

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2021 年 6 月 24 日 (24.06.2021)



(10) 国际公布号
WO 2021/120937 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 47/64 (2017.01) *A61K 47/36* (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01) *A61K 31/196* (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01) *A61K 31/07* (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01) *A61P 27/02* (2006.01)
A61K 47/38 (2006.01) *C07K 19/00* (2006.01)

JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/128588

(22) 国际申请日: 2020 年 11 月 13 日 (13.11.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201911302937.3 2019年12月17日 (17.12.2019) CN
202010506950.7 2020年6月5日 (05.06.2020) CN
202010976582.2 2020年9月16日 (16.09.2020) CN
202010974997.6 2020年9月16日 (16.09.2020) CN

(71) 申请人: 童妍 (上海) 医疗器械有限公司 (TONGYAN (SHANGHAI) MEDICAL DEVICE CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区自由贸易试验区郭守敬路199号105P室 (生物与医药创新园), Shanghai 201203 (CN)。

(72) 发明人: 辛瑜 (XIN, Yu); 中国江苏省无锡市蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。

(74) 代理人: 上海弼兴律师事务所 (SHANGHAI BESHINING LAW OFFICE); 中国上海市小木桥路681号外经大厦21楼, Shanghai 200032 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT,

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明:

- 关于申请人有权申请并被授予专利 (细则4.17(ii))
- 关于申请人有权要求在先申请的优先权 (细则4.17(iii))
- 发明人资格 (细则4.17(iv))

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分 (细则5.2(a))。

(54) Title: APPLICATION OF TRANSTHYRETIN IN ENTERING EYE AND PREPARING DROP

(54) 发明名称: 转甲状腺素蛋白进入眼内以及在制备滴剂中的应用

(57) Abstract: The present invention provides an application of transthyretin serving as a carrier for a protein and/or polypeptide drug to enter an eye through an eye barrier. The transthyretin is a protein consisting of amino acid as shown in SEQ ID NO: 1 or a mutation thereof or a modification thereof. Further provided are an application of transthyretin and/or a fusion protein of the transthyretin and a drug in preparation of a drop, and a drop. The drug is a protein and/or polypeptide drug. The transthyretin has good biocompatibility and safety in human bodies, can effectively convey a foreign protein and/or polypeptide into the eye, and achieves an effect of treating eye diseases.

(57) 摘要: 本发明提供了转甲状腺素蛋白作为蛋白质类和/或多肽类药物通过眼部屏障进入眼内的载体方面的应用, 所述转甲状腺素蛋白为由SEQ ID NO:1或其突变或其修饰所示氨基酸组成的蛋白质。还提供了转甲状腺素蛋白和/或转甲状腺素蛋白与药物的融合蛋白在制备滴剂中的应用以及一种滴剂, 所述药物为蛋白质类和/或多肽类药物。转甲状腺素蛋白在人体内具有较好的生物相容性与安全性, 能够有效地将外源蛋白和/或多肽输送到眼内, 达到治疗眼部疾病的作用。

WO 2021/120937 A1

转甲状腺素蛋白进入眼内以及在制备滴剂中的应用

本申请要求申请日为 2019/12/17 的中国专利申请 201911302937.3、申请日为 2020/6/5 的中国专利申请 202010506950.7、申请日为 2020/9/16 的中国专利申请 202010976582.2、申请日为 2020/9/16 的中国专利申请 202010974997.6 的优先权。本申请引用上述中国专利申请的全文。

技术领域

本发明涉及医药技术领域，具体涉及转甲状腺素蛋白作为蛋白质类和/或多肽类药物通过眼部屏障进入眼内的载体方面的应用，本发明还涉及转甲状腺素蛋白、和/或转甲状腺素蛋白与蛋白质类和/或多肽类药物组成的融合蛋白在制备滴剂中的应用，本发明进一步涉及一种含有转甲状腺素蛋白的眼用制剂及其制备方法以及在治疗与眼部血管新生和/或眼部视网膜渗漏等相关的眼部疾病中的应用。

背景技术

糖尿病视网膜病变（Diabetic Retinopathy, DR）简称“糖网”，是糖尿病微血管病的临床表现，也是糖尿病最严重的并发症之一，现在已经成为主要的致盲眼病之一。主要是在眼部长长期高糖及缺氧的微环境下，逐步发生微血管阻塞、微血管瘤、出血、静脉扩张、黄斑水肿、新生血管、大量玻璃体出血、眼内纤维化、视网膜脱离等临床症状。

老年性黄斑变性（Age-related macular degeneration, AMD），为黄斑区结构的衰老性改变。主要表现为视网膜色素上皮细胞对视细胞外节盘膜吞噬消化的能力下降，结果使未被完全消化的盘膜残余小体滞留于基底部细胞原浆中，并向细胞外排出，沉积于 Bruch 膜，形成玻璃膜疣。由于黄斑部结构与功能上的特殊性，此种改变更为明显。玻璃膜疣也见于正常视力的老年人，但由此继发的种种病理改变后，则导致黄斑部变性发生。或者引起 Bruch 膜断裂，脉络膜毛细血管通过破裂的 Bruch 膜进入 RPE（retinal pigment epithelium，视网膜色素上皮）下及视网膜神经上皮，形成脉络膜新生血管，脉络膜新生血管为视网膜下新生血管。由于新生血管壁的结构异常，导致血管的渗漏和出血，进而引发一系列的继发性病理改变。老年性黄斑变性大多发生于 45 岁以上，其患病率随年龄增长而增高，是当前老年人致盲的重要疾病。

早产儿视网膜病变（retinopathy of prematurity, ROP）是指在孕 36 周以下、低出生体重、长时间吸氧的早产儿，其未血管化的视网膜发生纤维血管瘤增生、收缩，并进一步

引起牵拉性视网膜脱离和失明。以往曾称为 Terry 综合征或晶状体后纤维增生症，但后者仅反映了该病的晚期表现。孕期更短或更低出生体重者，发生率可达 60%~80%。其病因是由于早产儿出生后在温箱内高氧环境中过度吸氧，而移出温箱后处于相对缺氧的状态，未完全血管化的视网膜对氧产生血管收缩和血管增殖。

针对眼部疾病的治疗，需要将药物有效的传递到眼内，特别是上述所述的糖尿病视网膜病变、老年性黄斑变性以及早产儿视网膜病变等眼部疾病，以及色素性视网膜炎、青光眼导致的神经改变等其他眼部疾病；但由于眼部存在较多的屏障，将药物有效的传递到眼内充满了挑战性。因此，近来眼部给药系统受到了广泛的关注。

根据眼部解剖结构，眼部屏障主要包括了泪液屏障、角膜/结膜屏障、以及血眼屏障；多重屏障在保护眼部的同时，能够有效的阻挡外源化学及生物分子的侵入，但也给药物的传递带来了较大的阻碍。目前，眼部常用的给药方式主要包括常规滴眼、结膜下注射、巩膜给药，以及玻璃体内注射给药。其中，常规滴眼液与眼表接触时间较短，由于自身的结构与特性，一些外源药物及蛋白很难有效进入眼内；而结膜下注射、巩膜给药及玻璃体内注射通常会带来一定程度的创伤。视网膜激光治疗、玻璃体切除联合硅油填充术这些方法损伤较大，视力恢复不理想。

目前治疗 DR、AMD 以及 ROP 的最常规手段为玻璃体腔内注射抗 vegf 抗体，但是如上述所述这种方式通常会带来一定程度的创伤，多次给药必须有较长时间的间隔期。

目前，也有一些专利文献设计了能够有效突破各种眼部屏障到达眼内的功能性小肽，如郑颖，许讯等人的专利（一类新的抑制新生血管的小肽及其应用，CN2013100527142），苏莉等人的专利（一类抑制新生血管的小肽及其应用，CN201310058978.9），杨晓璐等人的专利（一种预防和/或治疗炎症反应的小分子多肽及其应用，CN201210581759.4）。

以上研究均存在一定的局限性，眼内注射会带来一定的创伤，而功能性小肽的输送效率较低半衰期较短，为此，有必要寻找更为安全、稳定、有效且对眼部无伤害或伤害较小的药物及给药方法。

发明内容

本发明为了克服现有技术中由于眼部屏障的存在而没有能够安全、稳定、有效且对眼部无伤害或伤害较小的将药物传递至眼内的给药方法和药物以治疗糖尿病视网膜病变（DR）、老年性黄斑变性（AMD）、早产儿视网膜病变（ROP）等眼部疾病的缺陷，提供了一种转甲状腺素蛋白（TTR）作为蛋白质类和/或多肽类药物通过眼部屏障进入眼内的载体方面的应用，一种转甲状腺素蛋白、和/或转甲状腺素蛋白与蛋白质类和/或多肽类药

物组成的融合蛋白在制备滴剂中的应用以及一种滴剂。

本发明人通过大量实验，意外发现通过使用滴剂进行滴眼而非本领域常规的进行注射的方式，转甲状腺素蛋白可有效跨越角膜屏障进入玻璃体及眼底，并且还能有效地输送外源蛋白和/或多肽，由此，可以根据眼部疾病的病理特征，选择合适的蛋白质类和/或多肽类药物，通过转甲状腺素蛋白输送至眼内，从而达到治疗眼部疾病的作用，在医药领域作为注射类药物的替代物方面具有重要的应用前景。

本发明人通过大量实验，还意外地发现在转甲状腺素蛋白跨越角膜屏障进入玻璃体及眼底之后，转甲状腺素蛋白可以显著抑制眼球视网膜渗漏，显著降低视网膜新生血管数，有效缓解 DR、AMD、ROP 等眼部疾病。即，无需与蛋白质类和/或多肽类药物融合，转甲状腺素蛋白本身即可治疗或缓解 DR、AMD、ROP 等眼部疾病，并且能够达到足够的治疗浓度和治疗时间（半衰期很长）。

而且，本领域技术人员仅知晓透明质酸具有湿润的作用，并不知晓其可以增加转甲状腺素蛋白的透过量，而本发明人还进一步发现在制备滴剂例如滴眼液时，使用透明质酸可以增加玻璃体腔内及眼底转甲状腺素蛋白的透过量，进而有效增加转甲状腺素蛋白的浓度。

为了解决上述技术问题，本发明第一方面提供了转甲状腺素蛋白作为蛋白质类和/或多肽类药物通过眼部屏障进入眼内的载体方面的应用，所述转甲状腺素蛋白如(a)、(b)或(c)所示：

(a) 由 SEQ ID NO: 1 所示氨基酸组成的蛋白质；

(b) 在(a)中的氨基酸序列上经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸的序列所示的具有抑制血管新生功能的由(a)衍生的蛋白质；

(c) 在(a)或(b)中的氨基酸序列上经过亲水性修饰或疏水性修饰的序列所示的蛋白质。

较佳地，所述(b)中，所述的由(a)衍生的蛋白质为在(a)中的氨基酸序列上经过 22 个氨基酸的取代。

较佳地，所述(b)中，所述的由(a)衍生的蛋白质为在(a)中的氨基酸序列上经过 25 个氨基酸的取代。

较佳地，所述(b)中，所述的由(a)衍生的蛋白质为在(a)中的氨基酸序列的 T3、T5、I26、N27、H31、R34、A36、A37、D38、D39、T40、S50、E61、E63、V65、I68、K70、I73、A81、H90、E92、P102、R104、T123、K126 和/或 E127 发生取代。更佳地，所述(b)中，所述的由(a)衍生的蛋白质为在(a)中的氨基酸序列上经过 T3G、T5A、

I26V、N27D、H31K、R34K、A36T、D39G、T40S、S50A、E61D、E63K、V65T、I68V、K70R、I73L、H90Y、P102H、R104H、T123S、K126Q 和 E127N 的取代。更佳地，所述 (b) 中，所述的由 (a) 衍生的蛋白质为在 (a) 中的氨基酸序列上经过 T3G、T5A、I26V、N27D、H31K、R34K、A36T、A37S、D38E、D39G、T40S、S50A、E61D、E63K、I68V、K70R、I73L、A81T、H90F、E92D、P102H、R104H、T123S、K126Q 和 E127N 的取代。

较佳地，所述 (b) 中，所述的由 (a) 衍生的蛋白质为在 (a) 中的氨基酸序列上经过 5 个氨基酸的缺失。更佳地，所述 (b) 中，所述的由 (a) 衍生的蛋白质为在 (a) 中的氨基酸序列的第 123-127 位发生缺失。

较佳地，所述 (b) 中，所述的由 (a) 衍生的蛋白质的氨基酸序列优选如 SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10 或 SEQ ID NO: 11 所示。

较佳地，所述 (c) 中，所述亲水性修饰或疏水性修饰在 (a) 中的氨基酸序列上的第 10 位的半胱氨酸上进行。较佳地，所述疏水性修饰为使用长链疏水片段例如正十二烷进行修饰。在本发明某一较佳实施例中，所述蛋白质为在 (a) 中的氨基酸序列上的第 10 位的半胱氨酸通过马来酰亚胺连接正十二烷修饰的序列所示的蛋白质。本发明中，所述的在 (a) 中的氨基酸序列上的第 10 位的半胱氨酸还可以是连接有 5-氨基荧光素等荧光标记，以便追踪修饰后的蛋白。

较佳地，所述转甲状腺素蛋白与所述蛋白质类和/或多肽类药物融合表达；所述融合优选是将所述蛋白质类和/或多肽类药物融合在所述转甲状腺素蛋白的 N 端或 C 端。

较佳地，所述转甲状腺素蛋白与所述蛋白质类和/或多肽类药物融合是在微生物细胞中表达，并经过纯化。所述的微生物细胞可以为大肠杆菌，所述大肠杆菌包括但不限于 *E. coli* BL21、*E. coli* BL21 (DE3)、*E. coli* JM109、*E. coli* DH5 α 、*E. coli* K12 或 *E. coli* TOP10。所述纯化优选是通过内毒素吸附柱（例如使用 Pierce™ High Capacity Endotoxin Removal Spin Columns, ThermoFisher）去除内毒素，再通过 0.22 μ m 孔径滤膜去除残留菌体。

较佳地，所述蛋白质类和/或多肽类药物包括但不限于：溶菌酶、白蛋白和/或 EGFR 抗体，且分子量不超过 45 kDa。其中，所述溶菌酶优选为鸡蛋清溶菌酶，其 GenBank 登录号为 AAL69327.1。其中，所述白蛋白优选为鸡蛋清白蛋白。

较佳地，所述蛋白质类和/或多肽类药物包括治疗眼部视网膜渗漏和/或视网膜血管新生类眼部疾病例如糖尿病视网膜病变、老年性黄斑变性和/或早产儿视网膜病变的蛋白质类和/或多肽类药物。

较佳地，编码所述转甲状腺素蛋白的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示。

较佳地，所述转甲状腺素蛋白通过使用重组表达载体进行表达，所述重组表达载体的骨架质粒中的启动子为鼠李糖诱导型启动子，优选为 rhaPBAD 启动子。

较佳地，所述转甲状腺素蛋白通过使用重组表达载体进行表达，所述重组表达载体的骨架载体可以为 pET-21a 或与其具有 25%及以上同源性的载体，所述与其具有 25%及以上同源性的载体的序列优选如 SEQ ID NO: 8 所示。

较佳地，表达所述转甲状腺素蛋白的重组质粒的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示。

较佳地，所述转甲状腺素蛋白可以是在微生物细胞中进行表达（形成转化体的形式），并进一步可以经过纯化；所述的微生物细胞可以为大肠杆菌，所述大肠杆菌包括但不限于 *E. coli* BL21、*E. coli* BL21 (DE3)、*E. coli* JM109、*E. coli* DH5 α 、*E. coli* K12 或 *E. coli* TOP10。所述纯化可以通过内毒素吸附柱（例如使用 Pierce™ High Capacity Endotoxin Removal Spin Columns, ThermoFisher）去除内毒素，通过 0.22 μ m 孔径滤膜去除残留菌体。

较佳地，表达所述转甲状腺素蛋白时，通过培养包含所述转甲状腺素蛋白的基因的转化体至所得菌体的 OD₆₀₀ 达到 1.5-2.0（例如 1.6、1.7、1.8 或 1.9）时进行表达。

较佳地，表达所述转甲状腺素蛋白时为使用诱导表达的试剂进行诱导表达，所述诱导表达的试剂的质量体积百分比为 0.1-2%，例如 0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.7%、0.8%、1.2% 或 1.6%，所述诱导表达的时间优选为 8-20 h，例如 10 h、12 h、14 h、16 h、17 h、18 h 或 19 h；所述诱导表达的试剂优选为鼠李糖或者 IPTG。

在本发明某一较佳实施例中，所述应用是将所述转甲状腺素蛋白与所述蛋白质类和/或多肽类药物融合表达所得的融合蛋白，通过滴眼的方式（例如制备成滴剂如滴眼液的形式）作用于眼睛，每日滴加次数为 1-3 次，每次滴加量为 0.3-0.8 nmol 蛋白/眼。所述滴剂可以是以每日 2 次、每次 1 滴、持续 3 个月进行施用。所述滴剂可以是以每日 1 次、每次 1 滴、持续 5 天进行施用。所述滴剂可以是以每日 2 次、每次 1 滴、持续 2 周进行施用。

为了解决上述技术问题，本发明第二方面提供了转甲状腺素蛋白、和/或转甲状腺素蛋白与药物组成的融合蛋白在制备滴剂中的应用，所述药物为蛋白质类和/或多肽类药物，所述转甲状腺素蛋白如（a）、（b）或（c）所示：

（a）由 SEQ ID NO: 1 所示氨基酸组成的蛋白质；

（b）在（a）中的氨基酸序列上经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸的序列所示的具有抑制血管新生功能的由（a）衍生的蛋白质；

(c) 在 (a) 或 (b) 中的氨基酸序列上经过亲水性修饰或疏水性修饰的序列所示的蛋白质。

较佳地, 所述 (b) 中, 所述的由 (a) 衍生的蛋白质为在 (a) 中的氨基酸序列上经过 22 个氨基酸的取代。

较佳地, 所述 (b) 中, 所述的由 (a) 衍生的蛋白质为在 (a) 中的氨基酸序列上经过 25 个氨基酸的取代。

较佳地, 所述 (b) 中, 所述的由 (a) 衍生的蛋白质为在 (a) 中的氨基酸序列的 T3、T5、I26、N27、H31、R34、A36、A37、D38、D39、T40、S50、E61、E63、V65、I68、K70、I73、A81、H90、E92、P102、R104、T123、K126 和/或 E127 发生取代。更佳地, 所述 (b) 中, 所述的由 (a) 衍生的蛋白质为在 (a) 中的氨基酸序列上经过 T3G、T5A、I26V、N27D、H31K、R34K、A36T、D39G、T40S、S50A、E61D、E63K、V65T、I68V、K70R、I73L、H90Y、P102H、R104H、T123S、K126Q 和 E127N 的取代。更佳地, 所述 (b) 中, 所述的由 (a) 衍生的蛋白质为在 (a) 中的氨基酸序列上经过 T3G、T5A、I26V、N27D、H31K、R34K、A36T、A37S、D38E、D39G、T40S、S50A、E61D、E63K、I68V、K70R、I73L、A81T、H90F、E92D、P102H、R104H、T123S、K126Q 和 E127N 的取代。

较佳地, 所述 (b) 中, 所述的由 (a) 衍生的蛋白质为在 (a) 中的氨基酸序列上经过 5 个氨基酸的缺失。更佳地, 所述 (b) 中, 所述的由 (a) 衍生的蛋白质为在 (a) 中的氨基酸序列的第 123-127 位发生缺失。

较佳地, 所述 (b) 中, 所述的由 (a) 衍生的蛋白质的氨基酸序列优选如 SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10 或 SEQ ID NO: 11 所示。

较佳地, 所述 (c) 中, 所述亲水性修饰或疏水性修饰在 (a) 中的氨基酸序列上的第 10 位的半胱氨酸上进行。较佳地, 所述疏水性修饰为使用长链疏水片段例如正十二烷进行修饰。在本发明某一较佳实施例中, 所述蛋白质为在 (a) 中的氨基酸序列上的第 10 位的半胱氨酸通过马来酰亚胺连接正十二烷修饰的序列所示的蛋白质。本发明中, 所述的在 (a) 中的氨基酸序列上的第 10 位的半胱氨酸还可以是连接有 5-氨基荧光素等荧光标记, 以便追踪修饰后的蛋白。

较佳地, 所述融合蛋白的含量为 4-30 $\mu\text{mol/L}$, 优选 10-15 $\mu\text{mol/L}$ 。

较佳地, 所述转甲状腺素蛋白的含量为 4-30 $\mu\text{mol/L}$, 优选 5-30 $\mu\text{mol/L}$, 更优选 10-20 $\mu\text{mol/L}$, 例如 10、15、20 $\mu\text{mol/L}$ 。

较佳地, 所述滴剂中还含有生理盐水。本发明中, 所述的生理盐水的使用量可按照本领域规定的标准进行使用即可。

较佳地，所述滴剂中还含有表面活性剂，所述表面活性剂例如为吐温 80，其含量优选为 5% (v/v)。

较佳地，所述滴剂中还含有透明质酸，所述透明质酸的质量体积百分比的含量 $\leq 6\%$ ，优选 1-4%，更优选 2%。

较佳地，所述滴剂优选滴眼液。

较佳地，所述滴剂为抑制眼部视网膜渗漏和/或降低视网膜新生血管数的滴剂，优选为治疗糖尿病视网膜病变、老年性黄斑变性和/或早产儿视网膜病变的滴剂。

较佳地，所述滴剂的每日滴加次数为 1-3 次，每次滴加量优选为 0.3-0.8 nmol 蛋白/眼。

较佳地，所述滴剂以每日 2 次、每次 1 滴、持续 3 个月进行施用；和/或，所述滴剂以每日 1 次、每次 1 滴、持续 5 天进行施用；和/或，所述滴剂以每日 2 次、每次 1 滴、持续 2 周进行施用。

较佳地，编码所述转甲状腺素蛋白的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示。

较佳地，所述转甲状腺素蛋白通过使用重组表达载体进行表达，所述重组表达载体的骨架质粒中的启动子为鼠李糖诱导型启动子，优选为 rhaPBAD 启动子。

较佳地，所述转甲状腺素蛋白通过使用重组表达载体进行表达，所述重组表达载体的骨架载体为 pET-21a 或与其具有 25%及以上同源性的载体，所述与其具有 25%及以上同源性的载体的序列优选如 SEQ ID NO: 8 所示。

较佳地，表达所述转甲状腺素蛋白的重组质粒的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示。

较佳地，所述转甲状腺素蛋白可以是在微生物细胞中进行表达(形成转化体的形式)，并进一步可以经过纯化；所述的微生物细胞可以为大肠杆菌，所述大肠杆菌包括但不限于 *E. coli* BL21、*E. coli* BL21 (DE3)、*E. coli* JM109、*E. coli* DH5 α 、*E. coli* K12 或 *E. coli* TOP10。所述纯化可以通过内毒素吸附柱(例如使用 Pierce™ High Capacity Endotoxin Removal Spin Columns, ThermoFisher)去除内毒素，通过 0.22 μ m 孔径滤膜去除残留菌体。

较佳地，表达所述转甲状腺素蛋白时，通过培养包含所述转甲状腺素蛋白的基因的转化体至所得菌体的 OD₆₀₀ 达到 1.5-2.0 (例如 1.6、1.7、1.8 或 1.9) 时进行表达。

较佳地，表达所述转甲状腺素蛋白时为使用诱导表达的试剂进行诱导表达，所述诱导表达的试剂的质量体积百分比为 0.1-2%，例如 0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.7%、0.8%、1.2%或 1.6%，所述诱导表达的时间优选为 8-20 h，例如 10 h、12 h、14 h、16 h、17 h、18 h 或 19 h；所述诱导表达的试剂优选为鼠李糖或者 IPTG。

较佳地，所述融合蛋白的序列如 SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 7 所示。

较佳地，所述转甲状腺素蛋白与所述蛋白质类和/或多肽类药物融合表达；所述融合优选是将所述蛋白质类和/或多肽类药物融合在所述转甲状腺素蛋白的 N 端或 C 端；所述转甲状腺素蛋白与所述蛋白质类和/或多肽类药物融合优选是在微生物细胞中表达，并经过纯化。所述的微生物细胞可以为大肠杆菌，所述大肠杆菌包括但不限于 *E. coli* BL21、*E. coli* BL21 (DE3)、*E. coli* JM109、*E. coli* DH5 α 、*E. coli* K12 或 *E. coli* TOP10。所述纯化优选是通过内毒素吸附柱去除内毒素，再通过 0.22 μ m 孔径滤膜去除残留菌体。

较佳地，所述蛋白质类和/或多肽类药物包括但不限于：溶菌酶、白蛋白和/或 EGFR 抗体，且分子量不超过 45 kDa；所述溶菌酶优选为鸡蛋清溶菌酶，其 GenBank 登录号为 AAL69327.1；所述白蛋白优选为鸡蛋清白蛋白。

较佳地，所述蛋白质类和/或多肽类药物包括治疗眼部视网膜渗漏和/或视网膜血管新生类眼部疾病例如糖尿病视网膜病变、老年性黄斑变性和/或早产儿视网膜病变的蛋白质类和/或多肽类药物。

本发明人在实验过程中还意外发现，使用羧甲基纤维素或其盐例如羧甲基纤维素钠、硫酸软骨素或其盐例如硫酸软骨素 A 钠盐、右旋糖酐例如右旋糖酐 70、透明质酸等材料能够与转甲状腺素蛋白和/或融合蛋白相互牵制、协同配合，形成一个有机整体，从而可以对与眼部血管新生和/或眼部视网膜渗漏等相关的眼部疾病例如糖尿病视网膜病变、老年性黄斑变性和/或早产儿视网膜病变进行协同治疗，最终获得了较佳的治疗效果。而本领域技术人员仅知晓透明质酸、羧甲基纤维素或其盐例如羧甲基纤维素钠、硫酸软骨素或其盐例如硫酸软骨素 A 钠盐、右旋糖酐例如右旋糖酐 70、透明质酸等材料具有湿润等作用，通常可以将它们用于制备滴眼液以能够有效缓解眼部干燥等。

基于此，上述滴剂中进一步可以含有药学上可接受的辅料，所述药学上可接受的辅料选自“羧甲基纤维素或其盐、其溶剂合物、其药学上可接受的盐的溶剂合物、或、其晶型”、“硫酸软骨素或其盐、其溶剂合物、其药学上可接受的盐的溶剂合物、或、其晶型”、“右旋糖酐或其盐、其溶剂合物、其药学上可接受的盐的溶剂合物、或、其晶型”、和、“透明质酸或其盐、其溶剂合物、其药学上可接受的盐的溶剂合物、或、其晶型”中的一种或多种。

较佳地，所述羧甲基纤维素或其盐、其溶剂合物、其药学上可接受的盐的溶剂合物、或、其晶型的黏度为 800-1200 CP。

较佳地，所述硫酸软骨素为硫酸软骨素 A。

较佳地，所述右旋糖酐为右旋糖酐 70。所述的右旋糖酐 70 的分子量通常在 64000-76000 范围内。

较佳地，所述透明质酸的分子量为 10000-500000。

本发明中，所述的“药学上可接受的”通常是指无毒、安全，并且适合于患者使用。所述的“患者”优选哺乳动物，更优选为人类。

本发明中，所述的“或其盐”中的“盐”通常是药学上可接受的盐，其通常是指本发明化合物与相对无毒的、药学上可接受的酸或碱制备得到的盐。当本发明的化合物中含有相对酸性的功能团时，可以通过在纯的溶液或合适的惰性溶剂中用足够量的药学上可接受的碱与这类化合物的原型接触的方式获得碱加成盐。药学上可接受的碱加成盐包括但不限于：锂盐、钠盐、钾盐、钙盐、铝盐、镁盐、锌盐、铋盐、铵盐、二乙醇胺盐。当本发明的化合物中含有相对碱性的官能团时，可以通过在纯的溶液或合适的惰性溶剂中用足够量的药学上可接受的酸与这类化合物的原型接触的方式获得酸加成盐。所述的药学上可接受的酸包括无机酸，所述无机酸包括但不限于：盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硝酸、碳酸、磷酸、亚磷酸、硫酸等。所述的药学上可接受的酸包括有机酸，所述有机酸包括但不限于：乙酸、丙酸、草酸、异丁酸、马来酸、丙二酸、苯甲酸、琥珀酸、辛二酸、反丁烯二酸、乳酸、扁桃酸、邻苯二甲酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、柠檬酸、水杨酸、酒石酸、甲磺酸、异烟酸、酸式柠檬酸、油酸、单宁酸、泛酸、酒石酸氢、抗坏血酸、龙胆酸、富马酸、葡糖酸、糖酸、甲酸、乙磺酸、双羟萘酸（即 4,4'-亚甲基-双(3-羟基-2-萘甲酸)）、氨基酸（例如谷氨酸、精氨酸）等。当本发明的化合物中含有相对酸性和相对碱性的官能团时，可以被转换成碱加成盐或酸加成盐。具体可参见 Berge et al., "Pharmaceutical Salts", *Journal of Pharmaceutical Science* 66: 1-19 (1977)、或、*Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use* (P. Heinrich Stahl and Camille G. Wermuth, ed., Wiley-VCH, 2002)。

在某一较佳实施例中，所述的“羧甲基纤维素或其盐”中所述的“盐”可为钠盐或钙盐，例如为羧甲基纤维素钠。

在某一较佳实施例中，所述的“硫酸软骨素或其盐”中所述的“盐”可为钠盐或钙盐，例如为硫酸软骨素 A 钠盐。

本发明中，所述的“溶剂合物”是指本发明化合物与化学计量或非化学计量的溶剂结合形成的物质。溶剂合物中的溶剂分子可以有序或非有序排列的形式存在。所述的溶剂包括但不限于：水、甲醇、乙醇等。

本发明中，所述的“药学上可接受的盐的溶剂合物”中的“药学上可接受的盐”和

“溶剂合物”如上所述，是指本发明化合物 1、与相对无毒的、药学上可接受的酸或碱制备得到的 2、与化学计量或非化学计量的溶剂结合形成的物质。所述的“药学上可接受的盐的溶剂合物”包括但不限于本发明所述辅料的盐酸一水合物。

本发明中，所述的“辅料”、“药学上可接受的盐”、“溶剂合物”和“药学上可接受的盐的溶剂合物”，以及下述的“化合物”、“糖苷”，可以以晶型或无定型的形式存在。术语“晶型”是指其中的离子或分子是按照一种确定的方式在三维空间作严格周期性排列，并具有间隔一定距离周期重复出现规律；因上述周期性排列的不同，可存在多种晶型，也即多晶型现象。术语“无定型”是指其中的离子或分子呈现杂乱无章的分布状态，即离子、分子间不具有周期性排列规律。

较佳地，所述滴剂中，所述羧甲基纤维素或其盐、其溶剂合物、其药学上可接受的盐的溶剂合物、或、其晶型的浓度为 0-8 mg/mL 但不为 0（即 $0 < \text{浓度} \leq 8 \text{ mg/mL}$ ），优选为 2、4、6 或 8 mg/mL。

较佳地，所述滴剂中，所述硫酸软骨素或其盐、其溶剂合物、其药学上可接受的盐的溶剂合物、或、其晶型的浓度为 0-40 mg/mL 但不为 0（即 $0 < \text{浓度} \leq 40 \text{ mg/mL}$ ），优选为 10、20、30 或 40 mg/mL。

较佳地，所述滴剂中，所述右旋糖酐或其盐、其溶剂合物、其药学上可接受的盐的溶剂合物、或、其晶型的浓度为 0-0.8 mg/mL 但不为 0（即 $0 < \text{浓度} \leq 0.8 \text{ mg/mL}$ ），优选为 0.2、0.4、0.6 或 0.8 mg/mL。

较佳地，所述滴剂中，所述透明质酸或其盐、其溶剂合物、其药学上可接受的盐的溶剂合物、或、其晶型的质量体积百分比的含量 $\leq 6\%$ ，优选 1-4%，更优选 2%。

在某一较佳实施例中，所述滴剂由 10 $\mu\text{mol/L}$ 转甲状腺素蛋白、6 mg/mL 羧甲基纤维素钠和生理盐水组成。

在某一较佳实施例中，所述滴剂由 10 $\mu\text{mol/L}$ 转甲状腺素蛋白、0.4 mg/mL 右旋糖酐 70 和生理盐水组成。

在某一较佳实施例中，所述滴剂由 10 $\mu\text{mol/L}$ 转甲状腺素蛋白、20 mg/mL 硫酸软骨素 A 钠盐和生理盐水组成。

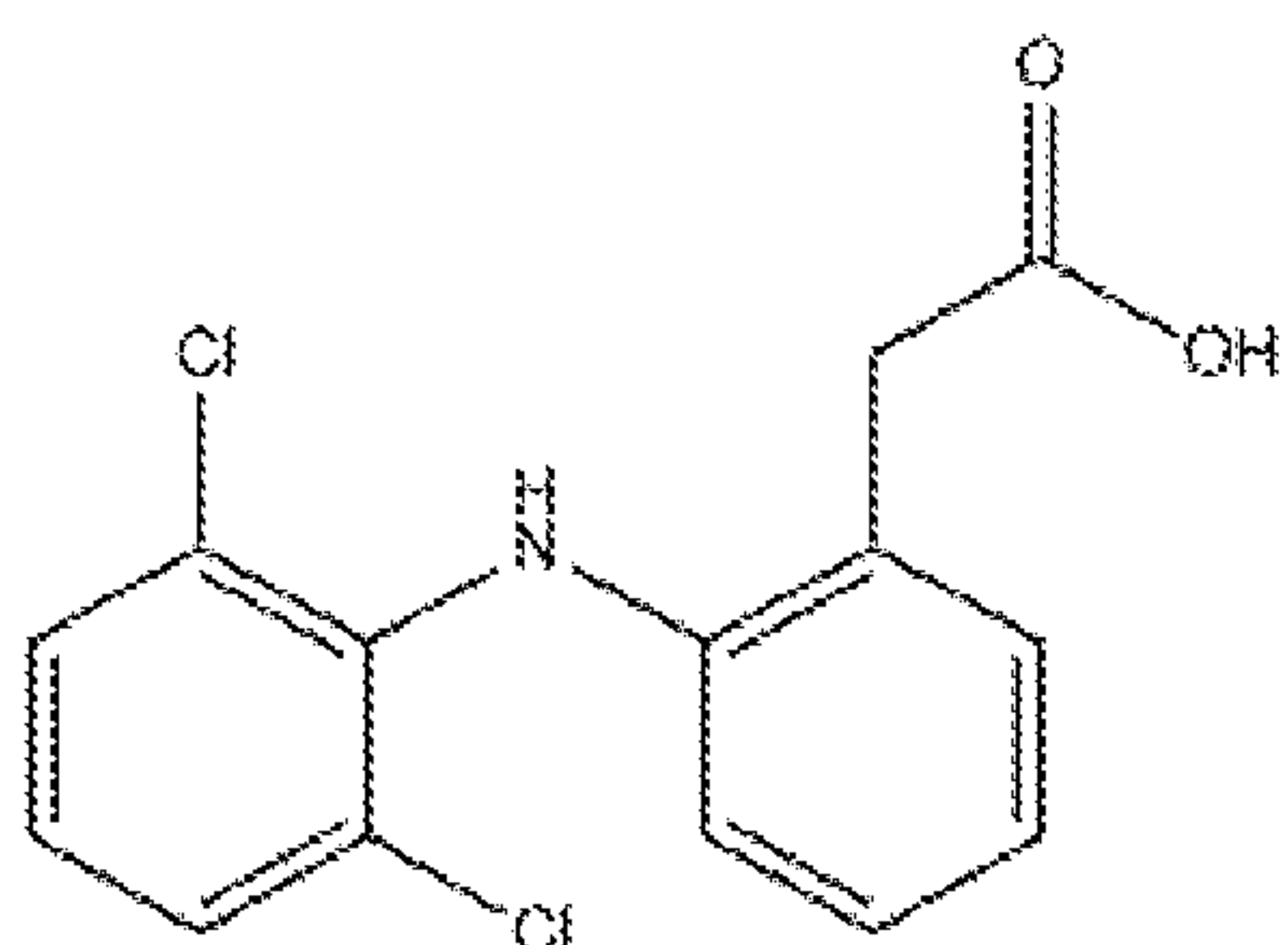
在某一较佳实施例中，所述滴剂由 10 $\mu\text{mol/L}$ 转甲状腺素蛋白、2%透明质酸和生理盐水组成。

当所述滴剂含有上述药学上可接受的辅料时，所述滴剂的制备方法包括将所述的药学上可接受的辅料与所述的转甲状腺素蛋白和/或融合蛋白混合即可。

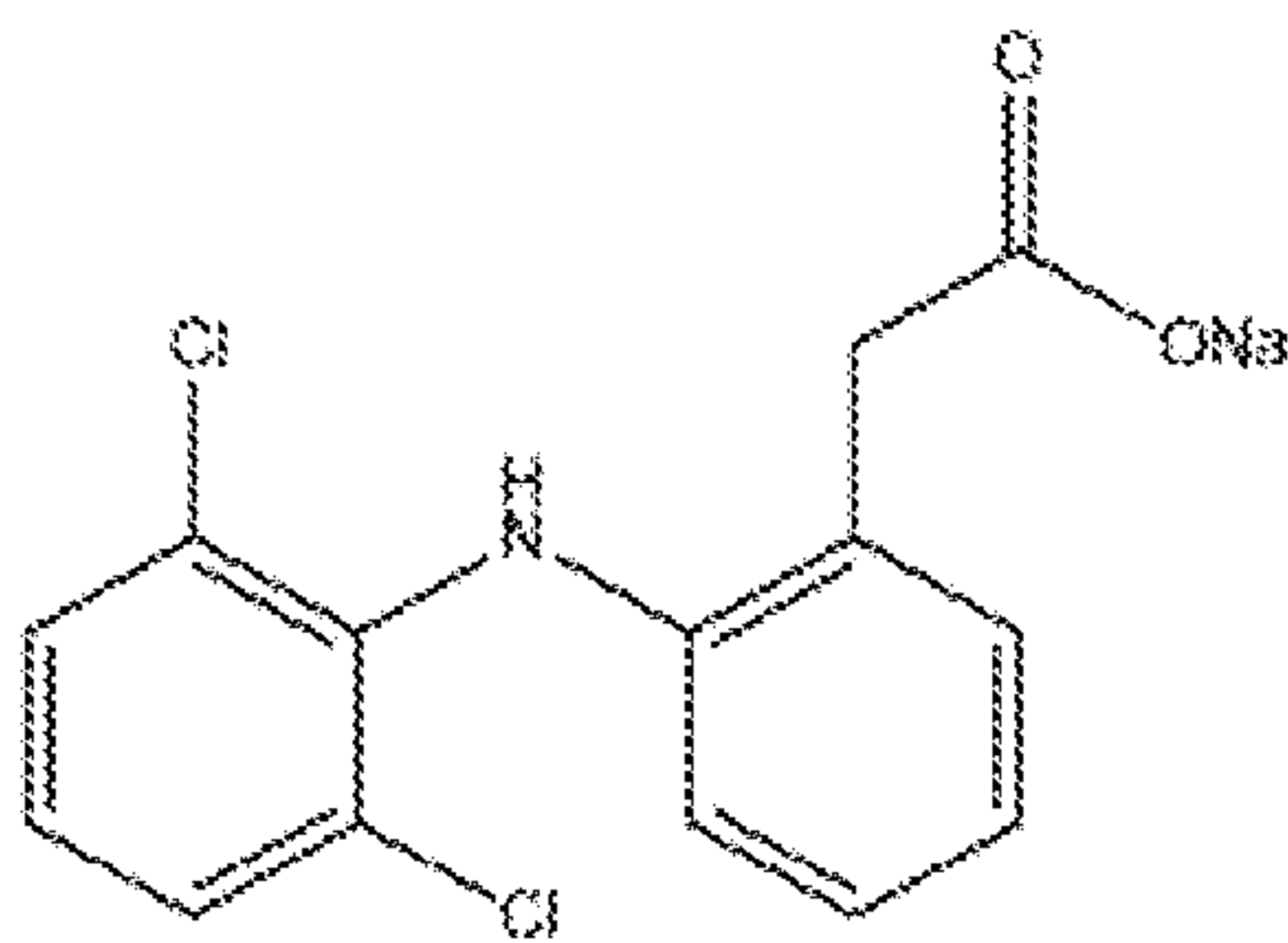
本发明人在实验过程中还意外发现，将转甲状腺素蛋白和/或融合蛋白与特定化合物共同施用眼部时，所述的化合物能够与转甲状腺素蛋白和/或融合蛋白协同配合、共同作用，从而能够有效治疗或缓解与眼部视网膜血管新生和/或眼部视网膜渗漏等相关的眼部疾病，使得治疗效果更佳。

基于此，上述滴剂中进一步可以含有化合物、其药学上可接受的盐、其糖苷、其溶剂合物、其药学上可接受的盐的溶剂合物、或其晶型；所述化合物选自双氯芬酸、维生素 A 和木犀草素中的一种或多种。

其中，双氯芬酸及其钠盐：双氯芬酸及其钠盐属于非甾体抗炎药，有明显的镇痛，消炎及解热作用。双氯芬酸钠滴眼液，用于治疗葡萄膜炎、角膜炎、巩膜炎，抑制角膜新生血管的形成；治疗眼内手术后、激光滤帘成形术后或各种眼部损伤的炎症反应；抑制白内障手术中缩瞳反应；用于准分子激光角膜切削术后止痛及消炎；治疗春季结膜炎、季节性过敏性结膜炎等过敏性眼病；预防和治疗白内障及人工晶体术后炎症及黄斑囊样水肿；以及青光眼滤过术后促进滤过泡形成等。双氯芬酸钠滴眼液针对眼表使用或眼部开放式创伤使用，目前的市售产品有迪非，含量为 1 mg/mL。双氯芬酸、双氯芬酸钠的结构式如下所示：



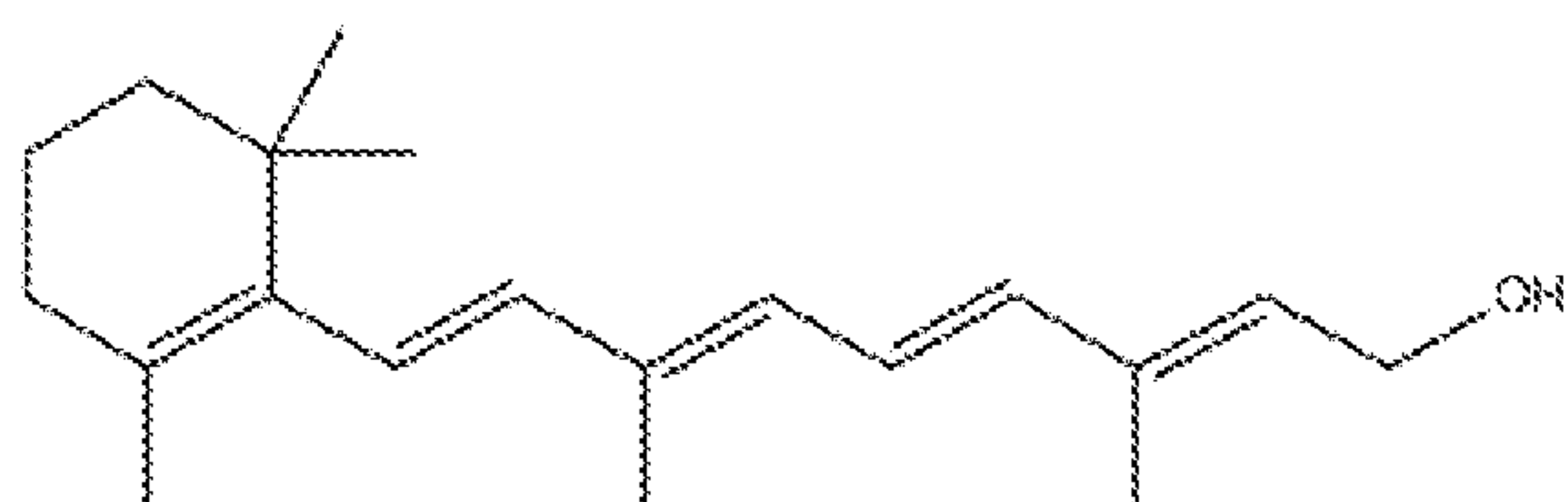
双氯芬酸，



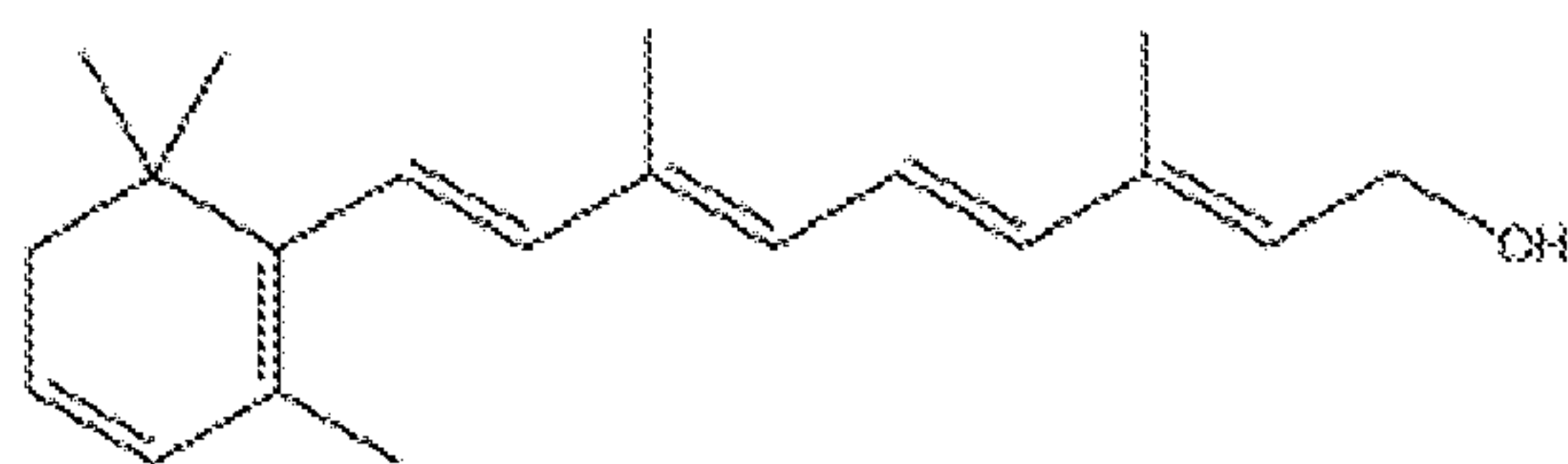
双氯芬酸钠。

维生素 A：维生素 A 包括视黄醇（A1）、3-脱氢视黄醇（A2），是一类脂溶性维生素，对热、酸、碱稳定。维生素 A 有促进生长、繁殖，维持骨骼、上皮组织、视力和粘膜上皮正常分泌等多种生理功能，维生素 A 及其类似物有阻止癌前期病变的作用。维生素 A 缺乏时表现为生长迟缓、暗适应能力减退而形成夜盲症。维生素 A 滴眼液用于促进角膜细胞的生长以及干眼症的治疗。其中视黄醇（A1）、3-脱氢视黄醇（A2）的结构式如下所

示：

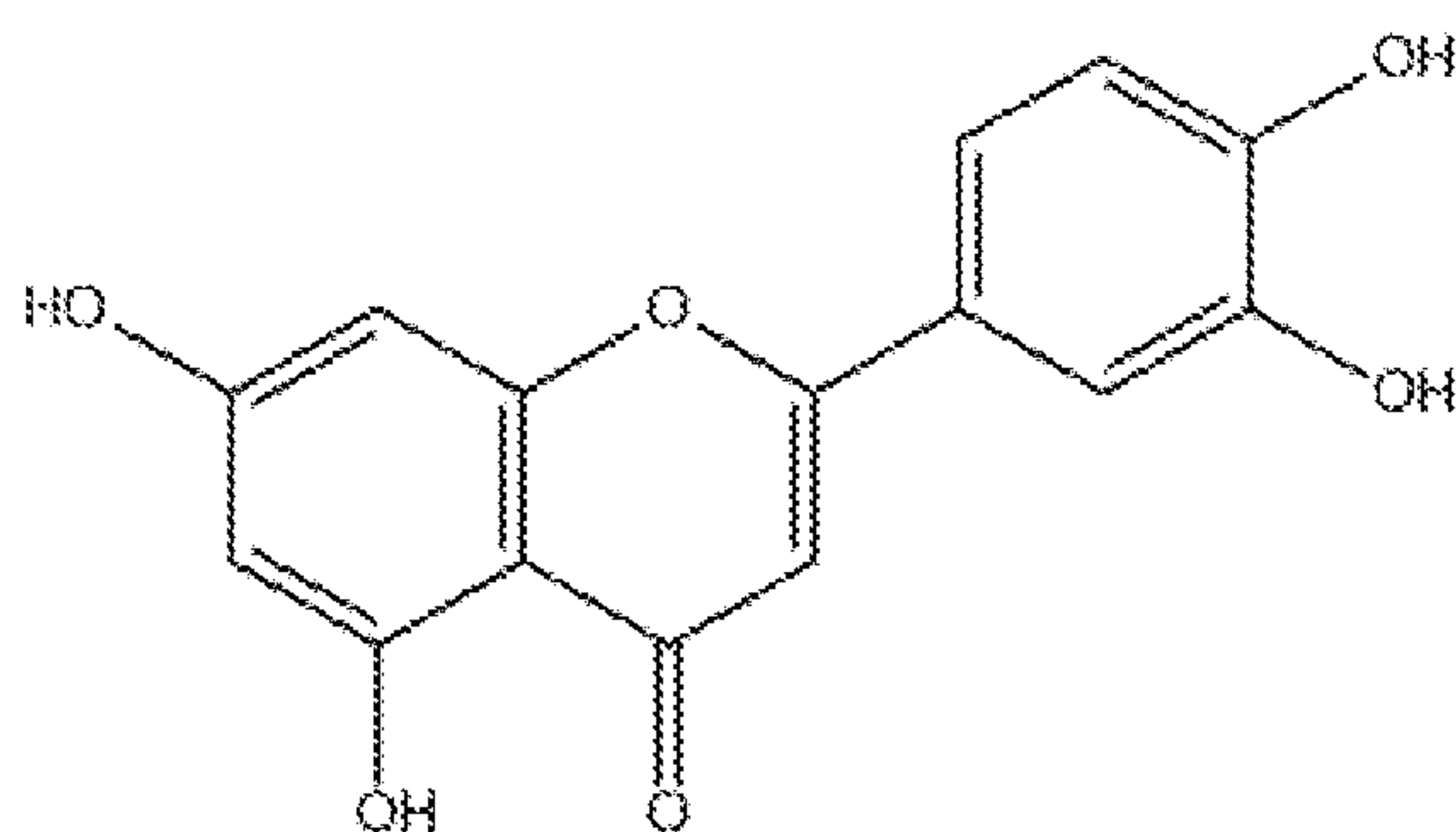


A1,

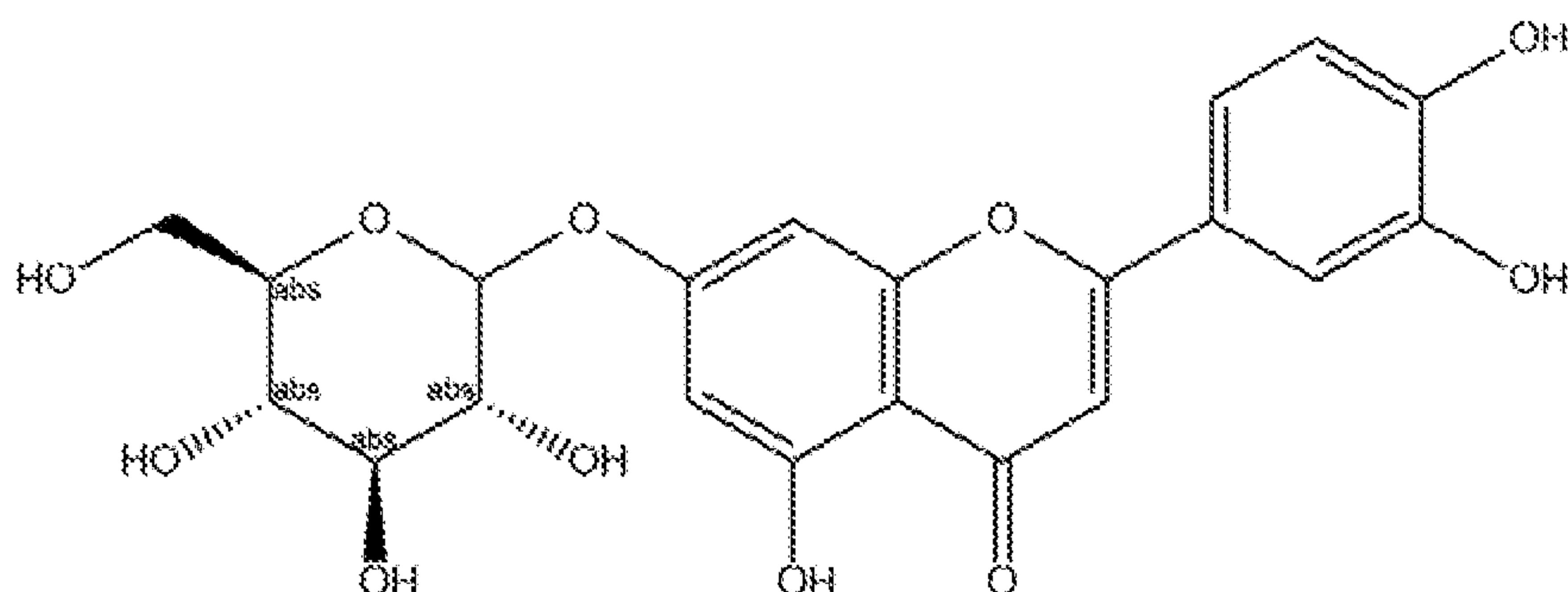


A2。

木犀草素：是一种天然黄酮类化合物，存在于多种植物中。具有多种药理活性，如消炎、抗过敏、降尿酸、抗肿瘤、抗菌、抗病毒等，临床主要用于止咳、祛痰、消炎、降尿酸、治疗心血管疾病，以及治疗肌萎缩性脊髓侧索硬化症、SARS、肝炎等。木犀草素，多以糖苷的形式存在于多种植物中。木犀草素及其糖苷形式的结构式分别如下所示：



木犀草素，



木犀草苷。

本发明中，所述的盐通常是药学上可接受的盐，具体如上所述。在某一较佳实施例中，所述的药学上可接受的盐为钠盐，例如为双氯芬酸钠。

较佳地，所述的糖苷为木犀草苷。

较佳地，所述的维生素 A 为维生素 A1 和/或维生素 A2。在本发明某一较佳实施例

中，所述的维生素 A 可以购自国药，国药编号为 CATOCCHM700908，CAS: 68-26-8。

较佳地，所述滴剂中，所述双氯芬酸(或例如其钠盐双氯芬酸钠)的含量为 5-20 $\mu\text{mol/L}$ ，例如为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。

较佳地，所述滴剂中，所述维生素 A 的含量为 2-10 $\mu\text{mol/L}$ ，例如为 5 $\mu\text{mol/L}$ 。

较佳地，所述滴剂中，所述木犀草素（或例如其糖苷形式木犀草苷）的含量为 2-10 $\mu\text{mol/L}$ ，例如为 5 $\mu\text{mol/L}$ 。

在某一较佳实施例中，所述滴剂由 10 $\mu\text{mol/L}$ 转甲状腺素蛋白、辅料、10 $\mu\text{mol/L}$ 双氯芬酸钠和生理盐水组成，所述辅料为 6 mg/mL 羧甲基纤维素钠、0.4 mg/mL 右旋糖酐 70、20 mg/mL 硫酸软骨素 A 钠盐以及 2%（质量体积百分比）透明质酸中的任意一种。

在某一较佳实施例中，所述滴剂由 10 $\mu\text{mol/L}$ 转甲状腺素蛋白、辅料、5 $\mu\text{mol/L}$ 维生素 A、5%（v/v）吐温 80 和生理盐水组成，所述辅料为 6 mg/mL 羧甲基纤维素钠、0.4 mg/mL 右旋糖酐 70、20 mg/mL 硫酸软骨素 A 钠盐以及 2%（质量体积百分比）透明质酸中的任意一种。

在某一较佳实施例中，所述滴剂由 10 $\mu\text{mol/L}$ 转甲状腺素蛋白、辅料、5 $\mu\text{mol/L}$ 木犀草苷和生理盐水组成，所述辅料为 6 mg/mL 羧甲基纤维素钠、0.4 mg/mL 右旋糖酐 70、20 mg/mL 硫酸软骨素 A 钠盐以及 2%（质量体积百分比）透明质酸中的任意一种。

当所述滴剂含有上述化合物时，所述滴剂的制备方法包括将所述化合物与所述的转甲状腺素蛋白和/或融合蛋白混合即可。

为了解决上述技术问题，本发明第三方面提供了一种滴剂（例如以滴眼液的形式），其含有转甲状腺素蛋白、和/或转甲状腺素蛋白与药物组成的融合蛋白；所述药物为蛋白质类和/或多肽类药物，所述转甲状腺素蛋白如（a）、（b）或（c）所示：

（a）由 SEQ ID NO: 1 所示氨基酸组成的蛋白质；

（b）在（a）中的氨基酸序列上经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸的序列所示的具有抑制血管新生功能的由（a）衍生的蛋白质；

（c）在（a）或（b）中的氨基酸序列上经过亲水性修饰或疏水性修饰的序列所示的蛋白质。

较佳地，所述（b）中，所述的由（a）衍生的蛋白质为在（a）中的氨基酸序列上经过 22 个氨基酸的取代。

较佳地，所述（b）中，所述的由（a）衍生的蛋白质为在（a）中的氨基酸序列上经过 25 个氨基酸的取代。

较佳地，所述(b)中，所述的由(a)衍生的蛋白质为在(a)中的氨基酸序列的 T3、T5、I26、N27、H31、R34、A36、A37、D38、D39、T40、S50、E61、E63、V65、I68、K70、I73、A81、H90、E92、P102、R104、T123、K126 和/或 E127 发生取代。更佳地，所述(b)中，所述的由(a)衍生的蛋白质为在(a)中的氨基酸序列上经过 T3G、T5A、I26V、N27D、H31K、R34K、A36T、D39G、T40S、S50A、E61D、E63K、V65T、I68V、K70R、I73L、H90Y、P102H、R104H、T123S、K126Q 和 E127N 的取代。更佳地，所述(b)中，所述的由(a)衍生的蛋白质为在(a)中的氨基酸序列上经过 T3G、T5A、I26V、N27D、H31K、R34K、A36T、A37S、D38E、D39G、T40S、S50A、E61D、E63K、I68V、K70R、I73L、A81T、H90F、E92D、P102H、R104H、T123S、K126Q 和 E127N 的取代。

较佳地，所述(b)中，所述的由(a)衍生的蛋白质为在(a)中的氨基酸序列上经过 5 个氨基酸的缺失。更佳地，所述(b)中，所述的由(a)衍生的蛋白质为在(a)中的氨基酸序列的第 123-127 位发生缺失。

较佳地，所述(b)中，所述的由(a)衍生的蛋白质的氨基酸序列优选如 SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10 或 SEQ ID NO: 11 所示。

较佳地，所述(c)中，所述亲水性修饰或疏水性修饰在(a)中的氨基酸序列上的第 10 位的半胱氨酸上进行。较佳地，所述疏水性修饰为使用长链疏水片段例如正十二烷进行修饰。在本发明某一较佳实施例中，所述蛋白质为在(a)中的氨基酸序列上的第 10 位的半胱氨酸通过马来酰亚胺连接正十二烷修饰的序列所示的蛋白质。本发明中，所述的在(a)中的氨基酸序列上的第 10 位的半胱氨酸还可以是连接有 5-氨基荧光素等荧光标记，以便追踪修饰后的蛋白。

较佳地，当所述滴剂含有转甲状腺素蛋白与蛋白质类和/或多肽类药物组成的融合蛋白时，所述融合蛋白的含量 4-30 $\mu\text{mol/L}$ ，优选 10-15 $\mu\text{mol/L}$ 。

较佳地，当所述滴剂含有转甲状腺素蛋白时，所述转甲状腺素蛋白的含量为 4-30 $\mu\text{mol/L}$ ，优选 5-30 $\mu\text{mol/L}$ ，更优选 10-20 $\mu\text{mol/L}$ ，例如 10、15、20 $\mu\text{mol/L}$ 。

较佳地，所述滴剂中还含有生理盐水。本发明中，所述的生理盐水的使用量可按照本领域规定的标准进行使用即可。

较佳地，所述滴剂中还含有表面活性剂，所述表面活性剂例如为吐温 80，其含量优选为 5% (v/v)。

较佳地，所述滴剂中还含有透明质酸，所述透明质酸的质量体积百分比的含量 $\leq 6\%$ ，优选 1-4%，更优选 2%。

在本发明某一较佳实施例中，所述滴剂（例如以滴眼液的形式）还含有生理盐水与

1-6%透明质酸。

在本发明某一较佳实施例中，所述滴剂（例如以滴眼液的形式）还含有生理盐水与1-4%透明质酸。

在本发明某一较佳实施例中，所述滴剂（例如以滴眼液的形式）还含有生理盐水与2%透明质酸。

较佳地，所述滴剂优选滴眼液。

较佳地，所述滴剂为抑制眼部视网膜渗漏和/或降低视网膜新生血管数的滴剂，优选为治疗糖尿病视网膜病变、老年性黄斑变性和/或早产儿视网膜病变的滴剂。

较佳地，所述滴剂的每日滴加次数为1-3次，每次滴加量优选为0.3-0.8 nmol 蛋白/眼。

较佳地，所述滴剂以每日2次、每次1滴、持续3个月进行施用；和/或，所述滴剂以每日1次、每次1滴、持续5天进行施用；和/或，所述滴剂以每日2次、每次1滴、持续2周进行施用。

较佳地，编码所述转甲状腺素蛋白的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示。

较佳地，所述转甲状腺素蛋白通过使用重组表达载体进行表达，所述重组表达载体的骨架质粒中的启动子为鼠李糖诱导型启动子，优选为 rhaPBAD 启动子。

较佳地，所述转甲状腺素蛋白通过使用重组表达载体进行表达，所述重组表达载体的骨架载体为 pET-21a 或与其具有 25%及以上同源性的载体，所述与其具有 25%及以上同源性的载体的序列优选如 SEQ ID NO: 8 所示。

较佳地，表达所述转甲状腺素蛋白的重组质粒的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示。

较佳地，所述转甲状腺素蛋白可以是在微生物细胞中进行表达（形成转化体的形式），并进一步可以经过纯化；所述的微生物细胞可以为大肠杆菌，所述大肠杆菌包括但不限于 *E. coli* BL21、*E. coli* BL21 (DE3)、*E. coli* JM109、*E. coli* DH5α、*E. coli* K12 或 *E. coli* TOP10。所述纯化可以通过内毒素吸附柱（例如使用 Pierce™ High Capacity Endotoxin Removal Spin Columns, ThermoFisher）去除内毒素，通过 0.22 μm 孔径滤膜去除残留菌体。

较佳地，表达所述转甲状腺素蛋白时，通过培养包含所述转甲状腺素蛋白的基因的转化体至所得菌体的 OD₆₀₀ 达到 1.5-2.0（例如 1.6、1.7、1.8 或 1.9）时进行表达。

较佳地，表达所述转甲状腺素蛋白时为使用诱导表达的试剂进行诱导表达，所述诱导表达的试剂的质量体积百分比为 0.1-2%，例如 0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.7%、0.8%、1.2% 或 1.6%，所述诱导表达的时间优选为 8-20 h，例如 10 h、12 h、14 h、16 h、17 h、

18 h 或 19 h；所述诱导表达的试剂优选为鼠李糖或者 IPTG。

较佳地，所述融合蛋白的序列如 SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 7 所示。

较佳地，所述转甲状腺素蛋白与所述蛋白质类和/或多肽类药物融合表达；所述融合优选是将所述蛋白质类和/或多肽类药物融合在所述转甲状腺素蛋白的 N 端或 C 端；所述转甲状腺素蛋白与所述蛋白质类和/或多肽类药物融合优选是在微生物细胞中表达，并经过纯化。所述的微生物细胞可以为大肠杆菌，所述大肠杆菌包括但不限于 *E. coli* BL21、*E. coli* BL21 (DE3)、*E. coli* JM109、*E. coli* DH5 α 、*E. coli* K12 或 *E. coli* TOP10。所述纯化优选是通过内毒素吸附柱去除内毒素，再通过 0.22 μ m 孔径滤膜去除残留菌体。

较佳地，所述蛋白质类和/或多肽类药物包括但不限于：溶菌酶、白蛋白和/或 EGFR 抗体，且分子量不超过 45 kDa；所述溶菌酶优选为鸡蛋清溶菌酶，其 GenBank 登录号为 AAL69327.1；所述白蛋白优选为鸡蛋清白蛋白。

较佳地，所述蛋白质类和/或多肽类药物包括治疗眼部视网膜渗漏和/或视网膜血管新生类眼部疾病例如糖尿病视网膜病变、老年性黄斑变性和/或早产儿视网膜病变的蛋白质类和/或多肽类药物。

在本发明某一较佳实施例中，上述滴剂例如滴眼液中转甲状腺素蛋白的含量为 5-20 μ mol/L，每日 2 次，每次 1 滴，持续 3 个月。

在本发明某一较佳实施例中，上述滴剂例如滴眼液中转甲状腺素蛋白的含量为 10-15 μ mol/L，每日 2 次。

在本发明某一较佳实施例中，上述滴剂例如滴眼液中转甲状腺素蛋白的含量为 10 μ mol/L，每日 2 次。

在本发明某一较佳实施例中，上述滴剂例如滴眼液中转甲状腺素蛋白的含量为 5-20 μ mol/L，每日 1 次，每次 1 滴，持续 5 天。

在本发明某一较佳实施例中，上述滴剂例如滴眼液中转甲状腺素蛋白的含量为 10-15 μ mol/L，每日 1 次。

在本发明某一较佳实施例中，上述滴剂例如滴眼液中转甲状腺素蛋白的含量为 10 μ mol/L，每日 1 次。

在本发明某一较佳实施例中，上述滴剂例如滴眼液中转甲状腺素蛋白的含量为 5-20 μ mol/L，每日 2 次，每次 1 滴，持续 2 周。

在本发明某一较佳实施例中，上述滴剂例如滴眼液中转甲状腺素蛋白的含量为 10-15 μ mol/L，每日 2 次。

在本发明某一较佳实施例中，上述滴剂例如滴眼液中转甲状腺素蛋白的含量为 10

μmol/L，每日 2 次。

本发明中，所列的滴眼剂量和滴剂中转甲状腺素蛋白的含量仅为建议。本领域技术人员应当理解的是，根据本发明的剂量和含量进行适度调整以施用于合适的受试者时的用量也应该在本发明的保护范围内。

本发明人在实验过程中还意外发现，使用羧甲基纤维素或其盐例如羧甲基纤维素钠、硫酸软骨素或其盐例如硫酸软骨素 A 钠盐、右旋糖酐例如右旋糖酐 70、透明质酸等材料能够与转甲状腺素蛋白和/或融合蛋白相互牵制、协同配合，形成一个有机整体，从而可以对与眼部血管新生和/或眼部视网膜渗漏等相关的眼部疾病例如糖尿病视网膜病变、老年性黄斑变性和/或早产儿视网膜病变进行协同治疗，最终获得了较佳的治疗效果。而本领域技术人员仅知晓羧甲基纤维素或其盐例如羧甲基纤维素钠、硫酸软骨素或其盐例如硫酸软骨素 A 钠盐、右旋糖酐例如右旋糖酐 70、透明质酸等材料具有湿润等作用，通常可以将它们用于制备滴眼液以能够有效缓解眼部干燥等。

基于此，上述滴剂中进一步可以含有药学上可接受的辅料，所述药学上可接受的辅料选自“羧甲基纤维素或其盐、其溶剂合物、其药学上可接受的盐的溶剂合物、或、其晶型”、“硫酸软骨素或其盐、其溶剂合物、其药学上可接受的盐的溶剂合物、或、其晶型”、“右旋糖酐或其盐、其溶剂合物、其药学上可接受的盐的溶剂合物、或、其晶型”、和“透明质酸或其盐、其溶剂合物、其药学上可接受的盐的溶剂合物、或、其晶型”中的一种或多种。

较佳地，所述羧甲基纤维素或其盐、其溶剂合物、其药学上可接受的盐的溶剂合物、或、其晶型的黏度为 800-1200 CP。

较佳地，所述硫酸软骨素为硫酸软骨素 A。

较佳地，所述右旋糖酐为右旋糖酐 70。所述的右旋糖酐 70 的分子量通常在 64000-76000 范围内。

较佳地，所述透明质酸的分子量为 10000-500000。

在某一较佳实施例中，所述的“羧甲基纤维素或其盐”中所述的“盐”可为钠盐或钙盐，例如为羧甲基纤维素钠。

在某一较佳实施例中，所述的“硫酸软骨素或其盐”中所述的“盐”可为钠盐或钙盐，例如为硫酸软骨素 A 钠盐。

较佳地，所述滴剂中，所述羧甲基纤维素或其盐、其溶剂合物、其药学上可接受的盐的溶剂合物、或、其晶型的浓度为 0-8 mg/mL 但不为 0（即 $0 < \text{浓度} \leq 8 \text{ mg/mL}$ ），优选为

2、4、6 或 8 mg/mL。

较佳地，所述滴剂中，所述硫酸软骨素或其盐、其溶剂合物、其药学上可接受的盐的溶剂合物、或、其晶型的浓度为 0-40 mg/mL 但不为 0（即 $0 < \text{浓度} \leq 40 \text{ mg/mL}$ ），优选为 10、20、30 或 40 mg/mL。

较佳地，所述滴剂中，所述右旋糖酐或其盐、其溶剂合物、其药学上可接受的盐的溶剂合物、或、其晶型的浓度为 0-0.8 mg/mL 但不为 0（即 $0 < \text{浓度} \leq 0.8 \text{ mg/mL}$ ），优选为 0.2、0.4、0.6 或 0.8 mg/mL。

较佳地，所述滴剂中，所述透明质酸或其盐、其溶剂合物、其药学上可接受的盐的溶剂合物、或、其晶型的质量体积百分比的含量 $\leq 6\%$ ，优选 1-4%，更优选 2%。

在某一较佳实施例中，所述滴剂由 10 $\mu\text{mol/L}$ 转甲状腺素蛋白、6 mg/mL 羧甲基纤维素钠和生理盐水组成。

在某一较佳实施例中，所述滴剂由 10 $\mu\text{mol/L}$ 转甲状腺素蛋白、0.4 mg/mL 右旋糖酐 70 和生理盐水组成。

在某一较佳实施例中，所述滴剂由 10 $\mu\text{mol/L}$ 转甲状腺素蛋白、20 mg/mL 硫酸软骨素 A 钠盐和生理盐水组成。

在某一较佳实施例中，所述滴剂由 10 $\mu\text{mol/L}$ 转甲状腺素蛋白、2%透明质酸和生理盐水组成。

当所述滴剂含有上述药学上可接受的辅料时，所述滴剂的制备方法包括将所述的药学上可接受的辅料与所述的转甲状腺素蛋白和/或融合蛋白混合即可。

本发明人在实验过程中还意外发现，将转甲状腺素蛋白和/或融合蛋白与特定化合物共同施用眼部时，所述的化合物能够与转甲状腺素蛋白和/或融合蛋白协同配合、共同作用，从而能够有效治疗或缓解与眼部视网膜血管新生和/或眼部视网膜渗漏等相关的眼部疾病，使得治疗效果更佳。

基于此，上述滴剂中进一步可以含有化合物、其药学上可接受的盐、其糖苷、其溶剂合物、其药学上可接受的盐的溶剂合物、或其晶型；所述化合物选自双氯芬酸、维生素 A 和木犀草素中的一种或多种。

本发明中，所述的盐通常是药学上可接受的盐，具体如上所述。在某一较佳实施例中，所述的药学上可接受的盐为钠盐，例如为双氯芬酸钠。

较佳地，所述的糖苷为木犀草苷。

较佳地，所述的维生素 A 为维生素 A1 和/或维生素 A2。在本发明某一较佳实施例

中，所述的维生素 A 可以购自国药，国药编号为 CATOCCHM700908，CAS: 68-26-8。

较佳地，所述滴剂中，所述双氯芬酸(或例如其钠盐双氯芬酸钠)的含量为 5-20 $\mu\text{mol/L}$ ，例如为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。

较佳地，所述滴剂中，所述维生素 A 的含量为 2-10 $\mu\text{mol/L}$ ，例如为 5 $\mu\text{mol/L}$ 。

较佳地，所述滴剂中，所述木犀草素（或例如其糖苷形式木犀草苷）的含量为 2-10 $\mu\text{mol/L}$ ，例如为 5 $\mu\text{mol/L}$ 。

在某一较佳实施例中，所述滴剂由 10 $\mu\text{mol/L}$ 转甲状腺素蛋白、辅料、10 $\mu\text{mol/L}$ 双氯芬酸钠和生理盐水组成，所述辅料为 6 mg/mL 羧甲基纤维素钠、0.4 mg/mL 右旋糖酐 70、20 mg/mL 硫酸软骨素 A 钠盐以及 2%（质量体积百分比）透明质酸中的任意一种。

在某一较佳实施例中，所述滴剂由 10 $\mu\text{mol/L}$ 转甲状腺素蛋白、辅料、5 $\mu\text{mol/L}$ 维生素 A、5%（v/v）吐温 80 和生理盐水组成，所述辅料为 6 mg/mL 羧甲基纤维素钠、0.4 mg/mL 右旋糖酐 70、20 mg/mL 硫酸软骨素 A 钠盐以及 2%（质量体积百分比）透明质酸中的任意一种。

在某一较佳实施例中，所述滴剂由 10 $\mu\text{mol/L}$ 转甲状腺素蛋白、辅料、5 $\mu\text{mol/L}$ 木犀草苷和生理盐水组成，所述辅料为 6 mg/mL 羧甲基纤维素钠、0.4 mg/mL 右旋糖酐 70、20 mg/mL 硫酸软骨素 A 钠盐以及 2%（质量体积百分比）透明质酸中的任意一种。

当所述滴剂含有上述化合物时，所述滴剂的制备方法包括将所述化合物与所述的转甲状腺素蛋白和/或融合蛋白混合即可。

本发明中，所述的转甲状腺素蛋白是一种四聚体载体蛋白，可在血浆和脑脊液中运输甲状腺激素。研究发现转甲状腺素蛋白进入细胞是通过高密度脂蛋白受体 SRB1 所介导的（Landers, K.A., et al., Transthyretin uptake in placental cells is regulated by the high-density lipoprotein receptor, scavenger receptor class B member 1. Mol Cell Endocrinol, 2018. 474: p. 89-96）。从结构上看（三维结构见图 1），转甲状腺素蛋白的四聚体表面具有显著的亲水结构域（深色）与疏水结构域（浅色），转甲状腺素蛋白的核心疏水结构域能够携带强疏水的甲状腺素分子跨越各种细胞（见图 2）。此外，不同物种的转甲状腺素蛋白的氨基酸序列高度保守，人源的转甲状腺素蛋白与 SD 大鼠及 C57BL/6 小鼠来源的转甲状腺素蛋白的氨基酸序列相似度>95%（见图 3）。

本发明人在制备滴剂的过程中，发现转甲状腺素蛋白在大肠杆菌内的重组表达水平极低，大部分为不可溶的包涵体形式。常用的提高蛋白表达量的方法有表达载体选择，发酵条件优化（温度、pH 值、时间、诱导剂浓度等）或者分子伴侣共表达辅助等，但是本发明人尝试了上述知悉方法均不能有效提升转甲状腺素蛋白在大肠杆菌中的表达水平。

本发明人经过大量实验，发现基于 pET-21a 质粒、利用鼠李糖诱导型（例如 rhaPBAD 启动子）替代质粒上的启动子（例如 T7 启动子）后，或对 TTR 的核苷酸序列进行密码子优化（核苷酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示）后，或对于 pET-21a 质粒本身进行序列重构后，或对表达蛋白时的 OD 值、诱导蛋白表达的试剂的用量、诱导表达的时间进行优化后，能够构建转甲状腺素蛋白成熟片段（NCBI Reference Sequence: NP_000362.1）的高效生产质粒，从而使得最终所得转甲状腺素蛋白的表达量显著提升。因此，本发明中进一步提供了一种表达转甲状腺素蛋白的基因、包含其的重组表达载体和转化体，一种用于表达转甲状腺素蛋白的重组质粒，一种转甲状腺素蛋白的表达方法等。使用本发明的表达转甲状腺素蛋白的基因、或使用表达转甲状腺素蛋白的重组质粒进行表达、或使用本发明所述的转甲状腺素蛋白的表达方法时，转甲状腺素蛋白的表达量显著提高。具体的：

本发明第四方面还提供了一种表达转甲状腺素蛋白的基因，所述基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示。

本发明第五方面还提供了一种重组表达载体，所述重组表达载体中含如本发明第四方面所述的基因。

较佳地，所述重组表达载体的骨架载体中的启动子为鼠李糖诱导型启动子；所述鼠李糖诱导型启动子优选为 rhaPBAD 启动子。

较佳地，所述重组表达载体的骨架载体为 pET-21a 或与 pET-21a 具有 25%及以上同源性的载体，所述与 pET-21a 具有 25%及以上同源性的载体的序列优选如 SEQ ID NO: 8 所示。

更佳地，所述重组表达载体的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示。

本发明第六方面还提供了一种重组质粒，其序列如 SEQ ID NO: 8 所示。

本发明第七方面还提供了一种表达转甲状腺素蛋白的重组质粒，所述重组质粒包含骨架质粒和转甲状腺素蛋白的表达片段，

其中，所述骨架质粒中的启动子为鼠李糖诱导型启动子；和/或，所述骨架质粒的骨架载体为 pET-21a 或与其具有 25%及以上同源性的载体，所述与其具有 25%及以上同源性的载体的序列优选如 SEQ ID NO: 8 所示。

较佳地，编码所述转甲状腺素蛋白的表达片段的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示。

较佳地，所述鼠李糖诱导型启动子为 rhaPBAD 启动子。

更佳地，所述重组质粒的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示。

本发明第八方面还提供了一种转化体，其包括如本发明第四方面所述的基因、或者如本发明第五方面所述的重组表达载体、或者如本发明第六或七方面所述的重组质粒。

较佳地，在宿主中导入如本发明第四方面所述的基因、如本发明第五方面所述的重组表达载体或者如本发明第六或七方面所述的重组质粒，所述宿主为大肠杆菌，优选为大肠杆菌 *E.coli* BL21 (DE3)、*E.coli* TG1、*E.coli* JM109、*E.coli* DH5 α 、*E.coli* K12 或 *E.coli* TOP10。

本发明第九方面还提供了一种转甲状腺素蛋白的制备方法，其包括以下步骤：

- (1) 获得如本发明第八方面所述的转化体；
- (2) 筛选所述转化体，表达并纯化所述蛋白。

较佳地，所述表达为培养所述转化体至所得菌体的 OD₆₀₀ 达到 1.5-2.0(例如 1.6、1.7、1.8 或 1.9) 时进行表达。

较佳地，所述表达为使用诱导表达的试剂进行诱导表达，所述诱导表达的试剂的质量体积百分比为 0.1-2%，例如 0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.7%、0.8%、1.2%或 1.6%，所述诱导表达的时间优选为 8-20 h，例如 10 h、12 h、14 h、16 h、17 h、18 h 或 19 h；所述诱导表达的试剂优选为鼠李糖或者 IPTG。

本发明第十方面还提供了一种转甲状腺素蛋白的表达方法，其包括获得包含转甲状腺素蛋白的基因的转化体并筛选、表达、纯化所述转甲状腺素蛋白的步骤。

较佳地，所述表达为使用诱导表达的试剂进行诱导表达，所述诱导表达的试剂的质量体积百分比为 0.1-2%，例如 0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.7%、0.8%、1.2%或 1.6%，所述诱导表达的时间优选为 8-20 h，例如 10 h、12 h、14 h、16 h、17 h、18 h 或 19 h；所述诱导表达的试剂优选为鼠李糖或者 IPTG。

基于上述所述，本发明人通过大量实验，还意外地发现在转甲状腺素蛋白跨越角膜屏障进入玻璃体及眼底之后，转甲状腺素蛋白可以显著抑制眼球视网膜渗漏，显著降低视网膜新生血管数，有效缓解 DR、AMD、ROP 等眼部疾病。因此，本发明中还进一步提供了转甲状腺素蛋白在制备抑制眼部视网膜渗漏和/或降低视网膜新生血管数的药物中的应用，例如，在制备治疗糖尿病视网膜病变、老年性黄斑变性和/或早产儿视网膜病等眼部疾病的药物中的应用。

本发明第十一方面还提供了转甲状腺素蛋白和/或如本发明第三方面所述的滴剂在制备抑制眼部视网膜渗漏和/或降低视网膜新生血管数的药物中的应用，优选为在制备治疗老年性黄斑变性、早产儿视网膜病变和/或糖尿病视网膜病变的药物中的应用。

较佳地，所述转甲状腺素蛋白以非注射剂型的方式存在，所述非注射剂型优选抹剂或滴剂，所述抹剂优选膏体（如眼药膏）或凝胶（如眼用凝胶），所述滴剂例如为滴眼液

(所述滴剂中的组分、使用剂量等可以如上所述)。

较佳地，使用如本发明第四方面所述的基因、如本发明第五方面所述的重组表达载体或者如本发明第六或七方面所述的重组质粒、如本发明第八方面所述的转化体表达所述的转甲状腺素蛋白。

本发明第十二方面还提供了转甲状腺素蛋白和/或如本发明第三方面所述的滴剂在治疗眼部疾病中的应用。所述的眼部疾病优选为眼部视网膜渗漏和/或视网膜血管新生相关眼部疾病，更优选为糖尿病视网膜病变、老年性黄斑变性和/或早产儿视网膜病变。所述的转甲状腺素蛋白优选如上所述。所述应用中使用的条件、剂量、施用方法等均可以如上所述进行应用。

本发明第十三方面还提供了一种治疗眼部视网膜渗漏和/或视网膜血管新生类眼部疾病例如糖尿病视网膜病变、老年性黄斑变性和/或早产儿视网膜病变等的方法，其包括施用上述转甲状腺素蛋白和/或如本发明第三方面所述的滴剂。所述方法中治疗的条件、剂量、施用方法等均可以如上所述进行。

本发明第十四方面还提供了一种使用上述的转甲状腺素蛋白将外源蛋白和/或多肽通过眼部屏障输送至眼内的方法。

在本发明的某一较佳实施例中，上述融合蛋白的制备方法为：(1) 将转甲状腺素蛋白与药物蛋白和/或多肽的编码基因连接在 pET 21a (+) 质粒上，获得重组质粒；(2) 将步骤(1) 构建的重组质粒转化至宿主细胞内进行表达；(3) 使用 TB 培养基，发酵温度为 30-40 °C，OD₆₀₀ 达到 1.5-2.0 时利用 0.1-0.5 mM IPTG 进行诱导，诱导时间为 8-16 h；(4) 通过镍柱亲和吸附纯化制备表达的目标蛋白后，通过内毒素吸附柱 (Pierce™ High Capacity Endotoxin Removal Spin Columns, ThermoFisher) 去除内毒素，通过 0.22 μm 孔径滤膜去除残留菌体。

在本发明的某一较佳实施例中，所述转甲状腺素蛋白的表达和纯化的步骤包括：将构建的 pETx- rhaPBAD -ttr 质粒 (质粒整体的核酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示) 转化入 *E. coli* BL21 (DE3) 细胞，将所得重组 *E. coli* BL21 (DE3) 在 LB 培养基中培养，制备种子液，再以 5% 的接种量，接入至 5L TB 培养基中，温度 37 °C，搅拌桨转速 150 rpm，培养至 OD₆₀₀ 为 1.5-2.0；加入 0.4-2 % 鼠李糖诱导 16-20 h。使用内毒素吸附柱 (Pierce™ High Capacity Endotoxin Removal Spin Columns, ThermoFisher) 去除内毒素，通过 0.22 μm 孔径滤膜去除残留菌体。

基于上述所述本发明人在实验过程中还意外发现，使用羧甲基纤维素或其盐例如羧

甲基纤维素钠、硫酸软骨素或其盐例如硫酸软骨素 A 钠盐、右旋糖酐例如右旋糖酐 70、透明质酸等材料能够与转甲状腺素蛋白和/或融合蛋白相互牵制、协同配合，形成一个有机整体，从而可以对与眼部血管新生和/或眼部视网膜渗漏等相关的眼部疾病例如糖尿病视网膜病变、老年性黄斑变性和/或早产儿视网膜病变进行协同治疗，最终获得了较佳的治疗效果。

本发明第十五方面还提供了一种眼用制剂，其包括转甲状腺素蛋白和药学上可接受的辅料，所述药学上可接受的辅料选自“羧甲基纤维素或其盐、其溶剂合物、其药学上可接受的盐的溶剂合物、或、其晶型”、“硫酸软骨素或其盐、其溶剂合物、其药学上可接受的盐的溶剂合物、或、其晶型”、“右旋糖酐或其盐、其溶剂合物、其药学上可接受的盐的溶剂合物、或、其晶型”、和、“透明质酸或其盐、其溶剂合物、其药学上可接受的盐的溶剂合物、或、其晶型”中的一种或多种。

较佳地，所述羧甲基纤维素或其盐、其溶剂合物、其药学上可接受的盐的溶剂合物、或、其晶型的黏度为 800-1200 CP。

较佳地，所述硫酸软骨素为硫酸软骨素 A。

较佳地，所述右旋糖酐为右旋糖酐 70。所述的右旋糖酐 70 的分子量通常在 64000-76000 范围内。

较佳地，所述透明质酸的分子量为 10000-500000。

在某一较佳实施例中，所述的“羧甲基纤维素或其盐”中所述的“盐”可为钠盐或钙盐，例如为羧甲基纤维素钠。

在某一较佳实施例中，所述的“硫酸软骨素或其盐”中所述的“盐”可为钠盐或钙盐，例如为硫酸软骨素 A 钠盐。

较佳地，所述眼用制剂中，所述羧甲基纤维素或其盐、其溶剂合物、其药学上可接受的盐的溶剂合物、或、其晶型的浓度为 0-8 mg/mL 但不为 0（即 $0 < \text{浓度} \leq 8 \text{ mg/mL}$ ），优选为 2、4、6 或 8 mg/mL。

较佳地，所述眼用制剂中，所述硫酸软骨素或其盐、其溶剂合物、其药学上可接受的盐的溶剂合物、或、其晶型的浓度为 0-40 mg/mL 但不为 0（即 $0 < \text{浓度} \leq 40 \text{ mg/mL}$ ），优选为 10、20、30 或 40 mg/mL。

较佳地，所述眼用制剂中，所述右旋糖酐或其盐、其溶剂合物、其药学上可接受的盐的溶剂合物、或、其晶型的浓度为 0-0.8 mg/mL 但不为 0（即 $0 < \text{浓度} \leq 0.8 \text{ mg/mL}$ ），优选为 0.2、0.4、0.6 或 0.8 mg/mL。

较佳地，所述滴剂中，所述透明质酸或其盐、其溶剂合物、其药学上可接受的盐的溶

剂合物、或、其晶型的质量体积百分比的含量 $\leq 6\%$ ，优选 1-4%，更优选 2%。

较佳地，所述眼用制剂中，所述转甲状腺素蛋白如 (a)、(b) 或 (c) 所示：

(a) 由 SEQ ID NO.1 所示氨基酸组成的蛋白质；

(b) 在 (a) 中的氨基酸序列上经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸的序列所示具有抑制血管新生功能的由 (a) 衍生的蛋白质；

(c) 在 (a) 或 (b) 中的氨基酸序列上经过亲水性修饰或疏水性修饰的序列所示的蛋白质。

其中，所述 (b) 中，所述的由 (a) 衍生的蛋白质的氨基酸序列可以是如 SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10 或 SEQ ID NO: 11 所示。

其中，所述 (c) 中，所述亲水性修饰或疏水性修饰可以是在 (a) 中的氨基酸序列上的第 10 位的半胱氨酸上进行，优选在 (a) 中的氨基酸序列上的第 10 位的半胱氨酸上使用长链疏水片段例如正十二烷进行所述修饰、或、在 (a) 中的氨基酸序列上的第 10 位的半胱氨酸上通过使用马来酰亚胺连接正十二烷进行所述修饰。

较佳地，所述眼用制剂中含有的所述转甲状腺素蛋白的含量为 4-30 $\mu\text{mol/L}$ ，优选 5-30 $\mu\text{mol/L}$ ，更优选 10-20 $\mu\text{mol/L}$ ，例如 10、15 或 20 $\mu\text{mol/L}$ 。

较佳地，所述眼用制剂中还可含有本领域常规使用的其他药学上可接受的辅料，例如生理盐水等。本发明中，所述的生理盐水的使用量可按照本领域规定的标准进行使用即可。

较佳地，所述眼用制剂可以是以本领域常规施用于眼部的产品形式存在，例如可以为滴剂例如滴眼液，还可以为喷剂、凝胶剂或眼用脂质体等。

较佳地，所述眼用制剂为抑制眼部视网膜渗漏和/或降低视网膜新生血管数的眼用制剂；所述眼用制剂优选为治疗糖尿病视网膜病变、老年性黄斑变性和/或早产儿视网膜病变的眼用制剂。

较佳地，所述眼用制剂以每日施用 1-3 次、每次施用量优选为 0.3-0.8 nmol 蛋白/眼进行施用。

较佳地，所述眼用制剂以每日 2 次、每次 1 滴、持续 3 个月进行施用。

较佳地，所述眼用制剂以每日 1 次、每次 1 滴、持续 5 天进行施用。

较佳地，所述眼用制剂以每日 2 次、每次 1 滴、持续 2 周进行施用。

在某一较佳实施例中，所述眼用制剂由 10 $\mu\text{mol/L}$ 转甲状腺素蛋白、6 mg/mL 羧甲基纤维素钠和生理盐水组成。

在某一较佳实施例中，所述眼用制剂由 10 $\mu\text{mol/L}$ 转甲状腺素蛋白、0.4 mg/mL 右旋

糖酐 70 和生理盐水组成。

在某一较佳实施例中，所述眼用制剂由 10 $\mu\text{mol/L}$ 转甲状腺素蛋白、20 mg/mL 硫酸软骨素 A 钠盐和生理盐水组成。

在某一较佳实施例中，所述滴剂由 10 $\mu\text{mol/L}$ 转甲状腺素蛋白、2%透明质酸和生理盐水组成。

基于上述所述，本发明人在实验过程中还意外发现，将转甲状腺素蛋白和/或融合蛋白与特定化合物共同施用眼部时，所述的化合物能够与转甲状腺素蛋白和/或融合蛋白协同配合、共同作用，从而能够有效治疗或缓解与眼部视网膜血管新生和/或眼部视网膜渗漏等相关的眼部疾病，使得治疗效果更佳。

本发明第十六方面还提供了一种眼用制剂，其包括化合物、其药学上可接受的盐、其糖苷、其溶剂合物、其药学上可接受的盐的溶剂合物、或其晶型，以及转甲状腺素蛋白；所述化合物选自双氯芬酸、维生素 A 和木犀草素中的一种或多种。

在某一较佳实施例中，所述的药学上可接受的盐为钠盐，例如为双氯芬酸钠。

较佳地，所述的糖苷为木犀草苷。

较佳地，所述的维生素 A 为维生素 A1 和/或维生素 A2。在本发明某一较佳实施例中，所述的维生素 A 可以购自国药，国药编号为 CATOCCHM700908，CAS: 68-26-8。

较佳地，所述眼用制剂中，所述转甲状腺素蛋白的含量为 4-30 $\mu\text{mol/L}$ ，优选 5-30 $\mu\text{mol/L}$ ，更优选 10-20 $\mu\text{mol/L}$ ，例如为 10、15 或 20 $\mu\text{mol/L}$ 。

较佳地，所述眼用制剂中，所述双氯芬酸（或例如其钠盐双氯芬酸钠）的含量为 5-20 $\mu\text{mol/L}$ ，例如为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。

较佳地，所述眼用制剂中，所述维生素 A 的含量为 2-10 $\mu\text{mol/L}$ ，例如为 5 $\mu\text{mol/L}$ 。

较佳地，所述眼用制剂中，所述木犀草素（或例如其糖苷形式木犀草苷）的含量为 2-10 $\mu\text{mol/L}$ ，例如为 5 $\mu\text{mol/L}$ 。

较佳地，所述眼用制剂中，所述转甲状腺素蛋白如（a）、（b）或（c）所示：

（a）由 SEQ ID NO.1 所示氨基酸组成的蛋白质；

（b）在（a）中的氨基酸序列上经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸的序列所示具有抑制血管新生功能的由（a）衍生的蛋白质；

（c）在（a）或（b）中的氨基酸序列上经过亲水性修饰或疏水性修饰的序列所示的蛋白质。

其中，所述（b）中，所述的由（a）衍生的蛋白质的氨基酸序列可以是如 SEQ ID NO:

9、SEQ ID NO: 10 或 SEQ ID NO:11 所示。

其中，所述(c)中，所述亲水性修饰或疏水性修饰在(a)中的氨基酸序列上的第10位的半胱氨酸上进行，优选在(a)中的氨基酸序列上的第10位的半胱氨酸上使用长链疏水片段例如正十二烷进行所述修饰、或、在(a)中的氨基酸序列上的第10位的半胱氨酸上通过使用马来酰亚胺连接正十二烷进行所述修饰。

较佳地，所述眼用制剂中还含有药学上可接受的辅料例如生理盐水。本发明中，所述的生理盐水的使用量可按照本领域规定的标准进行使用即可。

较佳地，所述眼用制剂中还含有药学上可接受的辅料例如表面活性剂，所述表面活性剂例如为吐温80，其含量优选为5% (v/v)。

较佳地，所述眼用制剂中还含有药学上可接受的辅料，所述辅料为羧甲基纤维素钠、右旋糖酐70、硫酸软骨素A钠盐或透明质酸。所述羧甲基纤维素钠的浓度为0-8 mg/mL 但不为0 (即 $0 < \text{浓度} \leq 8 \text{ mg/mL}$)，优选为2、4、6或8 mg/mL。所述右旋糖酐70的浓度为0-0.8 mg/mL 但不为0 (即 $0 < \text{浓度} \leq 0.8 \text{ mg/mL}$)，优选为0.2、0.4、0.6或0.8 mg/mL。所述硫酸软骨素A钠盐的浓度为0-40 mg/mL 但不为0 (即 $0 < \text{浓度} \leq 40 \text{ mg/mL}$)，优选为10、20、30或40 mg/mL。所述透明质酸的质量体积百分比的含量优选 $\leq 6\%$ ，优选1-4%，更优选2%。

较佳地，所述眼用制剂可以是以本领域常规施用于眼部的产品形式存在，例如可以为滴剂例如滴眼液，还可以为喷剂、凝胶剂或眼用脂质体等。

较佳地，所述眼用制剂以每日施用1-3次、每次施用量优选为0.3-0.8 nmol 蛋白/眼进行施用。

较佳地，所述眼用制剂以每日2次、每次1滴、持续3个月进行施用。

较佳地，所述眼用制剂以每日1次、每次1滴、持续5天进行施用。

较佳地，所述眼用制剂以每日2次、每次1滴、持续2周进行施用。

在某一较佳实施例中，所述眼用制剂由10 $\mu\text{mol/L}$ 转甲状腺素蛋白、辅料、10 $\mu\text{mol/L}$ 双氯芬酸钠和生理盐水组成，所述辅料为6 mg/mL 羧甲基纤维素钠、0.4 mg/mL 右旋糖酐70、20 mg/mL 硫酸软骨素A钠盐以及2% (质量体积百分比)透明质酸中的任意一种。

在某一较佳实施例中，所述眼用制剂由10 $\mu\text{mol/L}$ 转甲状腺素蛋白、辅料、5 $\mu\text{mol/L}$ 维生素A、5% (v/v) 吐温80和生理盐水组成，所述辅料为6 mg/mL 羧甲基纤维素钠、0.4 mg/mL 右旋糖酐70、20 mg/mL 硫酸软骨素A钠盐以及2% (质量体积百分比)透明质酸中的任意一种。

在某一较佳实施例中，所述眼用制剂由10 $\mu\text{mol/L}$ 转甲状腺素蛋白、辅料、5 $\mu\text{mol/L}$

木犀草苷和生理盐水组成，所述辅料为 6 mg/mL 羧甲基纤维素钠、0.4 mg/mL 右旋糖酐 70、20 mg/mL 硫酸软骨素 A 钠盐以及 2%（质量体积百分比）透明质酸中的任意一种。

较佳地，所述眼用制剂为抑制眼部视网膜渗漏和/或降低视网膜新生血管数的眼用制剂，所述眼用制剂优选为治疗糖尿病视网膜病变、老年性黄斑变性和/或早产儿视网膜病变的眼用制剂。

在符合本领域常识的基础上，上述各优选条件，可任意组合，即得本发明各较佳实例。

本发明所用试剂和原料均市售可得。

本发明中，所述的药学上可接受的辅料等通常可以通过商购获得，例如购自国药集团。

本发明中，所提及的化合物等通常可以通过商购获得，例如购自国药集团、百灵威科技有限公司等。

本发明中，所述的“包括或包含”可以是指除了包括后面所列举的成分，还存在其他成分；在某些情况下，也可以是指“由……组成”，即只包括后面所列举的成分而不存在其他成分。

本发明中的氨基酸简写符号如无特殊说明均为本领域常规，具体简写符号对应的氨基酸如表 1-1 所示。

表 1-1

氨基酸名称	三字母符号	单字母符号	氨基酸名称	三字母符号	单字母符号
丙氨酸（alanine）	Ala	A	亮氨酸（leucine）	Leu	L
精氨酸（arginine）	Arg	R	赖氨酸(lysine)	Lys	K
天冬酰胺（asparagine）	Asn	N	甲硫氨酸（methionine）	Met	M
天冬氨酸（asparticacid）	Asp	D	苯丙氨酸（phenylalanine）	Phe	F
半胱氨酸（cysteine）	Cys	C	脯氨酸（proline）	Pro	P
谷氨酰胺（glutamine）	Gln	Q	丝氨酸（serine）	Ser	S
谷氨酸（glutamicacid）	Glu	E	苏氨酸（threonine）	Thr	T
甘氨酸（Glicine）	Gly	G	色氨酸（tryptophan）	Trp	W
组氨酸（histidine）	His	H	酪氨酸（tyrosine）	Tyr	Y

异亮氨酸（isoleucine）	Ile	I	缬氨酸（valine）	Val	V
------------------	-----	---	-------------	-----	---

所述氨基酸对应的密码子也为本领域常规，具体氨基酸与密码子的对应关系如表 1-2 所示。

表 1-2

第一个核苷酸	第二个核苷酸				第三个核苷酸
	T	C	A	G	
T	苯丙氨酸 F	丝氨酸 S	酪氨酸 Y	半胱氨酸 C	T
	苯丙氨酸 F	丝氨酸 S	酪氨酸 Y	半胱氨酸 C	C
	亮氨酸 L	丝氨酸 S	终止密码子	终止密码子	A
	亮氨酸 L	丝氨酸 S	终止密码子	色氨酸 W	G
C	亮氨酸 L	脯氨酸 P	组氨酸 H	精氨酸 R	T
	亮氨酸 L	脯氨酸 P	组氨酸 H	精氨酸 R	C
	亮氨酸 L	脯氨酸 P	谷氨酰胺 Q	精氨酸 R	A
	亮氨酸 L	脯氨酸 P	谷氨酰胺 Q	精氨酸 R	G
A	异亮氨酸 I	苏氨酸 T	天冬酰胺 N	丝氨酸 S	T
	异亮氨酸 I	苏氨酸 T	天冬酰胺 N	丝氨酸 S	C
	异亮氨酸 I	苏氨酸 T	赖氨酸 K	精氨酸 R	A
	甲硫氨酸 M	苏氨酸 T	赖氨酸 K	精氨酸 R	G
G	缬氨酸 V	丙氨酸 A	天冬氨酸 D	甘氨酸 G	T
	缬氨酸 V	丙氨酸 A	天冬氨酸 D	甘氨酸 G	C
	缬氨酸 V	丙氨酸 A	谷氨酸 E	甘氨酸 G	A
	缬氨酸 V	丙氨酸 A	谷氨酸 E	甘氨酸 G	G

本发明的积极进步效果在于：转甲状腺素蛋白在人体内具有较好的生物相容性与安全性，不仅自身能够通过眼部屏障，还能有效地将外源蛋白和/或多肽输送到眼内，达到治疗眼部疾病的作用，在医药领域作为注射药物的替代物方面具有重要的应用前景。本发明中，通过使用滴剂进行滴眼而非直接注射的方式，转甲状腺素蛋白在治疗 DR、AMD、ROP 等眼部疾病时，转甲状腺素蛋白可跨越角膜屏障进入玻璃体及眼底，显著抑制眼球

视网膜渗漏，显著降低视网膜新生血管数，有效缓解 DR、AMD、ROP 等眼部疾病的病理现象。

附图说明

图 1 显示了转甲状腺素蛋白（TTR）的三维结构（PDB ID: 1ICT）。

图 2 显示了 TTR 核心疏水结构域携带强疏水的甲状腺素分子跨越各种细胞。

图 3 显示了人源 TTR 与 SD 大鼠、C57BL/6 小鼠、家兔来源的 TTR 氨基酸序列相似度>95%，其中，SD 大鼠来源的 TTR 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示，C57BL/6 小鼠来源的 TTR 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示。

图 4 为 pET 21a (+) -His-tag-TTR-X 质粒图。基因序列前端融合表达 His-tag 序列，并通过 *Nde*I 与 *Eco*RI 两个限制性内切酶酶切位点连接入质粒；“X”表示与 TTR 融合的蛋白。

图 5 为 *E. coli* BL21 (DE3) 表达人源转甲状腺素蛋白，融合蛋白纯化产物以及绿色荧光蛋白，鸡蛋清溶菌酶与鸡蛋清白蛋白标准品的电泳图谱。

图 6 显示了 TTR 滴眼后 C57BL/6 小鼠及 SD 大鼠的角膜、玻璃体与眼底样本（视网膜，脉络膜）中 TTR 的含量。

图 7 为人源转甲状腺素蛋白及其融合蛋白对大鼠及家兔滴眼两周后，玻璃体腔内目标蛋白的 western-blot 图谱，左眼为滴加眼，右眼为对照眼。由于人源/大鼠源/兔源 TTR 具有较高的同源性，TTR 经过滴眼后，玻璃体样本使用抗 TTR 抗体检测存在本底 TTR 阳性信号；而使用抗 His-tag 抗体检测时，滴加眼内阳性信号显著上升，说明人源 TTR 可以有效进入眼内到达玻璃体；TTR 与 GFP, Lysozyme 以及 Ovalbumin 等外源蛋白融合表达后能有效进入眼内，而未融合表达的上述蛋白则无法进入。

图 8 显示了 TTR 滴眼 STZ 诱导 SD 大鼠后的视网膜渗漏与视网膜新生血管数。

图 9 显示了 TTR 滴眼阻止了 ROP 的造模过程。

图 10 显示了 TTR 滴眼抑制了 ROP 的病理过程。

图 11 显示了 TTR 滴眼抑制了 AMD 模型的病理过程。

图 12 显示了化学修饰人源 TTR 的过程。

图 13A 显示了蛋白结构为 TTR 二聚体，双氯芬酸配体分子使用箭头指示，一分子 TTR 二聚体可以结合两分子双氯芬酸。

图 13B 显示了双氯芬酸与 TTR 氨基酸残基的相互作用。

图 14A 显示了通过 Discovery studio 软件进行分子模拟发现维生素 A1 能够与 TTR 多

聚体的疏水通道稳定结合，图中蛋白结构为 TTR 二聚体，维生素 A1 配体分子使用箭头指示，一分子 TTR 二聚体可以结合一分子维生素 A1。

图 14B 显示了维生素 A1 与 TTR 氨基酸残基的相互作用。

图 15A 显示了通过 Discovery studio 软件进行分子模拟发现维生素 A2 能够与 TTR 多聚体的疏水通道稳定结合，图中蛋白结构为 TTR 二聚体，维生素 A2 配体分子使用箭头指示，一分子 TTR 二聚体可以结合一分子维生素 A2。

图 15B 显示了维生素 A2 与 TTR 氨基酸残基的相互作用。

图 16A 显示了通过 Discovery studio 软件进行分子模拟发现木犀草苷能够与 TTR 多聚体稳定结合，图中蛋白结构为 TTR 二聚体，木犀草苷配体分子使用箭头指示，一分子 TTR 二聚体可以结合一分子木犀草苷。

图 16B 显示了木犀草苷与 TTR 氨基酸残基的相互作用。

图 17A 显示了通过 Discovery studio 软件进行分子模拟发现磺胺甲恶唑能够与 TTR 多聚体稳定结合，图中蛋白结构为 TTR 二聚体，磺胺甲恶唑配体分子使用箭头指示，一分子 TTR 二聚体可以结合一分子磺胺甲恶唑。

图 17B 显示了磺胺甲恶唑与 TTR 氨基酸残基的相互作用。

具体实施方式

下面通过实施例的方式进一步说明本发明，但并不因此将本发明限制在所述的实施例范围之中。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，按照常规方法和条件，或按照商品说明书选择。

第一部分：转甲状腺素蛋白（TTR）及其融合蛋白的制备

实施例 1：转甲状腺素蛋白的制备

转甲状腺素蛋白的制备包括如下步骤：

（1）重组质粒 pET 21a（+）- His-tag-TTR 的构建：合成核苷酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示的 His-tag-TTR（其中所用 TTR 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示，pET 21a 购于 ATCC 中国菌种保藏中心），将其用 Nde I 和 EcoR I 酶与 pET 21a（+）连接，经测序验证（测序公司为南京金斯瑞生物科技有限公司，下同），构建成功。

（2）重组 TTR 的表达和纯化：将步骤（1）构建的 pET 21a（+）- His-tag-TTR 质粒转化入 *E. coli* BL21（DE3）细胞，将所得重组 *E. coli* BL21（DE3）在 LB 培养基中培养，制备种子液，再以 5% 的接种量，接入至 5L TB 培养基中，温度 37 °C，搅拌桨转速 150 rpm，培养至 OD₆₀₀ 为 1.5-2.0；加入 0.1-0.5 mM IPTG 诱导 8-16 h（表 1）。利用高压均质

破菌并将上清液通过镍柱亲和吸附制备得到 TTR。所得蛋白通过内毒素吸附柱(Pierce™ High Capacity Endotoxin Removal Spin Columns, ThermoFisher)去除内毒素,通过 0.22 μm 孔径滤膜去除残留菌体。对 TTR 蛋白产量进行检测,结果如表 1 所示。在 OD₆₀₀ 为 1.5-1.8 时,以 0.3-0.5 mM IPTG 诱导 12-14 h,可获得的蛋白产量≥17 mg/g 湿菌体。

表 1 不同诱导条件下 TTR 的表达

(1) 诱导温度 37 °C, 培养至 OD ₆₀₀ 为 1.8 时加入不同浓度 IPTG 诱导 12 h 的蛋白产量					
IPTG (mM)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
蛋白产量 (mg/g 湿菌体)	5.4±0.6	7.6±0.3	20.8±1.6	19.4±0.9	20.2±1.1
(2) 诱导温度 37 °C, 培养至 OD ₆₀₀ 为不同值时加入 0.3 mM IPTG 诱导 12 h 的蛋白产量					
OD ₆₀₀	1.5	1.6	1.8	1.9	2.0
蛋白产量 (mg/g 湿菌体)	17.4±1.2	19.2±1.5	20.8±1.6	16.3±1.2	14.4±1.3
(3) 诱导温度 37 °C, 培养至 OD ₆₀₀ 为 1.8 时加入 0.3 mM IPTG 诱导不同时间的蛋白产量					
诱导时间 (h)	8	10	12	14	16
蛋白产量 (mg/g 湿菌体)	9.3±0.8	11.4±1.2	20.8±1.6	17.3±2.2	15.8±1.7

实施例 2: 转甲状腺素蛋白-绿色荧光蛋白的融合蛋白的制备

转甲状腺素蛋白-绿色荧光蛋白的融合蛋白 (TTR-GFP) 按照如下方法制备:

(1) 重组质粒 pET 21a (+) - His-tag-TTR-GFP (以下重组质粒 pET 21a (+) - His-tag-TTR-X 质粒图如图 4 所示) 的构建: 合成如 SEQ ID NO: 5 所示的 His-tag-TTR-GFP 序列, 将其用 Nde I 和 EcoR I 酶与 pET 21a (+) 连接, 经测序验证, 构建成功。

(2) TTR-GFP 融合蛋白的表达和纯化: 将步骤 (1) 构建的重组质粒转化入 *E. coli* BL21 (DE3) 细胞, 将所得重组 *E. coli* BL21 (DE3) 在 LB 培养基中培养, 制备种子液, 以 5% 的接种量, 接入 5L TB 培养基中, 温度 37 °C, 搅拌桨转速 150 rpm, 培养 OD₆₀₀ 至 1.5-2.0; 加入 0.1-0.5 mM IPTG 进行诱导 8-16 h; 利用高压均质破菌并将上清液通过镍柱亲和吸附制备得到 TTR-GFP 融合蛋白。所得蛋白通过内毒素吸附柱 (Pierce™ High Capacity Endotoxin Removal Spin Columns, ThermoFisher) 去除内毒素, 通过 0.22 μm 孔径滤膜去除残留菌体。对 TTR-GFP 蛋白产量进行检测, 结果如表 2 所示。在 OD₆₀₀ 为 1.5-1.9 时, 以 0.3-0.5 mM IPTG 诱导 12 h, 可获得的蛋白产量≥10 mg/g 湿菌体。

表 2 不同诱导条件下 TTR-GFP 的表达

(1) 诱导温度 37 °C，培养至 OD ₆₀₀ 为 1.8 时加入不同浓度 IPTG 诱导 12 h 的蛋白产量					
IPTG (mM)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
蛋白产量 (mg/g 湿菌体)	3.2±0.1	8.5±0.6	16.4±2.2	14.2±1.4	10.3±0.7
(2) 诱导温度 37 °C，培养至 OD ₆₀₀ 为不同值时加入 0.3 mM IPTG，诱导 12 h 的蛋白产量					
OD ₆₀₀	1.5	1.6	1.8	1.9	2.0
蛋白产量 (mg/g 湿菌体)	10.2±0.9	14.3±1.1	16.4±2.2	11.6±1.8	9.6±1.0
(3) 诱导温度 37 °C，培养至 OD ₆₀₀ 为 1.8 时加入 0.3 mM IPTG 诱导不同时间的蛋白产量					
诱导时间 (h)	8	10	12	14	16
蛋白产量 (mg/g 湿菌体)	5.3±0.4	7.4±0.5	16.4±2.2	8.6±1.0	6.6±0.5

实施例 3：转甲状腺素蛋白-鸡蛋清溶酶菌的融合蛋白的制备

转甲状腺素蛋白-鸡蛋清溶酶菌的融合蛋白（TTR-Lysozyme）按照如下方法制备：

（1）重组质粒 pET 21a（+）- His-tag-TTR-Lysozyme 的构建：合成如 SEQ ID NO: 6 所示的 His-tag-TTR-Lysozyme 序列，将其用 Nde I 和 EcoR I 酶与 pET 21a（+）连接，经测序验证，构建成功。

（2）TTR-Lysozyme 融合蛋白的表达和纯化：将步骤（1）构建的 pET 21a（+）- His-tag-TTR-Lysozyme 质粒转化入 *E. coli* BL21（DE3）细胞，将所得重组 *E. coli* BL21（DE3）在 LB 培养基中培养，制备种子液，以 5%的接种量，接入 5L TB 培养基中，温度 37 °C，搅拌桨转速 150 rpm，培养 OD₆₀₀ 至 1.5-2.0；加入 0.1-0.5 mM IPTG 进行诱导 8-16 h；利用高压均质破菌并将上清液通过镍柱亲和吸附制备得到 TTR-Lysozyme 融合蛋白。所得蛋白通过内毒素吸附柱（Pierce™ High Capacity Endotoxin Removal Spin Columns, ThermoFisher）去除内毒素，通过 0.22 μm 孔径滤膜去除残留菌体。对 TTR-Lysozyme 蛋白产量进行检测，结果如表 3 所示。

表 3 不同诱导条件下 TTR-Lysozyme 的表达

(1) 诱导温度 37 °C，培养至 OD ₆₀₀ 为 1.8 时加入不同浓度 IPTG 诱导 12 h 的蛋白产量					
IPTG (mM)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
蛋白产量 (mg/g 湿菌体)	8.8±1.3	20.1±1.9	33.4±4.8	21.4±2.6	13.3±2.0

(2) 诱导温度 37 °C，培养至 OD ₆₀₀ 为不同值时加入 0.3 mM IPTG，诱导 12 h 的蛋白产量					
OD ₆₀₀	1.5	1.6	1.8	1.9	2.0
蛋白产量 (mg/g 湿菌体)	17.3±2.2	24.6±3.1	33.4±4.8	27.2±1.9	14.6±1.8
(3) 诱导温度 37 °C，培养至 OD ₆₀₀ 为 1.8 时加入 0.3 mM IPTG 诱导不同时间的蛋白产量					
诱导时间 (h)	8	10	12	14	16
蛋白产量 (mg/g 湿菌体)	20.2±1.4	28.8±3.4	33.4±4.8	30.3±2.7	25.5±3.0

实施例 4：转甲状腺素蛋白-鸡蛋清白蛋白的融合蛋白的制备

转甲状腺素蛋白-鸡蛋清白蛋白的融合蛋白（TTR-Ovalbumin）按照如下方法制备：

(1) 重组质粒 pET 21a (+) - His-tag-TTR-Ovalbumin 的构建：合成如 SEQ ID NO: 7 所示的 His-tag-TTR-Ovalbumin 序列，将其用 Nde I 和 EcoR I 酶与 pET 21a (+) 连接，经测序验证，构建成功。

(2) TTR-Ovalbumin 融合蛋白的表达和纯化：将步骤 (1) 构建的 pET 21a (+) - His-tag-TTR-Ovalbumin 质粒转化至 *E. coli* BL21 (DE3) 细胞，将所得重组 *E. coli* BL21 (DE3) 在 LB 培养基中培养，制备种子液，以 5% 的接种量，接入 5L TB 培养基中，温度 37 °C，搅拌桨转速 150 rpm，培养 OD₆₀₀ 至 1.5-2.0；加入 0.1-0.5 mM IPTG 进行诱导 8-16 h；利用高压均质破菌并将上清液通过镍柱亲和吸附制备得到 TTR-Ovalbumin 融合蛋白。所得蛋白通过内毒素吸附柱（Pierce™ High Capacity Endotoxin Removal Spin Columns, ThermoFisher）去除内毒素，通过 0.22 μm 孔径滤膜去除残留菌体。对 TTR-Ovalbumin 蛋白产量进行检测，结果如表 4 所示。

表 4 不同诱导条件下 TTR-Ovalbumin 的表达

(1) 诱导温度 37 °C培养至 OD ₆₀₀ 为 1.8 时加入不同浓度 IPTG 诱导 12 h 的蛋白产量					
IPTG (mM)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
蛋白产量 (mg/g 湿菌体)	4.2±0.3	6.3±0.4	9.8±0.7	7.3±0.6	7.5±1.2
(2) 诱导温度 37 °C，培养至 OD ₆₀₀ 为不同值时加入 0.3 mM IPTG，诱导 12 h 的蛋白产量					
OD ₆₀₀	1.5	1.6	1.8	1.9	2.0
蛋白产量 (mg/g 湿菌体)	6.7±0.5	8.3±1.1	9.8±0.7	8.4±1.2	7.3±0.6
(3) 诱导温度 37 °C，培养至 OD ₆₀₀ 为 1.8 时加入 0.3 mM IPTG 诱导不同时间的蛋白					

产量					
诱导时间 (h)	8	10	12	14	16
蛋白产量 (mg/g 湿菌体)	5.5±0.4	8.5±1.0	9.8±0.7	7.4±0.7	5.8±0.8

图 5 中显示了 *E. coli* BL21 (DE3) 表达转甲状腺素蛋白，融合蛋白纯化产物以及绿色荧光蛋白、鸡蛋清溶菌酶与鸡蛋清白蛋白标准品的电泳图谱。由图中可知，上述这些蛋白均正确表达。

实施例 5：人源转甲状腺素蛋白的重组制备

(1) 重组质粒 pETx- rhaPBAD-*ttr* 的构建：对 pET-21a 质粒（购于 ATCC 中国菌种保藏中心）进行改造重构（重构后所得质粒与原始 pET-21a 质粒在序列上的差别在约 75% 左右，具体序列如 SEQ ID NO: 8 所示），利用 rhaPBAD 启动子（鼠李糖诱导型）替代 T7 启动子，同时连接人源 TTR 优化核酸序列（如 SEQ ID NO: 2 所示，TTR 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示），所得质粒整体的核酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示。经测序验证（测序公司为南京金斯瑞生物科技有限公司），构建成功。

(2) 重组人源 TTR 的表达和纯化：将步骤 (1) 构建的 pETx- rhaPBAD -*ttr* 质粒转化入 *E. coli* BL21 (DE3) 细胞，将所得重组 *E. coli* BL21 (DE3) 在 LB 培养基中培养，制备种子液，再以 5% 的接种量，接入至 5L TB 培养基中，温度 37 °C，搅拌桨转速 150 rpm，培养至 OD₆₀₀ 为 1.5-2.0；加入 0.4-2 %（质量体积百分比）鼠李糖诱导 16-20 h（表 5）。通过高压均质机将菌体破碎后，上清液通过镍（Ni⁺）柱层析制备得到人源 TTR。使用内毒素吸附柱（Pierce™ High Capacity Endotoxin Removal Spin Columns, ThermoFisher）去除内毒素，通过 0.22 μm 孔径滤膜去除残留菌体。所得人源 TTR 蛋白产量如表 5 所示。在 OD₆₀₀ 为 1.8-2.0 时，以 1.6-2% 鼠李糖诱导 18-19 h，可获得的蛋白产量 ≥ 50 mg/g 湿菌体。

表 5 人源 TTR 的重组表达

(1) 诱导温度 37 °C，培养至 OD ₆₀₀ 为 1.8 时加入不同浓度鼠李糖诱导 18 h 的蛋白产量					
鼠李糖 (%)	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0
蛋白产量 (mg/g 湿菌体)	22.3±3.6	32.5±4.3	44.8±5.2	50.9±4.8	51.8±5.3
(2) 诱导温度 37 °C，培养至 OD ₆₀₀ 为不同值时加入 1.6% 鼠李糖诱导 18 h 的蛋白产量					
OD ₆₀₀	1.5	1.6	1.8	1.9	2.0
蛋白产量 (mg/g 湿菌体)	33.3±3.2	38.2±4.1	50.9±4.8	53.2±4.8	54.1±5.3
(3) 诱导温度 37 °C，培养至 OD ₆₀₀ 为 1.8 时加入 1.6% 鼠李糖诱导不同时间的蛋白产量					

诱导时间 (h)	16	17	18	19	20
蛋白产量 (mg/g 湿菌体)	29.9±2.8	37.6±4.2	50.9±4.8	52.2±5.2	45.8±4.7

(3) 重组大鼠源 TTR 和小鼠源 TTR 的表达和纯化同上所述，仅将人源 TTR 优化核酸序列替换成对应的鼠源 TTR 核酸序列，其余的步骤均相同。其中，大鼠源 TTR 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示，小鼠源 TTR 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示。

(4) 人源成熟 TTR 丢失 C 末端-TNPKE 后的蛋白质产物依据上述重组表达的步骤纯化得到，其产物命名为人源 TTR-CL，氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示。

(5) 化学修饰人源 TTR：设计并合成一段化学修饰基团，其是由马来酰亚胺、正十二烷以及 5-氨基荧光素连接而成的疏水性修饰片段 (Ex 490 nm, Em 520 nm)，然后将该化学修饰基团与上述重组表达及纯化的人源 TTR 中唯一的半胱氨酸 (C) 残基进行靶向的化学修饰。在 4 ℃ 情况下，人源 TTR 与化学修饰基团以 1: 5 的摩尔比例缓慢震荡反应 (反应过程如图 12 所示)。反应终止后，通过超滤去除残留的化学修饰试剂并对 TTR 进行浓缩，样品通过荧光光谱仪检测，在 490 nm 波长下激发，发射波长为 520 nm，说明成功对 TTR 的唯一半胱氨酸残基进行了靶向修饰，将其命名为人源 TTR-Modified。

实施例 6：人源 TTR 核酸序列优化前后的对比

将实施例 5 中改造重构后的 pET-21a 质粒上面的 T7 启动子利用 rhaPBAD 启动子(鼠李糖诱导型) 进行替代，与核酸序列未优化的人源 TTR 连接，构建得到重组质粒 pETx-rhaPBAD-ttr (未优化)，即所得重组质粒与实施例 5 中重组质粒 pETx-rhaPBAD-ttr 的区别仅在于 TTR 是否经过优化。再使用与实施例 5 第 (2) 部分相同的方法进行重组人源 TTR 的表达和纯化，所得结果如下表 6 所示。由表中可以看出，TTR 蛋白均有表达，且在 OD₆₀₀ 为 1.6-2.0 时，以 1.2~2%鼠李糖诱导 17~20 h，可获得的蛋白产量≥17 mg/g 湿菌体，蛋白表达量较高。

表 6 人源 TTR 的重组表达 (pETx- rhaPBAD-ttr (未优化))

(1) 诱导温度 37 ℃，培养至 OD ₆₀₀ 为 1.8 时加入不同浓度鼠李糖诱导 18 h 的蛋白产量					
鼠李糖 (%)	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0
蛋白产量 (mg/g 湿菌体)	4.2±0.5	10.2±1.0	17.1±1.1	22.3±2.1	22.5±3.2
(2) 诱导温度 37 ℃，培养至 OD ₆₀₀ 为不同值时加入 1.6%鼠李糖诱导 18 h 的蛋白产量					
OD ₆₀₀	1.5	1.6	1.8	1.9	2.0

蛋白产量 (mg/g 湿菌体)	13.2±1.7	18.3±1.6	22.3±2.1	20.4±1.8	17.7±0.9
(3) 诱导温度 37 °C, 培养至 OD ₆₀₀ 为 1.8 时加入 1.6%鼠李糖诱导不同时间的蛋白产量					
诱导时间 (h)	16	17	18	19	20
蛋白产量 (mg/g 湿菌体)	9.6±1.1	17.8±2.0	22.3±2.1	23.4±3.2	20.4±1.8

第二部分：TTR 本身及与蛋白融合后可以通过角膜屏障进入玻璃体腔及眼底

实施例 7：人源 TTR 滴眼方式跨越角膜屏障进入玻璃体腔及眼底

(1)将实施例 5 所得的人源 TTR 配置为 10 μmol/L(含有生理盐水),分别对 C57BL/6 小鼠(购于上海实验动物研究中心, 8 周龄)及 SD 大鼠(购于上海实验动物研究中心, 8 周龄)进行滴眼, 滴入一滴 (~30 μl), 等待 3 h 后处死, 分别取下角膜、玻璃体与眼底样本(视网膜, 脉络膜), 并分别提取蛋白。由于重组人源 TTR 带有 His-tag 标签, 使用兔抗-His-tag 抗体为一抗, 驴抗兔抗体为二抗, 通过 western-blot, 测定 C57BL/6 小鼠及 SD 大鼠的角膜及玻璃体与眼底样本中, 是否存在重组的人源 TTR。结果显示, 角膜组织提取蛋白中, 信号不显著, 而玻璃体与眼底样本中信号显著(图 6), 说明通过滴眼方式, TTR 可跨越角膜屏障进入玻璃体及眼底。

(2) 将实施例 5 所得的人源 TTR 配置为 5-30 μmol/L (含有生理盐水, 以及 0-6%低分子量透明质酸), 分别对 C57BL/6 小鼠(8 周龄)及 SD 大鼠(8 周龄)进行滴眼, 经过 3-72 h 后处死, 取玻璃体与眼底样本提取蛋白, 使用兔抗-His-tag 抗体为一抗, 驴抗兔抗体为二抗, 通过 ELISA, 测定 C57BL/6 小鼠及 SD 大鼠的玻璃体与眼底样本中, 人源 TTR 的含量。结果显示, 滴眼液中 TTR 含量为 10-15 μmol/L 时, 滴眼 3 h 后玻璃体与眼底样本中人源 TTR 含量达到最高峰; TTR 浓度达到 15 μmol/L 后, 再进一步增加 TTR 的浓度对增加玻璃体与眼底样本中人源 TTR 浓度的作用不大; 滴眼液中, 透明质酸含量为 2%时, 滴眼 3 h 后玻璃体与眼底样本中人源 TTR 含量达到最高峰; 滴眼后, 人源 TTR 在 C57BL/6 小鼠及 SD 大鼠玻璃体与眼底样本内的含量半衰期接近 60 h, 说明可以在玻璃体与眼底样本内有效存在 60 h, 有足够的治疗浓度和治疗时间(表 7-1)。

表 7-1 人源 TTR 跨越 C57BL/6 小鼠及 SD 大鼠角膜屏障进入玻璃体腔及眼底

(1) 人源重组 TTR (生理盐水溶液), 滴眼后 3 h, 玻璃体及眼底内人源 TTR 含量						
滴眼 TTR 浓度 (μmol/L)	5	10	15	20	25	30

C57BL/6 小鼠玻璃体及眼底样本中人源 TTR 浓度 (μmol/L)	0.84±0.07	1.81±0.19	1.75±0.20	1.83±0.21	1.88±0.17	1.87±0.20
SD 大鼠玻璃体及眼底样本中人源 TTR 浓度 (μmol/L)	1.14±0.11	2.43±0.21	2.37±0.30	2.42±0.36	2.45±0.42	2.44±0.36
(2) 人源重组 TTR (10 μmol/L) (生理盐水溶液添加不同浓度透明质酸)，滴眼后 3 h，玻璃体及眼底内人源 TTR 含量						
透明质酸浓度 (%)	0	1	2	4	6	
C57BL/6 小鼠玻璃体及眼底样本中人源 TTR 浓度 (μmol/L)	1.81±0.19	2.07±0.16	2.77±0.16	2.13±0.20	1.47±0.11	
SD 大鼠玻璃体及眼底样本中人源 TTR 浓度 (μmol/L)	2.43±0.21	2.74±0.32	3.11±0.31	3.09±0.29	3.12±0.34	
(3) 人源重组 TTR (10 μmol/L) (生理盐水溶液添加 2%透明质酸)，滴眼后 3 h 达到最高峰，此后不同时间玻璃体及眼底内人源 TTR 含量						
滴眼后取样时间 (h)	3	18	36	60	72	
C57BL/6 小鼠玻璃体及	2.77±0.16	2.01±0.22	1.73±0.13	1.40±0.11	0.87±0.10	

眼底样本中 人源 TTR 浓 度 (μmol/L)					
SD 大鼠玻璃 体及眼底样 本 中 人 源 TTR 浓 度 (μmol/L)	3.11±0.31	2.74±0.26	1.98±0.22	1.54±0.17	1.02±0.06

(3) 将实施例 5 所得的人源 TTR 以及人源 TTR-Modified 配置为 10 μmol/L (含有生理盐水, 以及 2%低分子量透明质酸), 分别对 C57BL/6 小鼠 (8 周龄) 及 SD 大鼠 (8 周龄) 进行滴眼, 经过 3-72 h 后处死, 取玻璃体与眼底样本 (视网膜, 脉络膜) 提取蛋白, 使用兔抗-His-tag 抗体为一抗, 驴抗兔抗体为二抗, 通过 ELISA, 测定 C57BL/6 小鼠及 SD 大鼠的玻璃体与眼底样本中, 人源 TTR 的含量。结果显示, 人源 TTR-Modified 经过长疏水片段修饰后, 进入玻璃体及眼底的效率显著高于未修饰的人源 TTR (表 7-2)。

表 7-2 人源 TTR 及人源 TTR-Modified 进入玻璃体腔及眼底效率比对

重组人源 TTR 以及人源 TTR-Modified (10 μmol/L) (生理盐水溶液添加 2%透明质酸), 滴眼后 3 h 达到最高峰, 此后不同时间玻璃体及眼底内人源 TTR 或人源 TTR-Modified 含量					
滴眼后取样时间(h)	3	18	36	60	72
C57BL/6 小鼠玻璃 体及眼底样本中人 源 TTR 浓 度 (μmol/L)	2.77±0.16	2.01±0.22	1.73±0.13	1.40±0.11	0.87±0.10
C57BL/6 小鼠玻璃 体及眼底样本中人 源 TTR-Modified 浓 度 (μmol/L)	3.62±0.33	2.86±0.27	2.11±0.19	1.89±0.17	1.14±0.10
SD 大鼠玻璃体及眼 底样本中人源 TTR 浓度 (μmol/L)	3.11±0.31	2.74±0.26	1.98±0.22	1.54±0.17	1.02±0.06

SD 大鼠玻璃体及眼底样本中 TTR-Modified 浓度 (μmol/L)	3.94±0.41	3.16±0.34	2.44±0.24	2.07±0.18	1.44±0.13
---	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------

实施例 8：TTR 滴眼方式跨越角膜屏障进入玻璃体腔

将实施例 1 制备的去除内毒素及细菌后的纯化的 TTR 蛋白（浓度为 4 μmol/L），通过滴眼的方式处理健康 SD 大鼠（*rattus norregicus*）（6 周龄）及新西兰大耳兔（*Oryctolagus cuniculus*）（2 月龄，~2.5 kg），左眼为滴加蛋白样本眼，右眼滴加生理盐水作为空白对照。每日滴加次数为 1-3 次，每次滴加量为 0.4-0.8 nmol。两周后摘取眼球并分离获得玻璃体样本，通过 western-blot 法初步验证（图 7A）TTR 能够从眼表进入玻璃体腔，以 Anti-His tag 抗体为一抗的 western-blot 结果显示 SD 大鼠左眼玻璃体内外源 TTR 的信号强度为右眼的 28.7 倍，新西兰大耳兔左眼玻璃体内外源 TTR 的信号强度为右眼的 35.6 倍；利用 ELISA 法，以 Anti-His tag 抗体为一抗测定玻璃体样本内 TTR 的含量（表 8，9）。结果显示，每日以 0.6 nmol 含量滴加 2 次后，SD 大鼠及新西兰大耳兔玻璃体内检测到较高值的外源 TTR 含量。

此外，图 3 中显示了人/大鼠/小鼠/家兔源转甲状腺素蛋白经同源性比对，序列相似性达到近 95%，可见图 7A 中的本体 TTR 阳性信号是眼内的同源蛋白信号。

表 8 不同处理方式下 TTR 到达 SD 大鼠眼内的效果

(1) 处理方式：左眼每次滴加 TTR 含量 0.6 nmol，滴加不同次数				
每日滴加次数		1	2	3
玻璃体内 TTR 含量 (nmol/L)	2 天	23.2±1.8	40.3±5.2	41.1±4.8
	6 天	48.9±5.4	69.7±7.4	70.6±7.6
	10 天	61.2±7.3	85.3±7.5	89.2±9.3
	14 天	70.8±6.9	103.2±9.9	107.4±10.1
(2) 处理方式：左眼每日滴加两次，滴加不同含量				
每次滴加含量 (nmol)		0.4	0.6	0.8
玻璃体内 TTR 含量 (nmol/L)	2 天	20.7±2.3	40.3±5.2	42.8±4.8
	6 天	41.5±5.2	69.7±7.4	70.2±5.9
	10 天	57.6±4.9	85.3±7.5	87.9±9.2

	14 天	66.6±7.1	103.2±9.9	107.7±10.3
--	------	----------	-----------	------------

表 9 不同处理方式下 TTR 到达新西兰大耳兔眼内的效果

(1) 处理方式：左眼每次滴加 TTR 含量 0.6 nmol，滴加不同次数				
每日滴加次数		1	2	3
玻璃体内 TTR 含量 (nmol/L)	2 天	31.5±4.2	49.5±4.5	50.2±4.3
	6 天	51.7±6.3	76.3±6.2	76.7±7.1
	10 天	82.6±7.4	97.6±8.7	99.2±8.6
	14 天	89.6±8.8	112.3±9.5	113.2±10.6
(2) 处理方式：左眼每日滴加两次，滴加不同含量				
每次滴加含量 (nmol)		0.4	0.6	0.8
玻璃体内 TTR 含量 (nmol/L)	2 天	36.6±3.5	49.5±4.5	51.1±4.6
	6 天	53.4±5.7	76.3±6.2	79.2±6.3
	10 天	81.6±7.2	97.6±8.7	101.2±9.8
	14 天	89.8±8.3	112.3±9.5	115.4±10.6

实施例 9：TTR-GFP 融合蛋白滴眼方式跨越角膜屏障进入玻璃体腔

将实施例 2 制备的去除内毒素及细菌后的纯化的 TTR-GFP 蛋白(浓度为 4 μmol/L)，通过滴眼的方式处理健康 SD 大鼠 (*rattus norregicus*) (6 周龄) 及新西兰大耳兔 (*Oryctolagus cuniculus*) (2 月龄，~2.5 kg)，左眼为滴加蛋白样本眼，右眼滴加生理盐水作为空白对照。每日滴加次数为 1-3 次，每次滴加量为 0.4-0.8 nmol。两周后摘取眼球并分离获得玻璃体样本，通过 western-blot 法初步验证 (图 7B) TTR-GFP 能够从眼表进入玻璃体腔，以 Anti-GFP 抗体为一抗的 western-blot 结果显示 SD 大鼠左眼玻璃体内外源 GFP 的信号强度为右眼的 62.3 倍，新西兰大耳兔左眼玻璃体内外源 GFP 的信号强度为右眼的 47.6 倍；以 Anti-His tag 抗体为一抗的 western-blot 结果显示 SD 大鼠左眼玻璃体内外源 TTR 的信号强度较强而右眼无信号，新西兰大耳兔左眼玻璃体内外源 TTR 的信号强度为右眼的 45.4 倍。利用 ELISA 法以 Anti-His tag 抗体为一抗测定玻璃体样本内 TTR-GFP 的含量 (表 10，11)。结果显示，每日以 0.6 nmol 含量滴加 2 次后，SD 大鼠及新西兰大耳兔玻璃体内检测到较高值的外源 TTR-GFP 含量。

表 10 不同处理方式下 TTR-GFP 到达 SD 大鼠眼内的效果

(1) 处理方式：左眼每次滴加 TTR-GFP 含量 0.6 nmol，滴加不同次数
--

每日滴加次数		1	2	3
玻璃体内 TTR-GFP 含量 (nmol/L)	2 天	18.7±1.3	32.2±2.7	33.3±3.1
	6 天	33.2±2.8	51.6±4.9	54.3±6.2
	10 天	40.2±3.6	70.3±6.4	74.2±6.9
	14 天	47.8±5.1	89.9±8.2	91.3±8.7
(2) 处理方式: 左眼每日滴加两次, 滴加不同含量				
每次滴加含量 (nmol)		0.4	0.6	0.8
玻璃体内 TTR-GFP 含量 (nmol/L)	2 天	11.6±1.7	32.2±2.7	34.6±4.0
	6 天	28.8±3.4	51.6±4.9	54.2±4.9
	10 天	46.7±5.2	70.3±6.4	73.4±7.1
	14 天	55.7±6.1	89.9±8.2	92.2±10.4

表 11 不同处理方式下 TTR-GFP 到达新西兰大耳兔眼内的效果

(1) 处理方式: 左眼每次滴加 TTR-GFP 含量 0.6 nmol, 滴加不同次数				
每日滴加次数		1	2	3
玻璃体内 TTR-GFP 含量 (nmol/L)	2 天	25.3±2.4	42.4±3.8	43.5±4.2
	6 天	40.1±3.8	61.3±5.4	64.1±5.7
	10 天	58.3±4.6	77.6±6.8	79.3±7.5
	14 天	72.2±7.3	90.2±8.7	94.3±8.6
(2) 处理方式: 左眼每日滴加两次, 滴加不同含量				
每次滴加含量 (nmol)		0.4	0.6	0.8
玻璃体内 TTR-GFP 含量 (nmol/L)	2 天	36.1±3.2	42.4±3.8	44.1±4.5
	6 天	49.9±5.6	61.3±5.4	62.3±5.8
	10 天	57.8±5.7	77.6±6.8	79.2±7.0
	14 天	72.4±6.6	90.2±8.7	91.3±9.2

实施例 10: TTR-Lysozyme 融合蛋白滴眼方式跨越角膜屏障进入玻璃体腔

将实施例 3 制备的去除内毒素及细菌后的纯化的 TTR-Lysozyme 蛋白 (浓度为 4 μmol/L), 通过滴眼的方式处理健康 SD 大鼠 (*rattus norregicus*) (6 周龄) 及新西兰大耳兔 (*Oryctolagus cuniculus*) (2 月龄, ~2.5 kg), 左眼为滴加蛋白样本眼, 右眼滴加生理盐水作为空白对照。每日滴加次数为 1-3 次, 每次滴加量为 0.4-0.8 nmol。两周后摘取眼球并分离获得玻璃体样本, 通过 western-blot 法初步验证 (图 7C) TTR-Lysozyme 能够从

眼表进入玻璃体腔，以 Anti-Lysozyme 抗体为一抗的 western-blot 结果显示 SD 大鼠左眼玻璃体内外源 Lysozyme 的信号强度为右眼的 34.6 倍，新西兰大耳兔左眼玻璃体内外源 Lysozyme 的信号强度较强而右眼无信号；以 Anti-His tag 抗体为一抗的 western-blot 结果显示 SD 大鼠左眼玻璃体内外源 TTR 的信号强度为右眼的 30.2 倍，新西兰大耳兔左眼玻璃体内外源 TTR 的信号强度为右眼的 46.3 倍。利用 ELISA 法以 Anti-His tag 抗体为一抗测定玻璃体样本内 TTR-Lysozyme 的含量（表 12，13）。结果显示，每日以 0.6 nmol 含量滴加 2 次后，SD 大鼠及新西兰大耳兔玻璃体内检测到较高值的外源 TTR-Lysozyme 含量。

表 12 不同处理方式下 TTR-Lysozyme 到达 SD 大鼠眼内的效果

(1) 处理方式：左眼每次滴加 TTR-Lysozyme 含量 0.6 nmol，滴加不同次数				
每日滴加次数		1	2	3
玻璃体内 TTR-Lysozyme 含量 (nmol/L)	2 天	22.1±1.7	37.8±3.2	39.6±4.2
	6 天	39.8±3.4	59.2±5.3	61.7±5.6
	10 天	49.9±5.1	75.6±6.9	80.5±5.9
	14 天	55.2±5.5	96.4±8.8	99.4±10.3
(2) 处理方式：左眼每日滴加两次，滴加不同含量				
每次滴加含量 (nmol)		0.4	0.6	0.8
玻璃体内 TTR-Lysozyme 含量 (nmol/L)	2 天	17.7±1.5	37.8±3.2	39.7±5.0
	6 天	36.5±3.1	59.2±5.3	66.3±5.7
	10 天	50.2±4.8	75.6±6.9	79.9±7.2
	14 天	60.3±5.4	96.4±8.8	100.4±9.6

表 13 不同处理方式下 TTR-Lysozyme 到达新西兰大耳兔眼内的效果

(1) 处理方式：左眼每次滴加 TTR-Lysozyme 含量 0.6 nmol，滴加不同次数				
每日滴加次数		1	2	3
玻璃体内 TTR-Lysozyme 含量 (nmol/L)	2 天	29.7±3.1	49.2±4.6	50.8±5.3
	6 天	48.6±5.3	63.4±5.8	65.4±6.3
	10 天	61.2±5.6	85.7±7.8	87.9±9.0
	14 天	70.4±6.7	107.2±9.6	110.2±10.4
(2) 处理方式：左眼每日滴加两次，滴加不同含量				
每次滴加含量 (nmol)		0.4	0.6	0.8

玻璃体内 TTR-Lysozyme 含量 (nmol/L)	2 天	36.1±3.2	49.2±4.6	51.8±4.7
	6 天	49.4±5.0	63.4±5.8	67.5±6.2
	10 天	70.3±6.5	85.7±7.8	89.9±9.3
	14 天	79.6±6.2	107.2±9.6	110.8±12.4

实施例 11：TTR-Ovalbumin 融合蛋白滴眼方式跨越角膜屏障进入玻璃体腔

将实施例 4 制备的去除内毒素及细菌后的纯化的 TTR-Ovalbumin 蛋白（浓度为 4 μmol/L），通过滴眼的方式处理健康 SD 大鼠（*rattus norregicus*）（6 周龄）及新西兰大耳兔（*Oryctolagus cuniculus*）（2 月龄，~2.5 kg），左眼为滴加蛋白样本眼，右眼滴加生理盐水作为空白对照。每日滴加次数为 1-3 次，每次滴加量为 0.4-0.8 nmol。两周后摘取眼球并分离获得玻璃体样本，通过 western-blot 法初步验证（图 7D）TTR-Ovalbumin 能够从眼表进入玻璃体腔，以 Anti-Ovalbumin 抗体为一抗的 western-blot 结果显示 SD 大鼠左眼玻璃体内外源 Ovalbumin 的信号强度为右眼的 25.3 倍，新西兰大耳兔左眼玻璃体内外源 Ovalbumin 的信号较强而右眼无信号；以 Anti-His tag 抗体为一抗的 western-blot 结果显示 SD 大鼠左眼玻璃体内外源 TTR 的信号信号强度为右眼的 37.8 倍，新西兰大耳兔左眼玻璃体内外源 TTR 的信号强度较强而右眼无信号。利用 ELISA 法以 Anti-His tag 抗体为一抗测定玻璃体样本内 TTR-Ovalbumin 的含量（表 14，15）。结果显示，每日以 0.6 nmol 含量滴加 2 次后，SD 大鼠及新西兰大耳兔玻璃体内检测到较高值的外源 TTR-Ovalbumin 含量。

表 14 不同处理方式下 TTR-Ovalbumin 到达 SD 大鼠眼内的效果

(1) 处理方式：左眼每次滴加 TTR-Ovalbumin 含量 0.6 nmol，滴加不同次数				
每日滴加次数		1	2	3
玻璃体内 TTR-Ovalbumin 含量 (nmol/L)	2 天	14.4±1.2	27.7±1.9	28.9±3.0
	6 天	24.3±2.1	39.4±3.2	41.3±3.5
	10 天	30.5±2.9	57.8±4.9	60.4±5.7
	14 天	36.7±3.5	70.2±6.4	73.6±8.1
(2) 处理方式：左眼每日滴加两次，滴加不同含量				
每次滴加含量 (nmol)		0.4	0.6	0.8
玻璃体内 TTR-Ovalbumin 含量 (nmol/L)	2 天	9.5±0.7	27.7±1.9	29.2±2.6
	6 天	20.2±1.9	39.4±3.2	43.1±3.0

	10 天	31.7±3.4	57.8±4.9	59.8±6.2
	14 天	43.5±4.1	70.2±6.4	74.5±6.3

表 15 不同处理方式下 TTR-Ovalbumin 到达新西兰大耳兔眼内的效果

(1) 处理方式：左眼每次滴加 TTR-Ovalbumin 含量 0.6 nmol，滴加不同次数				
每日滴加次数		1	2	3
玻璃体内 TTR-Ovalbumin 含量 (nmol/L)	2 天	23.9±2.1	31.2±2.8	33.6±3.7
	6 天	30.5±3.2	44.7±5.0	47.2±4.5
	10 天	47.5±4.6	61.3±5.7	65.6±5.9
	14 天	59.9±6.1	75.4±8.0	77.3±8.0
(2) 处理方式：左眼每日滴加两次，滴加不同含量				
每次滴加含量 (nmol)		0.4	0.6	0.8
玻璃体内 TTR-Ovalbumin 含量 (nmol/L)	2 天	19.8±2.4	31.2±2.8	34.3±3.6
	6 天	34.2±2.9	44.7±5.0	46.5±4.5
	10 天	47.6±5.1	61.3±5.7	65.1±6.4
	14 天	58.7±6.2	75.4±8.0	78.7±8.0

第三部分：TTR 治疗糖网等眼部疾病

实施例 12：人源 TTR 滴眼方式治疗 DR（糖尿病视网膜病变）SD 大鼠

8 周龄 SD 大鼠，体重 200-250 g，禁食 12-18 h，腹腔注射 2% STZ（60 mg/kg），48 h 及 72 h 后剪尾采血，血糖试纸检测均高于 16.7 mM，造模成功，获得 DR SD 大鼠。DR SD 大鼠分为 2 大组，1 组为 DR SD 大鼠不加任何处理（5 只），另外 1 组为实施例 5 所制得的人源 TTR 滴眼组，25 只，左眼每日滴加 2 次人源 TTR（5-20 μmol/L）（生理盐水+2%透明质酸），右眼滴加生理盐水+2%透明质酸；此外，另有 1 组正常 SD 大鼠（未滴眼）作为正常对照组（5 只）。所有 SD 大鼠继续饲养 3 个月后，分别剥取视网膜进行 Evans Blue（EB）染色观察视网膜血管渗漏情况，Trypsin 酶解观察新生血管密度；结果显示，STZ 诱导 SD 大鼠饲养 3 个月后，与正常对照相比，视网膜血管渗漏，新生血管数量均显著提升，而滴加人源 TTR 的眼球视网膜渗漏现象显著抑制，视网膜新生血管数显著下降（图 8），说明了 DR 的临床病理现象得到了缓解。其中，每日滴加 10 μmol/L 人源 TTR（生理盐水+2%透明质酸）的效果最佳（表 16）。

表 16 人源 TTR 治疗 STZ 诱导 SD 大鼠 DR 病理状况

人源重组 TTR（生理盐水溶液+2%透明质酸），对 STZ 诱导 SD 大鼠进行滴眼治疗 3 个月后 DR 病理状况					
滴眼 TTR 浓度（ $\mu\text{mol/L}$ ）	0	5	10	15	20
视网膜渗漏区域（%）	29.4 $\pm$ 3.1	6.2 $\pm$ 0.5	5.5 $\pm$ 0.4	5.6 $\pm$ 0.5	5.3 $\pm$ 0.5
视网膜新生血管数（10 个视野）	77 $\pm$ 6	14 $\pm$ 2	11 $\pm$ 1	13 $\pm$ 2	12 $\pm$ 1

实施例 13：人源 TTR 滴眼方式治疗 ROP（早产儿视网膜病变）SD 大鼠

出生一周乳鼠（SD 大鼠），放入高压氧舱饲养，正常对照组放入正常环境饲养（正常对照组，6 只）。高压氧舱中，一组乳鼠使用 5-20 $\mu\text{mol/L}$ 实施例 5 所制得的 TTR（生理盐水+2%透明质酸）滴眼，每天滴 1 次，每次 30 μl （ROP/TTR（造模）组，6 只）；高压氧舱中，另一组乳鼠不处理（ROP 组，24 只）；高压氧舱饲养 5 天后，将所有乳鼠从高压氧舱转移至正常环境饲养，并在 ROP 组中分出一组每日使用 5-20 $\mu\text{mol/L}$ 实施例 5 所制得的 TTR（生理盐水+2%透明质酸）滴眼，每天滴 1 次，每次 30 μl （ROP/TTR（成模）组）；而 ROP 组其余乳鼠则不加任何处理作为对照；正常环境饲养 5 天后处死乳鼠并剥取视网膜进行 EB 染色。

结果如图 9 所示，图中显示，造模过程中，正常对照组视网膜 EB 染色形态正常；ROP 组存在显著无灌注区及新生血管；而造模同时 TTR 滴眼的 ROP/TTR（造模）组则均没有形成显著的无灌注区及畸形新生血管，这说明在缺氧状态下 TTR 对正常血管有保护作用，对新生血管具有抑制作用（图 9）。

对已成模的 ROP 乳鼠进行 TTR（10 $\mu\text{mol/L}$ ）滴眼，持续 5 天。比较 ROP 及 ROP/TTR（成模）组，在实验后期（5 天），ROP 组内畸形新生血管布满视网膜后，出现大量的渗漏区域，而 TTR 滴眼能够逆转这种趋势（图 10）。

不同浓度 TTR（5-20 $\mu\text{mol/L}$ ）对已成模的 ROP 乳鼠进行滴眼，持续 5 天。在实验后期（5 天），ROP 对照组内畸形新生血管布满视网膜，出现大量的渗漏区域，而 TTR 滴眼能够逆转这种趋势，其中 10 $\mu\text{mol/L}$ TTR 滴加量效果最佳（表 17）。

表 17 人源 TTR 治疗高压氧舱诱导 SD 大鼠乳鼠 ROP 病理状况

人源重组 TTR（生理盐水溶液+2%透明质酸），对高压氧舱诱导 SD 大鼠乳鼠进行滴眼治疗 5 天后病理状况					
滴眼 TTR 浓度（ $\mu\text{mol/L}$ ）	0	5	10	15	20
视网膜渗漏区域（%）	44.7 $\pm$ 5.1	9.8 $\pm$ 1.0	3.4 $\pm$ 0.2	3.2 $\pm$ 0.2	3.3 $\pm$ 0.2

实施例 14：人源 TTR 滴眼方式治疗 AMD（老年性黄斑变性）C57BL/6 小鼠

9 周龄 C57/BL6 小鼠，用氩激光（647 nm）对视网膜进行光凝，功率 360 mW，直径 50 μm，时间 0.05 s，每眼 8 个光凝点，诱导脉络膜新生血管生成，并逐步向视网膜增生移行，获得 AMD C57BL/6 小鼠。AMD C57/BL6 小鼠分为滴眼组及未滴眼组，滴眼组 14 只，进行 TTR 滴眼，每日右眼滴加 5-20 μmol/L 实施例 5 所制得的 TTR（生理盐水+2%透明质酸）两次，每次 30 μL，左眼滴加生理盐水+2%透明质酸作为对照；未滴眼组 6 只，不做任何处理；另有未打激光组 2 只（未滴眼）作为正常对照组；滴眼 2 周后，处死动物，剥离视网膜并进行 EB 染色观察视网膜血管渗漏情况，以及 Trypsin 酶解观察新生血管密度。

结果如图 11 所示，图中显示，正常对照组视网膜 EB 染色形态正常；AMD 组存在显著视网膜渗漏及新生血管；而 10 μmol/L TTR 滴眼的 AMD/TTR 组视网膜渗漏情况及新生血管情况得到显著的缓解（图 11）。

不同浓度 TTR（5-20 μmol/L）对已成模的 AMD 小鼠进行滴眼，持续两周。AMD 对照组内出现较多的渗漏区域，新生血管数量显著增多，而 TTR 滴眼能够逆转这种趋势，其中 10 μmol/L TTR 滴加量效果最佳（表 18）。

表 18 人源 TTR 治疗激光视网膜光凝诱导 C57BL/6 小鼠 AMD 病理状况

人源重组 TTR（生理盐水溶液+2%透明质酸），对激光视网膜光凝诱导 C57BL/6 小鼠进行滴眼治疗 2 周后 AMD 病理状况					
滴眼 TTR 浓度（μmol/L）	0	5	10	15	20
视网膜渗漏区域（%）	24.7±2.2	7.2±0.5	4.5±0.3	4.5±0.2	4.3±0.2
视网膜新生血管数（10 个视野）	80±7	18±2	12±2	13±1	14±3

由以上实施例可知，通过 TTR 滴眼的方式，在 DR、AMD 以及 ROP 的动物模型中，能够有效治疗 DR、AMD 以及 ROP 的病理状态。

实施例 15：人源 TTR/大鼠源 TTR 滴眼方式治疗 DR（糖尿病视网膜病变）SD 大鼠

8 周龄 SD 大鼠，体重 200-250 g，禁食 12-18 h，腹腔注射 2% STZ（60 mg/kg），48 h 及 72 h 后剪尾采血，血糖试纸检测均高于 16.7 mM，造模成功，获得 DR SD 大鼠。DR SD 大鼠分为 5 大组，1 组为 DR SD 大鼠不加任何处理（5 只）；1 组为实施例 5 所制得的人源 TTR 滴眼组，5 只，左眼每日滴加 2 次人源 TTR（10 μmol/L）（生理盐水+2%透明质酸），右眼滴加生理盐水+2%透明质酸；1 组为实施例 5 所制得的大鼠源 TTR 滴眼组，5 只，左眼每日滴加 2 次实施例 5 所制得的大鼠源 TTR（10 μmol/L）（生理盐水+2%

透明质酸)，右眼滴加生理盐水+2%透明质酸；1 组为实施例 5 所制得的人源 TTR-CL 滴眼组，5 只，左眼每日滴加 2 次实施例 5 所制得的人源 TTR-CL（10 μmol/L）（生理盐水+2%透明质酸），右眼滴加生理盐水+2%透明质酸；最后 1 组为实施例 5 所制得的人源 TTR-Modified 滴眼组，5 只，左眼每日滴加 2 次实施例 5 所制得的人源 TTR-Modified（10 μmol/L）（生理盐水+2%透明质酸），右眼滴加生理盐水+2%透明质酸；另有 1 组正常 SD 大鼠（未滴眼）作为正常对照组（5 只）。所有 SD 大鼠继续饲养 3 个月后，分别剥取视网膜进行 EB 染色观察视网膜血管渗漏情况，Trypsin 酶解观察新生血管密度；结果显示，STZ 诱导 SD 大鼠饲养 3 个月后，与正常对照相比，视网膜血管渗漏，新生血管数量均显著提升，而滴加人源 TTR、人源 TTR-CL、人源 TTR-Modified 以及大鼠源 TTR 的眼球视网膜渗漏现象显著抑制，视网膜新生血管数显著下降，说明了 DR 的临床病理现象得到了缓解。

表 19 人源 TTR/大鼠源 TTR 治疗 STZ 诱导 SD 大鼠 DR 病理状况

人源重组 TTR/大鼠源重组 TTR（生理盐水溶液+2%透明质酸），对 STZ 诱导 SD 大鼠进行滴眼治疗 3 个月后 DR 病理状况						
	正 常 对 照 眼	未 滴 TTR 对 照	人 源 TTR	人 源 TTR-CL	人源 TTR- Modified	大 鼠 源 TTR
滴 眼 TTR 浓 度 （μmol/L）	-	0	10	10	10	10
视 网 膜 渗 漏 区 域 （%）	4.9±0.5	29.4±3.1	5.5±0.4	5.7±0.9	10.2±1.3	6.2±0.7
视 网 膜 新 生 血 管 数（10 个视野）	11±2	77±6	11±1	10±1	19±4	13±2

实施例 16：人源 TTR/大鼠源 TTR 滴眼方式治疗 ROP（早产儿视网膜病变）SD 大鼠

出生一周乳鼠（SD 大鼠），放入高压氧舱饲养；高压氧舱饲养 5 天后，造模成功，将所有乳鼠从高压氧舱转移至正常环境饲养，对部分已成模的 ROP 乳鼠进行 TTR（10 μmol/L）滴眼，每日一次，持续 5 天。比较 ROP 未滴眼组（5 只），ROP+人源 TTR 滴眼组（5 只），ROP+人源 TTR-CL 滴眼组（5 只），ROP+人源 TTR-Modified 滴眼组（5 只），ROP+大鼠源 TTR 滴眼组（5 只），另有非 ROP 模型大鼠（未滴眼）作为正常对照组（5 只）。ROP 组内畸形新生血管布满视网膜后，出现大量的渗漏区域，而 TTR 滴眼能够逆转这种趋势。

表 20 人源 TTR/大鼠源 TTR 治疗高压氧舱诱导 SD 大鼠乳鼠 ROP 病理状况

人源重组 TTR/大鼠源重组 TTR（生理盐水溶液+2%透明质酸），对高压氧舱诱导 SD 大鼠乳鼠进行滴眼治疗 5 天后病理状况						
	正 常 对 照眼	未滴 TTR 对照	人 源 TTR	人 源 TTR-CL	人 源 TTR- Modified	大 鼠 源 TTR
滴眼 TTR 浓度 （μmol/L）	-	0	10	10	10	10
视网膜渗漏区域 （%）	3.3±0.3	44.7±5.1	3.4±0.2	3.0±0.1	7.8±1.0	3.6±0.4

实施例 17：人源 TTR/小鼠源 TTR 滴眼方式治疗 AMD（老年性黄斑变性）C57BL/6 小鼠

9 周龄 C57/BL6 小鼠，用氩激光（647 nm）对视网膜进行光凝，功率 360 mW，直径 50 μm，时间 0.05 s，每眼 8 个光凝点，诱导脉络膜新生血管生成，并逐步向视网膜增生移行，获得 AMD C57BL/6 小鼠。AMD C57/BL6 小鼠分为滴眼组及未滴眼组，滴眼组进行 TTR 滴眼，每日右眼滴加 10 μmol/L 人源 TTR 或小鼠源 TTR（生理盐水+2%透明质酸）两次，每次 30 μL，左眼滴加生理盐水+2%透明质酸作为对照，人源 TTR 滴眼组 5 只，人源 TTR-CL 滴眼组 5 只，人源 TTR-Modified 滴眼组 5 只，小鼠源 TTR 滴眼组 5 只；未滴眼组 5 只，不做任何处理；另有非激光光凝小鼠（未滴眼）作为正常对照组（5 只）。滴眼 2 周后，处死动物，剥离视网膜并进行 EB 染色观察视网膜血管渗漏情况，以及 Trypsin 酶解观察新生血管密度。由表 21 中可知，滴加人源 TTR、人源 TTR-CL、人源 TTR-Modified 以及小鼠源 TTR 的眼球视网膜渗漏现象显著抑制，视网膜新生血管数显著下降，说明了 AMD 的临床病理现象得到了缓解。

表 21 人源 TTR/小鼠源 TTR 治疗激光视网膜光凝诱导 C57BL/6 小鼠 AMD 病理状况

人源重组 TTR/小鼠源重组 TTR（生理盐水溶液+2%透明质酸），对激光视网膜光凝诱导 C57BL/6 小鼠进行滴眼治疗 2 周后 AMD 病理状况						
	正 常 对 照 眼	未 滴 TTR 对 照	人 源 TTR	人 源 TTR- CL	人 源 TTR- Modified	小 鼠 源 TTR
滴 眼 TTR 浓 度 （μmol/L）	-	0	10	10	10	10

视网膜渗漏区域（%）	3.9±0.4	24.7±2.2	4.5±0.3	4.8±0.6	9.4±1.1	4.2±0.5
视网膜新生血管数 （10 个视野）	11±3	80±7	12±2	11±2	20±3	10±3

第四部分：辅料的改进

实施例 18：使用羧甲基纤维素钠作为辅料可促进 TTR 通过角膜屏障

（1）将实施例 5 制得的人源 TTR 配置为 5-30 μmol/L（含有生理盐水），分别对 C57BL/6 小鼠（8 周龄）及 SD 大鼠（8 周龄）进行滴眼，经过 3 h 后处死，取玻璃体与眼底样本提取蛋白，使用兔抗-His-tag 抗体为一抗，驴抗兔抗体为二抗，通过 ELISA，测定 C57BL/6 小鼠及 SD 大鼠的玻璃体与眼底样本中人源 TTR 的含量。

（2）将实施例 5 制得的人源 TTR 配置为 10 μmol/L（含有生理盐水及 0-8 mg/mL 羧甲基纤维素钠（购于国药，粘度为 800-1200 CP）），分别对 C57BL/6 小鼠（8 周龄）及 SD 大鼠（8 周龄）进行滴眼，经过 3-72 h 后处死，取玻璃体与眼底样本提取蛋白，使用兔抗-His-tag 抗体为一抗，驴抗兔抗体为二抗，通过 ELISA，测定 C57BL/6 小鼠及 SD 大鼠的玻璃体与眼底样本中人源 TTR 的含量。

结果显示，滴眼 3 h 后玻璃体与眼底样本中人源 TTR 含量达到最高峰；滴眼液中，添加了羧甲基纤维素钠之后，玻璃体与眼底样本中人源 TTR 的含量均显著提高（提高 10% 以上），且当羧甲基纤维素钠含量为 6 mg/mL 时，滴眼 3 h 后玻璃体与眼底样本中人源 TTR 含量达到最高峰；滴眼后，人源 TTR 在 C57BL/6 小鼠及 SD 大鼠玻璃体与眼底样本内的含量半衰期接近 72 h，说明可以在玻璃体与眼底样本内有效存在 72 h，有足够的治疗浓度和治疗时间（表 22）。

表 22 人源 TTR 跨越 C57BL/6 小鼠及 SD 大鼠角膜屏障进入玻璃体及眼底

(1) 人源重组 TTR（生理盐水溶液），滴眼后 3 h，玻璃体及眼底内人源 TTR 含量						
滴眼 TTR 浓度 (μmol/L)	5	10	15	20	25	30
C57BL/6 小鼠 玻璃体及眼底 样本中人源 TTR 浓度 (μmol/L)	0.84±0.07	1.81±0.19	1.75±0.20	1.83±0.21	1.88±0.17	1.87±0.20

SD 大鼠玻璃体及眼底样本中人源 TTR 浓度 (μmol/L)	1.14±0.11	2.43±0.21	2.37±0.30	2.42±0.36	2.45±0.42	2.44±0.36
(2) 人源重组 TTR (10 μmol/L) (生理盐水溶液添加不同浓度羧甲基纤维素钠)，滴眼后 3 h，玻璃体及眼底内人源 TTR 含量						
羧甲基纤维素钠 浓度 (mg/mL)	0	2	4	6	8	
C57BL/6 小鼠玻璃体及眼底样本中人源 TTR 浓度 (μmol/L)	1.81±0.19	2.01±0.17	2.44±0.18	2.85±0.25	2.80±0.17	
SD 大鼠玻璃体及眼底样本中人源 TTR 浓度 (μmol/L)	2.43±0.21	2.88±0.19	3.05±0.26	3.24±0.29	3.20±0.30	
(3) 人源重组 TTR (10 μmol/L) (生理盐水溶液添加 6 mg/mL 羧甲基纤维素钠)，滴眼后 3 h 达到最高峰，此后不同时间玻璃体及眼底内人源 TTR 含量						
滴眼后取样时间 (h)	3	18	36	60	72	
C57BL/6 小鼠玻璃体及眼底样本中人源 TTR 浓度 (μmol/L)	2.85±0.25	2.54±0.22	2.14±0.10	1.66±0.10	1.44±0.10	
SD 大鼠玻璃体及眼底样本中人源 TTR 浓度	3.24±0.29	2.96±0.27	2.32±0.19	1.83±0.13	1.63±0.15	

($\mu\text{mol/L}$)					
-----------------------	--	--	--	--	--

实施例 19：使用右旋糖酐 70 作为辅料可促进 TTR 通过角膜屏障

(1) 将实施例 5 制得的人源 TTR 配置为 5-30 $\mu\text{mol/L}$ (含有生理盐水)，分别对 C57BL/6 小鼠 (8 周龄) 及 SD 大鼠 (8 周龄) 进行滴眼，经过 3 h 后处死，取玻璃体与眼底样本提取蛋白，使用兔抗-His-tag 抗体为一抗，驴抗兔抗体为二抗，通过 ELISA，测定 C57BL/6 小鼠及 SD 大鼠的玻璃体与眼底样本中人源 TTR 的含量。

(2) 将实施例 5 制得的人源 TTR 配置为 10 $\mu\text{mol/L}$ (含有生理盐水及 0-0.8 mg/mL 右旋糖酐 70 (购于国药，分子量为 64000-76000))，分别对 C57BL/6 小鼠 (8 周龄) 及 SD 大鼠 (8 周龄) 进行滴眼，经过 3-72 h 后处死，取玻璃体与眼底样本提取蛋白，使用兔抗-His-tag 抗体为一抗，驴抗兔抗体为二抗，通过 ELISA，测定 C57BL/6 小鼠及 SD 大鼠的玻璃体与眼底样本中人源 TTR 的含量。

结果显示，滴眼 3 h 后玻璃体与眼底样本中人源 TTR 含量达到最高峰；滴眼液中，添加了右旋糖酐 70 之后，玻璃体与眼底样本中人源 TTR 的含量均显著提高 (提高 15% 以上)，且当右旋糖酐 70 含量为 0.4 mg/mL 时，滴眼 3 h 后玻璃体与眼底样本中人源 TTR 含量达到最高峰；滴眼后，人源 TTR 在 C57BL/6 小鼠及 SD 大鼠玻璃体与眼底样本内的含量半衰期接近 60 h，说明可以在玻璃体与眼底样本内有效存在 60 h，有足够的治疗浓度和治疗时间 (表 23)。

表 23 人源 TTR 跨越 C57BL/6 小鼠及 SD 大鼠角膜屏障进入玻璃体及眼底

(1) 人源重组 TTR (生理盐水溶液)，滴眼后 3 h，玻璃体及眼底内人源 TTR 含量						
滴眼 TTR 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	5	10	15	20	25	30
C57BL/6 小鼠 玻璃体及眼底 样本中人源 TTR 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0.84±0.07	1.81±0.19	1.75±0.20	1.83±0.21	1.88±0.17	1.87±0.20
SD 大鼠玻璃体 及眼底样本中 人源 TTR 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	1.14±0.11	2.43±0.21	2.37±0.30	2.42±0.36	2.45±0.42	2.44±0.36

(2) 人源重组 TTR (10 μmol/L) (生理盐水溶液添加不同浓度右旋糖酐 70)，滴眼后 3 h，玻璃体及眼底内人源 TTR 含量					
右旋糖酐 70 浓度 (mg/mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8
C57BL/6 小鼠玻璃体及眼底样本中人源 TTR 浓度 (μmol/L)	1.81±0.19	2.47±0.20	2.91±0.23	2.90±0.24	2.87±0.21
SD 大鼠玻璃体及眼底样本中人源 TTR 浓度 (μmol/L)	2.43±0.21	2.81±0.22	3.22±0.27	3.18±0.30	3.12±0.28
(3) 人源重组 TTR (10 μmol/L) (生理盐水溶液添加 0.4 mg/mL 右旋糖酐 70)，滴眼后 3 h 达到最高峰，此后不同时间玻璃体及眼底内人源 TTR 含量					
滴眼后取样时间 (h)	3	18	36	60	72
C57BL/6 小鼠玻璃体及眼底样本中人源 TTR 浓度 (μmol/L)	2.91±0.23	2.21±0.16	1.73±0.14	1.48±0.13	0.87±0.06
SD 大鼠玻璃体及眼底样本中人源 TTR 浓度 (μmol/L)	3.22±0.27	2.53±0.20	1.86±0.11	1.59±0.14	0.93±0.10

实施例 20：使用硫酸软骨素 A 钠盐作为辅料可促进 TTR 通过角膜屏障

(1) 将实施例 5 制得的人源 TTR 配置为 5-30 μmol/L (含有生理盐水)，分别对 C57BL/6 小鼠 (8 周龄) 及 SD 大鼠 (8 周龄) 进行滴眼，经过 3 h 后处死，取玻璃体与眼底样本提取蛋白，使用兔抗-His-tag 抗体为一抗，驴抗兔抗体为二抗，通过 ELISA，测

定 C57BL/6 小鼠及 SD 大鼠的玻璃体与眼底样本中人源 TTR 的含量。

(2) 将实施例 5 制得的人源 TTR 配置为 10 $\mu\text{mol/L}$ (含有生理盐水及 0-40 mg/mL 硫酸软骨素 A 钠盐 (购于国药))，分别对 C57BL/6 小鼠 (8 周龄) 及 SD 大鼠 (8 周龄) 进行滴眼，经过 3-72 h 后处死，取玻璃体与眼底样本提取蛋白，使用兔抗-His-tag 抗体为一抗，驴抗兔抗体为二抗，通过 ELISA，测定 C57BL/6 小鼠及 SD 大鼠的玻璃体与眼底样本中人源 TTR 的含量。

结果显示，滴眼 3 h 后玻璃体与眼底样本中人源 TTR 含量达到最高峰；滴眼液中，添加了硫酸软骨素 A 钠盐之后，玻璃体与眼底样本中人源 TTR 的含量均显著提高 (提高 17%以上)，且当硫酸软骨素 A 钠盐含量为 20 mg/mL 时，滴眼 3 h 后玻璃体与眼底样本中人源 TTR 含量达到最高峰；滴眼后，人源 TTR 在 C57BL/6 小鼠及 SD 大鼠玻璃体与眼底样本内的含量半衰期接近 72 h，说明可以在玻璃体与眼底样本内有效存在 72 h，有足够的治疗浓度和治疗时间 (表 24)。

表 24 人源 TTR 跨越 C57BL/6 小鼠及 SD 大鼠角膜屏障进入玻璃体及眼底

(1) 人源重组 TTR (生理盐水溶液)，滴眼后 3 h，玻璃体及眼底内人源 TTR 含量						
滴眼 TTR 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	5	10	15	20	25	30
C57BL/6 小鼠 玻璃体及眼底 样本中人源 TTR 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0.84 $\pm$ 0.07	1.81 $\pm$ 0.19	1.75 $\pm$ 0.20	1.83 $\pm$ 0.21	1.88 $\pm$ 0.17	1.87 $\pm$ 0.20
SD 大鼠玻璃体 及眼底样本中 人源 TTR 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	1.14 $\pm$ 0.11	2.43 $\pm$ 0.21	2.37 $\pm$ 0.30	2.42 $\pm$ 0.36	2.45 $\pm$ 0.42	2.44 $\pm$ 0.36
(2) 人源重组 TTR (10 $\mu\text{mol/L}$) (生理盐水溶液添加不同浓度硫酸软骨素 A 钠盐)，滴眼后 3 h，玻璃体及眼底内人源 TTR 含量						
硫酸软骨素 A 钠盐浓度 (mg/mL)	0	10	20	30	40	

C57BL/6 小鼠 玻璃体及眼底 样本中人源 TTR 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	1.81 $\pm$ 0.19	2.57 $\pm$ 0.22	3.01 $\pm$ 0.27	2.97 $\pm$ 0.26	2.84 $\pm$ 0.26
SD 大鼠玻璃体 及眼底样本中 人源 TTR 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	2.43 $\pm$ 0.21	2.85 $\pm$ 0.27	3.25 $\pm$ 0.31	3.20 $\pm$ 0.30	3.10 $\pm$ 0.30
(3) 人源重组 TTR (10 $\mu\text{mol/L}$) (生理盐水溶液添加 20 mg/mL 硫酸软骨素 A 钠盐), 滴眼后 3 h 达到最高峰, 此后不同时间玻璃体及眼底内人源 TTR 含量					
滴眼后取样时间 (h)	3	18	36	60	72
C57BL/6 小鼠 玻璃体及眼底 样本中人源 TTR 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	3.01 $\pm$ 0.27	2.66 $\pm$ 0.27	1.98 $\pm$ 0.20	1.67 $\pm$ 0.14	1.48 $\pm$ 0.11
SD 大鼠玻璃体 及眼底样本中 人源 TTR 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	3.25 $\pm$ 0.31	2.78 $\pm$ 0.25	2.03 $\pm$ 0.19	1.83 $\pm$ 0.17	1.58 $\pm$ 0.17

实施例 21：人源 TTR-辅料滴眼方式治疗 DR（糖尿病视网膜病变）SD 大鼠

8 周龄 SD 大鼠，体重 200-250 g，禁食 12-18 h，腹腔注射 2% STZ（60 mg/kg），48 h 及 72 h 后剪尾采血，血糖试纸检测均高于 16.7 mM，造模成功，获得 DR SD 大鼠。DR SD 大鼠分为 6 组，1 组为 DR SD 大鼠不加任何处理（5 只），另外 5 组均为 5 只/组，左眼、右眼各每日滴加 2 次，每次 30 μL ，其中，左眼为采用实施例 5 所制得的人源 TTR 滴眼，或者采用实施例 5 所制得的人源 TTR 加辅料滴眼，具体为分别采用 10 $\mu\text{mol/L}$ 人源 TTR（生理盐水溶液）、10 $\mu\text{mol/L}$ 人源 TTR（生理盐水溶液+6 mg/mL 羧甲基纤维素钠）、10 $\mu\text{mol/L}$ 人源 TTR（生理盐水溶液+6 mg/mL PEG400）、10 $\mu\text{mol/L}$ 人源 TTR（生

理盐水溶液+0.4 mg/mL 右旋糖酐 70)、10 μmol/L 人源 TTR (生理盐水溶液+20 mg/mL 硫酸软骨素 A 钠盐)滴眼,右眼为采用生理盐水溶液,或者生理盐水溶液加辅料滴眼,以作为对照,具体为分别采用生理盐水溶液、生理盐水溶液+6 mg/mL 羧甲基纤维素钠、生理盐水溶液+6 mg/mL PEG400、生理盐水溶液+0.4 mg/mL 右旋糖酐 70、生理盐水溶液+20 mg/mL 硫酸软骨素 A 钠盐滴眼。此外,另有 1 组正常 SD 大鼠作为对照(5 只)。所有 SD 大鼠继续饲养 3 个月后,分别剥取视网膜进行 EB 染色观察视网膜血管渗漏情况,Trypsin 酶解观察新生血管密度。结果显示,STZ 诱导 SD 大鼠饲养 3 个月后,与正常对照相比,视网膜血管渗漏、新生血管数量均显著提升,而滴加人源 TTR 的眼球视网膜渗漏现象显著抑制,视网膜新生血管数显著下降,说明了 DR 的临床病理现象得到了缓解。其中,每日滴加 10 μmol/L 人源 TTR (生理盐水溶液+20 mg/mL 硫酸软骨素 A 钠盐)的效果最佳(表 25)。而滴加 10 μmol/L 人源 TTR (生理盐水溶液+6 mg/mL PEG400)的治疗效果相对较差。

表 25 人源 TTR/人源 TTR-辅料治疗 STZ 诱导 SD 大鼠 DR 病理状况

人源重组 TTR (生理盐水溶液+无辅料/6 mg/mL 羧甲基纤维素钠/6 mg/mL PEG400/0.4 mg/mL 右旋糖酐 70/20 mg/mL 硫酸软骨素 A 钠盐), 对 STZ 诱导 SD 大鼠进行滴眼治疗 3 个月后 DR 病理状况												
	正 常 对 照 眼	未滴 TTR 对照	人 源 TT R (生 理 盐 水 溶 液)	生 理 盐 水 溶 液	人 源 TT R (生 理 盐 水 溶 液 +6 mg/ mL	生 理 盐 水 溶 液 +6 mg/ mL 羧甲 基纤 维素 钠	人 源 TTR (生 理 盐 水 溶 液 +6 mg/m L PEG4 00)	生 理 盐 水 溶 液 +6 mg/ mL PEG 400	人 源 TT R (生 理 盐 水 溶 液 +0.	生 理 盐 水 溶 液 +0.4 mg/ mL 右旋 糖酐 70	人 源 TT R (生 理 盐 水 溶 液 +20 mg/ mL	生 理 盐 水 溶 液 +20 mg/ mL 硫酸 软骨 素 A 钠盐

					羧 甲 基 纤 维 素 钠)				mL 右 旋 糖 酐 70)		硫 酸 软 骨 素 A 钠 盐)	
滴 眼 TTR 浓 度 (μmo l/L)	-	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0
视 网 膜 渗 漏 区 域(%)	4.9 ±0. 5	29.4 ±3.1	6.0 ±0. 5	30.8 ±2.5	5.7 ±0. 9	30.4 ±3.5	6.7±0 .5	34.4 ±3.5	5.0 ±0. 3	32.8 ±2.9	4.8 ±0. 4	28.6 ±3.1
视 网 膜 新 生 血 管 数 (10 个 视 野)	11± 2	77±6	13± 2	80±9	10± 1	80±7	14±3	79±7	10± 2	75±9	9±1	82±5

实施例 22：人源 TTR-辅料滴眼方式治疗 AMD（老年性黄斑变性）C57BL/6 小鼠

9 周龄 C57/BL6 小鼠，用氩激光（647 nm）对视网膜进行光凝，功率 360 mW，直径 50 μm，时间 0.05 s，每眼 8 个光凝点，诱导脉络膜新生血管生成，并逐步向视网膜增生移行，获得 AMD C57BL/6 小鼠。AMD C57BL/6 小鼠分为 6 组，1 组为 AMD C57BL/6 小鼠不加任何处理（5 只），另外 5 组均为 5 只/组，左眼、右眼各每日滴加 2 次，每次 30 μL，其中，左眼为采用实施例 5 所制得的人源 TTR 滴眼，或者采用实施例 5 所制得

的人源 TTR 加辅料滴眼，具体为分别采用 10 μmol/L 人源 TTR（生理盐水溶液）、10 μmol/L 人源 TTR（生理盐水溶液+6 mg/mL 羧甲基纤维素钠）、10 μmol/L 人源 TTR（生理盐水溶液+6 mg/mL PEG400）、10 μmol/L 人源 TTR（生理盐水溶液+0.4 mg/mL 右旋糖酐 70）、10 μmol/L 人源 TTR（生理盐水溶液+20 mg/mL 硫酸软骨素 A 钠盐）滴眼，右眼为采用生理盐水溶液，或者生理盐水溶液加辅料滴眼，以作为对照，具体为分别采用生理盐水溶液、生理盐水溶液+6 mg/mL 羧甲基纤维素钠、生理盐水溶液+6 mg/mL PEG400、生理盐水溶液+0.4 mg/mL 右旋糖酐 70、生理盐水溶液+20 mg/mL 硫酸软骨素 A 钠盐滴眼。此外，另有 1 组正常 C57BL/6 小鼠作为对照（5 只）。滴眼 2 周后，处死动物，剥离视网膜并进行 EB 染色观察视网膜血管渗漏情况，以及 Trypsin 酶解观察新生血管密度。

结果显示，AMD C57BL/6 小鼠对照组内出现较多的渗漏区域，新生血管数量显著增多，而 TTR 滴眼能够逆转这种趋势（表 26），且添加了羧甲基纤维素钠、右旋糖酐 70 和硫酸软骨素 A 钠盐的组中，TTR 的治疗效果更佳。

表 26 人源 TTR/人源 TTR-辅料治疗激光视网膜光凝诱导 C57BL/6 小鼠 AMD 病理状况

人源重组 TTR（生理盐水溶液+无辅料/6 mg/mL 羧甲基纤维素钠/6 mg/mL PEG400/0.4 mg/mL 右旋糖酐 70/20 mg/mL 硫酸软骨素 A 钠盐），对激光视网膜光凝诱导 C57BL/6 小鼠进行滴眼治疗 2 周后 AMD 病理状况												
	正 常 对 照 眼	未滴 TTR 对照	人 源 TT R （ 生 理 盐 水 溶 液）	生理 盐水 溶液	人 源 TT R （ 生 理 盐 水 溶 液 +6 mg/ mL	生理 盐水 溶液 +6 mg/ mL	人 源 TTR （ 生 理 盐 水 溶 液 +6 mg/m L PEG4 00）	生理 盐水 溶液 +6 mg/ mL	人 源 TT R （ 生 理 盐 水 溶 液 +0. 4 mg/ mL	生理 盐水 溶液 +0.4 mg/ mL	人 源 TT R （ 生 理 盐 水 溶 液 +20 mg/ mL	生理 盐水 溶液 +20 mg/ mL

					羧 甲 基 纤 维 素 钠)				mL 右 旋 糖 酐 70)		硫 酸 软 骨 素 A 钠 盐)	
滴 眼 TTR 浓 度 (μmo l/L)	-	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0
视 网 膜 渗 漏 区 域(%)	3.9 ±0. 4	24.7 ±2.2	5.5 ±0. 4	26.3 ±3.0	4.0 ±0. 2	25.8 ±3.2	4.7±0 .5	23.9 ±3.0	4.0 ±0. 4	29.9 ±2.9	3.7 ±0. 3	30.2 ±3.1
视 网 膜 新 生 血 管 数 (10 个 视 野)	11± 3	80±7	13± 2	82±9	11± 1	79±8	12±3	83±9	10± 1	84+ 11	10± 1	83±8

实施例 23：人源 TTR-辅料滴眼方式治疗 ROP（早产儿视网膜病变）SD 大鼠

出生一周乳鼠（SD 大鼠），放入高压氧舱饲养，正常对照组放入正常环境饲养（正常对照组，5 只）。高压氧舱饲养 5 天后取出，获得 ROP SD 大鼠。将所有 ROP SD 大鼠连同正常对照组一起在正常环境中继续饲养 5 天。在该 5 天中，ROP SD 大鼠分为 6 组，1 组为 ROP SD 小鼠不加任何处理（5 只），另外 5 组均为 5 只/组，左眼、右眼各每日滴加 1 次，每次 30 μL，其中，左眼为采用实施例 5 所制得的人源 TTR 滴眼，或者采用实

施例 5 所制得的人源 TTR 加辅料滴眼，具体为分别采用 10 $\mu\text{mol/L}$ 人源 TTR（生理盐水溶液）、10 $\mu\text{mol/L}$ 人源 TTR（生理盐水溶液+6 mg/mL 羧甲基纤维素钠）、10 $\mu\text{mol/L}$ 人源 TTR（生理盐水溶液+6 mg/mL PEG400）、10 $\mu\text{mol/L}$ 人源 TTR（生理盐水溶液+0.4 mg/mL 右旋糖酐 70）、10 $\mu\text{mol/L}$ 人源 TTR（生理盐水溶液+20 mg/mL 硫酸软骨素 A 钠盐）滴眼，右眼为采用生理盐水溶液，或者生理盐水溶液加辅料滴眼，以作为对照，具体为分别采用生理盐水溶液、生理盐水溶液+6 mg/mL 羧甲基纤维素钠、生理盐水溶液+6 mg/mL PEG400、生理盐水溶液+0.4 mg/mL 右旋糖酐 70、生理盐水溶液+20 mg/mL 硫酸软骨素 A 钠盐滴眼。滴眼 5 天后，处死动物，剥离视网膜并进行 EB 染色观察视网膜血管渗漏情况。ROP SD 大鼠对照组内畸形新生血管布满视网膜后，出现大量的渗漏区域，而 TTR 滴眼能够逆转这种趋势（表 27），且添加了羧甲基纤维素钠、右旋糖酐 70 和硫酸软骨素 A 钠盐的组中，TTR 的治疗效果更佳。

表 27 人源 TTR/人源 TTR-辅料治疗高压氧舱诱导 SD 大鼠乳鼠 ROP 病理状况

人源重组 TTR（生理盐水溶液+无辅料/6 mg/mL 羧甲基纤维素钠/6 mg/mL PEG400/0.4 mg/mL 右旋糖酐 70/20 mg/mL 硫酸软骨素 A 钠盐），对高压氧舱诱导 SD 大鼠乳鼠进行滴眼治疗 5 天后 ROP 病理状况												
	正 常 对 照 眼	未滴 TTR 对照	人 源 TT R （ 生 理 盐 水 溶 液）	生理 盐水 溶液	人 源 TT R （ 生 理 盐 水 溶 液 +6 mg/ mL 羧甲 基纤 维素 钠	生理 盐水 溶液 +6 mg/ mL 羧甲 基纤 维素 钠	人 源 TTR （ 生 理 盐 水 溶 液 +6 mg/m L PEG4 00）	生理 盐水 溶液 +6 mg/ mL PEG 400	人 源 TT R （ 生 理 盐 水 溶 液 +0. 4 mg/ mL	生理 盐水 溶液 +0.4 mg/ mL 右旋 糖酐 70	人 源 TT R （ 生 理 盐 水 溶 液 +20 mg/ mL 硫	生理 盐水 溶液 +20 mg/ mL 硫酸 软骨 素 A 钠盐

					甲 基 纤 维 素 钠)				右 旋 糖 酐 70)		酸 软 骨 素 A 钠 盐)	
滴 眼 TTR 浓 度 (μmo l/L)	-	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0
视 网 膜 渗 漏 区 域(%)	3.3 ±0. 3	44.7 ±5.1	5.2 ±0. 4	46.3 ±6.1	3.2 ±0. 2	45.8 ±4.7	4.0±0 .3	39.7 ±4.0	4.1 ±0. 4	48.6 ±5.2	3.0 ±0. 2	42.6 ±4.7

第五部分：配体的改进

实施例 24：计算机模拟 TTR 与各个配体分子的结合形态

参照 PDB 数据库中，TTR 二聚体与双氯芬酸的静态共结晶模型（PDF：3CFQ），如图 13A 所示。图 13A 中，蛋白结构为 TTR 二聚体，双氯芬酸配体分子使用箭头指示，一分子 TTR 二聚体可以结合两分子双氯芬酸。图 13B 中显示了双氯芬酸与 TTR 氨基酸残基的相互作用。

通过 Discovery studio 软件进行分子模拟发现维生素 A1（视黄醇）能够与 TTR 多聚体的疏水通道稳定结合。图 14A 中显示的蛋白结构为 TTR 二聚体，维生素 A1 配体分子使用箭头指示，一分子 TTR 二聚体可以结合一分子维生素 A1。图 14B 中显示了维生素 A1 与 TTR 氨基酸残基的相互作用。

通过 Discovery studio 软件进行分子模拟发现维生素 A2（3-脱氢视黄醇）能够与 TTR 多聚体的疏水通道稳定结合。图 15A 中显示的蛋白结构为 TTR 二聚体，维生素 A2 配体分子使用箭头指示，一分子 TTR 二聚体可以结合一分子维生素 A2。图 15B 中显示了维

生素 A2 与 TTR 氨基酸残基的相互作用。

通过 Discovery studio 软件进行分子模拟发现木犀草苷能够与 TTR 多聚体稳定结合。图 16A 中显示的蛋白结构为 TTR 二聚体，木犀草苷配体分子使用箭头指示，一分子 TTR 二聚体可以结合一分子木犀草苷。图 16B 中显示了木犀草苷与 TTR 氨基酸残基的相互作用。

从以上结果可以看出，TTR 与这些配体分子之间的作用力主要为范德华力、氢键作用、疏水作用等非共价作用力，从本质上说不会改变 TTR 和配体之间的化学结构。

实施例 25：TTR 与各个潜在配体分子动态特异性结合参数的测定

使用 nano ITC（TA）测定 TTR 与实施例 24 中所提及的各个配体分子或其盐的亲合结合平衡解离常数 K_d ，在 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 TTR 溶液（1000 μL ）中，以 1 $\mu\text{L/min}$ 的速度滴加 100 $\mu\text{mol/L}$ 的上述各种配体溶液，使用内置软件计算亲和结合平衡解离常数 K_d （表 28）。

表 28 各种配体分子与 TTR 的亲合结合平衡解离常数

TTR 浓度（10 $\mu\text{mol/L}$ ）	双 氯 芬 酸钠（购于国药集团）	维生素 A（购于国药集团，国药编号为 CATOCCHM700908，CAS：68-26-8）	维生素 A2（购于百灵威科技有限公司，货号 D230075）	木犀草苷（购于国药集团）
亲和结合平衡解离常数（ mol/L ）	4.5×10^{-8}	2.27×10^{-8}	2.35×10^{-8}	1.29×10^{-7}

如表 28 所示，各种配体分子与 TTR 的亲合结合平衡解离常数均接近 10^{-8} mol/L ，与单克隆抗体识别单一抗原表位的能力接近，说明上述配体分子能与 TTR 特异性识别与结合。

实施例 26：人源 TTR-配体分子复合物跨越角膜屏障进入玻璃体及眼底

将实施例 5 中所制得的人源 TTR 配置为 10 $\mu\text{mol/L}$ （含有生理盐水，2%低分子量透明质酸以及 10 $\mu\text{mol/L}$ 双氯芬酸钠/5 $\mu\text{mol/L}$ 维生素 A+5%（v/v）吐温 80/5 $\mu\text{mol/L}$ 木犀草苷（添加比例参照实施例 24 中计算机模拟的结果），分别对 C57BL/6 小鼠（8 周龄）及 SD 大鼠（8 周龄）进行滴眼，经过 3-72 h 后处死，取玻璃体与眼底样本提取蛋白，使用兔抗-His-tag 抗体为一抗，驴抗兔抗体为二抗，通过 ELISA，测定 C57BL/6 小鼠及 SD 大

鼠的玻璃体与眼底样本中人源 TTR 的含量。参照中国药典 2020 年版第二部第 115 页，双氯芬酸钠滴眼液条目，测定样品中双氯芬酸钠含量；参照中国药典 2020 版第二部第 1472 页，维生素 A 条目，测定样品中维生素 A 含量；参照英国药典 BP2017，Luteolin-7-glucoside 条目，测定样品中木犀草苷含量。

滴眼后，在 C57BL/6 小鼠及 SD 大鼠玻璃体与眼底样本内的人源 TTR 以及各配体分子的含量半衰期接近 60 h，说明可以在玻璃体与眼底样本内有效存在 60 h，有足够的治疗浓度和治疗时间（表 29）。

表 29 人源 TTR 及配体分子跨越 C57BL/6 小鼠及 SD 大鼠角膜屏障进入玻璃体及眼底

人源重组 TTR（10 μmol/L）（生理盐水溶液添加 2%透明质酸，以及 10 μmol/L 双氯芬酸钠），滴眼后 3 h 达到最高峰，此后不同时间玻璃体及眼底内人源 TTR 以及双氯芬酸钠的含量					
滴眼后取样时间（h）	3	18	36	60	72
C57BL/6 小鼠玻璃体及眼底样本中人源 TTR 浓度（μmol/L）	2.72±0.21	1.97±0.16	1.69±0.14	1.37±0.10	0.85±0.10
C57BL/6 小鼠玻璃体及眼底样本中双氯芬酸钠浓度（μmol/L）	2.54±0.17	1.81±0.13	1.55±0.10	1.28±0.10	0.81±0.10
SD 大鼠玻璃体及眼底样本中人源 TTR 浓度（μmol/L）	3.22±0.25	2.81±0.28	1.93±0.20	1.65±0.15	0.93±0.07
SD 大鼠玻	3.01±0.19	2.66±0.21	1.74±0.15	1.48±0.10	0.92±0.08

璃体及眼底 样本中双氯 芬酸钠浓度 ($\mu\text{mol/L}$)					
人源重组 TTR ($10\ \mu\text{mol/L}$) (生理盐水溶液添加 2%透明质酸, 以及 $5\ \mu\text{mol/L}$ 维生素 A+5%吐温 80), 滴眼后 3 h 达到最高峰, 此后不同时间玻璃体及眼底内人源 TTR 以及维生素 A 的含量					
滴眼后取样 时间 (h)	3	18	36	60	72
C57BL/6 小 鼠玻璃体及 眼底样本中 人源 TTR 浓 度($\mu\text{mol/L}$)	2.83 ± 0.30	2.04 ± 0.18	1.77 ± 0.15	1.44 ± 0.13	1.02 ± 0.10
C57BL/6 小 鼠玻璃体及 眼底样本中 维生素 A 浓 度($\mu\text{mol/L}$)	1.52 ± 0.11	0.96 ± 0.10	0.85 ± 0.09	0.73 ± 0.07	0.60 ± 0.04
SD 大鼠玻 璃体及眼底 样本中人源 TTR 浓 度 ($\mu\text{mol/L}$)	3.34 ± 0.27	2.99 ± 0.30	2.06 ± 0.22	1.70 ± 0.14	1.23 ± 0.10
SD 大鼠玻 璃体及眼底 样本中维生 素 A 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	1.68 ± 0.11	1.53 ± 0.10	1.02 ± 0.10	0.88 ± 0.06	0.65 ± 0.06
人源重组 TTR ($10\ \mu\text{mol/L}$) (生理盐水溶液添加 2%透明质酸, 以及 $5\ \mu\text{mol/L}$ 木犀草					

昔), 滴眼后 3 h 达到最高峰, 此后不同时间玻璃体及眼底内人源 TTR 以及木犀草苷的含量					
滴眼后取样时间 (h)	3	18	36	60	72
C57BL/6 小鼠玻璃体及眼底样本中人源 TTR 浓度 (μmol/L)	2.56±0.22	1.97±0.20	1.54±0.13	1.30±0.10	0.90±0.06
C57BL/6 小鼠玻璃体及眼底样本中木犀草苷浓度 (μmol/L)	1.20±0.10	0.92±0.08	0.72±0.05	0.60±0.06	0.40±0.00
SD 大鼠玻璃体及眼底样本中人源 TTR 浓度 (μmol/L)	3.12±0.25	2.80±0.25	2.01±0.20	1.57±0.10	1.01±0.05
SD 大鼠玻璃体及眼底样本中木犀草苷浓度 (μmol/L)	1.48±0.10	1.35±0.10	0.96±0.05	0.71±0.05	0.52±0.00

实施例 27：人源 TTR-配体分子复合物滴眼方式治疗 DR（糖尿病视网膜病变）SD 大鼠

8 周龄 SD 大鼠，体重 200-250 g，禁食 12-18 h，腹腔注射 2% STZ（60 mg/kg），48 h 及 72 h 后剪尾采血，血糖试纸检测均高于 16.7 mM，造模成功，获得 DR SD 大鼠。DR SD 大鼠分为 5 组，1 组为 DR SD 大鼠不加任何处理（5 只），另外 4 组均为 5 只/组，左眼、右眼各每日滴加 2 次，每次 30 μL，其中，左眼为采用实施例 5 所制得的人源 TTR

滴眼，或者采用实施例 5 所制得的人源 TTR+配体滴眼，具体为分别采用 10 μmol/L 人源 TTR（生理盐水溶液+2%透明质酸），10 μmol/L 人源 TTR（生理盐水溶液+2%透明质酸+10 μmol/L 双氯芬酸钠）、10 μmol/L 人源 TTR（生理盐水溶液+2%透明质酸+5 μmol/L 维生素 A+5%吐温 80）、10 μmol/L 人源 TTR（生理盐水溶液+2%透明质酸+5 μmol/L 木犀草苷）滴眼，右眼为采用生理盐水溶液+2%透明质酸，或者生理盐水溶液+2%透明质酸+配体滴眼，以作为对照，具体为分别采用生理盐水溶液+2%透明质酸，生理盐水溶液+2%透明质酸+10 μmol/L 双氯芬酸钠，生理盐水溶液+2%透明质酸+5 μmol/L 维生素 A+5%吐温 80，生理盐水溶液+2%透明质酸+5 μmol/L 木犀草苷滴眼。此外，另有 1 组正常 SD 大鼠作为对照（5 只）。所有 SD 大鼠继续饲养 3 个月后，分别剥取视网膜进行 EB 染色观察视网膜血管渗漏情况，Trypsin 酶解观察新生血管密度。

结果显示，STZ 诱导 SD 大鼠饲养 3 个月后，与正常对照相比，DR SD 大鼠不加任何处理的对照组的视网膜血管渗漏、新生血管数量均显著提升，而滴加人源 TTR 或者人源 TTR/双氯芬酸钠、人源 TTR/维生素 A、人源 TTR/木犀草苷组的眼球视网膜渗漏现象显著抑制，视网膜新生血管数显著下降，说明了 DR 的临床病理现象得到了缓解(表 30)。

表 30 人源 TTR/人源 TTR-配体分子复合物治疗 STZ 诱导 SD 大鼠 DR 病理状况

人源重组 TTR（生理盐水溶液+2%透明质酸，以及无配体/10 μmol/L 双氯芬酸钠/5 μmol/L 维生素 A+5%吐温 80/5 μmol/L 木犀草苷），对 STZ 诱导 SD 大鼠进行滴眼治疗 3 个月后 DR 病理状况						
	正 常 对 照眼	未 滴 TTR 对 照	人 源 TTR （无配 体）	人 源 TTR/ 双 氯 芬 酸 钠	人 源 TTR/ 维 生素 A	人源 TTR/木犀草 苷
滴眼 TTR 浓 度（μmol/L）	-	0	10	10	10	10
视网膜渗漏 区域（%）	4.9±0.5	29.4±3.1	5.5±0.4	2.2±0.1	3.2±0.2	4.5±0.3
视网膜新生 血管数（10 个视野）	11±2	77±6	11±1	7±2	7±3	9±2

实施例 28：人源 TTR-配体分子复合物滴眼方式治疗 AMD（老年性黄斑变性）

C57BL/6 小鼠

9 周龄 C57/BL6 小鼠，用氩激光（647 nm）对视网膜进行光凝，功率 360 mW，直径 50 μm，时间 0.05 s，每眼 8 个光凝点，诱导脉络膜新生血管生成，并逐步向视网膜增生移行，获得 AMD C57BL/6 小鼠。AMD C57BL/6 小鼠分为 5 组，1 组为 AMD C57BL/6 小鼠不加任何处理（5 只），另外 4 组均为 5 只/组，左眼、右眼各每日滴加 2 次，每次 30 μL，其中，左眼为采用实施例 5 所制得的人源 TTR 滴眼，或者采用实施例 5 所制得的人源 TTR+配体滴眼，具体为分别采用 10 μmol/L 人源 TTR（生理盐水溶液+2%透明质酸）、10 μmol/L 人源 TTR（生理盐水溶液+2%透明质酸+10 μmol/L 双氯芬酸钠）、10 μmol/L 人源 TTR（生理盐水溶液+2%透明质酸+5 μmol/L 维生素 A+5%吐温 80）、10 μmol/L 人源 TTR（生理盐水溶液+2%透明质酸+5 μmol/L 木犀草苷）滴眼，右眼为采用生理盐水溶液+2%透明质酸，或者生理盐水溶液+2%透明质酸+配体滴眼，以作为对照，具体为分别采用生理盐水溶液+2%透明质酸，生理盐水溶液+2%透明质酸+10 μmol/L 双氯芬酸钠，生理盐水溶液+2%透明质酸+5 μmol/L 维生素 A+5%吐温 80，生理盐水溶液+2%透明质酸+5 μmol/L 木犀草苷滴眼。此外，另有 1 组正常 C57BL/6 小鼠作为对照（5 只）。滴眼 2 周后，处死动物，剥离视网膜并进行 EB 染色观察视网膜血管渗漏情况，以及 Trypsin 酶解观察新生血管密度。

结果如表 31 所示，表中显示，与正常对照组相比，AMD C57BL/6 小鼠不加任何处理的对照组视网膜血管渗漏、新生血管数量均显著提升；而滴加了人源 TTR 或者人源 TTR/双氯芬酸钠、人源 TTR/维生素 A、人源 TTR/木犀草苷组的视网膜渗漏情况及新生血管情况得到显著的缓解。

表 31 人源 TTR/人源 TTR-配体分子复合物治疗激光视网膜光凝诱导 C57BL/6 小鼠 AMD 病理状况

人源重组 TTR（生理盐水溶液+2%透明质酸，以及无配体/10 μmol/L 双氯芬酸钠/5 μmol/L 维生素 A+5%吐温 80/5 μmol/L 木犀草苷），对激光视网膜光凝诱导 C57BL/6 小鼠进行滴眼治疗 2 周后 AMD 病理状况						
	正常对 照眼	未 滴 TTR 对 照	人 源 TTR （无配 体）	人 源 TTR/ 双 氯 芬 酸 钠	人 源 TTR/ 维 生素 A	人源 TTR/木犀草 苷
滴 眼 TTR 浓 度	-	0	10	10	10	10

($\mu\text{mol/L}$)						
视 网 膜 渗 漏区域(%)	3.9 $\pm$ 0.4	24.7 $\pm$ 2.2	4.5 $\pm$ 0.3	2.8 $\pm$ 0.1	3.2 $\pm$ 0.1	4.4 $\pm$ 0.35
视 网 膜 新 生 血 管 数 (10 个 视 野)	11 $\pm$ 3	80 $\pm$ 7	12 $\pm$ 2	6 $\pm$ 3	7 $\pm$ 2	12 $\pm$ 1

实施例 29：人源 TTR-配体分子复合物滴眼方式治疗 ROP（早产儿视网膜病变）SD 大鼠

出生一周乳鼠（SD 大鼠），放入高压氧舱饲养，正常对照组放入正常环境饲养（正常对照组，5 只）。高压氧舱饲养 5 天后取出，获得 ROP SD 大鼠。将所有 ROP SD 大鼠连同正常对照组一起在正常环境中继续饲养 5 天。在该 5 天中，ROP SD 大鼠分为 5 组，1 组为 ROP SD 小鼠不加任何处理（5 只），另外 4 组均为 5 只/组，左眼、右眼各每日滴加 1 次，每次 30 μL ，其中，左眼为采用实施例 5 所制得的人源 TTR 滴眼，或者采用实施例 5 所制得的人源 TTR+配体滴眼，具体为分别采用 10 $\mu\text{mol/L}$ 人源 TTR（生理盐水溶液+2%透明质酸）、10 $\mu\text{mol/L}$ 人源 TTR（生理盐水溶液+2%透明质酸+10 $\mu\text{mol/L}$ 双氯芬酸钠）、10 $\mu\text{mol/L}$ 人源 TTR（生理盐水溶液+2%透明质酸+5 $\mu\text{mol/L}$ 维生素 A+5%吐温 80）、10 $\mu\text{mol/L}$ 人源 TTR（生理盐水溶液+2%透明质酸+5 $\mu\text{mol/L}$ 木犀草苷）滴眼，右眼为采用生理盐水溶液+2%透明质酸，或者生理盐水溶液+2%透明质酸+配体滴眼，以作为对照，具体为分别采用生理盐水溶液+2%透明质酸，生理盐水溶液+2%透明质酸+10 $\mu\text{mol/L}$ 双氯芬酸钠，生理盐水溶液+2%透明质酸+5 $\mu\text{mol/L}$ 维生素 A+5%吐温 80，生理盐水溶液+2%透明质酸+5 $\mu\text{mol/L}$ 木犀草苷滴眼。正常环境饲养 5 天后处死乳鼠并剥取视网膜进行 EB 染色，观察视网膜血管渗漏情况。

结果如表 32 所示，表中显示，与正常对照组相比，ROP SD 大鼠不加任何处理的对照组视网膜血管渗漏显著提升；而滴加了人源 TTR 或者人源 TTR/双氯芬酸钠、人源 TTR/维生素 A、人源 TTR/木犀草苷组的视网膜渗漏情况得到显著的缓解。

表 32 人源 TTR/人源 TTR-配体分子复合物治疗高压氧舱诱导 SD 大鼠乳鼠 ROP 病理状况

人源重组 TTR（生理盐水溶液+2%透明质酸，以及无配体/10 $\mu\text{mol/L}$ 双氯芬酸钠/5 $\mu\text{mol/L}$ 维生素 A+5%吐温 80/5 $\mu\text{mol/L}$ 木犀草苷），对高压氧舱诱导 SD 大鼠乳鼠进行滴眼治疗 5 天后 ROP 病理状况

	正 常 对 照 眼	未 滴 TTR 对 照	人 源 TTR	人 源 TTR/ 双 氯 芬 酸 钠	人 源 TTR/ 维 生 素 A	人源 TTR/木犀草 苷
滴 眼 TTR 浓 度 ($\mu\text{mol/L}$)	-	0	10	10	10	10
视 网 膜 渗 漏区域(%)	3.3 ± 0.3	44.7 ± 5.1	3.4 ± 0.2	2.0 ± 0.1	2.3 ± 0.1	4.0 ± 0.3

结合实施例 27-29 的数据还可以看出，即使是正常的 SD 大鼠，成年的 SD 大鼠的视网膜渗漏情况要比幼年的 SD 大鼠严重，另外，其他一些原因，例如，实验操作、个体差异等，也可能会造成视网膜渗漏以及新生血管数增加，这就表明即使是未经造模的正常对照眼也存在一定程度的视网膜渗漏以及新生血管增加的情况。通过使用人源 TTR/双氯芬酸钠或者人源 TTR/维生素 A 后，不仅可以治疗 DR、AMD 以及 ROP，还可以起到滋养作用，对眼部本身因其他原因产生的视网膜渗漏以及新生血管增加的情况也有一定的缓解效果。

对比例 1：人源 TTR 使用不同质粒进行重组表达

(1) 重组质粒 pET-28a-*ttr*, pQE-30-*ttr*, pQE-60-*ttr* 的构建：成熟 TTR 优化的 DNA 序列（如 SEQ ID NO: 2 所示）通过 *Nde* I 及 *Hind* III 两个酶切位点连接入 pET-28a 质粒（pET-28a、pQE-30, pQE-60 均购于 ATCC），构建了 pET-28a-*ttr* 质粒；成熟 TTR 优化的 DNA 序列（如 SEQ ID NO: 2 所示）通过 *Bam*HI 及 *Hind* III 两个酶切位点连接入 pQE-30 质粒，构建了 pQE-30-*ttr* 质粒；成熟 TTR 优化的 DNA 序列（如 SEQ ID NO: 2 所示）通过 *Eco*RI 及 *Hind* III 两个酶切位点连接入 pQE-60 质粒，构建了 pQE-60-*ttr* 质粒。经测序验证（南京金斯瑞生物科技有限公司），构建成功。

(2) 重组人源 TTR 的表达和纯化：将步骤（1）构建的 pET-28a-*ttr*, pQE-30-*ttr*, pQE-60-*ttr* 质粒以及实施例 5 中所构建的 pETx- rhaPBAD-*ttr* 转化入 *E. coli* BL21（DE3）细胞，将所得重组 *E. coli* BL21（DE3）在 LB 培养基中培养，制备种子液，再以 5%的接种量，接入至 5L TB 培养基中，温度 37 °C，搅拌桨转速 150 rpm，培养至 OD₆₀₀ 为 1.5-2.0；前三种培养基加入 0.2 mM IPTG 诱导 18 h，最后一种培养基加入 1.6 %鼠李糖诱导

18 h。通过高压均质机将菌体破碎后，上清液通过 Ni+柱层析制备得到人源 TTR。使用内毒素吸附柱（Pierce™ High Capacity Endotoxin Removal Spin Columns, ThermoFisher）去除内毒素，通过 0.22 μm 孔径滤膜去除残留菌体。所得人源 TTR 蛋白产量如表 33 所示。

表 33 人源 TTR 使用不同质粒进行重组表达

诱导温度 37 °C，培养至 OD ₆₀₀ 为 1.8 加入 0.2 mM IPTG 或 1.6%鼠李糖诱导 18 h 的蛋白产量				
质粒	pET-28a- <i>ttr</i>	pQE-30- <i>ttr</i>	pQE-60- <i>ttr</i>	pETx-rhaPBAD- <i>ttr</i>
蛋白产量（mg/g 湿菌体）	无可溶性表达	无可溶性表达	无可溶性表达	50.9±4.8

由以上结果可知，使用 pET-28a、pQE-30，pQE-60 等进行表达时，均不存在可溶性表达。

对比例 2：

相对于实施例 7 中的表 7-1，滴加 TTR 的浓度为 1 μmol/L 时，玻璃体及眼底内人源 TTR 的浓度仅为 0.10±0.00 μmol/L。

对比例 3:

具体实施方式同实施例 9, 区别在于, 按照实施例 2 的方法表达不与 TTR 融合的 GFP 蛋白（Genbank 登录号为 QAA95705.1），将未融合 TTR 的 GFP 蛋白按照实施例 9 相同的操作步骤对 SD 大鼠及新西兰大耳兔进行滴眼测试，结果显示，GFP 未进入 SD 大鼠及新西兰大耳兔玻璃体内（表 34，35）。

表 34 每次滴加 GFP 含量 0.6 nmol，滴加不同次数后 GFP 到达 SD 大鼠眼内的效果

每日滴加次数		1	2	3
玻璃体内 GFP 含量 (nmol/L)	2 天	-	-	-
	6 天	-	-	-
	10 天	-	-	-
	14 天	-	-	-

其中，“-”表示未检出（下同）。

表 35 每次滴加 GFP 含量 0.6 nmol，滴加不同次数后 GFP 到达新西兰大耳兔眼内的效果

每日滴加次数		1	2	3
玻璃体内 GFP 含量 (nmol/L)	2 天	-	-	-
	6 天	-	-	-
	10 天	-	-	-
	14 天	-	-	-

对比例 4:

具体实施方式同实施例 10，区别在于，按照实施例 3 的方法表达不与 TTR 融合的 Lysozyme 蛋白（Genbank 登录号为 AAL69327.1），将未融合的 Lysozyme 蛋白按照实施例 10 相同的操作步骤对 SD 大鼠及新西兰大耳兔进行滴眼测试，结果显示，Lysozyme 未进入 SD 大鼠及新西兰大耳兔玻璃体内（表 36，37）。

表 36 每次滴加 Lysozyme 含量 0.6 nmol，滴加不同次数后 Lysozyme 到达 SD 大鼠眼内的效果

每日滴加次数		1	2	3
玻璃体内 Lysozyme 含量 (nmol/L)	2 天	-	-	-
	6 天	-	-	-
	10 天	-	-	-
	14 天	-	-	-

表 37 每次滴加 Lysozyme 含量 0.6 nmol 滴加不同次数后不同处理方式下 Lysozyme 到达新西兰大耳兔眼内的效果

每日滴加次数		1	2	3
玻璃体内 Lysozyme 含量 (nmol/L)	2 天	-	-	-
	6 天	-	-	-
	10 天	-	-	-
	14 天	-	-	-

对比例 5:

具体实施方式同实施例 11，区别在于，按照实施例 4 的方法表达不与 TTR 融合的 Ovalbumin 蛋白（UniProt 登录号为 P01012），将未融合的 Ovalbumin 蛋白按照实施例 11 相同的操作步骤对 SD 大鼠及新西兰大耳兔进行滴眼测试，结果显示，Ovalbumin 未进入 SD 大鼠及新西兰大耳兔玻璃体内（表 38，39）。

表 38 每次滴加 Ovalbumin 含量 0.6 nmol，每日滴加不同次数后 Ovalbumin 到达 SD

大鼠眼内的效果

左眼				
每日滴加次数		1	2	3
玻璃体内 Ovalbumin 含量 (nmol/L)	2 天	-	-	-
	6 天	-	-	-
	10 天	-	-	-
	14 天	-	-	-

表 39 每次滴加 Ovalbumin 含量 0.6 nmol，每日滴加不同次数后 Ovalbumin 到达新西兰大耳兔眼内的效果

每日滴加次数		1	2	3
玻璃体内 Ovalbumin 含量 (nmol/L)	2 天	-	-	-
	6 天	-	-	-
	10 天	-	-	-
	14 天	-	-	-

对比例 6:

(1) 将实施例 5 制得的人源 TTR 配置为 5-30 $\mu\text{mol/L}$ (含有生理盐水)，分别对 C57BL/6 小鼠 (8 周龄) 及 SD 大鼠 (8 周龄) 进行滴眼，经过 3 h 后处死，取玻璃体与眼底样本提取蛋白，使用兔抗-His-tag 抗体为一抗，驴抗兔抗体为二抗，通过 ELISA，测定 C57BL/6 小鼠及 SD 大鼠的玻璃体与眼底样本中人源 TTR 的含量。

(2) 将实施例 5 制得的人源 TTR 配置为 10 $\mu\text{mol/L}$ (含有生理盐水及 0-8 mg/mL PEG400 (购于国药，分子量 360-440))，分别对 C57BL/6 小鼠 (8 周龄) 及 SD 大鼠 (8 周龄) 进行滴眼，经过 3-72 h 后处死，取玻璃体与眼底样本提取蛋白，使用兔抗-His-tag 抗体为一抗，驴抗兔抗体为二抗，通过 ELISA，测定 C57BL/6 小鼠及 SD 大鼠的玻璃体与眼底样本中人源 TTR 的含量。

结果显示，滴眼 3 h 后玻璃体与眼底样本中人源 TTR 含量达到最高峰；滴眼液中，添加了 PEG400 之后，玻璃体与眼底样本中人源 TTR 含量提高了 20%以上，且当 PEG400 含量为 6 mg/mL 时，滴眼 3 h 后玻璃体与眼底样本中人源 TTR 含量达到最高峰；滴眼后，人源 TTR 在 C57BL/6 小鼠及 SD 大鼠玻璃体与眼底样本内的含量半衰期接近 60 h，说明可以在玻璃体与眼底样本内有效存在 60 h，有足够的治疗浓度和治疗时间 (表 40)。

结合实施例 21 和 22 中的结果可知，虽然 PEG400 可有效促进 TTR 在玻璃体和眼底

样本中的含量，但将其用于治疗患有 DR 或 AMD 的老鼠时，治疗效果相对较差。这就表明，TTR 透过量的增加，并不意味着治疗效果增加，TTR、TTR 合适的透过量以及合适的辅料，相互牵制，协同配合，形成一个有机整体，最终才能获得一个较佳的治疗效果。

此外，从表 25 和表 27 可知，即使是正常的 SD 大鼠，成年的 SD 大鼠的视网膜渗漏情况要比幼年的 SD 大鼠严重，另外，其他一些原因，例如，实验操作、个体差异等，也可能会造成视网膜渗漏以及新生血管数增加，这就表明即使是未经造模的正常对照眼也存在一定程度的视网膜渗漏以及新生血管增加的情况。通过将 TTR 和硫酸软骨素 A 钠盐配合使用后，不仅可以治疗 DR、AMD 以及 ROP，还可以起到滋养作用，对眼部本身因其他原因产生的视网膜渗漏以及新生血管增加的情况也有一定的缓解效果。

表 40 人源 TTR 跨越 C57BL/6 小鼠及 SD 大鼠角膜屏障进入玻璃体及眼底

(1) 人源重组 TTR（生理盐水溶液），滴眼后 3 h，玻璃体及眼底内人源 TTR 含量						
滴眼 TTR 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	5	10	15	20	25	30
C57BL/6 小鼠 玻璃体及眼底 样本中人源 TTR 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0.84 $\pm$ 0.07	1.81 $\pm$ 0.19	1.75 $\pm$ 0.20	1.83 $\pm$ 0.21	1.88 $\pm$ 0.17	1.87 $\pm$ 0.20
SD 大鼠玻璃体 及眼底样本中 人源 TTR 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	1.14 $\pm$ 0.11	2.43 $\pm$ 0.21	2.37 $\pm$ 0.30	2.42 $\pm$ 0.36	2.45 $\pm$ 0.42	2.44 $\pm$ 0.36
(2) 人源重组 TTR（10 $\mu\text{mol/L}$ ）（生理盐水溶液添加不同浓度 PEG400），滴眼后 3 h，玻璃体及眼底内人源 TTR 含量						
PEG400 浓度 (mg/mL)	0	2	4	6	8	
C57BL/6 小鼠 玻璃体及眼底 样本中人源 TTR 浓度	1.81 $\pm$ 0.19	2.29 $\pm$ 0.18	2.83 $\pm$ 0.21	3.02 $\pm$ 0.15	3.00 $\pm$ 0.09	

($\mu\text{mol/L}$)					
SD 大鼠玻璃体及眼底样本中人源 TTR 浓度($\mu\text{mol/L}$)	2.43 $\pm$ 0.21	2.99 $\pm$ 0.21	3.33 $\pm$ 0.29	3.51 $\pm$ 0.32	3.47 $\pm$ 0.36
(3) 人源重组 TTR (10 $\mu\text{mol/L}$) (生理盐水溶液添加 6 mg/mL PEG400), 滴眼后 3 h 达到最高峰, 此后不同时间玻璃体及眼底内人源 TTR 含量					
滴眼后取样时间 (h)	3	18	36	60	72
C57BL/6 小鼠玻璃体及眼底样本中人源 TTR 浓度($\mu\text{mol/L}$)	3.02 $\pm$ 0.15	2.61 $\pm$ 0.20	2.01 $\pm$ 0.18	1.50 $\pm$ 0.12	1.00 $\pm$ 0.09
SD 大鼠玻璃体及眼底样本中人源 TTR 浓度($\mu\text{mol/L}$)	3.51 $\pm$ 0.32	3.04 $\pm$ 0.21	2.13 $\pm$ 0.20	1.73 $\pm$ 0.11	1.14 $\pm$ 0.10

对比例 7:

具体实施方式同实施例 26, 区别在于, 将未与 TTR 结合的各个配体分子按照实施例 26 相同的操作步骤对 C57BL/6 小鼠 (8 周龄) 及 SD 大鼠 (8 周龄) 进行滴眼测试, 结果显示, 各个配体分子单独无法进入 C57BL/6 小鼠及 SD 大鼠的玻璃体及眼底 (表 41)。

表 41 各个配体分子跨越 C57BL/6 小鼠及 SD 大鼠角膜屏障进入玻璃体及眼底

生理盐水溶液添加 2%透明质酸以及 1 mmol/L 双氯芬酸钠/ 1 mmol/L 维生素 A+5%吐温 80/ 1 mmol/L 木犀草苷, 滴眼后不同时间玻璃体及眼底内各配体的含量					
滴眼后取样时间 (h)	3	18	36	60	72
C57BL/6 小鼠玻璃体及眼底样本中双氯芬	-	-	-	-	-

酸 钠 浓 度 ($\mu\text{mol/L}$)					
C57BL/6 小 鼠 玻璃体及眼底 样本中维生素 A 浓 度 ($\mu\text{mol/L}$)	-	-	-	-	-
C57BL/6 小 鼠 玻璃体及眼底 样本中木犀草 苷 浓 度 ($\mu\text{mol/L}$)	-	-	-	-	-
SD 大鼠玻璃体 及眼底样本中 双氯芬酸钠浓 度 ($\mu\text{mol/L}$)	-	-	-	-	-
SD 大鼠玻璃体 及眼底样本中 维生素 A 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	-	-	-	-	-
SD 大鼠玻璃体 及眼底样本中 木犀草苷浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	-	-	-	-	-

对比例 8:

具体实施方式同实施例 27，表 42 中显示了其中右眼滴眼后的结果数据。结果显示，各个配体分子单独滴眼无法改善 STZ 诱导 SD 大鼠 DR 病理状况（表 42）。

表 42 各配体单独滴眼治疗 STZ 诱导 SD 大鼠 DR 病理状况

生理盐水溶液+2%透明质酸，以及 10 $\mu\text{mol/L}$ 双氯芬酸钠/5 $\mu\text{mol/L}$ 维生素 A+5%吐温 80/5 $\mu\text{mol/L}$ 木犀草苷，对 STZ 诱导 SD 大鼠进行滴眼治疗 3 个月后 DR 病理状况

	正 常 对 照 眼	未滴对照	双 氯 芬 酸 钠	维生素 A	木犀草苷
滴眼浓度 (μmol/L)	-	0	10	5	5
视网膜渗漏区域 (%)	4.9±0.5	29.4±3.1	30.4±3.1	28.9±3.0	27.6±4.1
视网膜新生血管数 (10 个视野)	11±2	77±6	80±9	76±8	79±9

对比例 9:

具体实施方式同实施例 28，表 43 中显示了其中右眼滴眼后的结果数据。结果显示，各个配体分子单独滴眼无法改善激光视网膜光凝诱导 C57BL/6 小鼠 AMD 病理状况（表 43）。

表 43 各配体单独滴眼治疗激光视网膜光凝诱导 C57BL/6 小鼠 AMD 病理状况

生理盐水溶液+2%透明质酸，以及 10 μmol/L 双氯芬酸钠/5 μmol/L 维生素 A+5%吐温 80/5 μmol/L 木犀草苷，对激光视网膜光凝诱导 C57BL/6 小鼠进行滴眼治疗 2 周后 AMD 病理状况					
	正 常 对 照 眼	未滴对照	双 氯 芬 酸 钠	维生素 A	木犀草苷
滴眼浓度 (μmol/L)	-	0	10	5	5
视网膜渗漏区域 (%)	3.9±0.4	24.7±2.2	25.2±3.0	26.7±3.4	21.3±2.2
视网膜新生血管数 (10 个视野)	11±3	80±7	85±6	79±10	82±8

对比例 10:

具体实施方式同实施例 29，表 44 中显示了其中右眼滴眼后的结果数据。结果显示，各个配体分子单独滴眼无法改善高压氧舱诱导 SD 大鼠乳鼠 ROP 病理状况（表 44）。

表 44 各配体单独滴眼治疗高压氧舱诱导 SD 大鼠乳鼠 ROP 病理状况

生理盐水溶液+2%透明质酸，以及 10 μmol/L 双氯芬酸钠/5 μmol/L 维生素 A+5%吐温 80/5 μmol/L 木犀草苷，对高压氧舱诱导 SD 大鼠乳鼠进行滴眼治疗 5 天后 ROP 病理状况					
	正 常 对 照 眼	未滴对照	双氯芬酸钠	维生素 A	木犀草苷
滴眼浓度 (μmol/L)	-	0	10	5	5

视 网 膜 渗 漏 区 域 (%)	3.3±0.3	44.7±5.1	48.5±5.8	46.9±4.9	51.2±6.8
----------------------	---------	----------	----------	----------	----------

对比例 11:

磺胺甲恶唑（sulfamethoxazole）的抗菌谱广，抗菌作用强，能阻碍细菌生长，对葡萄球菌、大肠杆菌特别有效；适用于呼吸系统、泌尿系统及肠道感染等；主要用于治疗禽霍乱等。其可用于制备滴眼液例如复方磺胺甲恶唑钠滴眼液（本品为复方制剂，每 10 毫升含磺胺甲恶唑钠 400 毫克，氨基己酸 200 毫克、甘草酸二钾 10 毫克、马来酸氯苯那敏 2 毫克。主要用于敏感菌所引起的细菌性结膜炎、睑腺炎（麦粒肿）及细菌性眼睑炎）。

通过 Discovery studio 软件进行分子模拟发现磺胺甲恶唑能够与 TTR 多聚体稳定结合。图 17A 中显示的蛋白结构为 TTR 二聚体，磺胺甲恶唑配体分子使用箭头指示，一分子 TTR 二聚体可以结合一分子磺胺甲恶唑。图 17B 中显示了磺胺甲恶唑与 TTR 氨基酸残基的相互作用。

参考实施例 25 的步骤，在 10 μmol/L 的 TTR 溶液（1000 μL）中，以 1 μL/min 的速度滴加 100 μmol/L 的磺胺甲恶唑钠盐溶液，使用内置软件计算亲和结合平衡解离常数 Kd 为 7.03×10⁻⁸ mol/L。

参照实施例 26 的步骤使用 TTR/磺胺甲恶唑钠盐对大鼠和小鼠进行滴眼 3-72 小时后，大鼠和小鼠的角膜出现损伤，即，磺胺甲恶唑钠盐与 TTR 配合使用时会烧伤角膜，不具有生物安全性。可见，用 Discovery studio 软件分子模拟筛选出同样具有生物活性、具有消炎作用且均可以与 TTR 结合的配体后，进行试验验证时并不是都可以提高治疗效果。

虽然以上描述了本发明的具体实施方式，但是本领域的技术人员应当理解，这些仅是举例说明，在不背离本发明的原理和实质的前提下，可以对这些实施方式做出多种变更或修改。因此，本发明的保护范围由所附权利要求书限定。

权利要求

1. 转甲状腺素蛋白作为蛋白质类和/或多肽类药物通过眼部屏障进入眼内的载体方面的应用，所述转甲状腺素蛋白如（a）、（b）或（c）所示：

（a）由 SEQ ID NO: 1 所示氨基酸组成的蛋白质；

（b）在（a）中的氨基酸序列上经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸的序列所示的具有抑制血管新生功能的由（a）衍生的蛋白质；

（c）在（a）或（b）中的氨基酸序列上经过亲水性修饰或疏水性修饰的序列所示的蛋白质。

2. 如权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述（b）中，所述的由（a）衍生的蛋白质为在（a）中的氨基酸序列上经过 22 个氨基酸的取代、25 个氨基酸的取代、或 5 个氨基酸的缺失；

和/或，所述（c）中，所述亲水性修饰或疏水性修饰在（a）中的氨基酸序列上的第 10 位的半胱氨酸上进行；

较佳地：

所述（b）中，所述的由（a）衍生的蛋白质为在（a）中的氨基酸序列的 T3、T5、I26、N27、H31、R34、A36、A37、D38、D39、T40、S50、E61、E63、V65、I68、K70、I73、A81、H90、E92、P102、R104、T123、K126 和/或 E127 发生取代；或在（a）中的氨基酸序列的第 123-127 位发生缺失；优选在（a）中的氨基酸序列上经过 T3G、T5A、I26V、N27D、H31K、R34K、A36T、D39G、T40S、S50A、E61D、E63K、V65T、I68V、K70R、I73L、H90Y、P102H、R104H、T123S、K126Q 和 E127N 的取代，或在（a）中的氨基酸序列上经过 T3G、T5A、I26V、N27D、H31K、R34K、A36T、A37S、D38E、D39G、T40S、S50A、E61D、E63K、I68V、K70R、I73L、A81T、H90F、E92D、P102H、R104H、T123S、K126Q 和 E127N 的取代；

和/或，所述（c）中，所述疏水性修饰为在（a）中的氨基酸序列上的第 10 位的半胱氨酸上使用长链疏水片段例如正十二烷进行修饰、或、在（a）中的氨基酸序列上的第 10 位的半胱氨酸上通过马来酰亚胺连接正十二烷进行修饰；

更佳地：

所述（b）中，所述的由（a）衍生的蛋白质的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10 或 SEQ ID NO: 11 所示。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的应用，其特征在于，所述转甲状腺素蛋白与所述蛋白质

类和/或多肽类药物融合表达；所述融合优选是将所述蛋白质类和/或多肽类药物融合在所述转甲状腺素蛋白的 N 端或 C 端；所述转甲状腺素蛋白与所述蛋白质类和/或多肽类药物融合优选是在微生物细胞中表达，并经过纯化；所述纯化优选是通过内毒素吸附柱去除内毒素，再通过 0.22 μm 孔径滤膜去除残留菌体；

和/或，所述蛋白质类和/或多肽类药物包括溶菌酶、白蛋白和/或 EGFR 抗体，且分子量不超过 45 kDa；所述溶菌酶优选为鸡蛋清溶菌酶，其 GenBank 登录号为 AAL69327.1；所述白蛋白优选为鸡蛋清白蛋白；

和/或，所述蛋白质类和/或多肽类药物包括治疗眼部视网膜渗漏和/或视网膜血管新生类眼部疾病例如糖尿病视网膜病变、老年性黄斑变性和/或早产儿视网膜病变的蛋白质类和/或多肽类药物。

4. 如权利要求 1~3 任一项所述的应用，其特征在于，编码所述转甲状腺素蛋白的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示；

和/或，所述转甲状腺素蛋白通过使用重组表达载体进行表达，所述重组表达载体的骨架质粒中的启动子为鼠李糖诱导型启动子，优选为 rhaPBAD 启动子；

和/或，所述转甲状腺素蛋白通过使用重组表达载体进行表达，所述重组表达载体的骨架载体为 pET-21a 或与其具有 25%及以上同源性的载体，所述与其具有 25%及以上同源性的载体的序列优选如 SEQ ID NO: 8 所示；

和/或，表达所述转甲状腺素蛋白的重组质粒的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示；

和/或，所述转甲状腺素蛋白是在微生物细胞中表达，并优选经过纯化；所述的微生物细胞优选为大肠杆菌，所述大肠杆菌优选包括 *E. coli* BL21、*E. coli* BL21 (DE3)、*E. coli* JM109、*E. coli* DH5 α 、*E. coli* K12 或 *E. coli* TOP10；所述纯化优选是通过内毒素吸附柱去除内毒素，通过 0.22 μm 孔径滤膜去除残留菌体；

和/或，表达所述转甲状腺素蛋白时，通过培养包含所述转甲状腺素蛋白的基因的转化体至所得菌体的 OD₆₀₀ 达到 1.5-2.0，例如 1.6、1.7、1.8 或 1.9 时进行表达；

和/或，表达所述转甲状腺素蛋白时为使用诱导表达的试剂进行诱导表达，所述诱导表达的试剂的质量体积百分比为 0.1-2%，例如 0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.7%、0.8%、1.2%或 1.6%，所述诱导表达的时间优选为 8-20 h，例如 10 h、12 h、14 h、16 h、17 h、18 h 或 19 h；所述诱导表达的试剂优选为鼠李糖或者 IPTG。

5. 转甲状腺素蛋白和/或转甲状腺素蛋白与药物组成的融合蛋白在制备滴剂中的应用，所述药物为蛋白质类和/或多肽类药物，所述转甲状腺素蛋白如 (a)、(b) 或 (c) 所示：

(a) 由 SEQ ID NO: 1 所示氨基酸组成的蛋白质；

(b) 在 (a) 中的氨基酸序列上经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸的序列所示的具有抑制血管新生功能的由 (a) 衍生的蛋白质；

(c) 在 (a) 或 (b) 中的氨基酸序列上经过亲水性修饰或疏水性修饰的序列所示的蛋白质。

6. 如权利要求 5 所述的应用，其特征在于，所述 (b) 中，所述的由 (a) 衍生的蛋白质为在 (a) 中的氨基酸序列上经过 22 个氨基酸的取代、25 个氨基酸的取代、或 5 个氨基酸的缺失；

和/或，所述 (c) 中，所述亲水性修饰或疏水性修饰在 (a) 中的氨基酸序列上的第 10 位的半胱氨酸上进行；

较佳地：

所述 (b) 中，所述的由 (a) 衍生的蛋白质为在 (a) 中的氨基酸序列的 T3、T5、I26、N27、H31、R34、A36、A37、D38、D39、T40、S50、E61、E63、V65、I68、K70、I73、A81、H90、E92、P102、R104、T123、K126 和/或 E127 发生取代；或在 (a) 中的氨基酸序列的第 123-127 位发生缺失；优选在 (a) 中的氨基酸序列上经过 T3G、T5A、I26V、N27D、H31K、R34K、A36T、D39G、T40S、S50A、E61D、E63K、V65T、I68V、K70R、I73L、H90Y、P102H、R104H、T123S、K126Q 和 E127N 的取代，或在 (a) 中的氨基酸序列上经过 T3G、T5A、I26V、N27D、H31K、R34K、A36T、A37S、D38E、D39G、T40S、S50A、E61D、E63K、I68V、K70R、I73L、A81T、H90F、E92D、P102H、R104H、T123S、K126Q 和 E127N 的取代；

和/或，所述 (c) 中，所述疏水性修饰为在 (a) 中的氨基酸序列上的第 10 位的半胱氨酸上使用长链疏水片段例如正十二烷进行修饰、或、在 (a) 中的氨基酸序列上的第 10 位的半胱氨酸上通过使用马来酰亚胺连接正十二烷进行修饰；

更佳地：

所述 (b) 中，所述的由 (a) 衍生的蛋白质的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10 或 SEQ ID NO: 11 所示。

7. 如权利要求 5 或 6 所述的应用，其特征在于，当所述滴剂含有转甲状腺素蛋白与药物组成的融合蛋白时，所述融合蛋白的含量 4-30 $\mu\text{mol/L}$ ，优选 10-15 $\mu\text{mol/L}$ ；

和/或，当所述滴剂含有转甲状腺素蛋白时，所述转甲状腺素蛋白的含量为 4-30 $\mu\text{mol/L}$ ，优选 5-30 $\mu\text{mol/L}$ ，更优选 10-20 $\mu\text{mol/L}$ ，例如 10、15、20 $\mu\text{mol/L}$ ；

和/或，所述滴剂中还含有生理盐水；

和/或，所述滴剂中还含有表面活性剂，所述表面活性剂例如为吐温 80，其含量优选为 5 v/v %；

和/或，所述滴剂中还含有药学上可接受的辅料，所述药学上可接受的辅料选自羧甲基纤维素或其盐、硫酸软骨素或其盐、右旋糖酐、和、透明质酸中的一种或多种；其中，所述羧甲基纤维素或其盐的黏度优选为 800-1200 CP；和/或，所述硫酸软骨素优选为硫酸软骨素 A；和/或，所述右旋糖酐优选为右旋糖酐 70；和/或，所述的“羧甲基纤维素或其盐”、“硫酸软骨素或其盐”中的“盐”独立地优选为钠盐或钙盐，例如为羧甲基纤维素钠或硫酸软骨素 A 钠盐；和/或，所述透明质酸的分子量优选为 10000-500000；和/或，所述羧甲基纤维素或其盐的浓度优选为 0-8 mg/mL 但不为 0，更优选为 2、4、6 或 8 mg/mL；和/或，所述硫酸软骨素或其盐的浓度优选为 0-40 mg/mL 但不为 0，更优选为 10、20、30 或 40 mg/mL；和/或，所述右旋糖酐的浓度优选为 0-0.8 mg/mL 但不为 0，更优选为 0.2、0.4、0.6 或 0.8 mg/mL；和/或，所述透明质酸的含量优选≤6%，优选 1-4%，更优选 2%；

和/或，所述滴剂中还含有化合物、其药学上可接受的盐或其糖苷；所述化合物选自双氯芬酸、维生素 A 和木犀草素中的一种或多种；其中，所述的药学上可接受的盐优选为钠盐，例如为双氯芬酸钠；和/或，所述的糖苷优选为木犀草苷；和/或，所述的维生素 A 优选为维生素 A1 和/或维生素 A2；和/或，所述双氯芬酸或其盐的含量优选为 5-20 μmol/L，例如为 10 μmol/L；和/或，所述维生素 A 的含量优选为 2-10 μmol/L，例如为 5 μmol/L；和/或，所述木犀草素或其糖苷的含量优选为 2-10 μmol/L，例如为 5 μmol/L；

和/或，所述滴剂优选滴眼液；

和/或，所述滴剂为抑制眼部视网膜渗漏和/或降低视网膜新生血管数的滴剂，优选为治疗糖尿病视网膜病变、老年性黄斑变性和/或早产儿视网膜病变的滴剂；

和/或，所述滴剂以每日滴加 1-3 次、每次滴加量优选为 0.3-0.8 nmol 蛋白/眼进行施用；

和/或，所述滴剂以每日 2 次、每次 1 滴、持续 3 个月进行施用；和/或，所述滴剂以每日 1 次、每次 1 滴、持续 5 天进行施用；和/或，所述滴剂以每日 2 次、每次 1 滴、持续 2 周进行施用；

和/或，编码所述转甲状腺素蛋白的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示；

和/或，所述转甲状腺素蛋白通过使用重组表达载体进行表达，所述重组表达载体的骨架质粒中的启动子为鼠李糖诱导型启动子，优选为 rhaPBAD 启动子；

和/或，所述转甲状腺素蛋白通过使用重组表达载体进行表达，所述重组表达载体的骨架载体为 pET-21a 或与其具有 25%及以上同源性的载体，所述与其具有 25%及以上同

源性的载体的序列优选如 SEQ ID NO: 8 所示；

和/或，表达所述转甲状腺素蛋白的重组质粒的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示；

和/或，所述转甲状腺素蛋白是在微生物细胞中表达，并优选经过纯化；所述的微生物细胞优选为大肠杆菌，所述大肠杆菌优选包括 *E. coli* BL21、*E. coli* BL21 (DE3)、*E. coli* JM109、*E. coli* DH5 α 、*E. coli* K12 或 *E. coli* TOP10；所述纯化优选是通过内毒素吸附柱去除内毒素，通过 0.22 μ m 孔径滤膜去除残留菌体；

和/或，表达所述转甲状腺素蛋白时，通过培养包含所述转甲状腺素蛋白的基因的转化体至所得菌体的 OD₆₀₀ 达到 1.5-2.0，例如 1.6、1.7、1.8 或 1.9 时进行表达；

和/或，表达所述转甲状腺素蛋白时为使用诱导表达的试剂进行诱导表达，所述诱导表达的试剂的质量体积百分比为 0.1-2%，例如 0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.7%、0.8%、1.2% 或 1.6%，所述诱导表达的时间优选为 8-20 h，例如 10 h、12 h、14 h、16 h、17 h、18 h 或 19 h；所述诱导表达的试剂优选为鼠李糖或者 IPTG；

和/或，所述融合蛋白的序列如 SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 7 所示；

和/或，所述转甲状腺素蛋白与所述蛋白质类和/或多肽类药物融合表达；所述融合优选是将所述蛋白质类和/或多肽类药物融合在所述转甲状腺素蛋白的 N 端或 C 端；所述转甲状腺素蛋白与所述蛋白质类和/或多肽类药物融合优选是在微生物细胞中表达，并经过纯化；所述纯化优选是通过内毒素吸附柱去除内毒素，再通过 0.22 μ m 孔径滤膜去除残留菌体；

和/或，所述蛋白质类和/或多肽类药物包括溶菌酶、白蛋白和/或 EGFR 抗体，且分子量不超过 45 kDa；所述溶菌酶优选为鸡蛋清溶菌酶，其 GenBank 登录号为 AAL69327.1；所述白蛋白优选为鸡蛋清白蛋白；

和/或，所述蛋白质类和/或多肽类药物包括治疗眼部视网膜渗漏和/或视网膜血管新生类眼部疾病例如糖尿病视网膜病变、老年性黄斑变性和/或早产儿视网膜病变的蛋白质类和/或多肽类药物。

8. 一种滴剂，其特征在于，其含有转甲状腺素蛋白和/或转甲状腺素蛋白与药物组成的融合蛋白；所述药物为蛋白质类和/或多肽类药物，所述转甲状腺素蛋白如 (a)、(b) 或 (c) 所示：

(a) 由 SEQ ID NO: 1 所示氨基酸组成的蛋白质；

(b) 在 (a) 中的氨基酸序列上经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸的序列所示的具有抑制血管新生功能的由 (a) 衍生的蛋白质；

(c) 在 (a) 或 (b) 中的氨基酸序列上经过亲水性修饰或疏水性修饰的序列所示的

蛋白质。

9. 如权利要求 8 所述的滴剂，其特征在于，所述（b）中，所述的由（a）衍生的蛋白质为在（a）中的氨基酸序列上经过 22 个氨基酸的取代、25 个氨基酸的取代、或 5 个氨基酸的缺失；

和/或，所述（c）中，所述亲水性修饰或疏水性修饰在（a）中的氨基酸序列上的第 10 位的半胱氨酸上进行；

较佳地：

所述（b）中，所述的由（a）衍生的蛋白质为在（a）中的氨基酸序列的 T3、T5、I26、N27、H31、R34、A36、A37、D38、D39、T40、S50、E61、E63、V65、I68、K70、I73、A81、H90、E92、P102、R104、T123、K126 和/或 E127 发生取代；或在（a）中的氨基酸序列的第 123-127 位发生缺失；优选在（a）中的氨基酸序列上经过 T3G、T5A、I26V、N27D、H31K、R34K、A36T、D39G、T40S、S50A、E61D、E63K、V65T、I68V、K70R、I73L、H90Y、P102H、R104H、T123S、K126Q 和 E127N 的取代，或在（a）中的氨基酸序列上经过 T3G、T5A、I26V、N27D、H31K、R34K、A36T、A37S、D38E、D39G、T40S、S50A、E61D、E63K、I68V、K70R、I73L、A81T、H90F、E92D、P102H、R104H、T123S、K126Q 和 E127N 的取代；

和/或，所述（c）中，所述疏水性修饰为在（a）中的氨基酸序列上的第 10 位的半胱氨酸上使用长链疏水片段例如正十二烷进行修饰、或、在（a）中的氨基酸序列上的第 10 位的半胱氨酸上通过使用马来酰亚胺连接正十二烷进行修饰；

更佳地：

所述（b）中，所述的由（a）衍生的蛋白质的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10 或 SEQ ID NO: 11 所示。

10. 如权利要求 8 或 9 所述的滴剂，其特征在于，当所述滴剂含有转甲状腺素蛋白与药物组成的融合蛋白时，所述融合蛋白的含量 4-30 $\mu\text{mol/L}$ ，优选 10-15 $\mu\text{mol/L}$ ；

和/或，当所述滴剂含有转甲状腺素蛋白时，所述转甲状腺素蛋白的含量为 4-30 $\mu\text{mol/L}$ ，优选 5-30 $\mu\text{mol/L}$ ，更优选 10-20 $\mu\text{mol/L}$ ，例如 10、15、20 $\mu\text{mol/L}$ ；

和/或，所述滴剂中还含有生理盐水；

和/或，所述滴剂中还含有表面活性剂，所述表面活性剂例如为吐温 80，其含量优选为 5 v/v%；

和/或，所述滴剂优选滴眼液；

和/或，所述滴剂为抑制眼部视网膜渗漏和/或降低视网膜新生血管数的滴剂，优选为

治疗糖尿病视网膜病变、老年性黄斑变性和/或早产儿视网膜病变的滴剂；

和/或，所述滴剂以每日滴加 1-3 次、每次滴加量优选为 0.3-0.8 nmol 蛋白/眼进行施用；

和/或，所述滴剂以每日 2 次、每次 1 滴、持续 3 个月进行施用；和/或，所述滴剂以每日 1 次、每次 1 滴、持续 5 天进行施用；和/或，所述滴剂以每日 2 次、每次 1 滴、持续 2 周进行施用；

和/或，编码所述转甲状腺素蛋白的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示；

和/或，所述转甲状腺素蛋白通过使用重组表达载体进行表达，所述重组表达载体的骨架质粒中的启动子为鼠李糖诱导型启动子，优选为 rhaPBAD 启动子；

和/或，所述转甲状腺素蛋白通过使用重组表达载体进行表达，所述重组表达载体的骨架载体为 pET-21a 或与其具有 25%及以上同源性的载体，所述与其具有 25%及以上同源性的载体的序列优选如 SEQ ID NO: 8 所示；

和/或，表达所述转甲状腺素蛋白的重组质粒的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示；

和/或，所述转甲状腺素蛋白是在微生物细胞中表达，并优选经过纯化；所述的微生物细胞优选为大肠杆菌，所述大肠杆菌优选包括 *E. coli* BL21、*E. coli* BL21 (DE3)、*E. coli* JM109、*E. coli* DH5 α 、*E. coli* K12 或 *E. coli* TOP10；所述纯化优选是通过内毒素吸附柱去除内毒素，通过 0.22 μ m 孔径滤膜去除残留菌体；

和/或，表达所述转甲状腺素蛋白时，通过培养包含所述转甲状腺素蛋白的基因的转化体至所得菌体的 OD₆₀₀ 达到 1.5-2.0，例如 1.6、1.7、1.8 或 1.9 时进行表达；

和/或，表达所述转甲状腺素蛋白时为使用诱导表达的试剂进行诱导表达，所述诱导表达的试剂的质量体积百分比为 0.1-2%，例如 0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.7%、0.8%、1.2%或 1.6%，所述诱导表达的时间优选为 8-20 h，例如 10 h、12 h、14 h、16 h、17 h、18 h 或 19 h；所述诱导表达的试剂优选为鼠李糖或者 IPTG；

和/或，所述融合蛋白的序列如 SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 7 所示；

和/或，所述转甲状腺素蛋白与所述蛋白质类和/或多肽类药物融合表达；所述融合优选是将所述蛋白质类和/或多肽类药物融合在所述转甲状腺素蛋白的 N 端或 C 端；所述转甲状腺素蛋白与所述蛋白质类和/或多肽类药物融合优选是在微生物细胞中表达，并经过纯化；所述纯化优选是通过内毒素吸附柱去除内毒素，再通过 0.22 μ m 孔径滤膜去除残留菌体；

和/或，所述蛋白质类和/或多肽类药物包括溶菌酶、白蛋白和/或 EGFR 抗体，且分子量不超过 45 kDa；所述溶菌酶优选为鸡蛋清溶菌酶，其 GenBank 登录号为 AAL69327.1；

所述白蛋白优选为鸡蛋清白蛋白；

和/或，所述蛋白质类和/或多肽类药物包括治疗眼部视网膜渗漏和/或视网膜血管新生类眼部疾病例如糖尿病视网膜病变、老年性黄斑变性和/或早产儿视网膜病变的蛋白质类和/或多肽类药物。

11. 如权利要求 8-10 任一项所述的滴剂，其特征在于，所述滴剂中还含有药学上可接受的辅料，所述药学上可接受的辅料选自羧甲基纤维素或其盐、硫酸软骨素或其盐、右旋糖酐、和、透明质酸中的一种或多种；

较佳地：

所述羧甲基纤维素或其盐的黏度为 800-1200 CP；

和/或，所述硫酸软骨素为硫酸软骨素 A；

和/或，所述右旋糖酐为右旋糖酐 70；

和/或，所述的“羧甲基纤维素或其盐”、“硫酸软骨素或其盐”中的“盐”独立地为钠盐或钙盐，例如为羧甲基纤维素钠或硫酸软骨素 A 钠盐；

和/或，所述透明质酸的分子量为 10000-500000；

和/或，所述羧甲基纤维素或其盐的浓度为 0-8 mg/mL 但不为 0，优选为 2、4、6 或 8 mg/mL；

和/或，所述硫酸软骨素或其盐的浓度为 0-40 mg/mL 但不为 0，优选为 10、20、30 或 40 mg/mL；

和/或，所述右旋糖酐的浓度为 0-0.8 mg/mL 但不为 0，优选为 0.2、0.4、0.6 或 0.8 mg/mL；

和/或，所述透明质酸的含量 $\leq$ 6%，优选 1-4%，更优选 2%。

12. 如权利要求 8-11 任一项所述的滴剂，其特征在于，所述滴剂中还含有化合物、其药学上可接受的盐或其糖苷；所述化合物选自双氯芬酸、维生素 A 和木犀草素中的一种或多种；

较佳地：

所述的药学上可接受的盐为钠盐，例如为双氯芬酸钠；

和/或，所述的糖苷为木犀草苷；

和/或，所述的维生素 A 为维生素 A1 和/或维生素 A2；

和/或，所述双氯芬酸或其盐的含量为 5-20 μ mol/L，例如为 10 μ mol/L；

和/或，所述维生素 A 的含量为 2-10 μ mol/L，例如为 5 μ mol/L；

和/或，所述木犀草素或其糖苷的含量为 2-10 μ mol/L，例如为 5 μ mol/L。

13. 如权利要求 8-12 任一项所述的滴剂在制备抑制眼部视网膜渗漏和/或降低视网膜新生血管数的药物中的应用；优选为在制备治疗糖尿病视网膜病变、老年性黄斑变性和/或早产儿视网膜病变的药物中的应用。

14. 如权利要求 8-12 任一项所述的滴剂在治疗眼部疾病中的应用；所述的眼部疾病优选为眼部视网膜渗漏和/或视网膜血管新生相关眼部疾病，更优选为糖尿病视网膜病变、老年性黄斑变性和/或早产儿视网膜病变。

15. 一种治疗眼部视网膜渗漏和/或视网膜血管新生类眼部疾病例如糖尿病视网膜病变、老年性黄斑变性和/或早产儿视网膜病变等的方法，包括向需要治疗的患者施用包含如权利要求 8-12 任一项所述的滴剂。

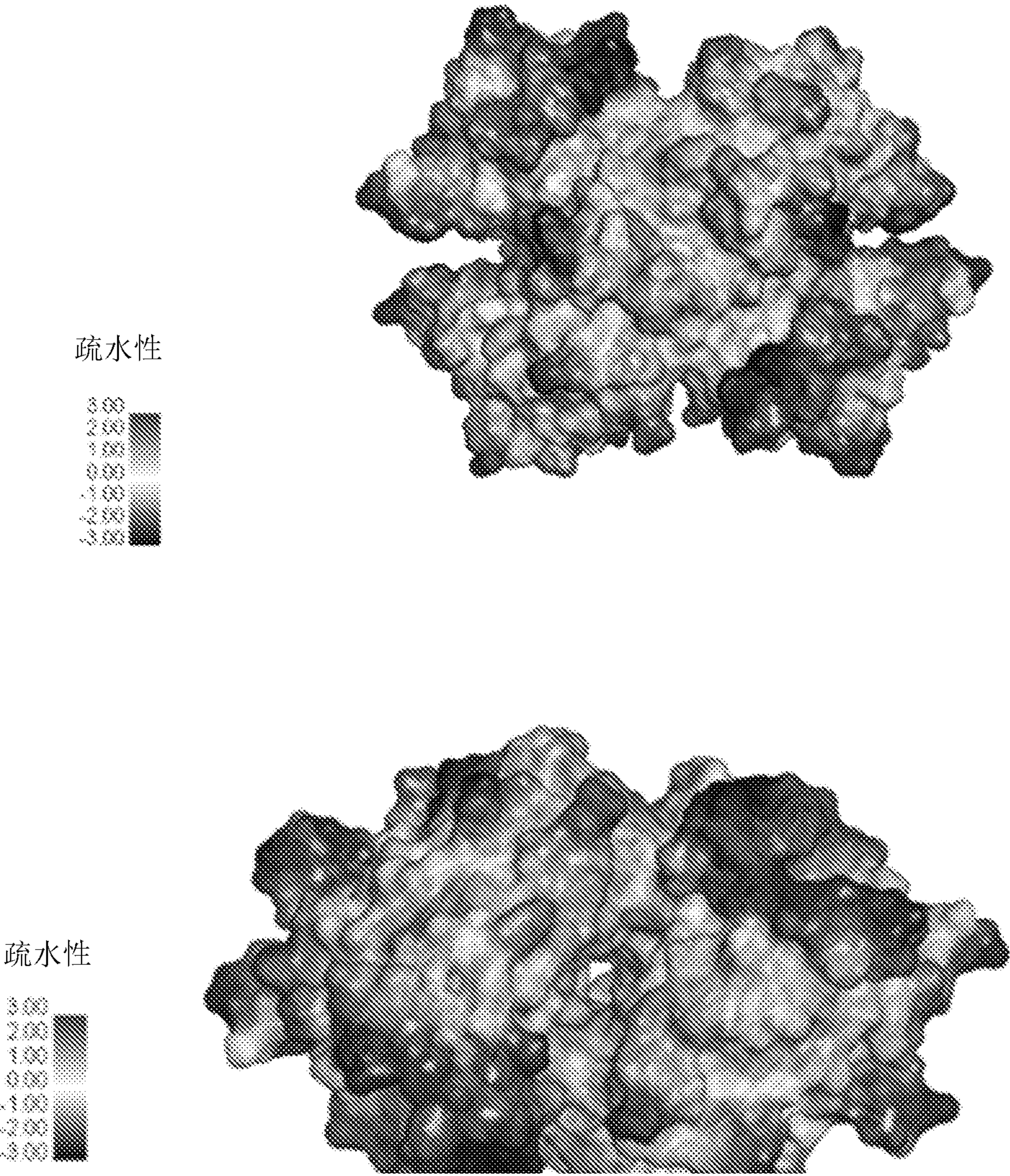


图 1

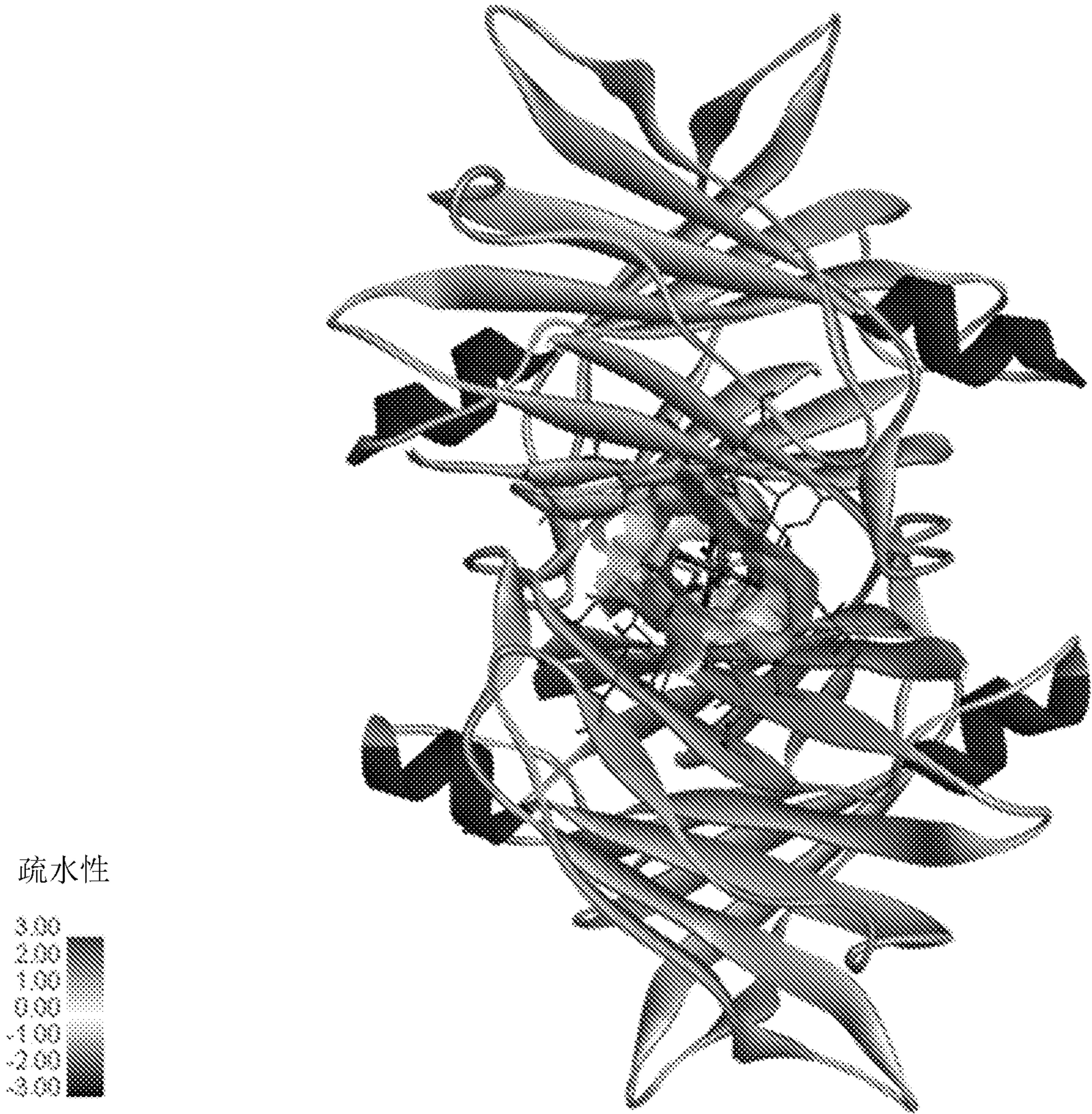


图 2

ATP	1	23	1	24	1	25	1	26	1	27	1	28	1	29	1	30	1	31	1	32	1	33	1	34	1	35	1	36	1	37	1	38	1	39	1	40	1	41	1	42	1	43	1	44	1	45	1	46	1	47	1	48	1	49	1	50	1	51	1	52	1	53	1	54	1	55	1	56	1	57	1	58	1	59	1	60	1	61	1	62	1	63	1	64	1	65	1	66	1	67	1	68	1	69	1	70	1	71	1	72	1	73	1	74	1	75	1	76	1	77	1	78	1	79	1	80	1	81	1	82	1	83	1	84	1	85	1	86	1	87	1	88	1	89	1	90	1	91	1	92	1	93	1	94	1	95	1	96	1	97	1	98	1	99	1	100	1	101	1	102	1	103	1	104	1	105	1	106	1	107	1	108	1	109	1	110	1	111	1	112	1	113	1	114	1	115	1	116	1	117	1	118	1	119	1	120	1	121	1	122	1	123	1	124	1	125	1	126	1	127	1	128	1	129	1	130	1	131	1	132	1	133	1	134	1	135	1	136	1	137	1	138	1	139	1	140	1	141	1	142	1	143	1	144	1	145	1	146	1	147	1	148	1	149	1	150	1	151	1	152	1	153	1	154	1	155	1	156	1	157	1	158	1	159	1	160	1	161	1	162	1	163	1	164	1	165	1	166	1	167	1	168	1	169	1	170	1	171	1	172	1	173	1	174	1	175	1	176	1	177	1	178	1	179	1	180	1	181	1	182	1	183	1	184	1	185	1	186	1	187	1	188	1	189	1	190	1	191	1	192	1	193	1	194	1	195	1	196	1	197	1	198	1	199	1	200	1	201	1	202	1	203	1	204	1	205	1	206	1	207	1	208	1	209	1	210	1	211	1	212	1	213	1	214	1	215	1	216	1	217	1	218	1	219	1	220	1	221	1	222	1	223	1	224	1	225	1	226	1	227	1	228	1	229	1	230	1	231	1	232	1	233	1	234	1	235	1	236	1	237	1	238	1	239	1	240	1	241	1	242	1	243	1	244	1	245	1	246	1	247	1	248	1	249	1	250	1	251	1	252	1	253	1	254	1	255	1	256	1	257	1	258	1	259	1	260	1	261	1	262	1	263	1	264	1	265	1	266	1	267	1	268	1	269	1	270	1	271	1	272	1	273	1	274	1	275	1	276	1	277	1	278	1	279	1	280	1	281	1	282	1	283	1	284	1	285	1	286	1	287	1	288	1	289	1	290	1	291	1	292	1	293	1	294	1	295	1	296	1	297	1	298	1	299	1	300	1	301	1	302	1	303	1	304	1	305	1	306	1	307	1	308	1	309	1	310	1	311	1	312	1	313	1	314	1	315	1	316	1	317	1	318	1	319	1	320	1	321	1	322	1	323	1	324	1	325	1	326	1	327	1	328	1	329	1	330	1	331	1	332	1	333	1	334	1	335	1	336	1	337	1	338	1	339	1	340	1	341	1	342	1	343	1	344	1	345	1	346	1	347	1	348	1	349	1	350	1	351	1	352	1	353	1	354	1	355	1	356	1	357	1	358	1	359	1	360	1	361	1	362	1	363	1	364	1	365	1	366	1	367	1	368	1	369	1	370	1	371	1	372	1	373	1	374	1	375	1	376	1	377	1	378	1	379	1	380	1	381	1	382	1	383	1	384	1	385	1	386	1	387	1	388	1	389	1	390	1	391	1	392	1	393	1	394	1	395	1	396	1	397	1	398	1	399	1	400	1	401	1	402	1	403	1	404	1	405	1	406	1	407	1	408	1	409	1	410	1	411	1	412	1	413	1	414	1	415	1	416	1	417	1	418	1	419	1	420	1	421	1	422	1	423	1	424	1	425	1	426	1	427	1	428	1	429	1	430	1	431	1	432	1	433	1	434	1	435	1	436	1	437	1	438	1	439	1	440	1	441	1	442	1	443	1	444	1	445	1	446	1	447	1	448	1	449	1	450	1	451	1	452	1	453	1	454	1	455	1	456	1	457	1	458	1	459	1	460	1	461	1	462	1	463	1	464	1	465	1	466	1	467	1	468	1	469	1	470	1	471	1	472	1	473	1	474	1	475	1	476	1	477	1	478	1	479	1	480	1	481	1	482	1	483	1	484	1	485	1	486	1	487	1	488	1	489	1	490	1	491	1	492	1	493	1	494	1	495	1	496	1	497	1	498	1	499	1	500	1	501	1	502	1	503	1	504	1	505	1	506	1	507	1	508	1	509	1	510	1	511	1	512	1	513	1	514	1	515	1	516	1	517	1	518	1	519	1	520	1	521	1	522	1	523	1	524	1	525	1	526	1	527	1	528	1	529	1	530	1	531	1	532	1	533	1	534	1	535	1	536	1	537	1	538	1	539	1	540	1	541	1	542	1	543	1	544	1	545	1	546	1	547	1	548	1	549	1	550	1	551	1	552	1	553	1	554	1	555	1	556	1	557	1	558	1	559	1	560	1	561	1	562	1	563	1	564	1	565	1	566	1	567	1	568	1	569	1	570	1	571	1	572	1	573	1	574	1	575	1	576	1	577	1	578	1	579	1	580	1	581	1	582	1	583	1	584	1	585	1	586	1	587	1	588	1	589	1	590	1	591	1	592	1	593	1	594	1	595	1	596	1	597	1	598	1	599	1	600	1	601	1	602	1	603	1	604	1	605	1	606	1	607	1	608	1	609	1	610	1	611	1	612	1	613	1	614	1	615	1	616	1	617	1	618	1	619	1	620	1	621	1	622	1	623	1	624	1	625	1	626	1	627	1	628	1	629	1	630	1	631	1	632	1	633	1	634	1	635	1	636	1	637	1	638	1	639	1	640	1	641	1	642	1	643	1	644	1	645	1	646	1	647	1	648	1	649	1	650	1	651	1	652	1	653	1	654	1	655	1	656	1	657	1	658	1	659	1	660	1	661	1	662	1	663	1	664	1	665	1	666	1	667	1	668	1	669	1	670	1	671	1	672	1	673	1	674	1	675	1	676	1	677	1	678	1	679	1	680	1	681	1	682	1	683	1	684	1	685	1	686	1	687	1	688	1	689	1	690	1	691	1	692	1	693	1	694	1	695	1	696	1	697	1	698	1	699	1	700	1	701	1	702	1	703	1	704	1	705	1	706	1	707	1	708	1	709	1	710	1	711	1	712	1	713	1	714	1	715	1	716	1	717	1	718	1	719	1	720	1	721	1	722	1	723	1	724	1	725	1	726	1	727	1	728	1	729	1	730	1	731	1	732	1	733	1	734	1	735	1	736	1	737	1	738	1	739	1	740	1	741	1	742	1	743	1	744	1	745	1	746	1	747	1	748	1	749	1	750	1	751	1	752	1	753	1	754	1	755	1	756	1	757	1	758	1	759	1	760	1	761	1	762	1	763	1	764	1	765	1	766	1	767	1	768	1	769	1	770	1	771	1	772	1	773	1	774	1	775	1	776	1	777	1	778	1	779	1	780	1	781	1	782	1	783	1	784	1	785	1	786	1	787	1	788	1	789	1	790	1	791	1	792	1	793	1	794	1	795	1	796	1	797	1	798	1	799	1	800	1	801	1	802	1	803	1	804	1	805	1	806	1	807	1	808	1	809	1	810	1	811	1	812	1	813	1	814	1	815	1	816	1	817	1	818	1	819	1	820	1	821	1	822	1	823	1	824	1	825	1	826	1	827	1	828	1	829	1	830	1	831	1	832	1	833	1	834	1	835	1	836	1	837	1	838	1	839	1	840	1	841	1	842	1	843	1	844	1	845	1	846	1	847	1	848	1	849	1	850	1	851	1	852	1	853	1	854	1	855	1	856	1	857	1	858	1	859	1	860	1	861	1	862	1	863	1	864	1	865	1	866	1	867	1	868	1	869	1	870	1	871	1	872	1	873	1	874	1	875	1	876	1	877	1	878	1	879	1	880	1	881	1	882	1	883	1	884	1	885	1	886	1	887	1	888	1	889	1	890	1	891	1	892	1	893	1	894	1	895	1	896	1	897	1	898	1	899	1	900	1	901	1	902	1	903</
-----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-----	---	-------

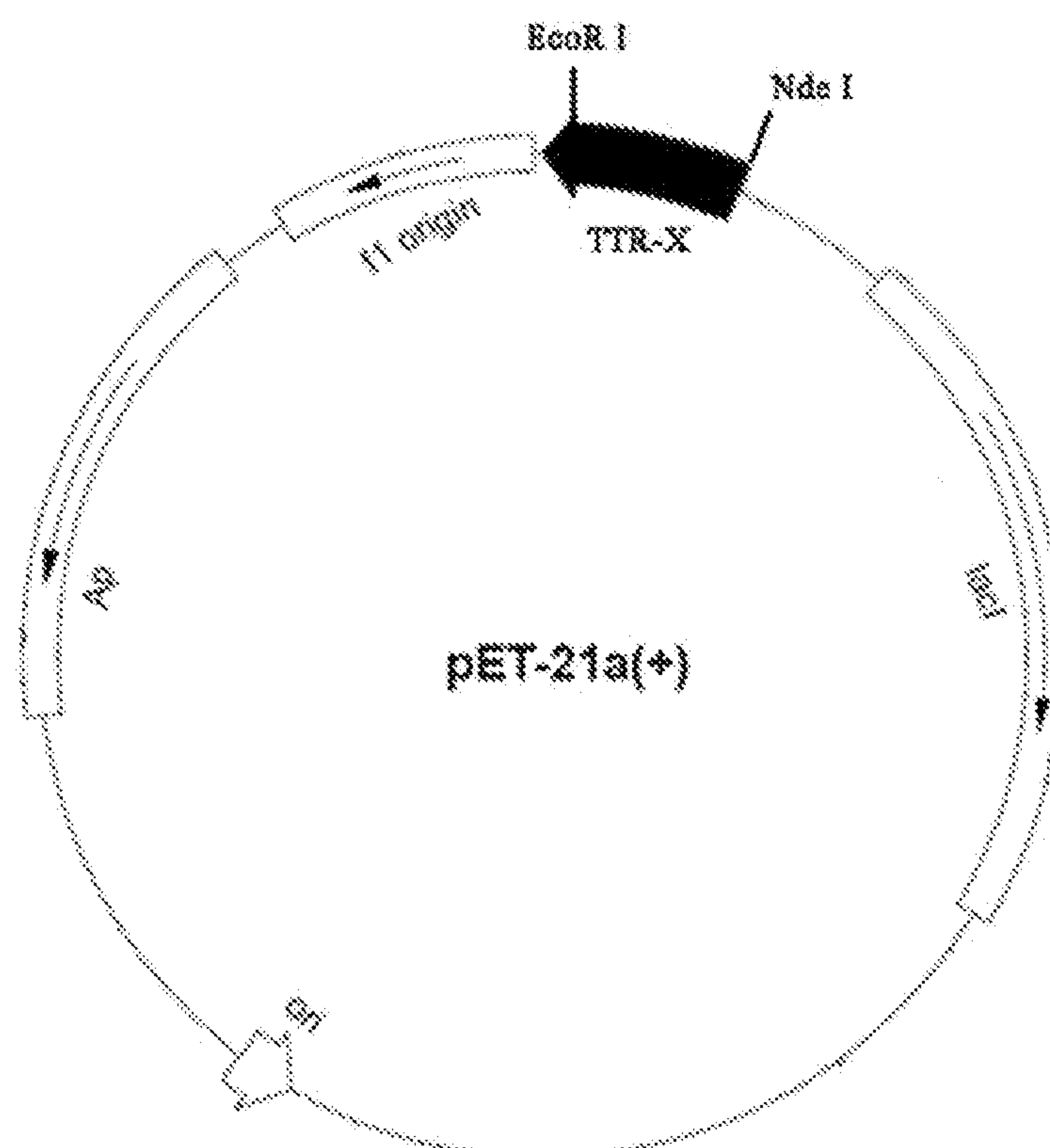


图 4

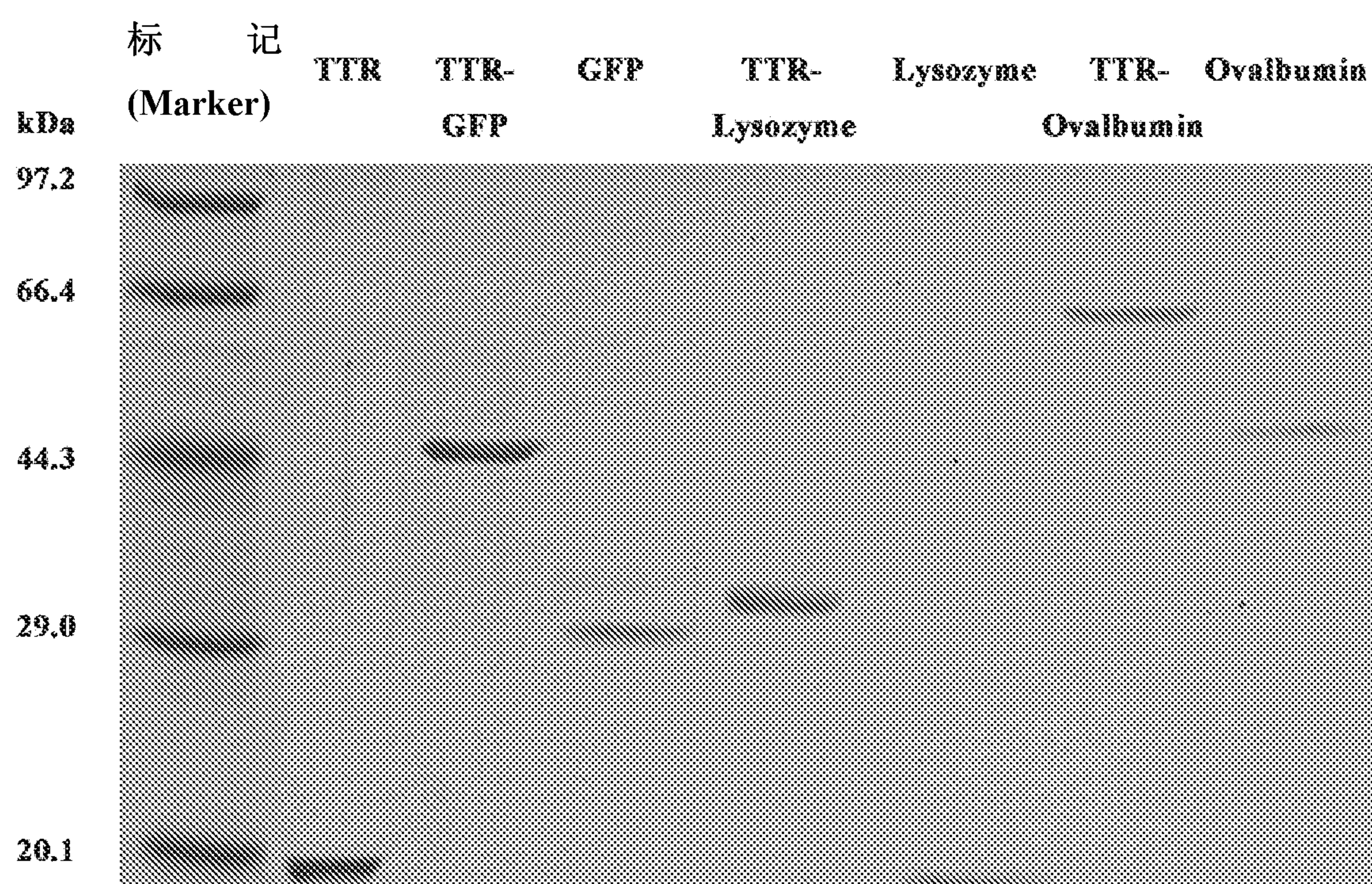


图 5

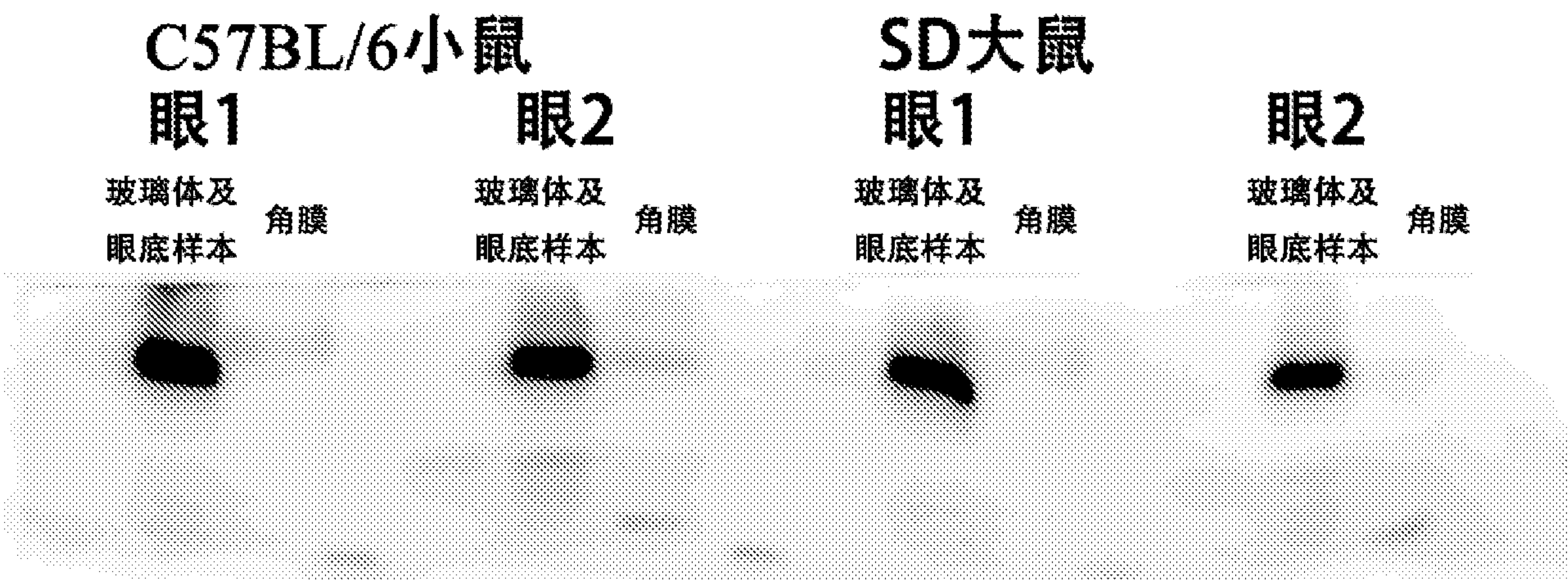
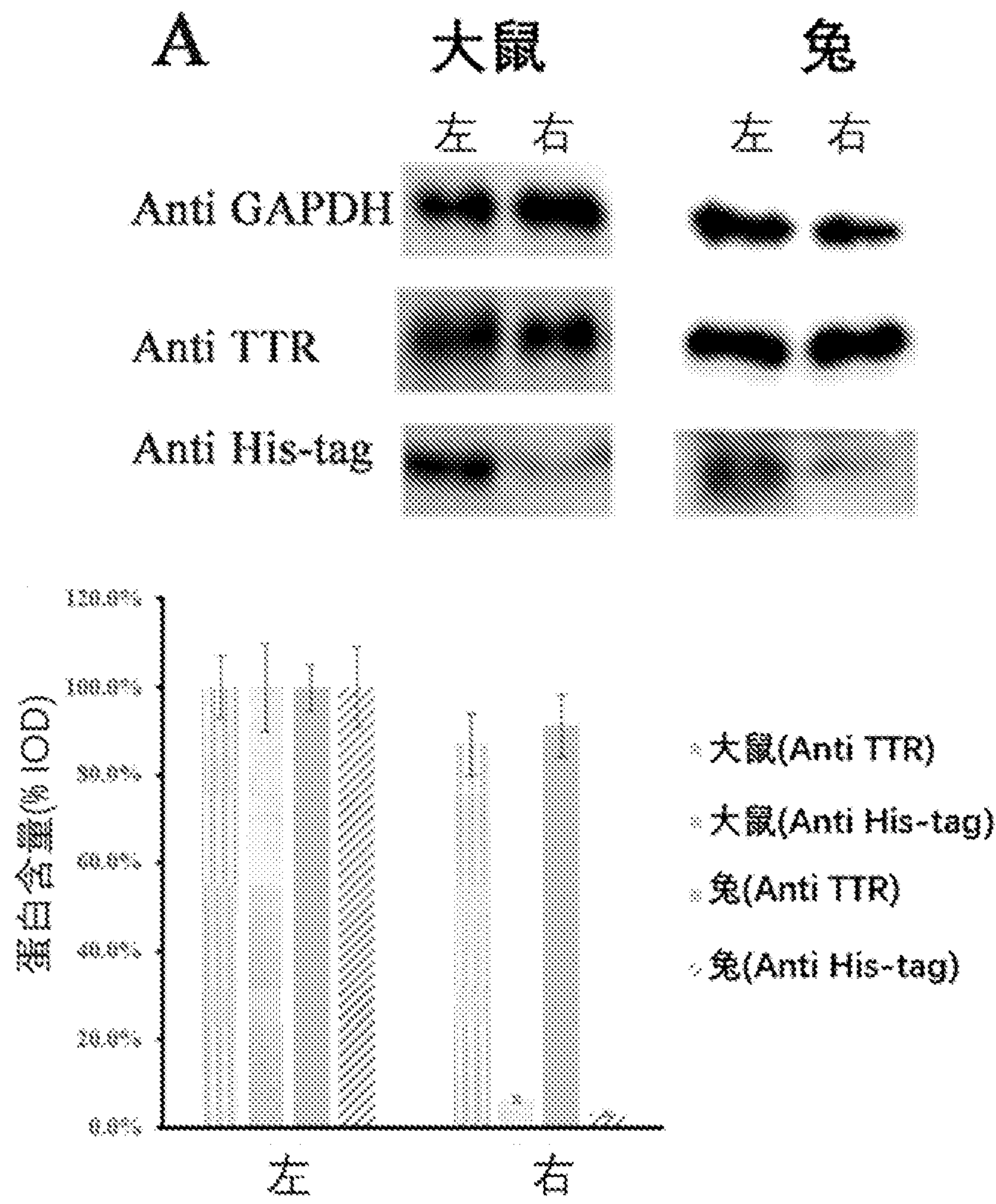
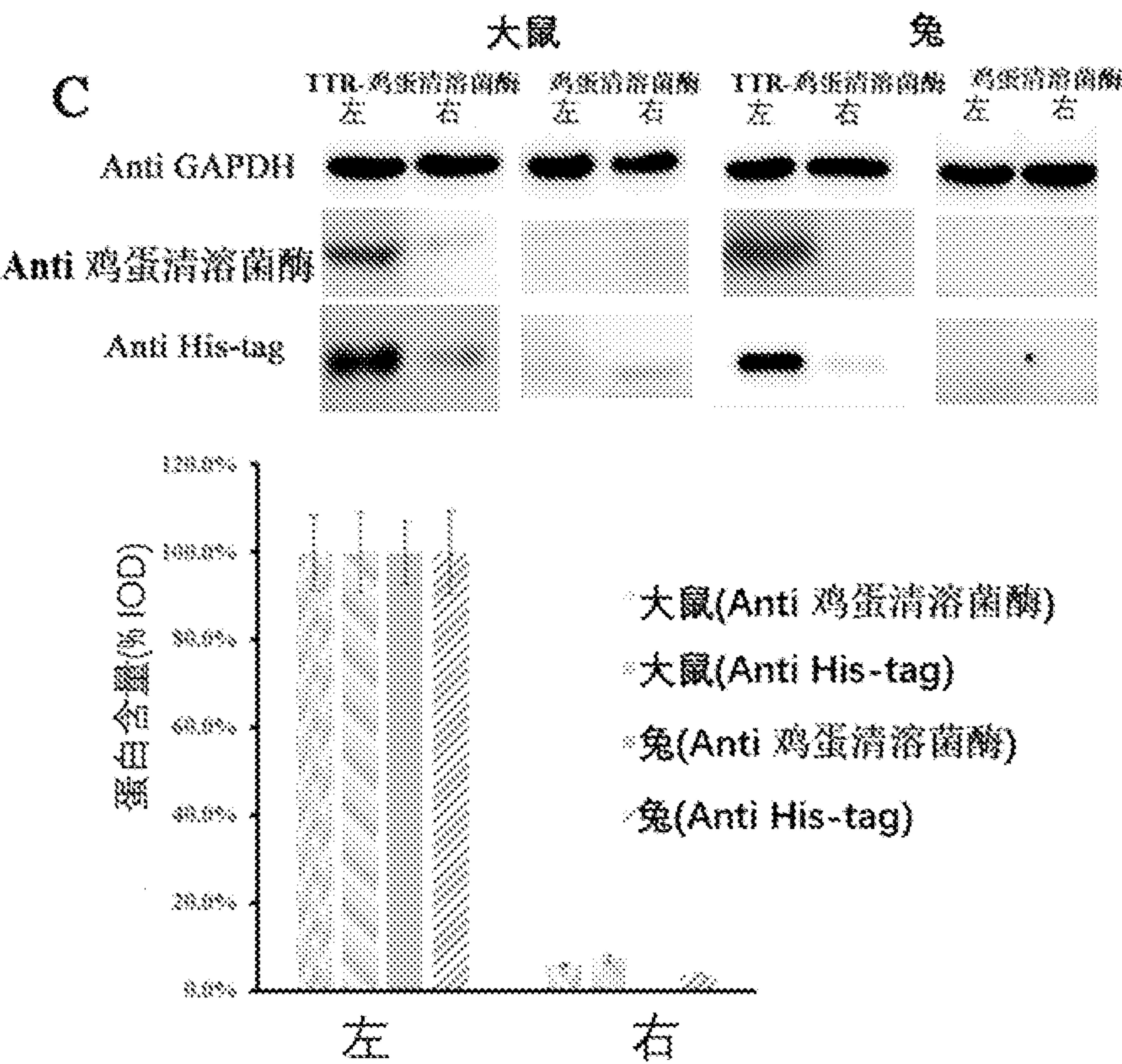
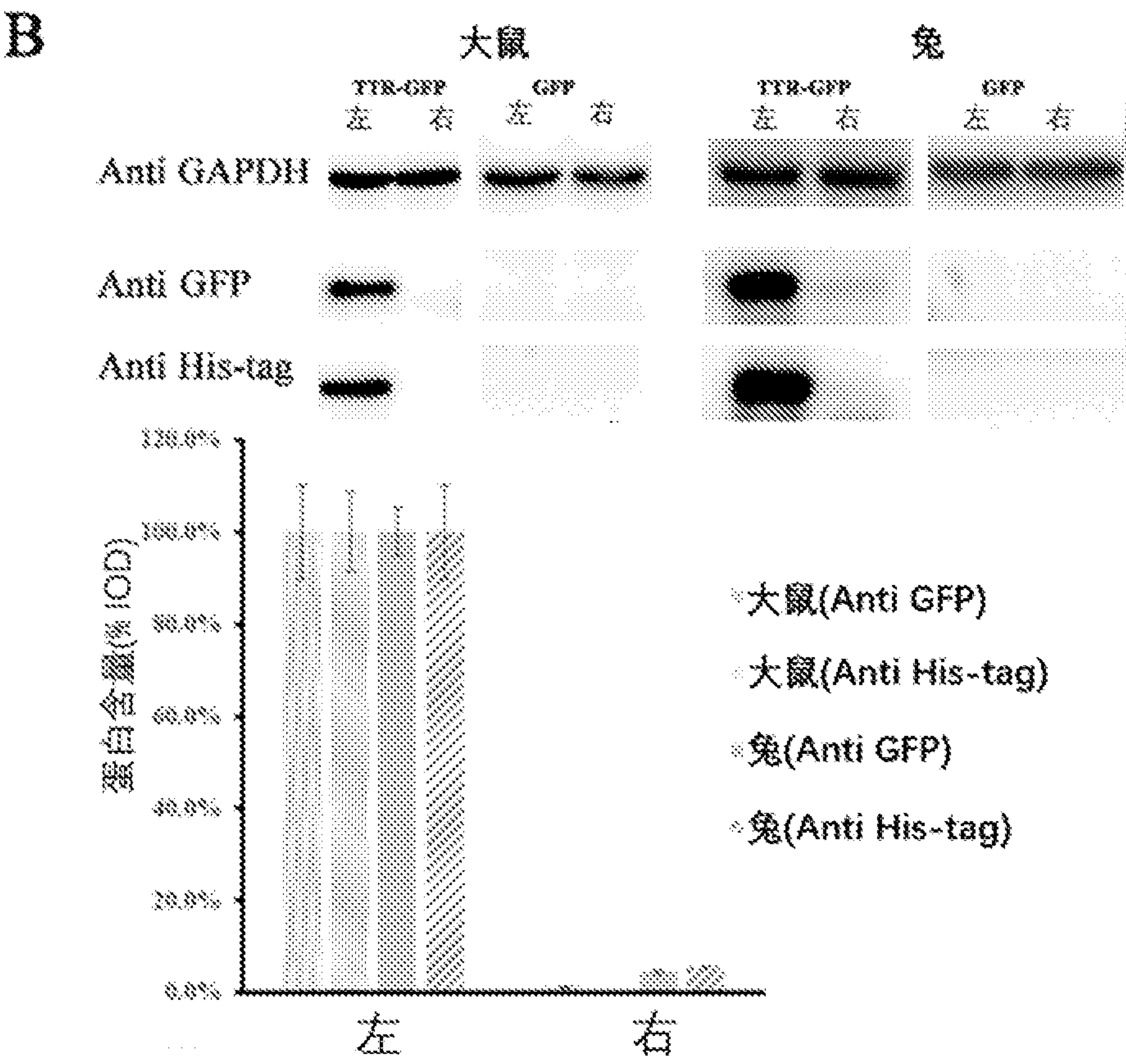


图 6



(接下图)

(续上图)



(接下图)

(续上图)

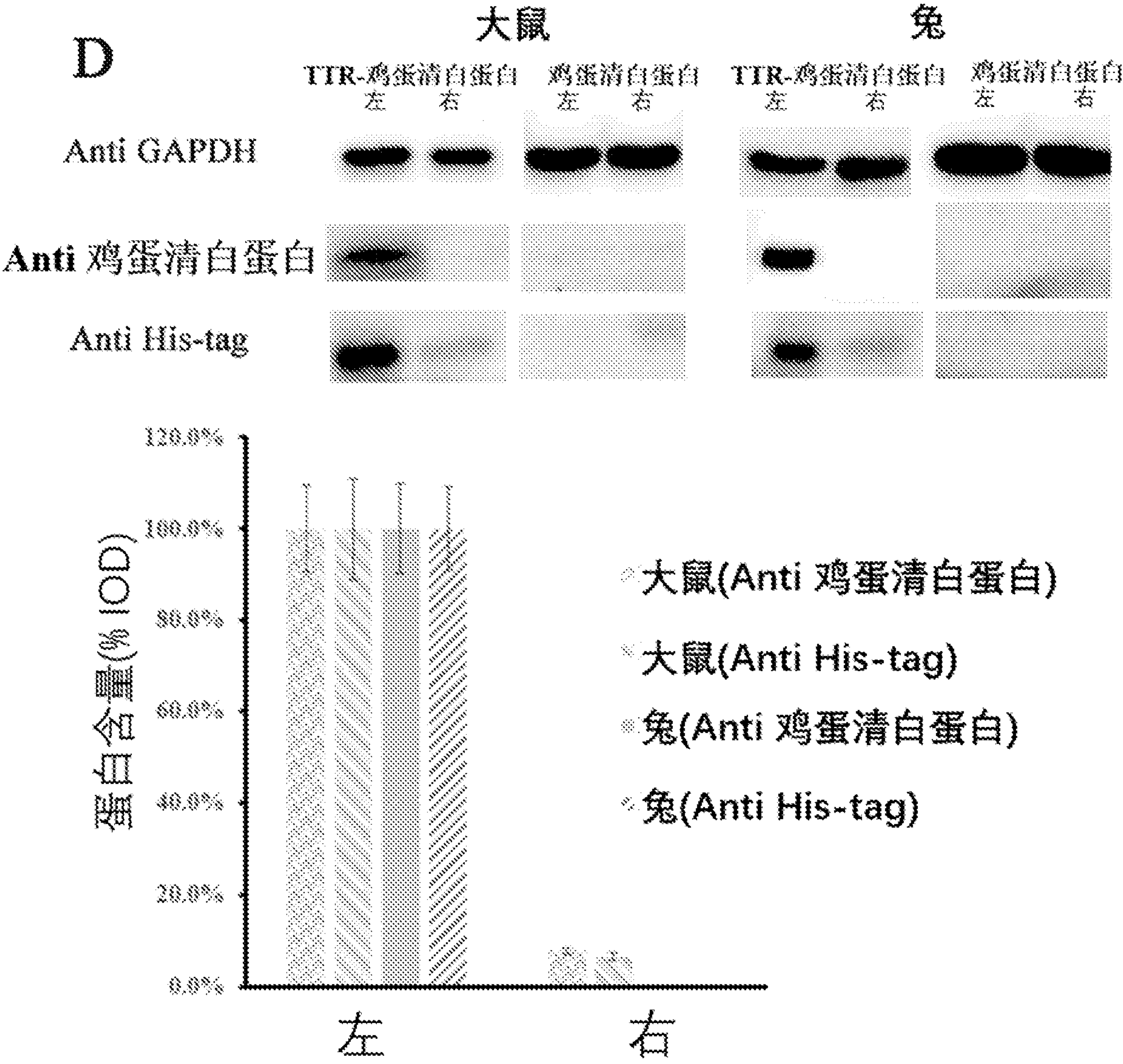


图 7

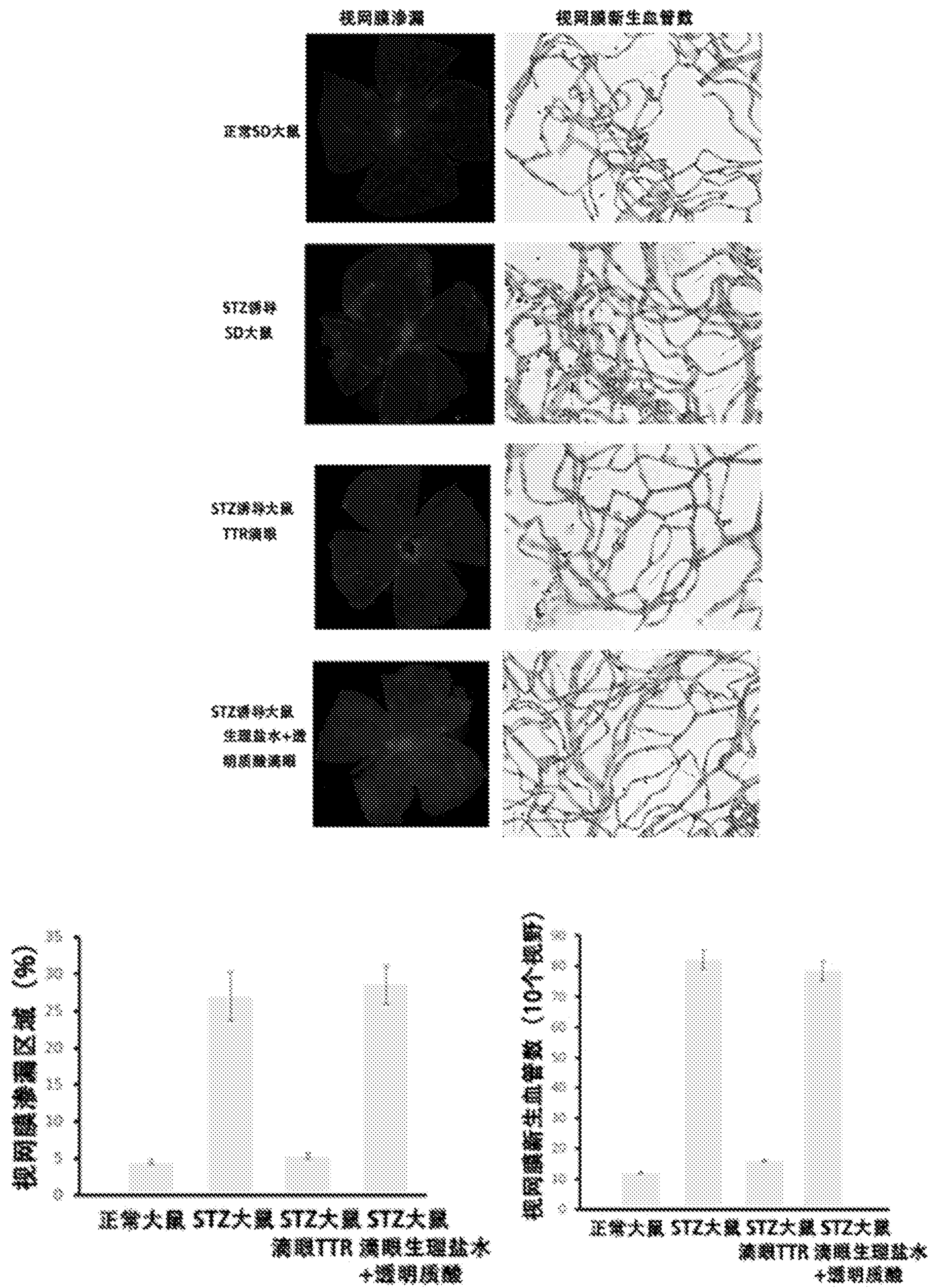


图 8

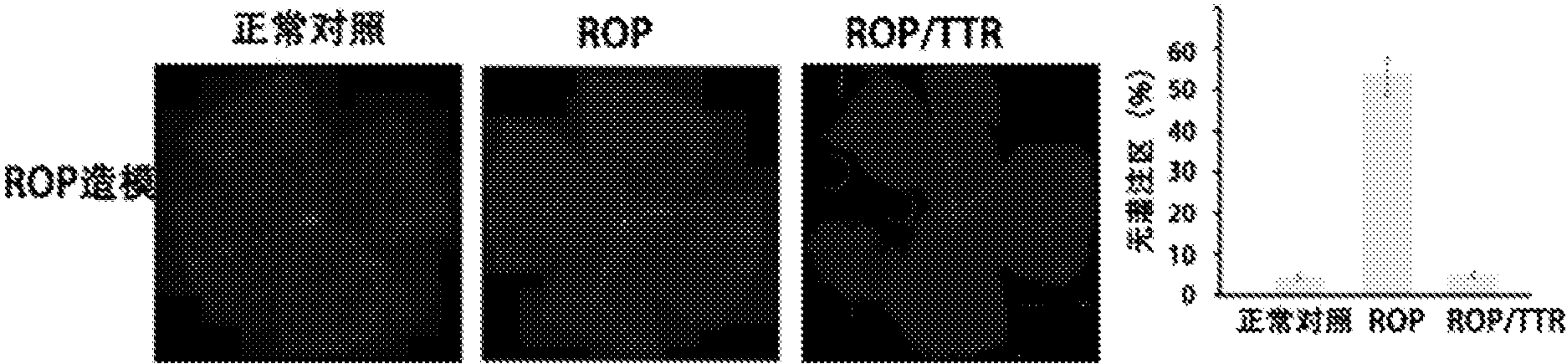


图 9

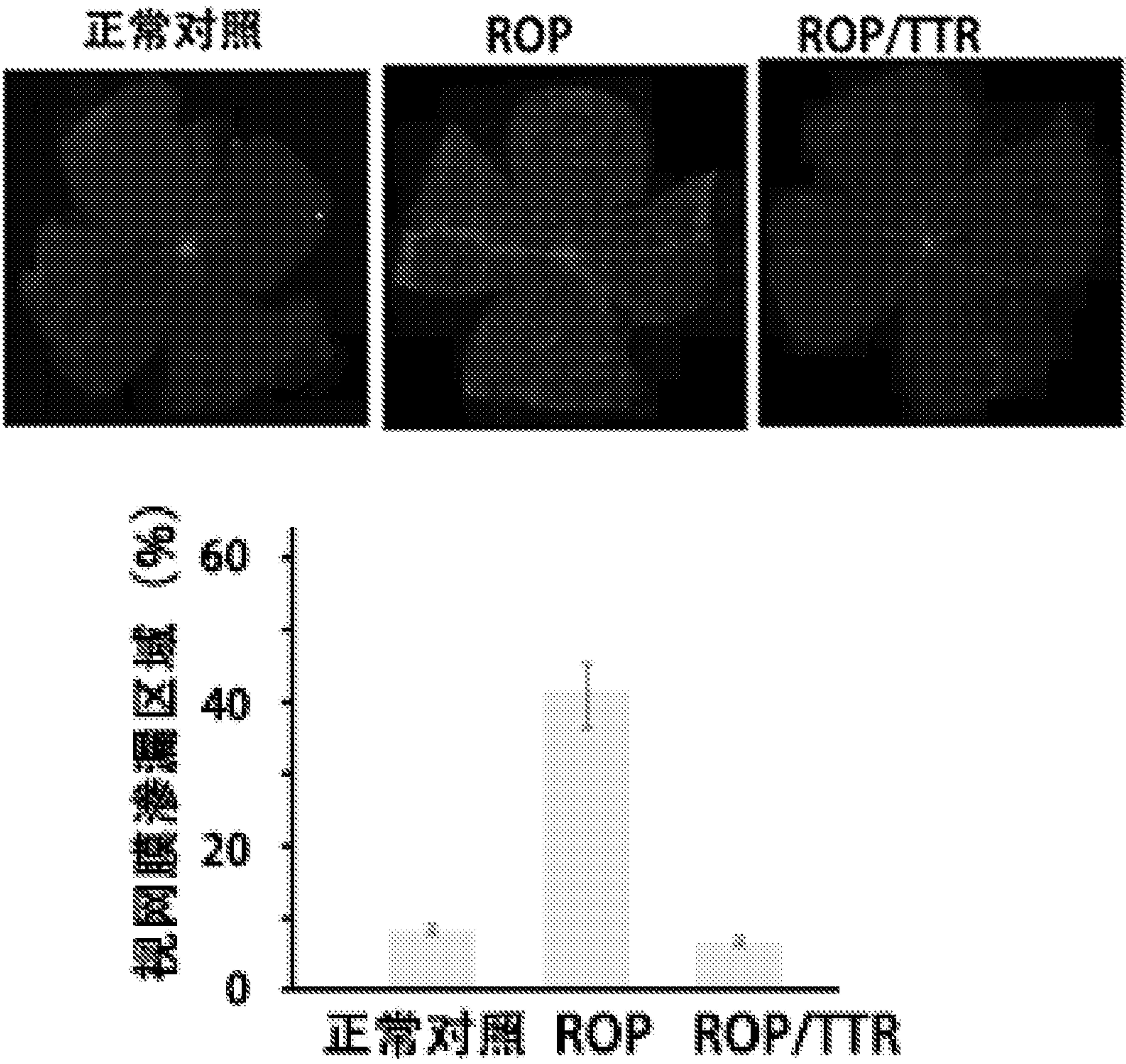


图 10

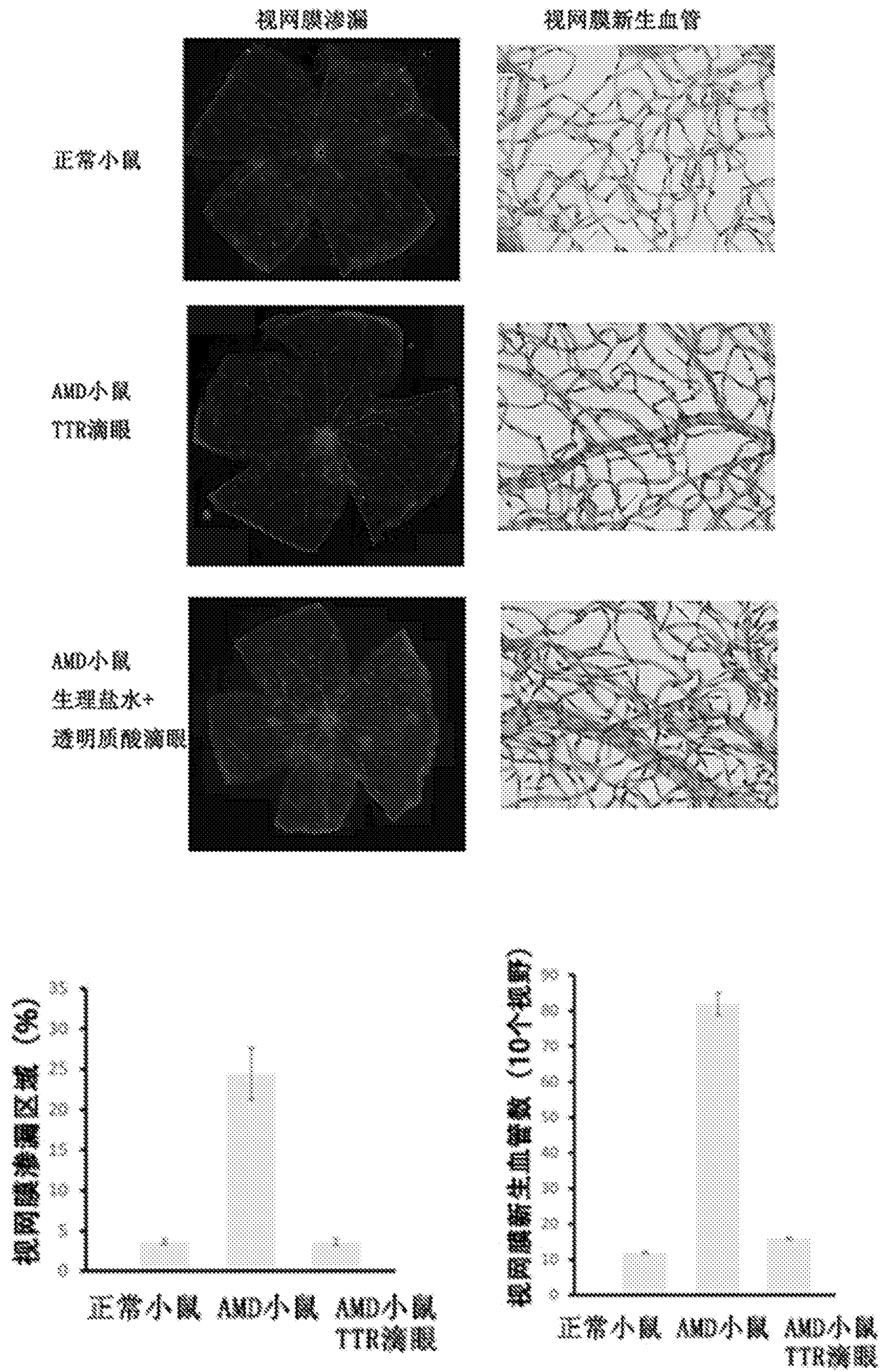


图 11

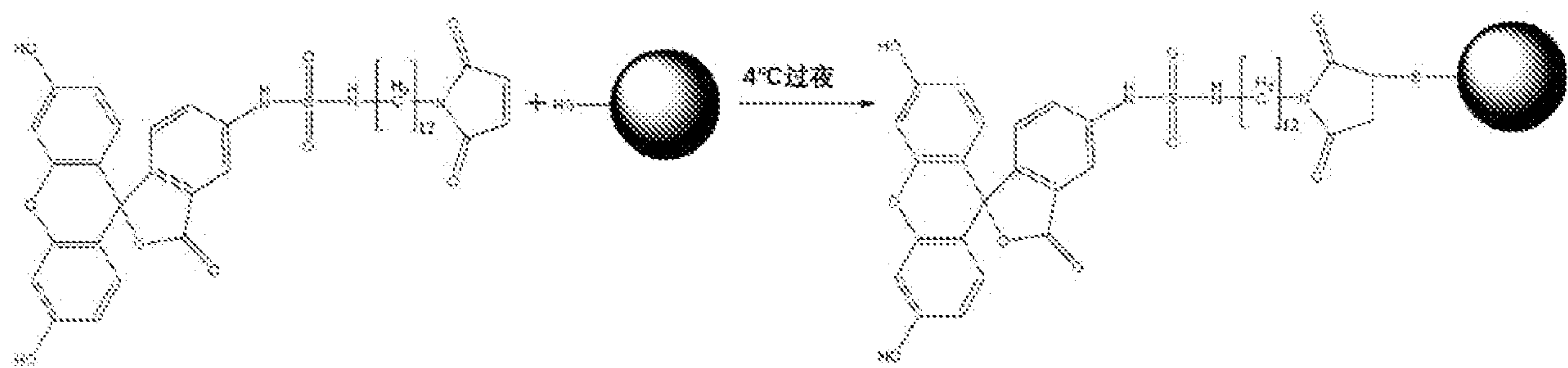


图 12

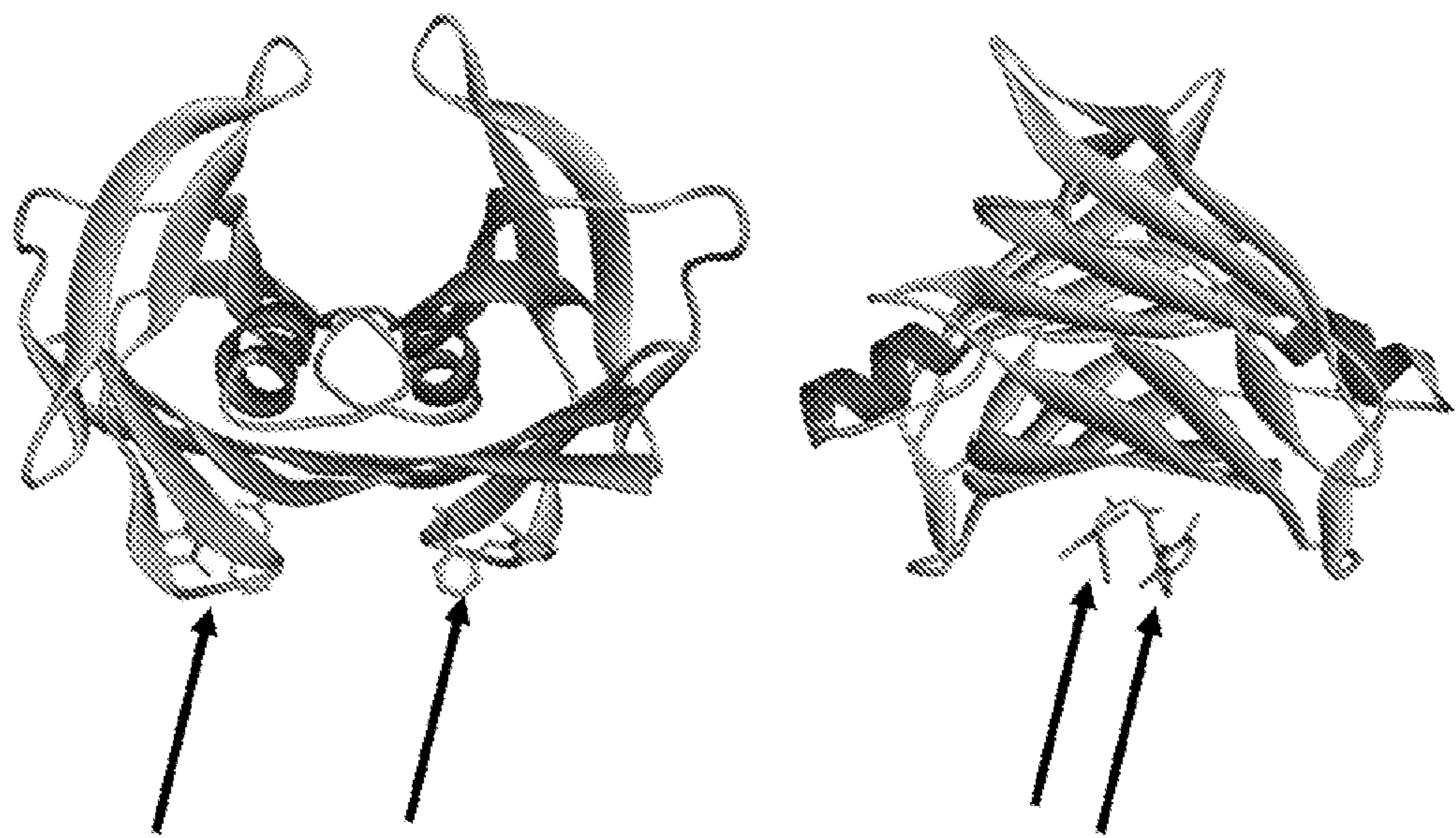
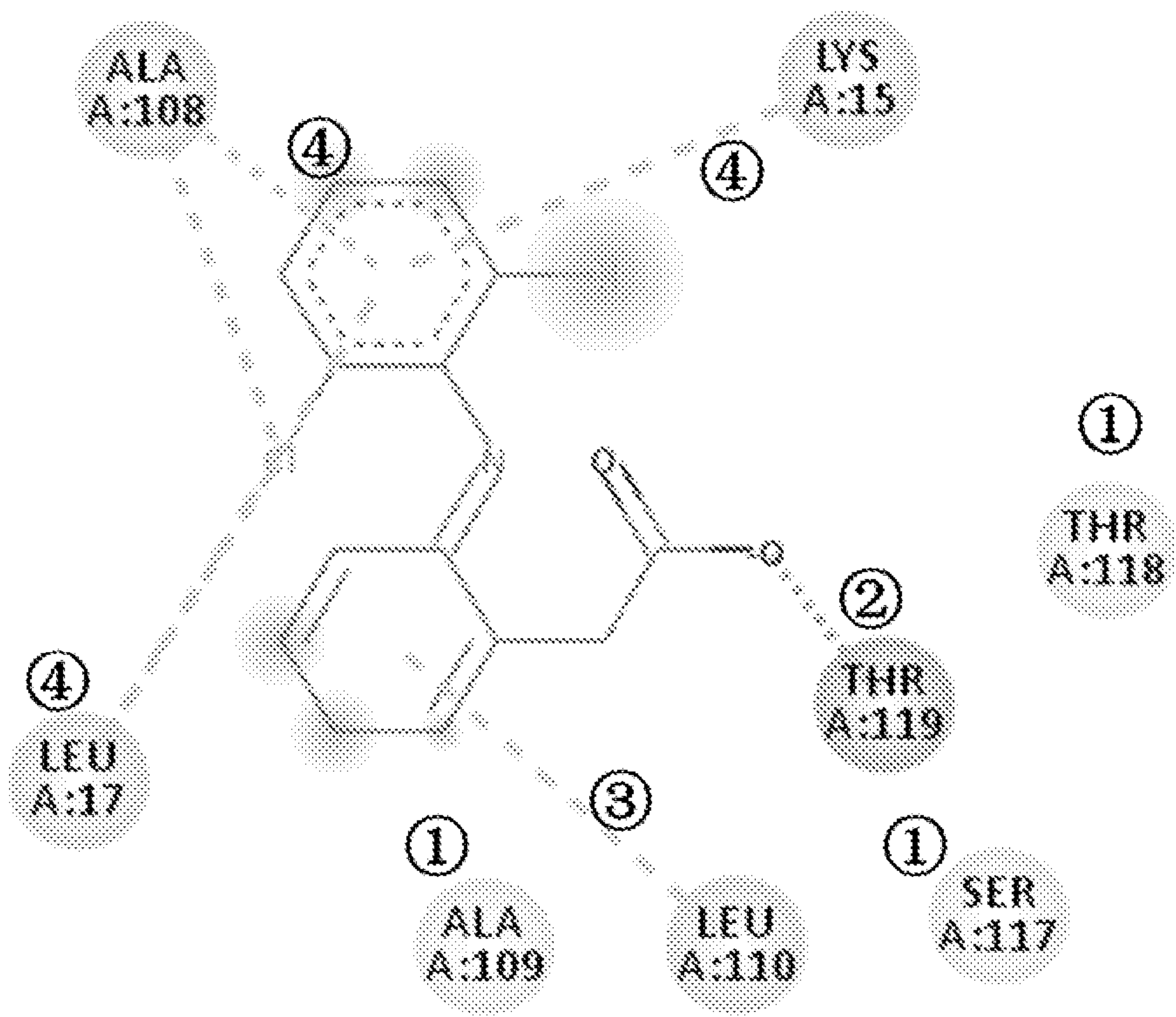


图 13A



①范德华力 ②普通氢键 ③烷基作用 ④Pi-烷基作用

图 13B

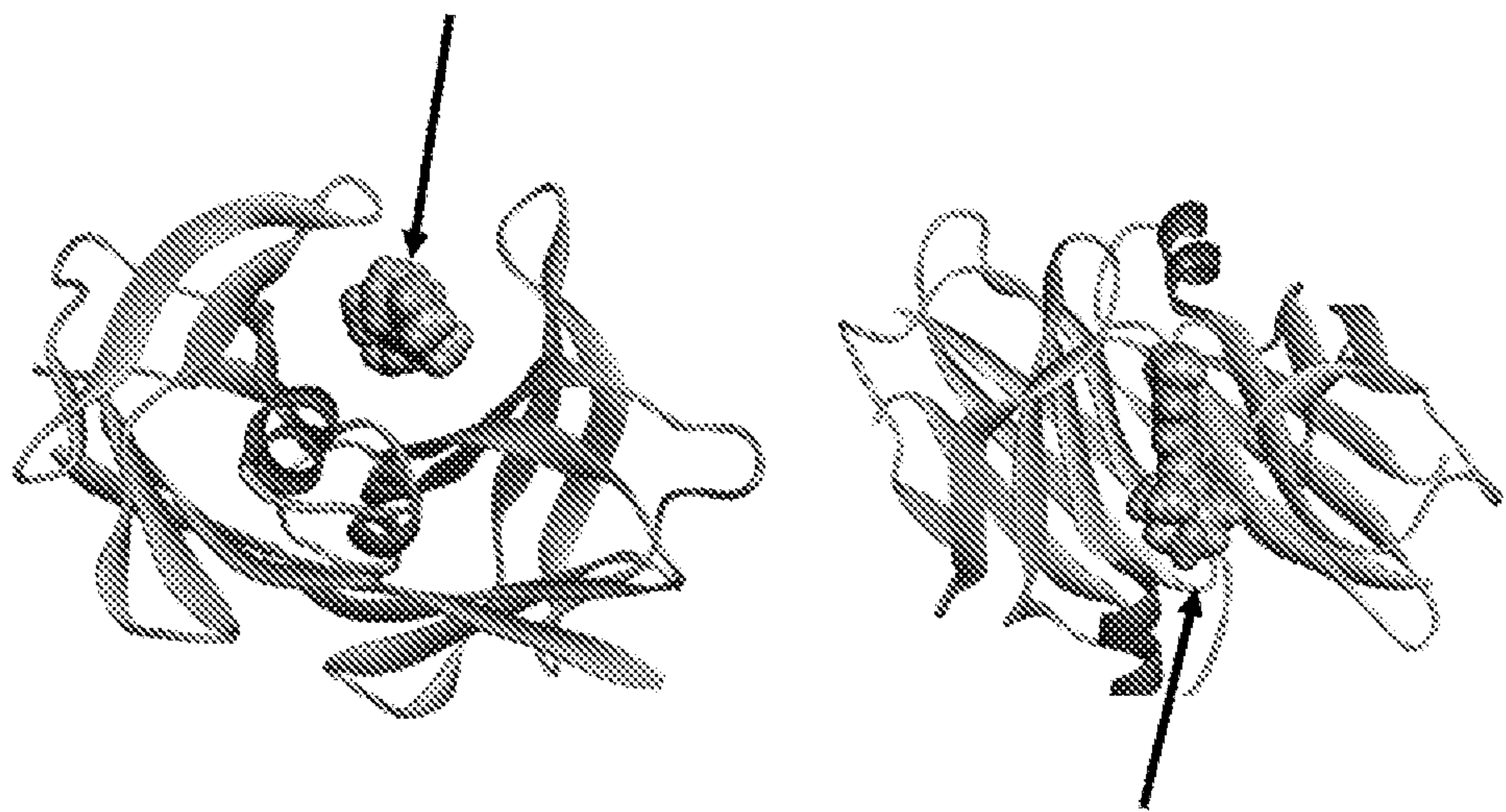
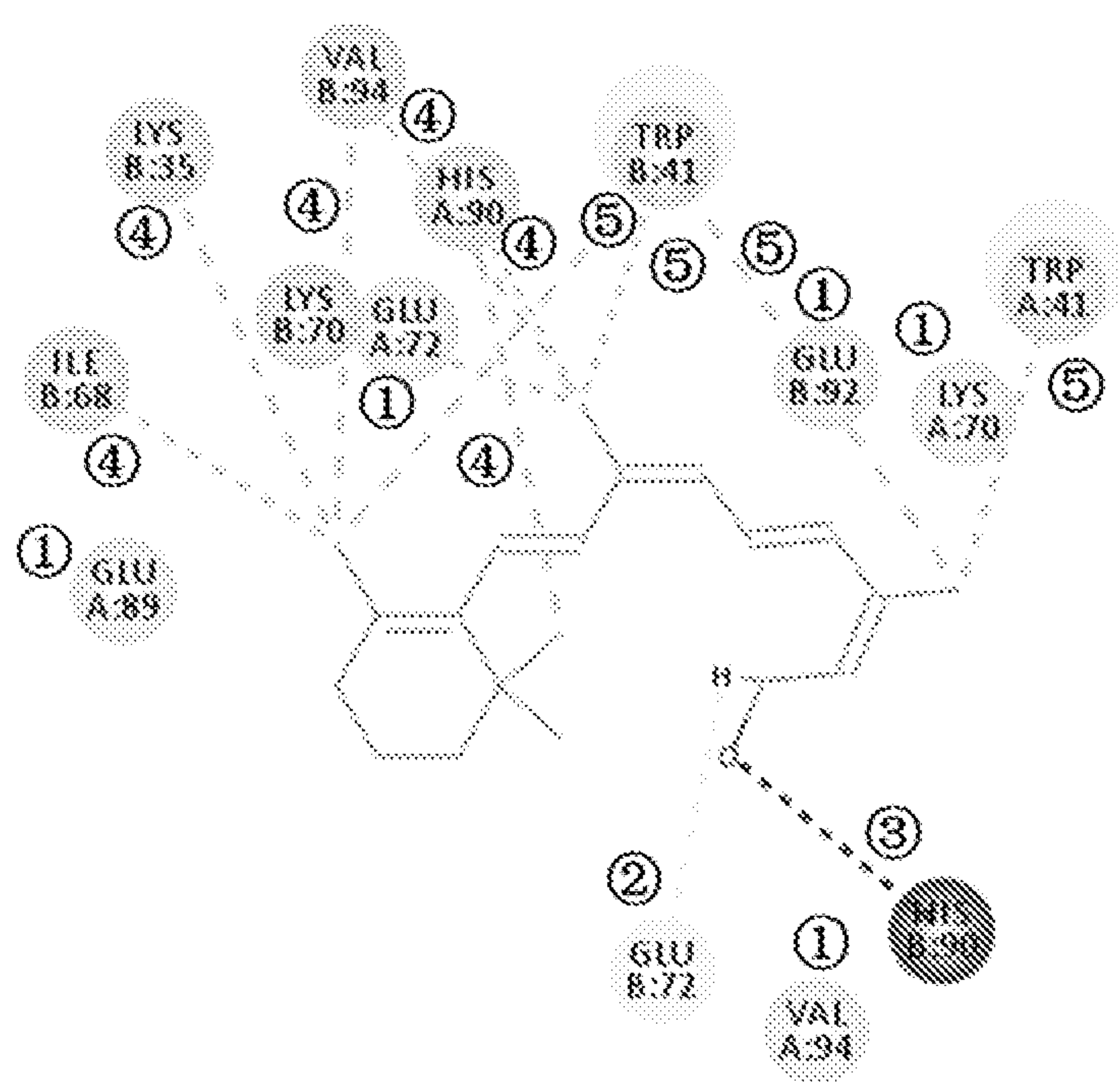


图 14A



①范德华力 ②普通氢键 ③非普遍的受体作用 ④烷基作用 ⑤Pi-烷基作用

图 14B

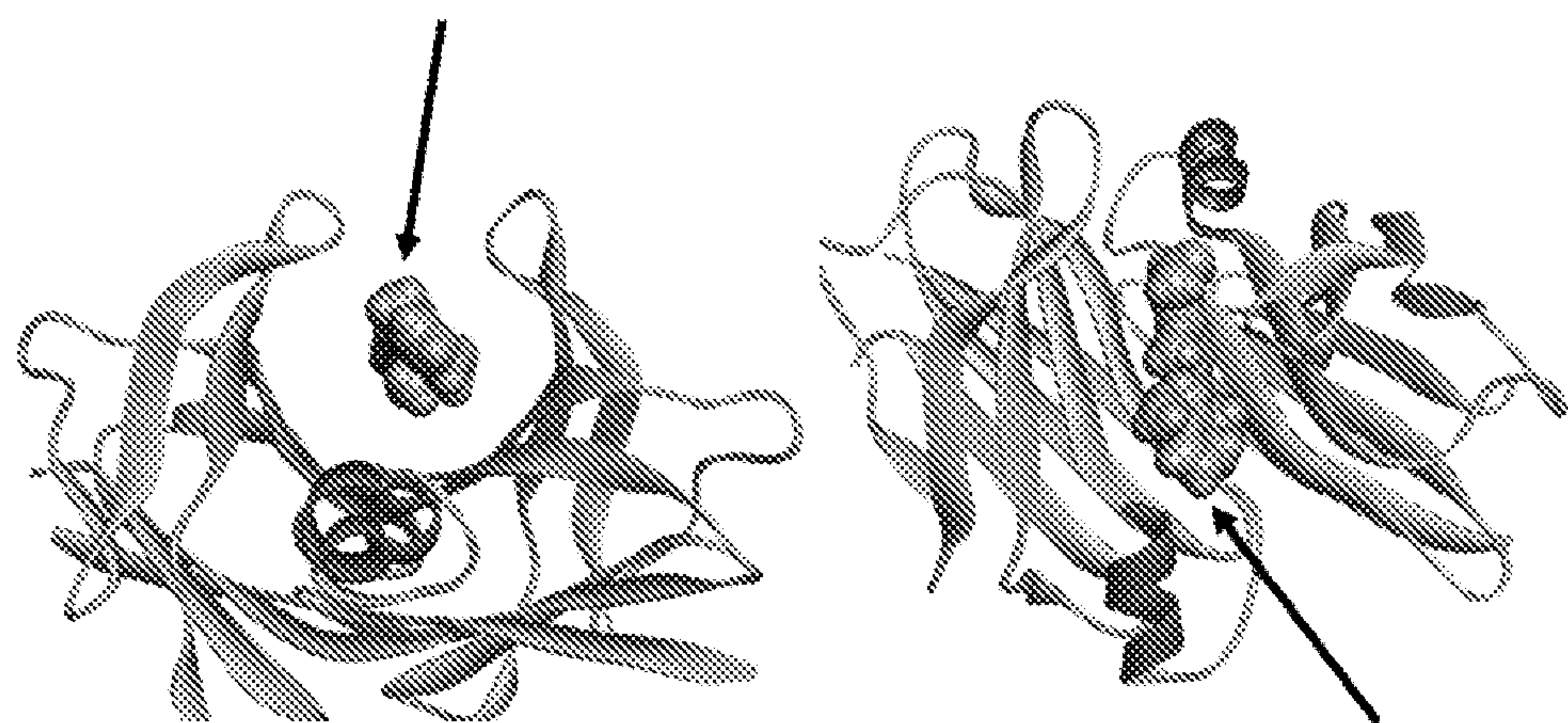
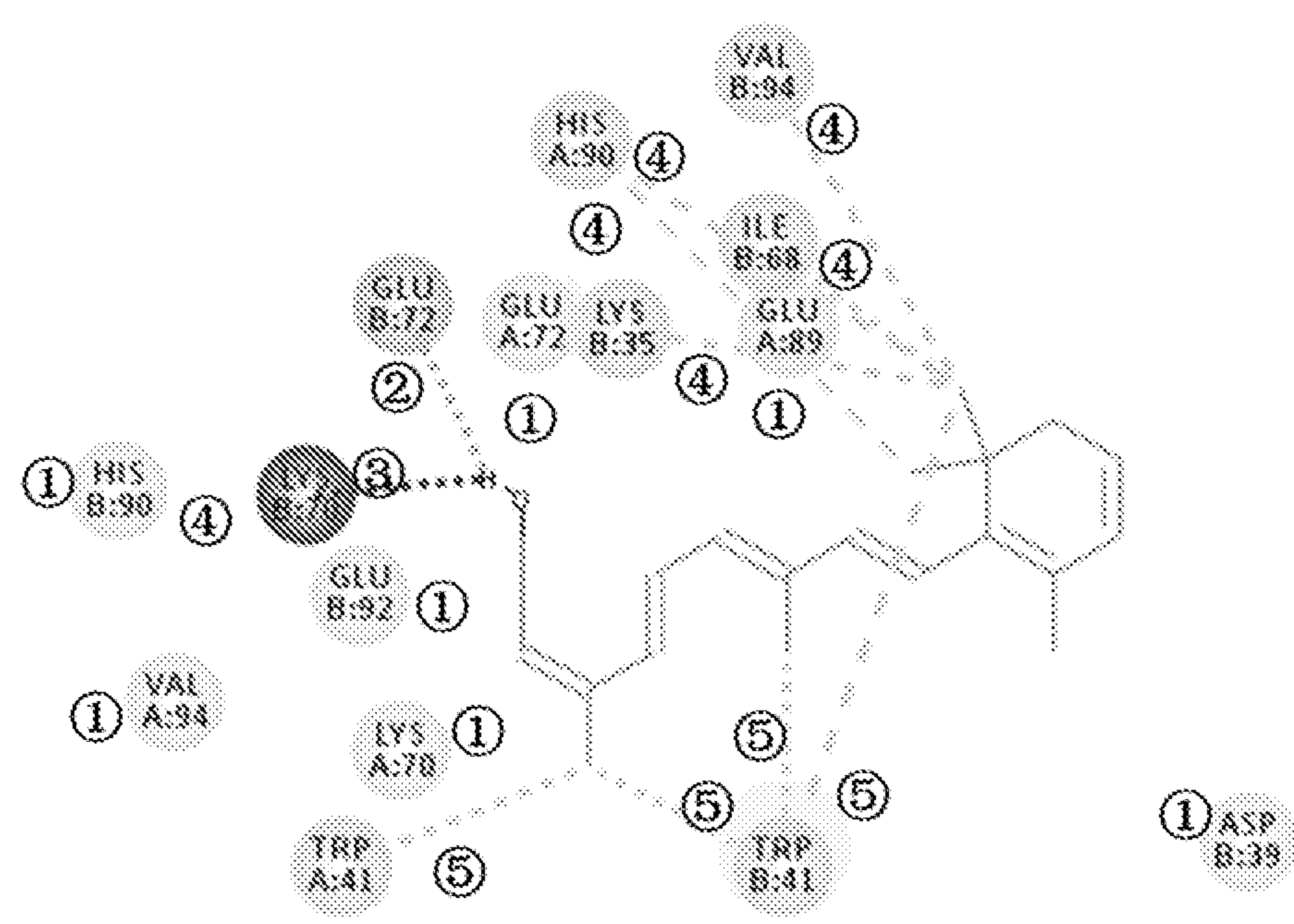


图 15A



①范德华力 ②普通氢键 ③非普遍的受体作用 ④烷基作用 ⑤Pi-烷基作用

图 15B

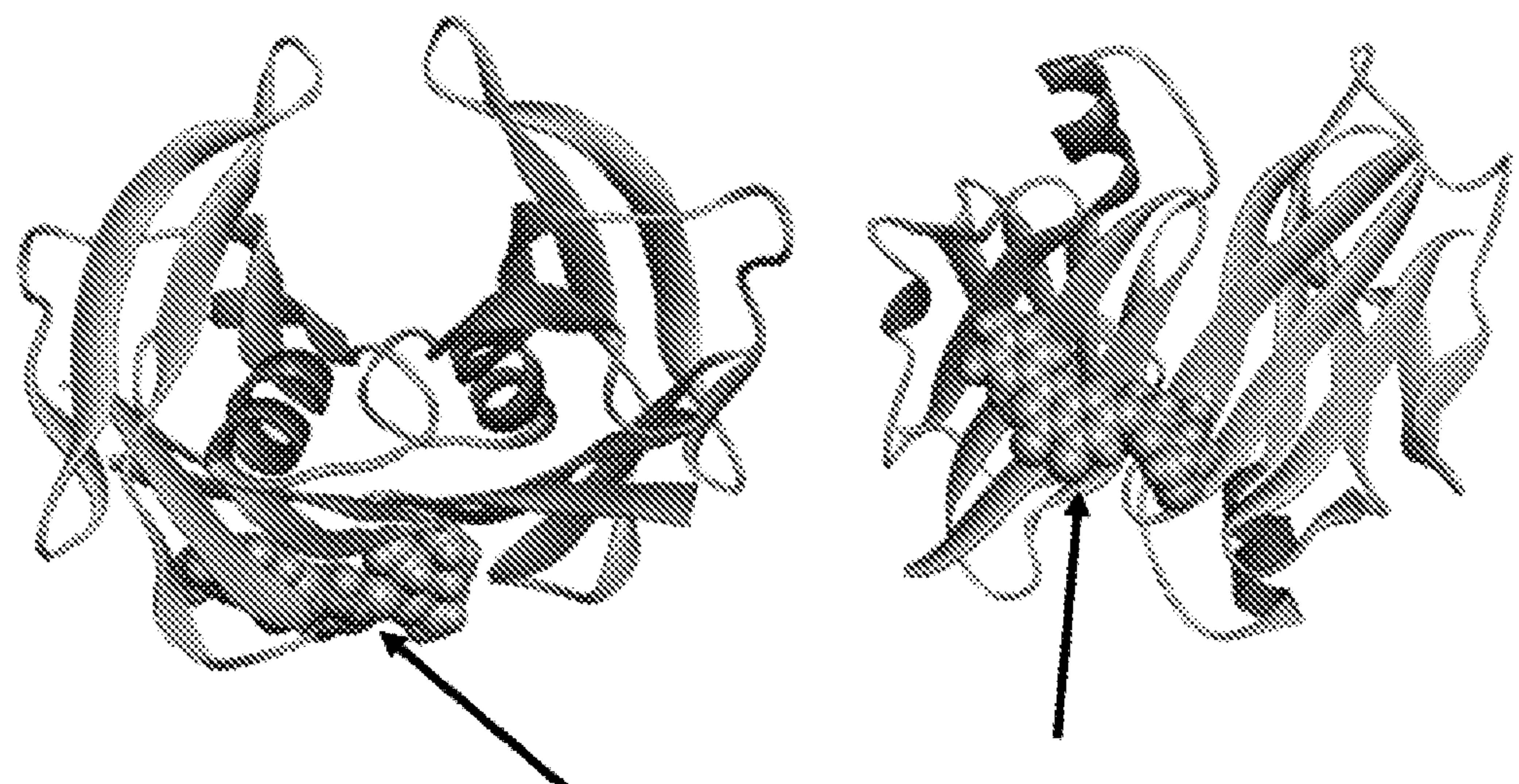
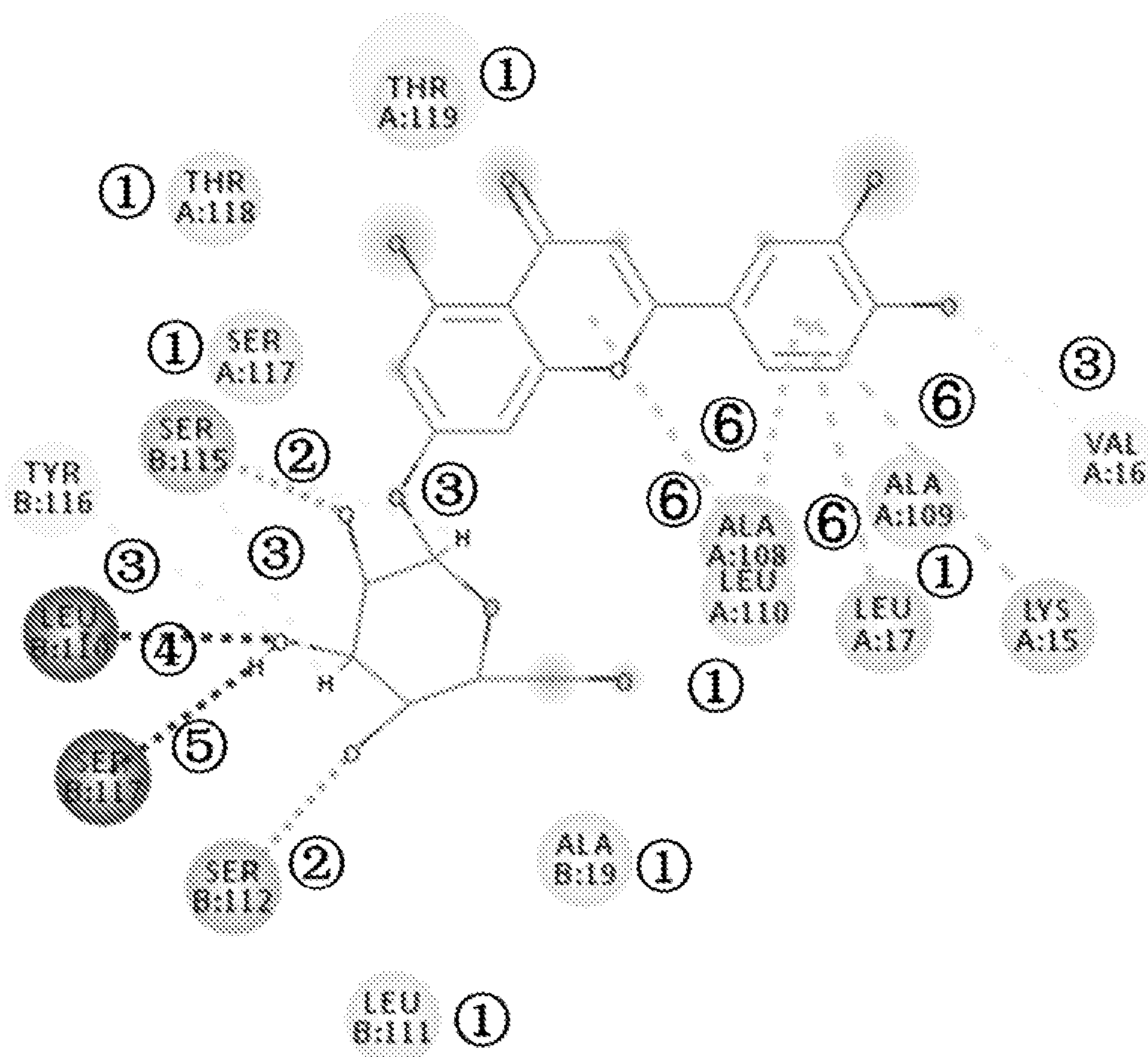


图 16A



①范德华力 ②普通氢键 ③非普遍作用的供体作用
④非普遍的受体作用 ⑤烷基作用 ⑥Pi-烷基作用

图 16B

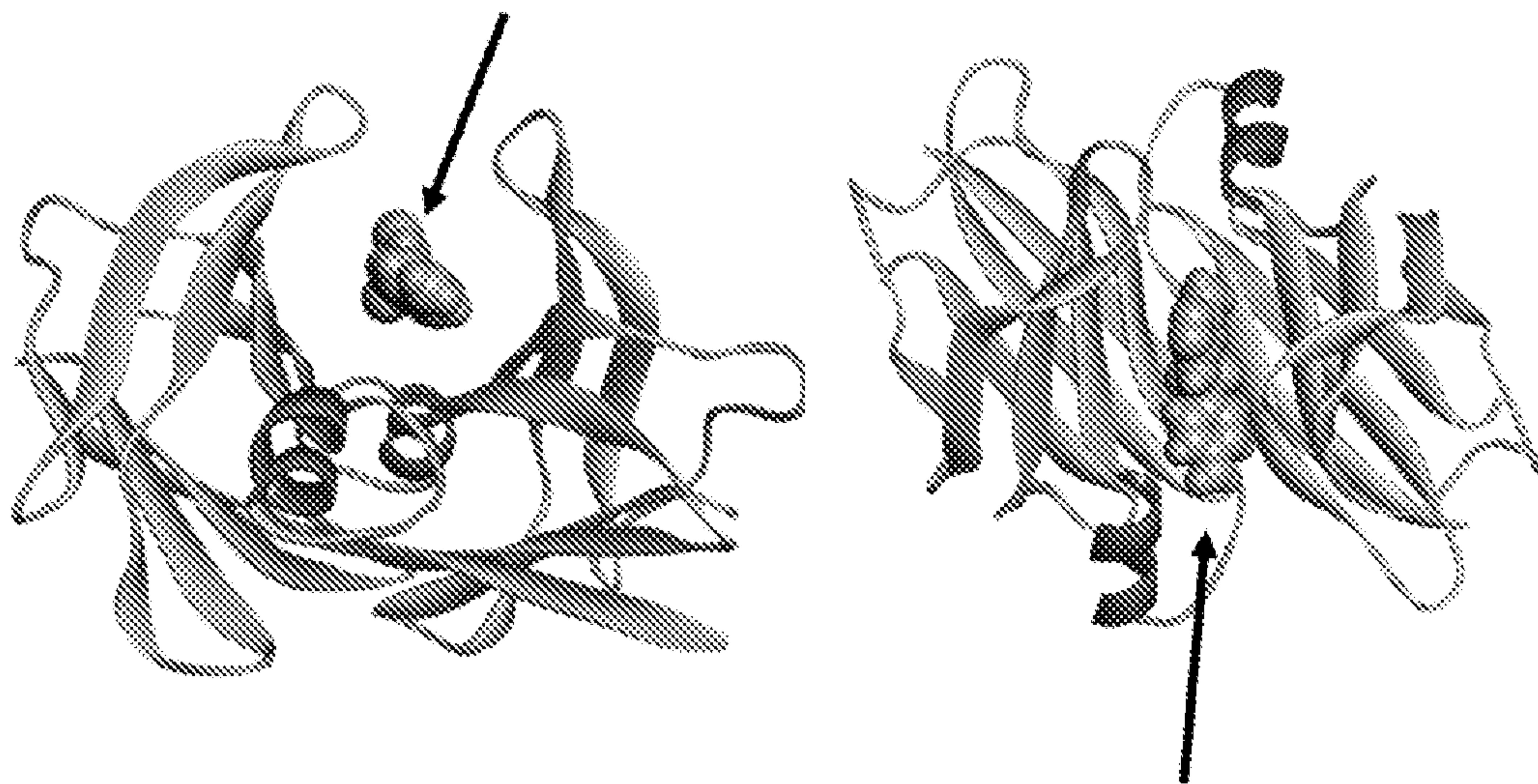


图 17A

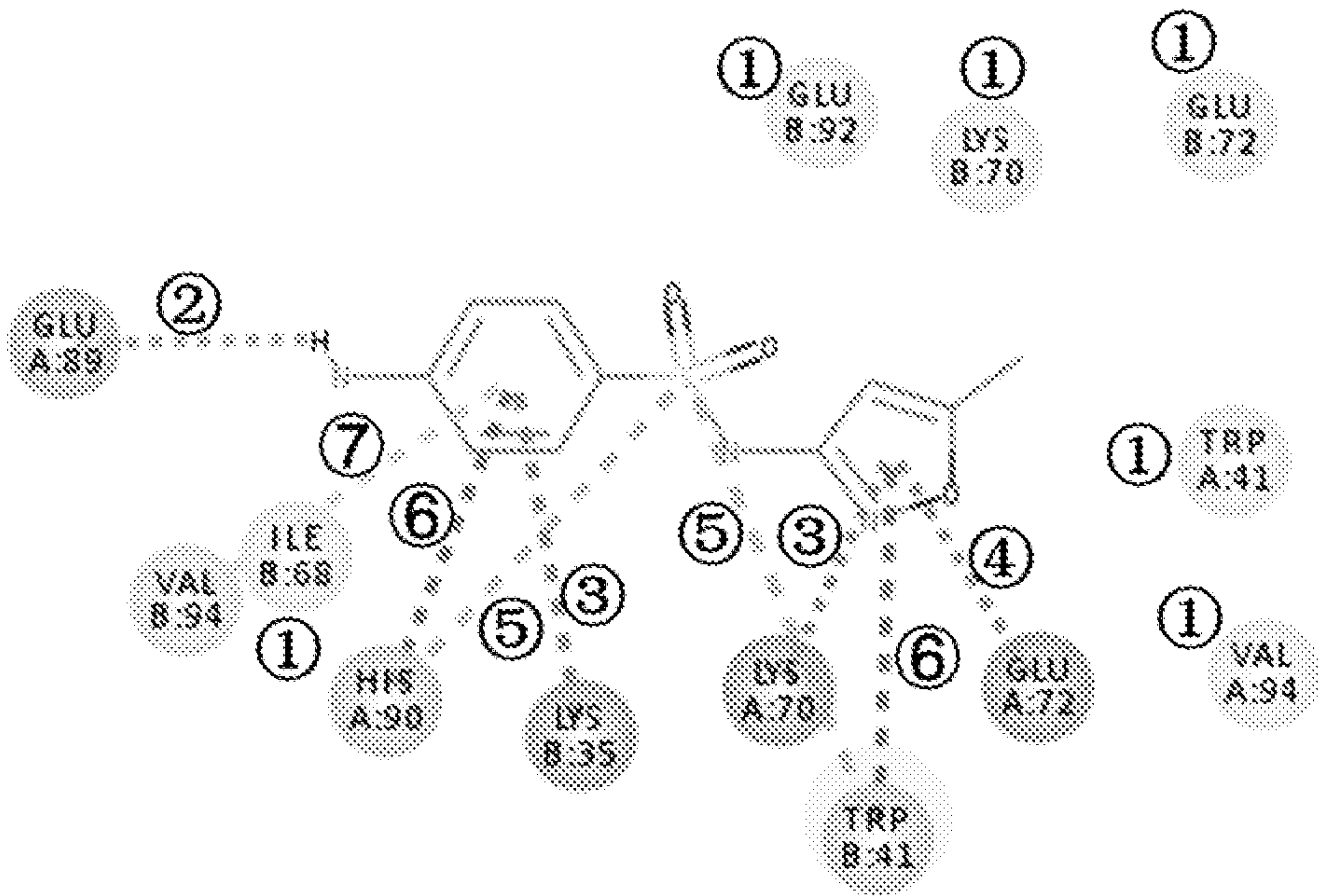


图 17B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/128588

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 47/64(2017.01)i; A61K 38/17(2006.01)i; A61K 45/00(2006.01)i; A61K 9/00(2006.01)i; A61K 47/38(2006.01)i; A61K 47/36(2006.01)i; A61K 31/196(2006.01)i; A61K 31/07(2006.01)i; A61P 27/02(2006.01)i; C07K 19/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K, A61P, C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CNTXT, DWPI, SIPOABS, CATXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, CPEA, CNKI, PUBMED, WEB OF SCIENCE, 百度学术, BAIDU XUESHU, GenBank, 中国专利生物序列检索系统, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System, 转甲状腺素蛋白, 甲状腺素转运蛋白, TTR, 滴眼, 滴剂, 眼, 突变, 变体, 融合, 载体, 屏障, 羧甲基纤维素, 硫酸软骨素, 右旋糖酐, 透明质酸, 双氯芬酸, 维生素A, 木犀草素, 血管新生, 渗漏, transthyretin, drop, optical, ocular, ophthalmic, retinal, mutant, variant, fusion protein, carrier, barrier, carboxymethyl cellulose, chondroitin, dextran, hyaluronic acid, diclofenac, voltaren, luteolin, neovascularization, leakage, 基于序列SEQ ID NOs: 1-11的检索, Search based on the sequence SEQ ID NOs: 1-11

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 8633153 B2 (WALKER KENNETH WILLIAM et al.) 21 January 2014 (2014-01-21) see description, column 2, lines 13-32, column 14, lines 21-55 and column 15, lines 50-58, SEQ ID NO: 1	5-11
X	CN 109432403 A (SHANGHAI CUTSEQ BIO-MEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 08 March 2019 (2019-03-08) see claims 1-9	5, 7, 8, 10, 13-15
X	US 2003195154 A1 (WALKER KENNETH et al.) 16 October 2003 (2003-10-16) see description, paragraphs [0006]-[0009], [0086] and [0093], SEQ ID NO: 1	5-11
X	WO 2010091253 A1 (WOMEN & INFANTS HOSPITAL OF RHODE ISLAND et al.) 12 August 2010 (2010-08-12) see description, page 5, lines 13-18 and page 6, line 6 to page 7, line 11	5, 7, 8, 10, 12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

04 February 2021

Date of mailing of the international search report

20 February 2021

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/128588

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Shao J et al. "Vitreous and Serum Levels of Transthyretin in High Myopia Patients are Correlated with Ocular Pathologies" <i>Clinical Biochemistry</i> , Vol. 44, No. 8, 9, 21 March 2011 (2011-03-21), pp. 681-685	1-15
A	Sousa MM et al. "Deposition and Passage of Transthyretin Through the Blood-nerve Barrier in Recipients of Familial Amyloid Polyneuropathy Livers" <i>Laboratory Investigation</i> , Vol. 84, No. 7, 03 May 2004 (2004-05-03), pp. 865-873	1-15
X	Shao J et al. "Transthyretin Represses Neovascularization in Diabetic Retinopathy" <i>Molecular Vision</i> , Vol. 22, 12 October 2016 (2016-10-12), pp. 1188-1197, and see page 204, left column, paragraph 1	5, 7, 8, 10, 13-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/128588

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 14和15
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] Claims 14 and 15 relate to the use of the drops according to any one of claims 8-12 in the treatment of eye diseases, and their subjects are all subjects that do not warrant search as defined in Rule 39.1(iv). The subject matter of claims 14 and 15 can be modified with reasonable expectation as corresponding pharmaceutical uses. The international search is made on the basis of such reasonable expectation.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/128588

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	8633153	B2	21 January 2014	JP	4738743	B2	03 August 2011
				PL	372849	A1	08 August 2005
				JP	2005529108	A	29 September 2005
				EP	1496926	A4	18 October 2006
				AU	2003224844	B2	21 May 2009
				US	2003195154	A1	16 October 2003
				EP	2298331	A3	13 April 2011
				EP	2298331	A2	23 March 2011
				US	2009191624	A1	30 July 2009
				MX	PA04009680	A	11 January 2005
				EP	1496926	B1	19 December 2012
				JP	2011136981	A	14 July 2011
				AU	2003224844	A1	27 October 2003
				US	2014234945	A1	21 August 2014
				CA	2480883	A1	23 October 2003
				WO	03086444	A1	23 October 2003
				ES	2400341	T3	09 April 2013
				EP	1496926	A1	19 January 2005
				US	2003191056	A1	09 October 2003
CN	109432403	A	08 March 2019	WO	2020118911	A1	18 June 2020
US	2003195154	A1	16 October 2003	JP	4738743	B2	03 August 2011
				PL	372849	A1	08 August 2005
				JP	2005529108	A	29 September 2005
				EP	1496926	A4	18 October 2006
				AU	2003224844	B2	21 May 2009
				EP	2298331	A3	13 April 2011
				EP	2298331	A2	23 March 2011
				US	2009191624	A1	30 July 2009
				MX	PA04009680	A	11 January 2005
				EP	1496926	B1	19 December 2012
				JP	2011136981	A	14 July 2011
				AU	2003224844	A1	27 October 2003
				US	2014234945	A1	21 August 2014
				US	8633153	B2	21 January 2014
				CA	2480883	A1	23 October 2003
				WO	03086444	A1	23 October 2003
				ES	2400341	T3	09 April 2013
				EP	1496926	A1	19 January 2005
				US	2003191056	A1	09 October 2003
WO	2010091253	A1	12 August 2010	CA	2751679	C	27 February 2018
				CA	2751679	A1	12 August 2010
				US	9675664	B2	13 June 2017
				US	2012101021	A1	26 April 2012
				US	2015238567	A1	27 August 2015

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2020/128588
A. 主题的分类 A61K 47/64(2017.01)i; A61K 38/17(2006.01)i; A61K 45/00(2006.01)i; A61K 9/00(2006.01)i; A61K 47/38(2006.01)i; A61K 47/36(2006.01)i; A61K 31/196(2006.01)i; A61K 31/07(2006.01)i; A61P 27/02(2006.01)i; C07K 19/00(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) A61K, A61P, C07K 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS, CNTXT, DWPI, SIPOABS, CATXT, USTXT, EPTXT, WOTXT, CPEA, CNKI, PUBMED, WEB OF SCIENCE, 百度学术, GenBank, 中国专利生物序列检索系统: 转甲状腺素蛋白, 甲状腺素转运蛋白, TTR, 滴眼, 滴剂, 眼, 突变, 变体, 融合, 载体, 屏障, 羧甲基纤维素, 硫酸软骨素, 右旋糖酐, 透明质酸, 双氯芬酸, 维生素A, 木犀草素, 血管新生, 渗漏, transthyretin, drop, optical, ocular, ophthalmic, retinal, mutant, variant, fusion protein, carrier, barrier, carboxymethyl cellulose, chondroitin, dextran, hyaluronic acid, diclofenac, voltaren, luteolin, neovascularization, leakage, 基于序列SEQ ID NOs: 1-11的检索		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	US 8633153 B2 (WALKER KENNETH WILLIAM等) 2014年 1月 21日 (2014 - 01 - 21) 参见说明书第2栏第13-32行, 第14栏第21-55行, 第15栏第50-58行, SEQ ID NO: 1	5-11
X	CN 109432403 A (上海卡序生物医药科技有限公司) 2019年 3月 8日 (2019 - 03 - 08) 参见权利要求1-9	5, 7, 8, 10, 13-15
X	US 2003195154 A1 (WALKER K等) 2003年 10月 16日 (2003 - 10 - 16) 参见说明书第[0006]-[0009]、[0086]和[0093]段, SEQ ID NO: 1	5-11
X	WO 2010091253 A1 (WOMEN & INFANTS HOSPITAL OF RH等) 2010年 8月 12日 (2010 - 08 - 12) 参见说明书第5页第13-18行, 第6页第6行至第7页第11行	5, 7, 8, 10, 12
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2021年 2月 4日		国际检索报告邮寄日期 2021年 2月 20日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员 李洋 电话号码 62411031

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	Shao J等. "Vitreous and serum levels of transthyretin in high myopia patients are correlated with ocular pathologies" CLINICAL BIOCHEMISTRY, 第44卷, 第8-9期, 2011年 3月 21日 (2011 - 03 - 21), 第681-685页	1-15
A	Sousa MM等. "Deposition and passage of transthyretin through the blood-nerve barrier in recipients of familial amyloid polyneuropathy livers" LABORATORY INVESTIGATION, 第84卷, 第7期, 2004年 5月 3日 (2004 - 05 - 03), 第865-873页	1-15
X	Shao J等. "Transthyretin represses neovascularization in diabetic retinopathy" MOLECULAR VISION, 第22卷, 2016年 10月 12日 (2016 - 10 - 12), 第1188-1197页 参见第204页左栏第1段	5, 7, 8, 10, 13-15

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:
- a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式
- b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式 (细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式 (细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)
2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围 (如适用) 的所需声明。
3. 补充意见:

第II栏

某些权利要求被认为是不能检索的意见 (续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 14和15
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求14和15涉及如权利要求8-12任一项所述的滴剂在治疗眼部疾病中的应用，其主题均属于细则39.1(iv)定义的不要求检索的主题。权利要求14和15的主题可经合理预期修改为相应的制药用途。国际检索基于这一合理预期作出。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告 关于同族专利的信息				国际申请号 PCT/CN2020/128588			
检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
US	8633153	B2	2014年 1月 21日	JP	4738743	B2	2011年 8月 3日
				PL	372849	A1	2005年 8月 8日
				JP	2005529108	A	2005年 9月 29日
				EP	1496926	A4	2006年 10月 18日
				AU	2003224844	B2	2009年 5月 21日
				US	2003195154	A1	2003年 10月 16日
				EP	2298331	A3	2011年 4月 13日
				EP	2298331	A2	2011年 3月 23日
				US	2009191624	A1	2009年 7月 30日
				MX	PA04009680	A	2005年 1月 11日
				EP	1496926	B1	2012年 12月 19日
				JP	2011136981	A	2011年 7月 14日
				AU	2003224844	A1	2003年 10月 27日
				US	2014234945	A1	2014年 8月 21日
				CA	2480883	A1	2003年 10月 23日
				WO	03086444	A1	2003年 10月 23日
				ES	2400341	T3	2013年 4月 9日
				EP	1496926	A1	2005年 1月 19日
				US	2003191056	A1	2003年 10月 9日
CN	109432403	A	2019年 3月 8日	WO	2020118911	A1	2020年 6月 18日
US	2003195154	A1	2003年 10月 16日	JP	4738743	B2	2011年 8月 3日
				PL	372849	A1	2005年 8月 8日
				JP	2005529108	A	2005年 9月 29日
				EP	1496926	A4	2006年 10月 18日
				AU	2003224844	B2	2009年 5月 21日
				EP	2298331	A3	2011年 4月 13日
				EP	2298331	A2	2011年 3月 23日
				US	2009191624	A1	2009年 7月 30日
				MX	PA04009680	A	2005年 1月 11日
				EP	1496926	B1	2012年 12月 19日
				JP	2011136981	A	2011年 7月 14日
				AU	2003224844	A1	2003年 10月 27日
				US	2014234945	A1	2014年 8月 21日
				US	8633153	B2	2014年 1月 21日
				CA	2480883	A1	2003年 10月 23日
				WO	03086444	A1	2003年 10月 23日
				ES	2400341	T3	2013年 4月 9日
				EP	1496926	A1	2005年 1月 19日
				US	2003191056	A1	2003年 10月 9日
WO	2010091253	A1	2010年 8月 12日	CA	2751679	C	2018年 2月 27日
				CA	2751679	A1	2010年 8月 12日
				US	9675664	B2	2017年 6月 13日
				US	2012101021	A1	2012年 4月 26日
				US	2015238567	A1	2015年 8月 27日