

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 38/51

A61K 45/00 A61K 38/46

A61K 38/06 A61P 43/00

A61P 7/08 A61M 1/16

A61M 1/28



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00818720.7

[43] 公开日 2003 年 7 月 30 日

[11] 公开号 CN 1433320A

[22] 申请日 2000.12.15 [21] 申请号 00818720.7

[30] 优先权

[32] 1999.12.20 [33] JP [31] 360479/1999

[86] 国际申请 PCT/JP00/08911 2000.12.15

[87] 国际公布 WO01/45733 日 2001.6.28

[85] 进入国家阶段日期 2002.7.30

[71] 申请人 黑川清

地址 日本东京都

共同申请人 宫田敏男 学校法人东海大学

[72] 发明人 宫田敏男

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 黄益芬 巫肖南

权利要求书 1 页 说明书 17 页 附图 6 页

[54] 发明名称 羰基应激改良剂

[57] 摘要

本发明提供了羰基应激改良剂，其含有作为活性组分的具有乙二醛酶 I 活性的酶和羰基化合物还原剂。本发明的羰基应激改良剂快速消除羰基化合物，并因此缓解羰基诱导应激反应的疾病。

ISSN 1008-4274

- 1、一种羰基应激改良剂，包含作为活性组分的具有乙二醛酶 I 活性的酶和羰基化合物还原剂。
- 5 2、权利要求 1 的羰基应激改良剂，其中另外含有作为活性组分的具有乙二醛酶 II 活性的酶。
- 3、权利要求 1 的羰基应激改良剂，其中羰基化合物还原剂是还原性的谷胱甘肽和/或其衍生物。
- 4、权利要求 3 的羰基应激改良剂，其中介质中用于消除羰基化合物的还原性谷胱甘肽的最终浓度为 0.1-50mM。
- 10 5、权利要求 1 的羰基应激改良剂，其中羰基应激的改良是通过消除 2-羰基醛来完成的。
- 6、权利要求 5 的羰基应激改良剂，其中 2-羰基醛是选自乙二醛、甲基乙二醛和 3-脱氧葡萄糖醛酮的化合物。
- 15 7、权利要求 1 的羰基应激改良剂，其中具有乙二醛酶 I 活性的酶被固定在载体上。
- 8、一种消除羰基化合物的方法，它包括在羰基化合物还原剂存在下使权利要求 7 的载体与病人血液或腹膜透析液接触的步骤。
- 9、一种含有权利要求 1 的羰基应激改良剂的腹膜透析液。
- 20 10、一种改良腹膜透析液中羰基应激的方法，它包括在羰基化合物还原剂存在下使腹膜透析液与具有乙二醛酶 I 活性的酶接触的步骤。

羰基应激改良剂

5 技术领域

本发明涉及羰基应激改良剂。

背景技术

10 由于体内通过非酶生物化学反应产生的各种由糖或脂质衍生的羰基化合物增加而使蛋白质修饰处于增强状态，这被称作“羰基应激”(Miyata 等人, *Kidney Int.* 55:389-399, 1999; Miyata 等人, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 11:1744-1752, 2000)。已有报道说，这些羰基化合物因 Maillard 反应而与成年人疾病如糖尿病和动脉硬化以及衰老性疾病有关。所述 Maillard 反应是还原糖如葡萄糖和氨基酸或蛋白质之间的非酶促糖基化(glycation)反应。Maillard 在 1912
15 年报道了该反应，该反应集中在将氨基酸和还原糖组成的混合物加热时出现棕色着色现象(Maillard, L. C., *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 72:599, 1912)。Maillard 反应涉及棕色着色、产生芳族成分、味道、蛋白质变性和在食品加热或贮存过程中的所述这些反应。因此，该反应已主要在食品化学领域进行研究。

20 然而，在 1968 年在体内鉴定了糖基化血红蛋白(HbA1c)，这是血红蛋白的一种微量成分并且显示在糖尿病病人中该成分增加(Rahbar, S., *Clin. Chim. Acta*, 22:296, 1968)。这些发现引起了人们对体内 Maillard 反应意义以及该反应即成年人发病(如糖尿病并发症和动脉硬化)和衰老之间关系的关注。例如，在 Amadori 化合物形成反应期之后形成的后期产物吡咯啉(pyrraline)和戊糖定(pentosidine)(高度糖基化的最终产物；下文缩写为 AGE)被认为是衰老和糖
25 尿病的指标。事实上，不管存在或不存在高血糖现象，慢性肾衰病人的血和组织中都积聚了非常高浓度的高反应性羰基化合物和 AGE(Miyata, T.等人, *Kidney Int.*, 51: 1170-1181, 1997; Miyata, T.等人, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 7:1198-1206, 1996; Miyata, T.等人, *Kidney Int.*, 55: 389-399, 1999; Miyata, T.等人, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 9:2349-2356, 1998)。该积聚归因于肾衰时的羰基应激，其中当由糖和脂质衍生的羰基化合物与氨基反应时，作为 Maillard 反应的结果，
30 蛋白质被修饰(Miyata, T.等人, *Kidney Int.*, 55: 389-399, 1999)。最近，已报道

了透析淀粉样变性和动脉硬化的发病和病情发展中涉及羰基应激(Miyata 等人, J. Clin. Invest., 92: 1243-1252, 1993; Miyata 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 2353-2358, 1996; Miyata 等人, FEBS Lett., 437: 24-28, 1998; Miyata 等人, FEBS Lett., 445: 202-206, 1999)。因此确立了肾衰中羰基应激的病理生理学重要性。

因此,通过除去体内产生的羰基化合物改善羰基应激的状态可导致与肾衰有关的 AGE 形成的抑制作用,减少组织损伤和并发症。

而且,在腹膜透析过程中,将废弃物跨腹膜从血中排泄到腹膜透析液中。在肾衰病人的血中,具有高渗透压的腹膜透析液(包含葡萄糖、icodextrin、氨基酸等的透析液)中积聚了高反应性羰基化合物,它们通过腹膜进入腹膜腔中的腹膜透析液中。这导致腹膜透析液中羰基化合物的浓度增加,由此引起羰基应激状态。结果,由于羰基修饰了腹膜内的蛋白质,腹膜的功能降低;假设该反应接着又与除水能力削弱和腹膜硬化渐重期中有关(Miyata, T.等人, Kidney Int., 58: 425-435, 2000; Inagi R.等人, FEBS Lett., 463: 260-264, 1999; Ueda, Y.等人, Kidney Int. (in press); Combet, S.等人, J. Am. Soc. Nephrol., 11: 717-728, 2000)。

事实上,内皮和间皮免疫组织化学检查证明腹膜透析病人的腹膜内羰基应激状态是由腹膜透析液中所包含的葡萄糖诱导的(Yamada, K.等人, Clin. Nephrol., 42:356-361, 1994; Nakayama, M.等人, Kidney Int., 51: 182-186, 1997; Miyata, T.等人, Kidney Int., 58: 425-435, 2000; Inagi R.等人, FEBS Lett., 463: 260-264, 1999; Combet, S.等人, J. Am. Soc. Nephrol., 11: 717-728, 2000)。而且已揭示,腹膜透析液中所包含的甲基乙二醛作用于内皮和间皮细胞以促进产生血管内皮生长因子(VEGF),假设该因子是一种在削弱腹膜功能中发挥核心作用的一种物质(Combet 等人, J. Am. Soc. Nephrol., 11: 717-728, 2000; Inagi 等人, FEBS Let, 463: 260-264, 1999)。因此,也假设羰基应激引起伴发功能(除水能力)削弱的透析病人腹膜发生形态学改变。因此,本领域需要一种改善所述应激的方法。

最近已揭示了体内系统消除和代谢羰基化合物的机理。已报道在羰基化合物的消除中涉及许多酶和酶的路径,如醛糖还原酶、醛脱氢酶和乙二醛酶。这些羰基化合物消除系统的活性降低直接导致很多类型羰基化合物的浓度升高。氧化还原辅酶如谷胱甘肽(GSH)和 NAD(P)H 在所述路径中发挥重要的

作用(Thornalley P. J., *Endocrinol Metab* 3:149-166, 1996)。羰基化合物如甲基乙二醛和乙二醛与 GSH 的巯基进行非酶促反应并最后通过乙二醛酶代谢。NAD(P)H 激活谷胱甘肽还原酶, 增加 GSH 浓度。因此, 由细胞内氧化还原历程不平衡而引起的 GSH 和 NAD(P)H 减少阻断了羰基化合物消除系统并导致 AGE 积聚。事实上, 有报道说, 糖尿病病人的血 GSH 浓度降低, 而在这些病人中, 羰基化合物甲基乙二醛的浓度升高。

如上所述, 氧化还原辅酶如 GSH 和 NAD(P)H 的浓度降低被怀疑是 AGE 形成的原因, 因为羰基化合物的消除减少。因此建议, 通过升高巯基浓度来消除羰基应激。基于该理论, 本发明者尝试直接使用巯基化合物, 如 GSH 和半胱氨酸。事实上, 将正常人和糖尿病病人的血清通过加入这些巯基化合物进行孵育, 结果抑制 AGE 的产生。然而需要一个长周期来获得所述抑制作用, 这使得该方法不能实行。

此外, 已知 AGE 是通过在羰基化合物和蛋白质之间羰基-氨基化学反应产生的。因此结论是, 羰基应激可用那些能够通过化学方法捕获这些产物的化合物来消除。所述化合物包括含胍基的氨基胍(Brownlee M.等人, *Science* 232:1629-16332, 1986)和 2-亚异丙基脲-4-氧-噻唑烷-5-基乙酰苯胺(Nakamura S.等人, *Diabetes* 46: 895-899, 1997)。除了这些化合物外, 双胍如二甲双胍和丁二胍也能够捕获羰基化合物。体外试验证明, 所有这些化合物都能有效地捕获羰基化合物甲基乙二醛和乙二醛(Miyata T., *J. Am. Soc. Nephrol.* 11:1719-1725, 2000)。然而, 尽管这些化合物能有效地抑制 AGE 产生, 但这些化合物对羰基化合物的专一性低, 因为它们与所有类型的羰基化合物反应。结果, 这些化合物不仅捕获对活细胞有害的糖或脂质衍生的羰基化合物, 而且它们也捕获活细胞必需的羰基, 如吡哆醛。

为了解决上述问题, 本领域需要开发可迅速改善羰基应激和对糖或脂质衍生的有害羰基化合物有特异性的羰基应激改良剂。

将一种有害的羰基化合物甲基乙二醛转化为乳酸的体内系统是已知的。甲基乙二醛在由 GSH、乙二醛 I 和乙二醛 II 组成的乙二醛系统中转化为乳酸。也已知, 乙二醛酶 I 作用于除甲基乙二醛外的其他酮-醛化合物。然而, 尚不了解该系统的生理作用。此外, 以前尚未报道过利用该系统来改善活细胞中羰基应激的状态。

发明公开

本发明的目的是提供能够迅速消除羰基化合物的羰基应激改良剂。

本发明者广泛研究开发了一种有效的方法来消除和解毒溶解状态的羰基化合物，并集中于称作“乙二醛酶系统”的羰基化合物解毒系统。乙二醛酶系统是由两种酶，乙二醛酶 I(乳酰 GSH 裂合酶)和乙二醛酶 II(羟基酰基 GSH 水化酶(hydrase))组成的解毒反应系统。已知在 GSH 存在下，羰基化合物甲基乙二醛通过解毒反应转化为乳酸。

本发明者发现，通过另外将乙二醛酶 I 引入用谷胱甘肽捕获甲基乙二醛反应的反应溶液中，可迅速消除甲基乙二醛。最后，本发明者证明，在谷胱甘肽和乙二醛酶 I 存在下能迅速消除辅酶透析液中的其他羰基化合物以及甲基乙二醛。

更具体地说，本发明涉及羰基应激改良剂和如下使用所述改良剂的腹膜透析液：

(1). 一种羰基应激改良剂，它包含作为活性组分的且具有乙二醛酶 I 活性的酶和羰基化合物还原剂；

(2). (1)的羰基应激改良剂，它还包含作为活性组分的且具有乙二醛酶 II 活性的酶；

(3). (1)的羰基应激改良剂，其中所述羰基化合物还原剂是还原性谷胱甘肽和/或其衍生物；

(4). (3)的羰基应激改良剂，其中介质中用于消除羰基化合物的还原谷胱甘肽的最终浓度为 0.1:50mM；

(5). (1)的羰基应激改良剂，其中通过消除 2-氧醛来改善羰基应激反应；

(6). (5)的羰基应激改良剂，其中 2-氧醛是选自乙二醛、甲基乙二醛和 3-去氧葡萄糖酮醛的化合物；

(7). (1)的羰基应激改良剂，其中将具有乙二醛酶 I 活性的酶固定在载体上；

(8). 一种消除羰基化合物的方法，它包括将(7)的载体与病人的血或腹膜透析液在羰基化合物还原剂存在下接触的步骤；

(9). 一种腹膜透析液，它包含(1)的羰基应激改良剂；和

(10). 一种改善腹膜透析液中羰基应激的方法，它包括将腹膜透析液与具有乙二醛酶 I 活性的酶在羰基化合物还原剂存在下接触的步骤。

此外，本发明涉及用具有乙二醛酶 I 活性的酶和羰基化合物还原剂来制备羰基应激改良剂的用途。本发明也涉及用已固化了具有乙二醛酶 I 活性的酶的载体来制备羰基化合物吸收剂的用途。

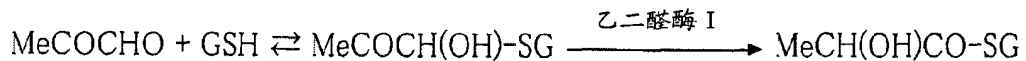
5 本发明羰基应激改良剂包含作为活性组分且具有乙二醛酶 I 活性的酶和羰基化合物还原剂。本文所使用的术语“改善羰基应激”是指在与活体接触的介质中消除羰基化合物，并因此减轻蛋白质修饰。“消除羰基化合物”是指不可逆地消除羰基的反应性。术语“与活体接触的介质”特指腹膜透析液(下文缩写为“CAPD 溶液”)、血和其他体液。

10 短语“可用于本发明的羰基化合物还原剂”是指一种化合物，它能够将羰基化合物还原为用作具有乙二醛酶 I 活性酶底物的化合物。只要满足上述要求，任意化合物都可用作本发明羰基化合物还原剂。例如，所述化合物包括还原谷胱甘肽(GSH)及其衍生物。这些化合物可以是其可药用盐。例如，还原 GSH 与羰基化合物甲基乙二醛结合产生半硫缩醛。该反应是非酶反应。由此产生的半硫缩醛用作具有乙二醛酶 I 活性的酶底物。此外，只要能够产生用作具有乙二醛酶 I 活性酶底物的羰基化合物，本发明可使用任何谷胱甘肽衍生物。更优选地，谷胱甘肽衍生物是那些具有巯基的化合物，其中所述巯基与羰基化合物反应产生巯基酯化合物。具体地说，例如，所述谷胱甘肽衍生物包括乙酰基谷胱甘肽、aspartathion、异谷胱甘肽等。

20 羰基化合物还原剂应该在能确保在反应中消除羰基化合物的浓度下使用。具体地说，例如当使用 GSH 来消除 CAPD 溶液中的羰基化合物时，在消除羰基化合物的介质(本文指 CAPD 溶液)中可使用最终浓度为 0.1-50mM，更优选 1-10mM 的 GSH。当 GSH 的浓度在该范围时，可在典型的 CAPD 溶液中，将羰基化合物接近完全并迅速地转化为具有乙二醛酶 I 活性的酶底物。然而，在透析过程中预测 CAPD 溶液中羰基化合物的量是困难的。因此，当怀疑病人羰基应激状态增强时，可使用保证有较高浓度的 GSH。

25 按照本发明，术语“具有乙二醛酶 I 活性的酶”是指具有相当于乙二醛酶 I 催化活性功能的酶。乙二醛酶 I 也称作乳酰 GSH 裂合酶(EC.4.4.1.5)，它利用其中羰基化合物还原剂，如还原谷胱甘肽，与酮-醛(2-氧醛)化合物的醛基连接的化合物作为酶底物。例如有代表性的乙二醛酶 I 的酶底物为半硫代半缩醛(半硫缩醛)，它是由与还原谷胱甘肽连接的甲基乙二醛组成的。具有乙二醛酶 I 活性的酶催化该反应，其中将所述酶底物转化为巯羧酸酯化合

物。只要在羰基化合物还原剂存在下，可将酮-醛化合物的醛基转化为羧酸酯，任何酶和还原剂都可以使用。酶反应图式如下：



5

反应式显示，具有乙二醛酶 I 活性的酶将由羰基化合物甲基乙二醛与 GSH 结合产生的半硫缩醛转化并解毒为 S-乳酰谷胱甘肽。该反应是不可逆反应。因此，无毒的 S-乳酰谷胱甘肽是稳定的并且基本上不进行产生甲基乙二醛的可逆反应。

10 本发明者发现，各种酶底物，包括在体内产生羰基应激状态的甲基乙二醛酶，都可以通过联合应用 GSH 和具有乙二醛酶 I 活性的酶而被迅速地消除，由此来支持所述组合作为羰基应激改良剂的可行性。

已知具有乙二醛酶 I 活性的酶是由如下各种途径衍生的：

15 哺乳动物组织(Methods Enzymol. 90, 536-541, 1982; Methods Enzymol. 90, 542-546, 1982); 酵母菌(FEBS Lett. 85, 275-276, 1978; Biochem. J. 183, 23-30, 1979); 细菌(Biochem. Biophys. Res. Commun., 141, 993-999, 1986); 和人(J. Biol. Chem. 268, 11217-11221, 1993)。

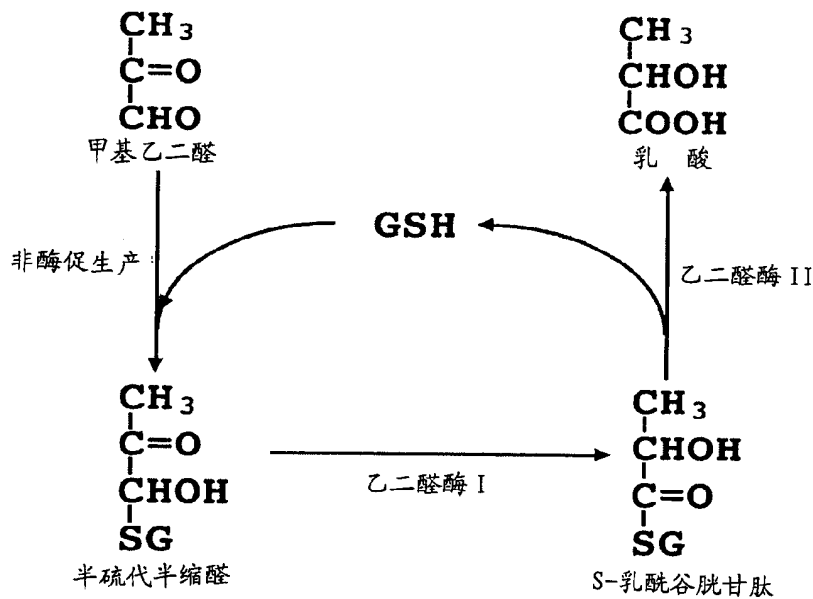
20 在这些酶中，当给人患者服用时，人的乙二醛酶 I 预期是安全的。纯化乙二醛酶 I 的方法是本领域公知的。本发明所使用具有乙二醛酶 I 活性的酶可以是天然酶或基因重组物。例如，人的乙二醛酶 I 基因的结构已被阐明(J. Biol. Chem. 268, 11217-11221, 1993)。因此，其重组蛋白质可以通过使用该已知的基因而很容易得到。此外，本发明具有乙二醛酶 I 活性的酶可以是(除了与天然酶具有相同氨基酸序列的那些酶)引入突变来改善其稳定性、活性等的酶。在氨基酸序列中人工引入突变的方法是本领域已知的。例如，按照位
25 点特异性诱变方法(Mark, D. F.等人 Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 81, 5662(1984))，利用编码所需突变氨基酸的合成的寡聚核苷酸引物，可部分地修改核苷酸序列的密码子。

30 除了使其氨基酸序列变异外，本发明具有乙二醛酶 I 活性的酶可进行化学修饰。例如，已知与聚乙二醇结合在某些情况下改善酶的稳定性。或者，将酶蛋白质固定在固相载体上的方法也通常用于酶蛋白质方便地回收。所述

化学修饰方法可适用于本发明具有乙二醛酶 I 活性的酶。

5 以确保迅速消除羰基化合物与羰基化合物还原剂之间反应所产生底物的浓度使用具有乙二醛酶 I 活性的酶。例如，当从 CAPD 溶液中消除羰基化合物时，通过每 1 升 CAPD 溶液用 $10-10^4$ U 乙二醛酶 I，优选 $10-10^3$ U 乙二醛酶 I 可达到迅速消除羰基化合物。1U 乙二醛酶 I 定义为在 1 分钟内从甲基乙二醛和还原谷胱甘肽中产生 $1\mu\text{mol}$ S-乳酰谷胱甘肽所需要的酶的量。

10 具有乙二醛酶 II 活性的酶也可配制成本发明羰基应激改良剂。乙二醛酶 II 是水解酶，也叫羟基酰基 GSH 水化酶(EC.3.1.2.6)。在体内，该酶催化产生乳酸的 S-D-乳酰谷胱甘肽(它是由乙二醛酶 I 的作用产生的)水解和还原谷胱甘肽的再生。由乙二醛酶 I、谷胱甘肽(GSH)和乙二醛酶 II 组成的乙二醛酶系统描述如下。



15 乙二醛酶 II，包括得自人的酶(J. Biol. Chem. 271, 319-323, 1996)也已被分离出来。本发明可使用任何已知的乙二醛酶 II。像具有乙二醛酶 I 活性的酶一样，本发明可使用具有乙二醛酶 II 活性的天然形式酶或基因重组酶。此外，本发明也可以使用在氨基酸序列中包含突变的酶。

当具有乙二醛酶 II 活性的酶与本发明羰基应激改良剂联合使用时，二

者可通过在使用前组合或在使用时接触来配制。此外，当具有乙二醛酶 I 活性的酶用作固定化酶时，具有乙二醛酶 II 活性的酶也可以以固定形式使用。可通过两种方法完成酶的固定：(1)可混合所述酶，然后固定在一起；或(2)分别固定所述酶，然后组合在一起。具有乙二醛酶 II 活性的酶优选地以确保迅速消除具有乙二醛酶 I 活性酶反应产物的浓度使用。具体地说，当使用 1U 乙二醛酶 I 时，具有乙二醛酶 II 活性的酶的量优选地为 0.5-10U，更优选 1-5U。1U 乙二醛酶 II 定义为在 1 分钟内从 S-D-乳酰谷胱甘肽中产生 1 μ mol 乳酸所需要的酶的量。

按照本发明，包含作为活体中产生羰基应激的基本结构羰基醛(R-CO-CHO)的羰基化合物可消除。例如，所述化合物包括对氧化应激有反应的肾衰病人血中积聚的化合物，有如下这些：

- 得自碳水化合物羰基化合物
- 乙二醛
- 甲基乙二醛
- 3-去氧葡萄糖酮醛。

本发明羰基应激改良剂可用于受羰基应激影响的活体。具体地说，例如，所述改良剂可通过非胃肠道给药或用到血透析液或腹膜透析液的环路中。或者，本发明羰基应激改良剂可在 CAPD 溶液之前加入。在该情况下，本发明羰基应激改良剂应该以无菌方式加到加热灭菌的 CAPD 溶液中。或者，本发明羰基应激改良剂也可以在使用时加入。

本发明羰基应激改良剂可以以无菌方式加入，包括将羰基应激改良剂以无菌方式填充到常规的多室容器中或预先填充到注射器中并在使用时混合。多室容器的实例为：所述室可以是连接的分馏袋容器；包含联通工具如双头针的试剂盒等等。多室容器的一个室填充腹膜透析液，而另一室填充本发明羰基应激改良剂。这两室在使用时连接。

为改善羰基应激状态，一种包括与 CAPD 溶液接触步骤的方法也是有效的。因此，CAPD 溶液包含固定化酶(具有本发明乙二醛酶 I 活性)和羰基化合物还原剂如还原 GSH；下文除另外说明外，术语“CAPD 溶液”是指包含羰基化合物还原剂的溶液。例如，用于腹膜透析的 CAPD 溶液在贮存过程中产生和积聚的羰基化合物可通过将该溶液放置在内表面固定具有乙二醛酶 I 活性酶的容器中或放置在包含固定在载体如珠子或纤维上的具有

乙二醛酶 I 活性酶的容器中来加以消除。在后一情况下，可通过过滤除去腹膜透析液中不溶性载体。

消除羰基化合物的药筒可通过将已固定具有乙二醛酶 I 活性酶的柱子中填充珠子形或纤维性载体来制备。CAPD 溶液可在与该药筒接触后引入腹膜腔。消除羰基化合物所需要的羰基化合物还原剂可在引入 CAPD 溶液前加入。如果在引入腹膜腔时接触了消除羰基化合物的药筒，在透析过程中积聚的由病人产生羰基化合物就不能除去，但是透析液中存在的那些可除去。或者，当通过在具有循环泵的封闭回路中循环腹膜透析液进行腹膜透析时，透析过程中腹膜腔中所积聚的羰基化合物可除去，同样腹膜透析液中的那些羰基化合物也可通过在回路中放置上述消除羰基化合物且包含固定羰基应力改良剂的药筒而除去。

当将具有乙二醛酶 II 活性的酶合并到本发明羰基应力改良剂中时，它可以先与具有乙二醛酶 I 活性的酶一起配制。或者，当使用固定化酶作为具有乙二醛酶 I 活性的酶时，则具有乙二醛酶 II 酶活性的酶也可以固定形式使用。具体地说，可以使用混合柱，该混合柱包含具有乙二醛酶 I 活性的酶和具有乙二醛酶 II 活性的酶，或者可将具有乙二醛酶 II 活性的酶顺流放置到具有乙二醛酶 I 活性的酶中。或者，可通过其中一种酶固定而另一种酶处于游离状态的一个系统来实现消除羰基化合物的目的。

本发明消除羰基化合物的方法可用于改善羰基应力的方法中，它包括将血、透析液和所述外界活体接触。在该方法中，最好将具有乙二醛酶 I 活性的酶进行固定。

按照本发明，对用于使具有乙二醛酶 I 活性的酶固定的载体来说没有特别的限制，只要该载体是对人无毒的并且是足够安全和稳定的以便于直接与血或透析液接触。例如，这样的物质包括合成的或天然的有机大分子化合物；无机物如玻璃珠、硅胶、氧化铝和活性炭；和用多糖、合成的聚合物等包衣的物质，等等。

例如，包含大分子化合物的载体包括聚甲基丙烯酸甲酯聚合物、聚丙烯腈聚合物、聚砜聚合物、乙烯基聚合物、聚烯烃聚合物、氟聚合物、聚酯聚合物、聚酰胺聚合物、聚酰亚胺聚合物、聚氨酯聚合物、聚丙烯酸聚合物、聚苯乙烯聚合物、聚酮聚合物、硅聚合物、纤维素聚合物、聚氨基葡萄糖聚合物等。更具体地说，载体的实例为多糖，如琼脂糖、纤维素、壳

多糖、壳聚糖、琼脂糖凝胶、葡萄糖等及其衍生物；聚酯、聚氯乙烯、聚苯乙烯、聚砜、聚醚砜、聚丙烯、聚乙烯醇、聚烯丙基醚砜、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、聚碳酸酯、乙酰化纤维素、聚丙烯腈、聚对苯二酸乙二酯、聚酰胺、硅树脂、氟树脂、聚氨酯、聚醚氨酯、聚丙烯酰胺及其衍生物等。大分子物质可单独使用或与两种或多种大分子联合使用。在后一情况下，将本发明具有乙二醛酶 I 活性的酶固定在至少一种大分子上。也可以将具有乙二醛酶 I 活性的酶单独固定在载体上，或与具有乙二醛酶 II 活性的酶联合固定在载体上。

按照本发明，对载体的形状没有限制。例如，所述载体可以是膜状的、纤维的、颗粒形的、中空纤维样的、无纺布样的、多孔的、蜂巢形的等。载体与血或腹膜透析液接触的面积可通过改变载体的厚度、表面积、直径、长度、形状和或大小来控制。

本发明具有乙二醛酶 I 活性的酶可利用已知的方法固定在上述载体上，所述方法如物理吸附、特异性生化结合反应、离子结合、共价键、接枝等。根据所需要的特定用途，可在载体和具有乙二醛酶 I 活性的酶之间插入间隔物。优选的是，将载体和具有乙二醛酶 I 活性的酶通过共价键结合使得所释放酶的量达到最小。利用载体上的官能团，通过共价键结合到具有乙二醛酶 I 活性的酶。例如，所述官能团包括羟基、氨基、醛基、羧基、巯基、甲硅烷醇基、酰胺基、环氧基、琥珀酰亚胺基等。然而，本发明官能团不限制与这些基团。共价键的实例为酯键、醚键、氨基键、酰胺键、硫化物键、亚氨基键、二硫化物键等。

固定了本发明具有乙二醛酶 I 活性酶的载体可通过常规灭菌方法灭菌。具体地说，灭菌方法包括 γ -射线照射、气体灭菌等。

固定了本发明具有乙二醛酶 I 活性酶的载体可以通过各种方式与血接触。其实例包括：通过将所采集的病人血注入血袋中消除病人血中羰基化合物的方法，其中所述血袋中装满了已固定具有乙二醛酶 I 活性酶的载体；血液在充满珠子或纤维等载体且固定了具有乙二醛酶 I 活性酶的药筒柱中循环的方法。代替全血，血浆也可以按照该方法处理。处理过的血也可以返回病人身体内，或者如果需要，可以贮存在血袋或类似容器中。在贮存中产生和/或积聚的羰基化合物也可以通过向血袋中加入固定了具有乙二醛酶 I 活性酶的载体来加以消除。

血、羧基化合物还原剂和固定了具有乙二醛酶 I 活性酶的载体之间的接触可在血纯化步骤进行，该步骤包括血透析、血过滤、血过滤透析、血吸附和血浆分离。

例如，血透析病人的血透析和消除羧基化合物两者可通过将固定了本
5 发明具有乙二醛酶 I 活性酶的载体放在血透析回路中同时进行，并且在羧基化合物还原剂存在下进行。因此，将本发明具有乙二醛酶 I 活性的酶优选地固定在血透析膜上。已知类型的透析膜可用作载体。其实例包括：纤维素衍生物如再生的纤维素和三乙酸纤维素；聚甲基丙烯酸甲酯；聚烯烃；聚砜；聚丙烯腈(PAN)；聚酰胺；聚酰亚胺；聚醚尼龙；硅；聚酯共聚物等；
10 然而，本发明对此没有限制。代替使用透析膜作为载体，甚至可将充满载体的柱子放入上述血透析回路中，其中所述载体上已固定了本发明具有乙二醛酶 I 活性的酶。通过在羧基化合物还原剂存在下，将病人的血与固定了具有乙二醛酶 I 活性酶的载体接来捕获血液中的羧基化合物，并消除了所述化合物对活体的伤害活性，使得化合物成为无毒的。可加入抗凝剂来
15 预防在体外循环过程中血凝固。例如，所述抗凝剂包括肝素、低分子量肝素、Futhan(Nafamostat mesilate)等。它们也可固定在载体上。

如果用于与血或透析液接触的本发明羧基应力改善剂的量太少，在透析过程中可能存在一些不能完全消除病人血中羧基化合物的情况。预先测定病人血中羧基化合物的量是特别困难的。因此，为了达到最好的效
20 果，有利的是在确保病人安全的范围内保持尽可能多起活性作用的羧基化合物改善剂。羧基应力改善剂的剂量可通过改变固定在载体上具有乙二醛酶 I 活性的酶的量或者已固定了具有乙二醛酶 I 活性酶的载体的量进行调节。

本发明调节应力改善剂可与生理上可接受的载体、赋形剂、稀释剂等
25 一起配制成通过非胃肠道给药的药物组合物。非胃肠道药物的剂型包括注射剂、滴剂等。术语“注射剂”包括皮下注射剂、肌肉注射剂、腹膜内注射剂等。

注射剂可通过将作为主要组分的羧基化合物还原剂和具有乙二醛酶 I 活性的酶与适宜的分散剂一起溶解，将所述物质与酶溶解或分散在分散介
30 质中来制备。根据所选择的分散剂类型，所述剂型可以是水溶液或油溶液。用于制备水溶液的分散介质包括蒸馏水、生理盐水、林格氏溶液等。各种

植物油、丙二醇等可用作制备油溶液的分散剂。另外，如果需要，也可以加入防腐剂如对羟基苯甲酸酯。也可以将已知的等渗剂如氯化钠和葡萄糖加入到注射剂中。而且，也可以将安慰剂如苯扎氯铵或盐酸普鲁卡因加到注射剂中。

- 5 本发明羰基应力改善剂的剂量根据给药方法的类型(剂型)和受试者的情况(体重、年龄、性别、症状等)选择。通常，在口服给药情况下，典型的给药剂量为 0.001-10mg，更优选 0.01-1mg/天/公斤体重(成人)来获得羰基应力的改善作用。可适当地选择给药次数，例如每天 1-5 次。

- 10 可通过监测血中羰基化合物或 AGE 的浓度来确定本发明羰基应力改善剂的作用。体内作用可通过比较对照组和已服用的本发明羰基应力改善剂组之间的血 AGE 浓度来估价。对照组可以是未处理组或用生理盐水或对照剂(由无主要组分即羰基应力改善剂的改善剂组成)的组。乙二醛(GO)、甲基乙二醛(MGO)、3-去氧葡萄糖醛酮(3DG)等也可以用作羰基化合物的指标。这些羰基化合物的浓度可以很容易地通过实施例中所显示的 HPLC 等方法测定(Ohnori S.等人, J. Chromatogra. 414:149-155, 1987; Yamada H., J. Biol. Chem. 269:20275-20280, 1994)。或者,羰基化合物的浓度可通过将它们与 2,4-二硝基苯基肼(2,4-DNPH)在酸性条件下反应并在 360nm 下测定有色反应产物的光学密度来测定。此外,pendosidine 等可用作 AGE 的指标。用反向 HPLC 确定 pendosidine 量的方法是本领域早已已知的(Miyata T 等人, J Am Soc Nephrol 7:1198-1206, 1996)。测定血或透析液中羰基化合物和 AGE 的浓度来评价本发明羰基应力改善剂在活体外的作用。

附图简述

- 25 图 1 描述谷胱甘肽对甲基乙二醛的捕获作用。横坐标表示反应时间(hr.);纵坐标表示甲基乙二醛的残留率(%),以反应前(0小时)的量为 100% 计算。

图 2 描述加入乙二醛酶 I 对消除甲基乙二醛的作用。横坐标表示乙二醛酶 I(单位/ml)的浓度;纵坐标表示甲基乙二醛的残留率(%),以不存在乙二醛酶时的量作为 100%计算。

- 30 图 3 描述加入乙二醛酶 I 对二羰基化合物的消除作用。

图 4 描述在三种二羰基化合物的混合溶液中谷胱甘肽对二羰基化合物

的捕获作用。上端图为乙二醛；中间图为甲基乙二醛；下端图为 3-脱氧葡萄糖醛酮。

图 5 描述在含有三种二羰基化合物之一的溶液中谷胱甘肽对二羰基化合物的捕获作用。上端图为乙二醛；中间图为甲基乙二醛；下端图为 3-脱氧葡萄糖醛酮。

图 6 描述在三种二羰基化合物的混合溶液中加入的乙二醛酶 I 对二羰基化合物的消除作用。横坐标表示乙二醛酶 I(单位/ml)的浓度；纵坐标表示二羰基化合物的残留率(%), 以不存在乙二醛酶时的量作为 100%计算。

10 本发明的最佳实施方式
参照下列实施例详细说明本发明。

实施例 1

谷胱甘肽在甲基乙二醛溶液中对甲基乙二醛的捕获作用

(1) 实验方法

15 将含有甲基乙二醛的 PBS(-)溶液和含有谷胱甘肽的 PBS(-)溶液(pH7.4)合并来制备含有 400 μ M 甲基乙二醛和 0、1、2、4、或 8mM 谷胱甘肽的溶液。这些溶液在 37 $^{\circ}$ C 温度下保温。在 0、2、4、8 和 24 小时后取样；并且将 40 μ l 的 2M 高氯酸盐、40 μ l 的 1% 邻苯二胺和 100 μ l 的 200 μ M 乙二醛加到 100 μ l 的每个取出的样品中。搅拌混合物然后在 25 $^{\circ}$ C 下保温 1 小时。分
20 离由甲基乙二醛和邻苯二胺反应产生的喹啉衍生物并按 Ohmori 等人的方法(Ohmori, S.等人, J. Chromatogr. 414:149-155, 1987)使用反相柱进行 HPLC 定量。

(2) 实验结果

25 谷胱甘肽捕获的甲基乙二醛取决于谷胱甘肽的浓度和在 37 $^{\circ}$ C 温度下保温的时间(图 1)。

实施例 2

在谷胱甘肽和乙二醛 I 存在下甲基乙二醛

从甲基乙二醛溶液中的消除作用

(1) 实验方法

30 制备 PBS(-)溶液, 其中甲基乙二醛浓度为 400 μ M, 谷胱甘肽浓度为 4mM

并且具有乙二醛酶 I 活性的酶的浓度分别为 8、16、40 和 80 单位/ml。溶液在 37℃ 温度下保温。由酵母衍生的商购酶(Sigma)被用作乙二醛酶 I。在 1 小时后取样, 然后采用与实施例 1 相同的方法定量甲基乙二醛。

(2) 实验结果

- 5 加入乙二醛酶 I 使大约 99% 的甲基乙二醛消除(图 2)。表明加入乙二醛酶 I 促进甲基乙二醛的消除。

实施例 3

在谷胱甘肽和乙二醛酶 I 存在下二羰基化合物

10 从 CAPD 溶液中的消除

(1) 实验方法

将谷胱甘肽和乙二醛(与实施例 2 相同)加到 CAPD 溶液(Baxter Ltd.; PD-4, 1.5)来制备含有 0、1 或 4mM 谷胱甘肽和 0、1.3 或 5.2 单位/ml 乙二醛酶 I 的溶液。溶液在 37℃ 温度下保温。在 1 小时后取样; 将 40μl 的 2M 高氯酸盐、40μl 的 1% 邻苯二胺和 100μl 的 20μM 2,3-丁二酮加到 100μl 的每个取出样品的等份试样中。搅拌混合物然后在 25℃ 下保温 1 小时。分离由邻苯二胺和 3-脱氧葡萄糖醛酮、乙二醛或甲基乙二醛之间反应产生的喹啉衍生物并按 Ohmori 等人的方法(Ohmori, S.等人, J. Chromatogr. 414:149-155, 1987)使用反相柱进行 HPLC 定量。

20 (2) 实验结果

通过加入乙二醛酶 I 和谷胱甘肽, 可从 CAPD 溶液中消除二羰基化合物如 3-脱氧葡萄糖醛酮、乙二醛和甲基乙二醛(图 3)。因此, 通过加入乙二醛酶 I 和谷胱甘肽可有效地从 CAPD 溶液中消除二羰基化合物。

25 实施例 4

在含有二羰基化合物的混合溶液中

谷胱甘肽对二羰基化合物的捕获作用

(1) 实验方法

30 制备 PBS(-)溶液(pH7.4), 其中乙二醛、甲基乙二醛和 3-脱氧葡萄糖醛酮的浓度均为 200μM, 谷胱甘肽的浓度是 0、0.5、1 或 5mM, 并且乙二醛酶 I 的浓度为 0、0.05、0.1、0.5、1 或 2 单位/ml。将这些溶液在 37℃ 温度下

保温 1 小时。将 40 μ l 的 2M 高氯酸盐、40 μ l 的 1% 邻苯二胺和 100 μ l 的 50 μ M 2,3-丁二酮作为内标加到 100 μ l 的每个样品的等份试样中。搅拌混合物并在 25 $^{\circ}$ C 下保温 1 小时。分离由邻苯二胺和乙二醛之间反应产生的喹啉衍生物并按 Ohmori 等人的方法(Ohmori, S.等人, J. Chromatogr. 414:149-155, 1987)

5 使用反相柱进行 HPLC 定量。

(2) 实验结果

将乙二醛酶 I 加到二羰基化合物(即乙二醛、甲基乙二醛和 3-脱氧葡萄糖醛酮)的混合溶液和含有谷胱甘肽的溶液中, 观察到二羰基化合物的浓度降低。而且, 随着谷胱甘肽和乙二醛酶 I 浓度的增加, 二羰基化合物的消除速率增加(图 4)。在三种二羰基化合物的混合溶液中, 反应活性较低的二羰基化合物 3-脱氧葡萄糖醛酮的消除减少。这可能由同时存在的反应活性高的二羰基化合物甲基乙二醛所导致。因此, 使用分别含有各个二羰基化合物的溶液进行类似的实验。

15

实施例 5

在分别含有各个二羰基化合物的溶液中

谷胱甘肽对二羰基化合物的捕获作用

(1) 实验方法

制备 PBS(-)溶液(pH7.4), 其中乙二醛浓度为 100 μ M, 谷胱甘肽的浓度是 0、0.1、1 或 10mM, 并且乙二醛酶 I 的浓度为 0、0.01、0.1、1 或 10 单位/ml。溶液在 37 $^{\circ}$ C 温度下保温 1 小时。将 40 μ l 的 2M 高氯酸盐、40 μ l 的 1% 邻苯二胺和 100 μ l 的 50 μ M 2,3-丁二酮作为内标加到 100 μ l 的每个样品的等份试样中; 搅拌混合物并在 25 $^{\circ}$ C 下保温 1 小时。分离由邻苯二胺和乙二醛之间反应产生的喹啉衍生物并按 Ohmori 等人的方法(Ohmori, S.等人, J. Chromatogr. 414:149-155, 1987)使用反相柱进行 HPLC 定量。以相同方法用甲基乙二醛和 3-脱氧葡萄糖醛酮代替乙二醛进行实验。

25

(2) 实验结果

将乙二醛酶 I 加到含有乙二醛、甲基乙二醛或 3-脱氧葡萄糖醛酮的溶液中并加到含有谷胱甘肽的溶液中降低了二羰基化合物的浓度。而且, 随着谷胱甘肽和乙二醛酶浓度的增加, 二羰基化合物的消除速率增加(图 5)。单独保温各个化合物时每个羰基化合物的消除速率比合并的反应溶液更快。

30

所以，假定反应活性最高的羰基化合物(即毒性最高的)甲基乙二醛首先消除，那么三种羰基化合物中反应活性比甲基乙二醛低的其他化合物依次从混合溶液中消除。

5

实施例 6

在 CAPD 液体中谷胱甘肽对二羰基化合物的捕获作用

(1) 实验方法

将谷胱甘肽和乙二醛酶 I 加到从选定的腹膜透析病人中收集的 CAPD 液体(来自 Baxter Ltd.的 PD-4, 1.5; 在腹膜腔中停留时间 1 小时)来制备含有
10 5mM 浓度谷胱甘肽和 0、5、10 或 20 单位/ml 浓度乙二醛酶 I 的溶液。将该溶液在 37℃ 温度下保温 1 小时。1 小时后取样。将 40μl 的 2M 高氯酸盐、
40μl 的 1% 邻苯二胺和 100μl 的 20μM 2,3-丁二酮作为内标加到 100μl 的每个样品的等份试样中; 搅拌混合物并在 25℃ 下保温 1 小时。分离由邻苯二
胺和 3-脱氧葡萄糖醛酮、乙二醛或甲基乙二醛之间反应产生的喹啉衍生物
15 并按 Ohmori 等人的方法(Ohmori, S.等人, J. Chromatogr. 414:149-155, 1987) 使用反相柱进行 HPLC 定量。

(2) 实验结果

乙二醛酶 I 和谷胱甘肽加到 CAPD 液体中之后，二羰基化合物如 3-脱
氧葡萄糖醛酮、乙二醛和甲基乙二醛的浓度降低(图 6)。所以，证实了加入乙
20 二醛酶 I 和谷胱甘肽可以从 CAPD 病人的腹腔 CAPD 溶液中消除二羰基化
合物。

工业实用性

根据本发明，通过本发明的羰基应力改良剂可以实现对羰基化合物的
25 快速消除。所述的改良剂不仅对于甲基乙二醛的消除有效，而且对其他主
要的羰基化合物包括 3-脱氧葡萄糖醛酮和乙二醛也有效。具体来说，本发明
的意义在于证实了快速消除引起活体羰基应力的主要羰基化合物的可能性
并能够将其用作羰基应力改良剂。因为本发明的羰基应力改良剂使用源于
体内起作用的酶反应，它们即使通过 CAPD 溶液释放和直接进入活体都有
30 希望是高度安全的。

而且，由于使用酶反应，高度特异性是本发明的另一特征。以前已知

的羰基应激改良剂是基于化合物的化学反应。所以，其特异性是低的并且它们与所有类型的羰基化合物反应。因此，预计这些已知的改良剂不仅捕获对活体有害的由糖衍生的或由类脂衍生的羰基化合物，而且也捕获活体必需的羰基如吡哆醛。本发明利用酶反应，有望对于活体有害的羰基化合物是高度特异性的。

5 另外，以上实施例证实，本发明羰基应激改良剂优先消除具有较高反应活性的羰基化合物。具体来说，在甲基乙二醛、3-特异葡萄糖醛酮和乙二醛共存时，对活体影响大的甲基乙二醛首先被消除，然后其他化合物再被消除。因此，本发明羰基应激改良剂的优异性能不仅体现在羰基化合物的消除速率上，而且也体现在以示构的方式进行改良羰基应激状态的反应。

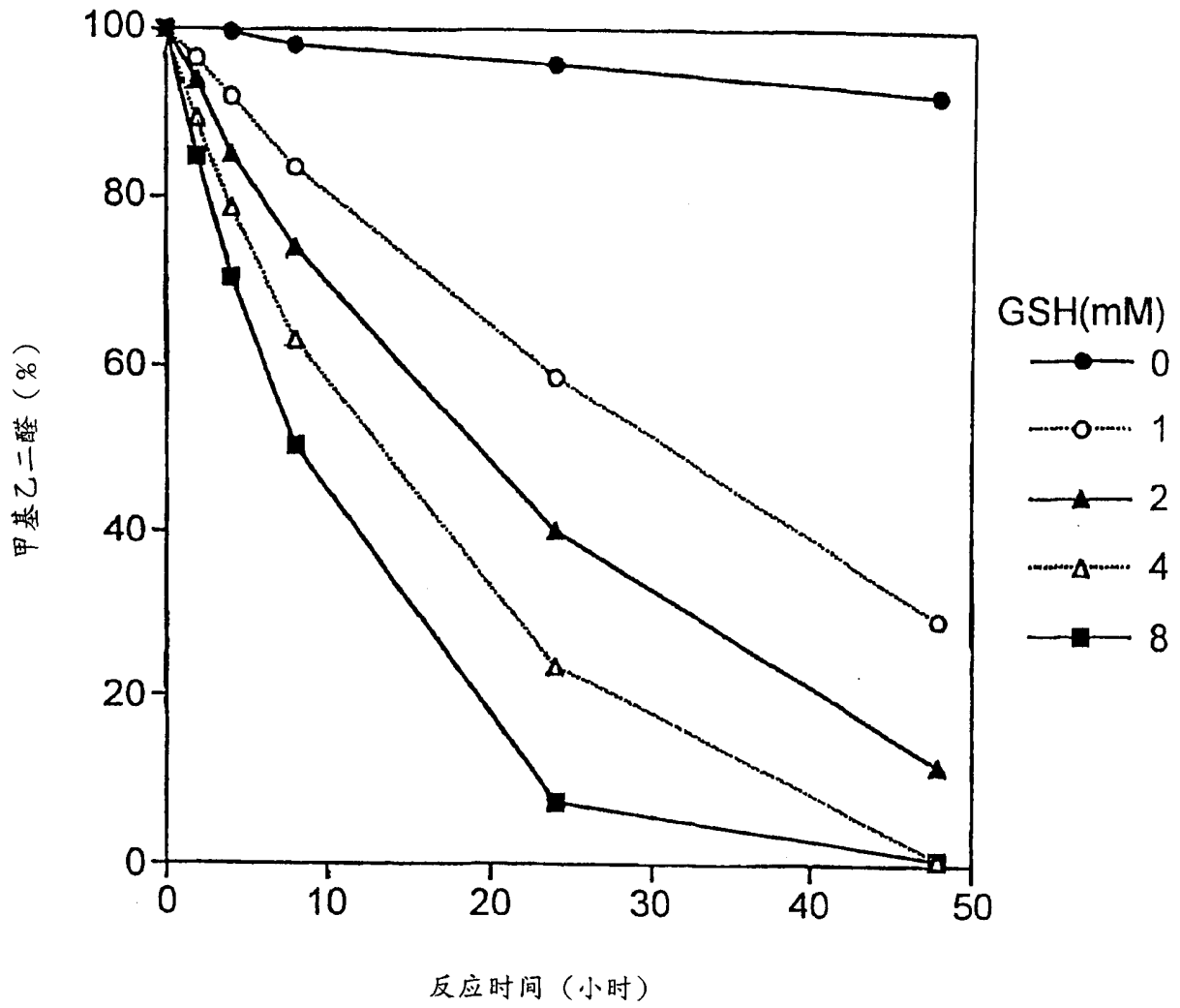


图 1

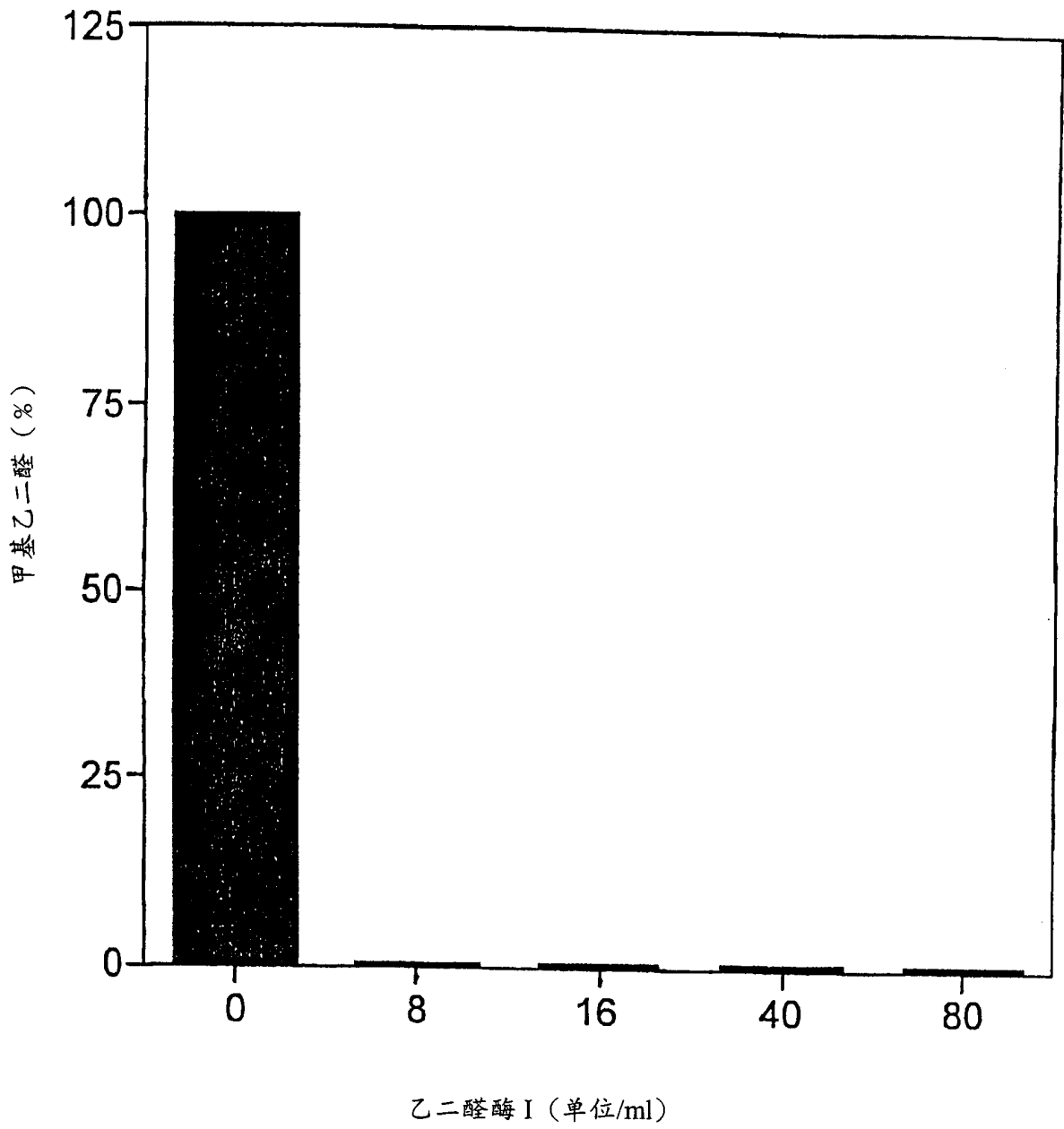


图 2

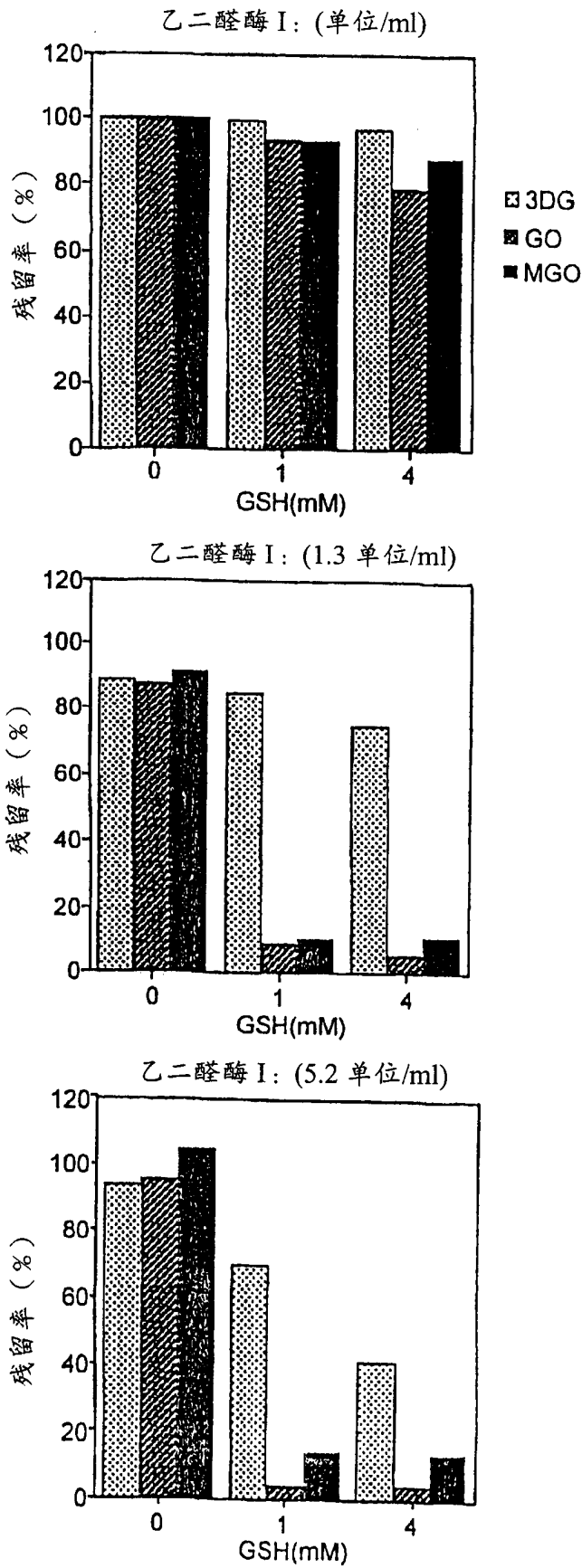


图 3

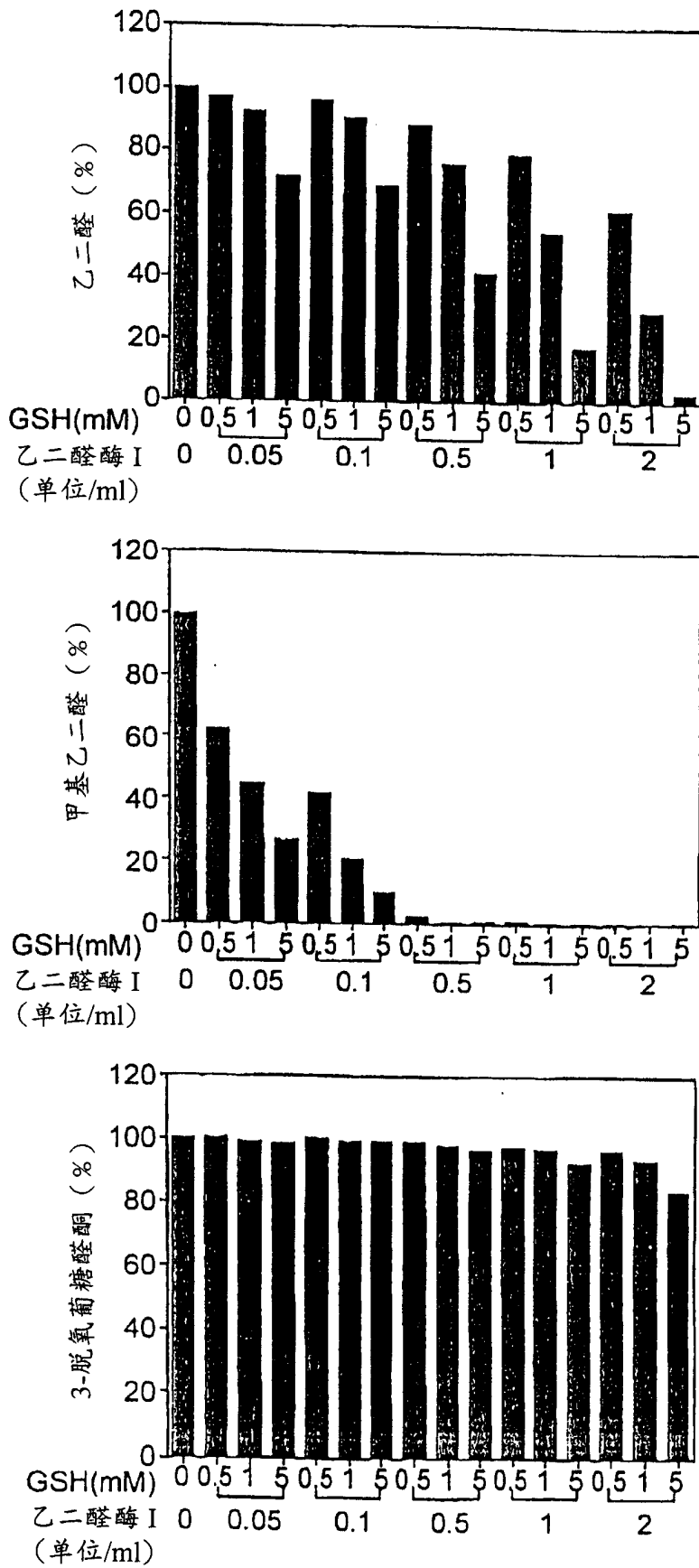


图 4

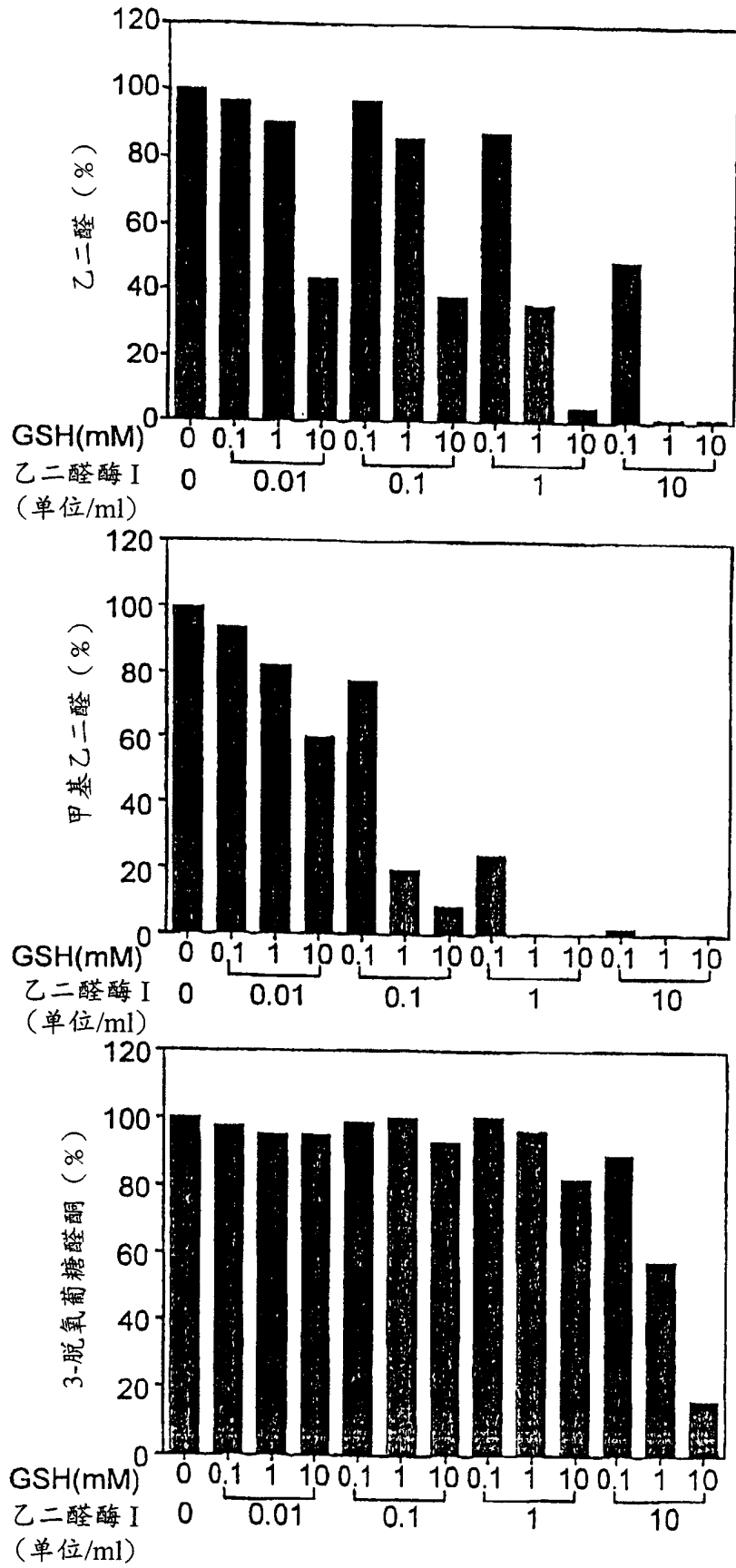


图 5

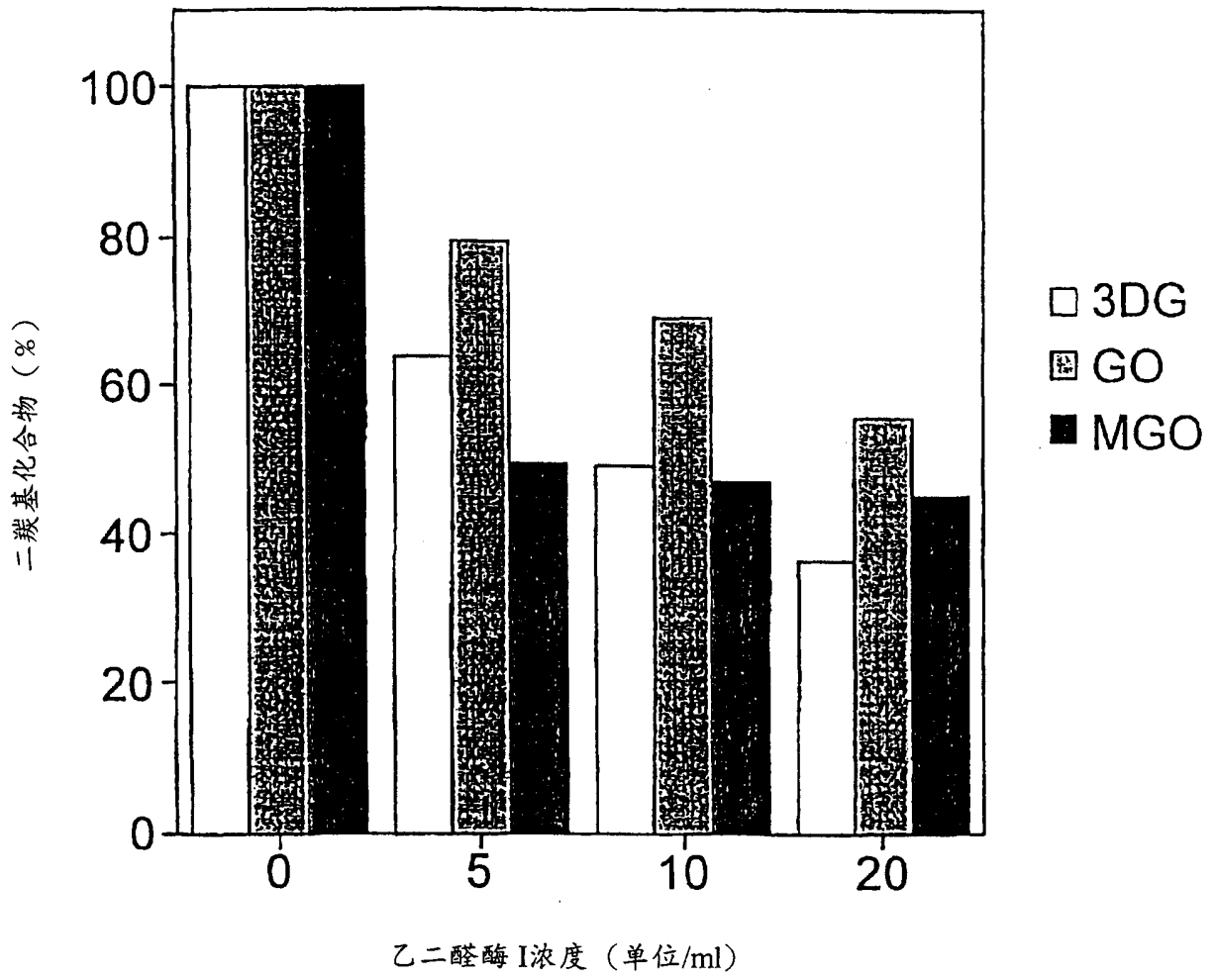


图 6