



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 89108193.3

[51] Int.Cl⁵
C07K 3/02

[43] 公开日 1990年5月23日

[22] 申请日 89.10.28

[30] 优先权

[32] 88.10.29 [33] JP [31] 275664 / 88

[71] 申请人 日本油脂株式会社

地址 日本东京都

[72] 发明人 土田英俊 大野弘幸 武冈真司

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
代理部
代理人 辛敏忠

C07K 3/12 C07K 15/06
A61K 35/14

说明书页数: 5 附图页数:

[54] 发明名称 生产血红蛋白浓缩物的方法

[57] 摘要

一种生产血红蛋白浓缩物的方法是将红细胞尽可能地浓缩、破碎红细胞的膜以获得浓缩的血红蛋白溶液, 以及除去红细胞膜等组分而又不会使该溶液稀释。

202

权 利 要 求 书

1 一种生产血红蛋白浓缩物的方法，其特征在于该方法包括：浓缩红细胞、使红细胞浓缩物溶血，以及除去血红蛋白浓缩物中的杂质，例如膜组分（基质蛋白），以获得分离和纯化的血红蛋白浓缩物。

2 权利要求1所述的方法中，红细胞为收缩的红血细胞。

3 权利要求1或2所述的方法中，采用冻结和融法、超声处理法或电穿孔法作为使红细胞浓缩物溶血的方法。

生产血红蛋白浓缩物的方法

本发明涉及一种生产血红蛋白浓缩物的方法，该方法包括将红细胞尽可能地浓缩、破碎红细胞的膜以得到浓缩的血红蛋白溶液，以及除去红细胞膜成分等步骤而又不会稀释该溶液。

当然，按重量计浓缩至约30%的血红蛋白是包含在红细胞内的。在生产血红蛋白的常规基本方法中，采用了浓缩血红蛋白的步骤，将红细胞溶血并分离出血红蛋白后，浓缩所得的血红蛋白。通常采用的使红细胞溶血的方法是通过加入低渗透压溶液对红细胞施加渗透压的冲击。但是，在上述常规方法中，由于所得的血红蛋白按重量计被稀释至8%，因此必须将血红蛋白浓缩。然而，目前尚没有有效的浓缩血红蛋白的方法。亦即：一般用于浓缩蛋白的沉淀法及分散吸收法不适用于血红蛋白的浓缩，因为所采用的是溶剂而不是氯化钠生理盐水。在冷冻及干燥方法中，血红蛋白发生变性。因此采用超滤法来浓缩血红蛋白。然而，在用该方法时，随着血红蛋白被浓缩，过滤器常常被堵塞，操作变得很麻烦而又无效。因此要寻找更为有效的浓缩血红蛋白的方法。

本发明者进行了研究以解决上述有关蛋白浓缩的方法中的问题，具体地说，他们进行了许多纯化血红蛋白的基本研究。然后他们找到了一种生产血红蛋白浓缩物的有效方法。

亦即，本发明提供了一种生产血红蛋白浓缩物的方法，该方法包括的步骤有：浓缩红细胞、然后使该红细胞浓缩物溶血、再除去溶血后的浓缩物中的杂质，例如膜的组分（基质），以获得分离和纯化的

血红蛋白浓缩物。

以下的叙述更具体地说明本发明所构成的特征。

本发明的方法包括三个步骤，即红细胞的浓缩、浓缩物的溶血以及血红蛋白的分离和纯化。

首先，用离心法浓缩红细胞。用氯化钠生理盐水洗涤红细胞并用离心分离器浓缩，以达到将该红细胞分离出来的目的。因为红细胞的直径约为8微米，所以用离心分离器很容易将其浓缩。再者，用氯化钠生理盐水洗涤红细胞后，加入不会使红细胞溶血的高渗透压溶液洗红细胞并使其收缩，然后用离心操作即能将收缩后的红细胞有效地浓缩和分离。此外，红细胞的洗涤也可采用离心操作进行。

然后，将红细胞溶血。通常采用加入等体积低渗透压溶液的方法从红细胞中分离出血红蛋白。也可采用其他的溶血方法，如超声波处理法或电穿孔法。最可取的溶血方法是冻融法。在实施例1中，浓缩的红细胞溶液在干冰-甲醇溶液中冷冻，然后将冷冻的溶液在30℃的温水浴中融熔使浓缩的红细胞溶血。采用冻融法可很容易使红细胞在无菌的条件下溶血而又不会稀释血红蛋白。

最后，分离并提纯血红蛋白，虽然浓缩的红细胞已溶血，但由于红细胞膜的组分（基质）、低分子物等存于血红蛋白中，因此必须除去这些杂质。除去杂质的方法不作具体规定。例如，可采用离心分离法除去杂质。用该方法时，必须小心地防止血红蛋白的稀释。

如上所述，采用本发明的方法时，易浓缩的红细胞被尽可能地浓缩，然后溶血。如此可有效地获得血红蛋白。

按照本发明所述，该发明的优点如下。即如上所述，由于纯化的血红蛋白是采用包括浓缩红细胞、将红细胞浓缩物溶血，以及将膜组

分(基质)从溶血的浓缩物中除去的方法来分离的,因此,用本发明的方法所得的血红蛋白浓缩物的浓度有可能为用常规法所制备的血红蛋白浓缩物的三倍或三倍以上,常规法的步骤包括将红细胞溶血、分离所得的血红蛋白、浓缩分离出的血红蛋白。

以下例子更具体地阐明了本发明。

实例 1

将已过有效期的人血(保藏的血)400毫升放入4支100毫升的离心管中,在4℃,3000r.p.m下离心5分钟。为了分离红细胞与血浆,先将血浆组分的上清液除去,在红细胞粗制品中加入与上清液等体积的氯化钠生理盐水,所得之溶液在与上述相同的条件下离心,并除去所得之上清液。重复该操作二次,然后把纯化的红细胞浓缩物从装置中取出。接着,将此纯化的浓缩物放入300毫升的茄形烧瓶中。将此烧瓶在干冰—甲醇溶液中缓慢旋转使红细胞冻结,然后放入30℃的热水浴中使冻结的红细胞融解。重复该操作二次,使红细胞完全溶血。将溶血的溶液放入40毫升的超离心管中,并在4℃、25000r.p.m下离心30分钟,除去沉淀下来的膜组分基质。该操作重复2次,然后将所得之未被冲稀的血红蛋白液通过孔径为5微米、3微米、2微米、1.2微米、0.8微米、0.45微米和0.2微米等一系列的膜过滤器各3次,即得到纯化的血红蛋白。

所得血红蛋白浓缩物的浓度为26.0%(重量),变性血红蛋白的含量为8.0%,磷脂的数量为40mg/dl。

实例 2

采用与实例1中所用的相同的操作方法,将红细胞浓缩物溶血并

离心，然后除去沉淀的基质蛋白。所得的血红蛋白循环通过孔径为 0.2 毫米的空心纤维过滤组件即完成过滤步骤。因为血红蛋白在 4℃ 下很容易通过该过滤组件，而基质蛋白残渣留在循环的液体中。所以血红蛋白的纯化在很短的时间内即能完成。

（按重量计）所得的血红蛋白浓缩物的浓度为 24.5%；变性血红蛋白含量为 4.0%；磷脂的含量为 10 毫克/分升。

实例 3

采用与实例 1 中所用的相同的操作方法，将血红蛋白浓缩物溶血。在 4℃ 下将所得的血红蛋白溶液循环通过孔径为 0.2 微米的空心纤维过滤组件直接进行过滤，并除去基质蛋白。（按重量计）所得之血红蛋白浓缩物的浓度为 23.0%，变性血红蛋白含量为 3.2%，磷脂含量为 22 毫克/分升。

实例 4

采用与实例 1 中所用的相同的操作方法，用离心法洗涤红细胞。加入不会使红细胞溶血的高渗透压溶液。水从红细胞中释放出来，而红细胞即收缩。将红细胞溶液离心，分离出收缩的红细胞浓缩物。然后采用与实例 1 中所用的相同的操作方法使浓缩物溶血并纯化所得之血红蛋白溶液。

在这种情况下，红细胞中的血红蛋白被进一步浓缩。按重量计得到浓度较高的血红蛋白浓缩物，其浓度为 33.0%，变性血红蛋白含量为 9.2%，磷脂含量为 45 毫克/分升。

实例 5

采用与实例 1 中所用的相同的操作方法，浓缩收缩的红细胞，并将红细胞浓缩物溶血。所得之血红蛋白溶液在 4℃ 下循环通过孔径为

0.2微米的空心纤维组件直接除去基质蛋白。

按重量计所得的血红蛋白浓缩物的浓度为31.0%，变性血红蛋白的含量为4.5%，磷脂的含量为11毫克/分升。

实例6

采用与实例1中所用的相同的操作方法浓缩红细胞。用超声处理法（批式）在氮气环境中使红细胞溶血。所得之血红蛋白溶液在4℃下循环通过孔径为0.2微米的空心纤维组件，直接除去基质蛋白。

按重量计所得的血红蛋白浓缩物的浓度为26.0%，变性血红蛋白的含量为10.2%，磷脂含量为60毫克/分升。

实例7

采用与实例1中所用的相同的操作方法浓缩红细胞。用电穿孔法使红细胞浓缩物穿孔，在该方法中，红细胞膜经高压脉冲处理而被穿孔。所得之血红蛋白溶液经离心并除去基质蛋白后，循环通过孔径为0.2微米的空心纤维组件。因为在4℃下血红蛋白很容易通过该组件，而基质蛋白残渣留在循环的液体中，所以血红蛋白的纯化在很短的时间内即可完成。

按重量计所得的血红蛋白浓缩物的浓度为19.6%，变性蛋白的含量为3.2%，磷脂含量为7毫克/分升。