

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C07K 14/805

C08B 37/00



## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01817437.X

[43] 公开日 2005年9月14日

[11] 公开号 CN 1668643A

[22] 申请日 2001.9.19 [21] 申请号 01817437.X

[30] 优先权

[32] 2000.9.19 [33] CA [31] 2,319,966

[86] 国际申请 PCT/CA2001/001329 2001.9.19

[87] 国际公布 WO2002/024751 英 2002.3.28

[85] 进入国家阶段日期 2003.4.16

[71] 申请人 右旋 - 血液公司

地址 加拿大安大略

[72] 发明人 蔡常彬 王子晖

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商  
标事务所

代理人 李华英

权利要求书2页 说明书28页 附图5页

[54] 发明名称 葡聚糖 - 血红蛋白共轭物作为血液代用品

[57] 摘要

一种具有 50kD - 500kD 的平均分子量的血红蛋白 (Hb) - 葡聚糖 (Dx) 共轭物提供了获得可接受的红血球沉淀速度 (ESR) 和排泄速度 (EXC) 的血液代用品。本发明的 DxHb 共轭物可作为血液代用品用于各种目的。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种载氧化合物，包含一种与多糖共价相连的血红蛋白的共轭物，所述共轭物具有约 50kD-约 500kD 的平均分子量。
2. 权利要求 1 的化合物，其中使用 Wintrobe 法，所述化合物获得低于 20mm/hr 的红血球沉淀速度(ESR)，并且肾排泄速度(EXC)低于 1%。
3. 权利要求 1 的化合物，其中所述多糖是葡聚糖。
4. 权利要求 3 的化合物，其中所述共轭物具有约 89kD-约 116kD 的平均分子量。
5. 权利要求 2 的化合物，其中使用 Wintrobe 法，所述化合物获得低于 1mm/hr 的红 ESR，并且肾 EXC 低于 0.2%。
6. 一种载氧化合物的制备方法，所述化合物包含与多糖共价相连的血红蛋白的共轭物，所述方法包括：
  - 1) 将多糖与溴化合物反应以在所述多糖上提供溴基，由此提供一活化多糖；
  - 2) 用第一过滤器将所述活化多糖过滤；
  - 3) 将所述活化多糖与血红蛋白反应由此提供一偶联的葡聚糖-血红蛋白分子；
  - 4) 用第二过滤器将所述葡聚糖-血红蛋白分子过滤。
7. 权利要求 6 的方法，其中所述多糖是葡聚糖。
8. 权利要求 7 的方法，其中所述葡聚糖具有 20kD 的平均分子

量。

9. 权利要求 6 的方法，其中所述第一过滤器具有使保留物具有大于 500kD 的分子量的孔径。

10. 权利要求 9 的方法，其中所述第一过滤器具有使保留物具有大于 300kD 的分子量的孔径。

11. 权利要求 6 的方法，其中所述血红蛋白是无基质的血红蛋白。

12. 权利要求 6 的方法，其中所述第二过滤器具有使保留物具有大于 500kD 的分子量的孔径。

13. 权利要求 6 的方法，还包括在步骤 4 之后通过第三过滤器将葡聚糖-血红蛋白过滤的步骤。

14. 权利要求 13 的方法，所述第三过滤器具有使滤液具有大于 80kD 的分子量的孔径。

## 葡聚糖-血红蛋白共轭物作为血液代用品

### 发明领域

本发明涉及血液代用品，及其制备方法。更具体地说，本发明涉及用作哺乳动物的血液代用品的改进的多糖-血红蛋白共轭物以及这种共轭物的制备方法。

### 发明背景

近年来，寻找安全的血液代用品快速增加。这种需要经常超过了可从人供体获得的血液的供应。此外，世界上许多地区，全血供应可能是危险的。因此，需要开发血液代用品。

血液最重要的功能之一是从肺携带氧支持组织呼吸。血红蛋白(Hb)在开发临床血液代用品中是一种吸引人的氧载体，原因是它属于广泛溶解性的呼吸色素，摄取和释放氧，并且首先是其运输大量氧的能力。然而，游离 Hb 本身作为血液代用品的一个根本缺陷在于其相对小的分子大小(为 64.5 kD)和因此高的肾排泄速度(EXC)，从而导致从循环中快速清除。因此，为了防止 Hb 的肾排泄并延长其血浆半衰期，已采用与载体聚合物的共价共轭。这些共轭物被称之为血红蛋白基氧载体(HBOC)。这些聚合物的实例包括：葡聚糖和葡聚糖的生物聚合物衍生物、菊粉、羟乙基淀粉、聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮(S. P. Tsai 和 J. T.-F. Wong, 葡聚糖-血红蛋白，其中：Winslow, R. N.、Vandegriff, K. D. 和 Intaglietta, M. [编辑], 1997 血液代用品的优点: Industrial Opportunities and Medical Challenges, Birlchauser, Boston; 将这些文献的内容通过引用加入本文)。

氧传送的效率是由总血液流量和体积、氧含量、红细胞或血红蛋白质量、氧亲和力和氧消耗的速度决定的。氧含量、传送和利用之间

的关系最好通过 Fick 等式列举。因此显而易见，单位体积可以运载和传送最大量氧同时保持优异流变特性的血液代用品将是理想的。

葡聚糖-血红蛋白 (DxHb) 是一种已作为血液代用品提出的共轭物。水溶性、在广泛分子大小的可用性、和没有显著毒性或组织向性的组合，在可生物降解聚合物中赋予了葡聚糖成为优异的药物载体。葡聚糖 (Dx) 与血红蛋白 (Hb) 共价共轭增加了 Hb 的有效大小，并因此减少了其通过肾脏系统的排泄速度 (EXC)。

已提出了该共轭物溶液的粘度的稳定方法，并进行了与狗和猕猴中的 DxHb 交换输血 (Tam 等, 1976, Tam 等, 1978, Wong 1988)。然而，迄今还没有研究该共轭物的流动性。在美国专利 US 4,064,118 和 4,650,786 中提供了 DxHb 共轭物的实例，将这些文献的内容通过引用加入本文。其中'118 专利教导一种可用作血液代用品或血液膨胀剂的组合物，它是将血红蛋白 (Hb) 与分子量为约 5kD-2000kD 的葡聚糖 (Dx) 偶联制备的。该 DxHb 共轭物的分子量是 70-2000kD。然而已发现，与血红蛋白相比，根据美国专利 US 4,064,118 的产品趋于显示对氧或多或少较大的亲和力，但是保留了血红蛋白的主要氧运输和释放能力。

美国专利 US 4,650,786 公开了一种氧亲和力降低的改进的葡聚糖-血红蛋白复合物。该 DxHb 复合物的分子量是 70-2000kD。

与 DxHb 复合物，或改进的 DxHb 复合物相伴的问题之一是，贮藏时共轭物溶液的粘度增加，由此使该溶液不适宜施用。上面问题的解决方法描述在美国专利 US 4,900,816，将其内容通过引用加入本文。已显示葡聚糖部分的活化位置可以被封闭，并且贮藏时的粘度得以稳定，没有影响该血红蛋白复合物的氧运输性能。美国专利 US 4,900,816 教导一种分子量为约 70kD-约 2000kD 的化合物，包含血红蛋白残基、降低氧亲和力的配体、多糖 (例如葡聚糖)、共价连接的化学桥接基团和封闭活化基团。

正如上面所述的，血液代用品的一个重要特性是其流变特性-就

代用品而言为了成为生理可接受的，其粘度不要高至阻碍血液流动。尽管红细胞的凝聚是造成血液粘度增加，尤其是在较低剪切速度下，的一个重要因素，但是红细胞凝聚的实际机理仍然未完全阐明。红细胞的凝聚可以通过各种方式引起。一般说来，粘度和 RBC 凝聚都随免疫球蛋白的浓度增加而增加；然而，两者之间的精确关系显然是很复杂的。因此重要的是表征 DxHb 在其开发为血液代用品时的可能的物理-化学性能。

正如下面所述的，在本发明中，合成了各种 DxHb 制品，并且通过测定这些溶液的粘度及其凝聚趋势来测定其流变性能，该凝聚趋势是以红血球沉淀速度 (ESR) 试验 (Dintenfass 1985, 将其内容通过引用加入本文) 来评估的。高分子以一定“临界浓度”存在于血浆中可能会诱导红细胞 (RBC) 凝聚并依次增加血液粘度，尤其是在低剪切速度下。

血液在低剪切区域，特别是在静脉循环中的流动，因其红血球凝聚的增强而大大降低，该红血球凝聚增加血液粘度并通过形成沉淀物而阻碍毛细血管流动 (Dintenfass 1981)。红细胞，RBC，凝聚是高分子在相邻红血球表面之间桥接的结果。当未包封的血红蛋白-基血液代用品被输入循环时，这些高分子还会与红血球相互作用并诱导 RBC 凝聚，ESR 是受这种凝聚影响的一种最早的血液流变学参数。依次，根本感兴趣的是测定血红蛋白-基血液代用品在其设计和开发过程中的 ESR 强化效果。

已知分子大小是通过高分子桥接机理强化 ESR 的一个关键性决定物。20 kD 的葡聚糖不诱导 RBC 凝聚，因此 ESR 没有升高，但是大于 40 kD 的葡聚糖完全能够提高 ESR (Chien 和 Jan 1973; 将其内容通过引用加入本文)。前面的研究显示，大于 220 kD 的高分子结合的血红蛋白将诱导 RBC 凝聚，这样可以增加低剪切速度的血液粘度并影响 RBC 在循环中的分布 (Tsai 和 Wong 1996; 将其内容通过引用加入本文)。

本发明提供了一种具有导致低 EXC 和 ESR 水平的分子量的 DxHb

共轭物，因此提供了一种有效的血液代用品或血浆膨胀剂。

### 发明概述

在一个实施方式中，本发明提供了一种载氧化合物，包含一种与多糖共价相连的血红蛋白的共轭物，该共轭物具有约 50kD-约 500kD 的平均分子量。

在另一实施方式中，本发明提供了一种载氧化合物的制备方法，该化合物包含与多糖共价相连的血红蛋白的共轭物，该方法包括：

- 1) 将多糖与溴化合物反应以在多糖上提供溴基，由此提供一活化多糖；
- 2) 用第一过滤器将该活化多糖过滤；
- 3) 将该活化多糖与血红蛋白反应由此提供一偶联的葡聚糖-血红蛋白分子；
- 4) 用第二过滤器将该葡聚糖-血红蛋白分子过滤。

### 附图简述

参照附图，通过以下详细描述，本发明的优选实施方式的这些和其它特征将变得显而易见，其中：

图 1 描述了由两个开始大小，10kD (DxT10) 和 20kD (DxT20) 的葡聚糖分子合成的葡聚糖-血红蛋白的红血球沉淀速度 (ESR) 和排泄速度 (EXC) 的大小依赖性。

图 2 描述了用标准蛋白校准凝胶过滤柱，Superdex™ 200、26/600。

图 3 描述了用 FPLC 和 MiniDawn 激光检测器测定的四个最优选 DxHb 制品的分子量分布。

图 4 和 5 描述了实施例 5 的试验结果。

### 优选实施方式的描述

本文所用的术语“血红蛋白”将理解为包含由任何哺乳动物的红

细胞获得的血红蛋白。尽管主要涉及人血红蛋白，但是本发明同样适用于由其它动物获得的血红蛋白并包括牛和猪血红蛋白。

在一个优选实施方式中，本发明提供了一种载体多糖-血红蛋白共轭物，更优选一种用作血液代用品或 HBOC 的改进的葡聚糖-血红蛋白 (DxHb) 共轭物。正如下面进一步讨论的，该 DxHb 共轭物，根据本发明的一个优选实施方式，具有约 50kD-约 500kD，更优选约 89kD-116kD 的分子量(MW)。由于 Hb 的大小通常是恒定的事实，因此该分子大小范围主要是以 Hb 和 Dx 分子之间的共轭量为基础的。已发现这种范围的共轭物大小使得分子在大小上比 Hb 足够大，以便这种分子的 EXC 速度不高，同时也提供在大小上足够小的分子，以便这种分子的 ESR 也不高。正如下面进一步所述的，与 EXC 速度有关的术语“高”是 1%，对 ESR 而言是 20 mm/hr。本发明还提供了这种共轭物的生产方法。本文所含的实施例仅仅是为了描述目的提供的，并不意味着限制本发明的范围，这一点对本领域技术人员将是显而易见的。

### 1. 无基质的人血红蛋白(SFH)的制备

通过溶解红细胞并释放用于本发明方法的血红蛋白生产一种纯血红蛋白溶液。然后对这些制品加工除去溶液中的基质以避免肾损害。根据本发明的优选实施方式，通过 Winslow 和 Chapman (Meth. Enzymol., 1994, 231: 3-16)所述的标准过滤工艺制备一高纯度的血红蛋白溶液，将该文献的内容通过引用加入本文。

### 2. 通过烷基化法活化葡聚糖

正如上面讨论的，多糖与血红蛋白共价共轭增加了其有效大小，因此防止了其肾排泄。本发明的多糖具有确定的生物相容性并且能够与血红蛋白结合。本发明的优选多糖是葡聚糖。

本发明的葡聚糖可以具有 10 kD (称之为葡聚糖 T10)-20 kD (称之为葡聚糖 T20)的平均分子量。应指出的是可商购获得的葡聚糖通过其平均分子量分类并且葡聚糖分子的大小变化是固有的。推测当

使用 10 kD 葡聚糖时 DxHb 存在较高的肾以及非肾排泄。因此，根据本发明的优选实施方式，葡聚糖最优的开始大小是 20kD。

为了将葡聚糖改性为能够与血红蛋白反应，它必须被“活化”，优选通过烷基化反应。具体地说，该葡聚糖在碱性 pH 下与溴化氰 (CNBr) 反应，接着与二氨基乙烷反应。将所得氨基乙基氨基-葡聚糖透析。该透析步骤用于洗涤掉小的反应分子或反应过的残余物质，例如二氨基乙烷。

这之后，在中性 pH 下将氨基乙基氨基-葡聚糖用溴代-乙酰溴酰基化，接着相对水进行透析并冷冻干燥。葡聚糖活化的该方法由 S.C. Tam、J. Blumenstein 和 J.T.F. Wong 详细描述在 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1976, 73: 2128-2131; 将其内容通过引用加入本文。

两个试验，茚三酮和硝酸银试验，用于监控透析结束。具体地说，对来自透析步骤的滤液进行这些试验，由此通过 S. Moore 和 W. H. Stein (J. Biol. Chem., 1948, 176:367-388; 将其内容通过引用加入本文)所述的茚三酮试验检测氨基的存在。进行硝酸银试验以检测溴基的存在，如下面讨论的。下面还将进一步描述这两个试验。

### 3. 葡聚糖-血红蛋白共轭物的制备

通过向称之为 N-溴-乙酰氨基-乙基氨基-葡聚糖 (DxB<sub>r</sub>) 的活化的葡聚糖中加入无基质的血红蛋白进行血红蛋白与葡聚糖偶联的最终步骤。该偶联反应包括除去活化葡聚糖 (DxB<sub>r</sub>) 的 -Br 基和除去血红蛋白的巯基 (-SH) 的氢原子，使 Dx-与 HbS-结合从而获得 DxHb。溴代-氨基乙基氨基-葡聚糖 (DxB<sub>r</sub>) 和 Hb 之间的连接是在 β-93 半胱氨酸 (共价连接的位置) 通过自由 -SH 介导的。在偶联反应的过程中，-Br 从 DxB<sub>r</sub> 分离并变成自由 Br 离子，它后来被透析掉。可以使用硝酸银试验 (下面进一步描述) 测定 Br 离子的存在。

葡聚糖与血红蛋白的共轭是按照 S.C. Tam、J. Blumenstein 和 J.T.F. Wong (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1976, 73:2128-

2131, 将其内容通过引用加入本文)进行的。根据本发明的优选实施方式, 该共轭反应是通过将 DxBr 和无基质的血红蛋白混合入含有 0.33% DxBr 和 1%无基质的血红蛋白溶液的水溶液中进行的。Hb 和 DxBr 的这种浓度确保 3:1 重量或 1:1 摩尔质量比的 DxHb 偶联。然而, 获得这些比例的反应物的其它最初浓度对本领域技术人员将是显而易见的。

溴代-葡聚糖(DxBr)与高浓度的血红蛋白溶液的偶联(即共轭)试验使得交联度较高, 由此使得所得共轭物的摩尔重量较高。因此, 为了具有较高比例的相对小的 DxHb 分子, 优选使用较低(即 1%)浓度的 Hb 进行该偶联反应。然而, 应理解的是可以进行 DxBr 与或者比 1%浓度高或者比其低的血红蛋白的偶联。

在具有碳酸氢钠缓冲剂的 pH 为 9.5 的溶液中进行该偶联反应。溶液混合物首先用 0.22 $\mu$ m 过滤器杀菌并按照 H. Xue 和 J. T. F. Wong (Meth. Enzymol, 1994, 231:308-322, 将其内容通过引用加入本文)所述的方法在 4 $^{\circ}$ C 下将该偶联反应进行过夜。将该偶联反应进行约 10-16 小时, 最优选 16 小时。较长的偶联时间, 由于交联度较高, 因此获得较高平均分子量的 DxHb。

然后将 $\beta$ -巯基丙酸加入与 DxBr 上的任何残余溴基反应, 由此使偶联反应停止。而且, 随着这加入也使交联反应停止, 由此防止了溶液粘度的任何进一步升高(S. P. Tsai 和 J. T. F. Wong, 在: Winslow, R. W., Vandegriff, K. D. 和 Intaglietta, M. (编辑), Advances in Blood Substitutes, 1997, Birkhauser, Boston, 将其内容通过引用加入本文)。然后将该溶液经过相对磷酸盐缓冲液的透析以清除任何残余的反应物和反应副产物。

因此, 获得上面共轭的烷基化方法可以汇总如下(如 Blumenstein 等, Experimental Transfusion of Dextran-Hemoglobin, (1978) 中所述; 将其内容通过引用加入本文):

- 1)  $Dx + CNBr \rightarrow$  活化 Dx
- 2) 活化 Dx + 二氨基乙烷  $\rightarrow$  氨基乙基氨基-葡聚糖

3) 氨基乙基氨基-葡聚糖 + 溴代乙酰溴  $\rightarrow$  N-溴-乙酰氨基乙基氨基-葡聚糖

4) N-溴-乙酰氨基乙基氨基-葡聚糖 + 血红蛋白-SH  $\rightarrow$  血红蛋白-S-乙酰氨基乙基氨基-葡聚糖

#### 4. DxHb 分馏和 ESR、EXC 和 MW 之间的关系

在发现通过过大 DxHb 分子强化 ESR 之后加入分馏步骤。为了确定分子大小、ESR 和 EXC 之间的关系，该 DxHb 优选由具有至少两个开始平均大小 10kD (DxT10) 和 20kD (DxT20) 的葡聚糖分子合成。所得共轭物，DxT10Hb 和 DxT20Hb，使用 Waters 650E 先进蛋白质提纯系统进行分馏。更具体地说，该分馏是在 Hiload™ 26/60 Superdex™ 200 预备级凝胶过滤柱 (Pharmacia) 上进行的。使用 10mM 磷酸盐缓冲溶液，pH 7.4，作为洗脱缓冲液并且洗脱流速是 0.5 ml/min。所用样品是 8 ml 的 8% DxHb。使用 ISCO Retriever II 收集馏份 (馏份收集 8 分钟，即每一馏份 4 ml)。如下所述测定馏份的 ESR 和 EXC。然而，由于由柱分馏步骤获得的样品量不够 ESR 和 EXC 试验，因此将几次馏份汇集并用 Centriprep 30 (Amicon) 浓缩，以便有足够样品 (每一大小的) 进行这两种试验。还测定每一馏份的平均 MW。尽管上面提到的分馏步骤描述涉及到 DxHb，但是本领域技术人员应理解的是，这种分馏步骤也可以对 DxBr 前体分子进行。在这种情况下，使用上述方法将 DxBr 馏出物与 Hb 共轭，从而获得所需大小范围的 DxHb 馏份。下面描述按照本发明优选实施方式进行的测定的细节。

##### 4.1. ESR 测定

红血球沉淀速度 (ESR) 是一种定量红细胞凝聚的方式。这种凝聚通常是因高分子的存在引起的。为了该测定，优选通过将 6.0% 试验溶液与等体积的刚抽出的柠檬酸化大鼠全血制备样品。ESR 测定应在抽出鲜血之后的 3-4 小时内进行，这是因为悬液稳定性的潜在变化和长时间静置下红细胞的红血球变形性。当使用取自大鼠的血液时发现

这一点。根据厂商 Clay Adams, Division of Becton Dickison and Company, Parisippany, N. J., 07054 USA 提供的说明进行 ESR 测定。以垂直位置将溶液在可重复使用的 Clay Adams Wintrobe Blood 沉淀管 (115 mm 长, 具有 3.0mm 孔) 中于 ESR 支架 (Chase Instruments) 上室温 (约 20-22℃) 下保持 60 分钟。该方法在本文通常称之为 “Wintrobe 法” 并且该方法的描述提供于 “Introduction to Medical Laboratory Technology”, Baker 和 Silverstein (编辑), 第 5 版第 605-606 页, Butterworths, 将其内容通过引用加入本文。

将这些沉淀管以 1 mm 间隔划刻度。就一些制品而言, 沉淀和上清液之间没有清楚的边界, 但是在 ESR 管的上面部分观察到渐渐的颜色变化。就这些制品而言, ESR 以一个范围 (例如 1- 18mm/hr, 表 2) 表示。可接受的 ESR 呈现为 20 mm/hr。

应指出的是 ESR 的其它测定方法对本领域技术人员来说是显而易见的。例如, 代替上面所述的 Wintrobe 法, 也可以使用 “Introduction to Medical Laboratory Technology”, Baker 和 Silverstein (编辑), 第 5 版, 第 606-607 页, Butterworths 中所述的 Westergren 法, 将其内容通过引用加入本文。这些方法将获得不同的 ESR 值, 然而, 在本情况下将得出相同结论。

#### 4.2. EXC 测定

进行排泄速度 (EXC) 试验以测定本发明的 DxHb 共轭物的肾排泄程度。为了测定 EXC, 将 DxHb 共轭物的试验溶液输注入平均重量为约 300-350g 的麻醉的雄性 Sprague-Dawley 大鼠的颈静脉中。通过 D. L. Drabkin 和 J. H. Austin, (J. Biol. Chem., 1935, 112:51-65, 将其内容通过引用加入本文) 所述的方法测定大鼠尿样中的血红蛋白的浓度来评价排泄速度。尽管该 EXC 值优选是 0, 但是可接受的值可以是小于 1%。在该水平以上, 发现大鼠的尿呈微红色。

### 4.3. 分子量测定

使用凝胶过滤色谱法测定 DxHb 共轭物的分子量，其中分子从柱洗脱以降低分子量。当 DxHb 分子在凝胶过滤柱上分馏时，检测器监控其停留时间。将 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) 用于本发明的 DxHb 共轭物的分子量测定，然而也可以使用高效液相色谱法 (HPLC)。为了描述本发明的目的，使用 Waters 650E Advanced Protein Purification System 测定分子量。在该系统中串联使用以下两个柱：1) TSK-Gel GMPWXL (7.8x300)；和 2) Pharmacia Superose 6 HR10/30。洗脱缓冲液由 10mM Tris-HCl、0.05%叠氮化钠组成，pH 8.0，所用流速是 0.4 ml/min。在该优选实施方式中，使用可用于 DxHb 的 MW 测定的检测器检验洗脱液的组成。例如，可以将 Wyatt Technology MiniDAWN 激光检测器或紫外线检测器用于本目的。在该优选实施方式中，将以下 3 个检测器串联使用：Waters 440 UV Detector A280；Wyatt Technology MiniDAWN 检测器和 Waters 410 差示折射仪。下表 1 列出了生产的各种 DxHb 的峰分子量值。而且，使用上述系统获得以下分子量数据：

样品	计算平均分子量
1) 纯 Hb	(66+/-7) kD
2) 葡聚糖 T20P (DxT20P-Pharmacia)	16.0 kD
3) 活化葡聚糖 (DxB <sub>r</sub> )，过滤之后获得具有低于 300kD 的组分的滤液	24.4 kD
4) DxHb，过滤之后获得具有低于 500kD 的组分的滤液，然后过滤获得具有大于 80 kD 的组分的保留物	115.6 kD

通过将讨论的分子的  $V_e/V_o$  比与已知分子量的蛋白质标准的  $V_e/V_o$  相比确定各种馏份的分子量 ( $V_e$  是洗脱体积， $V_o$  是空隙体积)。给定柱的空隙体积是以洗脱大分子如 Blue Dextran 等所需的洗脱液的体积为基础的。然后通过将蛋白质标准的已知分子量的对数相

对它们各自的  $V_e/V_o$  值绘图制备校准曲线。

应指出的是测定的分子量值可以根据所用设备/方法而改变。例如, S.P. Tsai 和 J.F.T. Wong (Artificial Cells Blood Subst. Immob. Biotech., 1996, 24:513-523) 报道测定血红蛋白的分子量时反常。根据该报道, Hb 分子, 由于其致密, 发现圆形分子结构和形状通过 FPLC 系统测定具有仅 46kD 的 MW 测定, 而其理论值是 64.5kD。如上所述, 使用 MiniDAWN 激光法测定 Hb 的分子量发现是  $66 \pm 7$  kD, 范围是 58-73 kD, 这非常接近理论值。而且, 葡聚糖, 由于其直链结构, 使用凝胶过滤获得一分子量读数, 即比其理论值高。当测定用于本发明 DxHb 共轭物的 MW 限制时应考虑到这一事实。为此, 为了获得更精确结果而使用上述激光检测器。例如, 使用这种激光检测器, 发现测定的 Hb 的分子量与其理论值接近。

#### 4.4. ESR 和 EXC 对 DxHb 共轭物的大小依赖性

在如上所述的洗脱体积的峰值下测定的 ESR、EXC 和 MW 数据提供于表 1 并描述在图 1 中。

**表 1. ESR 和 EXC 对由两个开始大小 (10kD 和 20kD) 的葡聚糖分子合成的 DxHb 共轭物的大小依赖性**

洗脱体积 (mL)	MW (kD)	Dx (T10) -Hb		Dx (T20) -Hb	
		ESR (mm/hr)	EXC (%)	ESR (mm/hr)	EXC (%)
124	1217	75			
128	1067	74		73	
132	935	73			
136	820	72		73	
140	719	71			
144	630	67		70	
148	553	53			
152	484	43		46	
156	425	13		28	
160	372	8	0.00	16	
164	326	2		5	
168	286	1		1	
172	251			0.5	
176	220		0.00		0.00
180	193	0.2		0.2	
184	169				0.09
188	148			0.2	0.00
192	130	0.2			0.00
196	114				0.00
200	100			0.2	0.56
204	88		1.44		1.34
208	77	0.2			
212	67		2.85		1.03
216	59			0.2	
220	52		7.77		
224	45	0.2			
228	40		16.49		

正如上面所讨论的，血红蛋白本身快速排泄的问题显然是由于其相对低的分子量的结果。为了增加血红蛋白的分子量从而能够适当的保留，将其与例如葡聚糖等的多糖偶联。理想地，如果血红蛋白以作

为血液代用品的 DxHb 共轭物的形式施用的话不应观察到血红蛋白的肾排泄。然而，优选排泄速度低于约 1%，更优选低于约 0.2% (S. C. Tam 和 J. T. F. Wong, 大鼠中无基质的血红蛋白的肾功能的损害, J. Lab. Clin. Med, 1988, 111:189-193; 将其内容通过引用加入本文)。

同样正如上面讨论的，尽管较高分子量导致 EXC 降低，但是这种较大分子量会导致 ESR 的增加。根据本发明的优选实施方式，ESR 应小于约 20mm/hr，更优选 ESR 应小于约 1 mm/hr。

在使用凝胶过滤色谱法将本发明的 DxHb 共轭物以分子量为基础分馏并测定收集的馏份对 ESR 的影响之后，发现峰分子量小于约 500kD 的 DxHb 馏份在高达 20mm/hr 的可接受限度下未提高 ESR。另一方面，大于约 50kD 的峰分子量的 DxHb 共轭物导致 EXC 值在 0-1% 的可接受的范围内。根据本发明的优选实施方式，这些结果定义了获得所需水平的 ESC 和 ESR 的 DxHb 共轭物分子量的可接受范围是约 50kD-约 500kD。

## 5. 选择最佳分馏步骤以获得优选的 Dxhb 共轭物

一旦测定了 DxHb 共轭物的上面所需的分子量范围，就开始搜索最佳分馏步骤。确定最佳分馏步骤所考虑的一个因素是使 DxHb 产品的产率最大化。高产率的最终产品避免了 DxHb 的任何不必要的浪费。

使用几个方法达到获得最佳分子大小的最终 DxHb 产品的目标。这些方法包括乙醇沉淀、开始葡聚糖的选择、以及过滤。在活化步骤之前和之后，以及在共轭步骤之前和之后，将 Dx、DxBr 和 DxHb 分馏，从而筛选较好的生产步骤。对各种 DxHb 制品的所用步骤和所得 ESR 和 EXC 列于下表 2。

**表 2. 通过各种方法获得的 DxHb 共轭物的红血球沉淀速度和排泄速度**

#	制品	ESR (mm/hr)	EXC (%)	产率 DxB	产率 DxHb	总产率
Hb	无基质的人血红蛋白	<1	30-40			
	以 DxT20P**为基础的 DxHb 制品					
1	DxT20P, 活化, <100kD (Millipore), 偶联	60	ND*	57	100	57
2	DxT20P, 活化, >100kD (Millipore), 偶联	78	ND	30	100	30
3	DxT20P, 活化, <100kD (A/G)***, 偶联	32	ND	38	100	38
4	DxT20P, 活化, >100kD (A/G), 偶联	50	ND	53	100	53
5	DxT20P, 活化, <300kD (A/G), 偶联	30	ND	35	100	35
6	DxT20P, 活化, >300kD (A/G), 偶联	78	ND	60	100	60
7	DxT20P, 活化, <500kD (A/G), 偶联	57	ND	49	100	49
8	DxT20P, 活化, >500kD (A/G), 偶联	64	ND	42	100	42
	偶联之后分馏 DxHb 的不同过滤器					
9	DxT20P, 活化, 偶联, <500kD >70kD (A/G)	1-20	ND	100	49.5	49.5
10	DxT20P, 活化, 偶联, >500kD (A/G)	76	ND	100	33	33
11	DxT20P, 活化, 偶联, <750kD >70kD (A/G)	51	ND	100	54.8	54.8
12	DxT20P, 活化, 偶联, >750kD (A/G)	73	ND	100	23.7	23.7
	在偶联之前和之后所用的选择的过滤器					
13	DxT20P, 活化, <300kD, 偶联, <500kD >80kD (A/G)	1	ND	35	100.2	35
14	DxT20P, 活化, <300kD, 偶联, <500kD (A/G)	1	ND	35	99.2	34.7
15	DxT20P, 活化, <300kD, 偶联, >500kD (A/G)	ND	ND	35	0.8	0.3
16	DxT20P, 活化, <500kD, 偶联, <500kD (A/G)	1-18	ND	49	91.1	44.6
17	DxT20P, 活化, <500kD, 偶联, >500kD (A/G)	77	ND	49	8.9	4.4
18	DxT20P, 活化, <500kD, 偶联, <750kD >70kD (A/G)	25	ND	49	86.3	42.3
19	DxT20P, 活化, <500kD, 偶联, >750kD (A/G)	80	ND	49	13.7	6.7
	分馏由 DxT20P 制备的 DxB 的不同商标的过滤器					
20	T20, 活化, 偶联, >10kD (A/G)	76	0.24	100	100	100
21	T20, 活化, <30kD (A/G), 偶联	<1	1.60	8	100	8
22	T20, 活化, >30kD (A/G), 偶联	76	0.30	85	100	85

24	T20, 活化, <50kD (A/G), 偶联	1-18	ND	4	100	4
25	T20, 活化, >50kD (A/G), 偶联	76	ND	91	100	91
26	T20, 活化, <50kD (Microgon), 偶联	1-9	ND	14	100	14
27	T20, 活化, >50kD (Microgon), 偶联	74	ND	85	100	85
28	T20, 活化, <50kD (PaulFiltron), 偶联	45	ND	14	100	14
29	T20, 活化, >50kD (PaulFiltron), 偶联	74	ND	81	100	81
30	T20, 活化, <60kD (A/G), 偶联	1-36	ND	18	100	18
31	T20, 活化, >60kD (A/G), 偶联	77	ND	82	100	82
32	T20, 活化, <70kD (PaulFiltron), 偶联	32	ND	17	100	17
33	T20, 活化, >70kD (PaulFiltron), 偶联	74	ND	82	100	82
34	T20, 活化, <100kD (A/G), 偶联	53	ND	22	100	22
35	T20, 活化, >100kD (A/G), 偶联	74	ND	73	100	73
	以 DxT10P 为基础的 DxHb 制品					
36	T20, 活化, 偶联, >10kD (A/G)	76	0.08	100	100	100
37	T20, 活化, 偶联, >30kD (A/G)	ND	0.07	100	99.9	99.9
38	T20, 活化, 偶联, >50kD (A/G)	ND	0.27	100	99.4	99.4
39	T20, 活化, 偶联, >70kD (A/G)	ND	0.04	100	98.4	98.4
40	T20, 活化, 偶联, >100kD (A/G)	ND	0.00	100	65.7	65.7
41	T10, 活化, 偶联, >10kD (A/G)	1-15	1.35	100	100	100
42	T10, 活化, 偶联, >30kD (A/G)	ND	0.88	100	99.8	99.8
43	T10, 活化, 偶联, >50kD (A/G)	ND	0.37	100	97.6	97.6
44	T10, 活化, 偶联, >70kD (A/G)	ND	0.23	100	95.2	95.2
45	T10, 活化, 偶联, >100kD (A/G)	ND	0.06	100	9	9
46	T10, 活化, <30kD >10kD (A/G), 偶联, >10kD (A/G)	1	2.60	39	100	39
47	T10, 活化, <30kD >10kD (A/G), 偶联, >30kD (A/G)	ND	1.56	39	99.7	38.9
48	T10, 活化, <30kD >10kD (A/G), 偶联, >50kD (A/G)	ND	0.19	39	97.9	38.2
49	T10, 活化, <30kD >10kD (A/G), 偶联, >70kD (A/G)	ND	0.21	39	90.3	35.2
50	T10, 活化, <50kD(M) >5kD(M), 偶联	<0.5	2.53	5	100	5
51	T10, 活化, >50kD(M), 偶联	10	0.47	66	100	66
52	T10, 活化, <60kD (A/G) >5kD(M), 偶联	<1	4.70	25	100	25
53	T10, 活化, >60kD (A/G), 偶联	35	ND	67	100	67

54	T10, >50kD(M), 活化, 偶联 用于分馏 DxT10 所用的乙醇	1	0.18	66	100	66
55	T10, 0-55%乙醇 ppt****, 活化, <30kD >10kD (A/G), 偶联, >10kD (A/G)	<1	0.41	45	100	45
56	T10, 0-55%乙醇 ppt, 活化, <30kD >10kD (A/G), 偶联, >30kD (A/G)	ND	0.51	45	99.8	44.9
57	T10, 0-55%乙醇 ppt, 活化, <30kD >10kD (A/G), 偶联, >50kD (A/G)	ND	0.47	45	97.9	44.1
58	T10, 0-55%乙醇 ppt, 活化, <30kD >10kD (A/G), 偶联, >70kD (A/G)	ND	0.13	45	96.1	43.2
59	T10, 0-55%乙醇 ppt, 活化, <30kD >10kD (A/G), 偶联, >100kD (A/G)	ND	0.00	45	40.2	18.1
60	T10, 0-49%乙醇 ppt, 活化, 偶联	62	ND	19	100	19
61	T10, 49-55%乙醇 ppt, 活化, 偶联	15	ND	17	100	17
62	T10, 55-80%乙醇 ppt, 活化, 偶联	<1	ND	11	100	11
63	T20, 0-46%乙醇 ppt, 活化, 偶联	73	ND	40	100	40
64	T20, 46-75%乙醇 ppt, 活化, 偶联	23	ND	54	100	54

其中:

1) “DxT10”和“DxT20”是指葡聚糖(Dx)分子的开始大小;即平均分子量分别为10或20kD。

2) “活化”意思是Dx通过如上所述的烷基化活化。

3) “偶联”是指DxBr与Hb如上所述的共轭、或偶联。

4) “<100kD”或“>500kD”等是指在DxBr或DxHb的过滤步骤期间所用的过滤器的截留值。而且,符号“<”和“>”分别是指滤液和保留物各自的值。例如,“<100kD”是指过滤器提供仅含分子量小于100kD的那些分子的滤液。类似地,“>500kD”是指过滤器提供具有分子量大于500kD的分子的保留物。

\* ND =未检出

\*\* 所有Dx样品(即T10、T20、T20P)都是从Pharmacia Biotech AB获得的。

\*\*\* A/G = A/G Technology Corp., Needham, MA, USA

\*\*\*\*乙醇 ppt = 乙醇沉淀(下面将进一步讨论)

偶联反应之后所用的截留值较大(例如 500kD)的过滤器有助于去除过大的 DxHb 共轭物(大于约 500kD 的那些-优选产品的上限)。共轭之后所用的中间过滤器(例如 50kD、70kD)用于除去小于优选产品的下限(约 50kD)的分子。小过滤器(例如 10kD)的实际功能与共轭反应之后进行的透析方法的相同,即除去任何残余反应物(例如巯基丙酸等)。

乙醇沉淀的功能是在活化步骤之前去除过大的葡聚糖分子。乙醇以逐步方式加入。例如,在制品#55-59(表 2)中乙醇从最初浓度的 0%开始至高至最终浓度 55%慢慢加入。结果,一些过大的葡聚糖分子沉淀、成颗粒并再次溶解用于后面的活化。

从表 2 所列的选择几个 DxHb 制品作为最优选的。这些制品在表 2 中以编号: 13、14 和 16 加以鉴定。所选制品的选择是以所需的 ESR 和 EXC 值以及产品的产率为基础。

如上所述测定这些制品的峰分子量并描述于图 3 中。如图 3 所示,优选制品,两个批次的制品#14 和两个批次的制品#16,的峰 MW 分析为 102、96、93、89kD。此外,尽管图 3 中没有显示,但是制品#13 的平均 MW 分析为 116kD。这些数据定义了本发明的最优选 DxHb 制品的平均 MW 的最优选范围。

因此,根据本发明, DxHb 共轭物的优选大小范围是约 50kD-约 500kD, 最优选范围是约 89kD-约 116kD。合成这些制品的最佳步骤包括将开始大小为 20kD 的葡聚糖活化,将活化的 DxBr 通过 500kD 或 300kD 过滤器过滤,将过滤的产物与无基质的血红蛋白偶联,将所得 DxHb 通过 500kD 过滤器过滤以去除任何过大的共轭物。生产本发明的 DxHb 共轭物的最优选步骤还包括将所得共轭物通过 80kD 过滤器以去除可能潜在增加 EXC 值的任何过小的共轭物的最终步骤。

下表 3 呈现了与表 2 类似的 DxHb 共轭物制品的数据。然而,表 3

包括涉及不同共轭物的附加的进一步制备和分析信息。表 3 中的数据还显示了各个批次的分子量分布。

表 3: Dx-Hb 的制备步骤和分析结果:

批次 编号	步骤和偶联条件(1)	组分产率 (2)	下限	上限	平均 MW	ESR mm/hr	%>	%>	%>	%>
							200 kD	300 kD	400 kD	500 kD
P5.1	DxT20P, 活化, 在 6%, >500kD 下偶联	23.0	1300	6300	太粘		100	100	100	100
P5.5	DxT20P, 活化, 在 1%, >500kD 下偶联	25.9	500	6000	930	77	100	100	100	97
P5.3	DxT20P, 活化, 在 1%, >500kD 下偶联	6.6	300	3000	572	76	100	100	74	58
P4.1	DxT20P, 活化, 在 6%, >750kD 下偶联	30.2	220	3000	490	73	100	82	65	53
P4.3	DxT20P, 活化, 在 6%, >750kD 下偶联	14.9	350	3000	778	73	100	100	95	84
P1.1S	DxT20P, 活化, 在 6%, <750kD 下偶联	83.3	100	2000	207	70	53	34.5	22.5	15
P3.2	DxT20P, 活化, 在 6%, <500kD, >70kD 下偶联	46.5	80	1800	160	63	39	23	14	8
P5.4	DxT20P, 活化, 在 6%, <500kD, >70kD 下偶联	93.4	57	1000	105	62	21	10	5	3
P4.4	DxT20P, 活化, 在 6%, <750kD, >70kD 下偶联	85.1	60	1300	140	60	36	21	13	7
P4.2	DxT20P, 活化, 在 6%, <750kD, >70kD 下偶联	69.8	60	1000	127	51	30	14	5.5	3
P1.3S	DxT20P, 在<300kD 下活 化, 在 2%, <750kD 下偶联	74.4	60	700	117	35	25	10	3.5	1

P1.2S	DxT20P, 活化, 在 2%, <750kD 下偶联	83.6	70	1300	130	25	24	10	4	2
具有可接受的 ESR 值(3) 的样品:										
P5.2	DxT20P, 活化, 在 1%, <500kD, >70kD 下偶联	77.0	53	500	107	1-32	15	5	1	0.5
P3.4	DxT20P, 活化, 在 6%, <500kD, >70kD 下偶联	60.0	64	700	110	1-20	19	6	2	1
P8.1	DxT20P, 活化, 在 1%, <500kD 下偶联	91.1	53	500	104	1-18	15	5	1.5	1
P5.6	DxT20P, 活化, 在 1%, <500kD, >70kD 下偶联	74.1	52	400	90	1-9	7	2	1	0
P102	DxT20P, 活化, <300kD, 在 1%, <500kD, >80kD 下 偶联	97.7	62	400	121	1	18	7	0.5	0
P6.4	DxT20P 活化, <500kD, 在 1%, <500kD 下偶联,	93.2	52	700	102	2	17	6	2.5	1
P6.2	DxT20P 活化, <300kD, 在 1%, <500kD 下偶联,	99.3	50	500	96	1	9	2	0.5	0
P6.8	DxT20P 活化, <500kD, 在 1%, <500kD 下偶联,	80.1	50	700	93	1	11	3	1	0.5
P8.3	DxT20P 活化, 在 1%, <500kD 下偶联	83.2	50	450	91	1	5	1	0	0
P6.6	DxT20P 活化, <300kD, 在 1%, <500kD 下偶联	99.1	49	500	89	1	9	2	0.5	0

注:

-(1): Dx Hb 的偶联显示相当于 Hb 浓度的%值。例如, 就批次 5.5 而言, DxHb 偶联是用 1% Hb 和 0.33% DxBr 进行的。

-(2): 最终 DxHb 分馏步骤的常规产率, 显示生产的 Dx-Hb 的%组

分。

-(3): 表 3 包括通过 ESR 值分类的数据并显示 ESR 值如上面定义的可接受的“截留”。

以下实施例用于描述本发明的优选实施方式，无论如何不打算限制本发明。

### 实施例 1: 无基质的人血红蛋白(SFH)的制备

根据上面所述的方法制备本发明的 SFH。旧人血是由香港红十字会输血站供应的。将 15 单位(约 4.5 升)全血，A、AB 或 O 型，汇集并与 4.5L 的 10 mM PBS (磷酸盐缓冲液-10mM 磷酸钠缓冲液和 154mM NaCl 的混合物)，pH 7.4 混合于一 10-升玻璃瓶中。红细胞(RBC)用 7 体积的冷缓冲液洗涤，用安装于 FlexStrand™ (A/G Technology Corp., Needham, MA)上的 0.65 $\mu$ m (CFP-6-D-6A)中空纤维过滤器以约 10 L 的恒定体积渗滤。然后将 RBC 用低渗 10 mM 磷酸盐缓冲液于与 0.1 $\mu$ m 膜筒(CFP-1-E-6A, A/G Technology Corp)相同的 pH 下慢慢溶解。该体积的 RBC 微粒用高达 5 体积的缓冲液充分洗涤。然后将滤液通过 500 kD 过滤器(UFP-500-E5A, A/G Technology Corp.)渗滤以确保无基质，然后通过 10 kD 膜盒(UFP-10-E-9A, A/G Technology Corp.)循环浓缩至 20 g/dL。溶液用 10 mM PBS, pH 7.4 渗滤，它是最后贮藏的缓冲液。将最终血红蛋白溶液通过串联的预过滤器和 0.22 $\mu$ m 过滤器(293 mm, Millipore)进一步确定它无菌。将该无基质的血红蛋白溶液装瓶并于 4 $^{\circ}$ C 下贮藏。

### 实施例 2: 通过烷基化方法将葡聚糖活化

根据本发明的优选实施方式通过烷基化方法将葡聚糖活化的描述包括小规模和中试规模活化。小规模葡聚糖活化可以获得仅以有限量生产 DxHb，它仅足够研究目的，而中试规模的葡聚糖活化步骤可较大量地用于接下来共轭 DxHb 的工业设施。

### a) 小规模活化

将溶于 3 mL 乙腈的 0.3 g 溴化氰(CNBr) (Riedel-de Haen) 加入到 95 mL 的 2%葡聚糖(平均 MW 20kD, Pharmacia), 并进行 5 分钟的活化。活化期间, 通过连续加入 1 M NaOH 将 pH 保持在 10.8。之后, 用 2 M HCl 将其降至 2.0-2.5。然后, 将 2mL 二氨基乙烷(Sigma) 与附加的 HCl 一起加入以防止 pH 超过 9.5。在 4℃下搅拌过夜之后, 将混合物相对蒸馏水充分透析。优选通过用茚三酮法测定透析液证实透析结束。因此获得氨基乙基氨基-葡聚糖。然后将固体  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  加入混合物中至浓度为 0.1 M 和 pH 7.0, 并在 2 小时内加入 3 mL 的溴代乙酰溴(Fluka), 在剧烈搅拌下结束并通过加入 1 M NaOH 将 pH 保持在 7.0。然后将混合物再次相对蒸馏水透析。优选通过用硝酸银溶液测定透析液证实透析结束。透析之后, 将产物 N-溴乙酰基-氨基乙基氨基-葡聚糖(DxBr) 冷冻干燥并贮藏在冰箱中, 备用。

### b) 中试规模活化

将 28 g CNBr (Riedel-de Haen) 溶于 50 mL 乙腈中, 然后加入到 4.0 L 的 3.5%葡聚糖 (Pharmacia) 中。通过持续 5-10 分钟连续加入 6 M NaOH(约 50 mL) 将溶液的 pH 保持在 10.8。之后, 加入约 50 mL 的 6 N HCl 将 pH 降至约 2.0。然后, 将 210 mL 二氨基乙烷(Sigma) 与 6 N HCl (约 500 mL) 一起加入以保持 pH 低于 9.5。在 4℃下搅拌过夜之后, 用 Millipore Pellicon Cassette Filter Acrylic Holder 和 3 个叠卡 PTGC 0005 盒(Millipore) 以约 8 L/min 的流速将混合物相对 40 L 蒸馏水充分透析。使用带有易装卸泵头(7529-80 型, MasterFlex) 的 Cole-Parmer 蠕动泵(7549-40 型) 保持葡聚糖溶液循环。循环体积保持在 3-4 L。为了监控透析结束, 然后将滤液经受如下所述的茚三酮试验。

接下来, 在剧烈搅拌下 2 小时内慢慢加入 180 mL 溴代-乙酰溴(Fluka), 这期间通过加入 6 M NaOH 将溶液保持在中性 pH。然后,

用 Pellicon 盒相对蒸馏水(约 50 L)将混合物充分透析。通过使滤液经受如下所述的硝酸银试验证实透析结束。将活化的溴代葡聚糖冷冻干燥并贮藏在 $-20^{\circ}\text{C}$ 。

### c) 茛三酮试验

首先, 如前面 Moore, S. 和 Stein, W.H. (J. Biol. Chem., 1948, 176:367-388; 加入本文作为参考)所述的制备茛三酮溶液。简言之, 通过将 1.0 L 的 4.0 M 醋酸钠 pH 5.5 与 3.0 L 乙二醇一甲酯 (Sigma) 混合制备茛三酮溶液。混合物用氮气冒泡 1 小时。然后, 加入 80 g 茛三酮 (Sigma) 和 7.5 mL 的 21% 三氯化钛溶液 (Sigma)。将该茛三酮溶液保持在氮气下。

为了进行试验, 将 1.0 mL 茛三酮溶液与 1.0 mL DxBr 溶液混合并使混合物在  $100^{\circ}\text{C}$  下反应 15 分钟。可以通过加入 2.0 mL 的 50% 乙醇稳定的蓝色显示阳性结果。在 570 nm 下分光光度地获得定量分析。使用乙胺校准。将导致无色溶液的氨基的缺少显示反应彻底。

可以进行较简单的茛三酮试验以获得定量结果, 其中将 1.0 g 茛三酮 (Sigma) 溶于 50 mL 蒸馏水中。将一半 mL 的该茛三酮溶液与等体积的 DxBr 溶液混合。如果存在任何残余氨基, 那么混合物将变为黄色。

### d) 硝酸银试验

使用硝酸银 ( $\text{AgNO}_3$ ) (Nalcalai Tesque) 溶液进行该试验。首先通过碱水解释放溴基。向每个 0.5 mL DxBr 样品中加入 3 滴 1 M NaOH 并将溶液于  $37^{\circ}\text{C}$  下培养 30 分钟。接着, 加入 3 滴浓硝酸, 之后加入另 3 滴 1%  $\text{AgNO}_3$ 。如果存在溴离子, 将获得溴化银白色沉淀, 并且溶液将变为乳白色。在上述实际试验中, 没有白色沉淀, 说明在 DxBr 溶液中没有溴基。

## 实施例 3: 葡聚糖-血红蛋白共轭物的制备

根据本发明, 优选通过将 16.7 g 的 DxBr 溶于 5 L (0.33% DxBr) 的 1% 无基质的血红蛋白溶液中进行该共轭反应。加入碳酸氢钠缓冲液至最终浓度为 0.1 M 并用 1M NaOH 将其 pH 调整至 9.5。首先将溶液混合物通过 0.22 $\mu$ m 过滤器(Millipore)杀菌, 搅拌并使该偶联反应在 4 $^{\circ}$ C 下进行高达 16 小时。加入 16mM  $\beta$ -巯基丙酸(Sigma, 用 NaOH 将 pH 调整至 0.5) 以与任何残余溴基反应并使偶联反应停止。将溶液相对 10 mM 磷酸盐缓冲液 pH 7.4 经受透析, 60 分钟之后清除任何残余反应物如 $\beta$ -巯基丙酸、溴基等。将常规透析袋用于小试验管规模, 而将 10 kD 过滤器盒(UFP-10-E-9A, A/G Technol.)用于中试规模的透析。

#### 实施例 4: 分子量测定: 过滤柱的校准

使用凝胶过滤色谱法测定本发明的 DxHb 制品的分子量的优选步骤概括在 Technical Bulletin No. GF-3, Sigma Chemical Company, 1987 年 10 月。使用 Superdex™ 200, 26/600 凝胶过滤柱(Pharmacia)。在测定本发明的 DxHb 共轭物的 MW 之前柱用标准蛋白质校准。所用标准蛋白质如下: 细胞色素 c (MW 12.4kD)、碳酸酐酶 (MW 29kD)、白蛋白 (MW 66kD)、醇脱氢酶 (MW 150kD)、 $\beta$ -淀粉酶 (MW 200kD)、铁蛋白 (MW 440kD)。校准曲线示于图 2, 其中就每一蛋白质标准将分子量相对  $V_e/V_o$  绘图。由于每一馏份可以含有不同 MW 值的 DxHb, 因此测定每一馏份的平均分子量。

#### 实施例 5: 在豚鼠内开发出血模型

##### 方法

将 6 个正常、健康的豚鼠用于出血条件的优化从而开发有用的出血模型, 进而研究对存活的影响和向组织输送氧的评价。在试验之前将豚鼠圈养至少 1 周。随欲望供应食物和水。

用腹膜内 (i. p.) 注射戊巴比妥将这些动物麻醉, 由于已知豚鼠具有较窄的呼吸道因此避免用醚。将颈静脉和颈动脉插套管灌注对照或

试验溶液并且用分别与电子放大器和 10mV 记录器连接的压强传感器测定血压。持续头 10 分钟以 30%、50%、70%、90%和 100%的最大出血使动物流血，然后以约 0.2-0.5ml 的较小体积保持血压较低。如下计算流出的血液体积：

$$\text{血液总体积 (TBV)} = \text{体重 (g)} \times 8\%$$

$$\text{最大流血 (MBO)} = \text{TBV} \times 60\%$$

$$\text{10-分钟流血 (10BO)} = \text{MBO} \times \text{不同百分比}$$

放血并保持约 25 mmHg 的低血压持续 90 分钟之后，抽取 0.2ml 血液用血清乳酸酯试剂盒 (Sigma) 测定乳酸酯。Sigma 诊断试剂盒上所述的步骤如下。简言之，将血液与等体积的 TCA 溶液混合，静置几分钟之后离心。将上清液贮藏用于后面的乳酸酯试验。将血管包扎，并将伤口用氨苄青霉素冲洗并缝合。然后监控动物并记录存活和体重数据。生活超过 7 天的动物分为“存活者”。

## 结果与讨论

获得以下存活结果和 90-分钟血液乳酸酯水平：

10BO (% MBO)	>7-天 存活 (%)	90-分钟血清 乳酸酯 (mg/dl)	标准误差
0	100	6.2	1.3
30	83.3	32.2	10.0
50	58.3	44.8	26.4
70	27.3	62.1	16.3
90	8.3	77.5	26.3
100	0.0	115.1	32.5

图 4 和 5 描述了 10-分钟流血体积对血容量减少性休克动物的长期存活的影响以及存活结果与 90-分钟乳酸酯水平之间的关系。一般说来，出血越快，乳酸酯水平越高，暗示动物厌氧呼吸并且动物处于血容量减少性休克的状态。而且，乳酸酯水平越高，长期存活越低。

试验之后存活者可以存活超过 2 个月并且观察到重量渐渐增加。相反，如果动物没有恢复，将连续失重并且最终在头几天内死掉。

### 实施例 6: 豚鼠在其它致命出血之后用葡聚糖-血红蛋白溶液复生

#### 方法

将体重为 350-550 g 的可商购获得的豚鼠绝食过夜(16 小时)，然后用戊巴比妥(Sigma)通过腹膜内注射麻醉。通过后趾收缩反应评价麻醉量并通过进一步给予戊巴比妥注射连续保持足够的反应。将颈动脉插套管放血并用与电子放大器和 10mV 图表记录器相连的压强传感器测定动脉血压。将颈静脉插套管以灌注液体。

在头 10 分钟内通过颈动脉放血与 70%的 MBO 相当的体积，这期间血压从 85mmHg 变为 30 mmHg。接着，在以下的 80 分钟内偶尔放血 0.2-0.5ml 以保持血压在 25-30mmHg。在 90 分钟时，在 60 分钟内在肾透析液中注入放血体积的对照缓冲液、血红蛋白(Hb)或分馏的葡聚糖-血红蛋白(Dx-Hb)。由于在试验期间放血技术不一致可能使乳酸酯水平太低或者过高，因此仅包括 90-分钟乳酸酯水平在 50-90 mg/dl 之间的那些。

#### 结果和讨论

试验溶液	n	存活%
肾透析液(KDF)	7	75.0
KDF 中 5% Hb(#29)	6	50.0
5% Dx(ZHB)-Hb >70kD	6	83.3
5% Dx(ZGB)-Hb >70kD	6	66.7
5% Dx(DBB)-Hb >70kD	5	60.0
5% Dx(DBB)-Hb >70kD	6	16.7
KDF 中 5% Dx(DBB)-Hb 70-300kD	9	77.8
KDF 中 5% Dx(DDB2)-Hb 70-500kD	9	100.0

KDF 中 5% Dx (DBB)-Hb 70-500kD	8	87.5
KDF 中 5% Dx (DBB)-Hb 70-750kD	4	50.0
KDF 中 5% Dx (DBB)-Hb 70-1,000kD	9	66.7
KDF 中 5% Dx (DBB)-Hb 70-1,000kD	5	20.0
KDF 中 5% Dx (DDB)-Hb >1,000kD	3	0.0

### 所用 DxHb 共轭物的描述:

	葡聚糖商 标	葡聚糖大 小(MW)	体积	葡聚糖 重量(g)	CNBr 重量	二氨基乙 烷	溴代乙酰溴	产率 (%)
ZGB	Fisons	20,000	5L	120g	24g	180ml	180ml	63%
ZHB	Fisons	20,000	5L	120g	24g	180ml	180ml	100%
DBB	Phamacia	20,000	5L*7	143g*7	28g*7	210ml*7	210ml*7	94%
DDB	Phamacia	20,000	5L*15	66g*15	10g*15	100ml*15	125ml*10	82%
DDB2								75%

DDB2: 由 DDB 用 < 500K A/G 盒获得。

本领域技术人员应理解的是本发明的 DxHb 共轭物可用于各种目的并且可以各种方式使用。主要的是本发明的共轭物可用作血液代用品或血液膨胀剂。例如, 这些 DxHb 共轭物可用作血液代用品以防止出血性休克(在外伤病房)或用于血液透析。

尽管参照一些特定实施方式描述了本发明, 但是在不背离本发明精神和其附加权利要求书所概括的范围的情况下, 其各种改变对本领域的技术人员来说将是显而易见的。

### 参考文献

以下列出了上面讨论的一些参考文献。将以下内容通过引用加入本文。

1) Chien, S., and K-M. Jan. (1973) Ultrastructural basis of the mechanism of rouleaux formation. *Microvasc. Res.* 5:155-166.

2) Chien, S., S. A. Luse, K-M. Jan, S. Usami. L. H. Miller. and H. Fremont. (1971) Effects of macromolecules on the rheology and ultrastructure of red cell suspensions. *6th Europ. Conf Microcirc.* pp. 29-34.

3) Dintenfass, L. eds. (1985) Blood viscosity, hyperviscosity & hyperviscosaemia. Boston: MTP Press, pp. 45-112.

4) Dintenfass, L. eds. (1981) Hyperviscosity in Hypertension. Sydney: Pergamon Press, pp. 1-40.

5) Fabry, T. L. (1987) Mechanism of erythrocyte aggregation and sedimentation. *Blood* 70:1572-1576.

6) Izumida, Y., A. Seiyama, and N. Maeda. (1991) erythrocyte aggregation: Bridging by macromolecules and electrostatic repulsion by sialic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 1067:221-226.

7) Jan, K-M. (1979) Red cell interactions in macromolecular suspension. *Biorheology* 16:137-148.

8) Tam, S-C., J. Blumenstein, and J. T. Wong. (1978) Blood replacement in dogs by dextran-hemoglobin. *Can. J.*

---

*Biochem.* 56:981-984.

9) Tam, S-C., J. Blumenstein, and J. T. Wong. (1976) Soluble dextran-hemoglobin complex as a potential blood substitute. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:2128-2131.

10) Tsai, S. P., and J. T. Wong. (1996) Enhancement of erythrocyte sedimentation by polymerized hemoglobin. *Artif. Cells Blood substitutes Immobilization Biotechol.* 24:513-523.

11) Wong, J. T. (1988) Rightshifted dextran-hemoglobin as blood substitute.

*Biomater. Artif. Cells Artif. Organs* 16:237-245.

图1

附录I DxHb的ESR和EXC的大小依赖性

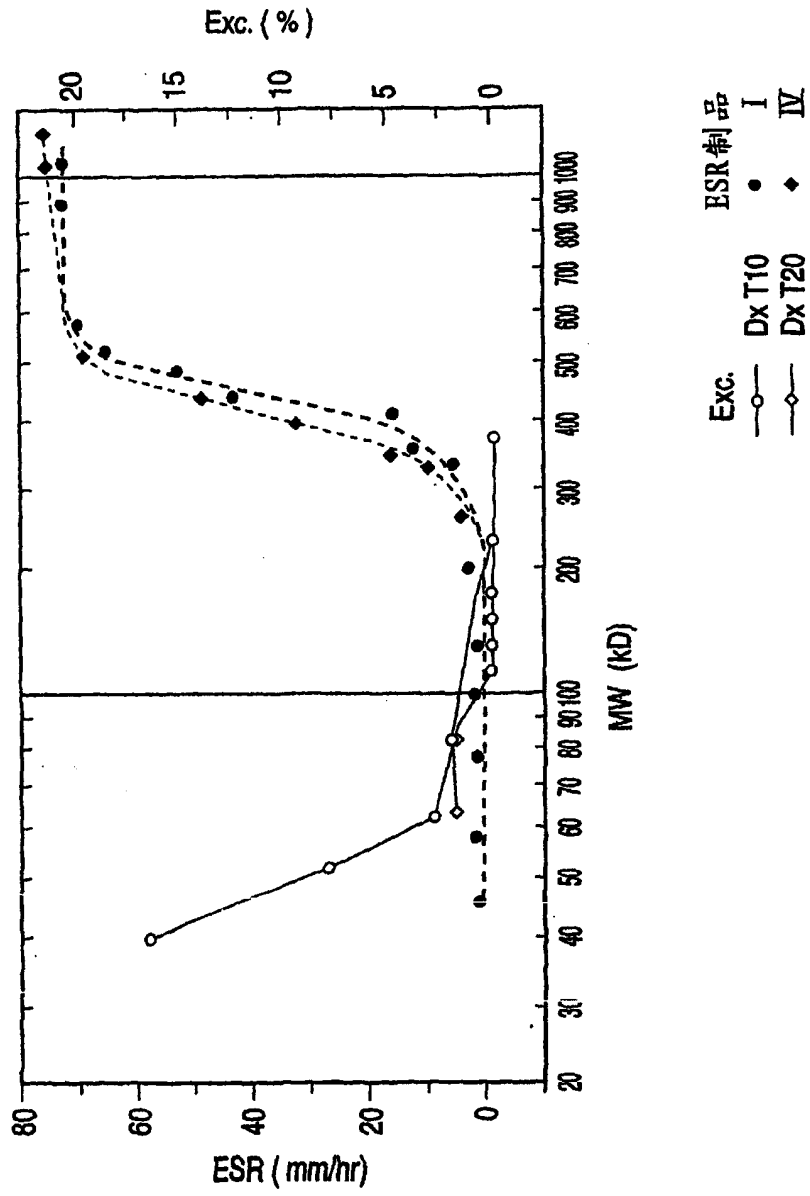


图2

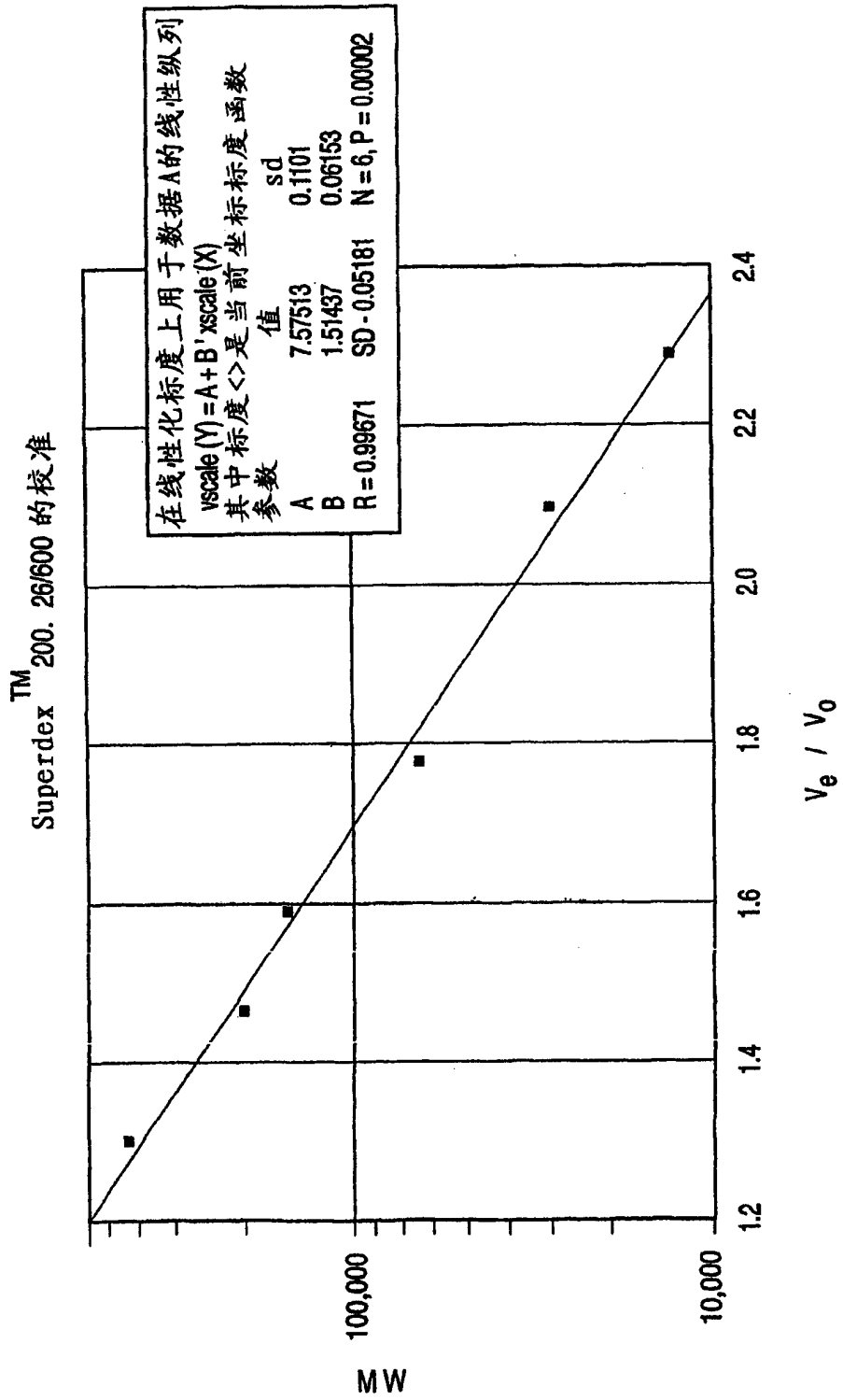


图3

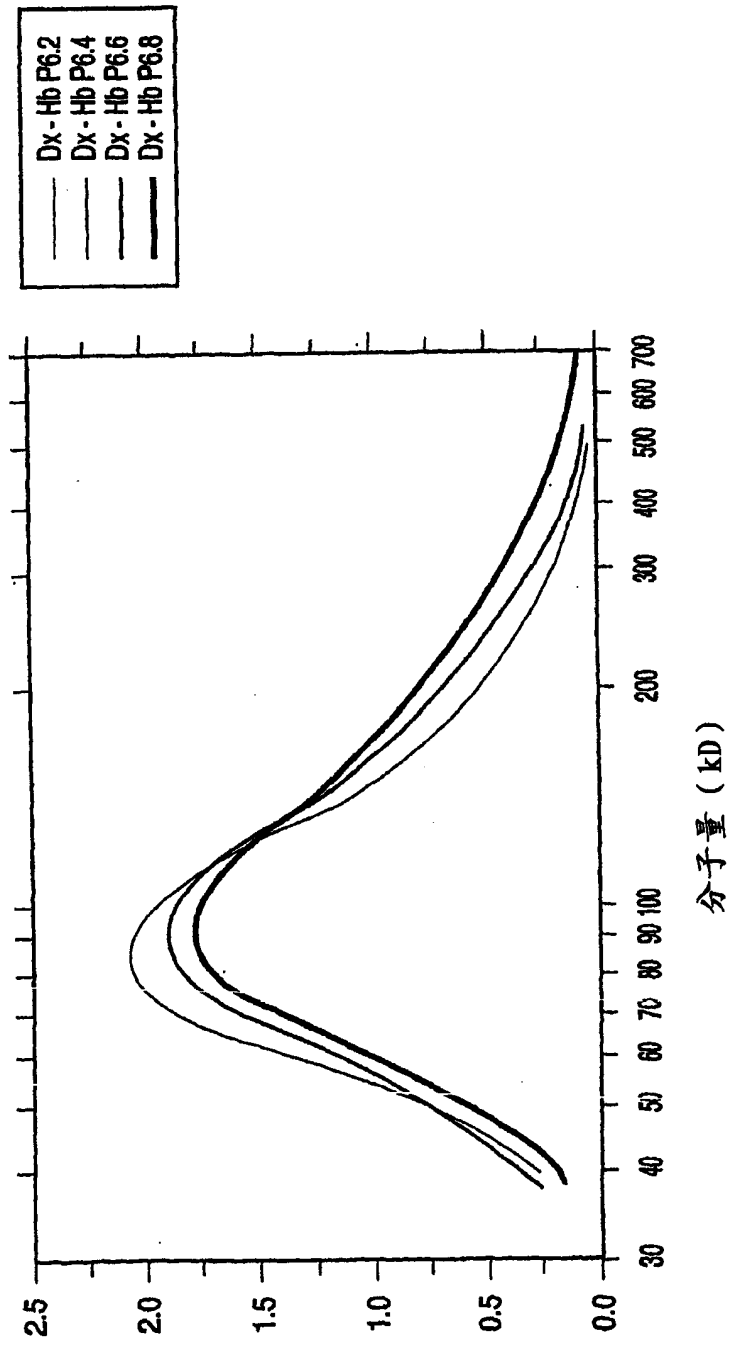


图4

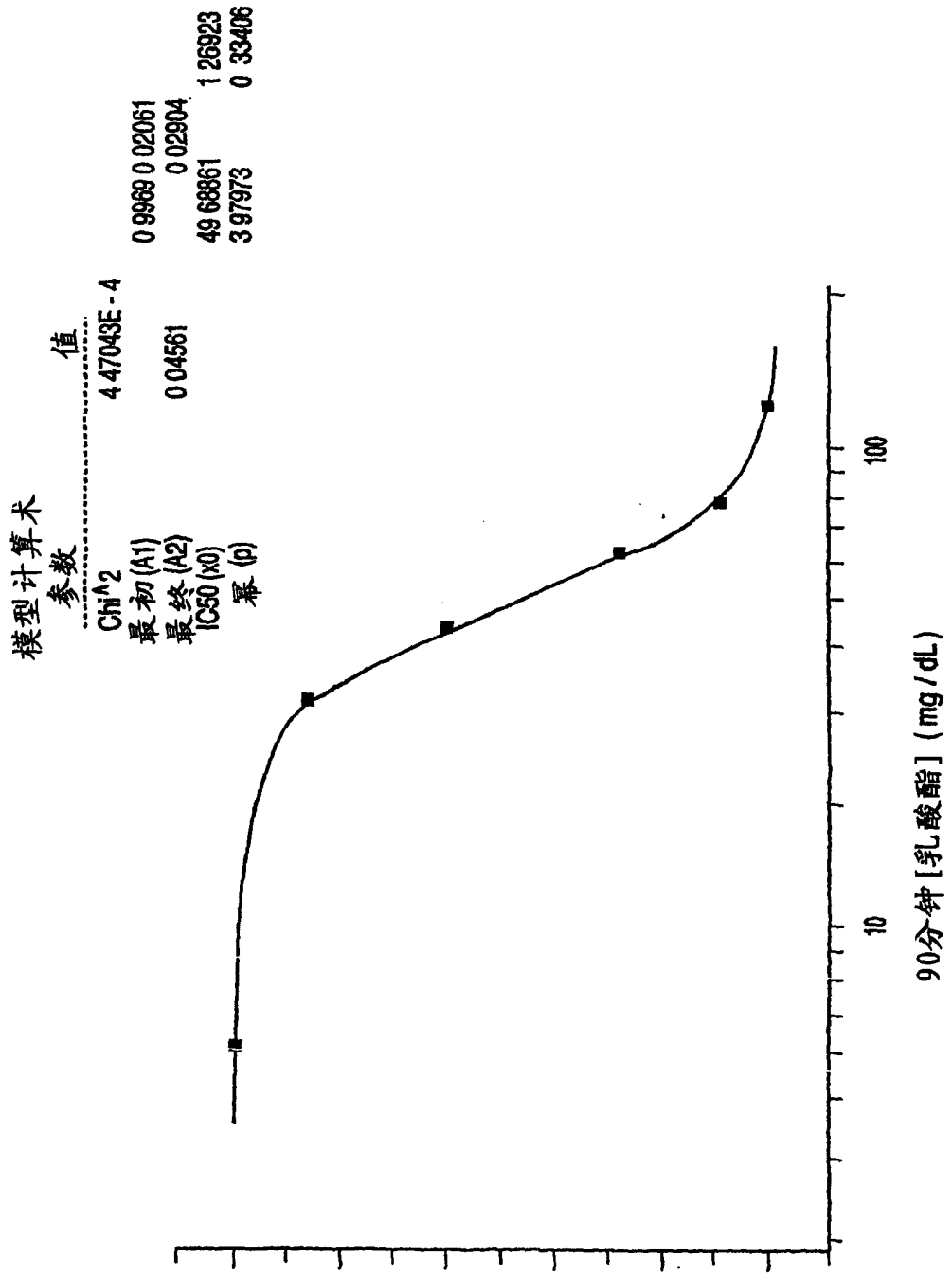


图5

