



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102625710 A

(43) 申请公布日 2012. 08. 01

(21) 申请号 201080048249. X

(22) 申请日 2010. 08. 24

(30) 优先权数据

61/236, 810 2009. 08. 25 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 04. 25

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/046417 2010. 08. 24

(87) PCT申请的公布数据

W02011/025755 EN 2011. 03. 03

(71) 申请人 艾格尼丝·奥斯塔芬

地址 美国犹他州

申请人 希罗希·密苏卡米

(72) 发明人 艾格尼丝·奥斯塔芬

希罗希·密苏卡米

(74) 专利代理机构 北京市立方律师事务所

11330

代理人 陈增新

(51) Int. Cl.

A61K 38/16 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 14 页 附图 5 页

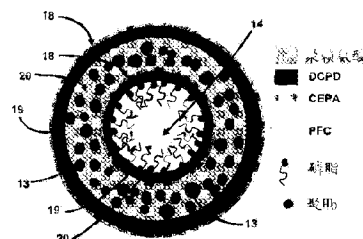
按照条约第19条修改的权利要求书 2 页

(54) 发明名称

携氧的抗湍流的高密度亚微米颗粒的合成

(57) 摘要

一种用于身体的人工氧载体 (AOC)。第一透气的壳包封携氧剂。第一壳具有围绕其的第二携氧剂,且存在包封第二试剂的第二透气壳。同心的壳不经受湍流破碎,或化学分解,不释放试剂。



包封有携氧剂且具有DCPD/CEPA涂层的外壳的抗湍流的高密度亚微米颗粒 (AOC) 的图

1. 一种用于替代人血液的粒状人工氧载体,所述粒状人工氧载体包括:
乳化材料的纳米颗粒,并且所述材料可以以与血液相似的方式携带氧和二氧化碳;
第一壳,其围绕乳化的纳米颗粒形成,所述第一壳稳定所述纳米颗粒;以及
第一涂层,其围绕所述乳化的纳米颗粒的所述第一壳,所述第一涂层终止所述第一壳的连续形成;

其中具有第一壳的所述纳米颗粒具有比血液中的任意组分更高的密度,并且其中所述第一壳允许所述乳化的纳米颗粒在闭合回路循环体系中的血液内连续地循环,而不破碎并且不会将在所述第一壳内的所述乳化的材料释放到血液中。

2. 如权利要求 1 所述的粒状人工氧载体,其中所述第一壳由磷酸钙制成。

3. 如权利要求 2 所述的粒状人工氧载体,其中在所述第一壳内的所述乳化的纳米颗粒为全氟化碳或多聚血红蛋白。

4. 如权利要求 1 所述的粒状人工氧载体,其还包括:
材料的新层,其可以以与血液相似的方式在所述第一壳的外部上携带氧和二氧化碳;
第二壳,其围绕所述第一壳的外部上的新层生成,形成围绕其的第二壳以保护所述材料的新层;以及

第二涂层,其围绕所述第二壳,所述第二涂层终止所述第二壳的连续形成。

5. 如权利要求 4 所述的粒状人工氧载体,其中所述第二壳由磷酸钙制成。

6. 如权利要求 5 所述的粒状人工氧载体,其中所述材料的新层包括在聚赖氨酸中的多聚血红蛋白。

7. 如权利要求 1 所述的粒状人工氧载体,其中使用卵磷脂乳化在所述第一壳内的材料的纳米颗粒材料。

8. 如权利要求 4 所述的粒状人工氧载体,其中使用卵磷脂乳化在所述第一壳和第一涂层的外部上的所述材料的新层。

9. 如权利要求 4 所述的粒状人工氧载体,其中所述粒状人工氧载体是亚微米尺寸的。

10. 制备用于替代人血液的粒状人工氧载体的方法,所述方法包括以下步骤:

乳化可以以与血液相似的方式携带氧和二氧化碳的第一材料;

使乳化的材料形成纳米颗粒;以及

用第二材料包覆所述纳米颗粒,以围绕所述纳米颗粒形成第一壳,所述第一壳可透过氧气和二氧化碳;

其中具有第一壳的所述纳米颗粒具有比血液中的任意组分更高的密度,并且其中所述第一壳允许所述乳化的纳米颗粒在闭合回路循环体系中的血液内连续地循环,而不破碎并且不会将在所述第一壳内的所述乳化的材料释放到血液中。

11. 根据权利要求 10 所述的制备用于替代人血液的粒状人工氧载体的方法,还包括用第三材料包覆所述第一壳以终止所述第一壳的生长的步骤。

12. 根据权利要求 10 所述的制备用于替代人血液的粒状人工氧载体的方法,还包括以下步骤:

形成可以以与血液相似的方式在所述第一壳和第一材料涂层的外部上携带氧和二氧化碳的材料的新层;以及

用第二壳包覆所述材料的新层,以保护所述材料的新层。

13. 根据权利要求 12 所述的制备用于替代人血液的粒状人工氧载体的方法,其中所述材料的新层是可以以与血液相似的方式携带氧和二氧化碳的在聚赖氨酸中的多聚血红蛋白。

14. 根据权利要求 12 所述的制备用于替代人血液的粒状人工氧载体的方法,还包括用材料包覆所述第二壳的外部以终止所述第二壳的生长的步骤。

15. 根据权利要求 10 所述的制备用于替代人血液的粒状人工氧载体的方法,其中包覆所述纳米颗粒以形成所述第一壳的材料是磷酸钙。

16. 根据权利要求 10 所述的制备用于替代人血液的粒状人工氧载体的方法,还包括在使所述乳化的材料形成小的颗粒之前,用卵磷脂乳化携氧第一材料的步骤。

17. 根据权利要求 11 所述的制备用于替代人血液的粒状人工氧载体的方法,且其中用第二材料包覆所述第一壳以终止所述第一壳的生长的步骤包括在适当的时间下用羧乙基膦酸包覆所述第一壳以终止所述第一壳的生长的步骤。

18. 根据权利要求 13 所述的制备用于替代人血液的粒状人工氧载体的方法,还包括在使所述乳化的材料形成小的颗粒之前,用卵磷脂乳化携氧第一材料的步骤。

19. 制备用于携带化学剂例如药物和成像示踪剂通过在人体内流动的血液的粒状载体的方法,所述方法包括以下步骤:

乳化所述化学剂;

使乳化的化学剂形成纳米颗粒;以及

用材料包覆所述纳米颗粒,以围绕所述纳米颗粒形成第一壳,所述第一壳是可渗透的,以允许所述化学剂以受控的方式离开所述粒状载体;

其中具有第一壳的所述纳米颗粒是足够稳定的,使得它们允许所述乳化的颗粒在人血液中连续地循环,而不破碎且不会将所述第一壳内的所述乳化的化学材料释放到血液中。

20. 根据权利要求 19 所述的制备用于携带化学剂通过在人体内流动的血液的粒状载体的方法,还包括以下步骤:

形成可以在所述第一壳的外部上携带所述化学剂的材料的新层;以及

用材料包覆所述材料的新层,以围绕所述材料的新层形成第二壳,从而保护其免于以不受控的方式释放到血液中。

携氧的抗湍流的高密度亚微米颗粒的合成

[0001] 本申请依据美国法典第 35 章第 119(e) 条要求 2009 年 8 月 25 日提交的第 61/236,810 号美国临时申请的优先权。

技术领域

[0002] 本发明涉及包封的载体活性物质,例如全氟化碳和多聚血红蛋白,其用作血液或其它液体中的可移除的人工氧载体和 / 或治疗剂和诊断剂的可移除的载体。

背景技术

[0003] 在现有技术中,存在宽范围的意图受控地将生物活性物质递送到身体内的粒状载体。它们的尺寸从微米变化至亚微米,并且它们的组成范围为有机物(例如聚合物、脂质、表面活性剂、蛋白质)至无机物(磷酸钙、硅酸盐、CdSe、CdS、ZnSe、金以及其它)。这些粒状载体中的每种设计成携带化学或生物化学反应的物质,并且随时间或在特定的位置或在这两种情况下释放该反应性物质。

[0004] 用于用特定组分合成这种粒状载体的方法范围为液相自装配、聚集、沉淀或这些合成方法的组合。单个粒状载体的尺寸和它们的有效负荷能力由在合成中使用的材料的量、组分装配的形态和组分的特定组成来控制。合成的粒状载体具有能够溶解或能够结合到意图被最终递送的化学或生物化学反应的物质的双重功能。潜在假定是包封的反应性物质将最终被释放,使得它们可进行其预期功能。粒状载体自身通常不参与释放功能,除了在一定程度上它们调节它们所携带的反应性物质的释放时间或位置,并且载体组分必须随时间分解或保持为不造成任何伤害的非活性和非毒性物质。

[0005] 在医学领域,这些粒状载体已用于将药物递送大身体内的特定位置并且用作人造血液产品中的人工氧载体(AOC)。人造血液是被制备成用作替代红细胞的产品,其将氧气和二氧化碳输送到身体内。然而,红细胞的功能是复杂的,并且人造血液的形成通常仅集中在满足特定的功能,气体交换—氧和二氧化碳。

[0006] 相比之下,全血可实现 AOC 不可复制的许多不同的功能。可与自体血混合的人造血液可在手术之间支持病人,以及在医疗保健、血液捐献和储存设施有限,或由于筛选步骤非常昂贵而具有暴露于疾病的高风险的新兴国家,支持供血服务。不依赖于交叉配血和血型测定的血液代用品将意味着血液供应没有延迟,且可能意味着病人生与死的区别。在现有医疗应用中,来自粒状材料的残余材料预期随时间进行新陈代谢和 / 或被排泄。然而,通过病人的自然新陈代谢来处理粒状载体是极其困难的。

[0007] 虽然在美国供血每年增长了约 2-3%,然而由于老年人口的增多对血液的需求甚至增加地更快,且对血液的需求超过了其捐赠。开发改进的 AOC 的另一动机是尽管对捐赠的血液的筛查显著进步了,但仍存在对有限货架期的担忧,其在 2°C -6°C 下为 42 天。

[0008] 尽管对捐赠的血液的筛查和储存有显著进步,仍存在对捐赠的储存血液的供应、成本和安全的担忧。当对血液进行血液中的危险病原体测试时,当前没有可行的方式来测试新发疾病,例如 Cruetzfeld-Jacob 疾病、天花和 SARS。根据 2000NIH 研究,在全球,每

年输注 10-15 百万单元的血液,而没有测试 HIV 和其它疾病。这对于具有高 HIV 感染人口的地区例如南非尤其如此,在该地区感染 HIV 的人口的百分比可高达 40%。最近的报道 (Koch CG, Li L, Sessler DI 等人., (心脏手术后红细胞储存周期及并发症) Duration of Red-Cell Storage and Complications after Cardiac Surgery, New Eng. J. of Med. 2008; 358:1229-1239) 详述了与使用储存的血液用于心脏直视手术相关联的疾病影响并且强调了对发现用作人造血液的人工氧载体 (AOC) 的紧迫性,作为对捐赠血液供应的可替代物。

[0009] 在现代科学时代,数十年的广泛研究、工业研究的努力、临床试验和花费数十亿美元已导致两种主要种类的 AOC,即乳化的全氟化碳 (PFC) 和聚血红蛋白 (Hb)。虽然这两种类型 AOC,每种具有一些优点,但在美国都还未被批准用于临床。

[0010] 一些基于全氟化碳 (PFC) 的 AOC 是 Oxygent (Alliance Pharmaceutical Corporation, San Diego, CA)、Fluosol-DA-20 (Green Cross, 日本)、Oxyfluor® (Hemagen, Inc., St. Louis, MO)、Oxycyte® (Oxygen Biotherapeutics, Inc. International, Costa Mesa, CA)、Pher-02® (Sanguine Corp, Pasadena, CA) (13)) 和 Liquivent® (Alliance Pharmaceutical, San Diego, CA)。基于血红蛋白或多聚血红蛋白的 AOC 是亚微米尺寸的,并且基于乳化的全氟化碳 AOC 是微米或亚微米尺寸的。任一类型在美国都还未被批准用于临床。

[0011] 化学上和生物上惰性的乳化的无菌全氟化碳 (PFC) 在低温 2-5°C 下储存一年是稳定的。此外,PFC 制备是相对便宜的并且可在无任何生物材料下制备,排除了经由输血传播传染病的可能性。因为它们不溶于水,它们必须与能够将 PFC 的微小液滴悬浮在血液中的乳化剂组合。在体内在乳化剂通过单核细胞/巨噬细胞体系消化后,全氟化碳最终经由肺被排除。另外,PFC 是生物上惰性的材料,其可溶解比血浆多约五十倍的氧,但溶解比红细胞少的氧。例如,如果肺中的氧分压可通过使病人呼入具有约 180mmHg 的氧分压的空气而提高到 120mm Hg,由按体积计 70% 血液和 30% 全氟化碳组成的混合物每 100ml 血液可提供需要的 5ml 氧。

[0012] 与上面描述的基于全氟化碳 (PFC) 的 AOC 的有前途的特征相比,使用这样的基于 PFC 的 AOC 已导致似流感症状、对比正常氧压力高的氧压力的需求、诸如乳化剂毒性、氧自由基的形成、AOC 在组织内长期滞留、对肺组织的伤害、血小板计数减少的问题,以及与血液中来自循环的一氧化氮 (NO) 的损失相关的问题。NO 的损失还是基于血红蛋白的 AOC 的问题。另外,最近的对于 Oxygent (Alliance Pharmaceutical Corporation, San Diego, CA) 的 III 期临床试验已显示与对照相比在治疗病人中风事件上的增加,并且因此已经终止 Oxygent 的临床试验,所述 Oxygent 使用稳定的全氟溴辛烷/全氟癸烷蛋黄磷脂乳液并且具有比 Fluosol-DA-20 (Green Cross, 日本) 大 4-5 倍的携氧能力。

[0013] 全氟化碳 (PFC) 比水溶解更多氧,但仍少于正常血液。为了供应在循环中需要量的氧,病人可能需要供氧。高度疏水性的 PFC 需要乳化剂来稳定血液中的液滴。这些乳化剂与存在于血液中的蛋白质和乳化剂相互作用,导致不稳定性。因为,在循环中不能接受大量的 PFC。小量的 PFC 从血液中逃逸进入肺,在肺中,PFC 蒸发并且被呼出。大量的 PFC 和乳化剂可对肺功能具有不利影响。

[0014] 与在前面段落中描述的基于全氟化碳的 AOC 相比,基于交联的聚合的或包封的血红蛋白的人工氧载体 (AOC) 为后来者,但引起了不断增加的关注,因为它们运输氧的特性

与红细胞（在下面称为 RBC）的运输氧的特性相似。一些基于血红蛋白的 AOC 是 Hemolink、Hemosol、Optro 和 Hemospan、Polyheme (Northfield, USA)、和 Hemopure (Biopure Corp., USA), 这些中的一些处于开发晚期并且在非洲和欧洲已通过 III 期临床试验。然而, 存在潜在的动物传播疾病, 血红蛋白从动物中获得并且被纯化, 但高生产成本已减慢了发展。诸如由于肝脏内的局部酶消化产生的铁超载的其它副作用是否将与基于这些血红蛋白的 AOC 一样出现仍是未知的。

[0015] 聚合血红蛋白 (pHb) 使用与红细胞 (RBC) 的结合机理更相似的结合机理来结合 O_2 和 CO_2 , 但在循环中留下的更小量的未聚合 Hb 可变得非常有毒。作为人工氧载体 (AOC), 大量的 pHb 需要注入到人体内。过早分解可增大毒性风险, 并且如此大量会使身体的自然除去过程负担加重。聚合 Hb 仍是昂贵的。其中动物来源的 Hb 冒着转移基于朊病毒的疾病的风险。重组 Hb 是有前景的方法。该方法需要高质量的分离和纯化步骤, 这会增加成本。

[0016] 虽然基于聚合血红蛋白 (Hb) 和全氟化碳 (PFC) 的 AOC 产品将大量的氧运输到细胞和组织, 它们的副作用, 例如一氧化氮相关的血管收缩、中风、心搏停止、似流感症状和长期的化学毒性, 已迫使在美国终止了所有临床试验。用于降低通过新陈代谢注入到身体内的相对大量的 AOC 的毒性的所有付出的努力已失败。

[0017] 对于安全的人造血液产品的期望的特征列表很长且包括: 肺中充足的氧吸入和运输到组织, 相应地从组织释放氧和除去二氧化碳; 广泛的适用性 (即不需要交叉配血或相容性测试); 无副作用; 对整个生物体无毒性; 合理的循环时间; 非毒性且可排泄而不造成伤害; 不从血液中排除一氧化氮 (NO); 无免疫原性; 易于杀菌以确保无病原体, 例如病毒; 无对普通血液组分的干扰; 在室温下是稳定的且大量制造是便宜的; 长的货架期和在实施时的即时全容量氧输送。

[0018] 因此, 考虑到意图受控地将生物上活性物质运输到身体内的人造血液产品和粒状载体遇到的许多问题, 在本领域存在对具有以下特性的改进的人工氧载体 (AOC) 和粒状载体的需求: (a) 不会意外破碎并且不允许意外释放以未经调节的量存在于身体内的可能有毒的活性药用物质, (b) 提供充足的肺的氧吸入和运输到组织并且从组织相应地除去二氧化碳, (c) 对身体无毒, (d) 不从血液中排除一氧化氮, (e) 制造便宜, (f) 在室温和低温下是稳定的, (g) 长的货架期, (h) 无副作用, (i) 不干扰普通血液组分, (j) 具有广泛的适用性, 即不需要交叉配血或相容性测试; (k) 化学上或生物上是惰性的, 使得它们无生物材料, 排除了经由输血传播传染病的可能性, (l) 基于全氟化碳的 AOC, 其不具有现有技术先前遇到的问题, 和 (m) 不必测试疾病。

[0019] 发明概述

[0020] 在前面段落中描述的现有技术中存在的需求通过本发明得以满足。为满足上面列出的现有技术的需求, 本发明的独特的特征是: (1) 粒状人工氧载体 (AOC), 其由以下性质的有机组分和无机组分的独特组合制成: 有机组分和无机组分的理化性质允许用作 AOC, 同时使用密度梯度的连续流动离心分离可从全血中回收, (2) AOC, 其合成可通过间歇法或连续方法来进行, 和 (3) 基于密度梯度分离的专用离心转子, 以完成从血液或其它生物流体中除去的任务。另外, 只要其医学目的实现便从病人系统中移除 AOC, 以便减轻已缺乏抵抗力的病人的生理应力。

[0021] 粒状人工氧载体被设计成在闭合回路流体循环体系中连续地循环, 不经受湍流破

碎、化学分解或碎片的积累,并且不释放其有效负荷,但能够进行小的离子和气体的交换,并且粒状人工氧载体可在所期望的任何时间使用采用密度梯度离心分离的连续流动分离被回收,而不会遭受破坏,或对可能已存在于流动流体中的其它材料造成破坏,密度梯度离心分离可通过磁场、亲和过滤或其它方法加以补充。

[0022] 本发明的其它应用包括从循环血液中除去和浓缩转移性癌细胞,回收低复制 (low copy) 哺乳动物细胞、细菌细胞或病毒细胞和组织器官成像。根据应用,依据这些材料的尺寸和组成这些材料的特定设计需求可变化,但对于它们全部的共同点是先前概述的性质,和使用在前面段落中列出的方法从循环流体中连续回收的定制能力。

[0023] 在本发明的 AOC 中使用的微粒的其它特征包括:(1) 由足够大以保持循环的尺寸制成的微粒(即大于 50nm 和小于 2 μ m), (2) 设计成在湍流条件下抵抗机械破碎的微粒, (3) 设计成避免粘附到血球和血蛋白的微粒, (4) 不会不利地影响现有的血液组分的生理功能的微粒, (5) 抵抗吞噬作用的颗粒, (6) 具有低毒性的微粒, (7) 避免血管堵塞的颗粒,和 (8) 能够携带药物、光学示踪物、X 射线示踪物、射线照相示踪物或 MRI 成像示踪物和移动化学传感器的微粒。

[0024] 现有的人工氧载体 (AOC) 产品可能满足作为 AOC 在体内使用时上面列出的标准中的一个或多个,但它们未被设计具有如本发明可实现的使用离心分离从血流中可连续回收的能力。

[0025] 为帮助实现 AOC 的上述目的,本发明涉及合成这样的载体颗粒:被设计成在闭合回路流体循环体系(例如人体的血流中)中连续循环,不经受湍流破碎、化学分解、碎片的积累,不释放其有效负荷,但能够进行小的离子和气体的交换,并且可在任何所期望的时间被回收。为从血样中除去载体颗粒,可使用以下连续流动分离方法中的一种或多种:(a) 离心分离, (b) 磁场,和 / 或 (c) 亲和过滤,而不会遭受破坏,或对可能已存在于流动流体中的其它材料造成破坏。设想的是,在 AOC 已执行它们的功能之后但在同时发生的 AOC 降解和副作用形成之前,尽可能快地从血流中除去 AOC。

[0026] 在本发明的两个实施方式中,合成了可移除的人工氧载体 (AOC),其具有单壳和双壳以产生微米或亚微米尺寸的微粒 / 颗粒,微粒 / 颗粒包封气体吸收物质,例如全氟化碳 (PFC) 或多聚血红蛋白 (PolyHB, 聚 HB)。简要而言,用于制备基于包覆的 PFC 的载体颗粒的合成方法需要:(a) 形成稳定的、抗湍流的 PFC 乳液, (b) 逐层合成多聚血红蛋白,和 (c) 形成一个或两个壳,以保护载体颗粒。这些颗粒还可用作血液或其它液体中的治疗剂或诊断剂的载体。使用间歇或连续流动合成方法实现包封。壳有助于抵抗在湍流条件下的机械破碎,避免粘附到血球,它们不会不利地影响现有的血液组分的正常的生理功能,它们抵抗吞噬作用,具有低毒性,且它们避免血管堵塞。新壳阻止将 PFC 释放到 AOC 内,但允许气体和小的离子在血液和包封的 PFC 之间交换。

[0027] 存在两种方法来制备用于单壳 AOC 的稳定的、抗湍流的、可回收的 PFC 纳米乳。第一种方法使用几种表面活性剂、油介体和其它添加剂的复合混合物,或使用专门设计的氟化的烷基末端磷脂酰胆碱型表面活性剂。第二种方法使用基于离子型碳氢化合物的表面活性剂(例如磷脂酸)以稳定纳米乳并且是优选的方法,其将在下面更详细描述。

[0028] 为了满足对于在上面描述的本发明的 AOC 颗粒在它们的使用期间从血液中可回收性的标准,粒状材料必须是填充有高密度全氟化碳液体的亚微米尺寸 (50nm-700nm) 的

空心颗粒。这些颗粒被一个或两个刚性的增强壳环绕。这些微粒壳的外表面包覆有含有暴露官能团 (COOH、NH₂、SH 等) 的分子, 这些暴露官能团对于交联多于一种的颗粒或蛋白质状抗体、细胞受体靶标、多聚血红蛋白、血红蛋白等是便利的。

[0029] 更具体地, 作为合成作为 AOC 的这种亚微米尺寸的单壳包覆的 PFC 颗粒, 在室温下用 1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸酯 (DOPA) 或具有比红细胞更高密度的等效脂质乳化全氟化碳, 例如全氟溴辛烷或全氟萘烷。在详述中描述了除了 DOPA 外的乳化剂。使用挤出机在 20-90°C 范围内的温度通过挤出膜数次挤出全氟化碳和乳化剂。然后用磷酸钙的 5-20nm 厚的壳包覆通过挤出过程产生的亚微米结构, 并且与稍微过量的羧乙基膦酸 (CEPA) 混合, 羧乙基膦酸羧化颗粒表面, 终止颗粒在生理 pH 下的进一步生长并且抑制颗粒在生理 pH 下的自聚集。离心浓缩材料, 并且用磷酸盐缓冲液透析最终产物并且通过热压处理进行灭菌, 而对包覆的颗粒无任何破坏。

[0030] 用于制备单壳包覆的乳化颗粒的可变的方式是供给良好混合的流中的磷酸盐缓冲的全氟化碳 (PFC) 或血红蛋白 (HB) 乳液通过含有适当 pH 的固定浓度的无菌氯化钙溶液的反应器。当在反应器中, 混合物中的钙和磷酸盐围绕乳化颗粒成核形成增强层, 且悬浮液将进入旋篮式反应器或终缩聚反应器中, 在反应器中, 添加少量的 CEPA 18 (足以覆盖在此体积中可得到的颗粒的表面积), 并且浓缩所得到的混合物并且收集。

[0031] 本发明的单壳包覆的乳化颗粒 (AOC) 具有比血液中的其它组分例如红细胞、白细胞和血浆更高的密度。因此, 可利用离心力来从其它血液组分中分离颗粒, 但使用密度梯度, 而不是如现有技术中的沉降速率。在现有技术中, 红细胞是在离心力场中移动最远的颗粒, 但根据本发明, 新的 AOC 是在离心力场中移动最远的颗粒。由于 AOC 为离心力场中移动最远的颗粒, 可将它们与所有其它血液组分分离。

[0032] 本发明的用作人工氧载体的单壳包覆的 PFC 颗粒通常被添加到人的血液中并且它们与血流一起循环, 从而以与血液相似的方式来交换氧和二氧化碳。

[0033] 本发明的第二实施方式是双核氧载体 (DCOC), 其被合成为具有双壳, 以产生包封活性物质 (例如全氟化碳 (PFC) 和多聚血红蛋白 (PolyHb, 聚 Hb)) 的微粒或亚微米尺寸的微粒。简要而言, 用于制备基于包覆的 PFC 的氧载体的合成方法需要: (a) 形成稳定的、抗湍流的 PFC 乳液 (b) 逐层合成多聚血红蛋白, 和 (c) 形成用于保护载体颗粒的壳。

[0034] 更具体地, 将 DOPA 与 PFC 混合并且挤出通过选定直径的多孔膜, 以形成具有亚微米尺寸的小颗粒的 PFC 乳液。将所得到的乳液悬浮在磷酸盐缓冲液中, 并且缓慢添加 CaCl₂ 溶液, 以在乳化颗粒上形成用于稳定它们的 DCPD 薄层。接着, 用羧乙基膦酸 (CEPA) 羧化第一壳的 DCPD 表面, 以产生阻止乳化颗粒的聚集 / 生长的层。

[0035] 第二壳的厚度可通过 DCPD 壳形成的持续时间来控制。然后通过透析或离心膜过滤除去未反应的试剂。最后的乳化颗粒的密度大于血液的密度并且可通过离心分离被分离。DCOC 颗粒具有与正常血液的氧解离曲线相似的氧解离曲线并且具有用于交换肺和组织中的气体的足够快的渗透性, 即它们以与正常血液相似的方式运输氧和除去二氧化碳。另外, DCOC 颗粒足够强, 以经得起在血液循环期间的正常湍流, 并且具有两种不同种类的氧载体, PFC 和聚 Hb, 预期 DCOC 的毒性比具有单组分 AOC 的毒性小。

[0036] 血液中的 AOC 具有比血液更高的密度并且通过利用较高密度的 AOC 颗粒的连续流动密度梯度离心分离与其分离, 以实现它们的分离。还可使用亲和过滤从血液中分离 AOC

纳米或亚纳米尺寸颗粒。

[0037] 另外,可将顺磁性材料添加到每个纳米颗粒中的较高密度 PFC 中,并且磁化率用于回收聚合血红蛋白。含有顺磁性和反磁性材料的流动液体(天然血液组分)在离心分离期间必须暴露于磁场,以使它们偏离具有顺磁性材料的颗粒的流动方向,远离反磁性颗粒,从而使得可以分离和收集两种类型的颗粒。

附图说明

[0038] 通过结合附图阅读下面的详述,本发明将被更好地理解,其中:

[0039] 图 1 是被优化用于所描述的发明的亚微米尺寸的血液代用品的透射电子显微镜图像;

[0040] 图 2A-C 是显示如何构造单壳 AOC 的横截面图;

[0041] 图 3 是显示不同浓度的全氟化碳血液代用品乳液(AOC)和亚微米尺寸血液代用品的估计的氧含量的曲线,表明每单位重量的携氧材料等同的携氧能力;

[0042] 图 4 示出在一定时间段内本发明的单壳 AOC 颗粒在不同类型溶液中的稳定性;

[0043] 图 5 示出显示本发明的单壳 AOC 颗粒用于不同浓度血红蛋白的估计的氧合速率的三种曲线;

[0044] 图 6 是双壳双核氧载体(DCOC)的横截面图示,双壳双核氧载体包裹 PFC 乳液核,PFC 乳液核包裹有第一壳,在第一壳的外部上是包裹有第二壳的聚 HB;

[0045] 图 7 是显示用于双核 AOC(DCOC)的人的血液、全氟化碳和它们的混合物中的以二氧化碳 CO_2 表示的氧含量对不同氧分压的曲线;

[0046] 图 8 示出表面活化的全氟化碳核和 CaP 壳稳定的人工氧载体的不同构型的四种图示;

[0047] 图 9 是显示用于连续合成稳定的人工氧载体的装配系统的示意图。

[0048] 发明详述

[0049] 现有技术的未包覆的纳米乳颗粒 13 具有许多缺点,例如非常易碎并且它们不期望地允许意外释放活性药用物质,该活性药用物质在身体中以未经调节的剂量存在,可能是有毒的。本发明的包覆的 AOC 纳米乳颗粒 11 不存在这种问题。为满足对于可暂时替代血液的人工氧载体(AOC)的标准,且满足对于 AOC 11 从血液的可回收性的标准,本文描述的 AOC 是根据本发明的具有壳 12 的微粒。AOC 壳 12 必须是围绕高密度全氟化碳(PFC)乳化纳米颗粒的亚微米尺寸(50-1000nm)的空心颗粒。增强壳 12 是刚性的并且由脂质和无机材料(例如磷酸钙、硅酸盐)或生物相容性有机聚合物的组合组成,该生物相容性有机聚合物为例如但不限于:聚己酸内酯、聚乳酸、聚乙醇酸、聚环氧乙烷、脱乙酰壳多糖或软骨素。AOC 纳米乳核颗粒 11 比血液密度大,且可使用特殊的离心,利用该更高的密度从血液中回收它们。

[0050] 图 1 示出 AOC 颗粒 11 的典型电子显微镜图片。这些新的 AOC 颗粒 11 的壳 12 被含有暴露官能团(COOH 、 NH_2 、 SH 等)的分子包覆,这些暴露官能团对于交联多于一种的颗粒或蛋白质状抗体、细胞受体靶标、多聚血红蛋白、血红蛋白等是便利的。外环或壳 12 是透气的磷酸钙或聚合物涂层,而内部是含有血红蛋白(HB)13 纳米颗粒和/或全氟化碳(PFC)14 纳米颗粒的携氧中心。

[0051] 由于基于碳氢化合物的乳化剂在 PFC 中的受限的溶解度、还与在高温下和在消毒期间它们在生物介质中的不稳定性有关的事实,在水中制备全氟化碳 (PFC) 14 纳米乳富有挑战性。为了乳化 PFC,使用 1,2- 二油酰基 -sn- 甘油 -3- 磷酸酯 (DOPA) 或不同链长度和结构的类似磷脂酸、卵磷脂或不同链长度和结构的磷脂酰胆碱、这些的混合物,以及这些与本领域其他人所用的其它添加剂 (包括单链表面活性剂、甘油三酯和部分氟化的化合物) 的混合物。

[0052] 为以高收率在水中形成纳米乳,有两种主要的方法:(a) 使用几种表面活性剂、油介体和其它添加剂的复合混合物;或(b) 使用专门设计的氟化的烷基末端磷脂酰胆碱型表面活性剂。第二种增加了成本和复杂性。另一种方法是使用基于离子型碳氢化合物的表面活性剂,例如磷脂酸。这些乳化剂在过去未被用于制备 PFC 乳液,但存在一些优点。乳化颗粒的高度带负电的头基预计能提高所形成乳液的曲率,结果使更小的纳米尺寸的乳液至少在温和条件下具有更高稳定性。

[0053] 为了改进乳化过程并且实现每批乳液 PFOB 含量的增加,卵磷脂替代 DOPA 或其它乳化剂,作为在 0.334M 磷酸盐缓冲液中的乳化剂。乳化纳米颗粒的增加量可为 5% 至 70%,但已发现对于 AOC 形成最佳的增加量为 ~40vol%。选择该数据,以使 AOC 形成过程便利和稳定。可使用更高浓度的材料,但所得到的更高的粘度引入与混合和挤出有关的问题。另外,卵磷脂比使用 DOPA 明显便宜,且结果是 AOC 和 DCOC 产物明显便宜。发现在水中最佳的乳液具有含有 0.1% 至 0.6% PFOB 的 0.25% 卵磷脂。

[0054] 用于成像、组织氧合和作为治疗措施的许多报道的 PFC 纳米乳使用期短,并且当需要大量的暴露时间或延长的暴露时间时这会导致产生的全身副作用和细胞副作用更糟。我们示出纳米乳颗粒的负电荷的磷酸根头基易于与磷酸钙的层 12 矿化,如在图 2A-2C 中所示,其在机械性和化学性方面被更弹性地增强。这些材料可用于这样的微流体设备、细菌和哺乳动物细胞培养体系和化学反应器中;需要足够且有效的氧化,但用聚乙二醇、交联蛋白质和其它聚合物补充的较弱乳化的全氟化碳 (PFC) 已经实现有限的成功。除了液体 PFC 外,可制备高度挥发性的气态形式的全氟化碳,并且合成在低温下进行,以避免全氟化碳蒸发。

[0055] 合成全氟化碳 AOC 11 颗粒的优选的方法涉及用如上描述的具有比红细胞 (RBC) 中更高密度的 1,2- 二油酰基 -sn- 甘油 -3- 磷酸酯 (DOPA) 或等同的脂质 (Avanti Lipid) 在室温下乳化全氟化碳例如全氟溴辛烷或全氟萘烷或其它合适的 PFC。例如,使用 Thermobarrel LIPEX 挤出机 (Northern Lipids),数次挤出 100ml 批量的全氟化碳和乳化剂的混合物通过 300、400、500、600 或 700nm 孔径的聚碳酸酯挤出膜 (Millipore),以产生乳化颗粒。根据本发明的教导,然后将亚微米尺寸的乳化颗粒 11 用磷酸钙的 5-20nm 厚的壳 12 包覆,并且与略微过量的羧乙基膦酸 (CEPA) 混合,羧乙基膦酸羧化颗粒表面,终止颗粒在生理 pH 下的进一步生长并且抑制颗粒在生理 pH 下的自聚集。材料被离心浓缩到高于 50vol%,并且通过使用 100,000MWCO Spectrapore 透析管 (Pierce) 用磷酸盐缓冲液透析最终产物并且通过热压处理消毒,而对颗粒无任何破坏。将浓缩的乳化纳米颗粒 13 收集在无菌储存器中。测量收集的最终的 AOC 纳米颗粒 11 的克分子渗透压浓度并且如需要用无菌的 PBS 调节。可使用其它材料用于形成壳 12,例如硅酸盐,或生物相容性有机聚合物,例如聚己内酯、聚乳酸、聚乙醇酸、聚环氧乙烷、脱乙酰壳多糖或软骨素。

[0056] 在一个实施方式变体中,这些材料的合成涉及缓慢地供给所制备的在良好混合的

流中的磷酸盐缓冲的全氟化碳或血红蛋白乳液通过含有在适当 pH 下的固定浓度的无菌氯化钙溶液的反应器中。在乳液在反应器中的停留时间期间,混合物中的钙和磷酸盐围绕乳化颗粒 13 成核形成增强层或壳 12,然后悬浮液将进入旋篮式反应器/终缩聚反应器中,其中在反应器中,添加有少量的 CEPA 18(足以覆盖在此体积中可得到的颗粒的表面积),并且浓缩所得到的混合物,并且收集在无菌储存器中。测量收集的最终 AOC 的克分子渗透压浓度并且如需要用无菌的 PBS 调节。反应器示出在图 9 中并且通过参考图 9 被描述。

[0057] CEPA 18 是优选的,因为一侧匹配存在的 CaP 涂层并且另一侧被羧化,CEPA 对于许多生物医学材料是代表性的并且易于经由已知的化学过程交联物质。双官能或三官能的配体可用于替代 CEPA,因为这些分子具有设计成粘着到颗粒的一个或两个配体并且一个或两个设计成突出或最终化学交联到可以是聚合物、蛋白质等的一些其它分子。对于非 AOC 应用,它可以是例如用于靶向运输的抗体。

[0058] 如果使用硅酸盐替代 CEPA,类似物将是替代磷酸酯基团的硅酸盐基团。如果聚合物涂层替代 CaP 用作壳,则基于胺或硫的材料将用于粘着到聚合物壳,但在壳的外部上仍使用羧基,使得表面电荷将是负的并且使得颗粒稳定且疏蛋白。

[0059] 更具体地,单壳 AOC 11 按如下制备。图 2(A-C) 图示了纳米乳颗粒的矿化以制备单壳 AOC 颗粒 11 的过程。纳米乳颗粒 13 优选地通过参考图 9 在本详述中任何地方所描述的搅拌过程由全氟溴辛烷 (PFOB) 21、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸酯 (DOPA) 22 和水的混合物制备,但还可使用本领域已知的其它方法。

[0060] 制备单壳 AOC 颗粒 11 通常需要的原材料从以下来源中获得:首先是 (a) 试剂级氯化钙 (CaCl_2)、(b) 磷酸 (H_3PO_4)、(c) 氯化钠 (NaCl) 和 (d) 氢氧化钠 (NaOH),所有这些都从 Pittsburgh, PA 的 Fisher Scientific 获得。需要的其它原材料是 (a) 羧甲基磷酸 (CEPA)、(b) 全氟溴辛烷 (PFOB) 和 (c) 达尔伯克氏改良伊格尔培养基 (DMEM),所有这些都从 St. Louis, MO 的 Sigma-Aldrich 获得。需要的另外的其它原材料是 (a) 1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸酯 (DOPA) 和 (b) 1-棕榈酰基-2-[12-[7-硝基-2-1,3-苯并噁二唑-4-基)氨基]十二酰基]-sn-甘油-3-磷酸胆碱 (16:0-12:0NBD PC) 和作为冻干粉末从 Alabaster, AL 的 Avanti Polar Lipids 获得的类似的脂质。然后是从 Salt Lake City, UT 的 ARUP Laboratories 获得的悬浮红细胞 (RBC)。最后,18M Ω 去离子水从 Millipore, Billerica, MA 的超纯水过滤系统获得。

[0061] 制备单壳 AOC 颗粒 11 的典型配方是将 50 μl 的 PFOB 21 与在水中的 5ml 0.69mM DOPA 22 溶液混合。当在室温下在 1200RPM 下搅拌 30 分钟时,产生这样的混合物:纳米尺寸的均相乳液,约 350nm 平均尺寸的范围,具有相对宽的尺寸分散度。分布和尺寸减小的细化通过使用 10ml Thermobarrel LIPEX 挤出机 (Northern Lipids, Vancouver, CA) 挤出混合物通过适当孔径(在 60 至 200nm 之间)的聚碳酸酯挤出膜 (Millipore, Billerica, MA) 而获得。使用工业级氮气在 800PSI 下驱动流体通过膜,以获得 ~ 0.2 -1.0ml/min 的流速。膜孔径被测试,以确定在每种情况下获得的纳米乳尺寸。在挤出之后在进行后续的包覆纳米乳颗粒的步骤之前,进行悬浮,以静止约 1 小时。

[0062] 在试验中,用在 100kV 下操作的 JEOL 100-SX 透射电子显微镜 (JEOL, 东京, 日本) 对矿化的纳米乳样品成像。将 1 μl 或 2 μl 被振摇的悬浮液放入具有聚醋酸甲基乙烯酯支撑物 (Ted Pella, Redding, CA) 的镀碳的 300 目铜网的中心并且进行空气干燥。图像捕获

在膜上并且将颗粒直径与在标刻度的 TEM 图像中的颗粒直径进行比较。见图 1。

[0063] 使用 Zetasizer Nano ZEN3600 (Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, UK) 获得 20°C 时在 20nM 的悬浮浓度下制备的产物的平均颗粒流体动力学直径、多分散指数 (PDI) 和定义为 $(PDI)^{1/2} \times 100$ 的多分散指数百分比。该仪器能够测量 0.6nm 至 6 微米范围的颗粒尺寸, 并且使用这样的配置: 7° 角的散射光从样品池的前部被检测到。这意味着对于获得准确尺寸测量, 相比在检测 90 度信号的常规的光散射仪器的情况, 样品的浓度是较不关键的。壳的厚度通过从初始纳米乳的平均尺寸分布减去颗粒的平均尺寸分布来确定。在水、DMEM 介质和 PBS 介质中时的纳米乳颗粒的尺寸在图 4 中示出。

[0064] 如在图 2A 中示出的, 全氟溴辛烷 (PFOB) 纳米颗粒 11 的外表面具有围绕纳米乳颗粒 21 的 1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸酯 (DOPA) 的表面。未包覆 (未矿化) 的纳米乳颗粒 13 具有通过使用磷脂酸产生的 PO_3^- 的负电荷表面, 以稳定纳米乳颗粒。由于纳米乳颗粒的合成在碱性条件下进行, 纳米乳的表面电荷密度是非常高的, 具有接近 -50mV 电动电位。

[0065] 为了在批处理中包覆负电荷的纳米乳颗粒 13, 将 600 μ l 纳米乳悬浮液与 2:00 μ l 0.1M 磷酸溶液混合, 磷酸溶液先前已用 0.1M NaOH 滴定到 pH7。在室温下在 100ml 烧杯中以 ~400RPM 的速度磁力搅拌混合物。接着, 添加 270 μ l 的 0.1M NaOH, 以将该混合物的 pH 调节到 9.5。使用由在个人计算机上运行的 Lab VIEW 6.0 版程序 (National Instruments, Austin, TX) 控制的两个 Tecan XP-3000 注射泵, 以 30 分钟为间隔, 将 15 至 30 份 10 μ l 整份的 0.1M $CaCl_2$ 水溶液添加到含有纳米乳的反应容器中。在最后添加 0.1M $CaCl_2$ 后一小时, 添加 100 μ l 的 0.1M CEPA 溶液 (在 pH 7.0 下制备), 以包覆颗粒并且阻止磷酸钙进一步沉积。

[0066] 在该过程中, 来自磷酸中的正电荷的钙离子被吸引到纳米乳颗粒 13 (DOPA) 的表面上的负电荷的 PO_3^- , 如在图 2B 中示出的。钙离子在纳米乳颗粒外周的积聚将局部浓度提高至超过磷酸钙沉淀的稳定点, 导致磷酸钙沉淀到纳米乳颗粒上。这产生第一磷酸钙 (CaP) 壳 22, 如在图 2A 中示出的。因为本体乳液中离子浓度低, 在纳米乳 / 溶剂界面处沉淀是优选的。以这种方式产生的磷酸钙的主要形式是透钙磷石。除了 CaP 壳 22 外, 可使用其它材料来产生壳, 例如脱乙酰壳多糖、软骨素和碳酸钙, 和 / 或 CaP 和这些材料的混合物和 / 或其它矿物。

[0067] 为了浓缩产生的产物, 如在前面的段落中描述的, 将 25ml 矿化的纳米乳颗粒放入 50ml 锥形离心管 (Fisher Scientific, Pittsburg, PA) 中并且使用 SL250T 型转子以 10,000RPM 在 Sorval T20Superspeed Centrifuge (ThermoFisher, Pittsburg, PA) 中离心 1 小时, 并且倒出上层清液。通常得到 5ml 浓缩产物, 产生含有约 10% PFOB 的悬浮液。使用 100,000MWCO Spectrapore 透析管 (Pierce, Rockford, IL) 用 pH 7.0 的 0.1mM 磷酸盐缓冲液透析离心样品, 以除去未反应的和未包封的材料。

[0068] 这产生基本的 CaP 单壳 AOC 11, 如在图 1B 和 2C 中所示。在最后的步骤中, 将 CEPA 的涂层 18 添加到 CaP 壳 12、22 上。在最后添加 0.1M $CaCl_2$ 以产生 CaP 壳后一小时, 添加 100 μ l 的 0.1M CEPA 溶液 (在 pH 7.0 下制备), 以用涂层 18 包覆颗粒并且阻止磷酸钙进一步沉积。最后的 AOC 纳米颗粒 11 图示在图 2C 中。

[0069] 在 37°C 下, 在剧烈搅拌、声波处理和热压处理灭菌下, 评估未包覆的纳米乳颗粒

13 和矿化的 12 颗粒 11 的稳定性。对于温度研究,在室温和 37℃ 下温育纳米乳和相应的矿化的颗粒 30 天。每隔五天,使用所描述的动态光散射测定平均尺寸。对于剧烈混合,使用定轨摇床,以将剪切力施加到颗粒,并且每天测量平均颗粒尺寸。对于声波测试,使用 Branson 细胞均质机,并且每隔 30 分钟测量平均颗粒尺寸。最后,使样品经受在 121℃ 下持续 30 分钟的一个热压灭菌周期来处理样品,并且证实了包覆的颗粒未被破坏。

[0070] 对如上面参考图 1 和 2A-2C 所描述的单层包覆的纳米乳颗粒的用途进行了它们用作人工氧载体 (AOC) 11 的测试。见图 5A-5C。这些图的斜率被调节以适应所用的血红蛋白的浓度,最终的速率估计为 4.8、14.5、和 15.2 sec⁻¹。对于 RBC,等效常数是 4.1 sec⁻¹。

[0071] 为了得到产生图 5A-5C 中的曲线的数据,通过用在等渗 PBS 中制备的 0.5ml 乳液和矿化的颗粒温育在 20% 血流比容计中的 0.5ml RBC/ 血浆样品,在室温下测试在纳米乳颗粒的存在下红细胞 (RBC) 的溶血。测量从 RBC 中释放的微摩尔和释放的血红蛋白的%,作为从 0-8% 的纳米乳或矿化的纳米乳颗粒的体积% 的函数。在所使用的颗粒的每种浓度下,通过假定血红蛋白的摩尔吸收率在 575nm 时为 55,540 cm⁻¹M⁻¹,用分光光度计测量在 3,000RPM 下离心 15 分钟以除去细胞和其它碎片之后混合物的上层清液中的 RBC 溶血的量。

[0072] 为了确定单层包覆的纳米乳颗粒 AOC 的携氧能力,测量了水中溶解的氧的量。首先确定了在充足量的氧的存在下在 37℃ 时 540nm 处的吸光度与葡萄糖浓度的线性依存关系,然后限制氧的量,在充足量的葡萄糖存在下,估计浓度。实际上,对于氧浓度的校准,将 200 μl 的冷冻葡萄糖分析溶液 (邻苯二茴香胺、葡萄糖氧化酶和过氧化物酶的混合物) 倒入 10ml 离心管中,用隔膜覆盖并且使用旋转式真空泵排空 5 分钟随后用氮气吹扫 5 分钟。重复排气和吹扫两次,并且将离心管保持在 37℃ 水浴中。在 37℃ 下,将每个 10 μl 的含有 100mg 葡萄糖 /ml 的类似脱氧的葡萄糖溶液与 0、25、50、75、100 和 150 μl 的空气平衡的去离子水混合,并且在 37℃ 下将混合物添加到在上面制备的脱氧葡萄糖分析溶液中并且反应 30 分钟。最后,将 200 μl 12N H₂SO₄ 添加到每个样品中,以终止反应。添加去离子水,以使总体积为 1.41ml 并且在 540nm 处检测吸光度。绘制吸光度与溶解的氧的浓度的曲线,假定空气在 1ATM 和 37℃,水含有 215.6 μmol 的 O₂。

[0073] 在实验上测定的包覆的 AOC 悬浮液中的氧含量为水中的氧含量和全氟化碳中的氧含量的加和。定量地, (等式 1)

$$[0074] \quad CO_2 \text{ 总} = CO_{2PFC} V_{PFC} + CO_{2水} V_{水}$$

$$[0075] \quad = CO_{2PFC} V_{PFC} + CO_{2水} (1 - V_{PFC})$$

[0076] 其中,CO₂ 总是样品的总的氧浓度,且 CO_{2PFC} 和 CO_{2水} 是在给定的氧分压和温度下 PFC 和水中的氧的浓度,且类似地,V 是 PFC 和水的体积分数。如果对于每相氧溶解度是已知的,CO₂ 总可根据 PFC 的给定的总分数估算。乳化的 PFOB 的氧含量在 37℃ 和在 1ATP 下具有估计 3,640 μmol/l CSAT 的 O₂。通过在 10,000rpm 下离心 1 小时将未包覆和包覆的颗粒的悬浮液浓缩到 10% v/v。使用上面的等式 (1) 并且使 V_{PFC} = 0.1,空气平衡的母液中的氧浓度测定为 558.0 μM。用 pH 7.4 的 PBS 顺序稀释 200 μl 的产物,以制备从 0 至 250nM 范围的 5 种不同浓度的悬浮液。向 37℃ 的 200 μl 的每个空气饱和的悬浮液中,添加 200 μl 先前制备的脱氧葡萄糖分析溶液连同 1 μl 的 100mg/ml 的葡萄糖溶液。使反应在 37℃ 下进行 30 分钟,并且测量 540nm 处的吸光度,以估算未包覆的和包覆的颗粒中存在的氧的量。见图 3。

[0077] 对于适合于作为组织充氧器的这些材料,从血流中摄取氧的速率必须与从组织毛细管中的血液中的卸载氧的速率相当。对于红细胞,氧摄取和释放速率测定为在最大变化的 50% 的点处,分别报道为 0.4 和 1.1sec,并且以假一级常数计算的脱氧常数为 $4.11 \pm 0.2 \text{sec}^{-1}$ 。产物的脱氧速率根据脱氧血红蛋白 (Hb) 溶液摄取氧的速率间接估算,因为,脱氧血红蛋白溶液的摄取氧的速率比产物的脱氧速率快得多。使用具有 30ms 混合时间的 Aminco 停流进样仪器进行脱氧 Hb 的氧摄取测量。用新获得的血细胞制备 Hb 溶液并且用盐水洗涤几次。离心地收集红细胞并且用 10 倍体积的冷去离子水溶解,且通过在 3,000RPM 下离心分离 20 分钟来除去膜片段。将 pH 调节到 7.0 使用而无需纯化。Hb 的浓度为约 0.5mM。Hb 的脱氧通过用氮气吹扫进行直至 585nm 处溶液的吸收峰值变得可忽略。PFOB- 纳米乳和颗粒的浓度设为约 10vol% 并且将它们的 pH 值调节为 7.0。在将 Hb 与纳米乳或颗粒快速混合后,在 25°C 观察到 585nm 处光谱吸收随时间的增大。对于每个样品,记录了三次连续停流踪迹的平均值。

[0078] 在单层壳包覆的 AOC 的可替代的实施方式中,载体颗粒具有微米或亚微米尺寸的双核全氟化碳 (PFC) 和多聚血红蛋白 (PolyHb, 聚 Hb),多聚血红蛋白为聚合的血红蛋白,双核全氟化碳和多聚血红蛋白使用间歇或连续流动合成方法使用与制备单层包覆的 AOC 相同的技术来制备。这些在本文称为双核氧载体 (DCOC)。图 6 示出双壳人工氧载体 (DCOC) 的横截面图并且除了制备单壳 AOC 所需要的步骤外还需要几种另外的顺序合成步骤。这些另外的步骤是形成稳定的 PFC 乳液,在第一壳中逐层合成多聚血红蛋白,以及形成最后的壳,以覆盖聚 Hb。另外,图 7 示出 DCOC 氧载体作为如先前描述的血液代用品性能是多么好。除了聚 Hb 外,还可使用其它 Hb 单体,转基因 Hb 和来自牛科动物和人类来源的 Hb。

[0079] DCOC 运输氧并且提取二氧化碳,由于其高密度,可使用连续流动密度梯度分离从先前关于单壳 AOC 已经描述的循环血液中回收。可将 DCOC 的氧解离曲线制成与正常血液的氧解离曲线相似,因此,不同于基于全氟化碳的氧载体,DCOC 不需要病人另外使用氧气筒。它持续保持循环,足以经受血压循环中的湍流,并且具有用于交换肺和组织中的气体的足够快的渗透性。有不同的两种氧载体 - 全氟化碳 (PFC) 和血红蛋白 (HB),DCOC 的毒性比由单组分制备的那些小。

[0080] 将 1,2- 二油酰基 -sn- 甘油 -3- 磷酸酯 (DOPA) 与接近 2.0g/ml 密度的 PFC 例如全氟溴辛烷或全氟癸烷混合并且挤出通过选定直径的多孔膜,以形成具有亚微米尺寸的 PFC 乳液。将乳液悬浮在 8-9 之间的 pH 值的 15mM 磷酸盐缓冲液中并且向悬浮液中缓慢添加 100mM CaCl_2 溶液,以使亚微米尺寸 PFC 乳液颗粒形成二水合磷酸二钙 (DCPD),以用于稳定它们。接着,用羧乙基膦酸 (CEPA) 羧化 DCOC 颗粒的 DCPD 壳表面,以防止颗粒的自聚集,从而终止 DCPD 壳在生理 pH 下的进一步生长,并且抑制颗粒在生理 pH 下的自聚集。DCPD 壳的厚度通过控制 DCPD 形成的持续时间和借助于透析或离心膜过滤除去未反应的试剂而通常被保持在 3-15nm 之间。最后的颗粒的密度为约 1.8g/ml,且因此它们可易于通过离心而被浓缩到高达 50% 体积。初步研究已表明带壳的 PFC 颗粒在磷酸盐缓冲液中是稳定的,经得起与在血液中所预期的湍流相同的湍流,并且呈现比在红细胞 (RBC) 中所预期的氧交换速率更快的氧交换速率。

[0081] 具有 DCPD 壳的 PFC 颗粒可用荧光标记物标记,用于跟踪和定量分析。将 O10 1- 棕榈酰基 -2-[12-[7- 硝基 -2-1,3- 苯并噁二唑 -4- 基] 氨基] 十二酰基]-sn- 甘油 -3- 磷

酸胆碱 (16:0-12:0 NBD PC) 与 DOPA 混合并且用于完成如上描述的 PFC 乳液的合成。已知 NBD 在 460nm 处激发且荧光在 524nm 处有荧光, 并且计算存在于悬浮液中的乳液颗粒的数目, 可为每份 DCOC 构建校准曲线, 通过校准曲线, 可估算使用这种乳液构建的未知浓度样品颗粒的量。当将乳液与 RBC 混合时, 两种样品的激发和发射将相互干扰, 并且每种样品的估算的浓度将需要求解吸收光谱和发射光谱的联立方程。为了减小误差, 使用疏水性荧光染料作为标记物 (其吸收和荧光受 RBC 的干扰将是最小的)。

[0082] 合成 DCOC 的下一步骤是添加第二壳。这通过用 DPCD 壳将聚赖氨酸/Hb 的层沉积在 PFC 颗粒上来完成。聚赖氨酸/Hb 被逐层地沉积到在本方法的前面步骤中所制备的 DCPD 壳的负电荷的羧化表面上。

[0083] 第一步是用聚赖氨酸的分子层覆盖在前面段落中描述的 DCPD/CEPA 包覆的 PFC 乳液的表面。聚赖氨酸/Hb 静电粘附到带电表面和其它蛋白质并且通常作为食品添加剂被美国食品和药物管理局接受为是安全的。为了牢固的粘附, 聚赖氨酸分子的长度应是足够长的, 以跨越至少 3 个或更多个血红蛋白分子。假定血红蛋白的直径是约 4nm 且单体赖氨酸的长度为约 1nm, 为了合成聚赖氨酸/Hb, 我们将需要至少 12-mer 的聚赖氨酸。然而, 聚赖氨酸分子的长度可增加, 以稳定 Hb。在 200nm 直径 PFC 颗粒的表面上, 有足够的空间结合多达 24,000 个 Hb 分子。如果 50% 或更高的表面被 Hb 包覆, 且需要至少 4 个聚赖氨酸分子来压紧 Hb 分子, 必须将 48,000 个聚赖氨酸分子结合到在其上具有第一壳的 PFC 颗粒的表面。如果 PFC 颗粒的浓度是已知的, 可估算用于包覆所需要的聚赖氨酸分子的最小数目。聚赖氨酸 (和 Hb) 的沉积可通过在本方法过程期间使用电动电位测量来监测并且用分光法或通过借助于透析从混合物中除去过量的试剂之后的总碳含量来证实。还可使用除聚赖氨酸外的聚合物, 例如聚乙二醇、聚乳酸、聚乙醇酸 pHEMA、脱乙酰壳多糖和软骨素。

[0084] 一旦聚赖氨酸的第一层沉积了, 添加含有至少 12,000X 浓度的 PFC 颗粒的血红蛋白 (Hb) 溶液, 作为 Hb 的第一层用于聚合。然后添加 3-4 倍浓度的聚赖氨酸。Hb 和聚赖氨酸的交替添加将持续, 直至获得所期望厚度的聚赖氨酸/Hb 层。所有反应将在 pH 8 下进行, 使得 Hb 的氧化保持是低的并且在 Hb 和 CEPA 之间维持相反的离子电荷。

[0085] 一旦聚赖氨酸/Hb 层形成, 应用第二 DCPD 涂层和最后的 CEPA 涂层, 以强化 DCOC 颗粒。该最后的层还用于保持内部材料完整。所制备的 DCOC 的详细横截面示出在图 6 中。

[0086] 图 7 示出了, 在其壳内具有 80% 聚 Hb 和 20% PFC 的单独的双核氧载体 (DCOC) 的携氧能力非常接近于全血的携氧能力, 且当向血中添加相同的 DCOC 以组成 80% 血液和 20% DCOC 时, 其同样具有非常接近于全血的携氧能力。还示出单独的聚 Hb 的携氧能力。

[0087] 更具体地, 图 7 示出了血液的氧解离曲线、用于合成双核氧载体 (DCOC) 的单个组分即聚 Hb 和 OFC 的推测的氧解离曲线, 以及 80% 聚 Hb 和 20% PFC 及类似地 80% 血液和 20% DCOC 的数字表示的额外的氧解离曲线。注意到, 血液的氧解离曲线和 DCOC 与血液混合物的氧解离曲线在它们的 S 形性质和氧亲和力方面是相似的, 这表明两者可将几乎相同量的氧从肺运输到组织。换句话说, 不同于基于 PFC 的 AOC, 病人可能不再需要补充吸氧。此外, 这还有助于降低聚 Hb 的氧化速率并且抑制其与环境直接接触, 避免与当前开发的聚 Hb 产品相关的一些问题。

[0088] 图 8 示出表面有活性的全氟化碳核 21 和稳定的壳 12 的人工氧载体 AOC 的不同配置的四种图示。在图 8A 和图 8B 中, 单个可回收颗粒的表面活性层 24 可以是使用各种交联

剂（例如 EDC/SNHS (Pierce)）交联到 CaP 层的蛋白质（例如抗体）或其它生物化学活性物质例如螯合剂、酶、核酸等。活性表面可以是与 A 中的密度相同的高密度或与 B 中的密度相同的低密度。活性层还可以是聚合物层，例如聚赖氨酸、聚乙二醇或聚乳酸 / 聚乙醇酸、pHEMA 等（可从 Sigma 得到）。这些材料中的许多在文献中已知为用于包覆其它类型的纳米颗粒并且提供其它功能。它们可以是对本发明可回收性特征的补充，但不排除其它技术。活性层还可以是交联的血红蛋白和聚电解质的层，或由另一种不可回收的纳米颗粒或具有其它性质（例如地磁活动性和化学活性）的材料组成。

[0089] 图 8C 和 8D 阐述了包封可回收颗粒的不同方式，成对或更多的数目限制。为了产生这些类型的颗粒排列，活性表面应具有使用标准的交联化学过程将颗粒交联在一起的性质。例如，可使用亲和素 - 生物素、抗体 - 抗原或直接交联剂。这些策略还用于文献中并且通过增大它们的质量或合并多种构型的可回收颗粒来补充增强本发明的可能具有不同的检测能力的可回收颗粒（例如，组合荧光性标记的和 MRI 活性的可回收纳米颗粒，或组合不可回收探针纳米颗粒与可回收纳米颗粒，以同时具有探针特征和可回收性特征，或组合顺磁性纳米颗粒或材料与具有高密度的可回收颗粒，以一并使用用于回收的密度和磁化率）。

[0090] 可使用用于单层 AOC 的相同的连续流动密度梯度分离从循环血液中回收 AOC 和 DCOC 颗粒。这是由于其高于红细胞的密度。通常，只要 AOC 或 DCOC 的医疗目的实现便将 AOC 或 DCOC 从病人体系中回收，以减轻已缺乏抵抗力病人的生理应力。

[0091] 本发明新的 AOC 和 DCOC 被设计成被循环通过身体和通过闭合回路流体循环体系而不破碎的大致目的。更具体地，AOC 和 DCOC 粒状人工氧载体被设计成在闭合回路流体循环体系中连续循环，且不经受湍流破碎、化学分解或碎片积累，并且它们不释放它们的有效负荷，但能够交换小的离子和气体，并且可使用采用密度梯度离心分离的连续流动分离在所期望的任何时间被回收，而不遭受破坏或对已存在于流体中的其它材料造成破坏，密度梯度分离可被磁场、亲和过滤或其它方法补充。

[0092] 新的 AOC 和 DCOC 的其它应用包括从循环血液中除去和浓缩转移性癌细胞，回收低复制哺乳动物细胞、细菌细胞或病毒细胞和组织器官成像。根据应用，依据这些材料的尺寸和组成，这些材料的特定设计需求可进行变化，但它们全部所共有的是先前概述的性质，和从循环流体中连续回收的定制能力。

[0093] 为了从血液中除去 AOC 和 DCOC 颗粒，可使用以下连续流动分离方法中的一种或多种：(a) 离心分离，(b) 磁场，和 / 或 (c) 亲和过滤，而不遭受破坏或对可能已存在于流动流体中的其它材料造成破坏。从血液中除去 AOC 和 DCOC 颗粒不是本发明的部分，且不再另外描述。

[0094] 图 9 是示出用于连续合成稳定的人工氧载体 (AOC 和 DCOC) 的装配体系的框图。在合成中使用的材料的细节之前已在本发明的详述中被详细描述。本方法的步骤、材料、百分比等先前已被详细描述，因此在此不再重复。整个体系包括用于运输原材料的可控源，并且包括多聚血红蛋白 (PHb) 的储存器 30、水性脂质溶液例如全氟化碳 (PFC) 的储存器 31 和制备的氯化钙 (CaCl) 溶液的储存器 32。有预混合器 / 多挤出机 33，储存器 30 和 31 中的材料在计算机控制下可控地进入预混合器 / 多挤出机 33。预混合器 / 多挤出机 33 产生如先前在本发明的详述中描述的纳米乳颗粒。纳米乳颗粒经由穿孔的试剂输送管被输送到合成室 35，并且，在适当的时间，还将氯化钙溶液添加到合成室，以产生围绕乳化颗粒 13 的增强

层或壳 12。在包覆过程期间,用由电机 34 驱动的桨 36 缓慢地搅拌室 35 内的原材料。

[0095] 在适当的时间,包覆的纳米乳颗粒离开合成室 35 进入旋篮式反应器/终缩聚反应器 37 中,在反应器中,颗粒被储存在储存器 38 中的 CEPA 18 包覆。在旋篮式反应器 37 中,包覆的纳米乳颗粒与足够的 CEPA 18 一起被缓慢搅拌,以包覆颗粒的有效表面。如先前描述的,CEPA 涂层羧化颗粒表面,终止纳米乳颗粒在生理 pH 下的进一步生长并且抑制纳米乳颗粒在生理 pH 下的自聚集。在离开终缩聚反应器 37 后,颗粒被离心浓缩(未示出)成高于 50vol%,并且通过使用 100,000MWC0 Spectrapore 透析管(Pierce)用磷酸盐缓冲液透析最终产物并且通过热压处理消毒,而对颗粒无任何破坏。将浓缩的乳化纳米颗粒 13 收集在无菌储存器(未示出)中。测量收集的最终 AOC 纳米颗粒 11 的克分子渗透压浓度并且如需要用无菌的 PBS 调节。虽然本文描述了基于钙的壳,还可使用其它材料形成壳 12,例如硅酸盐或生物相容性有机聚合物,例如聚己酸内酯、聚乳酸、聚乙醇酸、聚环氧乙烷、脱乙酰壳多糖或软骨素。

[0096] 基于先前描述的原因,储存器 31 中的脂质溶液中优选地可具有卵磷脂。另外,在每种纳米颗粒中可将顺磁性材料添加到更高密度的 PFC 中,并且随后使用磁化率,用于回收聚合血红蛋白。含有顺磁性和反磁性材料的流动液体(天然血液组分)在离心分离期间必须暴露于磁场,以使得它们偏离具有顺磁性材料的颗粒流动方向,远离反磁性颗粒,从而可以分离和收集两种类型的颗粒。

[0097] 虽然在本文已描述的是本发明的优选实施方式和一些可替代的实施方式,本领域技术人员将理解,可在不偏离本发明的精神和范围下作出许多改变。

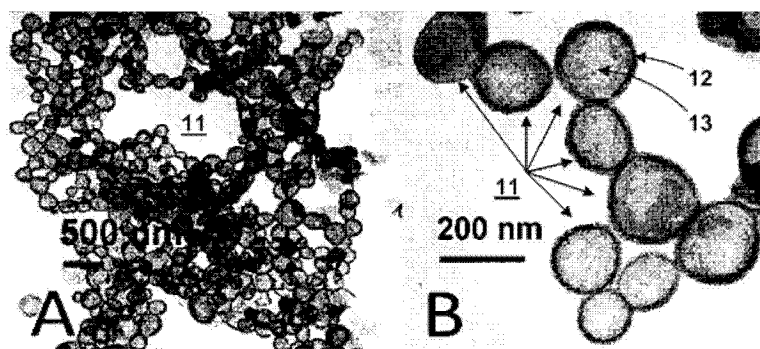


图 1A

图 1B

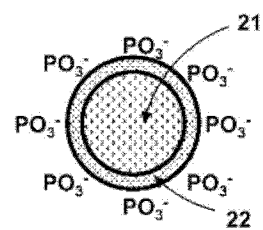


图 2A

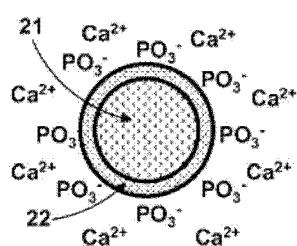


图 2B

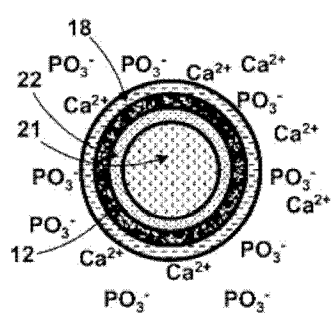


图 2C

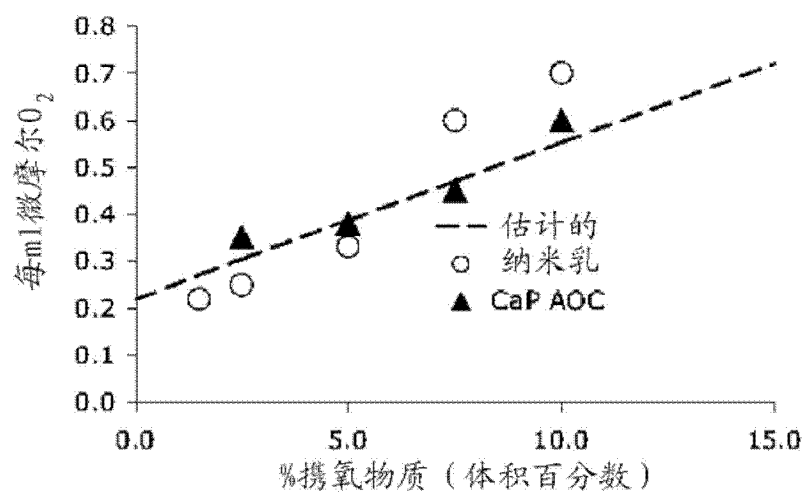


图 3

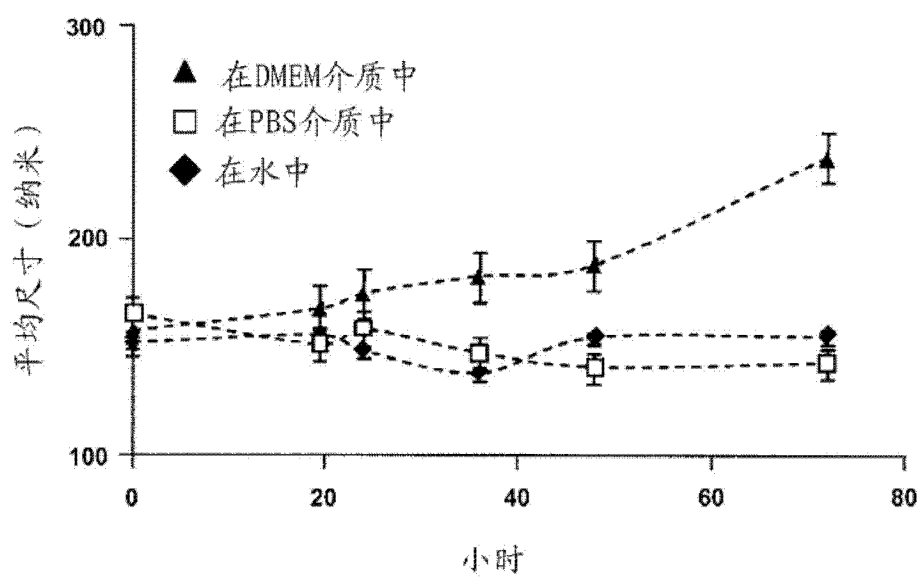
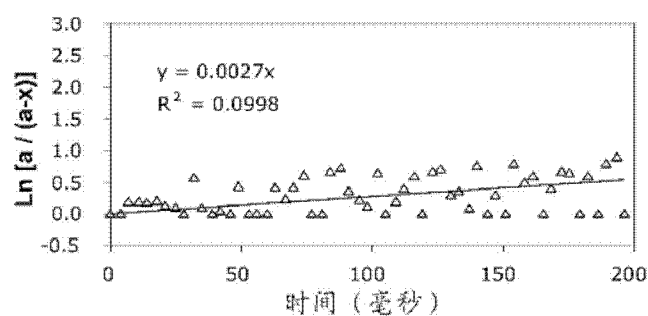


图 4

A. 从PBS的氧释放速率



B. 从乳液 (ePFOB) 的氧释放速率

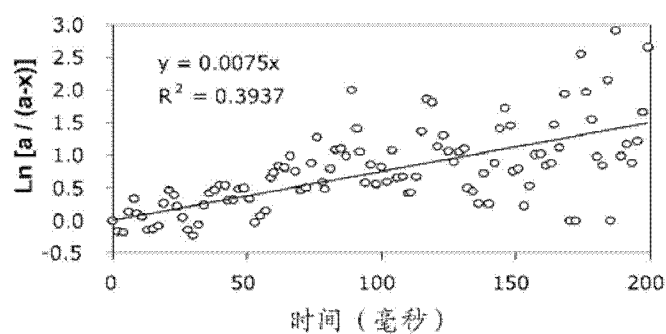
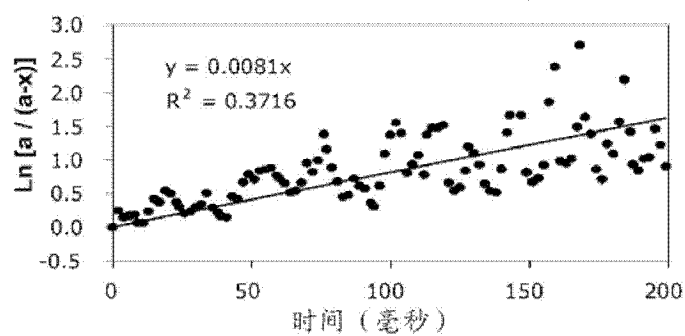
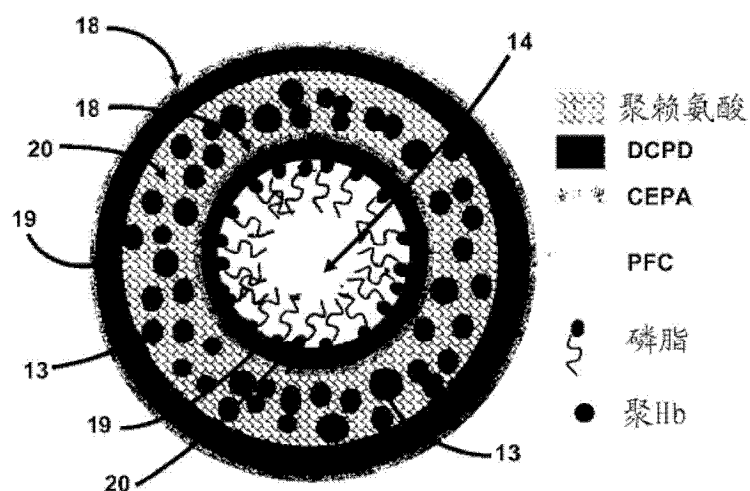
C. 从纳米颗粒 (带壳的ePFOB) 的 O_2 释放

图 5



包裹内部PFC乳液核和具有DCPD/CEPA涂层的外部聚Hb核的双核氧载体 (DCOC) 的图

图 6

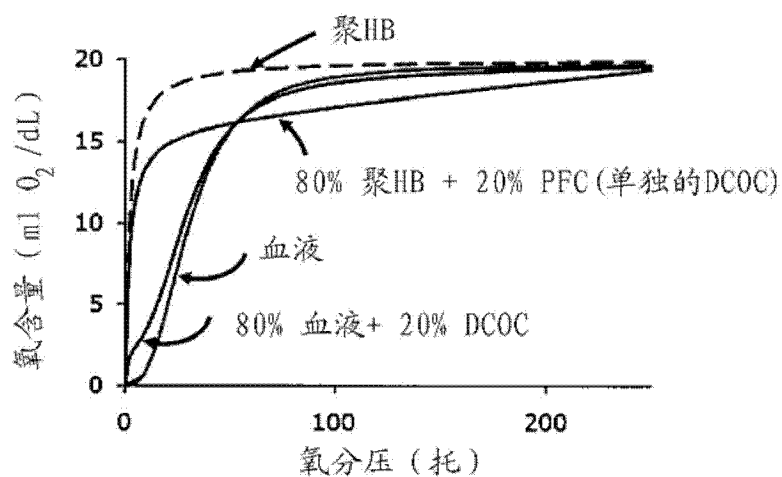


图 7

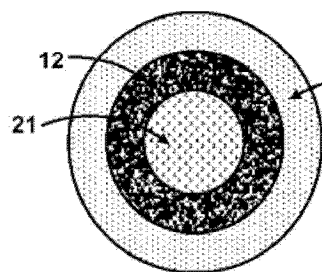


图 8A

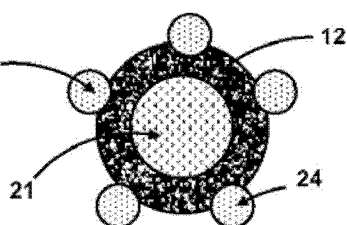


图 8B

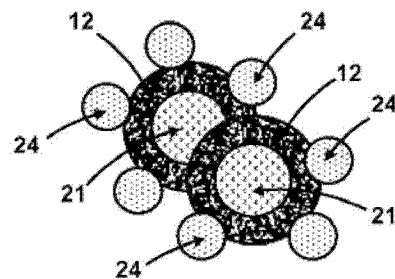


图 8C

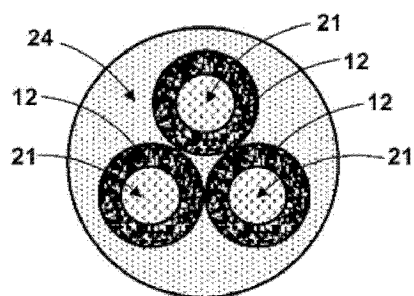


图 8D

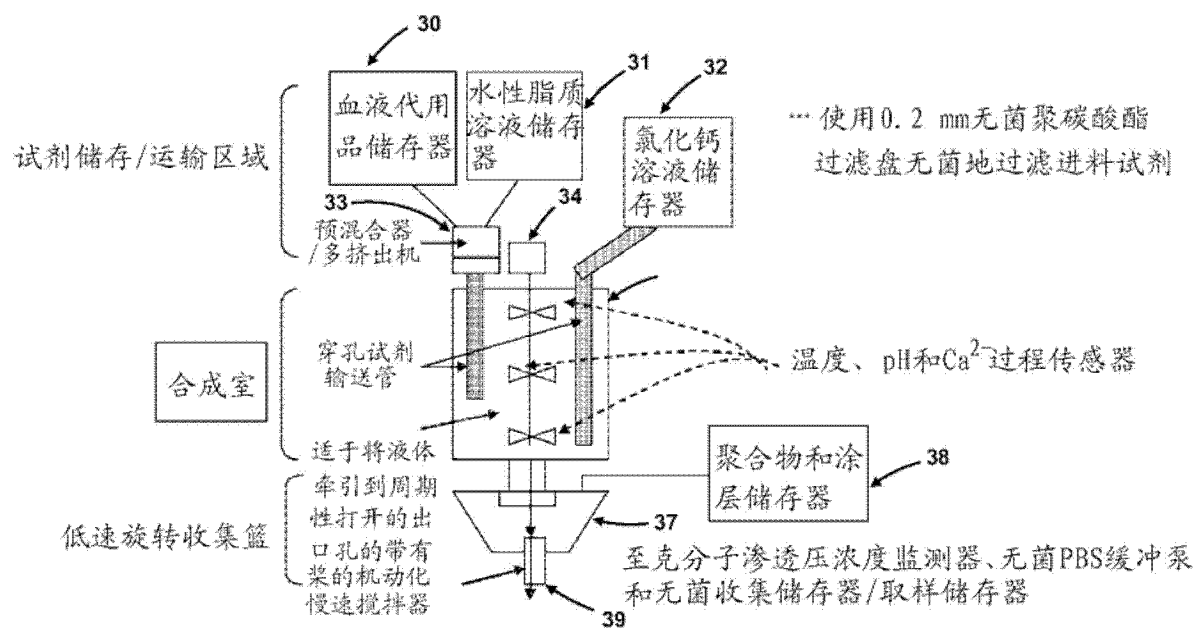


图 9

1. 一种用于替代人血液的粒状人工氧载体,所述粒状人工氧载体包括:
乳化材料的纳米颗粒,并且所述材料可以以与血液相似的方式携带氧和二氧化碳;
第一壳,其围绕乳化的纳米颗粒形成,所述第一壳稳定所述纳米颗粒;
新层,其在材料的所述第一壳的外部上,所述新层可以以与血液相似的方式携带氧和二氧化碳;以及
第二壳,其围绕所述第一壳的外部上的所述新层生成,以保护所述材料新层;
其中具有第一壳和第二壳的所述纳米颗粒具有比血液中的任意组分更高的密度,并且其中两个壳允许所述乳化的纳米颗粒在闭合回路循环体系中的血液内连续地循环,而不破碎并且不会将在所述两个壳内的所述乳化的材料释放到血液中。
2. 如权利要求1所述的粒状人工氧载体,其中所述第一壳由磷酸钙制成。
3. 如权利要求2所述的粒状人工氧载体,其中在所述第一壳内的所述乳化的纳米颗粒为全氟化碳或多聚血红蛋白。
4. 如权利要求1所述的粒状人工氧载体,其中所述第二壳由磷酸钙制成。
5. 如权利要求4所述的粒状人工氧载体,其中所述材料的新层包括在聚赖氨酸中的多聚血红蛋白。
6. 如权利要求1所述的粒状人工氧载体,其中使用卵磷脂乳化在所述第一壳内的材料的纳米颗粒材料。
7. 如权利要求1所述的粒状人工氧载体,其中使用卵磷脂乳化在所述第一壳和第一涂层的外部上的所述材料的新层。
8. 如权利要求1所述的粒状人工氧载体,其中所述粒状人工氧载体是亚微米尺寸的。
9. 制备用于替代人血液的粒状人工氧载体的方法,所述方法包括以下步骤:
乳化可以以与血液相似的方式携带氧和二氧化碳的第一材料;
使乳化的材料形成纳米颗粒;
用第二材料包覆所述纳米颗粒,以围绕所述纳米颗粒形成第一壳,所述第一壳可透过氧气和二氧化碳;
在所述第一壳和第一材料涂层的外部上形成可以以与血液相似的方式携带氧和二氧化碳的材料新层;以及
用第二壳包覆所述材料新层,以保护所述材料新层;
其中具有第一壳和第二壳的所述纳米颗粒具有比血液中的任意组分更高的密度,并且其中两个壳允许所述乳化的纳米颗粒在闭合回路循环体系中的血液内连续地循环,而不破碎并且不会将在所述两个壳内的所述乳化的材料释放到血液中。
10. 根据权利要求9所述的制备用于替代人血液的粒状人工氧载体的方法,还包括用第三材料包覆所述第一壳以终止所述第一壳的生长的步骤。
11. 根据权利要求9所述的制备用于替代人血液的粒状人工氧载体的方法,其中所述材料的新层是可以以与血液相似的方式携带氧和二氧化碳的在聚赖氨酸中的多聚血红蛋白。
12. 根据权利要求9所述的制备用于替代人血液的粒状人工氧载体的方法,还包括用材料包覆所述第二壳的外部以终止所述第二壳的生长的步骤。
13. 根据权利要求9所述的制备用于替代人血液的粒状人工氧载体的方法,其中包覆

所述纳米颗粒以形成所述第一壳的材料是磷酸钙。

14. 根据权利要求 9 所述的制备用于替代人血液的粒状人工氧载体的方法,还包括在使所述乳化的材料形成小的颗粒之前,用卵磷脂乳化携氧第一材料的步骤。

15. 根据权利要求 10 所述的制备用于替代人血液的粒状人工氧载体的方法,且其中用第二材料包覆所述第一壳以终止所述第一壳的生长的步骤包括在适当的时间下用羧乙基膦酸包覆所述第一壳以终止所述第一壳的生长的步骤。

16. 根据权利要求 11 所述的制备用于替代人血液的粒状人工氧载体的方法,还包括在使所述乳化的材料形成小的颗粒之前,用卵磷脂乳化携氧第一材料的步骤。

17. 制备用于携带化学剂例如药物和成像示踪剂通过在人体内流动的血液的粒状载体的方法,所述方法包括以下步骤:

乳化所述化学剂;

使乳化的化学剂形成纳米颗粒;

用材料包覆所述纳米颗粒,以围绕所述纳米颗粒形成第一壳,所述第一壳是可渗透的,以允许所述化学剂以受控的方式离开所述粒状载体;

形成可以在所述第一壳的外部上携带所述化学剂的材料新层;以及

用材料包覆所述材料新层,以围绕所述材料新层形成第二壳,从而保护其免于以不受控的方式释放到血液中;

其中具有第一壳和第二壳的所述纳米颗粒是足够稳定的,使得它们允许所述乳化的颗粒在人血液中连续地循环,而不破碎且不会将两个壳内的所述乳化的化学材料释放到血液中。