

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3628019号  
(P3628019)

(45) 発行日 平成17年3月9日(2005.3.9)

(24) 登録日 平成16年12月17日(2004.12.17)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>C07K 14/805  
A61K 9/127  
C07K 1/10

F I

C07K 14/805  
A61K 9/127  
C07K 1/10

請求項の数 31 (全 29 頁)

|               |                      |           |                     |
|---------------|----------------------|-----------|---------------------|
| (21) 出願番号     | 特願平7-507148          | (73) 特許権者 | 504085451           |
| (86) (22) 出願日 | 平成6年8月16日(1994.8.16) |           | シンザイム・テクノロジーズ・リミテッド |
| (65) 公表番号     | 特表平9-501681          |           | ・ライアビリティ・カンパニー      |
| (43) 公表日      | 平成9年2月18日(1997.2.18) |           | SYNZYME TECHNOLOGIE |
| (86) 国際出願番号   | PCT/US1994/009246    |           | S L L C             |
| (87) 国際公開番号   | W01995/005397        |           | アメリカ合衆国92618カリフォルニア |
| (87) 国際公開日    | 平成7年2月23日(1995.2.23) |           | 州アーバイン、スウィート・イー-309 |
| 審査請求日         | 平成13年6月7日(2001.6.7)  |           | 、ワン・テクノロジー・ドライブ     |
| (31) 優先権主張番号  | 08/107,543           | (74) 代理人  | 100062144           |
| (32) 優先日      | 平成5年8月16日(1993.8.16) |           | 弁理士 青山 稔            |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)              | (74) 代理人  | 100103115           |
| (31) 優先権主張番号  | 08/291,590           |           | 弁理士 北原 康廣           |
| (32) 優先日      | 平成6年8月15日(1994.8.15) | (72) 発明者  | シャー、ジェン-チャン         |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)              |           | アメリカ合衆国92715カリフォルニア |
|               |                      |           | 、アービン、スタークレスト135番   |
|               |                      |           | 最終頁に続く              |

(54) 【発明の名称】 ニトロキシドを用いる酸素毒性の防止用組成物と防止法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

安定化ヘモグロビンおよび該安定化ヘモグロビンと共有結合したニトロキシドを含有する代用赤血球。

【請求項2】

ヘモグロビンが架橋によって安定化された請求項1記載の代用赤血球。

【請求項3】

ヘモグロビンが組換え体であり、 $\alpha$ -グロビンダイマーによって安定化された請求項1記載の代用赤血球。

【請求項4】

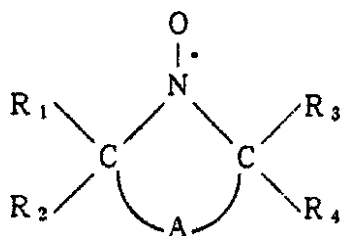
ヘモグロビンが、開環鎖状糖から誘導される多価アルデヒドを用いて架橋された請求項2記載の代用赤血球。

【請求項5】

ヘモグロビンが、開環環状糖から誘導される多価アルデヒドを用いて架橋された請求項2記載の代用赤血球。

【請求項6】

ニトロキシドが次式：



(式中、 $R_1 \sim R_4$ は炭素原子数1～4のアルキル基を示し、Aは5員環の残余員を示す)  
で表される構造を有する請求項1から5いずれかに記載の代用赤血球。

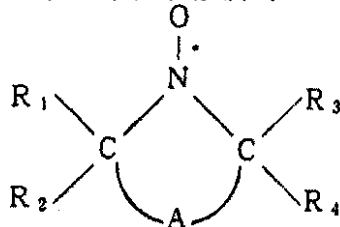
【請求項7】

ニトロキシドが2,2,5,5-テトラメチルピロリジン-N-オキシルである請求項6記載の  
代用赤血球。

10

【請求項8】

ニトロキシドが次式：



(式中、 $R_1 \sim R_4$ は炭素原子数1～4のアルキル基を示し、Aは6員環の残余員を示す)  
で表される構造を有する請求項1から5いずれかに記載の代用赤血球。

20

【請求項9】

ニトロキシドが2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-N-オキシルである請求項8記載の  
代用赤血球。

【請求項10】

安定化重合ヘモグロビンおよび該重合ヘモグロビンに共有結合したニトロキシドを含有す  
る代用赤血球。

【請求項11】

ヘモグロビンポリマーが開環鎖状糖から誘導される多価アルデヒドを含む請求項10記載の  
代用赤血球。

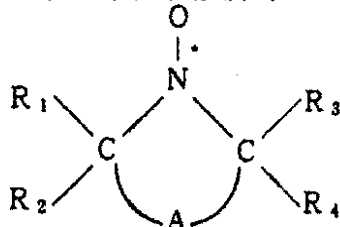
30

【請求項12】

ヘモグロビンポリマーが開環環状糖から誘導される多価アルデヒドを含む請求項11記載の  
代用赤血球。

【請求項13】

ニトロキシドが次式：



(式中、 $R_1 \sim R_4$ は炭素原子数1～4のアルキル基を示し、Aは5員環の残余員を示す)  
で表される構造を有する請求項10～12いずれかに記載の代用赤血球。

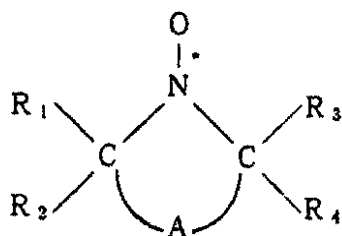
40

【請求項14】

ニトロキシドが2,2,5,5-テトラメチルピロリジン-N-オキシルである請求項13記載の  
代用赤血球。

【請求項15】

ニトロキシドが次式：



(式中、 $R_1 \sim R_4$ は炭素原子数1～4のアルキル基を示し、Aは6員環の残余員を示す)で表される構造を有する請求項10～12いずれかに記載の代用赤血球。

【請求項16】

ニトロキシドが2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-N-オキシルである請求項15記載の代用赤血球。

10

【請求項17】

生理学的に適合性のあるリポソーム、該リポソーム中にカプセル化されたヘモグロビンおよび該リポソーム中にカプセル化されたニトロキシドを含有する生理学的に適合性のあるヘモグロビンをベースとする溶液。

【請求項18】

ニトロキシドがリポソーム膜内に挿入された請求項17記載の溶液。

【請求項19】

ヘモグロビンが架橋または重合によって安定化された請求項18記載の溶液。

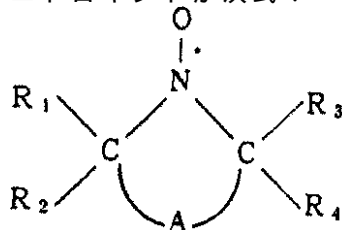
【請求項20】

リポソームがニトロキシド標識化脂肪酸、コレステロンまたはリン脂質から成る請求項17記載の溶液。

20

【請求項21】

ニトロキシドが次式：



(式中、 $R_1 \sim R_4$ は炭素原子数1～4のアルキル基を示し、Aは5員環の残余員を示す)で表される構造を有する請求項17～20いずれかに記載の溶液。

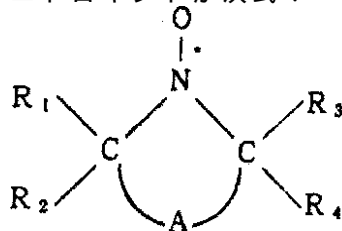
30

【請求項22】

ニトロキシドが2,2,5,5-テトラメチルピロリジン-N-オキシルである請求項21記載の溶液。

【請求項23】

ニトロキシドが次式：



(式中、 $R_1 \sim R_4$ は炭素原子数1～4のアルキル基を示し、Aは6員環の残余員を示す)で表される構造を有する請求項17～20いずれかに記載の溶液。

40

【請求項24】

ニトロキシドが2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-N-オキシルである請求項23記載の溶液。

【請求項25】

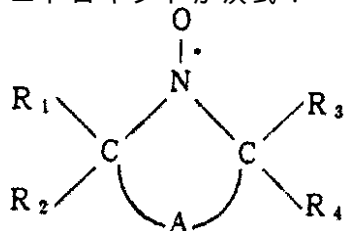
ニトロキシドに共有結合し、アルブミン、デキストラン、ポリオキシエチレンまたはヒド

50

ロキシエチルスターチと複合体を形成した安定化ヘモグロビンを含む生理学的に適合性のあるヘモグロビンベースとする溶液。

【請求項 26】

ニトロキシドが次式：



10

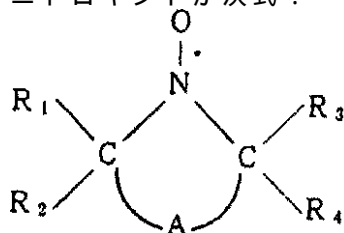
(式中、 $R_1 \sim R_4$ は炭素原子数 1 ~ 4 のアルキル基を示し、A は 5 員環の残余員を示す) で表される構造を有する請求項25記載の溶液。

【請求項 27】

ニトロキシドが2,2,5,5 - テトラメチルピロリジン - N - オキシルである請求項26記載の溶液。

【請求項 28】

ニトロキシドが次式：



20

(式中、 $R_1 \sim R_4$ は炭素原子数 1 ~ 4 のアルキル基を示し、A は 6 員環の残余員を示す) で表される構造を有する請求項25記載の溶液。

【請求項 29】

ニトロキシドが2,2,6,6 - テトラメチルピペリジン - N - オキシルである請求項28記載の溶液。

【請求項 30】

下記の工程によって特徴づけられる安定化ヘモグロビンを含む生理学的に適合性のある溶液の製造法：

30

ニトロキシドを安定化ヘモグロビンと共有結合させ、安定化ヘモグロビン溶液を実質上酸素を含まない環境に移す。

【請求項 31】

ニトロキシドを、スルフヒドロ基、 $\beta$  93サイトまたは反応性アミノ基を含む安定化ヘモグロビンのサイトへ共有結合させる請求項30記載の方法。

【発明の詳細な説明】

技術分野

この発明は、生体内の酸素関連種の毒性効果を低減するための、高分子、例えば、ヘモグロビン、アルビミン、イムノグロブリンおよびリポソームと共に用いられるニトロキシド (nitroxide) 化合物の使用に関する。特にこの発明は、赤血球代替物として用いられるカプセル化された生理学的に適合性のある無細胞ヘモグロビン溶液と関係づけられるニトロキシドおよび遊離基によって惹起される酸化ストレスと損傷を低減または防止するための生理学的に適合性のある他の高分子と関係づけられるニトロキシドによって特徴づけられる組成物と方法を開示する。

40

背景技術

酸素代謝の生理学的機構は多年にわたって知られているが、生理学と医学における酸化ストレスの果たす役割については未だに十分には解明されていない。種々のタイプの生理学的損傷に寄与する遊離基による機構が酸化ストレス (oxidative stress) とその毒性効果との関係で研究されている。しかしながら、酸素関連種と関係する酸化ストレスま

50

たは毒性と闘うために開発されている従来の方法や組成物は限定的にしか満足すべき結果をもたらしていない。血液代替物を調製するときに遭遇する困難は、酸素毒性の防止または低減の際にも重大な問題となる。

科学者および医者は人体に安全に輸血できる血液代替物の開発のために数十年間にわたって努力している。慢性的な血液不足、不適合な血液型、交叉試験法および病気の伝染等の問題は、多量の代替血液を顕著な生理学的副作用をもたらすことなく安全に輸血できる組成物を開発するための私的企業、大学および政府による広範な研究を促した。現在のところ、数社が実験的な血液代替物について臨床試験をおこなっている。しかしながら、予想外の不都合な生理学的反応と研究開発に伴う固有の複雑性が規制承認段階での進展を遅らせ、臨床的に有用な代替血液の採用を妨げている。

10

米国海軍の研究諮問委員会は、代替血液を製造するための数グループによる研究を略述し、該研究の状態を評価し、遭遇する毒性の問題を一般的に説明するレポートを1992年8月に発表している。この研究諮問委員会のレポートは、現在の血液代替品〔これは「ヘモグロビンをベースとする酸素キャリアー (hemoglobin-based oxygen carriers)」(HBOC) と呼ばれる場合が多い〕は酸素輸送においては明確な効果を発揮するが、毒性の問題については未解決であるという斯界の現在のコンセンサスを反映している。現存のHBOCの臨床的研究において観察される不都合な輸血反応には全身系の高血圧症と血管収縮が含まれる。これらの不都合な反応があるため、多数の製薬会社は臨床的試験を放棄するか、または投与量を少なくすることを余儀なくさせられている。

現存のヘモグロビンをベースとする代替血液の毒性の問題は、米国政府によって最重要課題として取り上げられた。海軍の研究諮問委員会の勧告は、国立保健研究所により、「ヘモグロビンをベースとする酸素キャリアー：毒性の機構」という題目の提案要望書 (Request For Proposal) (PA-93-23) の形で利用されている。このため、現存のヘモグロビンをベースとする酸素キャリアーにみられるような副作用をもたらさないで輸血できる代替血液を開発するという差し迫った重大な必要性に医科学界は悩んでいるのである。

20

赤血球は血液の主成分であって、身体の酸素輸送系を含んでいる。血液代替物の最も重要な特性は酸素輸送能である。赤血球が酸素を輸送できるのは、赤血球の一次成分が酸素キャリアーとして機能するヘモグロビンだからである。血液代替物として臨床試験に供されている大部分の製品は、赤血球膜と赤血球の残余成分から分離した後、実質上全ての汚染物を含まないように精製したヘモグロビンを含有する。しかしながら、ヘモグロビンを赤血球から取り出して、自然の形態で溶液中に移すと、ヘモグロビンは不安定なために急速にその構成サブユニットに解離する。このため、HBOCに用いられるヘモグロビンは溶液中で解離しないように安定化されなければならない。溶液中で安定であって、酸素輸送機能が損なわれないように安定化されたヘモグロビンをベースとする製品の開発にはかなりの科学的労力と資金が必要であった。HBOCの酸素輸送能は十分に確立されている(次の米国特許の各明細書参照：

30

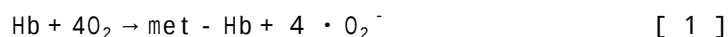
3,925,344;4,001,200;4,001,401;4,053,590;4,061,736;4,136,093;4,301,144;4,366,248;4,376,095;4,377,512;4,401,652;4,473,494;4,473,496;4,600,531;4,584,130;4,857,636;4,826,811;4,911,929および5,061,688。

身体内では、赤血球中のヘモグロビンは血液が肺を通過すると酸素分子と結合し、酸素分子を身体の隅々まで輸送することによって、身体の正常な代謝機能の要求を満たす。しかしながら、大部分の生物が生存するために吸い込まなければならない大気中の酸素は科学および医学的なパラドックスである。即ち、一方では、ほとんど全ての生物は生存のためには酸素を必要とするが、他方では、正常な酸素代謝中に種々の毒性酸素関連化学種が生成する。

40

ヘモグロビンによる酸素輸送に起因する酸化ストレスに関しては、次のことが知られている。即ち、酸素の輸送過程において、ヘモグロビン分子(Hb)はそれ自体が輸送する酸素分子( $O_2$ )によって酸化される。この自己酸化反応によって2種の望ましくない生成物、即ち、メトヘモグロビン(met-Hb)と超酸化物アニオン( $\cdot O_2^-$ )が形成される。この化学反応は次の通りである：

50



この超酸化物アニオン ( $\cdot \text{O}_2^-$ ) は、付加的な電子と負電荷を有する酸素分子であって、反応性が高く毒性である。ヘモグロビンによる酸素輸送の場合、潜在的に損傷性のある酸化的ストレスはヘモグロビンの自己酸化によって発生する超酸化物アニオンに由来し、その後の超酸化物不均化酵素 (SOD) の存在下での超酸化物アニオンの毒性過酸化水素への変換に起因する (次式参照)。



超酸化物アニオンと過酸化水素が赤血球中に共存することが、赤血球に対する酸化性ストレスの主要な原因であると考えられている。

生体内で持続的におこなわれるヘモグロビンによる酸素輸送のほかに、赤血球のあまり認識されていない特性として、酸素代謝の副生物として生成する酸素関連化学種を解毒し得る特異的な酵素類を含有することが挙げられる。これらの特異的な酵素系を保護することなく、ヘモグロビンの自己酸化によって赤血球の劣化と破壊がもたらされる。しかしながら、体内では、赤血球内での酵素系の保存能 (reserve capacity) により、正常な代謝中に生成する超酸化物アニオンを非毒性種に変換させて酸化的ストレスのレベルを調節することによって生体を酸素毒性から保護する。しかしながら、この酵素系が破壊されると、赤血球の統合性 (integrity) は損傷をうける。赤血球の保護系に含まれる酵素の 1 種を生成する遺伝子の損傷によって観察され得る病的症状がもたらされる。例えば、グルコース - 6 - ホフフェートデヒドロゲナーゼ欠損 (赤血球の遺伝的異常) は過酸化水素によって誘発される溶血性貧血に起因する。この疾患は、グルタチオンペルオキシダーゼによる過酸化水素の不十分な解毒化をもたらし酸化グルタチオンを還元するのに十分な濃度の NAD (P) H を維持する機能が損傷赤血球では失われることに起因する [ホーホシュタイン (P. Hochstein)、「遊離基生物学および医学」、第 5 巻、第 387 頁 (1988 年) 参照]。

赤血球の保護酵素系は、毒性超酸化物アニオン分子を化学的二段階経路によって非毒性形態に変換させる。この経路の第一段階は、超酸化物不均化酵素 (SOD) による超酸化物アニオンの過酸化水素への変換である (前記の化学反応式 [2] 参照)。過酸化水素は細胞に対して毒性であるので、赤血球は別の酵素 (カタラーゼ) を含んでおり、該酵素は第二の経路において過酸化水素を水に変換する (次式 [3] 参照)。



赤血球は、グルタチオンと反応して過酸化水素や有機過酸化物を水に変換させる酵素 (グルタチオンペルオキシダーゼ) を用いて過酸化水素や他の毒性有機過酸化物を解毒化することができる。赤血球はまた、ヘモグロビンの自己酸化によって生成するメトヘモグロビンの蓄積を防止する酵素を含んでいる。メトヘモグロビンレダクターゼはメトヘモグロビンを自然形態のヘモグロビンに変換する。従って、体内では、ヘモグロビンの自己酸化による毒性効果は、酸素代謝による望ましくない副生物を排除する特異的な酵素に基づく反応経路によって阻止される。

正常な酸素輸送中の酸素毒性から赤血球を保護するグルタチオンペルオキシダーゼ、カタラーゼおよび超酸化物不均化酵素の酵素的酸素解毒作用は、今日まで開発された HBOC には存在しない。酸素解毒作用がないために、現存する HBOC 溶液の安全性は毒性酸素関連種の存在のために損なわれる。

現存する HBOC 溶液を製造する基本的方法は、赤血球からヘモグロビンを採取した後、輸血中に不都合な反応を惹起する可能性のある非ヘモグロビタンパク質やその他の不純物を除去して精製する方法である (米国特許第 4,780,210 号、同第 4,831,012 号および同第 4,925,574 号各明細書参照)。酸素解毒酵素系の実質的な破壊または除去は、大部分の HBOC に用いられる精製ヘモグロビンを得るための現在の単離精製技術によっては避けられない結果である。別の製造法は、ヘモグロビンを赤血球から単離して精製せずに、組換え技術によって純粋なヘモグロビンを調製する方法である。しかしながら、ヒトの組換えヘモグロビンは高度に精製されており、赤血球に存在する酸素解毒系を含まない。従って、高度に精製されたヘモグロビン溶液を製造するための最新の技術の開発は、精製過程において有害な不純物と共に赤血球中に通常存在する有益な酸素解毒系が除去されるので一長一短が

10

20

30

40

50

あり、結局は酸素関連毒性をもたらすことになる。

現存のHBOCにみられる毒性副作用の一つは血管収縮または高血圧である。周知のように、超酸化物不均化酵素 (SOD) は生体外では超酸化物アニオンを素早く捕捉し、一酸化窒素 (NO) による血管拡張効果を長びかせる。一酸化窒素は、従来は「血管内皮由来拡張因子 (EDRF)」として知られていたにすぎない物質であることが最近判明した分子である。一酸化窒素の血管拡張効果のSODによる延長は、超酸化物と一酸化窒素との反応を阻害するSODの作用によるものである [ マーフィー (M.E.Murphy) ら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA、第88巻、第10860頁 (1991年) ; イグナツロ (Ignarro) ら、J.Pharmacol.Exp.Ther.第244巻、第81頁 (1988年) ; ルパニイ (Rubanyi)、Am.J.Physiol.、第250巻、第H822頁 (1986年) ; グリグレウスキー (Gryglewski) ら、ネイチャー、第320巻、第454頁 (1986年) ]

10

。しかしながら、生体内においては、超酸化物アニオンによるEDRFの不活性化は観察されておらず、また、一般的にもそのような効果があるとは考えられていない。それにもかかわらず、SOD活性を低下させる特定の病理生理学的症状は、超酸化物アニオンによってもたらされる毒性効果によるとされている [ イグナツロ、J.Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.、第30巻、第535頁 (1990年) 参照 ]。現存のHBOC溶液についての前臨床動物試験において観察された高血圧効果は次のこのことを示唆する。即ち、現存する多量のHBOC論液中の超酸化物アニオンの濃度がEDRFの破壊並びに観察されている血管収縮および全身系高血圧の原因であると考えられる。

従って、ヘモグロビンによるNOの結合と血液浸出に起因する高血圧効果によるNOと超酸化物アニオンとの反応に起因する高血圧効果を解明することは重要である。HBOCの輸液においては、ヘモグロビンもNOによる血管拡張作用を低下させるが、これはヘモグロビンがNOと反応して対応するニトロシル - ヘム (NO - ヘム) 付加物を生成するからである。特に、デオキシヘモグロビンは、一酸化炭素に対するよりも数桁高い親和力でNOと結合することが知られている。このようなヘモグロビンとNOとの相互作用はNOのアッセイやNOの生物学的活性の研究に利用されている。例えば、ヘモグロビンによるNOの血管拡張効果の拮抗は、ヘモグロビンの細胞膜透過率によって左右されると考えられる。無傷血小板においては、ヘモグロビンは、NOの前駆体であるL - アルギニンの効果を逆転させない。反対に、溶解血小板のサイトソル中では、ヘモグロビンは、L - アルギニンで誘発されてNOを媒介とする環状GMPの形成に対する最も有効なインヒビターである。これらの実験結果は、ヘモグロビンが血小板膜を効果的に透過しないことを示すものである [ ラドムスキー (Radomski) ら、Br.J.Pharmacol.、第101巻、第325頁 (1990年) 参照 ]。従って、HBOCの一つの望ましい特性は、NOとヘモグロビンとの相互作用を排除する性質である。ヘモグロビンが上皮に依存する筋肉弛緩 [ マルチン (Martin W.) ら、J.Pharmacol.Exp.Ther.、第232巻、第708頁 (1985年) 参照 ] およびNOによって誘発される平滑筋弛緩 [ グレーター (Grueter.C.A.) ら、J.Cyclic.Nucleotide Res.、第5巻、第211頁 (1979年) 参照 ] に対して拮抗作用を示すことが知られている。HBOC中のヘモグロビンを化学的に安定化、重合化、カプセル化または複合化させることによってヘモグロビンの血液浸出や高血圧効果を制限することにより循環時間を遅延させる試みがなされている。現存のHBOCは細胞膜を比較的透過しにくくて酸素を輸送することができるが、HBOC溶液は、輸液したときに超酸化物アニオンとNOとの反応を阻止する機能を有していない。

20

30

40

現存の血液代替物の毒性問題についての理想的な解決策は、現存のHBOCの酸素輸送機能と赤血球の酸素解毒機能を併有するヘモグロビンをベースとする配合物を調製することである。しかしながら、超酸化物不均化酵素 (SOD) を既存のHBOC溶液を単に添加するだけでは望ましい効果は得られない。何故ならば、超酸化物アニオンの濃度低下によってヘモグロビンをメトヘモグロビンに酸化する反応が促進されてメトヘモグロビンの望ましくない蓄積をもたらされるからである (前記の反応式 [ 1 ] 参照)。また、ヘモグロビン溶液中で超酸化物アニオンを過酸化水素に変換する反応を促進することも望ましくない。何故ならば、過酸化水素は毒性で反応性があり、貯蔵中に分解して毒性のヒドロキシルラジカルになるか、または他の毒性の有機過酸化物を形成するからである。

50

この発明は安定なニトロキシド遊離基（以下、「ニトロキシド」という）を使用することによって、赤血球の酸素解毒機能をヘモグロビンをベースとする血液代替物に付与すると共に、酸化的ストレスを低減させることによって遊離基毒性に関連する生物学的損傷、例えば、炎症、虚血後の再灌流損傷（post-ischemic reperfusion injury）、電離放射線損傷およびエイジングプロセス（aging process）損傷を回避するためになされたものである。ニトロキシドは安定な遊離基であって、超酸化物不均化酵素（SOD）と類似した抗酸化性触媒活性を有しており、生体内においてはカタラーゼに類似した活性を示す他の物質と相互作用する。従来からニトロキシドは電子スピン共鳴分光法において、生体高分子の配座特性と運動特性を研究するための「スピンラベル（spin label）」として使用されている。ニトロキシドは反応性遊離基中間体を検出するのに利用されているが、これはその化学構造中に十分に解明された超微細相互作用を安定な対電子があるからである。さらに、ニトロキシドは酵素類似体として作用することが観察されている。即ち、特定の低分子量ニトロキシドはSOD [サムニ（A.Samuni）ら、J.Biol.Chem.、第263巻、第17921頁（1988年）参照] およびカタラーゼ [メールホルン（R.J.Mehlhorn）ら、Free Rad. Res. Comm.、第17巻、第157頁（1992年）参照] と類似の活性を示すことが確認されている。多くの研究によって確認されているように、細胞膜を透過し得るニトロキシドは、ハイポキサンチン/キサンチンオキシダーゼによって発生する超酸化物アニオンおよび過酸化水素暴露に起因する細胞毒性から哺乳類の細胞を短期間保護する。

生体内での安全性に関しては、ニトロキシドは比較的安全であることが知られているので、比較的高濃度のニトロキシドも十分に許容される。例えば、TEMPOをマウスの腹腔内に投与する場合の最大許容量は275mg/kgであり、LD<sub>50</sub>は341mg/kgである。さらに、高分子が結合したニトロキシドは遊離のニトロキシドよりも安全である。従って、ニトロキシドで標識化した高分子の抗酸化性酵素類似体としての有用性は、高濃度、従って高活性のニトロキシドを安全に投与できる可能性に基づく。

今まで生体において試験された大部分のニトロキシドは、細胞膜を容易に透過して身体組織内へ入ることのできる比較的低分子量の化合物である。本発明によれば、酵素類似体として用いるニトロキシドは、血管裂孔へ注入して残存させてもよい生体高分子および合成高分子と結合させる。本発明の好ましい態様においては、ニトロキシドを高分子と共有結合させて遊離基の毒性を低減させると共に、ニトロキシドを血管裂孔内に閉じ込め、該裂孔内において遊離基との有用な反応性を最適化させる。

ニトロキシドを生体高分子、例えば、ヘモグロビン、アルブミン、イムノグロブリンおよびリポソーム等に共有結合させる方法は多数知られている。例えば次の文献参照：マッコネル（McConnell）ら、Quart. Rev. Biophys.、第3巻、第91頁（1970年）；ハミルトン（Hamilton）ら、「構造化学と分子生物学」[リッチ（A. Rich）ら編、フリーマン（W.H. Freeman）、サンフランシスコ]、第115頁（1968年）；グリフィス（Griffith）ら、Acc. Chem. Res.、第2巻、第17頁（1969年）；スミス（Smith I.C.P.）、「電子スピン共鳴分光法の生物学的応用」[シュバルツ（Swartz H.M.）ら編、ウィリー/インターサイエンス、ニューヨーク]、第483頁（1972年）。ヘモグロビンの協同的酸素結合機構を研究する目的で特定のニトロキシドをヘモグロビン分子に共有結合させることが知られているが、血液代替物と共に用いるために特別に調製されたヘモグロビンとの関連でニトロキシドが用いられた例はない。以下に示す実験結果は、ニトロキシドは遊離基と反応するので、血液代替物として使用するために安定化、重合化、複合化およびカプセル化したヘモグロビンに結合できることを例証するものである。ニトロキシドで標識したヘモグロビンと遊離基との相互作用は次のことを示唆する。即ち、十分な血漿半減期を有する生物学的に適合性のある他の高分子をニトロキシドで標識することによって、遊離基化学種によって惹起される酸化性ストレスまたは毒性に対する耐性を都合よく得るか、または該酸化的ストレスまたは毒性からの保護を都合よく達成できる。

前述のように、ニトロキシドは生体高分子、例えばヘモグロビン、血清アルブミン、イムノグロブリンおよびリポソーム等と化学的に結合することが知られている。しかしながら、この知見は、ニトロキシドが生物物理学的研究のための分子プローブ（molecular pro

10

20

30

40

50

be)として一般的に用いることができることを示すものであり、ニトロキシドで標識した高分子を治療用物質として用いるために特別に調製した例はない。

本明細書に記載の高分子に関しては、ニトロキシドを高分子に結合させるには2種の方法、即ち「標識化法 (labelling strategy)」として知られている方法が可能である。特異的標識化の意義は、ニトロキシドが高分子に結合する微視的環境とニトロキシドによる触媒活性にある。1個または複数個の特定の配位子結合部位における特異的標識化によって、より安定な結合部位のある微視的環境を有する均一生成物、即ちニトロキシドの触媒的な特異性と活性の点で信頼性の高い化合物が得られる。

ニトロキシドで標識したHBOCの注入を含む本明細書に示す実験結果に基づけば、低分子量または高分子量のニトロキシドと遊離基との反応が生体外および生体内の血管裂孔において観察された。これらの実験に基づけば、遊離基との酸化/還元反応にニトロキシド標識化HBOCが関与する反応機構は、遊離基を解毒する新規なHBOC化合物および他のニトロキシド-標識化高分子が調製できることを示すものである。

10

#### 発明の開示

この発明は、生体高分子、特にヘモグロビン含有溶液との関連で安定なニトロキシドを使用する方法およびこれらを含む組成物を開示する。特定の態様においては、安定なニトロキシドをヘモグロビン含有溶液と共に用いることによって、赤血球の酸素解毒機能を有する血液代替物用の数種の製剤が得られる。これらの製剤は本明細書においてはヘモグロビンをベースとする赤血球代替物 [hemoglobin-based red cell substitute (HRCS)] として表示するが、その理由は、HBOCの酸素輸送能は身体内の赤血球の酸素解毒作用を付与することによって高められるからである。生体内で安定で非毒性の特徴的な配位子結合部位と十分な血漿半減期を有する高分子にニトロキシドを共有結合させることによって、ニトロキシド-標識化アルブミンおよびニトロキシド-標識化イムノグロブリンに酸素解毒機能を付与させることができる。

20

さらにこの発明は、容器 (container) の内部表面に共有結合させたニトロキシドまたは既存のHBOCと併用して毒性酸素関連化合物を患者に注入する前に捕捉するためにフィルター中に収蔵された不溶性マトリックスに結合させたニトロキシドを開示する。本発明によるHRCS調製物は既存のHBOC溶液中での超氧化物アニオンの発生に起因する酸化ストレスを低減させ、また、輸液においては血管内皮由来拡張因子 (EDRF) であるNOの分解を抑制する。EDRFの分解が抑制されるならば、既存のHBOC溶液を患者に注入するときに観察される血管収縮と全身系高血圧の問題は実質的に解決される。

30

本発明によるHRCS製剤とニトロキシド-標識化高分子は、ニトロキシドが「超氧化物オキシダーゼ」として作用する反応 (この反応は赤血球内で起こることが知られていない酵素類似反応である) によって毒性酸素関連種の生成を阻止する。これらのHRCS製剤の場合、ニトロキシドは、ヘモグロビンの自己酸化によって生成する望ましくない超氧化物アニオンの蓄積を阻止する (前記の反応式 [I] 参照)。ニトロキシドで標識したアルブミンとノムノグロブリンは抗酸化性酵素類似体と類似の機能を発揮する (該類似体の機能は血管や間質の裂孔においては局所的に保持される)。

「超氧化物オキシダーゼ」の反応においては、超氧化物アニオンは分子性酸素に酸化され、過酸化水素は生成しない。このような反応は、ニトロキシドの濃度が酸素濃度よりも非常に高いような貯蔵条件を設定することによってある程度おこなわせることができる。本明細書に記載の用法に従えば、超氧化物アニオンを最初に生成する望ましくない酸化力カスケード反応はニトロキシドによって阻止される。さらに、本明細書に記載の生理学的に適合性のあるHRCS溶液は既存のHBOC溶液と比べて種々の点で優れているが、その理由は、前者を患者に注入した後にニトロキシドが超氧化物不均化酵素やカタラーゼと類似の酵素活性を示すからである。

40

生理学的に適合性のあるヘモグロビン溶液とニトロキシドを併用する好ましい組成物には次の (1) ~ (7) のものが含まれる:

(1) 貯蔵容器に結合させたニトロキシドまたはフィルターとして用いられる不溶性マトリックスに共有結合させたニトロキシド、

50

(2) 化学的または組換的架橋によって安定化されたヘモグロビンに共有結合させたニトロキシド、

(3) 重合化ヘモグロビンに、特に2モル当量、4モル当量または8モル当量共有結合させたニトロキシド、

(4) リボソーム内にヘモグロビンと共にカプセル化されたニトロキシドまたはリボソーム膜中に挿入されたニトロキシド、

(5) 複合ヘモグロビンに共有結合されたニトロキシド、

(6) アルブミンに共有結合されたニトロキシド、および

(7) イムノグロブリンに共有結合されたニトロキシド。

また、膜不透過性ニトロキシドとヘモグロビンを一緒にカプセル化することによって調製されるHRCsも開示される。上記製剤の調製法は、既存のHBOCの解毒および貯蔵のためのニトロキシド含有フィルターおよび容器の製法として記載される。

ヒト血清アルブミンまたは組換えアルブミンとニトロキシドを併用する好ましい組成物には次の(1)および(2)のものが含まれる：

(1) ニトロキシドで非特異的に標識化したアルブミン〔例えば、ニトロキシド対アルブミンの比が高い4-(2-プロモアセトアミド)-TEMPO〕、および

(2) 特異的な配位子結合部位においてニトロキシドで特異的に標識化したアルブミン。ノムノグロブリンとニトロキシドを併用する好ましい組成物には、部分抗原または抗原に対して特異的なイムノグロブリンに結合した部分抗原または抗原をニトロキシドで標識化したものが含まれる。

#### 【図面の簡単な説明】

図1Aおよび1Bは、4-アミノ-TEMPOで標識化した $\alpha$ -ラフィノーズ重合化ヘモグロビンの1日経過後(1A)および30日経過後(1B)の電子スピン共鳴スペクトルである(TEMPO: 2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-1-オキシル)。図1Cおよび1Dは、図1Aの試料を等容量の非標識化ヘモグロビンで希釈した試料の1日経過後(1C)および30日経過後(1D)の電子スピン共鳴スペクトルである。

図2Aおよび2Bは、4-(2-プロモアセトアミド)-TEMPOが $\omega$ -アミノヘキシル-アガロースに共有結合したことおよび4-アミノ-TEMPOが1,4-ビス(2:3-エポキシプロポキシ)ボタンで活性化されたアガロースに共有結合したことをそれぞれ示す電子スピン共鳴スペクトルである。

図3Aおよび3Bは、3,5-ビス-プロモシリシル-ビスフマレート(DBBF)またはジアスピリンで架橋したヒトヘモグロビンに4-(2-プロモアセトアミド)-TEMPOおよび3-マレイミド-PROXYLがそれぞれ共有結合したことを示す電子スピン共鳴スペクトルである。

図4Aは4-(2-プロモアセトアミド)-TEMPOの電子スピン共鳴スペクトルである。図4Bは4-(2-プロモアセトアミド)-TEMPOで標識したHBOCの電子スピン共鳴スペクトルである。図4Cはラクトート化したリンガー液中での $^{15}\text{ND}_{17}$ TEMPOLの電子スピン共鳴スペクトルである(測定温度：室温)。

図5は、ニトロキシド対Hbのモル比が2:1(5A)、4:1(5B)または8:1(5C)になるようにして4-(2-プロモアセトアミド)-TEMPOで標識したHBOCの電子スピン共鳴スペクトルである。装置の感度は、スペクトルの中央ピーク( $M_0$ )が同じピーク高さになるように図5A、図5Bおよび図5Cの順に適宜低下させた。

図6は4-(2-プロモアセトアミド)-TEMPOで標識化したHBOCおよび $^{15}\text{ND}_{17}$ -TEMPOLとの混合物の電子スピン共鳴スペクトルを示す。この場合、前者の中央ピーク(下向矢印参照)と後者の高磁場ピーク(上向矢印参照)が同じ強度になるように調整した。これは図4Bと4Cからのスペクトルの重ね合わせである。

図7は、4-(2-プロモアセトアミド)-TEMPOで標識化したHBOCのマウスにおける血漿半減期を示す。図7Aは、図6の測定に用いた試料0.5mlをマウスの尾に注入してから約10分後に測定したニトロキシドシグナルの電子スピン共鳴スペクトルである。図7Bは、10倍(感度)の装置で記録した図7Aの中央ピーク( $M_0$ )のシグナル強度の経時的低下を示す

10

20

30

40

50

( 走査時間:30分間 )。図7Cは、走査終了時の図7Bの延長部分を示す。

図8は、4 - ( 2 - ブロモアセトアミド ) - TEMPOで標識したHBOC ( Hb:8g/dl、TEMPO対Hb = 8:1 ) および<sup>15</sup>ND<sub>17</sub>TEMPOL ( 体重32gのマウス中に0.5ml ) との混合物の血漿半減期を示す ( この場合、マウスの尾にカニューレを挿入して注入ニトロキシドを直接測定した。注入前の試料の電子スピン共鳴スペクトルは図6に示す。図8Aは0.5分間隔で測定した5種の電子スピン共鳴スペクトルである ( 磁場強度を各走査間において2 Gauss増加させることによってシグナル強度を時間の関数として低下させた )。図8Bは同じ時間間隔で繰り返して測定した図8Aの6種の電子スピン共鳴スペクトルの延長部分である ( この場合、磁場強度は各走査間において2 Gauss低下させた )。 )

図9Aおよび9Bは、4 - アミノ - TEMPOで標識し、o - ラフィノーズで架橋し、さらに重合させたヒトヘモグロビンおよび3 - マレイミド - PROXYLで標識したDBBF/グルタルデヒドで重合させたヘモグロビンの電子スピン共鳴スペクトルをそれぞれ示す。

図10A、10Bおよび10Cは、3 - DOXYL - コレスタン ( A )、16 - DOXYL - ステアリン酸 ( B ) および3 - DOXYL - コレスタンと16 - DOXYL - スアアレート ( C ) をそれぞれ含有するリポソームでカプセル化したヒトヘモグロビンの電子スピン共鳴スペクトルを示す。

図11は4 - アミノ - TEMPOで標識すると共にデキストランと複合化させたニトロキシド - 標識化ヘモグロビンの電子スピン共鳴スペクトルである。

図12は、ニトロキシドと結合し、ヘモグロビン含有溶液を通過させることのできる固体状マトリックスを有するフィルターカートリッジの一態様を示す。

#### 産業上の利用性

本明細書においては、「ヘモグロビン」という用語は、特に言及しない限り、オキシヘモグロビン、カルボキシヘモグロビン、カルボンモノキシヘモグロビンおよびデオキシヘモグロビンを示すために一般的に用いる。本発明において用いるヘモグロビンはヒトヘモグロビン、組換えヘモグロビンまたは動物ヘモグロビンであってもよく、既知の方法によって入手して精製される。ヘモグロビンは、ヘモグロビンの架橋誘導体とアルデヒド基との反応によってピリドキサル - 5' - ホスフェートまたは開環アデノシントリホスフェート ( o - ATP ) のピリドキサル基と共有結合させてもよい。この種の架橋誘導体には次の多官能性、ヘテロ二官能性またはホモ二官能性の架橋剤で架橋したヘモグロビンおよび重合化ヘモグロビンが含まれる：ジアルデヒド、ポリアルデヒド、ジエポキシド、ポリエポキシド、活性化したポリカルボキシル基またはジカルボキシル基 ( 例えば、3,5 - ビス -

本明細書で用いる「ニトロキシド」という用語は、安定なニトロキシド遊離基、これらの前駆体およびこれらの誘導体 ( 酸素原子がヒドロキシル基で置換されてハロゲン化水素の形態で存在する対応するヒドロキシルアミン誘導体を含む ) を意味する。本発明の目的に対しては塩化物塩形態のヒドロキシルアミン誘導体が好ましい。

本明細書に記載のニトロキシドにおいては、ニトロキシドの不對電子はある程度安定であるが、これは、強い電子供与体で置換された2個の炭素原子に窒素原子核が結合しているからである。N - O結合の酸素原子上の部分負電荷により、隣接する2個の炭素原子は窒素原子核上の不對電子を共同して局在化させる。

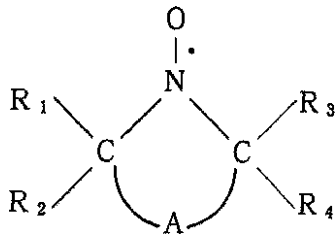
ニトロキシドはヘテロ環構造または鎖状構造を有していてもよいが、基本的な特徴は安定な遊離基である。化学構造的には、次式で表されるニトロキシドが好ましい ( 式中、R<sub>1</sub> ~ R<sub>4</sub>は電子供与体を示し、Aはヘテロ環の残余員を示す ) :

10

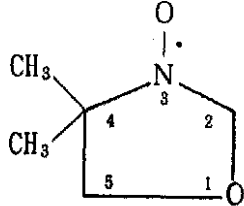
20

30

40

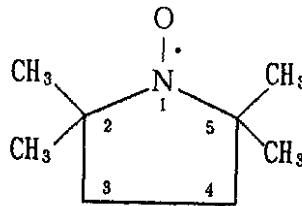


これらのヘテロ環構造において、Aは5員ヘテロ環（ピロリジニルまたは二重結合を1個有するPROXYL、即ちピロリン）または6員ヘテロ環（ピペリジニルまたはTEMPO）の残余炭素原子を示し、このうちの1個の炭素原子は酸素原子で置換されていてもよく（オキサゾリニルまたはDOXYL）、水素原子は1個または2個の臭素原子で置換されていてもよい。このようなヘテロ環構造においては、安定な同位体（例えば、 $N_{15}$ 、重水素等）を利用してもよい。 $\alpha$ -炭素原子での置換は、不対電子が $\pi$  p軌道配置に実質的に維持されるようにすべきである。 $R_1 \sim R_4$ は直鎖状または分枝鎖状のアルキル基またはアリール基を示すが、好ましくはメチル基またはエチル基を示す。いずれのニトロキシドの $\alpha$ -炭素原子上の置換基は安定性を増大させる強い電子供与体にするべきであり、メチル基またはエチル基が好ましいが、より長い炭素鎖を有する置換基であってもよく、実際上は、ステアシル基を用いて実用的で経済的なニトロキシド化合物の範囲を限定してもよい。本発明に用いる好ましいニトロキシドには次の構造を有するものが含まれる：



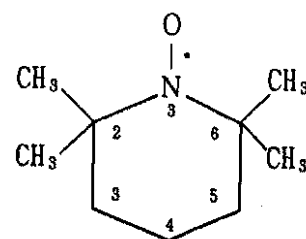
DOXYL

(4,4-ジメチル-3-オキサ  
ゾリニルオキシ-)  
(4,4-ジメチルオキサゾリ  
ン-N-オキシル)



PROXYL

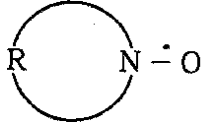
(2,2,5,5-テトラメチル  
1-ピロリジニルオキシ-)  
(2,2,5,5-テトラメチル  
ピロリジン-N-オキシル)



TEMPO

(2,2,6,6-テトラメチル  
1-ピペリジニルオキシ-)  
(2,2,6,6-テトラメチル  
ピペリジン-N-オキシル)

上記の説明から明らかなように、最も適当なニトロキシド化合物は基本的には次の構造式で表示してもよい（但し、Rは遊離基の安定性を保持する立体配置から選択される）：



本発明に用いることのできるニトロキシドは種々の構造を有する。何故ならば、ニトロキシドに要求される特性は、HRCS中での超酸化物アニオンのカスケード反応過程において実質的に消費されることなく超酸化物オキシダーゼ、超酸化物不均化酵素またはカタラーゼと類似の活性を示す特性だからである。本発明においては広範囲のニトロキシドを用いてもよいが、HRCS中の酸素毒性を低減させるのに必要な最小濃度において生理学的に許容されるものでなければならない。有効なものを評価するに際しては、ニトロキシドは毒性が比較的低いために、NMR画像における造影剤として推奨されていることに注目すべきである（米国特許第4,834,964号、同第4,863,717号および同第5,104,641号各明細書参照）。ヘモグロビンを生理学的に適合するように単離精製する方法は当業者には多数知られている。一般的には、精製ヘモグロビン組成物は全タンパク質の少なくとも99重量%のヘモグロビンを含んでおり、また、全リン脂質、ホスファチジルセリンまたはホスファチジルエタノールアミン、および不活性ヘム色素の含有量はそれぞれ約3 $\mu$ g/ml以下、1 $\mu$ g/ml以下および6%以下である。本発明において有用な精製ヘモグロビン溶液は種々の常套法によって調製することができる。このような調製法としては、特に限定的ではないが、下記の文

10

20

30

40

50

献に記載の方法が例示される：

チャン (Cheung) ら、Anal. Biochem. 第137巻、第481頁～第484頁 (1984年)；ド・ベヌト (De Venuto) ら、J. Lab. Clin. Med. 第89巻、第509頁～第516頁 (1977年)；リー (Lee) ら、血液代替物に関する第6回国際シンポジウムのアブストラクトH51 (サンディエゴ、カリフォルニア、1993年3月17日～20日)。

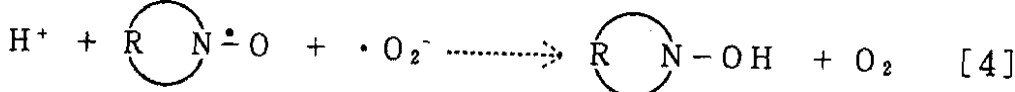
本発明に用いる精製ヘモグロビン溶液は実質的に酸素を含有しない。溶液中のヘモグロビンは、ヘモグロビンから酸素を放出させてこれを実質的な脱酸素状態に維持する化学的還元剤と混合させることによって脱酸素化処理してもよい。ヘモグロビン溶液を脱酸素化する好ましい方法は、ヘモグロビン溶液を実質的に酸素を含有しない不活性ガス、例えば窒素ガスまたは一酸化炭素等と接触させることによってヘモグロビンに結合している酸素を除去し、溶液中のヘモグロビンを酸素を含まないデオキシヘモグロビンまたはカルボンモノキシヘモグロビンに変換させる方法である。あるいは、ヘモグロビンを、酸素に透過させるがヘモグロビンは透過させない膜を用いて真空下またはガス中で処理してもよい。例えば、ヘモグロビン溶液を、酸素は通過させるがヘモグロビンは通過させない膜であって該膜に沿ってヘモグロビンが流動するような膜を有する拡散セルを通過させてもよい。不活性ガスを、ヘモグロビン溶液とは反対側の膜壁に沿って循環させることによって酸素を除去し、溶液中のヘモグロビンを脱酸素化状態に変換する。好ましくは、ニトロキシド-標識化、架橋、重合化または複合化の過程ではデオキシヘモグロビンを実質的に酸素を含まない環境下に保持する。

ヘモグロビンから結合酸素を除去した後、ニトロキシドをヘモグロビンに共有結合させる。単一のヘモグロビン分子に対して、通常は少なくとも1 (好ましくは1以上) のニトロキシドを共有結合させる。ニトロキシドは、ヘモグロビン分子上の次の (a) ～ (c) を含むいくつかの部位のいずれに共有結合させてもよい：

- (a) 例えば  $\beta$  - 93部位の1または複数の遊離のスルフヒドロ基 ( - SH )、
- (b) 例えば  $\beta$  - 鎖のVal - 1および/または  $\beta$  - 鎖のリシン - 82および/または  $\alpha$  - 鎖のリシン - 99に位置するDPG部位のいずれかの反応性アミノ基 ( - NH<sub>2</sub> )、および
- (c) 不特定のいずれかの表面アミノ基 ( - NH<sub>2</sub> ) またはカルボキシル基 ( - COOH )。

ニトロキシドは、ヘモグロビンの架橋または重合化に用いる一価または多価架橋剤の残余のアルデヒド基、エポキシ基または活性化カルボキシル基に結合させてもよく、あるいは、ヘモグロビンの複合化剤、例えばデキストラン (Dx)、ヒドロキシエチルスターチ (HE S) またはポリオキシエチレン (POE) のいずれかの残余反応性基に結合させてもよい。

前記の反応式 [ 1 ] に示すように、HBOC溶液中のヘモグロビンは貯蔵中に酸素によってゆっくりと自己酸化されてメトヘモグロビンと超酸化物アニオンを生成する。しかしながら、本発明によるHRCSの貯蔵中においては、生成する超酸化物アニオンはニトロキシドをヒドロキシルアミン誘導体に還元し、超酸化物アニオンは酸化されて分子性酸素になる (次の反応式 [ 4 ] 参照)。



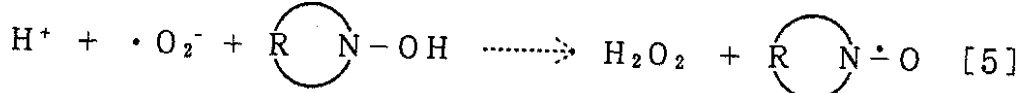
反応式 [ 4 ] に示す超酸化物アニオンから分子性酸素への変換によって、超酸化物アニオンの蓄積とその後の過酸化水素の生成は防止される。この活性 (本明細書では「超酸化物オキシダーゼ活性」という) は、組成物中の酸素の初期含有量が最小に維持され、組成物が実質的に酸素を含まない環境下で貯蔵され、さらにニトロキシドの濃度が超酸化物アニオンと過酸化水素の生成を阻止するのに十分高いときに最も高くなる。従って、HRCSは実質的に酸素を含まない容器内に貯蔵するのが好ましい。

酸素を含まない環境下での溶液の貯蔵を可能にする容器系は周知である。何故ならば、酸素の影響を受けやすい非ヘモグロビンをベースとする多くの静脈注射液がこの種の容器系に収容されているからである。例えば、充填と封止過程に酸素を除去したガラス容器を用いてもよい。また、酸素を遮断するオーバーラップで封止してもよい可撓性プラスチック容器も利用である。基本的には、溶液中のヘモグロビンと酸素との相互作用を防止する

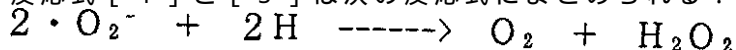
いずれの容器を用いてもよい。

ニトロキシドの超酸化物オキシダーゼ活性を例証するために、ニトロキシドで標識したヘモグロビンの溶液の試料を高い酸化条件下で貯蔵し、ニトロキシドのレドックス状態を電子スピン共鳴分光法によって経時的に調べた。例えば、4 - アミド - TEMPOで標識した  $\alpha$  - ラフィノーズ - 重合化ヘモグロビン溶液を封止ガラス容器内において酸素化状態で貯蔵した（図1A参照）。このような状態では、溶液中での超酸化物アニオンとメトヘモグロビンの生成速度は十分に速いので、ヒドロキシルアミン誘導体へのニトロキシドの変換反応は都合よく追跡することができる（反応式 [ 4 ] 並びに図1Aおよび図1B参照）。反応式 [ 4 ] に示すように、反磁性ヒドロキシル誘導体へのニトロキシドの変換反応には、超酸化物アニオンの分子性酸素への交換を伴う。このような変換を裏付ける実験的証拠を図1A および図1Bに示す。ヘモグロビンに共有結合したTEMPOの電子スピン共鳴スペクトル（図1A参照）は該ニトロキシドがその反磁性誘導体に変換されたことを示すが、試料を4 で30日間貯蔵した後ではその共鳴ピークは完全に消失する（図1B参照）。ニトロキシドはヘモグロビンの存在下でそのヒドロキシルアミン誘導体に変換されると、超酸化物オキシダーゼと類似の活性を示す。

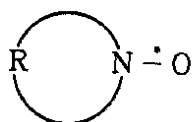
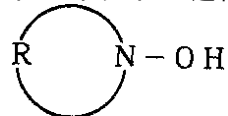
HBOC溶液中でのニトロキシドの超酸化物不均化酵素活性は、ヒドロキシルアミン誘導体のニトロキシドへの変換を示すことによって例証される [ 反応式 [ 4 ] および [ 5 ] 参照 ]。図1Aおよび1Bに示す実験条件下でニトロキシドはヒドロキシルアミンに完全に変換されることを考慮するならば（反応式 [ 4 ] 参照）、より多くの超酸化物アニオンを単に供給するだけでニトロキシドを再生することができる（反応式 [ 5 ] 参照）。この反応機構を例証するために、図1Aの試料を等容量の未標識ヘモグロビンを用いて希釈することによって、ニトロキシドに対するヘモグロビン（従って超酸化物アニオン）の相対濃度を高めた。図1Aと1Cの比較から明らかなように、ニトロキシドのシグナル強度はこの希釈効果によって約50%低下する。他方、試料を4 で30日間低温貯蔵した後では、ニトロキシドは反応式 [ 5 ] から予測されるように、部分的に再生された（図1D参照）。この実験結果は、ヒドロキシルアミン誘導体のニトロキシドへの再変換には超酸化物アニオンからの過酸化水素の生成が伴うということに一致する。



反応式 [ 4 ] と [ 5 ] は次の反応式にまとめられる：



この反応式から明らかなように、ニトロキシドはHBOC溶液中においては、低分子量の金属不含SOD類似体として作用する。電子スピン共鳴スペクトルによるニトロキシドの検出（図1D参照）は、超酸化物アニオンと下記のヒドロキシルアミンとの反応によって下記のニトロキシドと過酸化水素が生成することに一致する：



最近、オキソアンモニウムカチオンが、ニトロキシドを触媒とする超酸化物の不均化反応において中間体として含まれるということが報告されている [ クリシュナ (Krishna) ら、Proc. Nat. Acad. Sci. USA、第89巻、第5537頁～第5541頁（1992年）参照 ]。

ヘモグロビン分子あたりのニトロキシド分子の数は約1～40であるが、特異的標識化の場合は約2が最も好ましい。しかしながら、薬物動態学、毒物学および免疫学の観点からは

10

20

30

40

50

ニトロキシド - ヘモグロビンの比は最小にすべきである。例えば、3 - マレイミド - PROXYLのようなニトロキシドは、エタノールをキャリア溶媒とする100mMニトロキシド溶液をまず調製することによって、溶液中のヘモグロビンに共有結合させる。ヘモグロビンに対して2モル当量のニトロキシドを、DCL - Hbを8g/dl含有するラクテート化したリンガー液に攪拌下で直接添加した。反応混合物を攪拌下で22℃で反応させることによってニトロキシドの90%以上をDCL - Hbに共有結合させた（反応時間は通常1時間以内である）。未反応のニトロキシドは、30,000ダルトンの分子量カットオフ値を有する十字流膜濾過系に用い、10容量のラクテート化リンガー液で3回洗浄することによって除去した。ヘモグロビンの濃度を7 ~ 14g/dlに調整した試料を濾過滅菌処理に付した後、4℃で貯蔵した。注入後、HRCSが完全に酸素化されると、ニトロキシドはまずSOD類似体として作用し、次にカタラーゼ類似体として作用することが期待される。ニトロキシドはSOD類似体として超酸化物アニオンを過酸化水素に不均化させ（反応式[2]参照）、その結果として、内皮でのNOの分解を阻止して血管収縮を防止する。ニトロキシドはカタラーゼ類似体として過酸化水素を無害の水に変換させることによって、過酸化水素の毒性を防止する（反応式[3]参照）。

前述のように、ヘモグロビン分子自体の協同的酸素結合特性を研究するためにニトロキシドをヘモグロビンに共有結合させた報告はある。しかしながら、安定化、即ち、架橋、重合化、カプセル化または複合化した生理学的に適合性のあるヘモグロビン溶液とニトロキシドを併用した例はない。ヘモグロビンとニトロキシドの既知の化学によれば次にことが提案されている。即ち、化学的方法または組換え技術によって架橋されたヘモグロビンのニトロキシド - 標識化は、ヘモグロビン分子の安定化、重合化または複合化に用いられる特定の化合物によってブロックされていないヘモグロビン分子上の有効部位を選択することによっておこなうことが可能である。以下に説明するヘモグロビンの特定の安定化および重合化された形態のものは現在のところ臨床試験において用いられているので、これらの安定化および重合化されたヘモグロビンをベースとする酸素キャリアへのニトロキシドの結合については後述の第二、第三および第五の好ましい態様において説明するが、これらの態様は本発明の酸素解毒作用が既存のヘモグロビン溶液に適用できることを例証するものである。

本明細書においてニトロキシドHBOCの場合について説明するニトロキシド - 標識化法は、有用な抗酸化性酵素類似活性を有する他のニトロキシド標識化高分子、例えばニトロキシド - 標識化血清アルブミンおよびニトロキシド - 標識化イムノグロブリンの製造にも容易に適用できる。この方法によりニトロキシドで容易に標識できる血清アルブミンの形態は通常のアブミンモノマー、アブミンホモダイマー、アブミンオリゴマーおよびアブミン凝集体（ミクロスフェア）である。

ニトロキシドで標識したヘモグロビンおよび本明細書に記載の他の適当な高分子の抗酸化性酵素類似効果は、抗酸化性触媒作用が有効な医学やその他の分野においても有用である。

#### 発明の実施の態様

##### 1. 第一の好ましい態様... ニトロキシドで標識したHBOC用容器およびフィルター

本発明の酸素解毒作用は既存のHBOC溶液に適用できるが、この場合、該溶液中のヘモグロビンを化学的に変性させる必要はない。HBOCを貯蔵する容器の内部表面にニトロキシドを共有結合させることにより、既存の製剤を用いた場合に観察される酸素毒性に起因する生理学的悪影響を低減させることができる。

本発明に係るヘモグロビン含有溶液用容器は静脈注射液用容器と同様の生理学的に適合性のある特性を有するものである。一般的には該容器の材質はガラスまたは生体適合性のあるプラスチックが適している。ヘモグロビン含有溶液を容器に一定時間収容する態様の場合、該容器は酸素を含んでおらず、また、酸素を遮断するために封止できるものでなければならない。ガラス容器の場合、常套の栓や封止手段で十分である。しかしながら、現在利用し得る可撓性プラスチック容器は酸素透過性であるので、この場合は、金属箔オーバーラップまたはその他の封止手段を用いて溶液中のヘモグロビンが酸素と接触するのを防

止すればよい。

容器の内部表面にニトロキシドを適用するには、ニトロキシドポリマーまたはニトロキシドをドーブしたコポリマーの非浸出性層を該表面上に直接形成させればよい。ニトロキシド含有ポリマーは、遊離基の安定性が重合過程中に維持されるような一般的に知られている多数の重合法によって製造できる。

また、HBOC容器の内部表面を、ニトロキシドと結合し得る基、例えば、ニトロキシドのケトン基もしくはアルデヒド基と反応して安定なヒドラゾン誘導体を形成する親水性ヒドラジド基等を有する物質の被覆層を有するように変性させてもよい。この被覆反応は簡単におこなうことができる。例えば、ニトロキシドを酢酸塩緩衝液（pH5.0）に加えた溶液（100mM）をヒドラジドで活性化させたプラスチック容器に加えることによってヒドラゾン結合の形成を促進させればよい。

容器が調製されたならば、生理学的に適合性のある溶液を加える。この溶液は安定化された精製HBOCまたは本発明によるHRCSであってもよいが、該溶液は、ヘモグロビンと共に注入するのが望ましい静脈注射用のいずれかのコロイド溶液またはクリスタロイド溶液を含有していてもよい。この溶液は実質的に酸素を含有しない環境下に維持する。

容器の内部表面の処理のほかに、ルアーロック式の入口と出口を有するフィルター型のカートリッジであって、ニトロキシドが固定化されたゲル状または固体状マトリックスを保有するカートリッジを用いることによって、ヘモグロビン溶液が該カートリッジを通過する間に反応性酸素に由来する反応性種を除去してもよい。これらの処理によって、ニトロキシドはHBOCが通過する軟質または硬質のゲルマトリックスに結合し、実質的に注入前の滅菌並列フィルターとしての作用をする。ニトロキシドのような小さな配位子を硬質マトリックスに結合させる方法は、ガラス表面やプラスチック表面を化学的に変性させる方法が多数知られているように、アフィニティークロマトグラフィーの分野において多数知られている。滅菌溶液と適合性のあるマトリックスとしては種々のタイプのもの、例えばアガロースゲル、ポリスルホンをベースとする材料およびラテックス等が知られている。

フィルターカートリッジの場合、固体状マトリックスをニトロキシドと共有結合させてフィルターハウジングまたは類似の装置内に入れ、該装置内をヘモグロビン溶液を流通させることによって、患者に注入中の該溶液とニトロキシドを接触させることができる。実用的には一般的に入手し得る活性化アガロースゲルをマトリックスとして使用し、該ゲルを滅菌ルアーロック式カートリッジ内に収容する。このカートリッジはヘモグロビン含有溶液の注入に際して液体投与ライン中に挿入される。実際は、ニトロキシドが存在してヘモグロビンが通過するフィルターハウジングを有する構造体としては既知の種々の構造体可以利用できる。図12の場合、ハウジング（1）はニトロキシドで標識したアガロースゲル、例えば、4 - プロモアセトアミド - TEMPOで標識した $\omega$  - アミノヘキシルアガロース（図2A参照）および4 - アミノ - TEMPOを結合させた1,4 - ビス（2,3 - エポキシプロポキシ）ブタンアガロース（図2B参照）等を保有する。

注入に際しては、ヘモグロビン溶液を保有する静脈用注入ラインをルアー入口（2）と接続させてハウジング（1）内へ該溶液を導入させ、該溶液をハウジング内でマトリックス（4）と結合したニトロキシドと接触させることによって毒性酸素関連種を除去する。ヘモグロビン溶液はルアー出口（3）を通してカートリッジから流出させた後、患者に直接注入する。4 - アミノ - TEMPOで標識したエポキシアガロースの電子スピン共鳴スペクトルを図2Aに示す。あるいは、 $\omega$  - アミノヘキシル - アガロースを4 - （2 - プロモアセトアミド） - TEMPOと反応させることによってTEMPOで標識したアガロースを調製してもよく、該アガロースの電子スピン共鳴スペクトルを図2Bに示す。あるいは、ガルボジイミドを用いて4 - カルボキシル - TEMPOをアミドアガロースにカルボアミド結合を介して結合させてもよい。逆に、カルボジイミド、例えば、1 - エチル - 3 - （3 - ジメチルアミノ - プロピル）カルボジイミドを用いて4 - アミド - TEMPOをアガロースゲルのカルボキシル基と容易結合させることができる。

4 - アミノ - TEMPOで標識したカートリッジを次の様にして調製した。即ち、ラクテート化リンガー液に4 - アミノ - TEMPO [ シグマ化学社（Sigma Chem.Co.）製 ] を100mMの濃度

10

20

30

40

50

で加えた溶液をアルデヒド・アピド・クロム・カートリッジ [ユニシン・テクノロジー社 (Unisyn Tech.Inc.) 製] 中を室温で1時間循環させた後、ナトリウムシアノボロハイドライドを用いる還元処理を6時間おこない、次いでカートリッジのハウジングの内部をラクテート化リンガー液を用いて十分に洗浄した。

3 - アミノ - PROXYLで標識したカートリッジは、前記の手順に準拠し、4 - アミノ - TEMPOの代りに3 - アミノ - PROXYLを用いることによって調製することができる。

## II. 第二の好ましい態様・・・ニトロキシドで標識した安定化ヘモグロビン

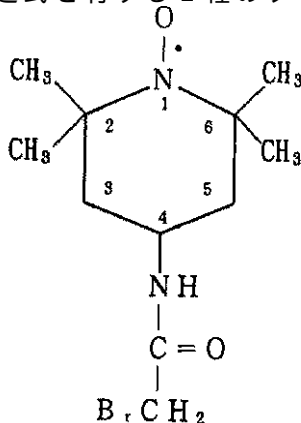
ヘモグロビンの構成サブユニットへの解離を防止するために、化学的方法または組換え技術によって該サブユニットの架橋によってヘモグロビンを分子内に安定化させる。ここで用いる安定化ヘモグロビンは、化学的方法または組換え技術によって安定化されたヘモグロビンモノマーのほか、個々のヘモグロビン分子がシクロデキストランまたはそのスルフェート化誘導体を用いて架橋されたダイマー、トリマーおよびより高位のオリゴマーを意味する。

ニトロキシドを安定化ヘモグロビンに結合させる好ましい方法と最良の態様は、安定化ヘモグロビンの2本のβ鎖のβ - 93スルフヒドリル基にニトロキシドを共有結合させることである。β - 93部位の特異的標識化は自然のヒトヘモグロビンの立体配置研究に関して報告されているが [マッコネル (McConnell) ら、Quart.Rev.Biophys., 第3巻、第91頁 (1970年) 参照]、架橋されたヘモグロビンについてのこの種の標識化は報告されていない。前述のように、いくつかのタイプのヘモグロビンをベースとした酵素キャリアー、即ち、DBBFで化学的に架橋されたもの、ジアスピリン架橋ヘモグロビンおよびα - ラフィノーズで安定化されてオリゴマー化されたヘモグロビンが開発されている。

本件出願人による米国特許第4,857,636号明細書に記載の糖開環により、二糖類、オリゴ糖類、好ましくはα - ラフィノーズのような三糖類から誘導される多価アルデヒドが得られる。これらの化合物は分子内安定化 (架橋) と分子間重合化の2つの作用をする。該特許明細書に記載の反応を調整することにより、重合を伴うことなく前記のような安定化ヘモグロビンを製造するのに多価アルデヒドを用いてもよい。別の場合には、安定化ヘモグロビンまたは重合化ヘモグロビンにニトロキシドを共有結合させてもよい。従って、多価アルデヒドを用いて安定化されたヘモグロビンをベースとする溶液は、この態様においては安定化ヘモグロビンとして取扱い、次の態様においては重合化ヘモグロビンとして取扱う。

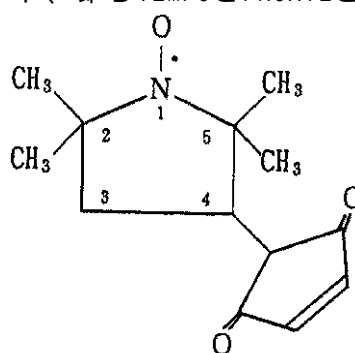
化学的に変性したヘモグロビンのβ - 93部位がニトロキシドの結合に対して立体的に接近し難い部位でないことを例証するために、DBBF - Hbのβ - 93部位にニトロキシドが共有結合できることを裏付けるデータを示す。

この態様では、DBBF - Hbを、2つのタイプのスルフヒドロ基に特異的な官能基と以下の構造式を有する2種のタイプのニトロキシド、即ちTEMPOとPROXYLと反応させる：



(I)

4-(2-ブロモイソブチル)-TEMPO



(II)

3-マレイミド-PROXYL

10

20

30

40

50

DBBF - Hbは、溶液中の精製した脱酸素化ヘモグロビンを既知の方法によりビス(3,5 - ジブromoサリシル)フマレートを用いて架橋させ、得られた生成物をカラムクロマトグラフィーによって精製することによって調製される。3 - マレイミド(2,2,5,5 - テトラメチルピロリジン - N - オキシル)[3 - マレイミド - PROXYL]による共有結合は、メタノールをキャリアー溶媒とする約100mMの溶液に調製した2モル当量の該ニトロキシドを、ラクテート化リンガー液にDBBF - Hbを約8g/dlの濃度で加えた溶液に添加し、22~23 で攪拌しながら約30分間反応させることによっておこなう。架橋度は、未反応ニトロキシドの電子スピン共鳴スペクトルのシグナル強度の低下率から評価する。未反応のニトロキシドを除去するために、反応混合物を10容量過剰のラクテート化リンガー液を用いて3回洗浄した。この洗浄処理には、30キロダルトンの見掛けの分子量限界(NMWL)カットオフ値を有するポリエチレンスルホン(PES)膜を備えたフィルترون攪拌セル[フィルترون・テクノロジー社(Filtron Technology Co.)製]を使用した。ニトロキシド - 標識化ヘモグロビンの電子スピン共鳴スペクトルの測定はブルーカー(Bruker)ESRスペクトロメーターを用いておこなった。4 - (2 - ブロモアセトアミド) - TEMPOで標識したDBBF - Hbの電子スピン共鳴スペクトルを図3Aに示す。3 - マレイミド - PROXYLを用いて同様にし

10

て標識化したDBBF - Hbの電子スピン共鳴スペクトルを図3Bに示す。この態様の場合、ニトロキシドは、ヘモグロビンの2本のβ - グロビン鎖上の孤立スルフィド基と共有結合する。従って、ヘモグロビンの2本のβ - グロビン鎖に結合したニトロキシドは2個あるので、99.00%の脱酸素ヘモグロビンにおけるニトロキシド対ヘモグロビン結合酸素の比は約200対1である。しかしながら、注入後は、脱酸素化HRCsは肺臓

20

内で酸素と結合するのでニトロキシド対ヘモグロビン結合酸素の比は100%の酸素化において約1対2になるが、これは、β - グロビン鎖上に残存する2個のニトロキシドを有するヘモグロビンの4本のグロビン鎖に4個の酸素分子が結合するからである。ヘモグロビン対ニトロキシドの比を1:2にすることにより、90%以上のニトロキシドをDBBF - Hbに共有結合させることができる。DBBF - Hbは、図3Bと類似の共鳴スペクトルを示すPROXYL部分(即ち、3 - マレイミドメチル - PROXYL)とマレイミド間のスパーサー基を用いて共有結合的に標識してもよい。注意すべきことは、他のニトロキシドをDPG結合部位(例えば、β - Val - 1、β - Lys - 82およびα - Lys - 99等)の特異的アミノ基に共有結合させてもよく、あるいはヘモグロビン上の残存する40 - プラス表面リシンε - アミノ基に結合させてもよいことである。TEMPOおよびPROXYLのイソチオシアネート誘導体もアミ

30

ノ基と反応性がある。例えば、4 - イチオシアネート - TEMPOは約10:1のモル比でヘモグロビンに添加してもよい。別の部位においてこのニトロキシドで標識したヘモグロビンの共鳴スペクトル(図示せず)は図3Aと類似する。DBBF - Hbのいくつかの部位にニトロキシドが結合できるので、α - グロビンダイマーで安定化させた組換えヘモグロビン(ルッカー(D. Looker)ら、ネイチャー、第356巻、第258頁(1992年)参照)もニトロキシドを用いて同様にして標識できる。また、ニトロキシド - 標識化架橋剤、例えば、TEMPO - 標識化スクシネート(米国特許第4,240,797号明細書参照)のDBBF類似体を調製することも可能である。

図4は、(A)2 - (ブロモアセトアミド) - TEMPO、(B)2 - (ブロモアセトアミド) - TEMPO - 標識化HBOCまたは(C)<sup>15</sup>ND<sub>17</sub>TEMPOL(TEMPOL:4 - ヒドロキシ - 2,2,6,6 - テトラメチルペリジン - 1 - オキシル)をラクテート化リンガー液に加えた溶液のESRスペクトルである(測定温度:室温)。図4Aと4Bの相違は、低分子量ニトロキシドの移動度とヘモグロビンのような高分子に共有結合したニトロキシドの移動度の違いによる。図4Cは、核スピンの1/2の安定な同位体窒素<sup>15</sup>Nは2つの共鳴ピークを与えるが、核スピンの天然の同位体窒素<sup>14</sup>Nは3つの共鳴ピークを与えることを示す[図4Aと図4C参照]、これらの一連の実験においては、これらのピークの分離を利用することによって酵素類似体および低分子量または高分子量ニトロキシドの生体内または生体外での酸素/還元反応が例証される。

40

ヘモグロビンに対して異なったモル比のニトロキシドを用いて標識したHBOCを以下のようにして調製した。2モル当量、4モル当量または8モル当量の4 - (2 - ブロモアセトア

50

ミド) - TEMPOを固体粉末として清浄フード内の3個の別々の15mlバキュテイナー (Vacutainer) 内へ直接添加した。ゴム隔壁を置換えた後、4 - (2 - ブロモアセトアミド) - TEMPOをクロロホルム20  $\mu$  lに溶解させた。バキュテイナーはゴム隔壁を通した27ゲージの針を介して高真空系 (5mmHg) に接続し、次いで、バキュテイナーの下半分を被覆する4 - (2 - ブロモアセトアミド) - TEMPOの皮膜からクロロホルムを除去した。適量のHBOCをゴム隔壁を通した滅菌注入器を用いて導入した後、反応は室温で1/2時間にわたり約5分間隔で渦状に断続的に攪拌しながらおこなった (ヘモグロビンに対して4モル比または8モル比のニトロキシドを用いた場合には、未溶解の固体があった)。次いで、バキュテイナーを4の冷蔵庫内で一夜放置した。翌朝、室温での渦状攪拌をさらに1/2時おこなうことによって、4 - (2 - ブロモアセトアミド) - TEMPOの全ての固体をバキュテイナーの表面から視覚的に消失させた。

10

反応混合物と対照を滅菌透析管に移し、遊離の非標識4 - (2 - ブロモアセトアミド) - TEMPOのESRシグナルが検出されなくなるまでラクテート化リンガー液に対する透析処理をおこなった。Hbに対して2モル当量、4モル当量および8モル当量の4 - (2 - ブロモアセトアミド) - TEMPOで標識したHBOCのESRスペクトルを図5A、5Bおよび5Cにそれぞれ示す。

ヘモグロビンに対して2モル当量の4 - (2 - ブロモアセトアミド) - TEMPOを用いた場合のESRは、透析をおこなった場合または透析をおこなわなかった場合と実質的に同一であり、このことは共有結合による標識化が定量的であることを示す。HBOCの場合、 $\beta$  - グロブリン鎖上の2個のSH - 基は共有結合の部位となる (このことは、N - エチルマレイミドを用いる4 - (2 - ブロモアセトアミド) - TEMPO標識化の選択的ブロッキングまたは逆相HPLCによるグロブリン鎖分析によって確認できる)。注意すべきことは、モル当量が2、4および8に対応するESRシグナル強度 (ピーク $M_0$ ) の比が、スペクトルをこれらに比例して低下させた装置感度で測定したので、同じ比になっていることである。

20

さらに、より多くの4 - (2 - ブロモアセトアミド) - TEMPOを、例えば生体内での放射線防護剤としてより高いモル比でHbに結合させることができる。

血液代替製剤におけるヘモグロビンに対するニトロキシドの好ましいモル比は後述するように8:1である。

図6には4 - (2 - ブロモアセトアミド) - TEMPO - 標識化HBOCと $^{15}\text{ND}_{17}$  - TEMPOLとの混合物のESRスペクトルを示す。この場合、4 - (2 - ブロモアセトアミド) - TEMPOの中央ピーク (下向きの矢印で示す) と $^{15}\text{ND}_{17}$  - TEMPOLの高磁場ピーク (上向きの矢印で示す) は同じ強度に調整した。

30

共鳴ピークの分離により、低分子量ニトロキシド (TEMPOL) とその高分子複合体を含む遊離基または酵素類似体の生体外および生体内 (マウスの体内) での反応における活性を同時に追跡することができる。例えば、この2種のニトロキシドの生体内での血漿半減期を特有のスペクトル特性によって比較した。特に、ヘモグロビンをベースとする溶液のマウス体内でのESRによる研究をニトロキシド対ヘモグロビンの比を8:1にすることによっておこなうことにより、高いESRシグナル強度が得られるという利点がある (図5C参照)。最初に、低分子量ニトロキシド ( $^{15}\text{ND}_{17}$  - TEMPOL; 図4C参照) および高分子量の4 - (2 - ブロモアセトアミド) - TEMPOL - 標識化HBOC (図4C参照) の大体の血漿半減期は、この2種の試料の混合物を調製し、ESRシグナル強度がほぼ同一になるように調整した (図6参照)。この混合物0.5mlを、加熱ランプの下で膨張させたマウスの尾の静脈内へ麻酔をかけて注入した。このマウスの尾をESR測定装置の空洞内に入れ、試料注入から10分以内にスペクトルを測定した (図7A参照)。

40

図7A~7Cを比較すれば明らかなように、 $^{15}\text{ND}_{17}$  - TEMPOLシグナルは検出されなかったが、4 - (2 - ブロモアセトアミド) - TEMPO - 標識化HBOCは明瞭に解像された (図7Bと7Cは血漿半減期に関するものであり、図7Cは図7Bの延長部分である)。HBOCの血管収縮効果はHBOCをラットに注入してから最初の5~15分間に完全に発現することが報告されているので、遊離基レドックス反応におけるニトロキシド - 標識化HBOCの作用効果は試料をマウスに注入直後から測定した。雌のCH3マウスの尾の静脈に、一酸化二窒素 (80%)、酸素 (2

50

0%)およびイソフルオラン(3%)で麻酔をかけた状態でカニユーレを挿入した。加熱ランプの下で視覚的に膨張したマウスの尾の静脈内に、長さ1フィートのポリエチレンチューブに装着した皮下注射用針(30ゲージ)から成るカニユーレを挿入し、これをシアノアクリレート接着剤で固定した。生体内でのESR測定のために、カニユーレを挿入したマウスを麻酔をかけた状態で円錐形の遠心分離管(50ml)に移した。この場合、該遠心分離管は、その円錐端部からマウスの尾が突出すると共に、麻酔ガスが該管の開口端から連続的に流入するように改造した。マウスの尾をプラスチックチューブ内へ挿入し、これをTE 102空洞内へ適合させた。カニユーレにはヘパリン(100ユニット/ml)を周期的に流してその開通性を保った。カニユーレは尾の根元近くに位置させると共に、ESR装置の空洞の外側に保持することによって尾からの純粋なシグナルを試料注入直後から測定した。試料(図8参照)0.5mlをカニユーレを通して注入し、スペクトロメーターを1/2分間の間隔で繰り返して走査できるようにセットした(図8Aおよび8B参照)。図8Aの場合、磁場は2ガウスずつ増加させ、図8Bの場合は磁場を2ガウスずつ減少させることによって共鳴スペクトルを重ね合わせた。 $^{15}\text{ND}_{17}$ -TEMPOLシグナルは試料注入後2.5分以内に消失した。同じ時間内に4-(2-ブromoアセトアミド)-TEMPOL-標識化HBOCのシグナルは類似の速度で減少した。

しかしながら、ニトロキシド-HBOCシグナルは血漿中では安定であった(図8B参照)。従って、図8Bと図7の結果から明らかなように、HBOCのような高分子に標識化されたニトロキシドは低分子量ニトロキシド(例えば、 $^{15}\text{ND}_{17}$ -TEMPOL)に比べて相当長い血漿半減期を有する。

遊離基反応について観察された特性には2つの経路が含まれる：

1. ニトロキシドからそのオキシアンモニウムカチオン中間体への遊離基(例えば、超酸化物)酸化とその後のオキシアンモニウムカチオンからその安定なヒドロキシルアミン誘導体への還元を含む高速経路。この還元には血管裂孔中に存在する1種または2種の還元性等価物(例えばNADH)の関与が含まれる。ニトロキシドからそのヒドロキシルアミンへの還元によってESRシグナル強度は急減する[モル比が8:1の4-(2-ブromoアセトアミド)-TEMPO-標識化HBOCの場合、HBOC上の4-(2-ブromoアセトアミド)-TEMPOは約25%となる]。この経路には低分子ニトロキシドと高分子ニトロキシドが含まれる。

2. ニトロキシドが環状遊離基反応(例えば、SOD類似反応)に含まれる反応機構に従って、HBOC上に存在する75%の4-(2-ブromoアセトアミド)-TEMPOによる抗酸化性酵素類似活性を示す低速経路(図8B参照)。ニトロキシド遊離基がSOD類似体として実質的に消費されない場合には、ESRシグナル強度の遅い低下速度は主として前記の反応機構に起因するものであるが、二次的にはHBOC濃度の減少も関係する。何故ならば、HBOCは血管裂孔からその血漿半減期の関数としてゆっくりと除去されるからである。

この結果は、ニトロキシドで標識したHBOCが生体内での遊離の解毒に有用であることを例証する。この有用性は、生体内における遊離基の短時間(分単位)の捕捉と酵素類似体として作用するニトロキシドによる酸化体反応からの長時間(時間単位)にわたる持続的保護が得られることによって規定される。

図8のスペクトルの解析結果に基づけば、遊離状態で残存する4-(2-ブromoアセトアミド)-TEMPO-標識化HBOCの約73%が酸化/還元(レドックス)サイクリング反応に含まれることになる。このことは、血管スペースの境界内での生体内レドックス反応にTEMPOLが関与することを示す。

### III. 第三の好ましい態様・・・安定化ヘモグロビンのニトロキシド-標識化ポリマー

架橋モノマーから安定化ヘモグロビンのダイマーを調製することは可能であるが、安定化ヘモグロビンまたは自然のヘモグロビンからヘモグロビンポリマーを調製することも可能である。ヘモグロビンポリマーの溶液はヘモグロビンのモノマー、ダイマー、トリマー、テトラマーおよびより高位のオリゴマーの混合物を含有する。HBOCとして用いる重合化ヘモグロビンを含有する溶液は一般に安定化ヘモグロビンモノマーに比べてより長い血漿循環時間とより高い酸素輸送能を有する。このような重合化ヘモグロビンはいくつかの重合化剤を用いる多数の反応経路によって調製できる[米国特許第4,001,200号、同第4,857,6

10

20

30

40

50

36号および同第4,826,811号各明細書参照]。重合化ヘモグロビン溶液にニトロキシドを導入する好ましい方法は、ヘモグロビンの $\beta$ -グロビン鎖の $\beta$ -93スルフヒドリル基にニトロキシドを共有結合させる方法である。このようなスルフヒドリル基を安定化法または重合化法に関与させることは知られていない。従って、ヘモグロビンモノマーの安定化または重合化の前にニトロキシドをヘモグロビンに共有結合させるのが好ましい。

例えば、ニトロキシドを前記の第二態に記載の方法に従ってDBBF-Hbに共有結合させ、次いでセーガル(Sehgal)らの方法(米国特許第4,826,811号明細書参照)に従ってグルタルデヒドを用いて重合させる。図4Bは、3-マレイミド-PROXYLで標識した後、グルタルデヒドで重合させたDBBF-HbのESRスペクトルである。同様に、グルタルデヒドで重合させたDBBF-Hbを4-(2-ブromoアセトアミド)-TEMPOを用いて標識してもよい。

類似の方法により、重合化ヘモグロビン中間体、例えば、未反応アルデヒド基を有する $\alpha$ -シクロデキストラン-重合化ヘモグロビン中間体、 $\alpha$ -ラフィノーズ-重合化中間体またはグルタルデヒド-重合化中間体に4-アミノ-TEMPOまたは3-アミノ-PROXYLを還元アミノ化によって共有結合させてニトロキシド-標識化ヘモグロビンポリマーを調製してもよい。還元アミノ化の場合には、反応の順序とタイミングが重要である。4-アミノ-TEMPOは、重合完結後であって、重合化ヘモグロビンへのニトロキシドの共有結合をもたらす還元反応の前にグルタルデヒド-重合化ヘモグロビンに添加する。同様に、 $\alpha$ -ラフィノーズ-重合化ヘモグロビンのニトロキシドによる標識化は、還元アミノ化の前に4-アミノ-TEMPOまたは4-アミノ-PROXYLを添加することによっておこなってもよい。

例えば、4-アミノ-TEMPOで標識した $\alpha$ -ラフィノーズ-重合化ヘモグロビンは本件出願人による米国特許第4,857,636号明細書に記載の方法によって調製される。但し、この場合には、重合の完結後に6モル当量の4-アミノ-TEMPOを添加し、還元前に20モル過剰のボランジメチルアミンコンプレックスを添加する。前述のように、ヘモグロビンは二糖類または開環糖、例えば、オリゴ糖または好ましくは $\alpha$ -ラフィノーズのような三糖類から誘導される多価アルデヒドを用いて架橋して重合してもよい。同様に、単糖類を用いてヘモグロビンの安定化と重合化をおこなってもよいが、より高い分子量の糖が好ましい。4-アミノ-TEMPOで標識した $\alpha$ -ラフィノーズ-重合化ヘモグロビンを透析処理と洗浄処理に付した試料のESRスペクトルを図9Aに示す。

重合化ヘモグロビンのヘモグロビンオリゴマー( $Hbn; n = 2 \sim 4$ )の収率を高めるためには、架橋剤のポリアルデヒドの原子価を高めるのが望ましい。 $\alpha$ -シクロデキストラン、 $\beta$ -シクロデキストランおよび $\gamma$ -シクロデキストラン並びに6-、7-および8-環化グルコース分子に相当するスルフェート誘導体を使用する場合、開環 $\alpha$ -シクロデキストラン、 $\beta$ -シクロデキストランおよび $\gamma$ -デキストランは反応性アルデヒド基をそれぞれ12個、14個および16個有する。これらの開環架橋剤を用いてヘモグロビンを架橋して重合させることによってオリゴマーに富む重合化ヘモグロビンを製造することができる。前述のように、未反応のアルデヒドを利用してアミノニトロキシド、例えば4-アミノ-TEMPOまたは3-アミノ-PROXYLと共有結合させてもよい。

さらに、開環スルフェート誘導体、例えば、スルフェート化 $\alpha$ -シクロデキストランは次の2つの付加的な理由から有効な架橋剤である。(1)スルフェート基はDPGと類似の活性を示して架橋ヘモグロビンの酸素親和性を低下させて酸素輸送特性を改良する。(2)スルフェート基は親和性標識として作用し、「クラスター」を形成する多重(例えば、 $n = 2 \sim 4$ )ヘモグロビンと複合化する。クラスター複合体が形成されると、シクロデキストランのアルデヒド基はDPG結合部位内の $NH_2$ 基と極めて接近するので、ヘモグロビンのサブユニット内および分子内での共有結合的架橋が促進され、この結果、ヘモグロビンオリゴマーの収率が増大する。抗酸化性酵素類似活性のほかに、開環シクロデキストランで重合化されてニトロキシドで標識されたヘモグロビンは $\alpha$ -ラフィノーズやグルタルデヒドで重合化されたヘモグロビンに比べて収率と組成の点で優れている。

#### IV. 第四の好ましい態様・・・ニトロキシドで標識されてリボソームでカプセル化されたヘモグロビン

リボソームは両親媒性分子の凝集によって形成される粒子であって、内部の水室と外部の

10

20

30

40

50

バルク水に面した極性面を有する中間球状形態の二層構造を有する。リポソームを製造するためのいくつかの利用し得る方法は当該分野においては周知である。一般的には、シパルミトイルホスファチジルコリンのような分子は水溶液中でリポソームを形成する。リポソームは安定性を高めるためにコレステロールを用いて調製してもよく、また、中性脂質のような他の物質および正または負に荷電した化合物のような表面改質剤を含有させてもよい。好ましいリポソームは小さな単一ラメラ状の二層球状殻である。

ヘモグロビンをリポソーム中にカプセル化する方法は知られている〔ファルマー (Farmer) らによる米国特許第4,911,921号明細書参照〕。この発明の目的のためには、多数の方法を利用してニトロキシドに基づく酸素解毒作用をリポソームでカプセル化ヘモグロビン溶液に付与させることができる。例えば、前述のようにして調製されるニトロキシドで標識した天然のヘモグロビンまたはニトロキシドで標識した安定化ヘモグロビンを出発原料とし、該ニトロキシド - 標識化ヘモグロビンに既知のリポソームによるカプセル化法を適用することが可能である。この態様では、スピン膜イムノアッセイ用に開示されているTE MPO - コリンクロリドのような膜透過性ニトロキシドと共に精製ヘモグロビンをカプセル化してもよい〔シア (Hsia) ら、米国特許第4,235,792号明細書参照〕。

また、ニトロキシドで標識した脂肪酸（例えば、7 - DOXYL - ステアレート、12 - DOXYL - ステアリン酸、16 - DOXYL - ステアレート等）、コレスタン、コレステロール類似体（例えば、3 - DOXYL - コレスタン等）またはリン脂質（例えば、12 - DOXYL - ステアレートで標識したホスファチジルコリン等）を含むリポソームを用いて精製ヘモグロビンをカプセル化してもよい。3 - DOXYL - コレスタン標識物を含むリポソーム中にカプセル化したヘモグロビン製剤はタブシ (Tabushi) らの文献〔J. Am. Chem. Soc., 第106巻、第219頁 (1984年) 参照〕に記載の方法と類似の方法によって調製してもよい。以下に説明するようなDOXYLで標識したステアリン酸および/またはコレスタンを含む脂質組成物を含有するクロロホルム溶液5mlを窒素気流中で溶媒を除去させて乾燥させ、残渣を真空下で乾燥させた後、得られた皮膜をラクトール化リンガー液にヘモグロビンを加えた溶液 (24g/dl) 2ml中に懸濁させた。懸濁液中の脂質の濃度は100mMである。リポソームでカプセル化したヘモグロビンを回転させながら好ましくは37℃でインキュベートし、全ての脂質を分散させて多層状小胞を形成させた。多層リポソームでカプセル化したヘモグロビンを含有し、未カプセル化ヘモグロビンを含有しない溶液を、クック (Cook) らの方法 (米国特許第4,533,254号明細書参照) に従い、マイクロフルイダイザー (microfluidizer) を通した。リポソーム中のジパルミトイルホスファチジルコリン : コレステロール : ジパルミチジルホスファチジン酸 : 3 - DOXYL - コレスタンのモル比は0.5:0.4:0.02:0.07である。3 - DOXYL - コレスタンで標識したリポソームでカプセル化したヘモグロビンのESRスペクトルを図10Aに示す。この試料の立体配置においては、ニトロキシドはリポソーム膜中に挿入され、脂質の二層の水界面と内側と外側の表面上に存在する。図10Aに示す脂質組成物中の3 - DOXYL - コレスタンを16 - DOXYL - ステアリン酸で代替させた試料のESRスペクトルを図10Bに示す。このスペクトルから得られるニトロキシドの移動度は、ステアリン酸のDOXYL部分が主として脂質の二層の疎水性内部に位置するという解釈と矛盾しない。3 - DOXYL - コレスタンと16 - DOXYL - ステアレートを同じモル比で脂質組成物中に添加して調製したニトロキシド - 標識化リポソームでカプセル化したヘモグロビンのESRスペクトルを図10Cに示す。図10Cのスペクトルは図10Aと図10Bのスペクトルの合成である。何故ならば、この態様においては、ニトロキシドは膜 - 水界面とその疎水性脂質二層内部の両方に位置するからである。ニトロキシドが両方の位置に存在するこの態様によれば、脂質二層疎水性内部と膜 - 水界面の両方において酸素解毒作用が発揮されるので、カプセル化されたヘモグロビンに酸素解毒能を保有させるという利点が付加的に得られる。

#### V. 第五の好ましい態様・・・ニトロキシドで標識した複合化ヘモグロビン

生理学的に適合性のある複合化ヘモグロビン溶液は、プラズマエキスパンダー (plasma expander) としての生体適合性高分子とヘモグロビンの複合体を形成させることによって調製される。プラズマエキスパンダー、例えば、デキストラン (Dx)、ポリオキシエチレン (POE) およびヒドロキシルエチルスターチ (HES) 等は体内でのヘモグロビンの循環半

10

20

30

40

50

減期を長くするのに用いられる。このような状態のヘモグロビン分子と生体適合性高分子は集合的にヘモグロビン複合体と呼ばれる。ニトロキシドをヘモグロビン複合体に取り込む方法としては多数の簡便な方法がある。例えば、被複合化ヘモグロビンをニトロキシドで標識したヘモグロビン、例えばTEMPO - 標識化DBBF - Hbで代替させるだけでよい。これは、複合化ヘモグロビンの調製においてヘモグロビンまたはピリドキシル化ヘモグロビンを3 - マレイミド - PROXYL - DBBF - Hbまたは4 - (2 - ブロモアセトアミド) - TEMPO - DBBF - Hbで代替させることによっておこなうことができる。

4 - アミノ - TEMPOで標識したデキストランとヘモグロビンとの複合体はタム (Tam) らの報文 [ Proc.Natl.Acad.Sci., 第73巻、第2128頁 (1976年) 参照 ] に記載の方法によって調製される。最初に、0.15M NaClと5mMリン酸塩緩衝液 (pH7.4) を含む8%ヘモグロビン溶液を過ヨウ素酸塩で酸化したデキストランと複合させることによってシッフ塩基中間体を調製した。20モル当量の4 - アミノ - TEMPOをヘモグロビンに付加させることによってニトロキシドとデキストランの残余反応性アルデヒド基との間でシッフ塩基を形成させた。4 でインキュベーションを30分間おこなった後、50モル当量のジメチルアミンボラン水溶液を添加した。この溶液を4 でさらに2時間インキュベートし、透析処理に付した後、ラクテート化リンガー緩衝液を用いて再調製し、次いでフィルترون膜濾過ユニット (フィルترونテクノロジー社製) を用いる滅菌濾過処理に付した。4 - アミノ - TEMPOで標識したデキストラン - ヘモグロビン複合体のESRスペクトルは、高い運動性自由度に起因するシャープな非対称トリプレットを示す (図11参照)。デキストランに共有結合したTEMPOの易動度の増大は、きつく折り重ねられたヘモグロビン分子に比べて柔軟なデキストラン鎖にニトロキシドが結合したことに対応する (図3Aおよび3B参照)。従って、図11のスペクトルは、ニトロキシドで標識されたデキストランとヘモグロビンとの新規複合体が形成されたことを示す。

#### VI. 第六の好ましい態様・・・ニトロキシド - 標識化アルブミンの酵素類似活性

前述のように、ニトロキシド (例えば、TEMPOL) は、超酸化物を過酸化水素に不均化させる金属酵素であるSODと類似の触媒活性を示す。さらに、生体系においては、ニトロキシドはペルオキシダーゼとシュードペルオキシダーゼと相互作用して、過酸化水素を酸素に変換させる酵素であるカタラーゼと類似の活性を発揮する。ニトロキシドの生物学的効果には、酸化的ストレスを減少させることによって反応性酸素種の細胞毒性からの保護に寄与することが含まれる。例えば、ニトロキシドは生体内および生体外における電離放射線による損傷から保護する。従って、ニトロキシドを生体に投与すると、複雑な抗酸化性酵素類似活性を発揮する。

TEMPOLは静脈内に注入されると、非常に短い血漿半減期を示す。TEMPOLはその分子サイズと電荷特性に起因して、血管スペースから容易に放出される。しかしながら、HBOCまたはHRCS以外の特定の医学的用途の場合、血管スペース内に存在する抗酸化性酵素類似体を用いるのが望ましいこともある。これは、ヘモグロビン以外的高分子であって、生物学的に安全で望ましい血漿半減期を有する高分子にニトロキシド化合物を結合させることによって達成される。このような望ましい高分子の一例としてはヒト血清アルブミン (HSA) が挙げられる。

血清アルブミンは多重配位子 - 結合部位を有する血漿タンパク質であり、血中の多くの配位子に対する運搬体タンパク質である。ニトロキシドはヒト血清アルブミンの多くの特異的配位子結合部位に特異的または非特異的に結合する。

ニトロキシド - 標識化アルブミンを生体内で利用することによって、反応性酸素種による細胞損傷を防止してもよい。ニトロキシド - アルブミンは単独で使用してもよく、または低分子量ニトロキシド化合物、例えば、TEMPOLと併用してもよい。ニトロキシド - 標識化アルブミンは改良されたアルブミン変性物 (即ち、抗酸化剤活性を有するように改良されたアルブミン) として、アルブミンが現在常用されている適用分野 (非経口用コロイド溶液としての用途を含む)、生体材料の分野および生体適合性表面コーティングの分野等において有効に利用できる。

アルブミンは血漿から得てもよく、あるいは組換え遺伝子技術によって調製してもよい。

HSAは種々の形態、例えばモノマー（正常な血漿形）、ホモダイマー、オリゴマーおよび凝集体（マイクロスフェア）として使用してもよい。ニトロキシドを用いるアルブミンの特異的標識化は種々の結合部位（例えば、ビリルビン、FFA、インドール、Cu 結合部位等）において、タンパク質の関連部位への結合特異性を付与させるために活性されたニトロキシド化合物を用いておこなってもよい。好ましい例は、HSAの主要なビリルビン - 結合部位に共有結合させた2,2,6,6 - テトラメチル - 1 - オキシル - 4 - ピペリジリデンスクシネート（TOPS）ニトロキシドである。アルブミンの非特異的標識化は約50個の利用し得るアミノ基上でおこなってもよい。

#### VII. 第七の好ましい態様...ニトロキシド標識化イムノグロブリン

前述の態様の場合のように、特定のニトロキシドは静脈に注入すると非常に短い血漿半減期を示した。長い血漿半減期を有する抗酸化性酵素類似体が要求される場合には、ニトロキシド化合物をイムノグロブリンに結合させることによって長時間にわたって持続する抗酸化性酵素活性を付与させればよい。

リムノグロブリンは免疫系のB細胞内で生産される一群の血漿タンパク質であって、2種の特異的配位子結合部位（抗原 - 結合部位）によって特徴づけられる。ニトロキシドは、一次および二次免疫応答中におけるイムノグロブリンのヘプタン - 結合性特異性と親和性に関する研究におけるプローブとして従来から使用されている。

ニトロキシド - 標識化アルブミンに関する前記態様の場合のように、ニトロキシド - HBOCの例における前述のニトロキシド - 標識化法はニトロキシド - 標識化イムノグロブリンの製造に容易に適用できる。

ニトロキシド - 標識化イムノグロブリンは、反応性酸素種による細胞損傷を防止するために生体内で使用してもよい。ニトロキシド - イムノグロブリンは、長期の血漿半減期を有する持続的抗酸化剤活性を付与するために単独で使用してもよく、あるいは低分子量ニトロキシド化合物と併用してもよい。

ニトロキシド - 標識化イムノグロブリンはイムノグロブリン自体の特異的標識化またはヘプタン - 結合性部位における共有結合的標識化によって調製してもよい。生体の自然な免疫応答の一部としてのニトロキシド - 標識化イムノグロブリンのクリアランス（clearance）を回避するために、イムノグロブリンフラグメント、例えば、非特異的標識化法を用いる既知の方法によるイムノグロブリンの開裂によって生成する（Fab）<sub>2</sub>を用いてもよい（ニトロキシドとイムノグロブリンの好ましいモル比は60:1までである）。

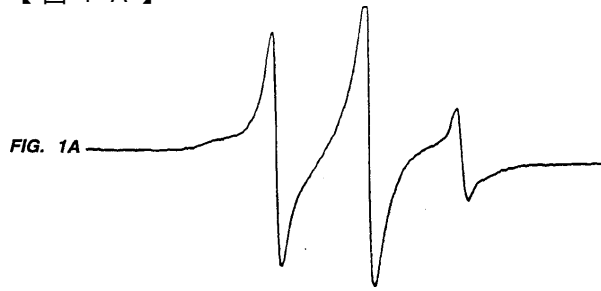
本発明は上記の特定の態様によって例証したが、生理学的に適合性のあるヘモグロビンの多様な形態と安定なニトロキシド遊離基の構造的多様性に基けば、以下の請求の範囲によって記載される本発明の基本的な技術的思想を逸脱することなく、前記態様の多数の変形態様が可能である。

10

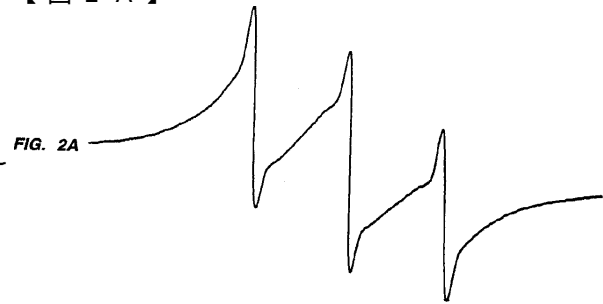
20

30

【 1 A 】



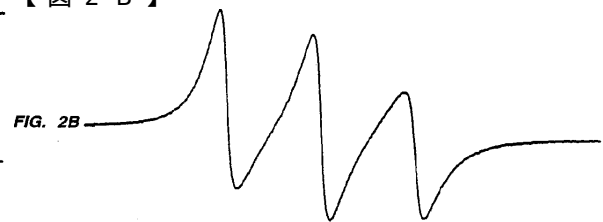
【 2 A 】



【 1 B 】



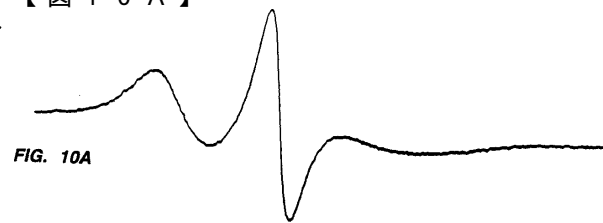
【 2 B 】



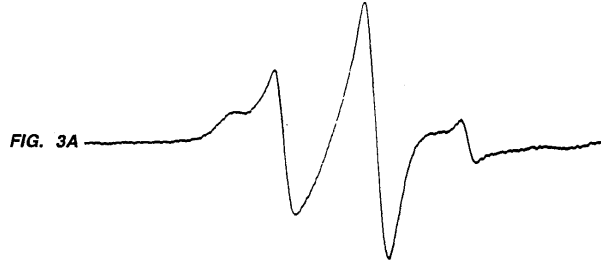
【 1 C 】



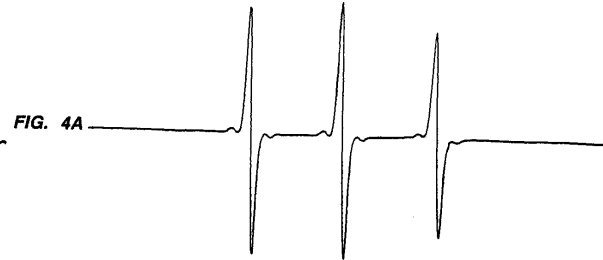
【 1 0 A 】



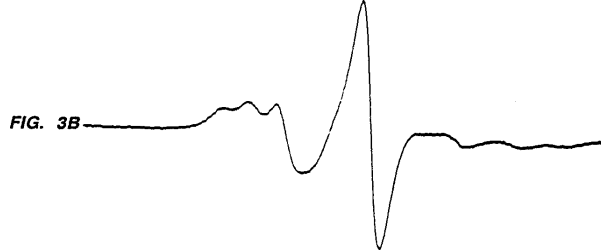
【 3 A 】



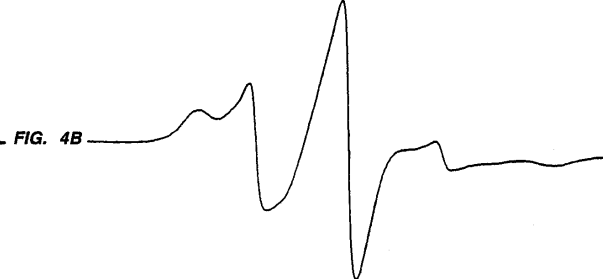
【 4 A 】



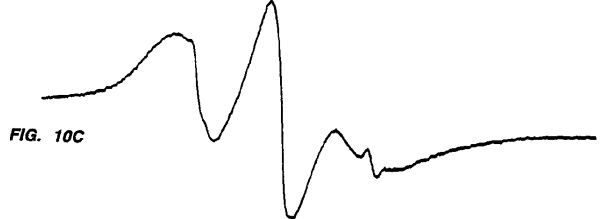
【 3 B 】



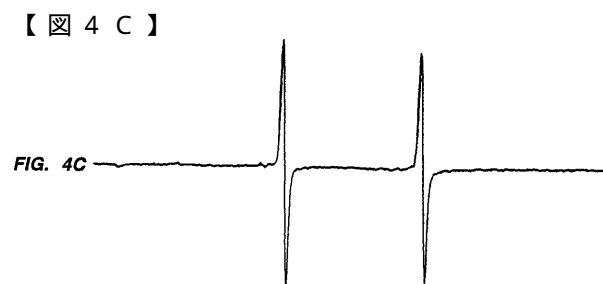
【 4 B 】



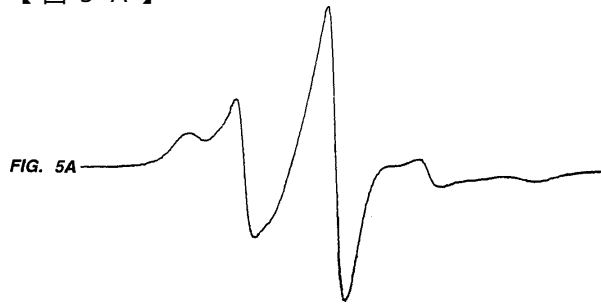
【 1 0 C 】



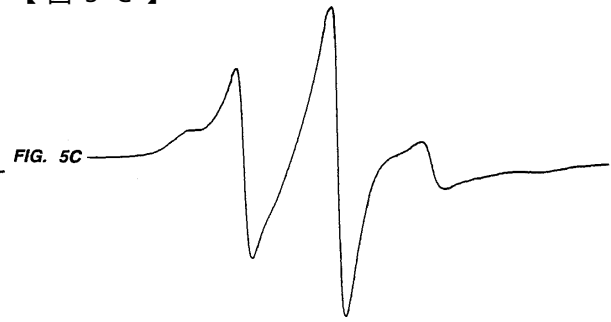
【 4 C 】



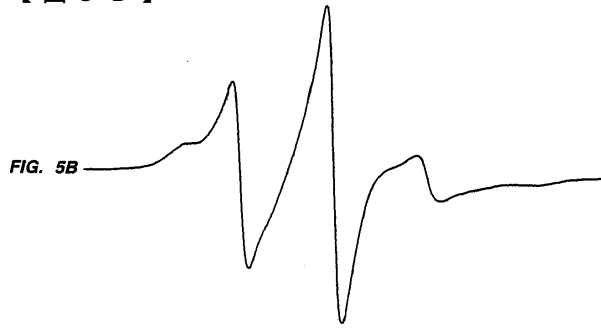
【 図 5 A 】



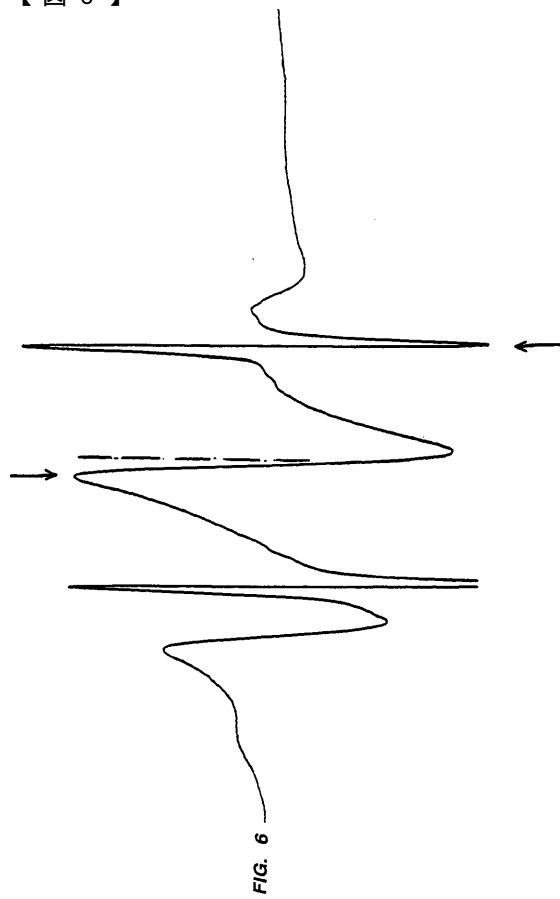
【 図 5 C 】



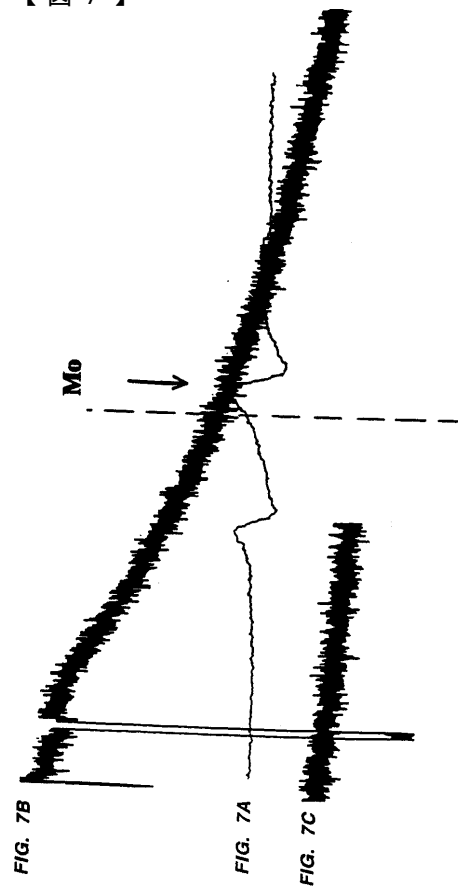
【 図 5 B 】

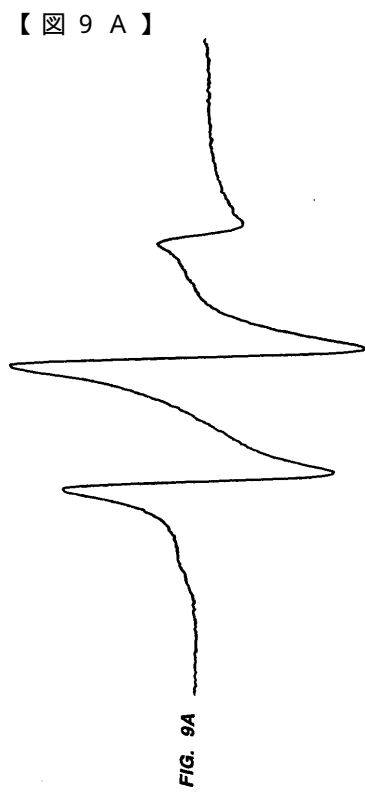
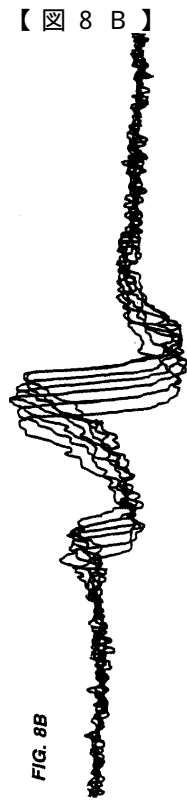


【 図 6 】

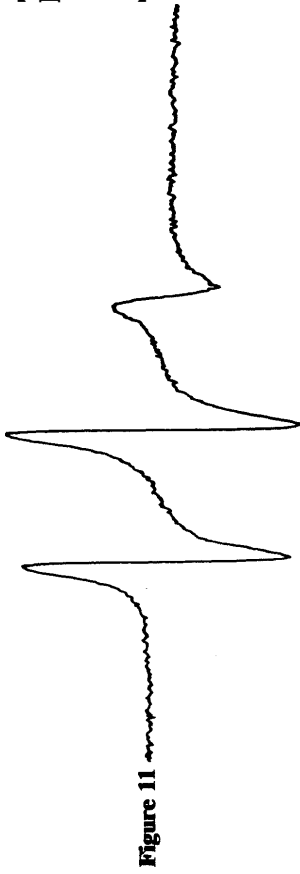


【 図 7 】



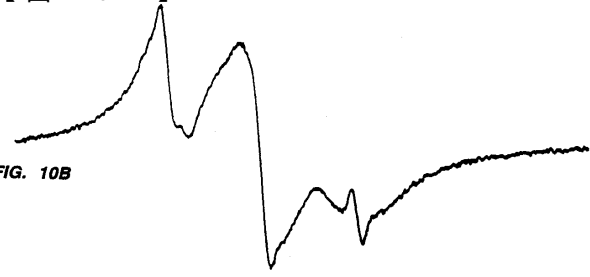


【図 11】

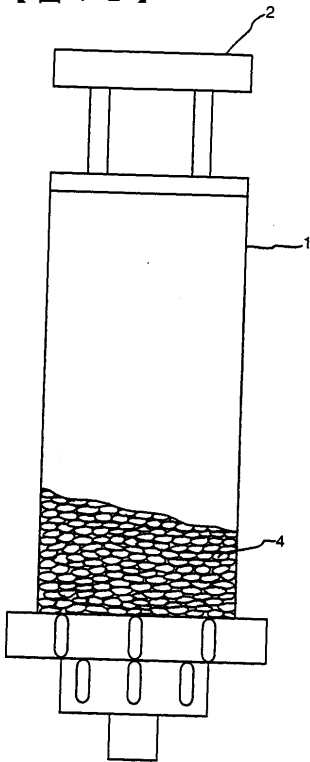


【図 10B】

FIG. 10B



【図 12】



---

フロントページの続き

審査官 鈴木 恵理子

(58)調査した分野(Int.Cl.<sup>7</sup>, D B 名)

C07K 14/76 ~ 805

C07K 1/10 ~ 113

A61K 9/127

A61K 38/42