



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1741812 B

(45) 授权公告日 2013.04.24

(21) 申请号 200380109157.8

(22) 申请日 2003.12.18

(30) 优先权数据

60/436,149 2002.12.23 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2005.07.25

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2003/040407 2003.12.18

(87) PCT申请的公布数据

W02004/058291 EN 2004.07.15

(73) 专利权人 犹太大学阿尔伯特爱因斯坦医学院

地址 美国纽约

(72) 发明人 S·A·阿查里雅 B·N·曼朱拉

(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 11038

代理人 陈轶兰

(51) Int. Cl.

A61K 38/16 (2006.01)

(56) 对比文件

MANJULA et al. Cys-93-beta-bet
a-succinimidophenyl polyethylene
glycol 2000hemoglobin. J Biol Chem275
8. 2000, 275(8), 5527-5534.

Juszczak et al., UV resonance
Raman study of β 93-modified
hemoglobinA:chemical modifier-specific
effects and added influences ofattached
poly(ethylene glycol)chains, .
Biochemistry, 41. 2002, 41376-385.

审查员 潘爱群

权利要求书2页 说明书18页 附图10页

(54) 发明名称

修饰的血红蛋白及其制备方法

(57) 摘要

本发明提供了一种具有 6 ± 1 个 PEG 链的血红蛋白分子 (Hb), 其中所述 PEG 链中的 2 个结合到 Hb 的 Cys-93 (β) 上, 其余的 PEG 链结合到引入到 Hb 的 ϵ -氨基上的巯基上。本发明还提供了制备修饰的血红蛋白分子 (Hb) 的方法, 包括以下步骤: (a) 使 Hb 与 8-15 倍过量的亚氨基四氢噻吩反应以形成巯基化 Hb ;和 (b) 使巯基化 Hb 与 16-30 倍过量的用马来酰亚胺部分官能化的 PEG 反应, 以形成修饰的 Hb。

1. 一种分离的具有 6 ± 1 个 PEG 链的不致高血压的血红蛋白分子 (Hb), 其中所述 PEG 链中的 2 个结合到 Hb 的 Cys-93 (β) 上, 其余 PEG 链结合到引入到 Hb 的 ϵ -氨基上的巯基上, 并且其中所述不致高血压的血红蛋白分子 (Hb) 不是具有 4-5 个 PEG 化位点的马来酰亚胺基-PEG-Hb。

2. 权利要求 1 的血红蛋白分子, 其中每个 PEG 链的分子量为 3000-10,000 道尔顿。

3. 权利要求 1 的血红蛋白分子, 其中每个 PEG 链的分子量为 5000 道尔顿。

4. 权利要求 1 的血红蛋白分子, 其中每个 PEG 链通过琥珀酰亚胺基键连接到 Hb 上。

5. 权利要求 2 的血红蛋白分子, 其中每个 PEG 链通过琥珀酰亚胺基键连接到 Hb 上。

6. 权利要求 3 的血红蛋白分子, 其中每个 PEG 链通过琥珀酰亚胺基键连接到 Hb 上。

7. 权利要求 1-6 中任一项的血红蛋白分子, 其中巯基与 Hb 的 γ -巯基丁脒化的 ϵ -NH₂ 相关联。

8. 一种制备经修饰以具有 6 ± 1 个 PEG 链的血红蛋白分子 (Hb) 的方法, 包括以下步骤:

(a) 使 Hb 与 8-15 倍过量的亚氨基四氢噻吩反应以形成巯基化 Hb;

(b) 使该巯基化 Hb 与 16-30 倍过量的用马来酰亚胺部分官能化的 PEG 反应, 以形成经修饰的具有 6 ± 1 个 PEG 链的 Hb; 和

(c) 分离经修饰的具有 6 ± 1 个 PEG 链的 Hb;

其中所制备的血红蛋白分子 (Hb) 不是具有 4-5 个 PEG 化位点的马来酰亚胺基-PEG-Hb。

9. 权利要求 8 的方法, 其中在步骤 (a) 中使 Hb 与 9-12 倍过量的亚氨基四氢噻吩反应。

10. 权利要求 8 的方法, 其中在步骤 (a) 中使 Hb 与 10 倍过量的亚氨基四氢噻吩反应。

11. 权利要求 8 的方法, 其中在步骤 (b) 中使巯基化 Hb 与 18-22 倍过量的用马来酰亚胺部分官能化的 PEG 反应。

12. 权利要求 8 的方法, 其中在步骤 (b) 中使巯基化 Hb 与 20 倍过量的用马来酰亚胺部分官能化的 PEG 反应。

13. 权利要求 8 的方法, 其中在步骤 (a) 中使 Hb 与 9-12 倍过量的亚氨基四氢噻吩反应, 且在步骤 (b) 中使该巯基化 Hb 与 18-22 倍过量的用马来酰亚胺部分官能化的 PEG 反应。

14. 权利要求 8 的方法, 其中在步骤 (a) 中使 Hb 与 9-12 倍过量的亚氨基四氢噻吩反应, 且在步骤 (b) 中使该巯基化 Hb 与 20 倍过量的用马来酰亚胺部分官能化的 PEG 反应。

15. 权利要求 8 的方法, 其中在步骤 (a) 中使 Hb 与 10 倍过量的亚氨基四氢噻吩反应, 且在步骤 (b) 中使该巯基化 Hb 与 18-22 倍过量的用马来酰亚胺部分官能化的 PEG 反应。

16. 权利要求 8 的方法, 其中在步骤 (a) 中使 Hb 与 10 倍过量的亚氨基四氢噻吩反应, 且在步骤 (b) 中使该巯基化 Hb 与 20 倍过量的用马来酰亚胺部分官能化的 PEG 反应。

17. 权利要求 8-16 中任一项的方法, 其中 PEG 的分子量为 3000-10,000 道尔顿。

18. 权利要求 8-16 中任一项的方法, 其中 PEG 的分子量为 5,000 道尔顿。

19. 权利要求 8-16 中任一项的方法, 其中该修饰的 Hb 是不致高血压的。

20. 权利要求 17 的方法, 其中该修饰的 Hb 是不致高血压的。

21. 权利要求 18 的方法, 其中该修饰的 Hb 是不致高血压的。

22. 一种通过权利要求 8-16 中任一项的方法制备的修饰的 Hb。

23. 一种通过权利要求 17 的方法制备的修饰的 Hb。

24. 一种通过权利要求 18 的方法制备的修饰的 Hb。
25. 一种通过权利要求 19 的方法制备的修饰的 Hb。
26. 一种通过权利要求 20 的方法制备的修饰的 Hb。
27. 一种通过权利要求 21 的方法制备的修饰的 Hb。

修饰的血红蛋白及其制备方法

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求申请日为 2002 年 12 月 23 日的美国临时申请 NO. 60/436, 149 的优先权。

发明领域

[0003] 本发明涉及一种修饰的血红蛋白及其制备方法。

[0004] 发明背景

[0005] 血红蛋白 (Hb) 是红细胞的主要组成, 红细胞携带氧从肺贯穿全身。当包含在红细胞中时, Hb 以两个氧连接的 $\alpha\beta$ 二聚物组成的四聚体结构存在, 每个二聚物的分子量大约为 32Kd。每个二聚物的每个 α 和 β 亚基都具有蛋白链和血红素分子。 α 和 β 蛋白链的序列是已知的。Hb 是一种用于输血的可能有用的血液代用品, 而且已经提出用作感染性休克中捕捉氧化亚氮, 以及在癌症的放射治疗中调节组织的氧合作用的试剂。重组 DNA 技术能生产修饰的 Hb, 其具有调节用于个别治疗应用的特殊需要的氧亲和力。

[0006] 无细胞 Hb 的血管活性, 即小动脉和毛细血管的收缩作用, 当灌输纯化的无细胞 Hb 溶液, 或分子内交联的 Hb 时, 已经成为开发基于 Hb 的载氧体的主要障碍 (Savitzsky 等人 1978, Sloan 等人 1999, Saxena 等人 1999)。该血管活性归因于 Hb 的 NO 清除作用 (Doharty 等人 1998)。两种分子方法, 二者之间截然不同, 企图用于克服 Hb 的 NO 清除活性。第一种方法是重组 DNA 方法, 其试图通过远端的血红素袋的位点特异性诱变来修饰 Hb 的 NO 结合活性, 从而降低 Hb 的氧化亚氮清除活性 (Eich et al, 1996)。第二种方法是化学方法, 其中通过低聚化作用来增加 Hb 的分子大小, 低聚化作用将降低或可能完全抑制 Hb 从血管空间外渗到胞间隙 (Hess 等人 1978, Thomas 等人 1993, Muldoon 等人 1996, Macdonal 等人 1994, Furchgott 1984, Kilbourn 等人 1994)。但是只有当 Hb 的血管活性主要作为外渗的结果而介导时, 增加分子大小的方法才是成功的。虽然低聚化介导的 Hb 大小增加显示出 Hb 血管活性有所降低, 但是通过重组 DNA 技术, 或通过包括 Hb 的低聚化作用使用小分子双功能试剂来进行大小增加的方法, 都没有产生不致高血压的 Hb 溶液。一个例外是 Hb 的低聚化产物 (Matheson 等人 2002), 其分子大小远远超过 300kDa, 平均分子半径为 24nm, 发现其是不致高血压的而且不外渗。但是, 大多数目前仍处于临床试验中的低聚化产物的分子量范围为 200 到 250kDa。

[0007] 证实 Enzon PEG 化的 Hb 是不致高血压的, 其携带连接到 Hb 的 α 和 ϵ -氨基上的 10 个拷贝的 PEG-5000 链, 刺激了在血液代用品领域的研究 (Rofls 等人 1998)。四聚体内交联 Hb, 低聚化的 Hb 和 PEG 化的 Hb 的 NO 结合活性 (Winslow et al, 1998, Vandegriff et al, 1997), 显示与它们的“升压效应”没有直接相关。因此, 无细胞 Hb “升压活性”的降低似乎不与制品的 NO 结合活性, 或者制品的分子大小直接相关。但是与低聚化的 Hb 相比, PEG 化的 Hb 显示出显著较低水平的血管活性。Enzon 的 PEG-Bv-Hb, 其携带 10 个拷贝的 PEG-5000, 几乎没有显示任何“升压效应”。Vandegriff 等 (1998) 表示, 相较于 Hb 低聚化样品, PEG-Bv-Hb 显示高的粘度和胶粒渗透压。从胶粒渗透压计算的 Enzon PEG 化 Bv-Hb 的分子半径比低聚

化 Hb 的大得多 (15nm), 而且计算的分子半径与它的计算的分子量 114,000 道尔顿不相符 (Vandegriff et. al. 1998)。因此, 假定 Hb 的大小应当增加到分子半径为大约 15nm, 而且同时应伴随粘度和胶粒渗透压的显著增加以产生不致高血压的 Hb 溶液 (Winslow 1999)。

[0008] 在不致高血压的 Enzon PEG 化的 Hb 中, PEG-5000 链通过异肽键连接到牛 Hb PEG-链的 α 和 ϵ 氨基上。PEG 的共价连接同时伴有衍生的氨基的净正电荷的丢失。在最近的研究中, 已经证实用戊二醛进行 rHb1.1 的单功能修饰, 能一定程度地降低 Hb 的血管活性, 而 rHb1.1 的低聚化作用能更高程度地降低 Hb 的血管活性。因此, 在理解通过 PEG 化作用中和 Hb 的血管活性的分子基础中, 需要考虑伴随 Hb 的 PEG 化的 Hb 表面电荷修饰的可能作用。

[0009] 为了揭露由于 PEG 化作用而产生的 Hb 表面电荷微扰与产生不致高血压的 Hb 之间的相关性, 已经开发了新方法, 其涉及 Hb 的保守性 PEG 化作用, 即 Hb 的 PEG 修饰而不改变 Hb 的表面电荷 (Acharya 等人 1996)。在氧条件下, PEG-马来酰亚胺对 Hb 的 Cys-93(β) 的高反应性和选择性, 已经用于制备每个四聚体携带两个拷贝 PEG 链的均一性 PEG 化 Hb。已经生产了三种不同的 PEG-HbA 制品, 分别携带两个拷贝的 PEG-5K, 或 PEG-10K 或 PEG-20K。Hb 的分子体积 (流体动力学体积), 分子半径, 粘度和胶粒渗透压的改变, 与共价连接到 Hb 上的 PEG 的质量相关; 而且所有的这些分子特性都与升压效应相关。尽管 (PEG_{20K})₂-Hb 的粘度和胶粒渗透压与 Enzon PEG-Bv-Hb (一种不致高血压的 Hb 分子) 相当, 这种 PEG 化的 Hb 是血管活性的。因此, 血管活性问题的解决不可能通过简单地赋予分子增加的粘度, 胶粒渗透压和分子体积 (流体动力学体积) 来完成。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明提供了一种修饰的 Hb, 其具有增加的分子体积, 高粘度, 高胶粒渗透压, 高 O₂ 亲和力, 其是不致高血压的并且还能解决血管活性问题。此外, 本发明修饰的 Hb 可以在简单、灵活而且高效的方法中生产, 其使本发明修饰的 Hb 的制备有成本效益。

[0012] 更特别地, 本发明提供了一种具有 6 \pm 1 个 PEG 链的血红蛋白分子 (Hb), 其中所述 PEG 链中的两个结合到 Hb 的 Cys-93(β) 上, 而余下的 PEG 链结合到在 Hb 的 ϵ -氨基上引入的巯基上。

[0013] 本发明还提供了制备修饰的血红蛋白分子 (Hb) 的方法, 包括以下步骤: (a) 使 Hb 与 8-15 倍过量的亚氨基四氢噻吩反应以形成巯基化的 Hb; 和 (b) 使巯基化的 Hb 与 16-30 倍过量的马来酰亚胺部分官能化的 PEG 反应, 来形成修饰的 Hb。

[0014] 最后, 本发明提供了根据前述方法制备的修饰的 Hb 分子。

[0015] 附图简述

[0016] 图 1 提供了亚氨基四氢噻吩依赖的巯基化作用介导的基于马来酰亚胺化学的 Hb PEG 化的示意图。A: 描述了巯基化作用, 简化方式的 PEG 化反应的第一阶段, 以及马来酰亚胺官能化的 PEG 链结合到巯基化蛋白上。连接的 PEG 链描绘为伸出中心蛋白 (Hb) 核心的臂。B: 亚氨基四氢噻吩与 Hb 的 ϵ -氨基反应, 产生 γ -巯基丁胺基部分。

[0017] 图 2 描述了巯基化作用介导的基于 PEG 马来酰亚胺的 Hb 的 PEG 化。A: 亚氨基四氢噻吩对与马来酰亚胺 (maleido) 苯基 PEG-5000 孵育的 Hb 大小增加的影响。溶于 PBS pH7.4 中的 Hb (0.5mm 的四聚体), 在存在或缺乏已知浓度的亚氨基四氢噻吩时, 与 10mM 马来酰亚胺苯基 PEG-5000 于 4°C 孵育 4 小时。利用串联连接的两个 superose 柱, 使用 FPLC

通过大小排阻色谱法对产物进行分析。柱子用 PBS 以每分钟 0.5ml 的流速进行洗脱。标记 HbA, $(\text{PEG}_{5K})_2\text{-Hb}$, $(\text{PEG}_{10K})_2\text{-Hb}$ 和 $(\text{PEG}_{20K})_2\text{-Hb}$ 的洗脱位置, 作为追踪 Hb 分子大小增加的指导, 其伴随着 PEG 链结合。1: 对照 Hb。2: 缺乏亚氨基四氢噻吩时, 与 10mM 马来酰亚胺苯基 PEG-5000 孵育 4 小时的 HbA。3: 存在 1mM (2 倍摩尔过量) 亚氨基四氢噻吩时的 PEG 化。4: 存在 2.5mM (5 倍摩尔过量) 亚氨基四氢噻吩时的 PEG 化。5: 存在 5mM (10 倍摩尔过量) 亚氨基四氢噻吩时的 PEG 化。插图 a 给出了, 存在 10 倍摩尔过量的亚氨基四氢噻吩时 (超过 Hb), Hb 的巯基化作用的动力学。插图 b 显示了 Hb 巯基化作用程度 (孵育了 4 小时之后), 作为亚氨基四氢噻吩相对于 Hb 摩尔过量的函数。B: 温度, PEG-马来酰亚胺中 PEG 的分子大小和连接化学 (PEG 与马来酰亚胺部分之间的连接) 对 Hb 大小增加的影响。所有的 PEG 化反应, 都使用 10 倍摩尔过量的亚氨基四氢噻吩与 20 倍摩尔过量的 PEG-马来酰亚胺于室温进行 4 小时, 并于 4°C 过夜。如 A 所述通过大小排阻层析法检测大小增加。a: HbA, b: 使用 Ma1-Phe-PEG-5000 作为 PEG 马来酰亚胺于室温进行反应。c: 使用 Ma1-Phe-PEG-10,000 如 b 中所述的进行反应。d: 如 b 所述的进行反应, 但是于 4°C 过夜。e: 如 d 所述的进行反应, 但是使用马来酰亚胺乙基 PEG-5000 作为 PEG-马来酰亚胺。

[0018] 图 3 描述了使用 Acta 探测器通过大小排阻色谱对 $(\text{PEG}_{5K})_6\text{-Hb}$ 进行纯化。用 180mg 上样进行了制备级实验。如分析级实验 (图 2) 那样使用 PBS 进行洗脱。使用 10 倍摩尔过量的亚氨基四氢噻吩与 20 倍摩尔过量的 Ma1-Phe-PEG-5000 于 4°C 进行 PEG 化。插图对纯化的 $(\text{PEG}_{5K})_6\text{-Hb}$ 的分子大小与其它的 PEG 化 Hb 以及使用双马来酰亚胺苯基 PEG-600 在四聚体之间交联的 $\alpha\alpha$ -富马酰 Hb (一种分子内交联的 Hb) 的分子大小进行了比较。该样品有助于标记 $\alpha\alpha$ -富马酰 Hb 的四聚体, 八聚体, 十二聚体和十六聚体 (dohexameric) 形式的位置。1: 四聚体间交联的 $\alpha\alpha$ -富马酰 Hb。2: 在 Superose-12 制备柱上纯化的 $(\text{PEG}_{5K})_6\text{-Hb}$ 。3: Enzon PEG 化 Hb; $(\text{PEG}_{5K})_{10}\text{-Hb}$; 4: APEX Biosciences 的 PEG 化 Hb 样品, $(\text{PEG}_{3K})_{10}\text{-Hb}$ 。

[0019] 图 4 描述了 $(\text{PEG}_{5K})_6\text{-Hb}$ 的 NMR 光谱。

[0020] 图 5 描述了 PEG 化 Hb 的粘度对蛋白浓度的函数。空心圆表示 $(\text{PEG}_{5K})_6\text{-Hb}$; 实心菱形表示 Enzon PEG 化的 Hb, 且实心的三角形表示 $(\text{PEG}_{5K})_2\text{-Hb}$ 。

[0021] 图 6 描述了 $(\text{PEG}_{5K})_6\text{-Hb}$ 的胶体渗透压对蛋白浓度的函数。空心三角形表示 $(\text{PEG}_{5K})_2\text{-Hb}$, 空心圆表示 $(\text{PEG}_{5K})_6\text{-Hb}$; 实心圆表示 $(\text{PEG}_{5K})_6\text{-Hb}$, 其已经再透析以确保样品中没有任何游离的 PEG 试剂。实心菱形表示 Enzon PEG 化的 Hb。注意 Enzon PEG-Hb 与 $(\text{PEG}_{5K})_6\text{-Hb}$ 的胶粒渗透压相当。

[0022] 图 7 描述了 $(\text{PEG}_{5K})_6\text{-Hb}$ 的血管活性。A: 仓鼠中, 动物用 4gm% 的 $(\text{PEG}_{5K})_6\text{-Hb}$ 的 10% 最大负荷进行灌输后的平均动脉压力。B: 动物用 $(\text{PEG}_{5K})_2\text{-Hb}$ 和 $(\text{PEG}_{5K})_6\text{-Hb}$ 的 10% 最大负荷灌输后的小动脉直径作为时间的函数。

[0023] 图 8 描述了对动物用 $(\text{PEG}_{5K})_6\text{-Hb}$ 和 $\alpha\alpha$ -富马酰 Hb 进行 50% 换血后仓鼠中有功能的毛细血管密度与对照的比较。注意用 $(\text{PEG}_{5K})_6\text{-Hb}$ 换血后动物的动脉直径与对照样品的相当, 而 50% 换血 $\alpha\alpha$ -富马酰 Hb 的动物的动脉直径比对照的狭窄。还注意到, 用两种样品换血的毛细血管密度的差异。

[0024] 发明详述

[0025] 如这里所用的, 除非有另外说明, “Hb” 包括来自人类和哺乳动物 (例如, 牛 Hb, 猪 Hb) 来源的血红蛋白, 重组 Hb, 以及经修饰以增强或降低氧亲和力和 / 或自动氧化的 Hb (分

离的或重组的 Hb)。此外, Hb 可包括分子内交联桥的 Hb(分离的或重组的 Hb), 包括例如, 利用双马来酰亚胺苯基 PEG 于 Cys-93(β) 处交联的 Hb(双功能试剂的 PEG 链的 MW 为 2000 到 10,000 道尔顿), $\alpha\alpha$ -富马酰 Hb, 或 $\beta\beta$ -富马酰 Hb 或 $\beta\beta$ subaryl HbA。

[0026] 本发明中, Hb 具有或者携带 6 ± 1 个 PEG 链, 其中 2 个 PEG 链结合到 Hb 的 Cys-93(β) 上, 剩余的 PEG 链结合到引入到 Hb 的 ϵ -氨基上的巯基上。巯基优选与 Hb 的 γ -巯基丁脒化的 ϵ -氨基相关联。在优选的实施方案中, 每个 PEG 链的分子量为 3000-10,000 道尔顿, 更优选分子量为大约 5000 道尔顿。PEG 链也优选通过琥珀酰亚胺键连接到 Hb 上。在优选的实施方案中, 本发明的 Hb 分子也是不致高血压的。

[0027] 本发明的 Hb 分子可通过如下所述制备, 使 Hb 与 8-15 倍过量的亚氨基四氢噻吩反应以形成巯基化的 Hb; 然后使巯基化的 Hb 与 16-30 倍过量的用马来酰亚胺部分官能化的 PEG 反应, 来形成修饰的 Hb。在优选的实施方案中, 步骤 (a) 中使 Hb 与 9-12 倍过量的亚氨基四氢噻吩反应, 而且巯基化 Hb 优选与 18-22 倍过量的用马来酰亚胺部分官能化的 PEG 反应。在更优选的实施方案中, 步骤 (a) 中使 Hb 与大约 10 倍过量的亚氨基四氢噻吩反应, 而且步骤 (b) 中巯基化 Hb 与大约 20 倍过量的用马来酰亚胺部分官能化的 PEG 反应。Hb 的巯基化作用与巯基化 Hb 的 PEG-修饰可以同时进行, 或者在两步法中进行, 这也在本发明的范围内。至于该方法中使用的 PEG 的分子量, PEG 的分子量优选 3000-10,000 道尔顿, 更优选分子量为大约 5,000 道尔顿。在最优选的实施方案中, 从该方法获得的修饰 Hb 是不致高血压的。

[0028] 本发明的方法中, 可以从携带多个氧构象特异性反应巯基的哺乳动物 Hb(狗 Hb, 猫 Hb, 鸡 Hb, 鼠 Hb), 或在 α 和 β -链的所需位置带有另外的反应性半胱氨酸的重组人 Hb, 来直接制备修饰的 Hb, 其用经马来酰亚胺部分官能化的过量 PEG 处理以获得修饰的 Hb。

[0029] 该方法中的化学简明地表示在图 1A 和 1B 中。亚氨基四氢噻吩, 不携带游离的巯基, 一旦与 ϵ -氨基反应就原位产生巯基。衍生的 ϵ -氨基(一种脒)保持了该官能团的原始正电荷(图 1B)。因此, Hb 可以与 PEG-马来酰亚胺以及巯基化试剂一起孵育, 以产生 PEG 化的 Hb, 而没有巯基化试剂消耗 PEG-马来酰亚胺试剂的危险。PEG 化作用的水平可通过巯基化(亚氨基四氢噻吩与 Hb 反应)水平来测定。后者主要是由亚氨基四氢噻吩浓度, 以及在给定构象状态中 Hb 的 ϵ -氨基对亚氨基四氢噻吩脒化作用的反应性来决定。

[0030] PEG 化反应是灵活可变的, 因为该反应不依赖马来酰亚胺中 PEG 的分子大小, 以及 PEG-马来酰亚胺中马来酰亚胺与 PEG-链之间的连接化学。该方法可用于增加 Hb 的分子体积(大小)到任何所需的水平, 通过调节 Hb 的巯基化水平和/或 PEG-马来酰亚胺中 PEG 的分子量。保守的 PEG 化技术已优化用于生产具有高氧亲和力的多重、大小增加的 PEG 化 Hb。本发明修饰的 Hb 在净电荷和流体动力学体积方面都显示了高度的分子均一性, 其流体动力学体积相当于分子量 $\sim 250,000$ 道尔顿的球状蛋白的流体动力学体积。相信对不致高血压的 PEG 化的 Hb 的任何设计都应当试图利用很多较小的 PEG 链来掩蔽保护 Hb 的较大分子表面。

[0031] 参考下述的非限制性实施例可以更好地理解本发明。下述实施例的目的是为了更充分全面地解释本发明的优选实施方案, 而绝不能解释为对本发明范围的限制。

[0032] 实施例 1

[0033] 1、材料和方法

[0034] 血红蛋白。如前所述从红细胞溶解产物纯化人 HbA (Acharya 等人 1983)。

[0035] 合成马来酰亚胺苯基聚乙二醇 (MalPhePEG) 试剂。根据 Acharya, 等人 1996 的程序合成 PEG 5000 和 PEG 10000 的单功能马来酰亚胺苯基衍生物。马来酰亚胺乙基 PEG-5000 购自 Shaerwaters, Huntsville, Alabama。

[0036] HbA 与 MalPhe-PEG 试剂反应。血红蛋白 A (0.5mM) 溶于 PBS, pH 7.4, 与 10 倍摩尔过量的 Mal Phe PEG-5000 于 4°C 反应。PEG 对 HbA 的修饰可通过反相高压液相色谱 (RPHPLC) 和大小排阻色谱 (SEC) 进行监控。反应产物用 50mM Tris- 醋酸盐缓冲液 pH8.5 进行透析, 并通过离子交换色谱进行纯化。使用 AKTA Explorer 10 蛋白纯化系统, 在 Amersham Biosciences Q-Sepharose 高性能树脂上, 通过离子交换色谱对 PEG 化的 Hb 进行纯化。Q-Sepharose 高性能柱 (2.6cmx62cm) 用 50mM Tris- 醋酸盐缓冲液, pH 8.5 进行平衡, 蛋白用 8 倍柱体积的 50mM Tris- 醋酸盐, pH 8.5 和 50mM Tris- 醋酸盐, pH 7.0 组成的的线性降低 pH 梯度进行洗脱。柱流出液在 240 和 540nm 处监控。

[0037] 氧亲和力测定。使用 PBS pH 7.4 中的 Hem-O-Scan (Aminco), 以血红蛋白四聚体浓度 1mM, 于 37°C 测定氧平衡曲线。

[0038] 粘度测定。在流变仪中, 以蛋白浓度 4g/dl, 在 PBS 缓冲液 pH 7.4 中并于 37°C 测定 PEG 化 Hb 的粘度。在测定 Hb 样品的粘度之前, 仪器用去离子水校准。

[0039] 胶体渗透压测定。PEG 化血红蛋白的胶体渗透压使用 Wescor 4420 胶体渗透计进行测定。所有的测定都使用溶于 PBS pH7.4 的 2g/dl 血红蛋白样品于室温进行。使用 30kDa 的截断膜。样品测定之前, 仪器用 0 smoco11 参考标准进行测试。

[0040] PEG 化 Hb 的 RPHPLC 分析。各种 PEG 化 Hb 的球蛋白链通过 RPHPLC, 通过前面所述的方法进行分析。简单而言, 在 Vydac C4 (4.6x250mm) 柱上, 使用 100 分钟内含有 0.1% TFA 的 35-50% 乙腈的线性梯度进行分离。柱流出液在 210nm 处监控。

[0041] PEG 化 Hb 的血管活性。在仓鼠皮褶窗微循环模型中进行研究, 基本上根据先前所述的程序 (Mirhashemi 等人 1988, Tsai 等人 1996)。对体重 55-70g 的雄性 Golden Syrian 仓鼠 (Charles Rivers, USA) 进行研究。所有的动物研究由圣地亚哥的加利福尼亚大学动物项目委员会批准, 并根据用于实验室动物的护理和使用的 NIH 指南来进行 (NIH 出版物 #85-23Rev. 1985)。

[0042] 每只动物都用作其自己的基线。10% 的超容量灌输使用微灌输泵 (CMA 100 Microinjection Pump; CMA, Sweden), 通过颈静脉导管, 以 0.20ml/min 的速率灌输到动物中。灌输后立即以及灌输后 30min 测定血压, 小动脉直径和功能性毛细血管密度。

[0043] 通过亚氨基四氢噻吩进行 Hb 巯基化的动力学。可通过估计巯基化作用的程度来追踪亚氨基四氢噻吩对 Hb 的脬化作用。与一定量的亚氨基四氢噻吩一起孵育给定长度的时间后, 使用二硫代吡啶如 Ampsulki (1969) 所述评估 Hb 样品中的巯基数。4,4' 二硫代吡啶 (4-PDS, MW = 220.32, Aldrich Chemical Co.) 的母液, 通过把该试剂溶解在 PBS 中达到 3mM 的终浓度 (或者如果需要的话更高) 来制备。与亚氨基四氢噻吩一起孵育的 Hb 的等分试样, 与二硫代吡啶一起孵育, 并通过可于 324nm 处监控的 4-PDS 转化成 4- 硫代吡啶酮 (4-TP) 来评估蛋白上的反应性巯基数 ($\epsilon_{324} = 1.98 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)。

[0044] 亚氨基四氢噻吩依赖的巯基化作用介导的基于 PEG- 马来酰亚胺的 HbA 的保守性 PEG 化作用。磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 中的 HbA (0.5mM 四聚体), 在存在对亚氨基四氢噻吩而

言 2 倍摩尔过量的 PEG-5000 的马来酰亚胺 (马来酰亚胺) 苯基氨基甲酸酯 (BioAffinity System) 或马来酰亚胺乙基 PEG-5000 (Shearwaters) 或 PEG-1000 的马来酰亚胺苯基氨基甲酸酯时,与所需水平的摩尔过量的亚氨基四氢噻吩 (BioAffinity systems) 于 4° (或室温) 反应所需的一段时间。在 4°C 反应比在室温优选,因为室温时巯基化 Hb 的巯基发生一定量的氧化,甚至在存在 PEG-马来酰亚胺时,而这在 4°C 显著降低。PEG 化反应通常在蛋白浓度 0.5mM 时发生,但是它也可使用 Hb 浓度为 0.25mM 或者 1mM Hb 进行。

[0045] 巯基化作用介导的 PEG 化作用也以两步反应研究,首先使 Hb 与所需过量的亚氨基四氢噻吩一起孵育来进行 Hb 巯基化作用,然后添加所需摩尔过量 (相对于亚氨基四氢噻吩) 的 PEG-马来酰亚胺来完成巯基化 Hb 的 PEG 修饰。

[0046] 为了生产不致高血压的 Hb,使用对 Hb (表达为四聚体) 10 倍摩尔过量进行巯基化作用,以及用 20 倍摩尔过量的所需 PEG-马来酰亚胺进行巯基化蛋白的 PEG 化作用。这通常以一步反应进行,以减少巯基的氧化。如果在室温进行反应,一般需要 4 到 6 小时的反应时间来获得所需的分子。当在 4°C 进行反应时,通常进行过夜反应 (~ 16 小时)。

[0047] 使用 Ma1-Phe-PEG-10,000,通过巯基化作用介导的基于 PEG-马来酰亚胺的 PEG 化作用,以 0.25mM 的蛋白浓度进行 Hb 的表面装饰,因为以更高浓度的 Hb 进行反应导致不完全反应,可能是由于当使用 20 倍摩尔过量的 Ma1-PEG-2000 时,反应混合物的粘度较高。

[0048] 使用截断值为 12 到 14,000 道尔顿的透析袋,对反应产物用 PBS 进行广泛地透析。未反应的 (过量 PEG-马来酰亚胺) 透析出去;PEG 化产物使用连接到 Pharmacia Acta 上的 Superose 12 柱通过大小排阻色谱进行纯化。从而分离 PEG 化的 Hb, (PEG_{5K})₆-Hb 贮存于 -80° 直到进一步需要。

[0049] 对巯基化作用介导的基于 PEG-马来酰亚胺的 PEG 化作用的大小增加的测定。使用 Pharmacia FPLC 系统,分析 Hb 的大小增加与各种巯基化作用介导的基于 PEG-马来酰亚胺的保守性 PEG 化作用的关系。使用串联连接的 2 个 Superose 柱进行大小排阻色谱。使用 PBS pH7.4,以 0.5ml/min 的流速于室温以 300.15MHZ 于 29°C,使用 5mm 探针对样品进行洗脱。Hb 样品为在 0.1M 中 4 到 7% 浓度。

[0050] II. 结果

[0051] A) 保守性 PEG 化作用技术的开发

[0052] (i) HbA 的流体动力学体积增加作为巯基化作用介导的基于马来酰亚胺化学的 Hb 的 PEG 化作用的结果。缺乏和存在亚氨基四氢噻吩时,当 Hb 与 20 倍摩尔过量的 Ma1-Phe-PEG_{5K} 一起于室温孵育 4.5 小时时,Hb 的大小排阻色谱模式显示于图 2A 中。在缺乏亚氨基四氢噻吩本身时,Hb 用 PEG-Phe-PEG-5000 进行完全修饰 (图 2A, b)。未修饰的 Hb 于大约 57 分钟洗脱 (图 2A, a),而与 PEG-Phe-PEG 5K 一起孵育的 HbA 于大约 50 分钟洗脱。该产物的洗脱位置对应于在它的两个 Cys-93 (β) 处用 Ma1-Phe-PEG_{5K} 修饰的 Hb。具有在 Cys-93 (β) 处连接的各相应 PEG-链的 (SP-PEG_{10K})₂-HbA 以及 (SP-PEG_{20K})₂-HbA 的洗脱位置为该柱上大约 47 和 44 分钟,并标记作为参考。

[0053] 在 Hb 与 Ma 1-Phe-PEG 5K 的反应混合物中包括亚氨基四氢噻吩,该修饰的 Hb 比 (PEG_{5K})₂-HbA 的位置从大小排阻色谱柱中较早洗脱。新的 PEG-马来酰亚胺位点已经明显产生,从而在 Hb 上提供了新 PEG-马来酰亚胺反应位点。以亚氨基四氢噻吩浓度依赖性方式,该修饰的 Hb (PEG 化的 Hb) 在大小排阻色谱中较早洗脱。亚氨基四氢噻吩的浓度越高,修饰

的 Hb 洗脱的位置越早,表明 Hb 巯基化作用的水平增加,其作为反应混合物中亚氨基四氢噻吩浓度增加的函数,负责 Hb 表观分子大小的增加。存在 2.5mM 的亚氨基四氢噻吩(每个四聚体 5 倍摩尔过量)时产生的 PEG 化 Hb,在靠近 $(\text{SP-PEG}_{10\text{K}})_2\text{-HbA}$ 的位置洗脱(图 2A, d)。存在 5mM 亚氨基四氢噻吩时形成的样品,洗脱非常接近 $(\text{SP-PEG}_{20\text{K}})_2\text{-HbA}$ 的位置,但其流体力学体积比 $(\text{SP-PEG}_{20\text{K}})_2\text{-HbA}$ 的稍小(图 2A, e)。不过该物质在峰的上升侧有小的平缓区域(shoulder)。

[0054] 进一步增加亚氨基四氢噻吩的浓度到 7.5mM,而不改变 Mal-Phe-PEG 的浓度为同样的(10mM),PEG 化 Hb 峰的洗脱模式变得稍宽,但是作为平缓区域洗脱的产物产量只有较小的增加(数据未显示)。甚至增加亚氨基四氢噻吩的浓度到 10mM,洗脱模式也没有显著改变,除了在上升侧的平缓区域物质的浓度有较小改变之外。

[0055] PEG 的浓度对上升侧平缓区域的影响已经研究作为 PEG-马来酰亚胺浓度增加的函数。当 Mal-Phe-PEG 的浓度增加到接近图 2e 中使用的浓度的两倍时,该平缓区域显著减小(几乎消失),对主峰的洗脱位置的影响极小。

[0056] 10 倍摩尔过量的亚氨基四氢噻吩对 Hb 进行巯基化作用的动力学显示于图 2A 中(插图 a)。用 10 倍摩尔过量的亚氨基四氢噻吩巯基化的 Hb 平均每个四聚体携带~7 个反应 -SH 基(针对二硫代吡啶基),其中两个为 Cys-93(β)固有的 -SH 基,剩余的为通过使亚氨基四氢噻吩与 Hb 的反应性表面 ϵ -氨基(Hb 的 γ -巯基丁胺化)反应引入的内在巯基。由于已经使用了 10 倍摩尔过量的亚氨基四氢噻吩,巯基化作用的效率接近 50%。PEG 化 Hb 具有大约每个四聚体 0.5 摩尔的反应巯基(在非变性条件下),其表明,平均而言,在产生该 PEG 化 Hb 中接近~6.5 个拷贝的 PEG 链被引入到 Hb 上。

[0057] 蛋白浓度为 0.5mM 时 Hb 的巯基化作用也已经作为亚氨基四氢噻吩浓度的函数研究(图 2A,插图 b)。增加亚氨基四氢噻吩的浓度,从平均每个四聚体引入 5 个外在巯基的 10 倍摩尔过量到 30 倍,其几乎倍增巯基化 Hb 上的外在巯基数。然而,PEG 化作用中看到的大小增加仅是很小的,其表明 PEG 化 Hb 不能在巯基化 Hb 的所有外在巯基上反应。这些结果解释为表明在存在 10 倍摩尔过量的亚氨基四氢噻吩和 20 倍摩尔过量的 Mal-Phe-PEG_{5K} 时,Hb 的 PEG 化显著覆盖了 Hb 分子表面,产生“拥挤状况”,其中巯基化 Hb 处于通过该巯基化作用介导的 PEG-5000 马来酰亚胺依赖的 PEG 化作用的 PEG 增加 Hb 分子大小的该阶段,变得更抵抗对 PEG 化 Hb 的附加外在巯基的修饰。因此,对于所有的后续研究,利用 PEG 对 Hb 进行表面装饰而产生的 PEG 化 Hb,使用 10 倍摩尔过量的亚氨基四氢噻吩(相对于四聚体蛋白),存在 20 倍摩尔过量的 Mal-Phe-5000PEG。

[0058] (ii) 巯基化作用介导的基于马来酰亚胺-PEG 的 Hb PEG 修饰中的灵活可变性。使用 10 倍摩尔过量的亚氨基四氢噻吩和 20 倍摩尔过量的 PEG-马来酰亚胺,在 Superose 12 柱上进行大小排阻色谱作为检测系统,研究了温度, pH,连接化学,以及 PEG-马来酰亚胺中 PEG 的分子大小对 $(\text{PEG-5K})_6\text{-HbA}$ 形成的影响。当温度降低至 4°C 时,PEG-链与巯基化蛋白连接的速度似乎减缓,但是 Hb 的巯基化速度在很大程度上没有受到影响,进行该反应达 9 小时以确保反应完全,但是方便地通常选择过夜反应(14 到 16 小时)(图 2B,曲线 c)。两步法进行 PEG 化作用,首先巯基化,然后 PEG 化,也没有表现出影响大小增加(数据未显示)。在三种 pH 值, pH 6.5, 7.4 和 8.5 用 PEG 进行表面装饰。把使用 10mM 磷酸缓冲液在 pH 6.5, 7.5 和 8.5 时形成的 PEG 化产物,与在 PBS 中于 pH 7.4 时形成的产物进行了比较。所有的

产物在通过表面装饰获得的大小增加方面是相当的。

[0059] 用 PEG-5000 进行表面装饰时观察到的大小增加也是独立于连接化学的,使用马来酰亚胺-苯基-PEG-5000 获得的反应产物具有与用 PEG-乙基-PEG-5000 所产生的产物基本相同的流体动力学体积(图 2B, 曲线 d)。在给定的巯基化作用条件下, Hb 的大小增加对 PEG-马来酰亚胺中 PEG 的分子大小是敏感的。增加 PEG-链的质量从 5000 到 10,000, 观察到的大小增加高于用 PEG-5000 马来酰亚胺所观察到的(图 2B, 曲线 e)。

[0060] (iii) (PEG)₆-HbA 的纯化. 为了产生达 1gm 的 (PEG)₆-HbA 的物质, 开发了凝胶过滤方案。常规地将 HbA(0.5mm) 与 10 倍摩尔过量的亚氨基四氢噻吩以及 20 倍摩尔过量的马来酰亚胺 PEG 在磷酸缓冲盐溶液(pH 7.4) 中一起孵育 4 到 6 小时, 然后反应混合物用 100 倍过量的 PBS 进行透析更换 3 次, 以除去过剩的(未反应的)亚氨基四氢噻吩和马来酰亚胺 PEG。透析过的样品浓缩到大约 1mm, 并利用连接到 Pharmacia Acta Explorer 10 上的制备 Superose 12 柱进行凝胶过滤。在上面所讨论的条件下 PEG 化的 HbA 样品的典型色谱模式显示于图 6A 中。于 3 种波长监控洗脱, 以便于监控任何没有与 Hb 反应的 PEG-马来酰亚胺的洗脱。PEG 化 Hb 洗脱比存在于样品中的未反应 PEG-马来酰亚胺更前得多。凝胶过滤的 PEG 化样品浓缩到大约 6gms/dL。在巯基化作用介导的基于马来酰亚胺化学的 PEG 化反应过程中, 或者在后续的纯化步骤过程中, HbA 不经历任何可检测到的自动氧化而产生 met-Hb 型产物。PEG 化 Hb 样品可贮存于 -80°C 长达至少 1 年而不经历任何自动氧化。

[0061] (iv) 对由于 Hb 保守性 PEG 化作用而致的 Hb 大小增加进行定量. 把纯化的 (PEG-5K)₆-Hb 的洗脱模式与使用双马来酰亚胺苯基 PEG-600 在四聚体间交联桥的 $\alpha\alpha$ -富马酰 Hb 的洗脱模式进行了比较。(图 3, 插图, b 和 a)。如前面所述的, 保守性 PEG 化 Hb-(PEG-5K)₆-Hb, 稍小于 (PEG_{20K})₂-HbA, 但高于 (PEG_{10K})₂-HbA。它的流体动力学体积对应于分子量大约 250,000 道尔顿的球状蛋白的流体动力学体积。由于其上的 PEG 质量为 ~30,000, 因此计算的分子量只有 95,000 道尔顿。但它的流体动力学体积对应于分子量为 250,000 的蛋白的流体动力学体积。因此, 以 6 个拷贝的 PEG-5000 链引入 30,000 质量到 Hb 上, 等同于整合近 180,00 质量的球状蛋白到 Hb 上。从而, PEG 显示出增加 Hb 流体动力学体积的潜能, 其大约为紧密包装的球状蛋白的 6 倍。该结论与 Manjula et al(2002) 最近从他们的 PEG 化作用研究中得到的相似, 其中 PEG 化作用位点限于 Cys-93(β), 获得大小增加作为使用的 PEG-马来酰亚胺中 PEG 分子大小的函数。从而作为 PEG 化作用的结果发生的大小增加显示与连接到 Hb 上的总 PEG-质量直接相关, 而且当 PEG 质量以不同拷贝数呈现时是累加的。

[0062] 通过新的巯基化作用介导的基于马来酰亚胺化学的 PEG 化作用方案产生的 (PEG_{5K})₆-HbA 的大小排阻色谱模式, 与 Enzon(PEG_{5K})₁₀-Bv-Hb(一种非血管活性的 PEG 化的 Hb) 的大小排阻色谱模式进行了比较(图 3 插图, 曲线 c)。该物质在分子大小分布方面也相当均一, 正如 (PEG-5K)₆-Hb 那样。该 PEG 化的 Hb 具有每个四聚体 10 个拷贝的 PEG-5000(总 PEG-质量为 50,000), 并因此预期具有比 (PEG-5K)₆-Hb 更高的大小增加。然而, 对该 Hb 观察到的大小增加不如对 (PEG-5K)₆-Hb 观察到的那么多。这种异常的分子基础现阶段不是很显而易见的。另一方面, 鉴于每个四聚体的 PEG 质量与 (PEG-5K)₆-Hb 中的相当这一事实, PHP, 每个四聚体携带 10 个拷贝的 PEG-3000 的另一种 PEG 化 Hb, 将期望具有与 (PEG-5K)₆-Hb 相当的流体动力学体积。PHP 是非常不均一的(图 3, 插图, 曲线 d)。它携带一些量的大小增

加小于 $(\text{PEG}-5\text{K})_6\text{-Hb}$ 的物质,和一些大小增加与 $(\text{PEG}-5\text{K})_6\text{-Hb}$ 相当的物质,以及一些大于 $(\text{PEG}-5\text{K})_6\text{-Hb}$ 的物质。双功能 PEG-3000 用于表面装饰,以及该样品中存在四聚体内和或四聚体间的交联,可能促成了 PHP 中高水平的不均匀性。

[0063] B) $(\text{PEG}_5)_6\text{-HbA}$ 的分子,依数和功能表征。

[0064] (i) $(\text{PEG}_5)_6\text{-HbA}$ 的 $^1\text{H-NMR}$ 光谱学. Hb 的质子核磁共振光谱学是监控 HbA 的三级和四级结构改变的极好的工具,其中该变化在任何给定情景中伴随着化学修饰或突变。Cys-93(β) 位于分子的构象敏感区域, Cys-93(β) 对巯基特异性试剂的反应性是分子氧构象的独特特征,在脱氧结构中它是非反应性的。图 4A 对一氧化碳和脱氧形式的 $(\text{PEG}_{20})_2\text{-HbA}$ 和 $(\text{PEG}_5)_6\text{-HbA}$ 与 HbA 于 pH 7.0, 29°C 在 0.1M 磷酸缓冲液中的质子 NMR 光谱进行了比较。这两个样品每个四聚体中几乎相同量的 PEG 质量 [$(\text{PEG}_{20})_2\text{-HbA}$ 中 40,000 对 $(\text{PEG}_5)_6\text{-HbA}$ 中 30,000]。除了对 PEG 化样品由于 Hb 的 PEG 化作用的结果而致的分子大小的增加而观察到了较宽的共振外,在光谱范围 10 到 14ppm 的化学位移上没有显著差异,表明利用 PEG-20,000 仅仅在 Cys-93(β) 处或者利用 PEG-5000 在 Cys-93(β) 和 Hb 的至少 4 个其它的 ϵ -氨基处进行 Hb 的 PEG 化的结果,蛋白的 $\alpha_1\beta_1$ 界面没有改变。图 4B 对两种 PEG 化 Hb 的环流-位移 (ring-current-shifted) 质子共振,与一氧化碳形式的 HbA 的环流-位移质子共振进行了比较。环流位移质子共振中有某些改变,反映了在 PEG 化 Hb 样品的血红素的微环境中的某些扰动。图 4C 显示了脱氧形式的 PEG 化 Hb 的 α 和 β -链的近端组氨酸残基的超精细位移的 $N_\delta\text{H}^1\text{H}$ 共振。在 -75ppm 处的化学位移,其归于 β -链的近端组氨酸的 $N_\delta\text{H}$, 向前场位移了 -2 到 -3ppm, 其反映 PEG 化样品中 β -血红素环境的扰动。这种向前场位移在 $(\text{PEG}_{20})_2\text{-HbA}$ 中稍微比 $(\text{PEG}_5)_6\text{-HbA}$ 更显著。图 5D 对两种 HbA 的 PEG 化样品与脱氧形式的 HbA 的超精细位移和可交换质子共振进行了比较。超精细位移的共振比 HbA 的更宽。此外,在 16 到 24ppm 的光谱范围内有一些共振改变,其反映了作为分子 PEG 化作用的结果, Hb 的 β -血红素的微环境的改变。14ppm 处的共振,其归于 $\alpha_1\beta_2$ 亚基界面中 α -Tyr(42) 与 β -Asp(99) 之间重要的 H-键,在 PEG 化样品中没有改变。因此,在 PEG 化 Hb 的 $\alpha_1\beta_2$ 亚基界面没有改变。

[0065] (ii) $(\text{PEG}_5)_6\text{-HbA}$ 的分子半径. 通过动态光散射测定 $(\text{PEG}_5)_6\text{-HbA}$ 的分子半径,并与我们前面测定的 $(\text{PEG}_5)_2\text{-HbA}$ 和 $(\text{PEG}_{20})\text{-HbA}$ 的分子半径进行比较(参见表 I)。 $(\text{PEG}_5)_6\text{-HbA}$ 的分子半径为大约 6.8nm。该分子半径稍小于 $(\text{PEG}_{20})_2\text{-HbA}$ 的, $(\text{PEG}_{20})_2\text{-HbA}$ 的分子半径先前估计为 7.04。 $(\text{PEG}_5)_2\text{-HbA}$ 和 HbA 的值分别为 4.2 和 3.1。因此,当用大约 6 个拷贝的 PEG-5K 链进行表面装饰时, HbA 的分子半径超过加倍,即使加到该蛋白上的质量为仅仅大约 30,000。从而 $(\text{PEG}_5)_6\text{-Hb}$ 显示了增加的分子大小,其为对分子量为 94,000 的球状蛋白所预期的,而且在该 Hb 的大小增加区域的 PEG 的包装不象在蛋白核心一样致密。Enzon PEG Bv-Hb(其分子量为 114,000) 的分子半径小于 $(\text{PEG}_5)_6\text{-Hb}$, 为 5.53nm, 接近 $(\text{PEG}-10\text{K})_2\text{-HbA}$ 和 $(\text{PEG}-5\text{K})_4\text{-狗Hb}$ 的分子半径。还可注意到利用 Ma1 乙基 PEG-5000 产生的 $(\text{PEG}_5)_6\text{-Hb}$ 的分子半径差不多比利用 Ma1-Phe-5000 产生的小 10%。 $(\text{PEG}-10\text{K})_6\text{-Hb}$ 的分子半径为大约 9.8, 因此需要使用更高分子大小的 PEG 来获得分子半径大于用 $(\text{PEG}-5\text{K})_6\text{-HbA}$ 获得的 7nm 的 PEG 化 Hb。

[0066] (iii) 通过保守和非保守 PEG 化作用方案产生的 PEG 化 Hb 的分子密度比较. 由于通过 PEG 化作用获得的大小增加(流体动力学体积增加),几乎比在球状蛋白中的有效

6 倍（在同等质量的基础上），意味着在增加体积的 PEG 化 Hb 中原子的分子密度低于紧密的球状蛋白中。在表 I 中也给出了增加分子体积的不同 PEG 化 Hb 中 PEG 的分子密度。随着连接到 Cys-93(β) 上的 PEG 的分子量从 5000 增加到了 20,000, 增加分子体积的 Hb 中 PEG 的分子密度几乎降低了 50%。分子密度的降低意味着 PEG- 链间的相互作用降低, 以及给定的 PEG 化 Hb 的 PEG- 壳内的溶剂分子的占据增加。当 PEG 壳内的 PEG 密度低时, 可认为位于“蘑菇构象”中, 而当 PEG- 壳中的密度高时, 它可以被认为是处于“刷状缘构象”中, 而且 (PEG₅)₆-Hb 中, PEG- 壳的分子密度甚至小于 (PEG₂₀)₂-Hb 中的分子密度。另一方面, Enzon PEG Bv-Hb 的 PEG- 壳的分子密度很高, 表明其 PEG- 壳内的 PEG- 链之间的相互作用比 (PEG₅)₆-Hb 的 PEG- 壳中的 PEG- 链之间的相互作用强。该研究清楚地反映了, Enzon PEG 化 Hb 与通过保守的 PEG 化技术产生的新 PEG 化 Hb 之间在 PEG- 链的包装上的差异。由保守的 PEG 化作用产生的样品可以被认为处于“蘑菇构象”, 而 Enzon PEG 化样品处于“刷状缘样构象”。

[0067] (iv) (PEG₅)₆-HbA 的依数性. 图 5 比较了 (PEG₅)₂-HbA 与 (PEG₅)₆-HbA 的粘度作为蛋白质浓度的函数, 其范围为 1 到 10gm/dl。随着蛋白质的浓度从 1gm/dl 增加到 10gm/dl, (PEG₅)₂-HbA 的粘度只显示小的粘度增加, 并且 PEG 化溶液的粘度显示与蛋白质浓度成正比。另一方面, 即使 (PEG₅)₆-HbA 溶液的粘度与 (PEG₅)₂-HbA 的高度稀释溶液的粘度相当 (1gm/dl), 前者的粘度随蛋白质浓度呈指数级增加。还显示了浓度为 1 到 5gm/dl 的携带 10 当量的 PEG-5K 链（通过异肽键连接到牛 Hb 的 α 和 ϵ -氨基）的 Enzon PEG 牛 Hb 的粘度来进行比较。在所有研究的浓度, Enzon PEG 牛 Hb 的粘度与 (PEG₅)₆-HbA 的粘度相当。该结果表明键的化学性质和 PEG 化作用的位点强烈影响 PEG 化作用, 或者在存在每个四聚体 6 个拷贝的 PEG-5K 链时 PEG 化 Hb 溶液的粘度达到饱和值。

[0068] 图 6 显示了 PEG 化 Hb 样品的胶体血液渗透压, 作为蛋白质浓度的函数。样品的胶粒渗透压增加, 作为蛋白质浓度的函数。(PEG₅)₂-HbA 的这种增加是小的, 并且看起来随蛋白质的浓度（在 1 至 6.8gm/dl 范围内）线性增加。另一方面, (PEG₅)₆-HbA 溶液的胶粒渗透压随增加的蛋白质浓度而指数级增加。同样, 当浓度匹配时, Enzon (PEG₅)₁₀-Bv-Hb 的胶粒渗透压与 (PEG₅)₆-HbA 的胶粒渗透压相当。该结果表明, PEG 化 Hb 样品的胶粒渗透压与样品的粘度直接相关。

[0069] (v) (PEG₅)₆-HbA 的功能特性. 表 I 显示了 50mM Bis-Tris/50mM Tris 醋酸盐中, pH 7.4 以及 37°C 时, (PEG₅)₆-HbA 的氧亲和力, 以及在存在变构效应物时它的调节。随着 HbA 的 PEG 化作用, Hb 的 P₅₀ 降低（增加的氧亲和力）, 从对照值的 8.0 到 6.5。存在 5 倍过量的 DPG 时, 通过结合于 $\beta\beta$ - 裂缝而降低 HbA 的氧亲和力的效应物对其氧亲和力没有显著影响。另一方面, 存在 1M 氯化钠会稍微降低 PEG 化 Hb 的氧亲和力 (P₅₀ 从 6.5 增加到 8.5), 并与缺乏氯化物时未修饰的 HbA 相当。另一方面, 未修饰的 Hb 的氧亲和力, 在存在 1.0M 的氯化物时显著地降低。在存在 L-35（通过结合于分子的 $\alpha\alpha$ - 末端降低 Hb 的氧亲和力的变构效应物）时, 增加的 (PEG₅)₆-HbA 的 P₅₀ 具有一定的氧亲和力降低影响, 但是显著低于对未修饰的 HbA 观察到的。因此, 巯基化作用介导的基于马来酰亚胺化学的 PEG 化 HbA 几乎完全抑制了 HbA 对 DPG 存在应答的倾向, 并且强烈降低该分子对氯化物和 L-35 应答的倾向。

[0070] 还在 PBS 中测定了 (PEG₅)₆-HbA 的氧亲和力, 因为处于循环中的样品的值应该与

在 PBS 中的相当。与对照 HbA ($P_{50} = 15\text{mm Hg}$) 相比,甚至在 PBS 中, $(\text{PEG}_5)_6\text{-HbA}$ 显示较高的氧亲和力 ($P_{50} = 9.5\text{mm Hg}$)。 $(\text{PEG}_5)_6\text{-HbA}$ 的氧亲和力仅仅稍微高于 $(\text{PEG}_5)_2\text{-HbA}$ ($P_{50} = 11.8$) 的氧亲和力。因为 $(\text{PEG}_5)_6\text{-HbA}$ 具有如 $(\text{PEG}_5)_2\text{-HbA}$ 中一样修饰的 Cys-93 (β), 此外在 HbA 的赖氨酸残基的 ϵ -氨基上进行了另外的修饰, 氧亲和力结果表明 HbA 的 ϵ -氨基的巯基化作用介导的 PEG 化作用本身不显著地影响 Hb 的氧亲和力。利用马来酰亚胺-乙基- PEG_{5K} 对 HbA 进行巯基化作用介导的表面装饰: 商业可获得的马来酰亚胺 PEG- 试剂在马来酰亚胺部分与 PEG- 链之间具有烷基间隔连接。为了建立这里开发的新 PEG 化方法对马来酰亚胺烷基 PEG 试剂的一般原则, 我们在巯基化作用介导的基于马来酰亚胺化学的反应中用 Mal-乙基- PEG_{5K} 代替 Mal-Phe- PEG_{5K} 。 HbA 与该 PEG 的反应也象期望的那样进行, 除了反应效率稍微降低外。产生的并期待携带平均 6 个 PEG- 链的产物 $[(\text{SE-PEG}_{5K})_6\text{-HbA}]$, 产生类似于 $(\text{SP-PEG}_{5K})_6\text{-HbA}$ 的凝胶过滤模式, 除了在凝胶过滤上有点延迟洗脱外。此外如表 2 中所示, $(\text{SE-PEG}_{5K})_6\text{-HbA}$ 的分子半径稍微小于 $(\text{SP-PEG}_{5K})_6\text{-HbA}$ 的分子半径。

[0071] B. $(\text{PEG}_{5K})_6\text{-HbA}$ 的高血压活性

[0072] (i) 在仓鼠中通过 10% 最大负荷实验进行研究。通过在仓鼠皮褶窗模型中进行 10% 最大负荷实验中, 测量平均动脉压以及测量小动脉的直径 (A_2), 研究了以 2 个和 6 个拷贝的 PEG_{5K} 链进行 PEG 化作用后 Hb 的血管收缩活性的改变。如图 7A 所示, $(\text{PEG}_{5K})_2\text{-HbA}$ 灌输引起在几分钟内消退的血压的立即增加。另一方面, $(\text{PEG}_{5K})_6\text{-HbA}$ 的样品在相同的期限内没有引起血压的改变。图 7B 比较了用 10% 的最大负荷的 $(\text{PEG}_{5K})_2\text{-HbA}$ 与 $(\text{PEG}_{5K})_6\text{-HbA}$ 溶液灌输仓鼠不同时间期限之后的动脉直径。 $(\text{PEG}_{5K})_6\text{-HbA}$ 样品保留了比 $(\text{PEG}_{5K})_2\text{-HbA}$ 样品更接近起始值的肺泡直径。这些分析证实了无细胞 Hb PEG 化到 6 个拷贝 PEG_{5K} 链的水平抑制了无细胞 Hb 的内在血管活性至显著水平。

[0073] (ii) 用 $(\text{PEG}_{5K})_6\text{-HbA}$ 进行 50% 换血对仓鼠中功能性毛细血管密度的影响。图 8 描绘了在用 $(\text{PEG}_{5K})_6\text{-HbA}$ 进行 50% 换血的仓鼠中毛细血管血流, 并与用对照 (无换血) 以及用 $\alpha\alpha$ -富马酰 HbA 进行 50% 换血的毛细血管血流进行比较。由此, 显然用 $(\text{PEG}_{5K})_6\text{-HbA}$ 进行 50% 换血的仓鼠保持了高的毛细血管密度, 而 $\alpha\alpha$ -富马酰 HbA 显著地降低了功能性毛细血管密度。因此, 用 PEG-5000 链对 Hb 进行表面装饰可以中和无细胞 Hb 的内在血管收缩活性。

[0074] III. 讨论

[0075] 已经开发了一种通过 PEG 化作用增强 Hb 的分子大小而不改变该蛋白质的表面电荷的新的, 简单并灵活的方案。这包括在氧或脱氧条件下通过与亚氨基四氢噻吩反应活化 Hb 的一组 ϵ -氨基作为 PEG 马来酰亚胺反应性位点 (巯基化作用), 然后用所需的 PEG- 马来酰亚胺修饰巯基化 Hb。该方法已经最佳化以产生携带 6 个拷贝的 PEG-5000 的 PEG 化 Hb, 而且已经发现这是不致高血压的。

[0076] 缺乏亚氨基四氢噻吩时, 利用 PEG- 马来酰亚胺在氧条件下进行 Hb 的 PEG 化作用限于对 Cys-93 (β) 的修饰, 也即, 每个四聚体 2 个拷贝。该 PEG 化的 Hb 显示与分子量为 128KDa 的球状蛋白质相当的流体动力学体积。其他的 4 个半胱氨酸残基被掩盖, 并且不能使用的反应条件下与 PEG 马来酰亚胺反应。Cys-93 (β) 也不能用于与 PEG- 马来酰亚胺反应。

[0077] 以亚氨基四氢噻吩浓度依赖性方式, 亚氨基四氢噻吩激活 Hb 的一些 ϵ -氨基作

为 PEG-马来酰亚胺的反应位点。亚氨基四氢噻吩, γ -巯基 butyrimidate 的环化形式, 不携带游离的巯基, 并且一旦它与 ϵ -氨基反应就原位产生巯基。经其与 Hb 反应, 衍生一组酰胺化物反应性 ϵ -氨基作为 γ -巯基 butyrimidinyl 部分, 在远端具有游离的 -SH 基团。 ϵ -氨基的内在正电荷在该衍生的 ϵ -氨基中得以保存。这些新的外在巯基为官能化作为马来酰亚胺的所需分子大小的 PEG-链附着所靶向的位点。然而, 利用 PEG 与马来酰亚胺之间的烷基接头或烷基酰胺接头把 PEG 官能化作为马来酰亚胺的其他方法是同样有效的 PEG 化剂, 也即, 该 PEG 化反应是基于马来酰亚胺化学作用的。这种 PEG 化作用的方法因此具有保留 PEG 化 Hb 中的 Hb 的净电荷的优点。

[0078] 与 10 倍摩尔过量的亚氨基四氢噻吩一起孵育的氧 Hb 几乎激活 Hb 的 5 个 ϵ -氨基作为 PEG-马来酰亚胺反应位点。当 20 倍摩尔过量的 PEG-马来酰亚胺与 10 倍摩尔过量的亚氨基四氢噻吩一起存在时, 产生具有平均 6 个 PEG_{5k}-链的 PEG 化产物 [(PEG₅)₆-Hb]。引入的 6 个 PEG-链中的 2 个位于 Cys-93(β) 的巯基上, 其余的位于 Hb 的巯基化 Lys 残基上。携带 6 个 PEG-5000 链的 Hb 看起来产生了一定程度的对引入另外的 PEG-5000 链的抗性。是否这反映了 Hb 上一定程度的均一表面覆盖, 遮蔽了通过亚氨基四氢噻吩激活的 Hb 的其他表面 α -氨基的巯基使其不能与 PEG 马来酰亚胺反应, 暂时还不清楚。

[0079] 计算的 (PEG₅)₆-Hb 的质量为 ~ 94 Kda。然而, 在大小排阻色谱法中, (PEG₅)₆-Hb 的行为如同它的分子大小为 250kDa 数量级, 即 (PEG₅)₆-Hb 显示了相当于分子量为 ~ 250 KDa 的球状蛋白质的流体动力学体积。因此, 在球状蛋白质的分子尺度上, PEG 链增加了 Hb 的流体动力学体积, 分子体积几乎为球状蛋白质的 6 倍。

[0080] 早先利用 PEG-马来酰亚胺产生的 PEG 化 Hb 的分子体积的增加, 与在目前研究中用赋予这种大小增加的 PEG 质量所产生的 PEG 化 Hb 的分子体积的对比表明, 在每种产物内 PEG-链的包装是不同的。在以前的位点特异性 PEG 化产物研究中, PEG-链的分子量增加降低了增加大小的 Hb 分子的 PEG-壳中的 PEG 的分子密度。这可以解释为 PEG 链的分子大小锚定于 2 个 Cys-93(β), 它们之间可以彼此相互作用, 从而增加其中 PEG-链存在于分子运动中的分子体积(蛋白质周围的 PEG 壳)。当由 6 个 PEG-5000 链产生 Hb 周围的 PEG-壳时(2 个位于 Cys-93(β) 上, 其它的 4 个位于亚氨基四氢噻吩激活的 α -氨基上), 仿佛达到用于它们的分子运动的最大空间。对 (PEG₁₀)₆-Hb 进行初步计算, 表明在其内 PEG-链弯曲的分子空间具有与 (PEG₅)₆-Hb 的 PEG-壳相当的分子密度, 或可能甚至比 (PEG₅)₆-Hb 更低的密度。

[0081] 一个惊奇观察是 Enzon PEG Hb 的 PEG-壳的分子密度显著高于 (PEG₅)₆-Hb 的 PEG-壳的分子密度的事实。这 2 种 PEG 化 Hb 利用两种非常不同的化学作用组装。本发明的 PEG 化作用利用保守的方案进行, 因此 Hb 分子的净电荷保留在 PEG 化产物中, 即在 PEG 化 Hb 中蛋白质的水化层应当经历有限的微扰。Enzon PEG 化作用利用非保守性方法进行, 其中衍生的 α 与 α 氨基的原始正电荷不保留在最终产品中。因此, 该方法预期会扰乱蛋白质的水化壳。无论分子基础是什么, 这两种方法看起来已经产生了 Hb 周围的 PEG-壳, 其具有在禁闭 Hb 分子的 PEG-壳内的非常不同的 PEG-链结构(分子密度)。

[0082] 利用马来酰亚胺-乙基-PEG 5000 产生的 (PEG₅)₆-Hb 的 PEG-壳的分子密度高于利用马来酰亚胺-苯基-PEG 5000 产生的 (PEG₅)₆-Hb 的 PEG-壳中的分子密度, 但是不象 Enzon PEG-Hb 的 PEG-壳中的分子密度一样高。描述 PEG 与官能化基团之间的缀合连接与间隔键

的锚定位点处 PEG- 链的化学作用位于三种产物中,下面用图解法比较了琥珀酰亚胺基苯基 PEG 化 Hb,琥珀酰亚胺基乙基 PEG 化 Hb 和乙酰氨基 PEG 化 Hb。马来酰亚胺苯基 PEG 化 Hb 和马来酰亚胺乙基 PEG 化 Hb 都具有作为共同的分子实体的活化臂 (γ - 巯基丁酰亚胺基),缀合基团(琥珀酰亚胺基)。Mal-Phe-PEG 试剂具有作为 PEG 链与缀合臂之间的接头的苯基乙基氨基甲酸酯,而 Mal- 乙基 -PEG 试剂具有乙基接头。因此,在前者的情况下,利用较长的接头链,而且在该接头中存在苯基,使链在该锚定部分较刚性,而在后面的使 PEG 链连接到 Hb 上的情况中,缺乏苯基环产生更程度的旋转自由。另一方面,Enzon PEG-Hb 没有活化臂,由此其 PEG- 链更接近蛋白质表面。它具有作为缀合基团的乙酰胺基部分,没有缀合单元与 PEG- 链之间的连接基团。因为缀合臂的异肽键期望具有部分双键特性,还可以预期该 PEG 化作用的化学方法内在的一定程度的刚性。因此,在 Enzon 策略中(保守的 PEG 化方法),使 PEG 很接近蛋白质表面(离 ϵ - 氨基的原始正电荷 2 到 **3Å** 内),而巯基化作用介导的基于 PEG 马来酰亚胺的 PEG 化作用使 PEG- 链位于离蛋白质表面有一段距离处(在延伸构象中远离 ϵ - 氨基的原始正电荷大约 15 到 **21Å**)。因此,保守的 PEG 化作用产生的 PEG- 壳可以具有蛋白质核心与 PEG- 壳之间有明显边界的 Hb 水合球面。这表明 PEG 化 Hb 的 PEG- 壳内的 PEG 的分子密度与连接化学作用(PEG 与马来酰亚胺之间的连接)和偶联化学作用 -PEG 与 Hb 侧链之间的连接均相关。

[0083] 本发明重要发现是 $(\text{PEG}_{5\text{K}})_6$ -Hb 是不致高血压的。 $(\text{PEG}_{5\text{K}})_6$ -Hb 的物理 / 化学特性导致中和了无细胞 Hb 的内在致高血压活性。 $(\text{PEG}_{5\text{K}})_6$ -HbA 无疑是一种大小增加的 Hb 分子。增加 Hb 的分子大小是发展用于克服 Hb 的高血压活性的早期设计策略之一,其基于 Hb 外渗到胞间隙中的观念,并且因此将在捕获 NO 方面比在血浆中循环的 Hb 更有效。这种观念似乎得到 250kDa 范围内的分子大小的低聚化 Hb 较少血管活性的观察结果的支持。有趣的是注意到,Matheson 等最近已经生产了分子大小远远超过 300kDa,并且平均分子半径 24nm(半径分布在 12-33nm 之间的不均一产品)的低聚化产物,其不出现在肾门淋巴中,指示缺乏外渗。该产物也完全抑制了升压反应。Sakai 的观察证明分子大小与升压效应度之间的相关性,升压反应的程与分子大小成反比。直径接近 1000nm 的包囊的 Hb 不产生血管收缩。然而, $(\text{PEG}_{5\text{K}})_6$ -Hb 的分子大小仅仅为大约 7nm,与处于临床试验的许多目前的低聚化 Hb 的分子大小相当。因为这些中的大多数显示不同程度的血管收缩,大小增加本身不会是使 $(\text{PEG}_{5\text{K}})_6$ -Hb 不致高血压的主要因素。

[0084] 然而,本发明的保守 PEG 化 Hb,携带平均 6 个拷贝的 PEG-5000 链,是不致高血压的,并且显示出接近 Enzon PEG-Hb 的粘度与胶粒渗透压的事实,揭示了本发明的新的保守的 PEG 化技术的一些潜在的优点。(i) 具有每一四聚体 6 个拷贝的 PEG-5000 链的 Hb 的保守 PEG 化作用,产生的大小增加(增加流体动力学体积)优于以 10 个拷贝的 PEG-5000 链对牛 Hb 的非保守 PEG 化作用所产生的大小增加。(ii) 保守的 PEG 化作用增加流体动力学体积的较高效率表明,PEG- 链在 Hb 的分子表面上的包装密度较低。这与 Hb 分子周围的 PEG- 链产生的新水化壳(充水的外壳)中 PEG 的计算分子密度一致。(iii) 保守的 PEG 化作用技术比非保守 PEG 化作用更高效地增加了粘度和胶粒渗透压;当对共价结合到 Hb 上的 PEG-5000 链标准化比较时这显而易见。这表明在测定与用 PEG 进行表面装饰有关的粘度变化中,在通过 PEG 化作用在 Hb 周围产生的新 PEG 壳中 PEG 的分子密度的可能作用,以及它们产生不致高血压的 Hb 分子的倾向。

[0085] 基于 Hb 的载氧体的早期设计企图模仿红细胞的氧亲和力,以具有低的氧亲和力。Enzon 选择牛 Hb 产生 PEG 化 Hb,将赋予最终产物低氧亲和力。虽然牛 Hb 的氧亲和力并非保守性 PEG 化作用增加,本发明保守地 PEG 化 Hb 的氧亲和力显著高于 Enzon PEG 化 Hb 的氧亲和力。自动调节理论显示,当灌输低氧的基于 Hb 的载氧体时,发生血管收缩作为循环的动脉侧过量供氧的结果。预计通过增加基于 Hb 的载氧体的氧亲和力可以减少血管收缩。 $(\text{PEG}_{5\text{K}})_6\text{-HbA}$ 的氧亲和力高于 Enzon PEG-Hb 的氧亲和力,而且本发明仅具有 6 个拷贝的 PEG-5000 链的保守 PEG 化 Hb 的不致高血压的方面(与具有稍微低于本发明保守 PEG 化 Hb 的氧亲和力的 Enzon PEG-Hb 中 10 个拷贝的 PEG-5000 相比)可能是本制品的较高的氧亲和力的贡献的反映。因此我们推测 $(\text{PEG}_{5\text{K}})_6\text{-Hb}$ 的不致高血压的特性是多因素事件,而且要求设计多种 Hb,其模仿 Hb 的仅仅一个物理或功能特性,并建立这些分子的血管活性。

[0086] $(\text{PEG}_{5\text{K}})_6\text{-Hb}$ -保守地 PEG 化 Hb 具有许多这些年来已经发展的最小化无细胞 Hb 的血管活性所需要的属性:(i)Hb 氧亲和力增加以限制无细胞 Hb 在血管活性小动脉中的氧卸载;(ii)保留协同结合以确保毛细血管床中的氧卸载;(iii)增加的分子大小(流体动力学体积)以减少外渗;(iv)Hb 溶液的粘度增加以在小动脉壁上产生适当的剪切应力,并降低对于氧 Hb,和氧,二氧化碳和/或一氧化氮的扩散常数;和(v)比传统修饰的 Hb 增加的胶体渗透压,其增加了血液代用品的有效性,作为一种在许多血浆扩容剂的制剂中特色设计的血浆扩容剂。因此, $(\text{PEG}_{5\text{K}})_6\text{-Hb}$ 的观察结果是不惊奇的。

[0087] 虽然赋予 $(\text{PEG}_{5\text{K}})_6\text{-Hb}$ 的多种物理参数和功能特性的本性现阶段是不明确的,该新的保守地 PEG 化 Hb 应该被认为是一类新的基于 Hb 的载氧体的成员,其远离开基于 Hb 的载氧体的常规设计策略。这里也应该注意,赋予一组依数性质和氧亲和力本身不足以使 Hb 分子不致高血压。如同 Manjula 等最近所示的,增加高氧亲和力(其氧亲和力与 $(\text{PEG}_{5\text{K}})_6\text{-Hb}$ 的氧亲和力相当)PEG 化 Hb[在 Cys-93(β) 处位点特异性地 PEG 化]的分子体积,其粘度和胶粒渗透压增加,但是在 Hb 的血管活性方面没有任何显著的变化。另一方面,每一四聚体低于 $(\text{PEG}_{20})_2\text{-Hb}$ 的 PEG-链净重的 $(\text{PEG}_{5\text{K}})_6\text{-Hb}$ 是不致高血压的。相对于 2 个拷贝的 PEG-20K 所提供的,6 个拷贝的 PEG-5K 链对 Hb 的分子表面的更好的保护可能是对该观察结果最好的解释。这提出了一个重要的问题,即 PEG-5K 链在 Hb 的分子表面上的位置是否在对 Hb 分子表面的保护中起任何作用,倘若如此这可能是由亚氨基四氢噻吩介导的 Hb 的巯基化作用提供的。鉴定通过亚氨基四氢噻吩巯基化的 Hb 的位点,并制备具有明确限定 PEG-5000 链拷贝数的位点特异性 PEG 化 Hb 对于洞察 PEG 化反应的这一方面是关键性的。因为 Enzon PEG 化 Hb-不致高血压的 Hb 的第一个实例属于携带 10 个 PEG-链的 PEG 化类别,当非保守性的方法用于产生 PEG 化 Hb 时,是否需要较高水平的 Hb 的 PEG 化作用来产生不致高血压的 Hb,以及产生不致高血压的 Hb 所需的 PEG 化作用、氧亲和力的最佳水平是什么,都还是不清楚的。

[0088] 具有 PEG-5000 链的分子的亚氨基四氢噻吩依赖性巯基化作用介导的基于 PEG-马来酰亚胺的以 PEG-5000 链对分子进行表面装饰克服了在发展基于 Hb 的载氧体方面目前主要的障碍,即无细胞 Hb 的致高血压活性。这里开发的 PEG 化作用技术很简单,可以在氧条件下进行,而且不包括麻烦的色谱分析提纯方法来分离 PEG 化的 Hb。在该设计中,保守的 PEG 化作用技术,专门考虑了用于最小化副反应的问题,尤其是与酰化反应-用于开发 Enzon PEG 化 Hb 的非保守性 PEG 化反应相比。亚氨基四氢噻吩对 Hb 的 ϵ -氨基的脒化作

用的选择性,高效率的衍生作用,显著高于利用活性酯或者酞对 α 和 ϵ -氨基的酰化,是这种新 PEG 化方法的一些有利的方面。亚氨基四氢噻吩以及 PEG-马来酰亚胺的稳定性显著高于 PEG-酸的琥珀酰亚胺基活性酯和酸酐。因此,通过亚氨基四氢噻吩介导的保守性巯基化作用引入给定数目的 PEG-链所需的过量 PEG-马来酰亚胺,将显著低于在用于产生早期类型的不致高血压的 PEG 化 Hb 的非保守性 PEG 化方法中所需的过量 PEG-马来酰亚胺。通过该技术生产不致高血压的 Hb 分子不需要复杂的脱氧作用装置。因此,该新 PEG 化技术用于产生不致高血压的 Hb 是很经济合算的。

[0089] 表 I :用 MaI-Phe-PEG 进行 PEG 化的 HbA 的分子大小

[0090]

样品	质量 道尔顿	半径 nm	分子 体积 nm ³	PEG 质 量 道尔顿	体积 增加	PEG 质量/Inc. 体积 (PEG 壳中 的分子密度)
HbA	64000	3.12	127	0	-	-
P5K2-HbA	74000	4.2	310	10000	183	54.6
P10K2-HbA	84000	5.54	712	20000	585	34.2
P20K2-HbA	104000	7.0	1436	40000	1309	30.6
P5K6-HbA	94000	6.81	1322	30000	1195	25.1
P10K6-HbA	124000	9.25	3314	60000	3186	18.8
Enzon PEG-Hb (P5K10-牛 Hb)	114000	5.53	708	50000	581	86.1
八聚体	128000	4.12	293	-	-	-
十二聚体	192000	5.56	720	-	-	-

[0091] 表 II : (PEG_{5K})₆-HbA 的氧亲和力及其通过变构效应物的调节

	缓冲液	HbA	(PEG _{5K}) ₆ -HbA
	没有效应物	8.0 (2.5)	6.5 (2.2)
[0092]	DPG	22.5 (2.3)	5.5 (2.0)
	NaCl	24.0 (2.4)	8.2 (1.9)
	L35	57.0 (1.7)	12.0 (1.5)
	PBS	15.3 (2.7)	8.5 (1.8)

[0093] 样品的氧亲和力利用 Hem-O-scan 在 50mM Bis-tris/50mM tris 醋酸盐, pH 7.4 中于 37°C 测定。蛋白质浓度保持在大约 0.6mM。

[0094] 分析的样品具有低于 2% 的 met Hb。

[0095] 引用参考文献列表

[0096] Savitsky J, Doczi J, Black J 等人 A clinical safety trial of stroma-free hemoglobin. Clin Pharmacol Therap 1978 ;23 :73-80.

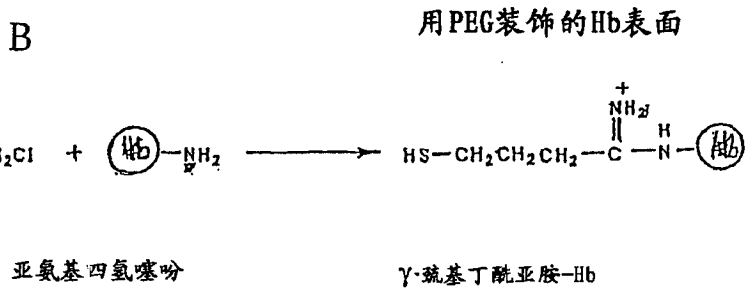
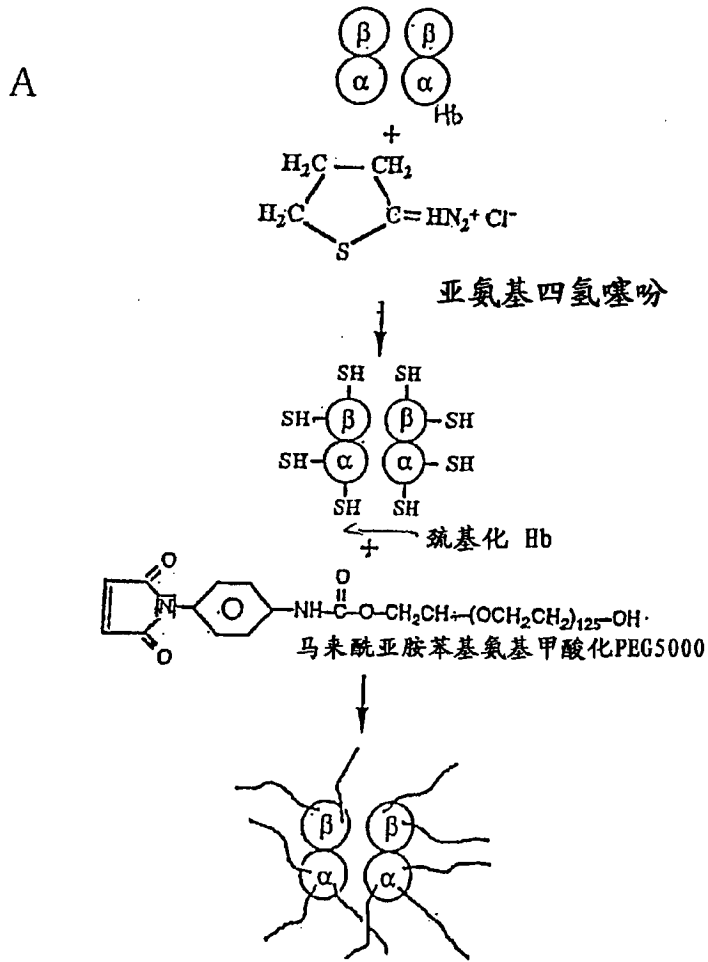
[0097] Sloan EP, Koenigsberg M, Gens D 等人 Diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) in the treatment of severe traumatic hemorrhagic shock. A randomized controlled efficacy trial. J Amer Med Assoc 1999 ;282 :1857-64.

- [0098] Saxena R, Wijnhoud AD, Carton H 等人 Controlled safety study of a hemoglobin-based oxygen carrier, DCLHb, in acute ischemic stroke. *Stroke* 1999 ;30 : 993-6.
- [0099] Hess, J. R. , Macdonald, V. W. and Brinkley, W. W. (1993) Systemic and pulmonary hypertension after resuscitation with cell free hemoglobin. *J. Appl. Physio.* 74 : 1769-1778.
- [0100] Thomson, A. , McGarry, A. E. , Valeri, C. R. and Lieberthal. W. (1994) Stroma-free hemoglobin increases blood pressure and GFR in the hypotensive rat: role of nitric oxide. *J. Appl. Physio.* 77 :2348-2354.
- [0101] Muldoon, S. M. , Ledvina, M. A. , Hart, J. L. and Macdonald, V. W. (1996) Hemoglobin-induced contraction of pig pulmonary veins. *J. Lab. Clin. Med.* 128 : 579-584.
- [0102] Macdonald, V. W. and Motterlini. R. (1994) Vasoconstrictor effects in isolated rabbit heart perfused with bis(3,5-dibromosalicyl)fumarate crosslinked hemoglobin. *Artificial Cells, Blood Substitutes and Immobilization Biotechnology* 22 :565-575.
- [0103] Furchgott, R. (1984) The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. *Ann. Rev. Pharmacol.* 24 :175-197.
- [0104] Kilbourn, R. , Ghislaire, J. , Casson, B. , DeAngelo, J. and Bonaventura. J.
- [0105] (1994) Cell-free hemoglobin reverses the endotoxin mediated hyporesponsivity of aortic rings to α -adrenergic agents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199 :155-162.
- [0106] Doherty DH, Doyle MP, Curry SR 等人 Rate of reaction with nitric oxide determines the hypertensive effect of cell-free hemoglobin. *Nature Biotechnology* 1998 ;16 :672-6.
- [0107] Winslow, R. M. , Gonzales, A. , Gonzales, M. L. , Magde, M. D. , McCarthy, M. , Rohlf, R. J. and Vandegriff. K. D. (1998) Vascular resistance and efficacy of red cell substitutes in a rat hemorrhage model. *J. Appl. Physio.* 85 :993-1003.
- [0108] Vandegriff, K. D. , Rohlf, R. J. and Winslow, R. M. (1997) Colloid osmotic effects of hemoglobin-based oxygen carriers. In *Advances in Blood Substitutes : Industrial Opportunities and Medical Challenges*. R. M. Winslow, K. D. Vandegriff, and M. Intaglietta, editors. Birkhauser, Boston. 207-227.
- [0109] Vandegriff K, McCarthy M, Rohlf R 等人 (1998) Colloid osmotic properties of modified hemoglobins: chemically cross-linked versus polyethylene glycol surface-conjugated. *Biophys Chem* 1997 ;69 :23-30.
- [0110] Winslow RM, Vandegriff KD. Hemoglobin oxygen affinity and the design of red cell substitutes. In : Winslow RM, Vandegriff KD, Intaglietta M, ed s.
- [0111] *Advances in Blood Substitutes. Industrial Opportunities and Medical Challenges.*

- [0112] Boston :Birkhauser,1997 ;167-88.
- [0113] Vandegriff K, Winslow R.A theoretical analysis of oxygen transport :A new strategy for the design of hemoglobin-based red cell substitutes. In :Winslow R, Vandegriff K, Intaglietta M, eds.Blood substitutes.Physiological basis of efficacy.
- [0114] New York :Birkhauser,1995 ;143-54.
- [0115] McCarthy MR,Vandegriff KD,Winslow RM.The role of facilitated diffusion in oxygen transport by cell-free hemoglobin:Implications for the design of hemoglobin-based oxygen carriers.Biophysical Chemistry 2001 ;92 :103-17.
- [0116] Acharya, A. S. , Manjula, B. N. and Smith, P. K. Hemoglobin crosslinkers. (1996) US Patent 5, 585, 484.
- [0117] Winslow RM. New transfusion strategies :Red cell substitutes. Ann Rev Med 1999 ;50 :337-53.
- [0118] Traut, R. R. , Bollen, A. , Sun, T. T. , Hershey, J. W. B. , Sundberg, J. , and Pierce, L. R. , (1973). Methyl mercapto bytyrimidate as a cleavable cross-linking reagent and its application to the Escherichia coli 30S ribosome, Biochemistry, 12, 3266.
- [0119] Acharya A. S. and Manning J. M. (1983) Reaction of glycolaldehyde with proteins :Latent crosslinking potential of α -hydroxy aldehydes. Proc. Natl. Acad. Sci. ,
- [0120] USA 80 :3590-3594.
- [0121] Ampulski R, Ayers V, Morell S. Determination of the Reactive Sulfhydryl Groups in Heme Proteins with 4,4' -dipyridinedisulfide. Biochem Biophys Acta 1969 ;163-9.
- [0122] Juszczak, L. J. , Manjula B. N. , Bonaventura, C. , Acharya A. S. and Friedman, J. M. (2002) UV Resonance Raman study of p93-modified hemoglobin A :Chemical modifier-specific effects and added influences of attached poly(ethylene glycol) chains. Biochemistry 41 :376-385.
- [0123] Khan, I, Dansker, D. , Samuni, U. , Friedman, A. J. , Bonaventura, C. , Manjula B. N. , Acharya, A. S. and Friedman, J. M. (2001) Cys-93(b) modified hemoglobin :Kinetic and conformational consequences. Biochemistry 40 :7581-7592.
- [0124] Mirhashemi 等人, (1998) Effects of hemodilution on skin microcirculation. Am J. Physiol. (Heart Circ. Physiol. 23) 254 :H411-H416.
- [0125] Tsai 等人 (1996) Microvascular oxygen distribution :effects due to free hemoglobin plasma. In Blood Substitutes. New Challenges. R. M. Winslow, K. D. , Vandegriff and M. Intaglietta, editors, Boston. 124-131.
- [0126] Matheson, 等人 (2002). Vascular response to infusions of a nonextravasating hemoglobin polymer. J. Appl. Physiol. 93 :1479-86.
- [0127] Sakai 等人 (2000). Molecular dimensions of Hb-based O₂ carriers determine

constriction of resistance arteries and hypertension. Am. J. Physiol. 279 : H908-H915.

[0128] 这里上述提到的所有出版物,无论是授权的专利,待审申请,出版论文,或者其它的,在此以其全部引入作为参考。为了清楚和理解的目的,对上述发明已经进行详细描述,本领域的技术人员应当理解,通过阅读公开内容,可在形式和细节上进行各种改变,而不背离所附权利要求中本发明的真实范围。



用亚氨基四氢噻吩对Hb的氨基进行脲化作用

图 1

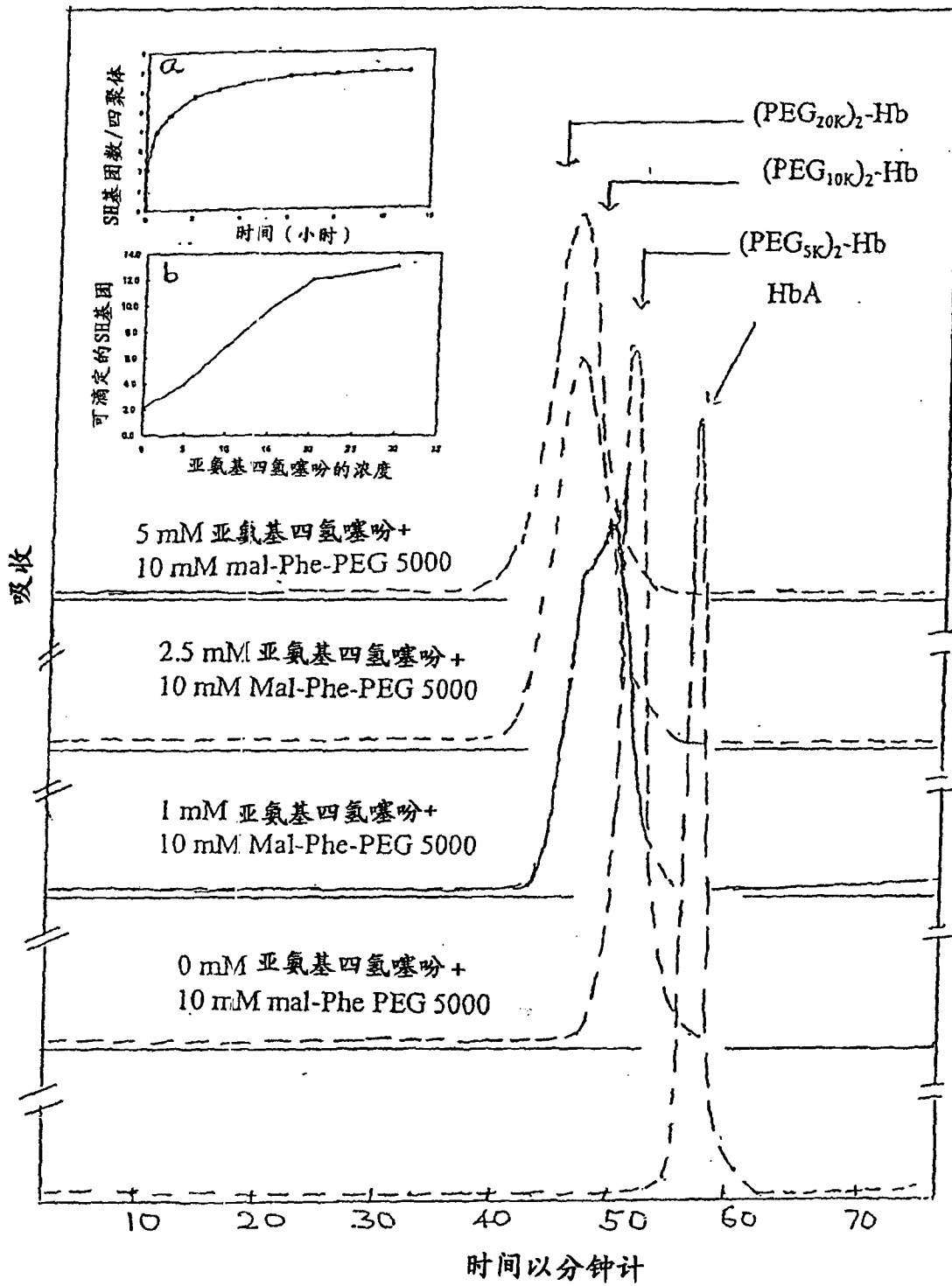


图 2A

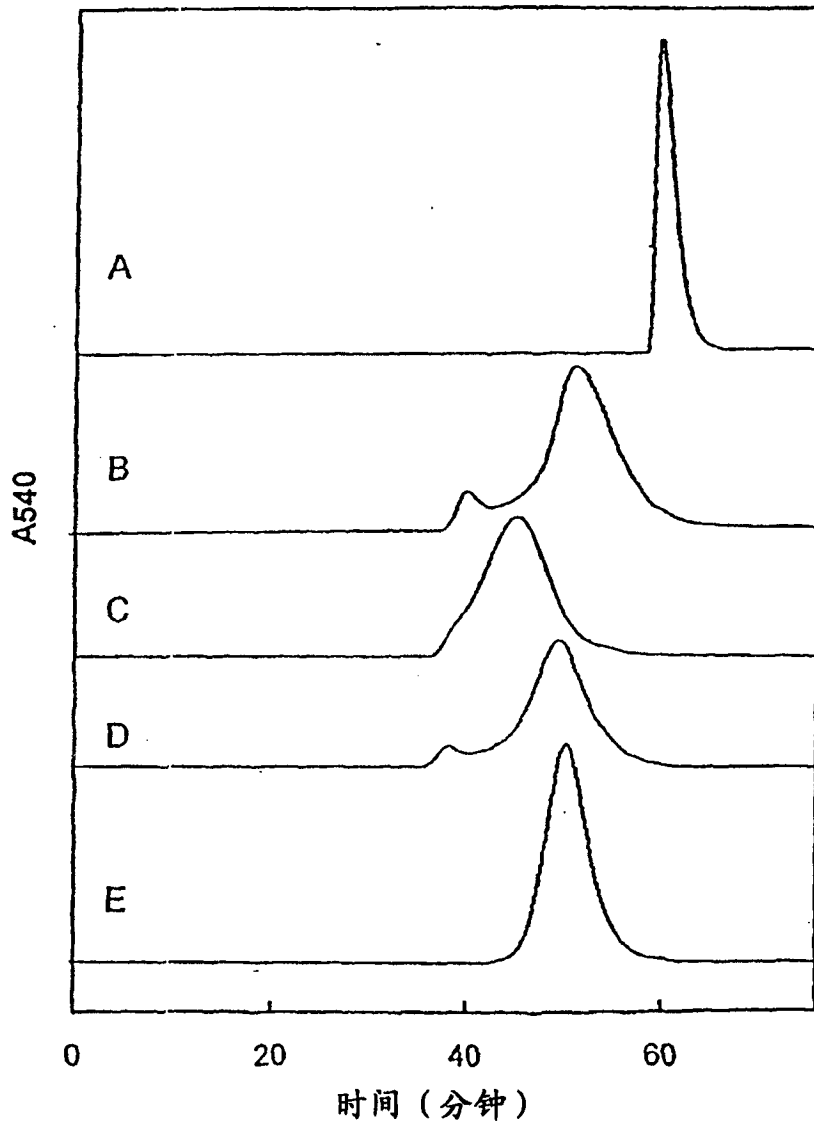


图 2B

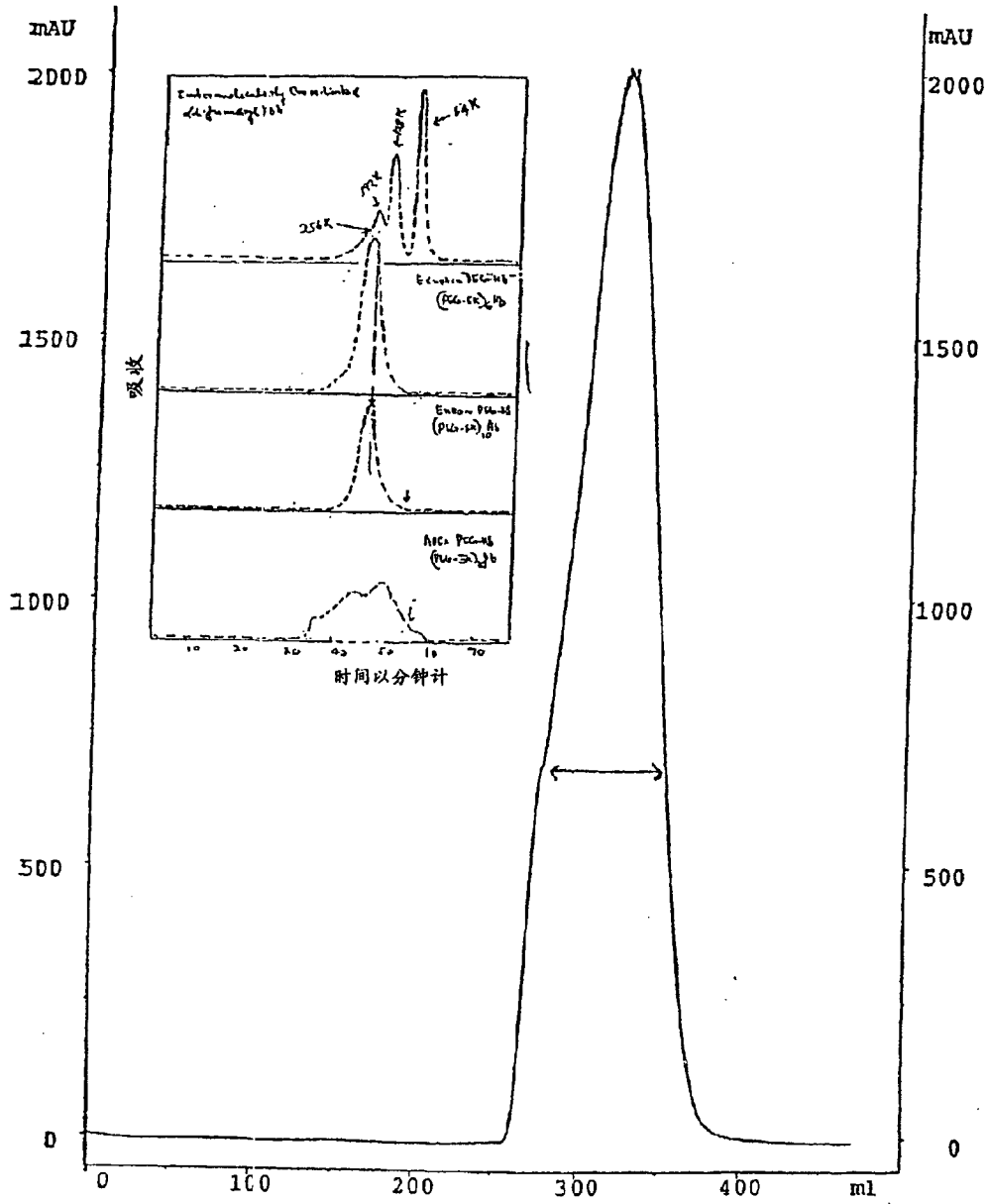
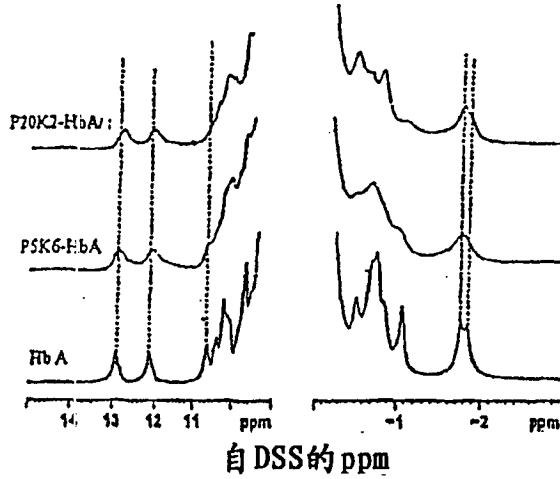


图 3

29℃, 存在5%D₂O, pH7.0, 0.1M磷酸缓冲液中, CO形式
 [(A)和(B)]以及脱氧形式[(C)和(D)]的
 HbA, P5K6-HbA, P20K2-HbA 的3%水溶液的300-MHz ¹H-NMR谱

A. 可交换的
 质子共振

B. 环流-位移
 质子共振



C. 近端组氨酸超精细
 位移NδH共振

D. 超精细位移和可
 交换质子共振

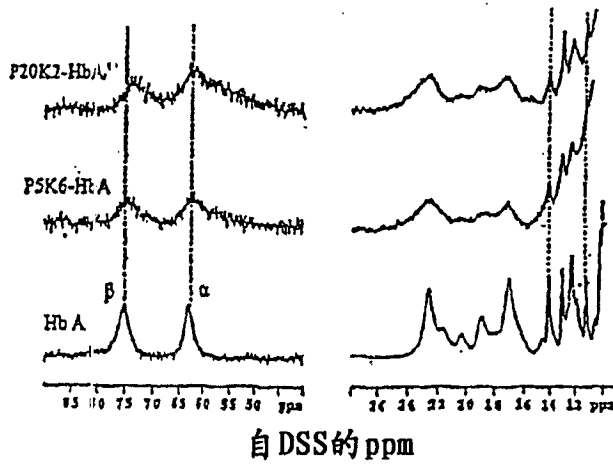


图 4

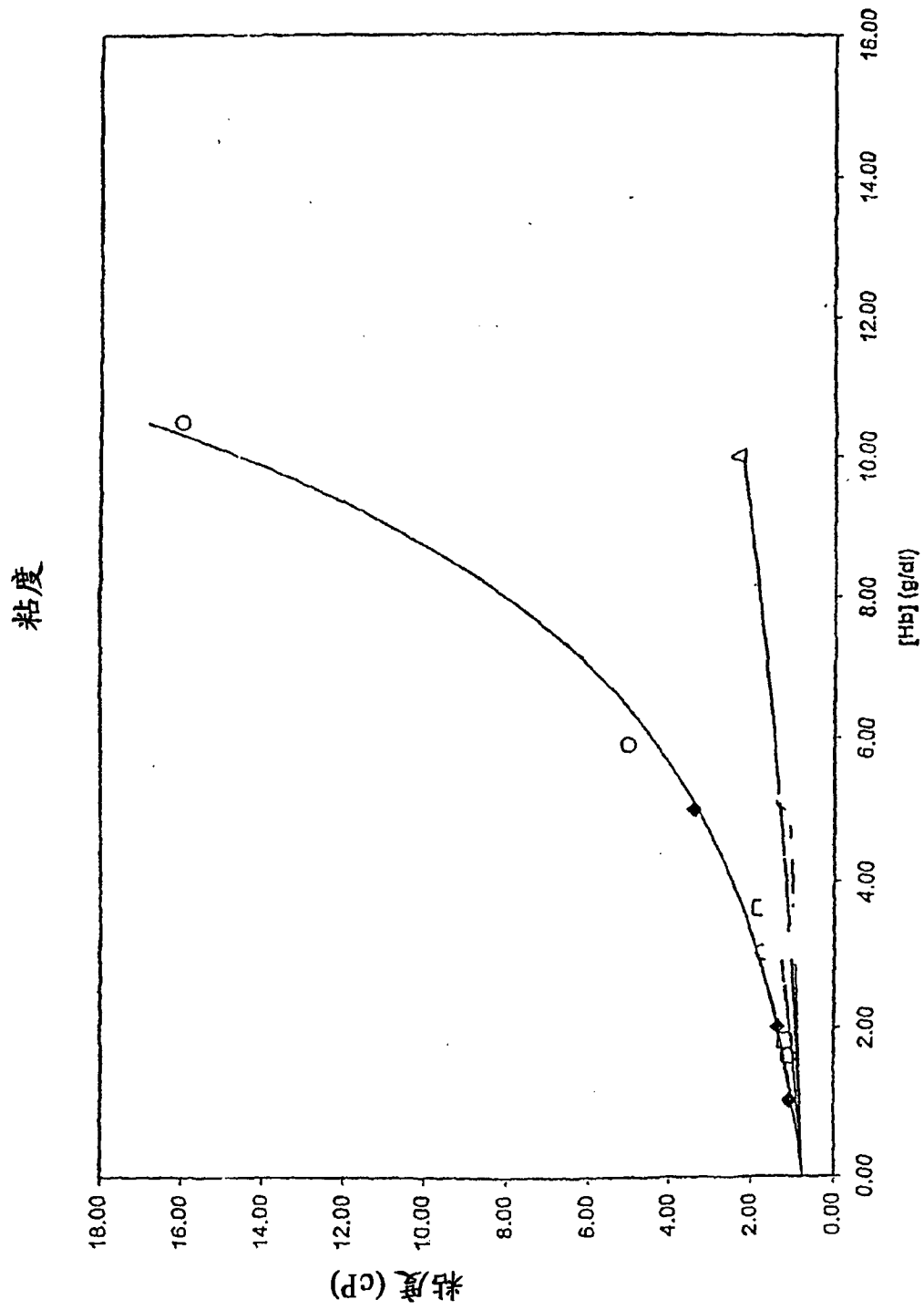


图 5

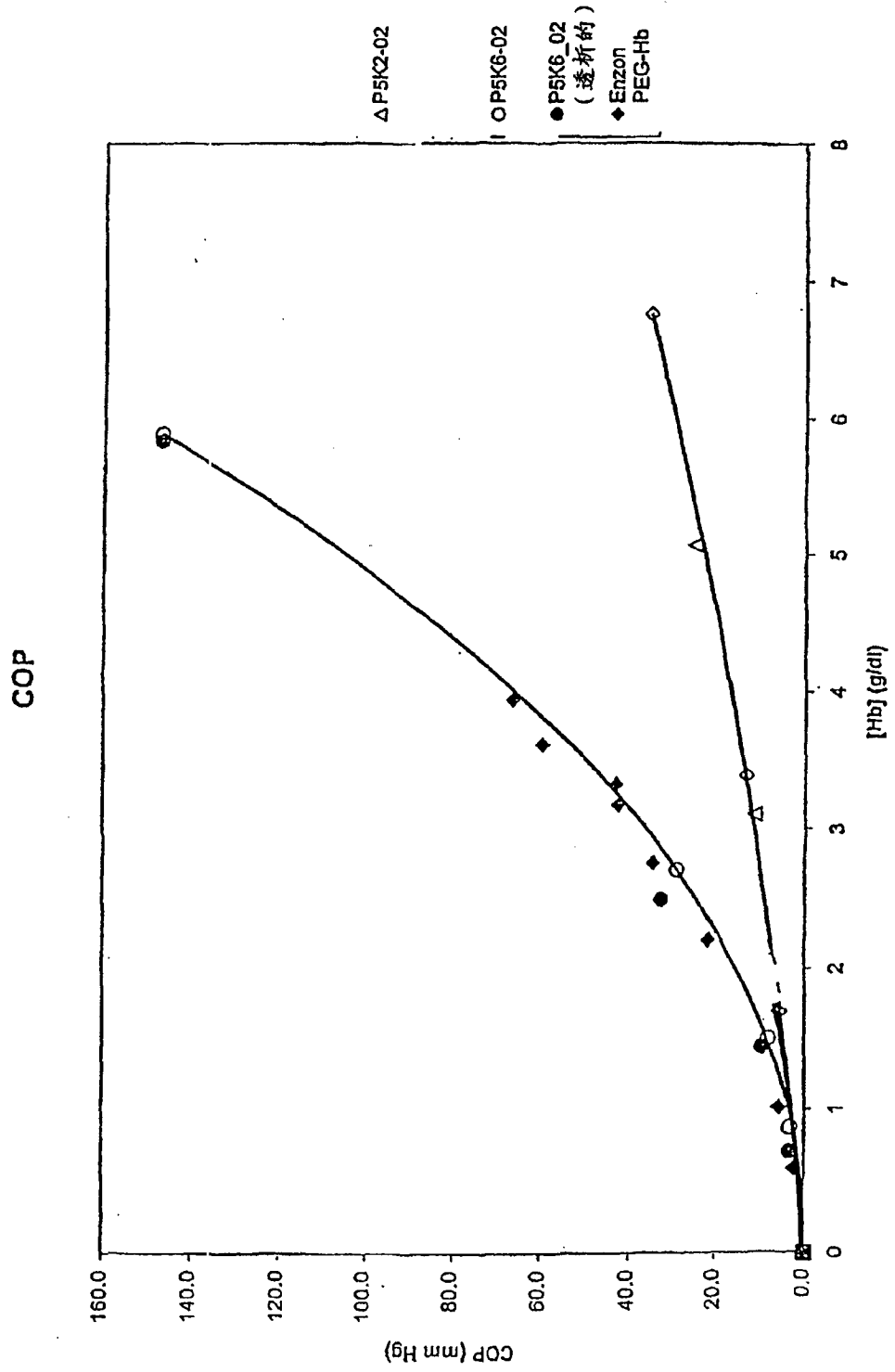


图 6

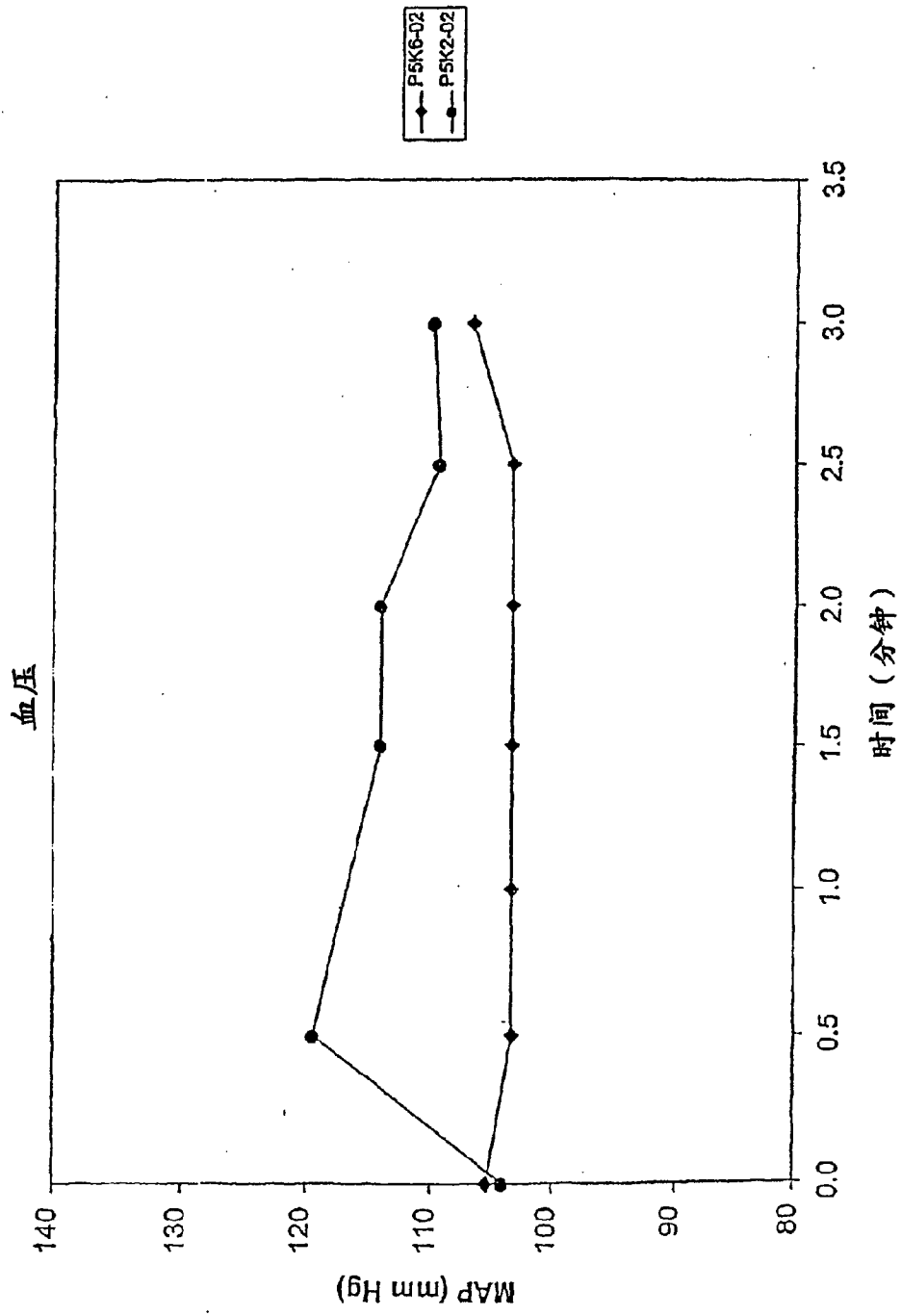
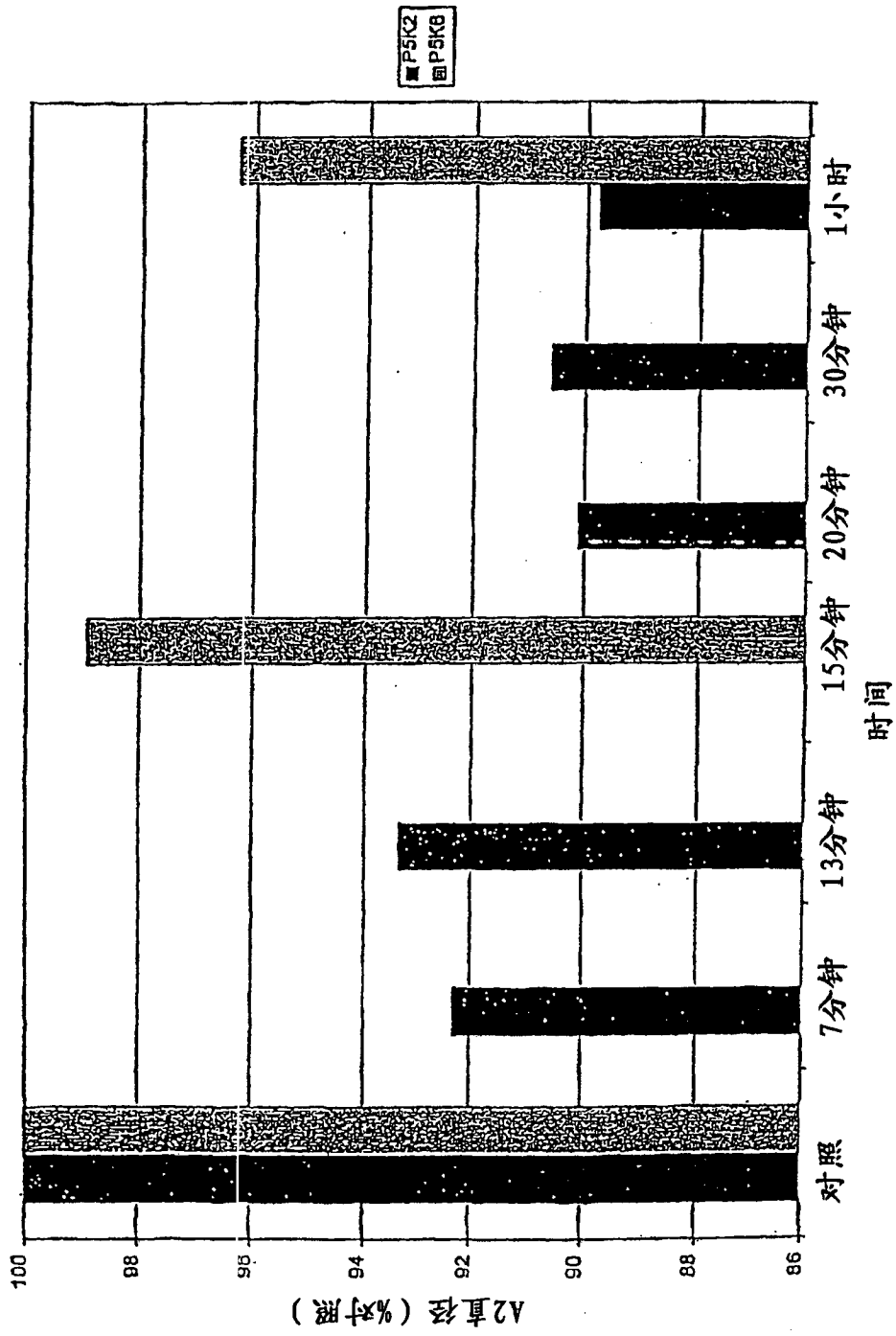


图 7A



1小时内10%最大负荷的P5K2 (黑色) 和P5K6 (灰色) 对仓鼠A2小动脉直径的影响

图 7B

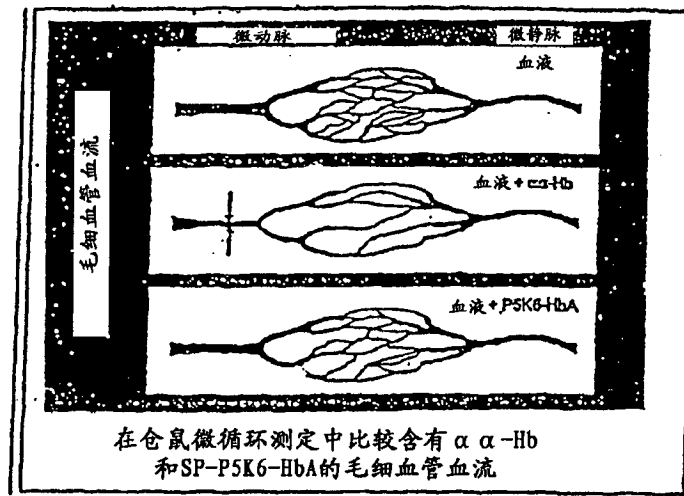


图 8