝基硫醇的可能性可能是显著的。然而，病理学上成功的痘病毒，如天花，编码允许病毒逃避宿主免疫应答的蛋白质。如下面更充分描述的那样，这些逃避蛋白质与毒力相关。它们直接和间接地与宿主防御因子相互作用以使它们失效：NFκB,TNFα,IFNγ,IL-18,促炎细胞因子级联的大部分组分，补体，趋化因子，和树突细胞的抑制剂，从而通过NK细胞消除先天免疫，并通过T细胞获得免疫。致死性痘病毒感染的结果是早期的、“沉默的”、未受阻碍的病毒复制和传播。当宿主细胞在天花暴露后约10天确实通过炎症反应开始反应时，防御因子被大量病毒体压制。患者现在卧床，处于高热，面临死亡。

[0126] 在响应性单个核细胞-巨噬细胞和T细胞中最严重的细胞内GSH的侵蚀使Th0细胞转变成Th2应答模式，其包括增加的IL-4产生，以及以下物质的抑制：IL-12,IFNγ和特异性抗天花细胞裂解细胞，与有机会恢复所需的相反。基于GSH的性质，优选的GSH制剂的性质以及GSH转运蛋白的普遍存在，施用GSH时应该发生以下反应：痘蛋白质中的可接近的半胱氨酰残基(对于病毒体结构，对于病毒复制，和对于逃避)如果作为热力学不足的二硫化物存在则将会还原；并且暴露的半胱氨酰残基(特别是在新生天花多肽链上)可以通过形成混合的二硫键而谷胱甘肽化。

[0127] 痘病毒的基因组编码许多在细胞和系统水平上与宿主过程相互作用的蛋白质，其中一些阻断趋化物质的发展或干扰经典补体途径的激活。牛痘病毒的38kDa蛋白质抑制在病毒复制过程中引发的趋化分子的产生。

[0128] 逃避蛋白质与宿主应答的各种实例：对抗凋亡，捕获趋化因子，抵消补体，干扰干扰素，和截断白细胞介素。以下代表由痘病毒编码的并由感染细胞产生的逃避蛋白质范围的样品：由鼠痘、痘苗和牛痘产生的IL-18结合蛋白质；牛痘、鼠痘和骆驼痘的TNF受体，痘苗病毒35-kDa蛋白质(VV-35kDa)的CC-趋化因子抑制剂；牛痘病毒对NFκB的抑制；通过痘苗病毒的补体调节蛋白质使人C3b和C6失活；鼠痘的CD30同源物在细胞中诱导反向信号传导，阻断产生干扰素γ的细胞的产生，并强烈抑制Th1应答，但不是Th2。

[0129] 已证实高GSH水平对于血小板、血管内皮细胞、巨噬细胞、细胞毒性T淋巴细胞和其他免疫系统组分的正常功能是必需的。最近发现HIV感染的患者在血浆、其他体液和某些细胞类型如巨噬细胞中表现出低GSH水平，这似乎不是由于GSH合成中的缺陷。

[0130] 天花

[0131] 天花与炭疽芽孢杆菌、鼠疫耶尔森氏菌、土拉弗朗西斯菌、肉毒杆菌毒素以及丝状

病毒(Filo)和沙粒病毒如埃博拉和出血热一起被分类为A类生物恐怖剂。专家认为,只有少数病毒体是天花传播所必需的。有些不确定性是具有白细胞介素-4(IL-4)的额外基因拷贝的生物工程化天花的想法,IL-4是一种细胞因子,如果过表达则抑制IL-12、IFNγ和特异性细胞介导的免疫,其为存活和从急性病毒感染中恢复所需的关键因素。用来降低发病率和死亡率的药物将有助于补充成功控制天花生物恐怖、生物战及其威胁。在可能存在有序"筛选的"疫苗接种的后勤障碍时,安全的药物会"填充"。在针对天花恐怖的总体战略上,重要的一点是在孵育的"七天窗口"内向可能暴露的个体提供和施用疫苗。药物GSH是安全的,在对个体是否在初次暴露后七天时间内有疑问的情况下可以用来"填充"。药物GSH可作为全面防护的一部分,以增强教育和疫苗接种。药物GSH的施用不会妨碍疫苗接种的效力,相反,鉴于GSH相对于下文描述和参考的Th2免疫应答模式促进Th1免疫应答模式的有利作用,这将是有帮助的。通过分叉针给予的天花疫苗诱导强烈的痘苗病毒特异性CD8(+)CTL和产生IFNγ的T细胞应答。这些是GSH增强的应答,只要它在单核细胞/巨噬细胞、树突细胞和B淋巴细胞内以正常细胞内浓度存在。对于超出疫苗"七天窗口"的人以及"群体"内的其他人,基于药物的发病率降低的核心是包括天花在组织和细胞水平上的分子病理学的主要过程、造成疾病进展的宿主因素以及死亡原因的问题。天花的细胞病变效应导致死亡,而且这些数据并不支持此前公布的将死亡归因于脓疱引起的细菌性脓毒症综合征的理论。通常在疾病的第二周发生的死亡,(最初暴露后3-4周)最可能是由于与循环免疫复合物和可溶性天花抗原相关的毒血症。高剂量的药物GSH可以安全、主动地用来补充和维持细胞内GSH浓度,从而在组织、细胞和分子水平上阻断天花病理学。在暴露于天花的情况下,GSH应该能够阻止感染的全面发展,可能将其转化为与在接种疫苗的人中发生的天花(10年至20年前,或者类天花,即,小天花)相当的温和形式。GSH转运蛋白存在于细胞膜上以及线粒体中,因此来自细胞外液的GSH可以进入细胞区室。GSH可以增加IFNγ,IFNγ转而诱导一氧化氮合酶(iNOS),从而增加清除病毒血症的有效的抗微生物·NO;减少与过量促炎性细胞因子有关的毒血症,因为GSH可以抑制NFκB活化,以及TNFα、IL-1β、COX-2和其他促成患者"毒性"状态的细胞因子。

[0132] 从暴露开始到包括两种早期病毒血症的无症状病毒复制,到前驱表现,到皮疹,然后到并发症,或恢复,或死亡,天花的以上顺序临床呈现揭示了独特的逐步发病机制:阻断最初的宿主防御细胞反应伴随未受阻和无症状的病毒复制与病毒血症,随后是严重失调的炎症反应级联,皮肤毛细血管内负载天花的粘附白细胞的定位,白细胞从毛细血管渗出以感染皮肤,破坏性皮疹,毒血症,与可溶性天花抗原的循环免疫复合物,和补体活化等。

[0133] 包括天花病毒在内的痘病毒通常编码用于复制的蛋白质,如DNA拓扑异构酶等,当被感染的宿主细胞表达时,这些蛋白质钝化宿主免疫策略以牵制并根除感染,包括阻断NFκB活化、趋化因子、细胞因子、IFNγ、补体片段和细胞介导的免疫。此外,武器化的生物工程痘变异体可以具有添加的编码的蛋白质,这些蛋白质可以钝化经免疫宿主的免疫策略,并导致先前未遇到的疾病传播和严重程度的模式。

[0134] GSH的施用通过其性质提供保护机制,如以前详细描述并参考,其可以在这个阶段安全地对抗天花病毒病理学。已知GSH上调Th1应答模式,并且如果早期使用,可增加IL-12、IL-18、IFNγ,增强特异性细胞毒性淋巴细胞,增强NK细胞活性,并增加氧化还原敏感的保护性应答。

[0135] 在无症状性天花感染的早期阶段，许多树突细胞、巨噬细胞和淋巴细胞尚未受到感染并保持对GSH的最佳反应性；然而，宿主应答可以被表达的可溶性和分泌性病毒蛋白质阻断。这些蛋白质可以不利地影响尚未感染的邻近细胞。痘病毒编码细胞因子肿瘤坏死因子、IL-1β、IFN-γ、IFN-α/β和趋化因子的受体的可溶性形式。发现这些可溶性病毒蛋白质与未感染的和感染的细胞结合，从而使干扰素和其他宿主反应的保护性抗病毒作用无效。可溶性病毒蛋白质在与所有细胞表面结合时充当受体，确保病毒无阻碍地接近并进入新的未感染细胞。因此，即使在新细胞受到感染之前，感染也会中和宿主细胞防御。除了及时的检疫、教育和疫苗接种之外，对抗策略现在可以包括作为安全药物的GSH，其：(a)通过上调Th1应答，提高在数字上具有挑战性的防御性生物分子相对于病毒蛋白质的量，(b)增加氧化还原敏感的防御细胞，如NK细胞，以及(c)攻击(减少)病毒逃避和复制蛋白质的敏感构象二硫键。

[0136] 在可以安全服用疫苗并且确实在7天内的人中，在可能暴露7天内急性施用天花疫苗是非常有效的，这一事实意味着未感染的或甚至早期感染的细胞群体可以迅速产生足量的IL-12、IL-18、IFNγ和刺激NK细胞的因子，以及天花特异性CTL，来克服病毒逃避蛋白质，并在这个早期阶段阻止感染。天花疫苗诱导强烈的痘苗病毒特异性CD8+CTL和产生IFNγ的T细胞应答。这些是相同的生化和细胞应答，GSH通过促进Th1应答、NK细胞活性和保护性的氧化还原敏感的应答而迅速增强这些生化和细胞应答。痘蛋白质通常通过巯基和二硫键与宿主蛋白质直接和生物化学反应。蛋白质-蛋白质相互作用通常发生在其他病理状态中。一些倾向于是化学计量的，而另一些则不是。这提供了早期使用高剂量GSH治疗来定量增强宿主免疫应答并在数值上压倒阻断的痘病毒蛋白质的基本原理。Th1应答模式的上调包括发展出特异性细胞毒性淋巴细胞(CTL)来杀死和清除天花感染的细胞。

[0137] 在口咽或呼吸道粘膜上植入病毒后发生自然感染。感染剂量是未知的，但被认为只是少数病毒体。病毒迁移到区域淋巴结并在其中增殖后，大约在第三天或第四天发生无症状的病毒血症，然后病毒在脾脏、骨髓和淋巴结中增殖。

[0138] GSH有助于消除有害的痘蛋白质的来源，并代表有利于宿主的非化学计量的有利结果。由ThyoGen和Kyowa Hakko,Co.,Ltd.生产的GSH是无毒的。在1/2期研究中，越来越多的口服剂量范围提供了外周血单个核细胞(PBMC)中安全、显著、剂量相关的GSH增加。

[0139] 除了促进Th1途径和氧化还原敏感性保护之外，GSH的另一种有用的性质涉及GSH和病毒蛋白质的直接翻译后修饰。GSH随着浓度和氧化还原电位的变化，通过还原二硫键或通过使半胱氨酸残基的巯基发生谷胱甘肽化来调节蛋白质、细胞信号传导和其他反应。这使许多蛋白质解折叠，并且通常抑制酶和配体与受体的结合。蛋白质的解折叠也可以暴露关键的酪氨酸位点，该酪氨酸可以被有利地亚硝基化为硝基酪氨酸，例如在活化的产生一氧化氮的巨噬细胞内，一氧化氮现在可以攻击病毒DNA拓扑异构酶中的活性位点酪氨酸。

[0140] 与宿主蛋白质相比，感染的宿主细胞表达的病毒蛋白质的热力学稳定性降低的可能性基于较低的稳定性提供了介入机会。这种性质的例子，特别是在病毒感染中，除其他HIV实例外，包括谷胱甘肽酰化HIV蛋白酶。HIV-1蛋白酶的两个保守半胱氨酸(Cys-67,Cys-95)容易被谷胱甘肽化，产生比活性显著较低的酶制品。去除GSH恢复了酶制品的完全活性。灭活二硫键的实例是HIV gp120的研究。在体外复制HIV-1与GSH暴露导致特别富含二硫键的特定糖蛋白如gp120的选择性减少。GSH对HIV gp120的影响以前在显示病毒感染力下降

的体外研究中得到证明。这可能是由于选择性抑制包膜糖蛋白，特别是富含链内二硫键的主要的这类蛋白质gp120。病毒蛋白质的这些GSH修饰在没有细胞毒性的情况下得以实现。

[0141] 继发性病毒血症，早期有症状阶段，伴有发热和毒血症，发生在暴露后的第8-14天，并且预示NFκB家族转录因子的激活和失去控制。伴随着感染的氧化应激、巨噬细胞质膜上的NADPH活化和GSH消耗激活组蛋白乙酰化，并且DNA解旋使得可以接近NFκB依赖性的广泛基因网络。同时，NFκB已被激活并且过量产生：促炎细胞因子，包括Th1细胞因子IL-12和IFNγ，IFNγ依赖性因子，IL-18，和Th2细胞因子IL-4；过量产生IL-4；过量产生粘附分子；诱导基质金属蛋白酶；不受控制的环加氧酶-2(COX-2)；类花生酸的加速合成；诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的激活；趋化因子，以及NFκB基因网络中的其他因子。这些反应，如不受控制的LOOH，RNS的过量，以及由TNFα引起的自由基反应，影响GSH浓度。这导致氧化还原电位进一步下降，并进一步加剧了急性炎症反应。随着GSH水平下降，Th1应答模式进一步下降，并且IL-12和IFNγ得到抑制。不发展特异性细胞毒性淋巴细胞(CTL)是下调的Th1应答模式的一部分，并导致天花病毒感染的单个核细胞的无阻碍传播。

[0142] 粘附分子在受感染的单个核细胞和活化的内皮上的表达使单个核细胞粘附到受损的内皮上。接着受感染的细胞通过受损的毛细血管发生血细胞渗出，以在真皮中形成血管周浸润。然后出现天花病毒以感染并破坏皮肤细胞，尤其是脸部和“泳衣”区域的皮脂腺的细胞。病理学过程有一个合理的替代实例，其涉及NFκB活化，其级联，包括粘附分子如ICAM-1。在Sprague-Dawley大鼠中进行的大脑中动脉闭塞(MCAO)在脑缺血中产生炎性基因表达，包括粘附分子，其使用定量实时RT-PCR分析是可测量的。缺血再灌注脑损伤启动涉及粘附分子细胞因子表达的炎症应答，其中一些受NFκB调节；参与炎症级联启动的诱导的分子因此可促成导致进一步脑损伤的继发细胞应答。

[0143] 在氧化应激(脂质过氧化物、活性氧、活性氮)损伤的血管中发生各种类型的病理变化，如在严重感染、局部缺血和其他以GSH消耗为特征的状况中发生的。两个内皮细胞之间的接合处是“紧密的路面”，所以没有任何物质可以渗漏。这是光滑的、不粘的路面，使血液顺畅流动。这些内衬细胞活跃地产生分子(例如氧化亚氮和PGI_2)，这些分子保持血管敞开且不粘。GSH强制帮助氧化亚氮和PGI_2执行其关键功能。否则，血管会大大变窄，并且血液成分，如血小板和白细胞，会“阻断”血管。在直径大约200μm的小动脉中的粘附白细胞也释放会损伤血管的物质，并且一些可以通过血细胞渗出穿过血管壁移动以攻击周围的组织细胞。这发生在严重感染、局部缺血和其他病症中，这是由于继发于GSH减少，白细胞和内皮细胞上粘附分子的安排。这是当负载天花的单个核细胞在皮肤毛细血管中停留以准备侵入皮肤细胞时所看到的过程的类型。一些白细胞激活它们的表面NADPH氧化酶，该NADPH氧化酶产生多种直接破坏性活性氧。该效应可以在内皮中造成大的坑口，以及其他超结构不规则性。通过SEM也可以看到导致小动脉内皮的自由基损伤的粘附白细胞的后果。可以观察到内衬细胞的成坑和垮塌。这发生在严重感染、局部缺血和其他以GSH缺陷为特征的病症中。像这些的坑口只有在存在粘附的白细胞时才可见，并且可代表由单核细胞/巨噬细胞产生的ROS和RNS的直接侵蚀。内皮细胞的垮塌可能是由于影响基底膜材料和其他血管支持分子的基质MMP的产生增加所致。

[0144] 继发性病毒血症大约在第八天开始，然后是发热和毒血症。包含在白细胞中的病毒然后定位于真皮的小血管中，并位于口腔和咽粘膜下方，并随后感染相邻细胞。典型的皮

肤病变起始于真皮毛细血管的变化，其特征在于扩张、内皮增殖和血管周单个核细胞浸润。在相邻的表皮中，发生细胞的网状变性。细胞膨胀，其外观出现特征性Guarneri体。这些是靠近细胞核的球体，由2至8微米大小的病毒原质小体集合组成。膨胀的细胞破裂，形成囊泡，泡囊下面的细胞经历不同类型的变性，类似于水痘中发生的“气球样变性”。

[0145] MMP(胶原酶、明胶酶等构成21种酶的家族，它们攻击细胞外基质的已知成分)受炎性细胞因子上调，并且在恶性肿瘤的扩散中是有效的。感染天花的单个核细胞从真皮毛细血管中渗出，及其随后穿过真皮的紧密胶原基质扩散到表皮层，或者穿透其进入皮脂腺结构，都是被MMP增强的步骤。保持高GSH浓度可以帮助抑制MMP活性并在减轻特别具有破坏性的皮疹方面具有重大益处。

[0146] 在大约30％至60％的未接种疫苗的患者中累积组织毒性进展而不减弱，导致死亡。幸存者通过激烈的过程恢复过来，有的在皮肤上留下点状疤痕。随着GSH水平下降，Th2应答模式失衡和不受控制的炎症级联占主导地位，其他病理机制也随之扩大。由一氧化氮(•NO)的过量产生引起的RNS与ROS和脂质过氧化物(LOOH)组合起来形成诸如过氧亚硝酸盐(•NOO)的RNS。随着IL-4增强12-和15-脂氧合酶，脂质过氧化作用扩大，同时抑制GSH过氧化物酶和其他正常分解LOOH的酶。宿主蛋白质受到不受控制的ROS、RNS、烷氧基(LO•)和其他反应性中间体的攻击。因此，会损害GSH和其他抗氧化剂防御的氧化应激显著增加。防御受损，因为Th2应答、IL-4、加剧的炎症反应和氧化应激周期性地相互放大。

[0147] 这一阶段的细胞内GSH浓度可能相当低。有几种诱导iNOS的诱导剂，包括促炎细胞因子TNFα、IL-1β和IFNγ。后者IFNγ可能不是重要的因子，因为存在有效的Th2过程实际上抑制了IFNγ。在其他炎性疾病中，增加IFNγ的产生会产生不良后果，因为它是iNOS的有效激活剂。到天花感染达到这个危及生命的紧急阶段时，不受调节和相互作用的许多途径变得非常复杂。如果早期开始GSH治疗，那么在天花感染的复杂后期阶段之前的过程将对控制机制的恢复更具响应性。然而，必须制定强有力的公共卫生措施、卫生专业人员的教育和其他后勤系统，以确定可能已经暴露的人员，以便可以实施筛选的疫苗接种、检疫和早期GSH治疗。

[0148] 在毒性阶段，暴露后的第14天至第30天，患者通常经历高热、不适以及虚脱伴头痛和背痛。然后斑状丘疹出现在口腔和咽部粘膜、面部和前臂上，并扩散到躯干和腿部。死亡通常发生在疾病的第二周，最可能是由与循环免疫复合物和可溶性天花抗原相关的毒血症引起的。几乎没有关于具有不同类型免疫缺陷的个体如何对天然天花感染作出反应的信息。在适当的技术可用于测量细胞介导的免疫之前，根除天花。然而，一些恶性肿瘤和出血性天花病例的潜在原因可能是免疫应答缺陷引起的。

[0149] 在晚期阶段开始时，使用GSH的化学计量法由于涉及的途径数目庞大而令人望而生畏。尽管GSH具有控制性质，但它依赖于其扩增酶，如GSH过氧化物酶、S转移酶和GSH还原酶。这些酶与其他蛋白质一样经历相同的氧化性自由基损伤，形成羰基。当GSH水平下降时，线粒体氧化磷酸化也处于风险中，并导致细胞大分子合成受损和凋亡。当线粒体GSH水平低时，可以避免巨噬细胞和抗原加工细胞的凋亡损失。在体外，GSH添加可以预防具有威胁的线粒体诱导的凋亡。

[0150] 总的来说，上面描述的复杂相互作用的迷宫具有中心特征。它们失控，这在很大程度上是由于对开始于GSH的利用度有限的分子的需求增加。通常在所有组织中都有很高的

需求,但45岁以后,即使明显健康的个体也变得相对不足。烟草、酒精、并发感染、糖尿病、药物如抗炎皮质类固醇的使用导致GSH不足恶化。

[0151] 随着在适当制剂中口服可生物利用的GSH的施用,必须避免破碎的生物分子、致凋亡的细胞碎片、脂质过氧化的毒性副产物、线粒体生物能的崩溃以及其他进行性的、不可挽回的晚期病理事件。

[0152] AIDS

[0153] 已显示GSH在体外抑制慢性感染细胞和急性感染细胞中的HIV复制。这使得GSH替代疗法具有吸引力,因为它有干扰整合的HIV基因组的表达的潜力,该基因组是不受当前使用的抗逆转录病毒药物(AZT、ddI、ddC、D4T)攻击的位点。GSH也可能有益于抵抗HIV感染中的过量自由基反应,这可归因于:B淋巴细胞过度分泌TNF-α,HIV感染,以及HIV的GP-120蛋白对花生四烯酸代谢的催化。免疫系统的关键细胞类型对GSH的生理需求,以及巨噬细胞吸收细胞内GSH以及与T淋巴细胞代谢相互作用以间接导致其GSH增加的能力,提供了额外的理由来尝试校正HIV/AIDS中的GSH缺乏。

[0154] GSH缺乏是HIV疾病存活的关键决定因素。GSH缺乏与HIV疾病的存活受损相关(PNAS.Vol.94,pp.1967-1972(1997))。由于这些疾病过程中的低细胞GSH水平允许越来越多的自由基反应来推动病症,所以提高细胞中GSH水平的追求被广泛认为是对HIV/AIDS和其他病症极其重要的。已知HIV会引发病理性自由基反应,该反应导致GSH的破坏,以及其他抗氧化剂系统的耗尽和细胞器和大分子的破坏。在临床前研究中,GSH在独特的点停止病毒复制,特别是阻止有毒自由基、前列腺素、TNF-α、白细胞介素和一系列免疫抑制性氧化脂质和蛋白质的产生,导致肌肉萎缩和神经症状。恢复GSH水平可安全和经济地减缓或停止疾病进展。

[0155] 在哺乳动物细胞中,氧化应激,即还原型GSH的低细胞内水平,和相对高水平的自由基,激活某些细胞因子,包括NFκB和TNF-α,这些细胞因子进而激活DNA到mRNA的细胞转录,导致mRNA翻译成多肽序列。已显示抗氧化剂阻断氧化剂对NFκB的诱导。在病毒感染的细胞中,病毒基因组被转录,导致病毒RNA产生,这通常对RNA病毒和逆转录病毒的病毒复制是必需的。这些过程需要细胞的相对氧化状态,这种状况是由应激、低GSH水平或减少的细胞产物的产生造成的。激活细胞转录的机制在进化上高度保守,因此一组突变不可能逃脱这个过程,或者这个途径中的酶和受体基因产物突变的生物体将会很好地适应生存。因此,通过保持细胞的相对还原状态(相对降低的氧化还原电位),病毒转录——后期病毒复制中的必要步骤——受到阻碍。

[0156] 氧化性细胞内条件对病毒复制的扩增效应通过降解GSH的各种病毒和病毒产物的作用而复合。例如,具有大量二硫键且通常存在于感染细胞表面上的HIV表面糖蛋白GP-120氧化GSH,导致细胞内GSH水平降低。另一方面,GSH还原GP-120的二硫键,降低或消除其生物活性,而这又是病毒感染性所必需的。因此,GSH干扰这类氧化蛋白质的产生,并且一旦形成就会降解它们。GSH还参与过氧化氢的破坏,过氧化氢是与活化NFκB有关的一种长寿命的氧化信使。活性氧中间体作为NF-κB转录因子和HIV-1活化中明显广泛使用的信使。

[0157] 在活跃复制病毒基因产物的细胞中,可能发生事件级联,其允许细胞从具有低病毒活性的相对静息期进入具有大量病毒复制和细胞死亡的活跃期,伴随着细胞氧化还原电位的改变;通过保持足够的GSH水平,该级联可能会受到阻碍。

[0158] 因此，某些病毒感染，如HIV，与GSH水平降低相关，并且认为通过增加感染细胞中的细胞内GSH水平，以及增加细胞外GSH，HIV的复制可能受到干扰，并且事件级联延迟或中断。值得注意的是，AIDS也可能与GSSG水平降低有关，这意味着干扰了GSH的从头合成以及以上讨论的现有GSH的氧化。

[0159] 最初HIV感染后，出现强烈的病毒感染，这模拟严重的流感病例，伴随着病毒的大规模复制。这个急性期在几周内自发地通过，因为身体发起大部分成功的免疫防御。此后，该个体没有感染的外在表现。然而，病毒继续在免疫系统组织和细胞内暗中复制，如在各种体腔中发现的淋巴结、淋巴小结和特定多树突细胞中。这种感染不仅仅是病毒问题。病毒除了复制外，还引起各种自由基和各种细胞因子以毒性或升高水平的过量产生。后者通常是对大量反应发出信号的存在的生化物质，通常以很小的浓度存在。最终，平均7-10年看似静止的HIV感染后，侵袭性自由基和细胞因子的毒性水平开始引起症状，免疫系统开始出现故障。产生毒性因子，如免疫抑制性的15-HPETE和引起肌肉萎缩的TNF-α。病毒颗粒数目增加，并且患者发生获得性免疫缺陷综合征，AIDS，这可能会持续2-4年，然后个体才会死亡。因此，AIDS不仅仅是一种病毒感染，尽管病毒感染被认为是该疾病病因的不可或缺的部分。

[0160] HIV具有强大的突变能力。正是这种能力使得难以制造疫苗或开发长期的抗病毒药物治疗。随着越来越多的人在目前复杂的药物治疗方案上继续失败，耐药病毒株的数量正在增加。这是一个特别危险的HIV库，并构成相当大的威胁。这些耐药突变体也增加了疫苗开发的难度。这种流行性感染失控，并且广泛普及的仅旨在降低病毒数量的多药方案被证明过于复杂，毒性太大，成本太高，而且范围太窄。因此，由于蛋白酶抑制剂与AZT型药物的联合应用，越来越多的人在这类治疗上失败。此外，自由基和细胞因子的持续产生(可能在很大程度上独立于病毒)使AIDS的免疫系统、胃肠道、神经系统和许多其他器官的功能障碍永久存在。已发表的科学文献表明，许多这些不同的器官系统功能障碍是由于病毒及其自由基引起的系统性GSH缺乏所致。GSH在HIV感染中被消耗，因为它是对抗自由基的主要的防护性抗氧化剂。GSH水平降低的另一个原因是HIV蛋白质中存在许多二硫键，如上面讨论的GP-120。二硫键与GSH反应并将其氧化。

[0161] 目前的HIV/AIDS药物利用了药物协同作用的概念，其中一个进程中的两个不同目标同时受到打击。效果不仅仅是叠加。选择现在使用的药物来抑制病毒复制的长途径中的两个非常不同的点。病毒复制的途径可以简单地描述：点1：病毒攻击并进入细胞；涉及病毒gp120蛋白和CD4+细胞受体等；点2：病毒从其RNA产生DNA；逆转录酶是涉及的酶(对AZT、ddI、ddC敏感)；点3：病毒DNA整合到细胞的DNA中；整合酶是涉及的酶；点4：前病毒DNA长时间无活性，但激活剂会迅速开始HIV复制；NFκB是休眠HIV DNA的激活剂，并且GSH水平必须低才能发生激活；点5：产生病毒RNA以及组装的病毒膜和蛋白质；涉及病毒蛋白酶(对GSH、蛋白酶抑制剂敏感)。使用AZT类药物，包括ddI、ddC和其他药物，点2是最早的攻击点。这些是有毒的，最终病毒会对这些逆转录酶抑制剂产生抗性。点5是晚期复制步骤，这是蛋白酶抑制剂起作用之处。这种药物阻断病毒蛋白酶，这种酶能够将长蛋白质链剪切成恰到好处的长度，从而使病毒包膜完全适合核酸核心，并将具有不同生物活性的蛋白质分开。蛋白酶抑制剂本身可促进抗性突变株的快速发展。

[0162] 通过组合逆转录酶抑制剂和蛋白酶抑制剂，获得协同作用，血浆中病毒颗粒的量骤减，而发育中的突变抗性病毒株的速度比仅使用一种抑制剂的速度慢。这些联合疗法或

“鸡尾酒”最初的前景受到越来越多失败的影响，这些失败预计会随着抗性突变体的发展而增加，尽管比分开使用药物更缓慢。

[0163] 新的疗法包括逆转录酶抑制剂和蛋白酶抑制剂类别中的其他药物。此外，正在开发以阻断点3的药物，其中整合酶将HIV DNA整合到受感染的细胞的DNA中，类似于将较小长度的丝剪接成较长的丝。虽然前景似乎很差，但疫苗开发也在继续，因为HIV似乎是一个移动的目标，而且变化速度似乎与变色龙一样快。疫苗的开发也受到病毒的免疫细胞亲和力的影响。

[0164] 人类免疫缺陷病毒感染的个体具有降低的血清酸溶性硫醇水平和血浆、外周血单核细胞和肺上皮衬液中的GSH水平。此外，已经表明具有高细胞内GSH水平的CD4+和CD8+T细胞随着HIV感染进展而选择性丢失。这种缺陷可能会加强HIV复制并加速疾病进展，特别是在炎症细胞因子浓度增加的个体中，因为这类细胞因子在GSH耗竭的细胞中更有效地刺激HIV复制。GSH和GSH前体如N-乙酰半胱氨酸(NAC)可抑制急性感染的细胞、慢性感染的细胞和正常外周血单个核细胞中细胞因子刺激的HIV表达和复制。

[0165] 值得注意的是，GSH的消耗也与称为细胞凋亡或程序性细胞死亡的过程有关。因此，人为消耗GSH的细胞间过程可导致细胞死亡，即使潜在的过程本身不是致死性的。

[0166] 糖尿病

[0167] 糖尿病有两种形式，儿童期或自身免疫(I型，IDDM)和迟发型或非胰岛素依赖型(II型，NIDDM)。前者约占30％，其余占所见病例的大部分。对于I型而言，发作通常是突然的，而对于II型而言是潜伏的。症状包括排尿过度、饥饿和口渴，第一种形式体重缓慢稳定减轻。肥胖往往与第二种形式有关，并被认为是易感人群的致病因素。血糖通常很高，尿液中的糖会频繁溢出。如果病情未得到治疗，则受害者可能会发生类似于饮酒者的具有恶臭呼吸气的酮酸中毒。未经治疗的糖尿病的直接医学并发症可包括神经系统症状，甚至糖尿病昏迷。

[0168] 由于高血糖症(非常高的血糖水平)的持续和有害的发生，发生被称为糖化的非酶促化学反应。由于糖化在细胞内发生的频率更高，因此几乎不断发生必需酶蛋白的失活。最关键的酶之一γ-谷氨酰半胱氨酸合成酶被糖化并容易失活。该酶是肝脏中GSH生物合成的关键步骤。这种特殊糖基化的最终结果是糖尿病患者GSH产生的不足。通常，成人每24小时产生8-10克，并且它被细胞迅速氧化。GSH是整个身体中多种重要功能所需的，例如在所有线粒体内产生化学能，被称为ATP。仅仅脑细胞、心脏细胞和其他细胞不能很好地发挥作用，并且可以通过凋亡被破坏。

[0169] GSH是人体内主要的抗氧化剂，也是我们唯一能够从头合成的抗氧化剂。它也是植物和动物中最常见的小分子量硫醇。如果没有GSH，免疫系统不能发挥作用，并且中枢和外周神经系统变得异常，然后停止运作。由于依赖于GSH作为一氧化氮(一种负责控制血管张力的血管扩张剂)的载体，心血管系统无法正常运作并最终失败。由于所有上皮细胞似乎都需要GSH，因此肠道内衬细胞无法正常工作，并失去有价值的微量营养素，营养受到损害，并且微生物被赋予进入门户从而导致感染。

[0170] 由于糖化作用对限速酶的破坏，使用GSH前体无助于控制GSH缺乏。随着GSH缺乏变得更加深入，众所周知的糖尿病后遗症在严重程度上进展。下面描述的并发症基本上是由于自由基损伤失控，因为糖尿病患者可用的GSH供应不足。

[0171] 已知还原糖与蛋白质、脂质和核酸中的游离氨基相互作用以形成Amadori产物并通过糖化反应产生活性氧。在糖尿病情况下，葡萄糖水平升高并且糖化蛋白质增加。已证明Cu，Zn-SOD在糖尿病条件下被糖化和灭活，并且由Amadori产物产生的ROS引起Cu，Zn-SOD的位点特异性断裂。通过多元醇途径产生的果糖具有比葡萄糖更强的糖化能力，因为线性形式的生理比例高于环化形式的比例。果糖以及核糖可以导致胰岛β细胞系中的凋亡。在果糖的存在下，细胞内过氧化物、蛋白质羰基化物和丙二醛的水平增加。另外，甲基乙二醛和3-脱氧葡糖醛酮也显示诱导凋亡细胞死亡。3-脱氧葡萄糖醛酮(一种2-氧代醛)通过降解Amadori化合物的降解而产生。这两种化合物在高血糖症期间均升高，并加速糖化反应。这些化合物由于其高反应性而对细胞具有毒性，并且存在具有NADPH-依赖性还原活性的清除系统，包括醛还原酶。

[0172] 细胞-细胞粘附对于产生有效的免疫应答是关键的，并且依赖于多种细胞表面受体的表达。细胞间粘附分子-1(ICAM-1;CD54)和血管细胞粘附分子(VCAM-1;CD 106)是可诱导的细胞表面糖蛋白。已知这些表面蛋白质的表达响应激活剂如细胞因子(TNF-α、IL-1α和β)、PMA、脂多糖和氧化剂而被诱导。淋巴细胞上ICAM-1和VCAM-1的配体分别是LFA-1(CD11a/CD18)和VLA-4。白细胞在特定部位的不适当或不正常隔离是多种自身免疫病和病理性炎性病症发展的中心组成部分。在兔动脉粥样硬化的饮食和遗传模型中都报道了在覆盖有早期泡沫细胞病变的动脉内皮中ICAM-1的集中表达。也已提出VCAM-1在冠状动脉病变进展中的作用。细胞表面分子的缺失或增加被认为决定了上皮癌细胞的动员、迁移和侵袭性。已知来自糖尿病患者的单核细胞在培养物中对内皮细胞具有增加的粘附。已经报道了通过特定的氧化还原敏感机制通过活性氧调节粘附分子表达和功能。抗氧化剂可以阻断诱导的粘附分子表达和细胞-细胞粘附。

[0173] 糖尿病将变得更容易感染，因为当GSH水平下降时免疫系统趋于崩溃，类似于HIV/AIDS中所见的某些缺陷。由于GSH不能足量获得以稳定一氧化氮(•NO)以有效地发挥其血管舒张(松弛)性质，所以外周脉管系统受损并且四肢的血液供应严重减少。坏疽是常见的后果，而连续截肢往往是晚年的结果。

[0174] 周围神经病变，脚和下肢常见的感觉丧失，常常随后是无法控制的异常感觉，如灼热或瘙痒。视网膜病变和肾病是后来的事件，其实际上是由于微血管病、新生血管和毛细血管的过度萌芽和生长所致，新血管和血血管通常会因为新血管壁的脆弱而出血。这种出血导致视网膜和肾脏受损，导致失明和肾脏停止，后者导致需要透析。随着GSH缺乏加重，白内障发生频率增加。

[0175] 大和中等大小的动脉成为加速的严重动脉粥样硬化的部位，早期有心肌梗死，程度更严重。如果糖尿病患者发生心力衰竭，则一年后的死亡率远远高于非糖尿病患者。此外，如果使用冠状动脉血管成形术来治疗其严重的动脉粥样硬化，糖尿病患者更可能具有心脏血管的再狭窄，称为再狭窄。

[0176] 上述并发症在很大程度上是由于GSH缺乏和正在进行的自由基反应。尽管每天使用降低血糖水平的胰岛素注射，但这些后遗症经常并最终发生。对于大多数糖尿病患者来说，很好地控制血糖水平是困难的。

[0177] 黄斑变性

[0178] GSH可用于治疗黄斑变性。年龄相关性黄斑变性(ARMD)是以慢性(干性形式)或快

速(湿性形式)发生破坏并且在眼睛的黄斑中发生不可挽回的视杆和视锥丢失为特征的疾病。黄斑是视网膜的近似中心,其中眼睛的晶状体聚焦其最强光。视觉细胞被称为视杆和视锥,是中枢神经系统的生长物和活跃部分。它们负责清晰查看细节(如脸部和面部表情、阅读、驾驶、机械和电气设备的操作以及对周围环境的普遍认知)所需的良好视觉辨别力,并且是必不可少的。最终,视杆和视锥的破坏导致功能性法定失明。由于没有与该病况相关的明显疼痛,发作的首次警告通常是明显的视敏度丧失。这可能已经意味着后期事件。现在认为,这个病理过程中的非常早期的事件之一是形成名为"玻璃膜疣"的物质。

[0179] 玻璃膜疣首先作为在黄斑中视网膜表面上沉积的黄色物质的斑块或弥散滴而出现。这是视网膜中由晶状体聚焦阳光的区域。这是对于视敏度而言包含最高密度的视杆的视网膜区域。虽然检测颜色的视锥在这种疾病中也会丢失,但认为是视杆损失导致失明。已经化学分析了玻璃膜疣,发现它由脂质混合物组成,其中大部分脂质通过自由基反应而过氧化。玻璃膜疣首先作为物质的小部分集合而出现在布鲁赫膜底部。这产生"气泡",该气泡将第一层细胞从膜上推出。血管萌芽、新生血管生长首先出现在这些通道中。

[0180] 这第一层细胞是独特的。它们是视网膜色素上皮(RPE)细胞,这些细胞与CNS小神经胶质远缘相关并具有吞噬功能。它们也是紧接在原发视网膜细胞(视杆和视锥)下方的细胞层。RPE细胞被认为对视杆和视锥起保护作用,因为它们消耗由视杆和视锥排出的碎屑。目前还不知道有色物质是否具有保护功能或仅与吞噬作用有关。然而,这种颜料虽然集中在细胞器中,但被认为是由过氧化脂质和黑色素组成的。

[0181] 据信,由于模型系统中事件的顺序,RPE细胞的损失首先在ARMD(年龄相关性黄斑变性)中发生。一旦视网膜黄斑区域缺乏RPE细胞,就会发生视杆丢失,最终会出现一些视锥先丢失。最后,毛细血管萌芽开始,我们看到典型的与晚期ARMD相关的微血管病。还已知RPE细胞需要大量的GSH才能正常发挥功能。当GSH水平在这些细胞中严重下降时,在可以研究它们的细胞培养物中,这些细胞开始死亡。当这些细胞的培养物在培养基中补充有GSH时,它们会繁殖。越来越多的证据表明,该疾病的进展是由视网膜内GSH更深的缺乏以及可能在这些细胞内发生的,正如细胞培养研究所表明的那样。

[0182] 一般认为,主要来自太阳光的"近"紫外线(UVB)和高强度可见光是ARMD的强烈促成因素。具有浅色虹膜的人构成了高风险人群,就像那些在户外和在阳光最强的赤道地区工作的人群一样。额外的自由基损害,如吸烟,会增加发生ARMD的风险。

[0183] 最近测试了几种方法,包括化疗,但没有成功。目前,没有有效的治疗方法来治疗ARMD。已开发了激光治疗广泛用于通过烧灼新生血管生长来减缓疾病缓慢发作形式所产生的损伤。然而,一旦疾病开始进展,最终的结果是肯定的。

[0184] GSH的作用是对抗自由基反应的直接和间接影响,以及改变对氧化还原敏感的基因表达。

[0185] GSH在活性氧方面在细胞调节中的应用

[0186] 有许多类型的信使在细胞之间传送信号。最近受到重视的一种信使是小分子氧化剂或自由基剂,其包括活性氧(ROS)。这些信使通常通过与生物大分子的非特异性相互作用起作用,这可能导致构型变化。例如,蛋白质二级结构通常由半胱氨酸残基控制,半胱氨酸残基易于通过形成二硫键而氧化。这些键形成连接的氧化可能导致蛋白质构型和功能的显著变化。

[0187] 因此越来越明显的是，O_2^-和H_2O_2是信号分子，由于它们与它们相互作用的蛋白质发生氧化还原反应的能力而改变如转录因子和膜受体一样多样化的蛋白质的行为，将-SH基团转化为例如二硫键，并改变酶缔合的过渡金属的氧化态。作为信号分子，O_2^-和H_2O_2由包括成纤维细胞、内皮和血管平滑肌细胞、神经元、卵子、精子和颈动脉体细胞在内的几种类型的细胞产生。所有这些细胞类型似乎都使用类似于经典的白细胞NADPH氧化酶的NAD(P)H氧化酶来产生这些氧化剂。然而，引发氧化剂产生的刺激以及氧化剂的使用目的因细胞而异。

[0188] 成纤维细胞响应于炎性介质如N-甲酰化肽和白细胞介素-1产生少量但显著量的O_2^-。假定这些细胞产生的O_2^-起到信号分子的作用。光学光谱分析显示成纤维细胞膜含有与白细胞NADPH氧化酶的黄细胞色素(flavocytochrome)亚单位不同的血红素蛋白，但其性质非常类似于白细胞蛋白质。这种血红素蛋白被认为是这些细胞产生的O_2^-的来源。

[0189] 内皮和血管平滑肌细胞使用NAD(P)H氧化酶响应于血管紧张素II(一种增加血压的肽激素)产生O_2^-。血压的这种增加似乎是由于O_2^-消耗由内皮细胞持续产生的NO-。产生的NO-浓度下降通过减弱或消除血管树中通常存在的NO-的血管舒张作用来提高血压。

[0190] 培养中的神经元细胞在暴露于淀粉样β肽时产生氧化剂，所述淀粉样β肽在阿尔茨海默病患者的大脑中观察到的淀粉样沉积物中发现，或者来自其他淀粉样蛋白疾病的相关肽。已知作用于白细胞NADPH氧化酶的黄素蛋白抑制剂也抑制该系统中氧化剂的产生，这一观察结果表明这种O_2^-由NADPH氧化酶产生的可能性。氧化剂的产生可以是神经元针对该肽所使用的防御的一部分，这些氧化剂可能与该肽反应以使其易于蛋白水解切割。

[0191] 在受精的那一刻，海胆卵中的膜NADPH氧化酶被活化，产生大量的H_2O_2。这种氧化剂通过形成双月桂酰桥连使受精膜的蛋白质交联，使得膜对精子不可渗透，从而防止多精症。这种机制对其他物种是共同的。

[0192] O_2^-对于精子的正常功能似乎是必需的。当被钙离子载体刺激时，正常精子会产生3到5分钟的O_2^-爆发。由于对超氧化物歧化酶抑制对许多刺激的顶体反应，所以在该反应中产生的O_2^-参与精子获能。另一方面，在没有刺激的情况下产生O_2^-的精子在功能上是异常的，可能是因为其信号传导机制的普遍中断。

[0193] 颈动脉体是位于颈总动脉分叉处的小器官，可测量血液的氧张力。该器官持续产生H_2O_2，并且免疫学分析显示其细胞含有白细胞NADPH氧化酶的所有4个特定亚单位，或与这些亚单位非常密切相关的蛋白质。据推测，与白细胞NADPH氧化酶非常相似或相同的颈动脉体NADPH氧化酶是颈动脉体氧气测量装置的关键部件。

[0194] 因此，除了磷酸化作为调控蛋白质构型和功能的控制机制之外，活性氧还可以在细胞调节和信号传导中起重要作用。选择性半胱氨酸氧化还原也是蛋白质翻译后修饰的重要机制。这种称为“氧化还原调节”的机制涉及多种细胞过程，例如DNA合成、酶活化、基因表达和细胞周期调控。

[0195] 硫氧还蛋白(TRX)是一种多效性细胞因子，具有巯基介导的氧化还原活性，在调节细胞过程(包括基因表达)方面发挥重要作用。TRX以还原或氧化形式存在，并通过该活性中心二硫醇的可逆氧化参与氧化还原反应。许多转录因子的活性被特定半胱氨酸残基的氧化还原修饰而翻译后改变。一种这样的因子是NFκB，其DNA结合活性被体外TRX处理改变。DNA修复酶氧化还原因子-1(Ref-1)改变了AP-1的DNA结合活性。Ref-1活性又被各种氧化还原

活性化合物(包括TRX)改变。响应于PMA处理,TRX从细胞质转移至细胞核以直接与Ref-1缔合并且不仅调节DNA结合,而且调节AP-1分子的转录活性。人硫氧还蛋白(hTRX)因此被证明是这些生物过程中重要的氧化还原调节剂。hTRX可以通过与靶分子如NFκB转录因子相互作用直接起作用,或者通过称为氧化还原因子1(Ref-1)的另一种氧化还原蛋白间接起作用。

[0196] 细胞氧化还原状态调节细胞事件的各个方面,包括增殖和凋亡。TRX是一种小的(13kDa)、普遍存在的蛋白质,在活性中心有两个氧化还原活性半胱氨酸残基-Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-,也被称为成人T细胞白血病衍生因子(ADF),其参与HTLV-I白血病发生。TRX还原蛋白质二硫键的途径需要活性位点SH之一进行亲核攻击以形成蛋白质-蛋白质二硫键,然后分子内置换还原的靶蛋白质,伴随形成氧化的TRX。除了作为HTLV-1感染的T细胞和EB病毒转化的淋巴细胞的自分泌生长因子的活性之外,许多研究已经显示ADF/TRX作为细胞还原催化剂在人类生理学中的重要性。

[0197] 体外和体内实验表明,TRX通过还原p50的Cys 62增强了NFκB的p50亚单位的DNA结合和转录活性。通过体外NMR研究揭示了TRX与NFκB p50寡肽的直接物理结合。也涉及Jun和Fos分子的氧化还原调节。各种抗氧化剂强烈激活AP-1复合物的DNA结合和反式激活能力。TRX在需要其他分子如氧化还原因子-1(Ref-1)的过程中增强了Jun和Fos的DNA结合活性。

[0198] NFκB调节各种细胞和病毒基因的表达。这些基因包括细胞因子如IL-2、IL-6、IL-8、GM-CSF和TNF,细胞粘附分子如ICAM-1和E-选择素,诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和病毒如人免疫缺陷病毒(HIV)和巨细胞病毒。通过与这些基因之间的因果关系,NFκB被认为与目前难治性疾病如获得性免疫缺陷综合征(AIDS)、造血癌细胞转移和类风湿性关节炎(RA)有因果关系。尽管由NFκB诱导的基因根据细胞谱系的情况而变化并且也处于其他转录因子的控制之下,但NFκB在调节这些基因中起主要作用,并因此对发病机制作出了很大贡献。因此,NFκB的生物化学干预应该确信干预致病过程并且对治疗有效。

[0199] NFκB由两个亚单位分子p65和p50组成,并且通常作为与胞质溶胶中的抑制性分子IκB的分子复合物存在。在用例如促炎细胞因子、IL-1和TNF刺激细胞后,IκB解离并且NFκB易位至细胞核并激活靶基因的表达。因此NFκB本身的活性受到上游调控机制的调节。关于上游信号级联的知识并不多。然而,NFκB激活级联中至少有两个独立的步骤:激酶途径和氧化还原信号传导途径。这两种不同的途径以协同方式参与NFκB激活级联,这可能有助于NFκB活性的微调以及故障安全调节。

[0200] 已知至少两种不同类型的激酶途径参与NFκB活化:NFκB激酶和IκB激酶。NFκB激酶是与NFκB缔合的43kD丝氨酸激酶。该激酶将NFκB的两个亚单位磷酸化并将其从IκB解离。已知有另一种激酶或多种激酶可以使IκB磷酸化。与这些发现一致,NFκB被证明在一些细胞系中被磷酸化,并且在其他细胞系中IκB响应于TNF或IL-1刺激被磷酸化。在大多数情况下,通过激酶级联的NFκB解离是NFκB活化的主要步骤。

[0201] 然而,从IKB解离后,NFκB必须通过细胞还原催化剂硫氧还蛋白(TRX)进行氧化还原调节。已知TRX通过将其活性中心二硫醇可逆地氧化成二硫化物而参与氧化还原反应。人类TRX最初被确定为负责诱导白细胞介素-2受体的A亚单位的因子,该受体现在已知处于NFκB的控制之下。已知NFκB不能与靶基因的κBDNA序列结合直至其被还原。

[0202] NFκB似乎具有称为β-桶的新型DNA结合结构,一组β-折叠向目标DNA伸展。在β桶结构的尖端有一个环插入核苷酸碱基,并被认为与DNA直接接触。该DNA结合环含有NFκB的半

胱氨酸残基62,其可能是作为TRX质子供体的氧化还原调节的靶标。包含氧化还原活性半胱氨酸的TRX表面上的靴形空心可以稳定地识别p50的DNA结合环,并且可能通过以结构依赖性方式提供质子来还原被氧化的半胱氨酸。因此,TRX对NFκB的还原被认为是特异性的。

[0203] 关于NFκB信号级联的启动所知不多。然而,用抗氧化剂如N-乙酰半胱氨酸(NAC)或α-硫辛酸预处理细胞可阻断NFκB。NAC也可以阻断TRX的诱导。因此,认为抗氧化剂的抗NFκB作用是双重的:1)阻断紧接信号引发下游的信号传导,以及2)抑制氧化还原效应物TRX的诱导。注意到,在没有可能损害生理性GSH代谢的慢性疾病如HIV感染、糖尿病等的哺乳动物中,可以采用改善GSH代谢的其他抗氧化剂的药物施用策略或本身为合适的抗氧化剂的化合物。值得注意的是,NAC已显示在长期给药中具有某些神经毒性,因此该化合物可能不合适。另一方面,硫辛酸单独地或与GSH组合,可以是有利的抗氧化剂。由于GSH口服给药对特定给药方法的敏感性,α-硫辛酸可能必须分开施用。

[0204] 细胞内氧化还原级联涉及通过添加四个电子对氧的连续还原和靶蛋白的氧化还原调节。在这些ROI中,过氧化氢具有最长的半衰期并被认为是氧化信号的介质。另一方面,诸如TRX的细胞还原系统抵消了过氧化氢的作用。氧化信号的强度可以通过内部GSH水平来调节。类似地,总GSH/GSSG含量可能影响细胞氧化还原信号的响应性。因此,细胞内半胱氨酸是产生GSH所需的。

[0205] 膜受体和转运蛋白(包括例如胰岛素受体和某些神经递质的受体)受细胞的氧化还原状态调节。大量的酶也受细胞的氧化还原状态调节。提供了其功能受氧化还原调节的部分蛋白质列表。酶:胶原酶p21Ras鸟嘌呤核苷酸结合蛋白;蛋白酪氨酸磷酸酶;p56Lck蛋白酪氨酸激酶;糖原磷酸化酶磷酸酶;糖原合成酶;磷酸果糖激酶;果糖-1,6-二磷酸酶;己糖激酶;丙酮酸激酶;葡萄糖-6-磷酸脱氢酶;3-羟基-3-甲基戊二酰基辅酶A还原酶;5-羟色胺N-乙酰转移酶;鸟苷酸环化酶;中链脂肪酰辅酶A脱氢酶;黄嘌呤脱氢酶;叶绿体NADP连接的甘油醛-3-磷酸脱氢酶;叶绿体NADP连接的苹果酸脱氢酶;叶绿体景天庚酮糖二磷酸酶;果糖二磷酸酶;NADP-苹果酸酶;3α-羟基类固醇脱氢酶;来自大肠杆菌的DsbA蛋白质二硫键异构酶;肌酸激酶;肌质网Ca2+-ATP酶;转录因子:NFκB;AP-1(jun/fos);SoxR(132,133);SoxS;OxyR;缺氧诱导因子1;甲状腺转录因子I;糖皮质激素受体;Sp1;受体:NMDA受体;胰岛素受体;Ryanodine受体;HOXB5;C-Myb;v-Rel;P53;Isl-1;其他:促红细胞生成素RNA结合蛋白

[0206] 活性氧(ROS)与各种人类疾病的发病机理有关。最近的证据表明,在中等高浓度下,某些形式的ROS(如H_2O_2)可能充当信号转导信使。至少两个明确的转录因子,核因子(NFκB)和激活蛋白(AP)-1,已被确定为受细胞内氧化还原状态的调节。氧化还原调节转录因子NFκB和AP-1的结合位点位于直接参与疾病发病机理的大量基因的启动子区域,所述疾病例如是AIDS、癌症、动脉粥样硬化和糖尿病并发症。生化和临床研究表明,抗氧化治疗可能有助于治疗疾病。信号转导级联中的关键步骤对氧化剂和抗氧化剂敏感。细胞调节的许多基本事件如蛋白质磷酸化和转录因子与DNA上共有位点的结合都是由生理氧化剂-抗氧化剂稳态,特别是由硫醇-二硫键平衡驱动的。内源性谷胱甘肽和硫氧还蛋白系统因此可被认为是氧化还原敏感性基因表达的有效调节剂。例如,通过使用抗氧化剂控制氧化还原级联,可能治疗几种疾病,例如造血癌细胞转移和AIDS。

[0207] 热休克(HS)响应是一种普遍存在的细胞对应激的响应,涉及HS基因的转录激活。

已显示H_2O_2诱导热休克因子-1(HSF-1)的浓度依赖性反式激活和DNA结合活性。然而，与H_2O_2相比，DNA结合活性低于HS，因此提供了氧化剂对HSF的双重调节的证据。SH还原剂二硫苏糖醇和内源性还原剂硫氧还蛋白(TRX)逆转了H_2O_2的体外作用。此外，TRX还恢复了体内氧化的HSF的DNA结合活性，同时发现它本身在体内被HS和H_2O_2诱导。因此，H_2O_2对HSF的活化和DNA结合活性具有双重作用：一方面，H_2O_2有利于HSF的核易位，而另一方面，它改变HSF-DNA结合活性，最可能是通过氧化在DNA结合结构域内的关键半胱氨酸残基。因此HSF属于ROS-调节的转录因子组。

[0208] 哺乳动物应激响应引发一系列神经内分泌响应，激活下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴和交感神经系统。维持体内平衡的高原需要协调应激反应系统之间的相互作用，发生在多个层面，包括脑、垂体、肾上腺和周围组织。糖皮质激素作为HPA轴的主要外周效应物，在重建人体每个外周组织中的内环境稳定状态方面发挥重要作用。另一方面，适应性响应也针对干扰作为细胞水平上局部宿主防御机制一部分的细胞稳态的各种内在或外在作用力进行操作。目前，还原/氧化(氧化还原)反应密切地涉及生物过程的控制，包括调节转录因子例如AP-1和NFκB的功能。细胞含有内源性缓冲系统，以防止活性氧中间体(ROI)的过量产生，从而通过表达和调节许多酶来保持细胞代谢。

[0209] 糖皮质激素与糖皮质激素受体(GR)结合后促进热休克蛋白(HSP)的解离，并且配体-受体复合物易位至细胞核，然后与称为糖皮质激素应答元件(GRE)的回文DNA序列结合。与DNA结合后，GR差异调节靶基因表达以产生激素作用，与或不与其他转录因子和共激活剂/共抑制剂相互作用。GR具有主要由中央DNA结合域(DBD)、核定位信号、配体结合结构域(LBD)和几种转录激活功能组成的模块化结构。人类GR含有20个半胱氨酸残基，集中在跨越DBD和LBD的中心区域。已经证明每个结构域中的半胱氨酸残基对于维持这些结构域和结构的结构和功能都是至关重要的。例如，已经显示DBD中的SH转化成二硫键阻断GR结合DNA纤维素，并且对硫醇具有高亲和力的金属离子干扰DBD-DNA相互作用。

[0210] TRX系统作为糖皮质激素介导的抗氧化应激应激反应的内源性防御机制。TRX被认为参与转录过程：例如，NFκB激活被TRX抑制，而AP-1活性被TRX诱导。此外，分离的大鼠细胞溶质中的GR被证明是稳定的并且通过TRX维持其被还原的配体结合形式。细胞oxistress、TRX、和GR之间的功能相互作用，并表明细胞氧化还原状态和TRX水平是细胞对糖皮质激素敏感性的重要决定因素。因此，TRX系统不仅可以通过例如隔离ROI来控制体内平衡，还可以通过微调激素信号来控制体内平衡。这些现象似乎是合理的，例如在炎症中，细胞被认为暴露于严重的氧化应激，其中糖皮质激素作用的抑制可以增强内源性防御机制并防止炎症反应级联的自我防御的提前终止。细胞TRX水平的增加可以恢复受体活性并允许GR有效地与靶基因进行交流。抗炎基因的合成激活和/或炎性基因的抑制可以防止炎症的超调。该过程可以通过改变细胞的氧化还原电位和细胞内液中GSH减少的浓度来调节。因此，糖皮质激素的功能可能受谷胱甘肽的调节。因此，慢性炎症性疾病如类风湿性关节炎以及其他免疫和自身免疫性疾病的治疗也可以受益于谷胱甘肽的治疗。

[0211] NFκB在HIV生命周期中的作用非常重要，特别是在潜伏感染细胞内的病毒再激活过程中已被广泛接受。在通过细胞内信号传导途径(例如由T细胞受体抗原复合物或IL-1或TNF受体引发的信号传导途径)激活后，NFκB通过结合HIV LTR启动子区域内的靶DNA元件来启动HIV基因表达。然后，产生病毒编码的反式激活因子Tat并触发爆发性病毒复制。由于细

胞转录因子NFκB的HIV基因表达激活途径在概念上先于病毒反式激活因子激活，因此概念上认为NFκB是病毒潜伏期维持和分解的决定因素。通过阻断HIV复制，抗氧化剂可能有效治疗AIDS。

[0212] NFκB起作用的另一种情况是造血癌细胞转移。NFκB在血管内皮细胞表面诱导E-选择蛋白(也称为ELAM-1)。由于一些癌细胞在其细胞表面上组成性表达称为唾液酸化Lewis X抗原的E-选择素的配体，因此认为E-选择素的诱导是癌细胞-内皮细胞相互作用的速率决定步骤。例如，当用IL-1或TNF处理原代人脐静脉内皮细胞(HUVEC)时，观察到NFκB的核易位，随后增强E-选择蛋白的表达。在一项研究中，研究了HUVEC和来自表达唾液酸化Lewis X抗原的肺的人类小细胞癌的肿瘤细胞系QG90细胞之间的细胞间相互作用，并且发现IL-1能够诱导癌细胞与HUVEC的附着。然而，用N-乙酰半胱氨酸，阿司匹林或pentoxyphillin预处理HUVEC以剂量依赖性方式有效地阻断了细胞与细胞的附着。

[0213] 色素上皮衍生因子(PEDF)

[0214] 众所周知，实体瘤如癌症需要新生血管形成以继续生长超过几毫米的大小。这是因为，就像所有的组织一样，他们需要氧气，并且必须摆脱毒性代谢产物。此外，由于细胞复制率高，快速生长的肿瘤可能需要远远超过正常组织。因此，寻求用于对抗肿瘤的一种技术是使用阻断新血管形成的药物和药剂，例如肿瘤坏死因子、内皮抑素、血管抑制素和其他药剂。引起人们兴趣的一种药物是色素上皮衍生因子(PEDF)，它是丝氨酸蛋白酶抑制剂(丝氨酸蛋白酶抑制剂)超基因家族的蛋白质，但具有底物而不是抑制剂的特性。PEDF因其与上述黄斑的色素RPE细胞的关联而得名。

[0215] PEDF是一种有效的自分泌和旁分泌激素，可阻断上皮细胞增殖(包括新生血管形成所必需的血管上皮细胞)并促进细胞分化，并具有神经营养和神经保护作用。随后的研究证实，PEDF或其同种型广泛分布于全身，但在视网膜和中枢神经系统的色素上皮细胞中浓度相对较高。PEDF可以帮助细胞抵抗凋亡。谷胱甘肽耗竭也与分化失败直接相关。PEDF与细胞外基质结合。色素上皮衍生因子(PEDF)与糖胺聚糖结合:结合位点的分析。PEDF是已知最有效的直接血管生成因子之一。在眼中，它可以防止晶状体、视网膜和眼球玻璃体中的血管向内生长。PEDF是细胞分化的显著增强剂，并且能够例如诱导成视网膜细胞瘤细胞逆转形成正常出现的细胞。PEDF保护神经组织免受一系列有害因素的影响，例如针对谷氨酸的兴奋性神经毒性。

[0216] PEDF由子宫内膜基质细胞产生，对腺上皮细胞的生长和分化有很强的作用。当基质细胞变成脱落细胞时，响应激素和妊娠，PEDF的产生被认为是至关重要的，以防止(i)胎盘的其他高度侵入性滋养层细胞的不受控制的生长和渗透进入子宫壁，和(ii)不受控制的向内生长来自绒毛膜绒毛的血管进入子宫壁。

[0217] PEDF通过直接影响细胞周期控制因子来控制许多不同细胞类型的细胞周期。PEDF的来源，即视网膜色素上皮细胞(RPE)，可能对神经视网膜的正常发育和功能至关重要。多种生物活性分子，包括生长因子，由RPE细胞合成和分泌。RPE在神经视网膜之前并与神经视网膜相邻，并且其作为血-视网膜屏障的一部分起作用。除了生长因子之外，RPE和视网膜之间也会交换营养素和代谢物。例如，RPE向视网膜供应众所周知的生长因子PDGF、FGF、TGFa和TGF。RPE提供的这些和其他未知因素很可能影响视网膜的组织、分化和正常功能。

[0218] 为了研究和确定由RPE分泌的推定的分化因子的作用，培养的细胞已经经历了从

人胎儿RPE细胞的培养物获得的视网膜提取物和条件培养基。例如,U.S.4,996,159公开了从RPE细胞回收的新血管生成抑制剂,其分子量约为57,000±3,000。类似地,U.S.1,700,691、4,477,435和4,670,257公开了视网膜提取物和这些提取物用于细胞再生和眼部疾病治疗的用途。此外,U.S.4,770,877和4,534,967描述了从牛玻璃体后部纯化的细胞增殖抑制剂。

[0219] 已经从人RPE中分离出PEDF作为50-kDa蛋白质。具体而言,PEDF已经被证明可以诱导人类Y79成视网膜细胞瘤细胞的分化,这是正常成视网膜细胞的肿瘤对应物。PEDF诱导的分化变化包括延伸一个复杂的神经突网络,神经元标记如神经元特异性烯醇化酶和神经丝蛋白的表达。这就是为什么RPE合成和分泌PEDF蛋白被认为会影响神经视网膜发育和分化的原因。此外,PEDF仅在未分化的人类视网膜细胞中高度表达,如Y79视网膜母细胞瘤细胞,但在其分化的对应物中缺失或下调。还有报道称PEDF mRNA在静止人胎儿W1成纤维细胞中以丰度表达,并且在其衰老对应物中不表达。

[0220] 进一步研究PEDF并检查其在治疗视网膜和中枢神经系统(CNS)的炎性、血管、退行性和营养不良性疾病中的潜在治疗用途需要获得大量的PEDF。遗憾的是,胎儿人眼中PEDF的低丰度以及其源组织的罕见可用性,尤其是在研究和治疗应用中限制使用胎儿组织的情况下,使PEDF的进一步研究有最多困难。因此,开发了一种重组技术来获得该因子的供应。参见U.S.5,840,686。

[0221] 基于蛋白质氨基酸序列,发现PEDF与serpin基因家族具有广泛的序列同源性,其成员是丝氨酸蛋白酶抑制剂。该家族的许多成员在羧基末端具有严格保守的结构域,其充当蛋白质的反应位点。这些蛋白质因此被认为是来源于共同的祖先基因。然而,发育调控在丝氨酸蛋白酶抑制剂基因家族成员之间差异很大,并且许多偏离了经典蛋白酶抑制活性。Becerra SP,Structure-function studies on PEDF.A noninhibitory serpin with neurotrophic activity。尽管PEDF与丝氨酸蛋白酶抑制剂具有序列同源性,但对cDNA序列的分析表明它缺乏保守结构域,因此可能不能作为经典蛋白酶抑制剂发挥功能。

[0222] PEDF的基因组测序和分析提供了内含子和外显子的序列以及约4kb的5'-上游序列。使用原位杂交和体细胞杂交小组的分析,已将PEDF的基因定位到17p13.1。这非常接近p53肿瘤抑制基因以及许多与p53基因产物中的突变无关的遗传性癌症的染色体定位,因此PEDF成为这些癌症的主要候选基因。

[0223] 虽然PEDF特别是由RPE细胞高度表达,但通过Northern和Western印迹分析可以在大多数组织、细胞类型、肿瘤等中检测到。例如在玻璃体和含水体液中很容易检测到。PEDF的亚细胞定位的重要问题也已得到解决。尽管大部分PEDF似乎是分泌的,但PEDF也与细胞核中的细胞骨架结构以及细胞核中的特定细胞骨架结构相关。重要的是,这取决于细胞的年龄和特定的细胞周期状态。例如,蛋白质似乎集中在灵长类动物RPE细胞的假肢的尖端,在附着的初始阶段与基质相互作用。不过后来这种染色消失了,蛋白质出现与特定的细胞骨架结构和细胞核相关。因此,似乎PEDF在细胞核和细胞质中都起着重要的细胞内作用。

[0224] 在分化的未分化的Y-79细胞中有PEDF表达,并且在它们的静止的,分化的对应物中表达很少或不表达。WI-38成纤维细胞中PEDF的合成限于年轻细胞中细胞周期的Go阶段。而且,在老年衰老细胞中,PEDF信使RNA不存在。在视网膜中,PEDF抑制Muller神经胶质细胞。由于Muller细胞类似于星形胶质细胞,所以PEDF在类似视网膜脱离、糖尿病、色素性视

网膜炎等状况中阻断胶质增生以及保留视网膜神经元的生命也同样有效。因此，施用GSH以改变细胞氧化还原电位，从而改变PEDF表达可能具有特殊价值。

[0225] 显然，在黄斑变性中，着色的RPE细胞变得有缺陷并死亡，导致黄斑中的PEDF功能性丧失。如果没有PEDF的持续存在，血管上皮细胞进行去分化并进入增殖阶段，导致新血管形成，伴随血管玻璃体侵入角膜。视网膜细胞产生的抑制性PEDF的量与氧浓度呈正相关。因此，PEDF被认为在局部缺血导致的视网膜新血管形成中起作用。事实上，研究表明，没有必要杀死RPE细胞来降低PEDF的可用性。PEDF的可用性对细胞的氧化还原电位敏感，在还原状态下更多可用，当细胞处于氧化状态时可用性更低。(缺血与细胞产生过量自由基的状态有关。这些可能是由于抗氧化剂耗尽、细胞死亡或凋亡或毒性代谢废物的积累)。这种适用于其他PEDF产生细胞的反馈调节因此在需要血流(相对氧化的氧化还原电位)的情况下诱导血管形成，同时保持适当的平衡并允许某些特定组织保持未血管化或具有高度控制的血管形成。据信PEDF的氧化控制处于翻译或翻译后水平，因为mRNA水平通常不变。注意到其他种类的生物活性剂通过转录修饰或敏感性对氧化还原状态作出响应。

[0226] 由于无法获得大量的PEDF以及给药困难，直接施用肽激素PEDF的努力难以成功。

[0227] GSH的临床使用

[0228] 在75克口服葡萄糖耐量试验和静脉葡萄糖耐量试验期间，十名糖耐量正常的老年患者和10名糖耐量异常(IGT)的老年患者在2hr内在基础条件下接受GSH输注，10mg/min，120min，总剂量为1,200mg。基础血浆总GSH水平对于正常组和IGT组基本相同，并且在基础条件下的GSH输注将GSH增加至相似水平。该研究表明GSH显著增强IGT患者的葡萄糖诱导的胰岛素分泌。对胰岛素清除率和作用没有影响。

[0229] 1,884mg或3,688mg静脉内浓注的抗高血压作用。在正常和轻度至中度的原发性高血压患者以及高血压和非高血压糖尿病患者(I型和II型)中研究GSH。1,844mg的给药。GSH使高血压患者和非高血压糖尿病患者在10分钟内收缩压和舒张压迅速显著下降，但在30分钟内恢复至基线，但对正常健康受试者无效。在3,699mg剂量时，不仅高血压受试者的血压降低，而且GSH也使正常受试者的血压值显著降低。发现以1,200mg/天向血液透析的慢性肾功能衰竭患者静脉内施用GSH，与基线相比，显著增加所研究的血液学参数(血细胞比容、血红蛋白、血细胞计数)，并有望逆转这些患者所见的贫血症。

[0230] GSH的毒理作用

[0231] 下表列出了通过各种给药途径报道的大鼠和小鼠中GSH的LD_{50}。GSH具有极低的毒性，并且由于必须由动物摄取GSH的纯粹质量以观察任何毒性效应，口服LD_{50}测量难以执行。

[0232] 小鼠数据显示GSH的以下LD_{50}：口服5,000mg/kg(Modern Pharmaceuticals of Japan,IV Edition,Tokyo,Japan Pharmaceutical,Medical and Dental Supply Exporters'Association,1972,p 93.)；腹膜内注射4,020mg/kg(Modern Pharmaceuticals of Japan,IV Edition,Tokyo,Japan Pharmaceutical,Medical and Dental Supply Exporters'Association,1972,p 93.)；腹膜内注射6,815mg/kg(Toxicology,vol.62,p.205,1990.)；皮下注射5,000mg/kg(Modern Pharmaceuticals of Japan,IV Edition,Tokyo,Japan Pharmaceutical,Medical and Dental Supply Exporters'Association,1972,p 93.)；静脉内注射2,238mg/kg(Japanese J.of Antibiotics,vol.38,p.137,1985.)；肌内注射4,000mg/kg(Modern Pharmaceuticals of Japan,III Edition,Tokyo,

Japan Pharmaceutical,Medical and Dental Supply Exporters'Association,1968,p 97.)。GSH可以是有毒的,特别是在抗坏血酸缺乏的情况下,并且这些效果可以在例如每天3.75mmol/kg(1,152mg/kg每日)以三个分剂量给予的抗坏血酸缺乏豚鼠中证实,而在非抗坏血酸缺乏动物中,在该剂量下未观察到毒性,但在该剂量的两倍处出现毒性。

[0233] GSH影响循环系统的许多方面,包括与一氧化氮信号传导、局部缺血以及对血管内皮的控制的相互作用。

[0234] 高剂量口服GSH在癌症患者中的应用

[0235] 在一项发表的研究中,8名肝细胞癌患者每天口服5克口服还原型GSH来治疗。由于无法忍受的副作用,两名患者在接受GSH后很快退出(胃肠刺激和硫磺气味)。其余患者,年龄在27-63岁,男性三名,女性三名,没有发生这种高剂量GSH的副作用,并继续服用5g口服GSH治疗119天(此时患者死于此病肿瘤)>820天(该患者在出版时仍然存活,并且仍然每天服用5g口服GSH;他的肿瘤没有进展,并且他的全身情况良好)。其中两名女性患者存活1年,肿瘤生长退化或停滞。其余两名男性患者在6个月内如预期的那样死亡。

[0236] 感染HIV的患者的经历

[0237] 由一组私人医生每日向一组46名AIDS患者提供含有3克还原型GSH的市售营养制剂,为期3个月。没有报道显著的GSH相关不良反应。没有报告有来自实验室研究或临床检查的毒性证据;然而,没有任何益处得到确凿的证明。

[0238] 从以上讨论可以明显看出,存在各种各样的病理变化和变性病症,其受到GSH水平和/或氧化型/还原型比率的影响,或基于所述水平或比率的次要影响。通常认为,在药物可接受范围内,如通过毒性范围所确定的,GSH水平的增加倾向于改善健康,并且低氧化型/还原型比率是有益的。因此,本发明主张给予全部受到老化和持续氧化损伤的健康人和如上所述患有病理的人的还原型GSH。如所示的,GSH本身可以以良好的生物利用度口服给药,因此这种给药方式是优选的。当然可能的是给予GSH的药学上可接受的衍生物或使用其他给药途径。同样,GSH可单独施用或与添加剂或协同组合物组合施用,或补充共同施用的药剂的毒性。

[0239] 有关使用GSH和其他SH-抗氧化剂的支持性文献)证明:(i)安全地立即进行辐射防护;(ii)安全地快速钝化硫芥子气;(iii)安全地立即修饰三种炭疽的外毒素,使得两种异种毒素中任一种的形成变得不可能并且毒素被抑制,由此阻止细胞进入和随后的细胞因子;(四)快速防护与脓毒症发生在天花疫苗接种、天花感染、烧伤和创伤等严重并发症之后。

[0240] 因此,GSH可用于对抗各种核生物和化学制剂,事实上其广泛的活性使其特别适用于抵御未知不明确威胁的"第一线"防御。其低毒性还允许在警戒或即将到来的威胁期间长期预防性使用。

[0241] GSH以制剂的形式提供,其使得这种否则困难的分子安全、稳定且生物可利用(80%在口服给药后1.5小时被吸收并且在细胞内在细胞内)并具有剂量响应性药代动力学。在针对无症状HIV阳性人群进行的第一阶段研究中,这种自然产生的物质(10克/24小时)的固有安全性得到FDA的抗病毒部门的肯定。

[0242] GSH有助于对抗和防止不寻常的微生物制剂、脓毒症、炭疽毒素、小痘苗接种并发症、天花以及携带白细胞介素4(IL-4)基因拷贝的基因工程天花(基于GSH抑制氧化应激;

GSH抑制过量的细胞因子产生;GSH抑制过量的前列腺素合成;GSH抑制宿主细胞中整合的前病毒DNA水平的病毒复制;GSH上调T辅助1响应模式和T辅助2下调响应模式,其中包括IL-4)。脓毒症死亡人数超过肺癌、乳腺癌、前列腺癌和结肠癌的总和,而且还会导致重症监护病房的非常费用;生物战微生物,如天花,由于脓毒症诱发的死亡。GSH在治疗放射性和化学伤害方面也很有用,并且可用于预防未来接触。

[0243] GSH对于治疗药学上欠缺的流行神经系统疾病也是有用的:阿尔茨海默症和帕金森病。

[0244] GSH可用于安全地中和有毒化学物质,如硫芥子气和放射性物质。支持性文献还表明,GSH有能力阻止炭疽毒素、天花疫苗接种并发症、天花感染和白细胞介素4(IL-4)增强的天花和其他“外来微生物”感染所导致的猖獗炎症的致死性“细胞因子风暴”。

[0245] 施用GSH的优选制剂和方法直接且快速补充身体的生物保护剂GSH的储存。这种物质的细胞浓度很容易受到许多因素的影响,包括年龄、糖尿病、吸烟、感染和暴露于毒素和放射性组合物。确保GSH水平保持在高浓度是必要的,以保护GSH,并且允许GSH在细胞中执行它的调控过程...它是细胞中最关键的生物化学物质...在其缺乏时,生命过程迅速停止。GSH可以很容易地部署,以帮助保护人们避免战时恐怖分子散布毒气、放射性物质和致命微生物。

[0246] 口服后约30分钟开始,细胞内GSH水平可恢复并增加。对于大多数可生存暴露来说,这完全在“治疗窗口”之内。口服GSH的安全系数较高,恢复性/增强性方案的高度可接受性(12个月为4至9克/天)使得可以使得第一反应者和特殊患者地面人员提前增强和维持高GSH水平成为可能。这些可用方案似乎是足够的,因为在人体中正常的产量是每24小时10克。没有显著的毒性。

[0247] 该药物优选作为稳定的药物GSH以粉末形式提供,其易于溶于任何方便的液体中。味道是良性和柑橘般的。粉末的保质期为2.5年。它也可以以更昂贵的封装剂型获得。

[0248] 该方案的易用性、安全性和高度可接受性使其在长期连续多年的治疗方案中治疗具有长期癌症风险的辐射幸存者是切实可行的。这些幸存者的癌症风险是辐射暴露后的主要考虑因素之一。GSH除了立即行动中和辐射引起的毒性自由基之外,还是一种重要的细胞调节剂,有助于控制几类基因,包括抑制癌基因等癌基因家族基因,促进癌细胞生长,以及促进癌症生长和扩散所需新血管生长的基因。GSH的这些长期性质被认为有助于降低癌症风险,并且可能为癌症治疗提供协同方法。

[0249] GSH是细胞中的主要生物保护物质。它与许多不属于的化学物质组合在一起,并将它们作为排泄物进行排放,例如硫芥或内在化的铀和钚。GSH是免疫系统生理学的一个组成部分;GSH的消耗损害了这种情况并且允许暴发性感染。GSH阻止了炭疽和脓毒症的分子病理学,如某些以强烈炎症为特征的病毒感染,如天花。GSH通过设置氧化还原电位来打开或关闭调控蛋白和基因。GSH与特定的酶(过氧化物酶和转移酶)配合使用,可以分解过氧化(腐臭)的有毒脂肪分子。这类有毒物质引起炎症和免疫抑制。GSH破坏线粒体中常规形成的过氧化氢(H_2O_2),细胞“熔炉”可有效地产生细胞功能。如果没有足够的GSH,线粒体会成为“刽子手”,并通过SH敏感孔(渗透性转换孔)泄漏细胞色素c和caspaces,从而诱导战略细胞中的非计划性凋亡性细胞死亡。维持线粒体的这种特性是治疗帕金森病和阿尔茨海默病的中心。GSH抑制过度生长因子和癌症中发现的血管生长因子的形成。GSH阻止转录因子(如NF

κB)的激活,转换疾病相关基因,如炎性疾病、脓毒症、感染和癌症。抑制NFκB有助于抑制硫芥子气、炭疽、脓毒症和天花的炎症。GSH对于清除组织中的碎片和微生物至关重要的吞噬细胞至关重要。巨噬细胞中的高GSH水平增强了局部组织对微生物的防御能力。这是使用GSH来对抗生物战中使用的微生物以及引起脓毒症的微生物的原因中的一个因素。

[0250] 在巨噬细胞、树突细胞和B型淋巴细胞的抗原加工过程中需要高GSH浓度,以维持T辅助细胞1(Th1)和Th2之间的生产平衡,这两者是相互关联的响应模式。GSH上调Th1并下调Th2响应模式。这与降低天花免疫的威胁生命的风险以及在抵抗IL-4增强病毒方面的潜在进口有关(例如,IL-4增强天花)

[0251] 设置氧化还原电位、分解脂质LOOH、中和ROS和RNS的GSH性质有助于保持NFκB转录因子家族无活性,并且离开核。NFκB家族的转录因子激活几组基因组序列,包括已被整合到感染的宿主细胞中的前病毒DNA序列(例如,HIV前病毒DNA已经在许多同行评审的出版物中成功地研究过;其他并入的病毒DNA序列,如天花的序列,可能与NFκB易位到核中以及随后的与前病毒DNA的激活结合具有相似的依赖性)。

[0252] GSH控制花生四烯酸代谢以及环加氧酶和脂氧合酶的产物。这些是促炎性的,刺激DNA合成并且也是免疫抑制性的。这就是为什么环加氧酶-2抑制剂(例如Vioxx)具有抗炎作用,同时也降低了癌症风险。

[0253] 本发明的一个方面提供了治疗天花感染的方法。虽然天花是一个可怕的灾祸,在20世纪已经造成5亿人死亡,但是分子病理机制已经确定,高剂量的GSH方案与这些机制形成了对比。涉及天花的主要器官是皮肤,大量溃疡痘病灶可能会被继发感染。这与感染三度烧伤的患者部分相似,该感染涵盖身体的80%-90%,除了天花更差之外,其炎症确保了巨噬细胞和白血细胞中真皮GSH和GSH的破坏。基本病理学类似于烧伤和脓毒症,但增加了大量的循环抗原,抗原抗体复合物和细胞因子。大多数细胞中的GSH水平在严重脓毒症和烧伤中不可测量。GSH损失在烧伤和脓毒症文献中是深刻的并且有据可查。“细胞因子风暴”表征一些病理学特征,并且通过用GSH灭活核因子κB(“NFκB”)来下调炎性细胞因子生成是可行的。这在以NFκB过度活化为特征的炎症情况下起作用。

[0254] GSH也可能阻碍天花病毒的复制,因为GSH促进了包括IL-12和干扰素γ(IFNγ)产生的T辅助1(“Th1”)应答模式.....人体最有效的抗病毒药物之一。已知GSH上调Th1应答,然后相互阻碍Th2应答,由此阻碍IL-4产生,Th2细胞因子可以钝化IFNγ产生并促进无节制的病毒复制。

[0255] 基本上,Rx GSH天花感染的高剂量治疗可能会削弱过量的NFκB激活,这将减少毒性炎性细胞因子的产生。此外,Rx GSH可促进Th1应答并上调IFNγ产生,这是一种有效的抗病毒药物。当Th1模式上调时,IL-4的相互下调是有帮助的,因为IL-4会干扰IFNγ。通过NFκB,GSH也可能具有抗病毒特性,这会阻碍天花病毒的复制,类似于Rx GSH显著抑制HIV从其前病毒DNA复制。痘病毒已经在啮齿类动物中用IL-4基因进行基因工程改造,并且可能也在天花病毒株中进行。在动物模型中,IL-4增强的痘病毒已被证明是致命的,尽管与特定的天然痘病毒相比成功的免疫接种。在这种“超级痘”病毒中,过量IL-4的病理结果是抑制IFNγ。Rx GSH可能能够克服这种分子病理。

[0256] 本发明的另一方面提供了一种设计用于帮助防止化学硫芥子气的方法,该硫芥子气是一种已经用于战争中的廉价易制备的危险物质,并且被认为是某些恐怖组织的“最

爱”。因此，根据本发明口服GSH可以恢复并提高细胞内的GSH水平，从而安全地帮助防止这种化学物质。由这种毒气引起的起泡并不是立竿见影的，由于其气味，其存在变得明显。因此，有时间口服GSH。它在30分钟内开始提高细胞水平，完全在“治疗窗口”内。

[0257] 本发明的另一方面提供了防止放射性分散体的方法。美国和日本和法国等国家严重依赖核能发电。事故、污染和浪费问题不断暴露在美国和全球的人们。在重大辐射暴露的情况下，GSH可以安全地用作多年疗法来降低癌症的风险，这是辐射幸存者的一个主要问题。

[0258] 本发明的另一方面提供了一种有助于控制炭疽感染的方法以及三种毒素的危险的滞留效应。这些蛋白质是三种蛋白质，并且这些蛋白质的特定组合必须化学形成，以便毒素渗透到细胞中，从而导致细胞产生巨大量的有害细胞因子。GSH具有防止穿透性毒素形成的能力，并且它具有通过其基因抑制功能减缓细胞因子产生的能力。由于外毒素，患者即使适当使用强力霉素和环丙沙星也会死亡。GSH可能会在这方面提供帮助。

[0259] 因为GSH被证明是安全的，并且是由身体产生的天然保护剂，所以它可以常规口服，每天在整个身体的所有细胞中提供始终如一的高水平；因此，急救人员和处于高风险状况的人员可以继续保持高GSH水平。没有毒性，并且大多数使用高剂量的人报告有积极的有益效果。GSH的健康益处非常广泛。基本上，让人们获得GSH的好处没有“缺点”。

[0260] 从最近的文献中已知，GSH合成在45岁后下降。在所有年龄段，都可能因过量的酒精、膳食脂肪、碳水化合物、烟草、阳光和有氧运动而被破坏。

[0261] 阿尔茨海默病被认为代表了细胞凋亡过程逐渐丧失的脑细胞，细胞凋亡是细胞分裂成碎片的一种形式。这个过程被认为是从线粒体即细胞的“发电厂”内的GSH消耗开始的。由于其能量需求高，一些脑细胞每个细胞有数百个线粒体。如果线粒体缺乏GSH，能量产生就会消失，此外，线粒体释放出高度破坏性的生物化学物质来启动细胞凋亡。该领域的医学科学家认为，脑中GSH的有效、安全的恢复可以钝化阿尔茨海默病的进展，特别是如果在早期检测和治疗的话。

[0262] 微血管病变也在痴呆中被描述，并且对永久的病理周期有贡献。H.B.Demopoulos及其同事首先通过扫描电子显微术定义了动物模型大脑中的微循环。Rx GSH通过保持内皮中的PGI2合成并确保血管一氧化氮(•NO)的理想生理特性来抵消这种类型的微血管病理。

[0263] 结合心理测量学的新方法(患者背诵的能力，逐字逐句，阅读段落的多少，以及其他标准化的短期记忆测试)和脑成像可以检测早期阿尔茨海默氏症，并且还绘制了这种疾病的进展情况。

[0264] 现代神经病学的这些进展使得用早期阿尔茨海默病患者进行临床试验成为可能，其具有安慰剂组和治疗组，是双盲且随机化的。可以按照两组进行比较并比较进展率以确定统计学显著性差异。据信，GSH可以代替并减慢或停止该过程，甚至允许患有与脑细胞进行性细胞凋亡相关的慢性痴呆的患者恢复一些功能。与进行性凋亡相关的其他慢性疾病也可以用GSH治疗。同样，GSH可用于治疗或预防导致脑和其他地方的细胞病理性凋亡的急性事件。优选的药物剂型是安全的、稳定的，吸收良好(从0.5小时开始并在1.5小时内达到70-80％)，并且容易分配到细胞中。

[0265] 帕金森病是一种GSH耗竭性疾病，发生在基底神经节的特殊脑细胞中，例如黑质。这些细胞产生强大的神经递质称为多巴胺。起始物质DOPA和导致多巴胺产生的生化途径充

满自由基反应，其消耗了相当多的抗氧化剂，包括抗坏血酸和GSH。虽然起始的病原体尚不清楚，但支持科学表明该病的发展和进展涉及GSH的不足。根据本发明，GSH水平被安全地恢复。

[0266] 对于所有GSH治疗方案来说，重要的一点是，身体中的所有细胞，特别是脑细胞，在它们的表面膜上都有活性GSH转运蛋白，它们会积极地从周围组织液中吸收GSH并将其泵入细胞中，从而产生细胞内的主要浓度增加。

[0267] GSH是口服生物可利用的，并且可以通过在空腹的大丸剂中施用药学上稳定的还原型GSH来提高效率。GSH有效地从粘膜吸收，特别是十二指肠的舌下粘膜和内腔以及回肠的初始部分。可以通过药理学施用GSH以改变生物体细胞内的氧化还原状态，从而改变氧化还原依赖性因子如NFκB和PEDF的表达。因此，例如，由于GSH(GSH)的生物可利用的施用，组织的氧化还原平衡将转向还原状态。特别是在具有高或异常高代谢需求的组织的情况下，其中自由基的产生过量。在那种情况下，药理学上施用的还原型GSH的存在将预期在改变细胞中的氧化还原平衡方面具有更大的影响。因此，相信外源性GSH的影响将特别见于处于缺血风险的那些组织附近。

[0268] 值得注意的是，GSH的作用不限于增加或维持PEDF的水平，而是GSH的作用可能作用于许多不同的组织和细胞功能。特别指出的是，GSH调节的氧化还原状态可以通过基因诱导、转录、翻译、翻译后或受体介导的作用，在多种因素上控制细胞功能。

[0269] 在PEDF的情况下，通过(a)减少新血管形成，(b)充当对细胞分化状态的影响，和(c)支持组织如神经元的正常功能，GSH的施用预期作为抗肿瘤治疗。特别指出的是，在这方面，GSH作为抗氧化剂和自由基清除剂的作用被认为是不同且独立的。

[0270] 在NFκB的情况下，GSH施用预期会阻止激活某些病毒复制(包括HIV)的级联。

[0271] GSH还可以缓解某些免疫和自身免疫性疾病，包括类风湿性关节炎，并改变糖皮质激素效应。

[0272] 据认为，神经元(或其前体细胞)的移植可治愈或缓解某些病状。例如，在帕金森病中，将特定的胎儿脑细胞移植入患者可以减轻或治愈与该疾病相关的某些问题。然而，移植细胞必须适当分化并保持分化，才能在功能上取代病理或死亡细胞。这涉及为具有适当生长因子和刺激的细胞创建和维持微环境。维持高浓度的还原GSH可以促进例如星形胶质细胞分泌PEDF，或协助基因修饰(转染)的星形胶质细胞产生高水平的PEDF，从而提供富含神经生长因子的环境。

[0273] 缺血再灌注损伤也是移植中特别关注的问题，对GSH含量较高的细胞进行预处理可以减少对细胞的自由基损伤以及二级氧化还原信使的水平。

[0274] 如本文所用，术语“药学上稳定的GSH”是指无基本环化而保持还原形式的GSH。这种稳定化可以通过加入一种或多种与GSH一起提供能够递送天然还原型GSH的药物制剂来实现。

[0275] 本发明还包括GSH和其他药理学试剂的新型组合以及新型剂型和给药方式。

[0276] 以较高浓度呈现为电荷转移复合物的药学上稳定的还原型GSH的口服给药可以在人体内产生显著的、可预测的细胞内GSH水平的增加。

[0277] 已经发现，在其他健康的HIV感染的人中，口服施用稳定的GSH后，外周血单核细胞(PBM)中的细胞内GSH水平显著增加。这是通过提供GSH制剂来实现的，该制剂确保递送足够

剂量的药学上稳定的还原型GSH,并在十二指肠之前快速溶解。施用该制剂以有效地在十二指肠中,即在空腹时提供高浓度的GSH以增强摄取。

[0278] 优选的制剂包含250mg或更多的还原型GSH与至少等摩尔的抗坏血酸,以实现三种功能:在制备、储存和摄取过程中充当牺牲性非特异性抗氧化剂;减少或中和GSH粉末的静电荷,使胶囊密实包装;并充当封装装置的润滑剂。抗坏血酸还保持酸性和还原性环境,其在药学上稳定GSH分子。据信抗坏血酸与GSH形成电荷偶联,增强了穿透细胞膜的渗透,并降低了γ-谷氨酰和甘氨酰残基呈环状构象或形成内环酰胺的倾向。因此抗坏血酸与溶液中的GSH复合以保持线性构象。这种线性构象进而又立体阻碍了游离的半胱氨酰硫醇基团。这种空间位阻稳定了可能形成的自由基,从而保持了GSH的生物活性。

[0279] 在某些条件下(例如中性至碱性pH)可能发生的环状GSH暴露SH部分,使其更具反应性。在碱性pH下,促进环状酰胺形成,留下潜在的有毒化合物。环状GSH组合物是可能抑制GSH还原酶、GSH过氧化物酶和特定GSH转运蛋白的潜在结构类似物。

[0280] 同样,氧化条件促进二硫化物形成(GSSG和Pr-S-S-G),这可能降低GSH的生物利用度并抵消GSH施用的一些潜在益处。此外,氧化条件还促进脱硫,导致眼酸形成(或其他化合物),其可能是有毒的或抑制有效的GSH吸收。

[0281] 因此,优选的口服制剂优选包含与稳定剂混合的有效量的GSH,所述稳定剂在这样的条件下施用,即在十二指肠后部的腔中达到的GSH浓度高于血浆GSH浓度,并且优选高于上皮内衬细胞的细胞间浓度。因此,例如,空腹服用GSH和抗坏血酸胶囊。还原剂,优选抗坏血酸,在包装和储存期间防止GSH的氧化,并且还可以在吸收之前将GSH稳定在十二指肠的相对碱性条件下。GSH的脱硫导致形成眼酸,GSH的丝氨酸类似物抑制GSH摄取。该方案与现有技术中的施用方法相反,后者在饭后直接服用GSH胶囊。通过用食物稀释GSH,降解酶被稀释并碱性条件被缓冲;然而,吸收的快速性允许仅有少量降解的高生物利用度。

[0282] GSH也可与另一种药物活性组合物组合,其中所述另一种组合物选自:易于氧化的组合物,抗氧化剂组合物,具有氧化剂作用的组合物,用于治疗病理学的组合物,所述组合物用于:抑制的总GSH水平,抑制的还原型GSH水平,生物体中相对氧化的条件,不受控制的自由基或氧化反应,或期望更多还原态的条件。

[0283] GSH可单独使用或与其他已知组合物组合用于治疗或减轻AIDS、HIV感染或逆转录病毒复制(例如HTLV I、HTLV-II、HTLV-III等)、疱疹病毒复制(例如,单纯疱疹I型、单纯疱疹II型、带状疱疹(水痘)、CMV、EBV、HHV-8等)、狂犬病、埃博拉病毒、流感病毒、CHF、冠状动脉疾病、冠状动脉再狭窄后状态、糖尿病、黄斑变性和/或肝炎(毒性或有感染性)。此外,某些神经系统疾病,如肌萎缩侧索硬化症、帕金森病、阿尔茨海默病等,也可能受益于抗氧化治疗。此外,许多药物疗法,特别是那些穿越血脑屏障的药物疗法,与氧化作用相关的副作用有关。其他药物如他莫昔芬与黄斑变性有关。因此,可以施用GSH以治疗病毒或某些细菌感染、慢性疾病、解毒药物,治疗或缓解氧化和脂质过氧化疾病,并减少氧化剂如超氧化物的长期作用,包括癌变和衰老。

[0284] 值得注意的是,在作为其病因的一部分的疾病的情况下,淀粉样蛋白疾病例如阿尔茨海默病等蛋白质的沉淀、培养基的氧化还原电位的改变可能对蛋白质溶解度具有显著影响。因此,随着培养基变得更加氧化,蛋白质通常会具有更多的二硫键,二者都定义了肽的二级结构,并可能与其他部分形成交联。另一方面,施用还原的GSH将导致还原环境,相应

地具有更多的游离SH基团。因此，预计GSH的给药将为这些疾病提供有效的治疗或部分治疗方案。还注意到，沉淀的肽可能参与自由基反应，其也将被GSH施用抵消。

[0285] GSH也可单独使用或与其他疗法组合用于治疗与自由基相关的神经疾病，例如阿尔茨海默病、帕金森病、儿茶酚胺毒性、其他自由基相关毒性、中风和短暂性缺血事件、脊髓损伤和其他创伤性神经组织损伤、外周神经病变、可能的朊病毒相关疾病、传染病病理学和炎症病理学，或降低用于治疗这些病症的药物的自由基相关毒性。

[0286] 支原体感染，如支原体肺炎，被认为是由于这些细胞内寄生虫在细胞内发生自由基反应而引起病理。因此，GSH可单独施用或与抗支原体抗生素联合用于治疗支原体感染。GSH也可能有益于预防或治疗由细胞壁缺乏或缺乏生物体引起的病理学，例如支原体或支原体样生物或L型细菌。

[0287] GSH也可用于增加或补充正常哺乳动物的GSH水平。这可能是期望的，例如，用于预防缺血事件，来自太阳的自由基损伤，化学物质或其他环境暴露，并降低癌症风险。

[0288] 事实上，由于生物体中的氧化条件通常是不合需要的，并且必要时产生氧化条件的机制通常摄取过多的抗氧化剂，所以大量的药物和药物适合于与GSH组合。但是，某些情况可能需要谨慎服用GSH。此外，某些癌症化疗方案依赖细胞自由基猝灭机制的消耗来选择性杀死靶细胞。最后，细胞凋亡或程序性细胞死亡依赖于细胞(线粒体)中GSH水平降低，导致死亡。在需要这种机制或生理学正确的情况下，外源性GSH的中断可能是不希望的。此外，GSH可以与一些组合物相互作用，或者非特异性地减少或与化学部分结合，或者在摄取后改变代谢;除非说明，这些影响可能是不可取的。

[0289] GSH可能有治疗男性不育症的功效。因此，谷胱甘肽可以弥补线粒体缺陷或缺陷。

[0290] 已知的抗HIV治疗，3'-叠氮胸苷(zidovudine® ，AZT)，作为有效的逆转录酶抑制剂。然而，这种药物会产生自由基，对线粒体有毒，并与肌病有关。因此GSH可与AZT联合使用以减少毒性，同时不干扰逆转录酶抑制活性，从而增加治疗指数。同样，GSH也可用于增加其他具有显著自由基相关毒性的药物的治疗指数。

[0291] 有许多认为与细胞内抗氧化剂水平降低有关的状况，包括AIDS、糖尿病、黄斑变性、充血性心力衰竭、血管疾病和冠状动脉再狭窄、疱疹病毒感染、毒性和传染性肝炎以及狂犬病。某些间质性肺病可能是由于GSH水平不足所致。此外，各种毒素和药物也可能导致自由基反应，包括癌症化疗的种类。因此，通过使用方便有效的GSH口服制剂，GSH的施用具有治疗这些疾病和病症的潜力。因此，外源性GSH的施用补充了肝脏产量以帮助维持生物体内的减少的条件。如上所述，不能猝灭自由基反应会导致不希望的级联反应，导致大分子损伤，脂质过氧化和毒性化合物的产生。维持足够的GSH水平对于阻断这些自由基反应是必要的。

[0292] GSH还具有与金属形成络合物的能力。例如，如上所述，GSH与镍、铅、镉、汞、钒和锰形成螯合物。GSH还与血浆中的铜形成循环复合物。GSH可用于治疗金属毒性。据信GSH-金属络合物将被排泄，从而减少金属负荷。因此，GSH可以用于治疗与铁、铜、镍、铅、镉、汞、钒、锰、钴、超铀金属如钚、铀、pol等有关的毒性。与EDTA相比，GSH具有降低螯合钙的趋势，提供了显著的优势。值得注意的是，GSH的螯合性质与抗氧化性能是分开的;然而，一些金属毒性是自由基介导的，例如铁，因此对于这些病症施用GSH是特别有利的。

[0293] 为了提供高生物利用度，已经发现希望在粘膜附近提供较高浓度的还原GSH，例如

用于口服给药的十二指肠。因此，与现有方法相比，GSH优选作为空腹单次推注施用。优选的剂量为约100-10,000mg GSH，更优选约250-3,000mg GSH。此外，GSH制剂优选用还原剂(抗氧化剂)稳定，优选抗坏血酸，以在吸收之前减少储存期间和消化道中的氧化。结晶抗坏血酸的使用具有降低GSH的静电荷以改善封装并用作封装设备的润滑剂的附加益处。然而，可以采用其他静电耗散方法或添加剂，并且可以采用其他抗氧化剂。优选的剂型是胶囊，例如两部分明胶胶囊，其保护GSH免受空气和湿气的影响，同时快速溶解在胃中。

[0294] 据信消化道具有特定的促进或主动的GSH转运载体，其允许从肠腔吸收GSH而不降解。通过提供高浓度梯度和避免转运抑制剂如眼酸的存在或产生，通过该机制的摄取被最大化。因此，口服给药的优选方法采用不同于使用现有方法施用的GSH以及大多数其他硫醇化合物的摄取机制。

[0295] 已经发现口腔粘膜可以快速有效地将GSH摄入血液中。与消化道相反，口腔粘膜中促进或主动转运机制的重要性被认为是低的；相反，认为口腔粘膜中高浓度的GSH允许GSH通过细胞或细胞周围被动转运到毛细血管循环中。因此，意图用于通过口腔粘膜吸收的组合物，例如舌下给药，优选具有高纯度，因为污染物可以与GSH类似地被吸收，并且作为相对小的不带电荷的分子被吸收。因此，所述组合物优选包含有助于维持GSH处于还原状态的抗坏血酸，维持口中有点酸性的环境以避免谷氨酸残基的去质子化，而基本上不会使所有的胺质子化。

[0296] 与其他科学家的报告相反，已发现GSH在胃中基本没有降解，因此GSH的释放不需要在胃中稀释或释放被延迟。事实上，GSH制剂优选释放并溶解在胃中。加入稳定剂，即抗坏血酸，进一步提高了GSH到达肠中未被降解的吸收位点的能力。一旦通过胃，重要的是GSH立即可用于吸收，因为来自胰腺的脱硫酶和肽酶以及pH的增加确实倾向于降解GSH。脱硫酶产生眼酸，干扰GSH吸收。因此，通过在十二指肠中提供高浓度的GSH而没有大量稀释，可以以最大速率吸收GSH。尽管十二指肠和回肠后部的GSH降解可能与吸收过程竞争，但本方法提供显著的生物利用度。事实上，研究表明口服GSH的生物利用度约为90％。

[0297] 该胶囊优选是双-0(00)尺寸的标准双部分硬明胶胶囊，其可以从许多来源获得。填充后，胶囊优选储存在氮气下，以减少储存过程中的氧化。胶囊优选根据美国专利号5,204,114的方法填充，使用结晶抗坏血酸作为抗静电剂和稳定剂。此外，每个胶囊优选含有500mg GSH和250mg结晶抗坏血酸。优选的组合物不包含其他赋形剂或填充剂；然而，可以添加其他相容的填料或赋形剂。尽管可以使用不同的GSH和稳定剂的量和比例，但是这些量是优选的，因为它们填充标准的双0胶囊，并提供有效的稳定化和高剂量。此外，避免添加已知高剂量GSH胶囊的组分碳酸钙，因为该组分中可能存在杂质。此外，碳酸钙充当碱，中和胃酸，其加速了小肠中GSH的降解。

[0298] 因为GSH和抗坏血酸以较高剂量施用，所以优选这些组分高度纯化，以消除可能使制剂不稳定或产生毒性作用或副作用的杂质、毒素或其他化学物质。如上所述，该制剂还可以包含各种类别的其他药剂。

[0299] GSH有利地在延长的时期内施用。因此，一组优选的有用组合包括GSH和旨在治疗在空腹吸收良好的慢性病症的药物，并且不具有不良相互作用或减少的或可变的组合吸收。

[0300] 一类特定的药物包括中枢或外周肾上腺素能或儿茶酚能激动剂或再摄取阻滞剂，

其可能产生许多毒性作用，包括神经毒性、心肌病和其他器官损伤。这些药物例如用作心脏、循环和肺部药物、麻醉剂和精神/抗精神病药物。其中一些药物也具有滥用潜力，如兴奋剂、致幻剂和其他类型的心理模拟药。其他与自由基起始有关的药物包括噻嗪、三环抗抑郁药、喹诺酮类抗生素、苯并二氮杂䓬类、乙酰胺苯酚和酒精。

[0301] 可以制备口服药物制剂，其包含约50mg至10g的量的GSH和能够在哺乳动物中引发自由基反应的有效量的药理学试剂。药理学试剂是例如肾上腺素能、多巴胺能、血清素能、组胺能、胆碱能、γ-氨基丁酸能、拟精神、醌、喹诺酮、三环和/或类固醇剂。

[0302] 肝GSH在许多药物的代谢、分解代谢和/或排泄中消耗。肝GSH的消耗可能导致肝损伤或中毒性肝炎。这样的药剂可以包括例如氨基糖苷类抗生素、对乙酰氨基酚、吗啡和其他阿片制剂。用于治疗高胆固醇血症的高剂量烟酸也与中毒性肝炎有关。可提供口服药物制剂，其包含量为约50-10,000mg的GSH，与消耗肝GSH储备的药理学试剂联合使用和有效量。

[0303] 许多病理状况导致肝损伤。进而，这种损伤减少了GSH的肝储备量和肝脏将氧化的GSH转化成其还原形式的能力。其他病理状况与GSH代谢受损相关。这些病症包括传染性和中毒性肝炎、肝硬化、肝原发和转移性癌、创伤性和医源性肝损伤或切除。可以提供包含GSH和抗病毒剂或抗肿瘤剂的药物制剂。抗病毒剂或抗肿瘤剂是例如核苷类似物。

[0304] GSH被分解，半胱氨酸可能在尿中排出。因此非常高剂量的GSH可能导致半胱氨酸结石导致的半胱氨酸尿症。其他长期毒性或不良反应可能会导致。因此，每日摄入量大于10克左右。长时间应该进行医学监测。另一方面，个别剂量低于约50mg。不足以将十二指肠腔的浓度提高到高水平以产生高水平的吸收，并且提供临床益处。因此，优选的制剂具有大于50mg的GSH含量，并且以一次或多次剂量提供总计高达约10,000mg/天。

[0305] 在HIV感染的治疗中，据信在空腹口服相对高剂量的GSH，即每天1-3克，将具有两种有益效果。首先，HIV感染与PBM、肺和其他组织中细胞内GSH水平的降低有关。进一步认为，通过增加细胞内GSH水平，这些细胞的功能可以恢复正常。因此，GSH的施用将治疗HIV感染的影响。因此，可以在口服制剂中提供GSH和抗坏血酸，任选地与抗逆转录病毒剂组合。注意到涉及逆转录病毒感染的转录机制和控制被认为在各种类型之间相对保守。因此，预期对各种类型的人类逆转录病毒和类似的动物逆转录病毒的晚期逆转录病毒抑制。

[0306] 其次，在体外试验中发现，通过将感染的单核细胞中的细胞内GSH水平提高到正常范围的高端，从这些细胞产生的HIV可能被抑制约35天。据信这与细胞因子(包括NFκB和TNFα)对细胞转录激活的干扰有关。因此，HIV感染者的传染性可能会降低，有助于防止传播。这种病毒载量的减少也可以允许体内未受感染但易感细胞的持续存在。

[0307] 根据本发明方法施用的GSH被认为在治疗充血性心力衰竭(CHF)中是有效的。在CHF中，认为有两个缺陷。首先，心肌减弱，导致心脏增大。其次，认为存在外周血管痉挛，导致外周阻力增加。GSH在增强一氧化氮的作用方面是有效的，因此认为通过减少血管收缩和外周血管阻力，同时增加组织的血流量，这些患者有益于这些患者。尽管亚硝基-GSH比血管舒张更有效地防止血小板聚集，但其仍然是一种比单独一氧化氮具有更长半衰期的强效血管舒张剂。此外，由于组织的相对缺氧与自由基介导的细胞损伤相关，因此GSH的存在也将有助于阻断这种损伤。例如，GSH可与以下药物一起口服施用：充血性心力衰竭，例如洋地黄糖苷、多巴胺、甲基多巴、苯氧苯扎明、多巴酚丁胺、特布他林、氨力农、异丙肾上腺素，β受体阻滞剂，钙通道阻滞剂，如维拉帕米、普萘洛尔、纳多洛尔、噻吗洛尔、吲哚洛尔、阿普洛尔、

奥布洛尔、索他洛尔、美托洛尔、阿替洛尔、醋丁洛尔、贝托洛尔、托来托尔、拉贝洛尔、地尔硫䓬、双嘧达莫、溴苯尼隆、苯妥英、奎尼丁、可乐定、普鲁卡因胺、乙酰卡尼、amiodarione、丙吡胺、恩卡胺、氟卡尼、劳卡尼、美西律、妥卡尼、卡托普利、米索地尔、硝苯地平、沙丁胺醇、帕吉林，血管舒张药，包括硝普钠、硝酸甘油、酚妥拉明、苯氧苯扎明、肼苯哒嗪、哌唑嗪、曲马唑嗪、妥拉苏林、曲马唑嗪、硝酸异山梨酯、赤藓酸四硝酸酯、阿司匹林、罂粟碱、环丙烯酸酯、异舒普林、烟酸、烟醇、布酚宁(nylidrin)，利尿剂，包括呋塞米、依他尼酸、螺内酯、氨苯蝶啶、阿米洛利、噻嗪、布美他尼、咖啡因、茶碱、尼古丁、卡托普利、沙拉宁和钾盐。

[0308] 已经发现高半胱氨酸水平作为血管疾病的显著风险，例如动脉粥样硬化、静脉血栓形成、心脏病发作和中风以及神经管缺陷和瘤形成。高胱氨酸促进自由基反应。在同型半胱氨酸代谢缺陷的患者中，血液中存在相对高水平的同型半胱氨酸。GSH可施用于高半胱氨酸水平升高的患者。

[0309] 据信由于肝细胞通过反馈抑制途径产生还原型GSH，所以肝细胞不能有效吸收血浆中的还原型GSH。因此，例如来自毒性或感染源对肝细胞的损伤(否则会抑制GSH产生)，将导致细胞损伤或死亡。事实上，本发明人相信，情况并非如此，至少在肝细胞受损的情况下。因此，各种类型的肝炎可用口服GSH治疗。例如，酒精和对乙酰氨基酚都具有肝毒性，并导致肝细胞GSH水平降低。因此，这些毒性可以用GSH治疗。GSH也可能有效治疗其他类型的毒性，对各种细胞或器官，导致自由基损伤细胞或降低GSH水平。肝炎也可能具有病毒病原学，GSH的使用可能与使用GSH治疗HIV感染的治疗相似。GSH可用来减少病毒基因的表达，以及减少由活性病毒复制引起的氧化攻击。GSH还可以减少病毒二硫键，降低病毒感染力。

[0310] 糖尿病，特别是不受控制的糖尿病，导致各种酶和蛋白质的糖基化，这可能损害其功能或控制。特别是，产生还原GSH的酶(例如GSH还原酶)变成糖基化和非功能性的。因此，糖尿病与GSH水平降低相关，事实上，许多糖尿病的继发症状可能归因于GSH代谢缺陷。GSH因此可以用于补充糖尿病患者以预防主要的继发性病理。包含GSH和抗高血糖剂的口服药物制剂也可以施用于需要这种治疗的患者。

[0311] GSH由于其强大的还原潜力而打破二硫键。据信大多数正常蛋白质在很大程度上没有由正常或超生理学水平的GSH变性。然而，据信阿片受体被高水平的GSH去活化。因此认为GSH给药可能对治疗肥胖症和/或进食障碍，其他成瘾性或强迫性障碍(包括烟草(尼古丁)和阿片类药物添加剂)有益。

[0312] GSH可以与尼古丁联合给药。尼古丁的生理效应是众所周知的。由于其血管舒张作用，GSH改善脑血流量，导致协同增强脑功能的作用。

[0313] 在哺乳动物中，血浆中GSH的水平相对较低，在微摩尔范围内，而细胞内水平通常在毫摩尔范围内。因此，细胞内胞质溶胶蛋白比细胞外蛋白受到高得多的GSH浓度。内质网是一种细胞器，参与处理从细胞中输出的蛋白质。已经发现内质网与胞质溶胶形成分离的细胞区室，与胞质溶胶相比具有相对氧化的状态，从而促进蛋白质中二硫键的形成，这对于正常活性通常是必需的。在许多病理状态下，可诱导细胞产生蛋白质用于从细胞中输出，并且由于干扰这些蛋白质的产生和输出而打断了病理学的进展。例如，许多病毒感染依赖于病毒蛋白的细胞生产以获得感染性。这些蛋白质产生的中断会干扰感染性。同样，某些病症涉及特定的细胞表面受体，它们必须存在且具有功能。在这两种情况下，诱导产生这些蛋白质的细胞都会消耗内质网中的还原型GSH。注意到消耗GSH的细胞会倾向于从血浆中吸收

GSH,并且可能受限于存在的量。因此,即使短暂地增加血浆GSH水平,内质网中的还原条件可能受到干扰,蛋白质产量受阻。正常细胞也可能受到某种干扰;然而,在病毒感染的细胞或异常刺激的细胞中,正常的调节机制可能不完整,并且内质网中的氧化还原条件受细胞外GSH的可用性控制。在这些情况下,GSH的药物施用可能产生显著的效果。

[0314] 作为DNA病毒的疱疹病毒的繁殖通过施用细胞外GSH而在细胞培养中被抑制或减少。疱疹病毒感染可以通过施用GSH来治疗。已知的疱疹病毒包括单纯疱疹病毒I型、单纯疱疹病毒II型、带状疱疹、巨细胞病毒、EB病毒以及许多其他已知病毒。

[0315] 也认为可以通过施用GSH来治疗狂犬病病毒(一种RNA病毒)的感染。虽然标准治疗是可用的,并且在及时施用时确实有效,但GSH在某些情况下可能是有用的。因此,至少部分可以治疗狂犬病病毒感染。一种可用于狂犬病的治疗是免疫血清。GSH可以与抗体例如单克隆抗体,人源化抗体或源自人或动物来源的供体抗体组合胃肠外施用。GSH也可以分开施用。

[0316] 高脂饮食会增加冠心病的风险,并且由于摄入抗氧化维生素(包括维生素E和维生素C)以及类黄酮而降低风险。高脂肪食物通过氧化应激损害内皮功能,导致一氧化氮可用性受损。已经发现维生素C和维生素E恢复了高脂肪餐后由内皮产生的一氧化氮产生的血管收缩。GSH可作为预防血管疾病的方式给药。

[0317] 在利用抗氧化剂作为先进的治疗方法时,随着时间推移已经开发了以下原理:不同的疾病在不同的环境中产生不同类型的自由基。因此,这些不同的自由基和相关化合物需要不同的特定抗氧化剂。最常见的物种和相关分子包括超氧化物,$\cdot O_2^-$;羟基,·OH;过氧的,·OH;过氧化氢,H_2O_2(分解成羟基);烷氧基,RO·;δ单线态氧,$^1O2$;一氧化氮,·NO;脂过氧化氢,LOOH(分解成烷氧基和羟基自由基)。参见Montagnier,Luc,Olivier,Rene,Pasquier,Catherine(Eds.),Oxidative Stress in Cancer,AIDS,and Neurodegenerative Diseases,Marcel Dekker,NY(1998)。

[0318] 除了几种自由基物质之间的质量差异之外,它们的形成速率也会不同,同样可能需要同时控制不同类型的煽动剂。例如,在黄斑变性中,持续的,无保护的眼睛暴露于强阳光和烟草烟雾将限制用作控制该疾病的治疗剂的抗氧化剂的益处。可通过全身或特定器官增加抗氧化剂水平以及减少氧化性,自由基产生和电离影响来向患者提供协同疗法。在这种情况下,如果需要,GSH治疗可以辅以防紫外线太阳镜和戒烟计划。用于与GSH组合的特别有利的抗氧化剂是α-生育酚琥珀酸酯。

[0319] 自由基发生在不同部位或组织和细胞的不同部位,具有不同的刺激剂。例如,在脑或脊髓创伤中,有害的自由基在脂肪(脂质)覆盖物中,它们隔绝神经纤维,髓鞘。非常高剂量的合成皮质类固醇,5到10克甲基泼尼松龙琥珀酸钠(MPSS),只给予24小时,迅速到达大脑和脊髓并迅速扩散到髓鞘中,中和创伤引起的自由基,具体为:·OH、·OOH和RO*。可以提供包含GSH和糖皮质激素药剂的组合的药物组合物。

[0320] 已显示TRX调节程序性细胞死亡(凋亡)的信号传导过程。TRX和其他硫醇化合物发挥针对各种氧化应激诱导的细胞毒性和细胞凋亡的保护性作用。例如,Fas和TNF-α依赖性细胞死亡可能经细胞内的和细胞外的TRX保护。氧化还原机制调控ICE(白细胞介素1b转换酶)家族蛋白酶(半胱氨酸蛋白酶)的活性,其中半胱氨酸残基在其参与细胞凋亡活性的位点。例如,胱天蛋白酶的重要成员胱天蛋白酶-3(CPP32)的活性被氧化剂显著抑制,该抑制

作用通过二硫苏糖醇或TRX抵消。相反，在暴露于二酰胺或过氧化氢时，几小时后观察到CPP32蛋白酶活性显著增加，这表明细胞内氧化还原状态通过调节胱天蛋白酶的活性显著调节凋亡的信号传导过程。许多转录因子和DNA结合蛋白受TRX的氧化还原调节，包括NFκB、AP-1、PEBP2/AML-1和p53。Junji Yodoi1,Shugo Ueda,Masaya Ueno,Tetsuro Sasada,and Hiroshi Masutani,Redox control of Thioredoxin(TRX)on the cytotoxic/death signal。

[0321] 超氧化物(O_2^-)是当氧被减少一个电子时获得的化合物。与超氧化物有关的氧化剂包括H_2O_2和烷基过氧化物、羟基自由基和其他活性氧化自由基、氧化卤素和halamines、单线态氧和过氧亚硝酸盐。这些分子被认为通过其的突变基因组的能力和动脉粥样硬化、通过其的氧化脂蛋白的能力参与了许多常见疾病的发病机制，包括恶性肿瘤。然而，对于宿主防御来说，氧化剂对于宿主防御是重要的，该氧化剂在正常细胞凋亡或程序性细胞死亡中以及在生物信号传导中用作杀微生物剂和杀寄生虫剂，该氧化剂的少量释放促使在酶和其他蛋白质的功能中的氧化还原介导的变化。一般认为宿主防御机制是由强烈效应介导的，而药理学抗氧化剂将无法克服该强大的氧化剂效应。另一方面，相信抗氧化剂药物可能在调节氧化还原介导的信号传导和生物学级联的早期步骤如凋亡中发挥重要作用。

[0322] 被公认的、发表的、被评议的文献已多次证明GSH在体内具有多种性能。GSH的丰富的生理和生化特性促使GSH作为前体施用的广泛的一系列临床试验，这是由于普遍认为GSH本身如果简单地作为GSH施用就不能被有效吸收。因此，相对无效且潜在破坏GSH前体的普及的N-乙酰半胱氨酸(NAC)目前在同性恋(高AIDS风险)团体中被滥用。进一步的理念是，GSH不会穿过淋巴细胞和其他细胞的膜，而NAC可以。该观点认为，利用GSH本身试图纠正GSH在HIV/AIDS方面的缺陷是一项没有希望的工作，因为它在被跨膜摄取前会被降解。然而，GSH的前体未能提高细胞内GSH水平。提供了用于口服施用GSH以获得高生物利用度和增加的细胞内GSH水平的适当方案。

[0323] 虽然之前的研究已经使用溶解于橙汁中的GSH向AIDS患者施用GSH，促使GSH被吸收，但该方法没有提供密封形式或丸剂形式的优点，并且没有认识到需要防止出现的稀释液消解或GSH衍生的杂质。

[0324] GSH也被证明是一种有效的抗病毒制剂，并且在不受其他现有药物、病毒mRNA转录影响的关键位点干扰HIV复制。GSH保持病毒DNA静止，特别是当存在有效活化剂时，如NFκB和TNF-α。GSH的抗病毒靶点似乎处于病毒不易发生突变的位置。HIV复制对活化的NFκB结合到其长末端的重复序列(LTR)上的依赖似乎对该病毒至关重要。

[0325] 口服施用的GSH可以安全地提高细胞水平，而不仅仅修正GSH缺陷。这些较高水平可以抑制许多病理过程，例如，缩减实质上自我延续的、强大的生化循环，该生化循环产生主要负责AIDS的体征和症状的腐蚀性自由基和毒性细胞因子。这些生化周期会破坏相当数量的GSH，但最终它们在持续的足够的GSH治疗的控制下正常化。典型实施例是从活化的巨噬细胞产生过量的物质15HPETE(15-氢过氧化二十碳四烯酸)。该15HPETE是一种破坏性的免疫抑制物质，其需要GSH将其转化为非破坏性的良性分子。问题是一旦巨噬细胞被活化，则它们很难正常化。

[0326] 一旦进入细胞，GSH缩减了自由基和细胞因子的产生，修正了淋巴细胞和巨噬细胞的功能障碍，增加了肺和其他器官中的防卫细胞，通过阻碍NFκB的活化来阻止病毒DNA的活

化从而阻止了所有主要感染细胞类型中的HIV复制,阻止了驱动病毒复制的HIV的TAT基因产物,分解了病毒外壳的通用120蛋白。这些通用120蛋白是对病毒的预测,通常允许它锁定到敏感的CD4+细胞上从而帮助病毒传播到未感染的CD4+细胞。通过破坏通用120蛋白,GSH提供了一种不仅可以防止患者传播给其他细胞还可能阻止传播给其他人的潜在的模式。

[0327] 除了经典的抗病毒或抗逆转录病毒药物(逆转录酶抑制剂,蛋白酶抑制剂)外,许多其他疗法可能对AIDS患者有益,例如将GSH与以下药物组合:环孢菌素A、沙利度胺、己酮可可碱、硒、去铁胺,2L-氧代噻唑烷,2L-氧代噻唑烷-4-羧酸酯、二乙基二硫代氨基甲酸盐(DDTC)、BHA,去甲二氢愈创木酸(NDGA)、葡糖二酸盐、EDTA、R-PIA、α-硫辛酸、槲皮素、鞣酸、2'-羟基查耳酮、2-羟基查耳酮、黄酮、α-当归内酯、秦皮素、姜黄色素、普罗布考和arcanut(槟榔儿茶酚)。

[0328] 炎症反应伴随着大量的氧爆作用,这导致大量的自由基。因此,GSH可用于治疗炎性疾病。GSH可以有利地减少主要损害以及次要反应的非期望方面。可将GSH施用于正患有炎性疾病的患者,例如关节炎、炎症性肠病等。可以提供组合药物疗法,其包括GSH和止痛剂或抗炎剂,例如阿片激动剂、糖皮质激素或非甾体抗炎药(NSAIDS),其包括鸦片麻醉剂、哌替啶、丙氧芬、纳布啡、喷他佐辛、丁丙诺啡、阿司匹林、吲哚美辛、二氟尼柳、对乙酰氨基酚、布洛芬、萘普生、非诺洛芬、吡罗昔康、舒林酸、托美丁、甲氯芬那酸、佐美酸、青霉胺、苯基丁氮酮、羟基保泰松、氯喹、羟氯喹、硫唑嘌呤、环磷酰胺、左旋咪唑、泼尼松、泼尼松龙、倍他米松、曲安西龙和甲基泼尼松龙。

[0329] GSH对于治疗腮腺炎、宫颈非典型性增生、阿尔茨海默病、帕金森病、氨基喹啉毒性、庆大霉素毒性、嘌呤霉素毒性、氨基糖苷肾毒性、对乙酰氨基酚、对乙酰氨基酚和非那西丁毒性也有益处。

[0330] GSH不需要经口服摄入以提供所述的有益效果。尽管该药物可以静脉内或肠胃外施用,但也可以经粘膜施用包括舌下施用,作为阴道栓剂或直肠栓剂,以及通过肺部吸入器以局部应用于肺泡的肺泡表面细胞,以增强肺部抵御不寻常的肺炎。全身施用GSH可用于在淋巴结和淋巴组织中浓缩GSH。

[0331] GSH在方案中趋于不稳定。因此,提供了一种药物施用装置,其具有双腔分配袋,该双腔分配袋具有易碎的相互连接体,这允许在水相和干GSH制剂之间的混合。所述水相可以是例如凝胶、乳膏或泡沫。如上所述,小袋也可以含有另一种药剂。

[0332] GSH施用器具可用于将有效剂量的GSH递送至粘膜附近,例如口腔、阴道、尿道或肛门腔。在箔袋或小袋中,例如在具有高表面积/单位体积比的脱水凝胶、基质或聚合物中,提供干燥的GSH制剂。脱水质量包括GSH,以及任选的稳定剂,诸如抗坏血酸。脱水物质被粘膜或外部使用液体水合,然后存在GSH以保护粘膜免受病毒感染。

[0333] GSH通过化学破坏结构性二硫键来化学分解HIV的通用120蛋白的能力表明,可能在一定程度上减少感染的传播。如果通用120被分解,病毒不能锁定CD4+细胞。治疗患者的口服GSH可能足以从治疗患者中分解通用120病毒。如果发生不安全的性行为,GSH对粘膜的局部施用可能有助于保护性伴侣。

[0334] 当将GSH或亚硝基-GSH置于男性尿道时可产生另一种效果。在这种情况下,该GSH或GSH衍生物被吸收。通过GSH与一氧化氮相互作用或直接提供GSH所形成的亚硝基-GSH的血管舒张作用,使阴茎血管扩张而导致勃起。因此,尿道GSH或亚硝基-GSH栓剂有治疗阳痿

的潜力。GSH或亚硝基-GSH也可用于治疗女性性功能障碍。将GSH或亚硝基-GSH直接应用于粘膜，例如作为乳膏或凝胶制剂，将导致勃起组织的局部血管舒张、润滑和充血。

[0335] 应注意的是，用于促进一氧化氮产生的各种药理学试剂，例如用于形成一氧化氮的底物，可以协同使用氨基酸精氨酸、血液中一氧化氮的稳定性或一氧化氮的作用。同样，作用于不同系统的药物，如中枢神经系统和外周血管系统，也可以协同使用。因此，GSH可以单独使用或组合使用以实现其对循环系统和血管组织的作用效果。

[0336] GSH或GSH衍生物也可与育亨宾(一种α-2受体阻断剂)共同施用，提供协同效应。育亨宾已被用于治疗男性性功能障碍(例如阳痿)以及具有其他效果。阿扑吗啡还可以与GSH协同治疗阳痿。值得注意的是，在许多情况下，女性性功能障碍可能与骨盆和生殖血管反应有关，特别是血管舒张，因此GSH单独使用或与其他血管活性物质或刺激神经活性物质组合可能有益于治疗男性和女性性功能障碍。

[0337] GSH可以以液体、凝胶、乳膏、果冻的形式被吸收到垫或海绵中而施用于粘膜。还可以通过提供粉末或悬液而施用。

[0338] 完整的、药学上稳定的、生物可利用的减少的L-GSH的有效递送已经完成。通过为身体的通常用途提供高剂量的GSH，具有任一种疾病形式的糖尿病患者可以获得充足的GSH。修正GSH缺陷并将细胞内的水平提高到正常范围的上限，将有助于延缓或预防糖尿病的并发症。GSH以适度高剂量口服给药，每天1至5克，可能会影响黄斑变性的结果。RPE细胞吸收GSH的活性表明它们可能在改善这种障碍中起关键作用。与视杆细胞和视维细胞不同，如果允许则RPE细胞可以自我分裂和自我补充。如果在早期阶段发现，则在视杆细胞和视维细胞明显损失之前，这种情况可能会停止并延迟。

[0339] 由于GSH相对无毒，因其的有利性能而可以广泛使用。可以将GSH添加到病毒污染流体或潜在污染的流体中以使病毒失去活性。例如，这通过减少核心病毒蛋白来进行。在输血前可将GSH加入血液或成分血。添加的GSH是其还原形式，并且是以约100mM-500mM的较低浓度或溶解度极限的浓度添加，并且更优选以约10-50mM的浓度添加。向全血、浓缩红细胞或其他形式的成分血(白血细胞、血小板)中添加GSH，可用于增加细胞或形成的组分的保质期和/或质量。

[0340] 还注意到可以使用其他药理学试剂来实现氧化还原平衡的改变或作为自由基清除剂使用。这些可以单独使用或组合使用。例如，GSH也可以结合其他抗氧化剂或氧化还原活性药物一起施用；优选的口服GSH制剂包括抗坏血酸(维生素C)。其他可接受的施用药剂包括α-生育酚，或者作为游离状态的抗氧化剂或者作为其作为维生素E前体的药学上可接受的酯。另外，α-硫辛酸被认为无毒，生物可利用的口服的且有效的抗氧化剂。由于GSH在维持细胞氧化平衡、在体内普遍存在以及高治疗指数方面发挥核心作用，GSH是最优选的药剂。已经解决了获得高效生物利用度的口服GSH的传统难题。

[0341] 本发明人已经开发并成功地临床测试了安全、稳定的生物可利用的口服GSH制剂。这一收获被认为并不可行，这是因为：高密度的分子电荷阻碍了跨膜运转；巯基存在一定的风险，如果存在过度氧化则可能发生脱硫作用，其结果是形成眼酸，这是一种阻断线粒体GSH转运蛋白的有毒性的结构类似物；一种普遍的观点认为，两个氨基肽键将立即被胃酸和/或胃和胰蛋白酶水解。

[0342] 施用GSH的优选制剂和方案：消散高密度的分子电荷而不改变GSH的结构或化学性

质;硫醇基团在化学上稳定,在制造、储存或患者长期持续使用分成两个等份剂量的每天0-75mg/kg剂量的期间没有氧化脱硫的证据;人胃部的胃酸不能水解氨基肽键,因为这种水解需要6N HCl并在110℃的温度下进行18小时;该GSH制剂在pH1.2下经受23小时的酸降解;GSH在胃和十二指肠中遇到的蛋白酶不会攻击这两个氨基肽键;这种类型的信息在过去对蛋白质起初的氨基酸序列很有帮助:例如,胰蛋白酶水解精氨酸和赖氨酸残基的羧基侧;糜蛋白酶对酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸的芳香族链的羧基侧是选择性的;如果所述残基具有芳族得或大的脂族侧链,则羧肽酶A水解羧基末端;GSH作为三肽,从大约Treitze韧带开始,在空肠上段的短段上被完全的吸收;并且,进一步进入小肠中,所述非特异性内肽酶将GSH水解为其的三种组分。

[0343] 早期的临床试验使用三个剂量1gm、2gm和3gm/天经过4周时间,其中两周为基准以及两周药物暴露,确定了无症状HIV(+)患者中的外周血单个核细胞中吸收和细胞内分布的药代动力学。每位患者进行了大约400次的GSH检测,包括24小时尿液样品。

[0344] 共进行了10,000次的GSH分析。该独立分析证实了剂量反应关系。GSH被摄入后30分钟开始被吸收并并在60分钟内分布于PBMC内。这项研究证实了安全性和良好的患者接受度,其中没有毒性证据。

[0345] 对已经用尽HAART组合治疗以及平均300,000个拷贝(HIV RNA PCR)和50个CD4+细胞/每立方毫米的晚期AIDS患者进行临床研究。该小组在3年内服用了两个等份的75mg/kg的剂量。遵循该治疗方案的四位患者在开始服用GSH后延长了3年的生存期。与上述四位患者几乎同时开始治疗的两个人,中途退出并在六个月内死亡。所述的四名患者没有恢复其任何程度的CD4+细胞计数。在第二年和第三年之间,GSH依从性开始失效。阶段1/II数据是基于经给予药物治疗方案的HIV阳性患者的外周血单核细胞(PBMC)的大约10,000个GSH的分析获得的。证实了剂量反应关系,并且对细胞内GSH不足的修正是显而易见的。

[0346] 因此,该技术的目的是为缺乏GSH、或患有消耗GSH的疾病或病症的人和动物提供有效的治疗。该治疗优选包括生物可利用的GSH的口服给药。GSH优选作为丸剂空腹施用,以产生高的胃内谷胱甘肽浓度,然后将其排入到十二指肠中,再传递到空肠后被有效地吸收。GSH优选为还原形式,作为抗坏血酸的电荷转移复合物的一部分,其增强了吸收和细胞摄取。GSH可用于治疗传染性疾病,诸如病毒、细菌和寄生虫(如疟疾)、化学和药物毒素、辐射照射、糖尿病以及与抑制(无论是由于减少生产或增加消耗)GSH有关的其他疾病。GSH也可用于45岁以上的人以恢复青春期的GSH水平。

[0347] 该技术提供了药学上可接受的谷胱甘肽制剂,其包含:至少100mg的粉末形式的还原型谷胱甘肽;至少50mg的粉末形式的结晶抗坏血酸,其以相对于还原型谷胱甘肽至少50重量%的量存在;所述还原型谷胱甘肽和结晶抗坏血酸各自在约25℃或更低的温度、约20%或更低的相对湿度下平衡;并且平衡的还原型谷胱甘肽和结晶抗坏血酸在干燥气体的冲洗下混合以获得均匀混合物,其中该均匀混合物具有摩擦静电以及还原型谷胱甘肽与结晶性抗坏血酸粒子之间的静电缔合。

[0348] 另一方面提供了药学上可接受的单位剂量型的谷胱甘肽制剂,其包含:至少100mg的颗粒状还原型谷胱甘肽;至少50mg的颗粒状抗坏血酸,其相对于还原型谷胱甘肽至少50重量%的量存在;胶囊,其适于含有至少250mg的还原型谷胱甘肽和抗坏血酸的静电结合的均匀混合物,其中还原型谷胱甘肽和抗坏血酸的比例约10-50重量%;所述还原型谷胱甘肽

和结晶抗坏血酸各自在低于约25℃的温度、约20％或更低的相对湿度下混合之前进行平衡;所述平衡的还原型谷胱甘肽和抗坏血酸在干燥气体的冲洗下混合以获得均匀的摩擦静电混合物,其中还原型谷胱甘肽和抗坏血酸颗粒静电结合,在干燥的氮气下包装。

[0349] 又一方面提供了配制药物谷胱甘肽的方法,该方法包括:提供颗粒形式的还原型谷胱甘肽,其在约25℃或更低的温度、约20％或更低的相对湿度下平衡;提供颗粒形式的结晶抗坏血酸,在约25℃或更低的温度、约20％或更低的相对湿度的空气下平衡;在干燥气体冲洗下混合大量的还原型谷胱甘肽和结晶抗坏血酸,所述结晶抗坏血酸粉末相对于还原型谷胱甘肽以至少50重量％的量存在,从而实现还原型谷胱甘肽和结晶抗坏血酸的摩擦静电,其中还原型谷胱甘肽的颗粒与结晶抗坏血酸的颗粒静电结合以形成具有中和净电荷的均匀混合物;并在缺氧的气体冲洗下包装该均匀混合物。

[0350] 可以通过生产设备中的HVAC系统来实现环境条件,所述生产设备持续除湿至小于约20％的RH(只要产品平衡至低水分含量,则允许超过该水平的一些偏差)和温度低于25℃,例如19-24℃。非常低的温度,例如低于冰点,则可能减少除湿量,这并不是优选的。

[0351] 该制剂可以包含至少250mg的还原型谷胱甘肽和至少125mg的结晶抗坏血酸,例如至少500mg的还原型谷胱甘肽和至少250mg的结晶抗坏血酸。所述还原型谷胱甘肽和结晶抗坏血酸可以在氮气、氩气或CO_2的冲洗下混合。氮气为常规和优选。优选地,所述冲洗不含氧(不含分子氧)减少氧化。所述制剂可以包含至少95重量％的还原型谷胱甘肽和结晶抗坏血酸。所述制剂可以包含至少75重量％的还原型谷胱甘肽和结晶抗坏血酸。所述制剂可以基本上由胶囊中的还原型谷胱甘肽和结晶抗坏血酸组成,并且具体地,在该实施方案中优选不包括氧化剂、催化剂和其他可能减少保质期的材料。该制剂还可以基本上由还原型谷胱甘肽、结晶抗坏血酸以及胶囊内的额外活性成分组成。

[0352] 混合物可包装在包含至少100mg的还原型谷胱甘肽和至少50mg的结晶抗坏血酸的包装中。该包装可包含单位剂型胶囊。该包装在胶囊中可含有约100-500mg之间的还原谷胱甘肽和约50-250mg之间的结晶抗坏血酸。所述产品包装内可能提供多个胶囊。该胶囊可包含至少500mg的还原型谷胱甘肽和至少250mg的结晶抗坏血酸。干气体冲洗可以包括氮气冲洗。所述均匀混合物可以包含至少95重量％的还原型谷胱甘肽和结晶抗坏血酸。该制剂基本上可不含任何的氧化剂成分。优选该制剂在制造时或者在保存期限结束之前提供给人,其基本没有硫醇气味。

[0353] 该制剂可以进一步包含抗病毒剂、抗生素剂、高血糖剂、抗氧化剂、促氧化剂、抗毒剂、一氧化氮前体、前列腺素前体、抗炎剂和免疫调节剂中的至少一种。

[0354] 优选实施方案详述

[0355] 实施例1GSH-抗坏血酸混合物的产生

[0356] 根据本发明的优选的GSH制剂提供了口服使用的胶囊,其含有500mg还原型L-GSH(Kyowa Hakko“Setria”®),250mg USP级结晶抗坏血酸,和不超过0.9mg硬脂酸镁,NF级在00型明胶胶囊中。粉末也可以包装成小包,例如每小包含有500mg至5g,更优选1-3g。优选的小包优选形成不透氧的屏障,以使GSH在标准温度和压力条件下保持基本上还原状态至少约2.5年。例如,金属化(例如铝化)的可热封聚合物膜包装可能是合适的。

[0357] GSH在干氮冲洗下在旋转混合器中与抗坏血酸混合。在制备之前,GSH应该在受控温度68-75°F(19-24℃)和湿度约小于20％的相对湿度(RH)的条件下储存,这在加工之前将

趋于与原料平衡。值得注意的是，高达30％的RH是可以忍受的，但应该通过除湿来主动控制，以便GSH原料在加工时具有足够低的含水量。同样，抗坏血酸晶体也优选在加工之前在低湿度下储存，以确保低湿度。这些干燥条件确保了在混合过程中谷胱甘肽和抗坏血酸上的高摩擦电荷的产生，导致干粉的电荷转移复合物，其确保了净电荷的一致中和以及颗粒在胶囊中的密集堆积，具有一致的填充。此外，因为GSH片被结晶抗坏血酸颗粒紧密包围，所以后者在加工和储存期间都有效地用作前者的牺牲性抗氧化剂。最后，谷胱甘肽的摩擦带电可能导致对氧化的敏感性增加。通过从混合器中排除氧气，GSH的活性氧自由基产物的形成减少，并且谷胱甘肽二聚体(GSSG)的形成得到支持。尽管要避免GSH的任何氧化，但是GSSG与GSH的ROS产物相比具有更低的毒性，并且确实已知GSSG被吸收并可被肝还原为GSH，尽管相对于GSH施用以代谢负荷增加为代价。GSH氧化的ROS产物通常是有毒的，应当避免，特别是当产物欲施用于需要还原型GSH治疗的动物或人时。

[0358] 根据现有技术，至少设施中的湿度没有被有效地降低到非常低的水平(例如，保持在20-55％ RH)，导致颗粒的摩擦带电发展不一致，并且因此混合颗粒的密度不一致，胶囊填充不一致，组分可能分离，以及在使用前在生产和储存过程中GSH不受氧化的保护不一致。因为GSH经历非特异性氧化成为眼酸——GSH的一种有毒的脱硫类似物，与抗坏血酸晶体颗粒没有紧密结合的GSH颗粒/片更容易氧化，并且会随着时间的推移而降解产物。

[0359] 此外，据认为在摄入之后和吸收过程中维持干混合物的电荷转移复合物；也就是说，随着胶囊溶解，水合作用产生谷胱甘肽和抗坏血酸的可溶性混合物，其作为缀合的抗衡离子在溶液中保持其紧密缔合。这进而又被认为是谷胱甘肽快速吸收和快速摄入细胞内的原因。在干粉中不存在这种电荷转移复合物时，GSH吸收不太快，因此更易经历胰脱硫酶对眼酸的酶促脱硫，导致GSH还原、毒性和吸收后摄取延迟。

[0360] 因此，实现了四种不同的效果：更长的保存期限，片状GSH粉末的更一致的包装，增强的吸收，和增强的细胞摄取。

[0361] 实施例2治疗方案

[0362] 根据本发明用GSH治疗人类的优选方案是根据实施例1，在两餐之间(空腹时)以每天1至10克，以两次分剂量施用包封的稳定的GSH。研究将GSH施用给HIV感染的、其他方面健康的18-65岁男性，其CD4+细胞计数高于500，未使用其他任何药物。在PBM细胞内GSH水平中观察到临床反应。因此，在以两个500mg胶囊施用1克包封的稳定化GSH后1小时，测得GSH增加3倍。值得注意的是，由于人体产生大量的GSH，在个别情况下外部GSH的作用有时可能被掩盖或甚至似乎是矛盾的。然而，统计分析显示了向受试者群体施用GSH的剂量响应效应。另外，显出了患者对序贯GSH剂量的响应。

[0363] 实施例3IND

[0364] 在压缩的I/II期临床试验(FDAIND#45012)中，在明确定义的GSH缺乏状态HIV感染中，根据实施例2的方案施用的根据实施例1的组合物被证明快速且安全地升高细胞内GSH水平2-3倍。因此，通过采用根据实施例2的方案施用的根据实施例1的组合物，口服药物已经显示出治疗已知推动一系列主要病症的GSH的关键损失。认为II期研究的受试者的GSH代谢，特别是药代动力学相对正常。因此，相同的方案可用于治疗其他病况，包括CHF、糖尿病、早期中风或其他缺血事件、毒性损伤、病毒感染或疾病，或自由基反应不受控制、异常或导致病理学的其他状况。

[0365] 实施例4GSH与对乙酰氨基酚的组合

[0366] 提供一种组合药物以改善对乙酰氨基酚的有害作用，对乙酰氨基酚是一种在代谢过程中消耗肝中的GSH的药物，并且在过量剂量下导致由于氧化损伤引起的肝损伤。该组合物包含500mg L-GSH、250mg结晶抗坏血酸和350mg对乙酰氨基酚。

[0367] 实施例5GSH与氯丙嗪的组合

[0368] 提供一种组合药物以改善氯丙嗪的有害作用，氯丙嗪是一种吩噻嗪药物，其引起副作用，包括迟发性运动障碍，可能与过量的自由基反应有关。该组合物包含500mg L-GSH、250mg结晶抗坏血酸和200mg氯丙嗪。

[0369] 实施例6GSH与氨基糖苷的组合

[0370] 提供一种组合药物以改善氨基糖苷类药物的有害作用，该氨基糖苷类药物包括但不限于新霉素、卡那霉素、阿米卡星、链霉素、庆大霉素、西索米星、奈替米星和妥布霉素(一种可能与各种毒性相关的药物类别)。这种损伤可能与氧化损伤或代谢过程中GSH的消耗有关。该组合物是静脉内制剂，包含有效量的氨基糖苷和约10-20mg/kg量的L-GSH。可以加入5-10mg/kg量的抗坏血酸作为稳定剂。

[0371] 实施例6血管疾病预防

[0372] 提供一种口服制剂用于预防血管疾病，例如在40岁以上的男性中。该组合物包含在00型明胶胶囊中的500mg还原型L-GSH、250mg USP级结晶抗坏血酸和50mg USP乙酰水杨酸(阿司匹林)。典型的施用是每天两次。有利的是，乙酰水杨酸可以以胶囊内的肠释放药丸的形式提供，从而减缓释放。

[0373] 实施例7血管疾病预防

[0374] 精氨酸是用于产生一氧化氮的正常起始底物。精氨酸通常供应有限，因此精氨酸的相对缺乏可能导致血管内皮功能受损。

[0375] 提供一种口服制剂用于预防血管疾病。该组合物包含在00型明胶胶囊中的500mg还原型L-GSH、200mg USP级结晶抗坏血酸和200mg精氨酸。

[0376] 实施例8血管疾病预防

[0377] 施用维生素E降低了心脏病发作和其他血管疾病的风险。维生素E琥珀酸酯(α-生育酚琥珀酸酯)是干粉。提供一种口服制剂用于预防血管疾病。该组合物包含在00型明胶胶囊中的500mg还原型L-GSH、200mg USP级结晶抗坏血酸和200mg维生素E琥珀酸酯。

[0378] 实施例9血管疾病预防

[0379] 非特异性酯酶存在于血浆中，具有广泛底物特异性。酯是在有用的联合疗法的药剂之间形成的，以提供有效的给药、高生物利用度和药物稳定性。优选的酯包括α生育酚-抗坏血酸酯、α生育酚-水杨酸酯和抗坏血酸基-水杨酸酯。生育酚酯保持分子处于还原状态，在酯裂解后允许完全抗氧化剂潜力。

[0380] 这些酯可以单独施用或与其他药剂例如GSH联合施用。通常，施用这些药物以递送有效剂量的水杨酸盐当量，对于炎性疾病的预防为为每天100mg，或对于炎性疾病的治疗为每个剂量750-1000mg。生育酚以100-500IU当量的量施用。抗坏血酸盐以至多1000mg当量的量施用。为了增强可用性，可以在制剂中提供非特异性酯酶以在胶囊溶解后切割酯。例如，可以包括细菌或酵母属(酵母)非特异性酯酶，例如酶或富含酶的制品，例如作为粉末或作为胶囊中的丸粒。

[0381] 实施例10血管疾病预防

[0382] 去甲二氢鸟苷酸(Nordihydroguaretic acid)是已知的脂氧合酶抑制剂。因此该组合物可用于治疗炎性过程或用作针对血管疾病的预防剂。

[0383] 提供一种口服制剂用于预防血管疾病。该组合物在00型明胶胶囊中包含500mg还原型L-GSH、200mgUSP级结晶抗坏血酸和100mg去甲二氢鸟苷酸。典型的施用是每天两次。

[0384] 实施例11预防

[0385] 将含有混合的2,500mg还原型L-GSH和750mg USP级抗坏血酸粉末的GSH小包每天两次口服施用至在其他方面健康的成年人。该粉末可以被舌下吸收,在空腹时作为大丸剂被吞咽,或者溶解在液体如水或橙汁中,并且在空腹时饮用。

[0386] 实施例12预防

[0387] 含有混合的1,000mg还原型L-GSH和500mg USP级抗坏血酸粉末的GSH小包以每天两次、每次1-2包口服施用至在其他方面健康的人类儿童。该粉末可以被舌下吸收,在空腹时作为大丸剂被吞咽,或者溶解在液体如水或橙汁中,并且在空腹时饮用。

[0388] 实施例13治疗

[0389] 将GSH空腹口服(如果耐受)或静脉内施用至急性暴露于辐射或放射性物质、生物战剂、化学战剂或患有脓毒症的受影响个体。剂量为每天5-20克,分剂量或定期或连续输注。

[0390] 实施例14治疗

[0391] 将GSH空腹口服施用至患有慢性神经疾病(包括但不限于阿尔茨海默病或帕金森病)的受影响患者。剂量为每天2-10克,以两次分剂量。

[0392] 应当理解,本文描述的优选实施方案和实施例仅用于说明的目的,而并非被解释为限制本发明的范围,本发明的范围仅在所附权利要求中适当地描述。本文的公开内容旨在单独考虑、组合考虑,并且以各种子组合和排列来考虑,并无限制,除非相互不兼容。

[0393] 本文引用的每篇参考文献都通过引用明确地以其全文并入本文。