[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl[6]
A61K 38/42
C07K 14/805

[12]发明专利说明书

[21] ZL 专利号 94193809.3

[45]授权公告日 1999 年 11 月 24 日

[11]授权公告号 CN 1046635C

[22]申请日 94.8.16 [24]颁证日 99.8.21
[21]申请号 94193809.3
[30]优先权
[32]93.8.16 [33]US [31]08/107,543
[32]94.8.15 [33]US [31]08/291,590
[86]国际申请 PCT/US94/09246 94.8.16
[87]国际公布 WO95/05397 英 95.2.23
[85]进入国家阶段日期 96.4.16
[73]专利权人 夏任长
地址 加拿大安大略省
[72]发明人 夏任长
[56]参考文献
FREE RADICAL RESERACH COMMUNICATIONS, VOL. 17, NO. 3. 1992. 1. 1 R. J. Mehlhorn 等" Nitroxide - stimulated H202 decompo - sifion by perxidases and
NATURE, VOL. 220. 1968. 11. 23 H. M. Mcconnell 等"spin - labelled haemoylobin and the haem - haem interaction."
审查员 黄 赤

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 魏金玺 姜建成

权利要求书 4 页 说明书 38 页 附图页数 12 页

[54]发明名称 使用氮氧化物去除氧毒性的组合物和方法

[57]摘要

本发明涉及以氮氧化物与生理学上相容的大分子相加成为基础的,缓解氧毒性 的组合物和方法之技术领域。具体说来,本发明介绍以稳定氮氧化物自由基用 于无细胞血红蛋白溶液、包封血红蛋白溶液、经稳定化处理之血红蛋白溶液、聚合血红蛋白溶液、共轭血红蛋白溶液、氮氧化物标记白蛋白,以及氮氧化物 标记免疫球蛋白为特征的,以血红蛋白为基的红细胞替代品。本文中所述制剂 与自由基相互作用,起抗氧化酶类似物之作用,并缓解氧化应激反应及与氧相关的 毒性。

ISSN1008-4274

权利要求书

1．生理学上相容的以血红蛋白为基的溶液，其特征在于包含经稳定化处理的血红蛋白，及共价键合于稳定化血红蛋白上的氮氧化物。

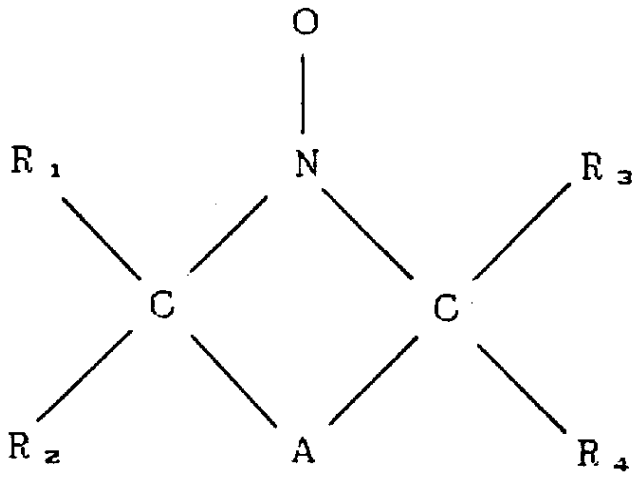
2．权利要求1的以血红蛋白为基的溶液，其中血红蛋白经交联加以稳定化处理。

3．权利要求1的以血红蛋白为基的溶液，其中血红蛋白是重组的和以α－球蛋白二聚体稳定化处理的。

4．权利要求2的以血红蛋白为基的溶液，其中血红蛋白是用衍生自开环线性糖的多价醛交联的。

5．权利要求2的以血红蛋白为基的溶液，其中血红蛋白是用衍生自开环环形糖的多价醛交联的。

6．权利要求1、2、3、4或5的以血红蛋白为基的溶液，其中氮氧化物结构如下：

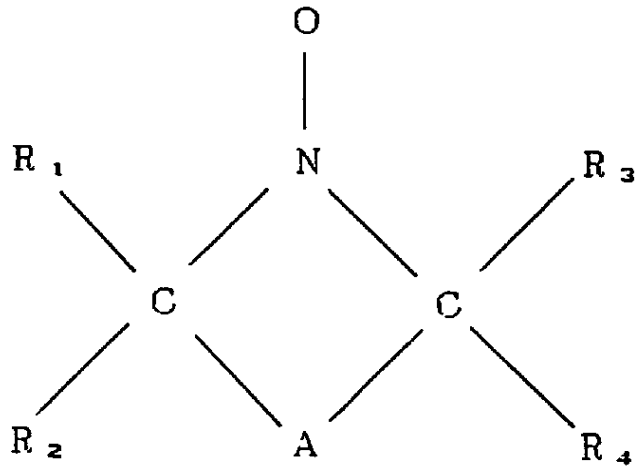


其中R_1－R_4是1－4个碳原子的烷基，而A是5元环的其余环原子。

7．权利要求6的以血红蛋白为基的溶液，其中氮氧化物是2，

2，5，5－四甲基吡咯烷－N－氧基。

8．权利要求1、2、3、4或5的以血红蛋白为基的溶液，其中氮氧化物结构如下：



其中R_1－R_4是1－4个碳原子的烷基，而A是6元环的其余环原子。

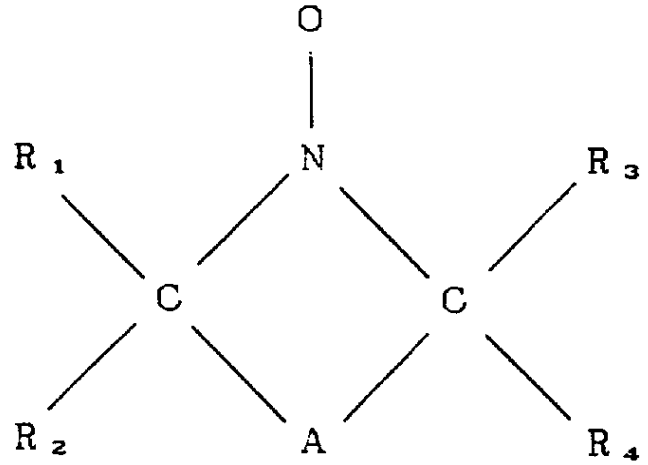
9．权利要求8的以血红蛋白为基的溶液，其中氮氧化物是2，2，6，6－四甲基哌啶－N－氧基。

10．生理学上相容的以血红蛋白为基的溶液，其特征在于包含高聚物血红蛋白，和共价键合于聚合血红蛋白上的氮氧化物。

11．权利要求10的以血红蛋白为基的溶液，其中血红蛋白高聚物包含衍生自开环线性糖的多价醛。

12．权利要求11的以血红蛋白为基的溶液，其中血红蛋白高聚物包括衍生自开环环状糖的多价醛。

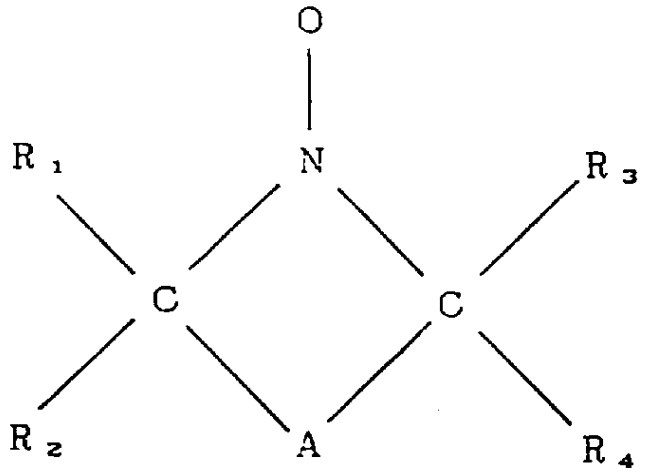
13．权利要求10、11或12的以血红蛋白为基的溶液，其中氮氧化物结构如下：



其中R_1－R_4是1－4个碳原子的烷基，而A是5元环的其余环原子。

14．权利要求13的以血红蛋白为基的溶液，其中氮氧化物是2，2，5，5－四甲基吡咯烷－N－氧基。

15．权利要求10、11或12的以血红蛋白为基的溶液，其中氮氧化物结构如下：



其中R_1－R_4是1－4个碳原子的烷基，而A是6元环的其余环原子。

16．权利要求15的以血红蛋白为基的溶液，其中氮氧化物是2，2，6，6－四甲基哌啶－N－氧基。

17. 生产含稳定化血红蛋白的生理学上相容溶液的方法，其特征在于包括下述步骤：

将氮氧化物共价键合到稳定化血红蛋白上；

将该稳定化血红蛋白溶液放入基本上无氧的环境中。

18. 权利要求 17 的方法，其中氮氧化物共价键合于稳定化处理血红蛋白上的位点包括巯基、β 9 3 位、或活性氨基。

19. 生产含生物学上相容大分子的生理学上相容溶液的方法，其特征在于：

提供含共价键合于氮氧化物上的生物学上相容大分子的生理学上相容溶液，其中所述氮氧化物在有机体血管腔内与自由基物种具反应活性。

20. 权利要求 19 的方法，其中大分子选自由血红蛋白、白蛋白或免疫球蛋白所组成的一类物质。

21. 权利要求 20 的方法，其中大分子是经稳定化处理的血红蛋白。

22. 权利要求 2 0 的方法，其中大分子是经聚合的血红蛋白。

说　明　书

使用氮氧化物去除氧毒性的组合物和方法

发明领域

本发明涉及氮氧类化合物的应用，该类化合物同包括血红蛋白、白蛋白、免疫球蛋白和脂质体等在内的大分子物质一起用于缓解活生物体内与氧相关之物种的毒性影响。具体说来，本发明公开以氮氧化物（nitroxide）结合生理学上相容的非细胞和囊封血红蛋白溶液为特征，用作红细胞替代品的化合物和方法，以及公开氮氧化物与其它生理学上相容的大分子物质相结合，用于缓解和预防由自由基引起的损害和氧化应激反应之化合物与方法。

技术背景

虽然许多年来氧的代谢机理已众所周知，但氧化应激反应在生理学和医药学上所起作用的有关知识，却并不为人所熟知。尽管自由基引起多种类型生理学损害的机理也已联系到氧化应激反应及其毒性效应进行过研究，然而，消除与氧相关物种伴生的氧化应激反应或毒性的方法及化合物的开发方面，却收效有限。研制血液替代物方面所遇到的困难，便是预防和缓解氧毒性之困难的突出例证。

为生产可以安全输入人体的血液替代物，科学家和医务工作者已奋斗了几十年之久。持续地血源短缺和血型不相容、混血相配以及疾病传播等问题，已引起私人企业、大学、及政府部门广泛动员作出努力，企图揭示出良方，解决可大量安全地输入血液替代品，而不引起明显副作用的问题。目前，有几家公司已就其实验性血替代品正进行

临床试验。但未能预料的各种生理学反应以及研究和开发过程的固有复杂性诸多因素，通过规章制度审批阶层而限制其取得进展，并且阻止了其血液替代品引入临床应用。

Research Advisory Committee of the United States Navy于1992年8月公布一份报告，总结了几家单位为生产血液替代品所付出的努力，评价了这些工作所达到的现状，并总的介绍了所遇到的毒性问题。该报告反映了该科研共同体的现实共同感受，即使研制出的血液替代品，[通常称之为“以血红蛋白为基的氧载体”(HBOC)]被证明对输送氧是有效的，但肯定有毒性的问题尚未解决。在已有血红蛋白为基的氧载体（HBOC）的临床研究中，已观察到各种各样的输血反应，包括系统性高血压和血管收缩等等。这些种种反应迫使很多药物公司放弃了临床试验，或者采用低剂量水平。

现有的以血红蛋白为基础的血替代品的毒性问题，已引起美国政府的高度重视。Naval Research Committee的建议，由National Institute of Health以“血红蛋白为基的氧载体：毒性机理”为主题的计划请求书（PA - 93 - 23）的形式加以贯彻。因此医药和科学联合机构面对一紧急使命和压力：需要一种可以输注而无现有以血红蛋白为基的氧载体所发现之副反应的血替代品。

血红细胞是血液的主要成份，并含有体内氧输送体系。长久以来已认识到血替代品的最重要特征是能载运氧气。血红细胞之所以能载运氧气，是因为血红细胞的主要成份是血红蛋白，它的主要功能就是作为氧载体。用作血替代品进行临床试验的大部分产物均含血红蛋白，该血红蛋白从血红细胞膜中，与血红细胞的其余成份分离开来，并加以提纯，基本上除去所有污染物。但是，当血红蛋白从血红细胞中移出，放入其天然形式的溶液中时，它并不稳定，很快分化成其组成亚

单元。为此原因，用在以血红蛋白为基的氧载体（HBOC）中的血红蛋白必需进行稳定化处理，避免其于溶液中分化。该研究的主要人力物力消耗均用于开发在溶液中稳定的以血红蛋白为基础的产物，且该稳定化处理需保证其氧转送功能不受损害。现有的以血红蛋白为基的氧载体之输氧能力已被完全肯定（见下述美国专利：

Nos. 3,925,344; 4,001,200; 4,001,401; 4,053,590; 4,061,736; 4,136,093; 4,301,144; 4,336,248; 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 and 5,061,688).

在体内，当血通过肺部时，血红细胞中的血红蛋白与氧分子结合，并输送这些氧分子到全身，满足体内经常新陈代谢功能的需要。然而，大部分活生物体必需呼吸大气中氧，以维持生命，这却是科学和医药学上一个自相矛盾的问题。一方面，几乎所有的活生物体需要氧才能生存，另一方面，在正常氧代谢中，各种与氧有关的毒性化学物种也随之产生。

关于由血红蛋白输氧引起氧化应激反应的问题，已知在输氧过程中，血红蛋白（Hb）分子自身可被其所携载的氧（O_2）分子氧化。此种自氧化反应产生两种不希望的产物：偏－血红蛋白（met－Hb）和超氧物阴离子（$\cdot O_2^-$）。该化学反应可表达如下：

$$Hb + 4\ O_2 \longrightarrow met\text{-}Hb + 4\ \cdot O_2^- \quad [1]$$

该超氧物阴离子（$\cdot O_2^-$）是载有一个附加电子及一负电荷的氧分子。该超氧物阴离子具高度反应活性和毒性。在由血红蛋白输送氧的情况下，潜在的有害氧化应激反应由血红蛋白的自氧化反应所产生的超氧物阴离子而引起，并且是在超氧物歧化酶（SOD）存在下，该超氧物阴离子随后转化为毒性过氧化氢所造成的后果，该反应如下：

$$2\ \cdot O_2^- \quad + \quad 2H^+ \quad \text{-------->} \quad 2\ O_2 + \quad H_2O_2 \qquad [2]$$

确信超氧物阴离子和过氧化氢存在于血红细胞中，将是对血红细胞产生应激反应的根源。

除了本文中一直提及的血红蛋白输氧这一问题外，血红细胞一个鲜为人知的特征是它们含有一类特异性的酶，这些酶能将作为氧代谢副产物产生的与氧有关的化学物种解毒。若没有这些特异性酶系统的保护作用，则血红蛋白的自氧化作用将导致血红细胞的损毁和破坏。然而在体内，血红细胞中该酶体系具储备能力，它通过将正常代谢时所产生的超氧化物阴离子转化为非毒性物种，并由此控制氧化应激反应水平，来保护身体免遭氧毒性损害。但是如果该酶体系被破坏，那么血红细胞将完全受到损害。血红细胞中产生该保护体系酶之一种的基因若受到损伤，将引起显著的病理学症状。例如，葡糖－6－磷酸酯脱氢酶不足（即红细胞遗传物质紊乱）可引起由过氧化氢诱导的溶血性贫血症。此种失调是由于不能使细胞维持足以将氧化谷胱甘肽还原的NAD（P）H水平，结果便不足以完成通过谷胱甘肽过氧化酶进行的过氧化氢去毒作用（P. Hochstein, Free Radical Biology & Medicine, 5 : 387 (1988)）。

血红细胞保护酶体系以两步化学过程将毒性超氧物阴离子分子转化为无毒形式。该过程第一步是通过超氧物歧化酶（SOD）将超氧物阴离子转化为过氧化氢（见式［2］）。因为过氧化氢也是有毒的，血红细胞中还含有另一种酶，即过氧化氢酶，它可将过氧化氢转化为水，此为该过程第二步（见式［3］）。

$$2\ H_2O_2 \quad \text{----------->} \quad 2\ H_2O \quad + O_2 \qquad [3]$$

使用谷胱甘肽过氧化酶，血红细胞也能将过氧化氢或其它毒性有机过氧化物去毒，因所述谷胱甘肽过氧化酶能与谷胱甘肽反应而将过氧化氢及有机过氧化物转化成水。血红细胞还含有能避免血红蛋白自氧化所产生的偏－血红蛋白集结的酶。该酶即偏－血红蛋白还原酶，能将偏血红蛋白转变为血红蛋白的天然形式。因此，体内血红蛋白自氧化毒效应，可由特异性的以酶为基础的反应，消除氧代谢之不希望副产物而得以避免。

迄今为止研制的以血红蛋白为基的氧载体（HBOC）中，不存在能在正常氧输送过程中，保护血红细胞不受氧毒性损害的超氧物歧化酶、过氧化氢酶、及谷胱甘肽过氧化酶之酶促氧去毒功能。既然无氧去毒功能，而由于与氧相关的毒性物种又存在，那么现有HBOC溶液的安全性便受到威胁。

现有HBOC溶液制造的基本方法是从血红细胞中移出血红蛋白，然后提纯除去所有非血红蛋白之蛋白及其它可引起各种输血反应的杂质（见美国专利4780210、4831012、4925574）。大部分HBOC生产中，用以获得纯血红蛋白的现有分离和提纯法，不可避免地引起氧去毒酶体系基本破坏和去除。此外，已能使用重组技术生产纯血红蛋白，来代替从血红细胞中分离和提纯血红蛋白。然而，重组人血红蛋白也是高纯的，不含有血红细胞中存在的氧去毒体系。因此，由于提纯过程既除去了有害杂质也除去了正常存在于血红细胞中的有益氧去毒酶，并最终引起与氧相关的毒性，那么发展生产高纯血红蛋白溶液的精细技术，只不过是一种盲目追求。

所观察到的现有HBOC毒副作用之一是血管收缩式高血压。众所周知超氧物歧化酶（SOD）在体外能很快清除超氧物阴离子，并延长氧化氮（NO）的松弛血管效应。氧化氮是一种现已公开过的分子，是

以前已知仅作为“内皮衍生的松弛因子”（EDRF）的物质。氧化氮通过SOD延长血管松弛效应，归因于SOD能避免超氧物阴离子和氧化氮之间反应的缘故（M.E. Murphy et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10860 (1991); Ignarro et.al. J. Pharmacol. Exp. Ther. 244: 81 (1988); Rubanyi Am. J. Physiol. 250: H822 (1986); Gryglewski et.al. Nature 320: 454 (1986)）。

然而在体内，此种超氧物阴离子对EDRF失活现象却并未观察到，一般认为不会发生。而且，损害SOD活性的某些病理生理学状况也可造成由超氧物阴离子引起的毒效应（Ignarro L. J. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 30 : 535 (1990)）。现有HBOC溶液所作临床前动物研究所观察到的高血压效应暗示，大量输注现有HBOC时，其中超氧物阴离子浓度是破坏EDRF和观察到的血管收缩及系统性高血压的诱因。

因此，重要的是清楚描绘由超氧物阴离子与氧化氮（ＮＯ）反应（由此引起溢血后果），以及ＮＯ与血红蛋白的结合引起的高血压效应。输注HBOC时，通过与氧化氮反应产生相应的亚硝酰－血红素（NO－heme）加成物，该血红蛋白也可降低氧化氮的血管松弛作用。特别是已知脱氧血红蛋白以亲和力与氧化氮之结合，其程度要比其与一氧化碳相结合高几个数量级。这些血红蛋白－ＮＯ之间的相互作用可以用来检测氧化氮，及研究氧化氮的生物活性。例如，由血红蛋白引起的对抗氧化氮舒张血管作用看来取决于血红蛋白细胞膜的渗透性。在完整血小板中，血红蛋白不能逆转氧化氮前体Ｌ－精氨酸的影响。而相反地，在溶解血小板的胞液中，血红蛋白则是对通过氧化氮介导而诱导环GMP形成的Ｌ－精氨酸最有效的抑制剂。这些实验证明，血红蛋白不能有效地透过血小板膜（Radomski等人，Br. J. Pharmacol.

101 ： 325 (1990))。因此HBOC理想特征之一是能消除氧化氮与血红蛋白之间的相互作用。也已知血红蛋白既对抗内皮依赖性血管舒张作用(Martin W.等人,J. Pharmacol. Exp. Ther. 232 ： 708 (1985)),也对抗ＮＯ引起的血管平滑肌舒张作用（Grueter C. A. 等人，J. Cyclic. Nucleotide Res. 5 ： 211 (1979))。人们作过种种尝试，通过将HBOC中血红蛋白加以化学稳定化处理，进行聚合反应，给以囊封，或与之共轭等措施延长其循环时间，以限制血红蛋白的溢血和高血压效应。因此，虽然现有的HBOC不具膜渗透性，并且能够输送氧，但该HBOC溶液在输注时没有能力避免超氧物阴离子与氧化氮之间反应。

现有血替代品在毒性问题上的理想溶液应是以血红蛋白为基的制剂，该制剂含现有HBOC的输氧功能，并具有血红细胞的去氧毒功能。然而简单地加入超氧物歧化酶（SOD）进现有HBOC溶液却并不可取，因为，在还原浓超氧物阴离子时，借助此反应，血红蛋白被氧化成偏－血红蛋白的反应也得到加强，导致不希望的偏血红蛋白聚集（见式［１］），并且也极不希望血红蛋白溶液中，超氧物阴离子转化为过氧化氢的反应增强，因为过氧化氢具毒性并具反应活性，在贮存期间，它能分解成有毒羟基自由基或形成其它毒性有机过氧化物。

本发明探讨稳定的氮氧化物自由基（下面称之为氮氧化物“nitroxide（s）”）的应用，它将红细胞的去氧毒功能提供给以血红蛋白为基的血替代品，并缓解氧化应激反应，避免由自由基毒性伴生的生物学损伤，包括炎症、反复输注损伤后贫血症、离子射线以及老化。氮氧化物是稳定的自由基，它具有与超氧物歧化酶（SOD）相似的抗氧化催化活性，并且当其存在于体内时，可以与其它物质相互作用，表现出类似过氧化氢酶的活性。过去，氮氧化物被用于电子自旋共振光谱作为“自旋标化物”研究生物大分子的构型和运动特性。

氮氧化物也因其化学结构能提供超精密限定相互作用的稳定未配对电子，而用于检测活性自由基中间体。此外，也观察到氮氧化物有与酶相似的作用，某些低分子量氮氧化物被鉴定出有类似超氧物歧化酶（SOD）（A. Samuni等人，J. Biol. Chem. 263：17921 (1988)）和过氧化氢酶（R. J. Mehlhorn等人，Free Rad. Res. Comm., 17：157 (1992)）的活性。许多研究表明，氮氧化物可渗透细胞膜，能短时间内保护哺乳动物细胞不受由次黄嘌呤／黄嘌呤氧化酶产生的超氧物阴离子和过氧化氢出现所引起的细胞毒性侵害。

有关体内安全问题，由于氮氧化物公认是相当安全的，预期相对高水平氮氧化物具良好耐受性。例如，TEMPO在小鼠体内的最大腹膜内给药耐受剂量为275mg／kg，而LD_{50}是341mg／kg。而且，与大分子结合的氮氧化物比游离氮氧化物还要安全。因此，利用氮氧化物标记大分子作为抗氧化酶类似物，展现出既达到高氮氧化物水平（及高活性）同时又具可接受安全性的可能性。

迄今为止，在活有机体中研究的大部分氮氧化物是分子量相对低的化合物，这些化合物很容易穿过细胞膜渗透进体内组织。依照本发明，作为酶类似物使用的氮氧化物，与生物及合成的大分子相结合，这些大分子可以输注，并可保持局限于血管腔中。本发明优选实施方案中，氮氧化物与大分子共价相连，缓解自由基毒性，同时将氮氧化物限制于其所在处，即存留于血管腔，此处它们与自由基反应的应用价值最佳。

将氮氧化物与生物大分子共价相连，已有各种技术被报导过，所述生物大分子包括血红蛋白、白蛋白、免疫球蛋白和脂质体。例如参见：

McConnell et. al., Quart. Rev. Biophys. 3:p.91 (1970); Hamilton et. al., "Structural Chemistry and Molecular Biology" A. Rich et. al., eds. W.H. Freeman, San Francisco, p.115 (1968); Griffith et. al., Acc. Chem. Res. 2:p.17 (1969); Smith I.C.P. "Biological Applications of Electron Spin Resonance Spectroscopy" Swartz, H.M. et. al., eds., Wiley/Interscience, New York p.483 (1972)。虽然经过挑选的氮氧化物已经有过与血红蛋白分子共价键合，用于研究血红蛋白协作性氧结合机理的先例，但并没有人用氮氧化物与血红蛋白连接，特别配制与血替代品一起使用过。下述实验结果证明，氮氧化物可以连接到经稳定化处理的、聚合的、共轭的，及包封的血红蛋白上，由于该氮氧化物能与自由基反应，而将其用作血替代品。氮氧化物标记的血红蛋白与自由基相互作用，也提示，实质上具有血浆半衰期的其它生物学相容大分子也可用氮氧化物标记，以对氧化应激反应或自由基化学物种引起的毒性有利地提供抗性或保护作用。

正如上面已指出的，众所周知氮氧化物可以与包括血红蛋白、血清白蛋白、免疫球蛋白及脂质体在内的生物大分子化学键合。然而，此项工作一般只将氮氧化物简单用作生物物理研究的分子探针，尚未具体制成氮氧化物标记大分子用作治疗物质。

就本文所述大分子而言，通常称之为“标记策略”的两种将氮氧化物与大分子结合的工艺方法是可行的。特异性标记的意义体现在氮氧化物与大分子键合的微观环境和氮氧化物所产生的催化活性上。在特别的配位键位点（或多个位点）进行特异性标记，将产生具有更牢固键合位微观环境的血红蛋白产物，从而也产生就氮氧化物的催化特异性和活性来说更为可靠的化合物。

根据包括氮氧化物标记HBOC输注所出现的实验结果，小分子量和大分子量氮氧化物在体外或体内血管腔内与自由基的反应已观察到。根据这些研究，证明从氮氧化物标记HBOC参与自由基氧化／还原反应的机理，能够构建新的HBOC化合物和去除自由基毒性的其它氮氧化物标准大分子。

发明公开

本发明公开使用与生物大分子，特别是与含血红蛋白的溶液相结合的稳定氮氧化物的组合物和方法。在具体实施方案中，用稳定氮氧化物与含血红蛋白的溶液分别配制几种血替代品制剂，这些制剂具有红细胞去氧毒功能。这些制剂在本文中可以称之为以血红蛋白为基的红细胞替代品（HRCS），因为其中以血红蛋白为基的氧载体（HBOC）的输氧能力由于提供体内红细胞的去氧毒功能而增长。氮氧化物标记白蛋白、和氮氧化物标记免疫球蛋白，借助氮氧化物共价连接于具多种特性配位键位点的大分子上也能提供去氧毒作用，所述大分子是稳定的且于体内无毒性，并且基本上具有血浆的半衰期。

此外，本发明介绍共价连接于容器内表面，或连接于装入滤器中的不溶性基质上，准备与现有HBOC一起使用，在给病人输注之前清除与氧相关之化合物的氮氧化合物。本文所介绍的HRCS制剂能缓解现有HBOC溶液中产生的超氧物阴离子所引起的氧化应激反应，当输注时，将能减少对氧化氮、即内皮衍生舒张因子（EDRF）的破坏作用。若EDRF的破坏得到避免，那么当现有的HBOC溶液输入患者时所出现的血管收缩和系统性高血压等问题便基本上得到缓解。

下述的HRCS制剂和氮氧化物标记大分子，通过使氮氧化物起“超氧物氧化酶”的功能（一种红细胞中未见的类酶反应），而阻止与氧相关的毒性物种形成。这些HRCS制剂中，氮氧化物可避免血红蛋白自

氧化所产生的不希望的超氧物阴离子集结（见式［1］）。氮氧化物标记白蛋白和免疫球蛋白具有抗氧化酶类似物的其功能保留于所处血管和间质腔的类似功能。

在超氧物氧化酶反应中，超氧物阴离子被氧化回复到分子氧状态，而不形成过氧化氢。这部分要借助建立氮氧化物浓度大大超过氧浓度的贮存条件来实现。若按本文公开的方式使用，那么氮氧化物可以避免以形成超氧物阴离子为起始步骤的不希望的阶式氧化反应。而且，本文所述生理学相容HRCS溶液优于现有HBOC溶液，因为本文所述制剂在输注给患者之后，氮氧化物将模拟超氧物歧化酶和过氧化氢酶的酶促活性。

用氮氧化物与生理学上相容的血红蛋白溶液相结合的优选组合方式包括：1）氮氧化物连接于贮存容器，或共价连接于作为滤器用的不溶性基质上，2）氮氧化物共价连接于通过化学式重组交联加以稳定化处理的血红蛋白上，3）氮氧化物共价连接于经聚合的血红蛋白上，特别是氮氧化物占2、4和8摩尔当量，4）氮氧化物与血红蛋白一起包封于脂质体中或嵌入脂质体膜中，5）氮氧化物共价键合于共轭血红蛋白上，6）氮氧化物共价键合于白蛋白上，7）氮氧化物共价键合于免疫球蛋白上。

本文也公开基于可渗透膜共包封氮氧化物与血红蛋白的HRCS。公开制备上述制剂的特殊方法，该方法作为生产含有氮氧化物的滤器，和贮存并将现有HBOC去毒的容器的方法，而加以介绍。

用氮氧化物与人血清白蛋白或重组白蛋白相结合的优选组合包括：1）白蛋白以氮氧化物（例如4－（2－溴乙酰氨基）－TEMPO）进行非特异性标记，按氮氧化物对白蛋白采用高比例的方式进行。

2）于特异性配位键合位对白蛋白进行特异性标记。

用氮氧化物与免疫球蛋白相结合的优选组合包括氮氧化物标记结合于免疫球蛋白（对于半抗原或抗原是特异性的）上的半抗原或抗原。

附图的简要说明

图1A和1B表示4－氨基－TEMPO标记的O－棉子糖聚合血红蛋白，在（A）第1天，（B）第30天记录的电子自旋共振光谱（其中TEMPO是2，2，6，6－四甲基哌啶－1－氧基）。图1C是用相等体积的未标记血红蛋白稀释的图1A样品第1天记录的光谱。图1D是第30天记录的图1C样品光谱。

图2A和2B分别表明4－（2－溴乙酰氨基）－TEMPO共价连接于ω－氨己基－琼脂糖上，而4－氨基－TEMPO共价连接到1，4－二（2：3－环氧丙氧（基）丁烷活化的琼脂糖上的电子自旋共振光谱。

图3A和3B分别是表明将4－（2－溴乙酰氨基）－TEMPO和3－马来酰亚氨基－PROXYL分别成功地共价连接到3，5－二－溴甲硅烷基－二富马酸（DBBF）交联的人血红蛋白，或双阿司匹林交联的人血红蛋白上的电子自旋共振光谱。

图4A是4－（2－溴乙酰氨基）－TEMPO的ESR光谱。图4B是4－（2－溴乙酰氨）－TEMPO标记的HBOC的ESR光谱。图4C是$^{15}ND_{17}$TEMPOL在Lactated Ringer氏溶液中，于室温下记录的ESR光谱。

图5是用氮氧化物对Hb之不同摩尔比将4－（2－溴乙酰氨基）－TEMPO标记HBOC所得出的ESR光谱，其中图5A表示该比例为2：1，图5B为4：1，而图5C为8：1。从图5A－5B－5C将仪器的灵敏度按比例调低来记录光谱，以便中心峰（Mo）均显示出相似峰高。

图6是4－（2－溴乙酰氨）－TEMPO标记HBOC和$^{15}ND_{17}$-TEMPOL的混合物的ESR光谱，其中前者的中心峰（见朝下箭头）和后者的高场峰（见朝上箭头）被调到相似强度。这是图4B和图4C叠加的ESR光谱。

图7是4－（2－溴乙酰氨基）－TEMPO－标记的小鼠HBOC的血浆半衰期。图7A是用图6所示样品0.5ml经静脉输注之后约10分钟，从小鼠尾所记录的氮氧化物信号的ESR光谱。图7B是10倍仪器灵敏度处所记录的图7A中心峰（Mo）信号强度随时间而降低（扫描时间30分钟）的情况。图7C是其扫描结束时图7B的延续。

图8是4－（2－溴乙酰氨基）－TEMPO－标记HBOC（Hb中8g／dl，TEMPO：Hb为8：1）和$^{15}ND_{17}$TEMPOL(32g小鼠中0.5ml)混合物的血浆半衰期，其值是从鼠尾以插管法，输注氮氧化物即时记录所得出的。注射前样品的ESR光谱示于图6。图8A是按0.5分钟间隔所记录的5次ESR光谱的系列谱图，每次扫描之间磁场强度均提高2Gauss，表示信号强度作为时间的函数而降低。图8B是图8A的延续，即在同样时间间隔反复记录6次ESR光谱的系列谱图，但不同之处是每次扫描之间磁场强度均降低2Gauss。

图9A和9B分别表示4－氨基－TEMPO标记的O－棉子糖交联并聚合的人血红蛋白，和3－马来酰亚氨基－PROXYL标记的与戊二醛（glutaldehyde）聚合的DBBF－血红蛋白的ESR光谱。

图10A、10B和10C分别是脂质体包封的含（A）3－DOXYL－胆甾烷，（B）16－DOXYL－硬脂酸，（C）3－DOXYL－胆甾烷和16－DOXYL－硬脂酸的人血红蛋白ESR光谱。

图11是以4－氨基－TEMPO标记并与葡聚糖共轭的氮氧化物标准血红蛋白的ESR光谱。

图 1 2是含有与氮氧化物键合的固态基质，且含血红蛋白的溶液可以通过其间的滤筒的实施方案。

工业实用性

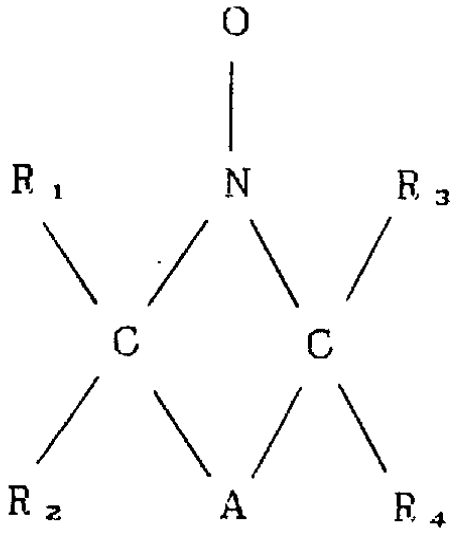
本文中通常所用的“血红蛋白”这一术语，除了上下文中注明的而外，均指氧－、羧基－、碳单氧基、及脱氧－血红蛋白。本发明所使用的血红蛋白可以是来源于人的、重组的或动物的血红蛋白，并由已知技术获得和提纯。通过醛类化合物与交联血红蛋白衍生物反应，血红蛋白可以共价键合于吡哆醛－5′－磷酸酯的吡哆醛基上或开环腺苷三磷酸酯（O－ATP）上。交联衍生物可以包括多官能团、杂二官能团和同二官能团交联试剂，例如二醛、多醛、二环氧化物、多环氧化物、活化多羧基和二羧基类（如3，5－二溴甲硅烷基－二富马酸酯，和TEMPO琥珀酸酯）或TOPS（见US专利4240797）环葡聚糖及它们的阴离子（如硫酸根）交联血红蛋白，以及聚合血红蛋白。本文所述的本发明所用所有血红蛋白溶液均是生理学上相容的。这些血红蛋白溶液是除去热原、内毒素及其它污染物的无细胞物。

本文所用“氮氧化物（nitroxide）这一术语指稳定的氮氧化物自由基，它们的前体，以及它们的衍生物，包括氧原子被羟基代替，且以氢卤化物形式存在的相应的羟胺衍生物。对于本发明的目的来说，优选羟胺衍生物的盐酸盐形式。

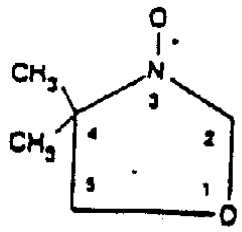
本文所述的氮氧化物中，该氮氧化物的未配对电子是稳定的，部分原因是氮核与强给电子基取代的两个碳原子相连。借助N－O键的氧上的部分负电荷，两相邻碳原子一起将未配对电子局限于氮核上。

氮氧化物可以为杂环或线性结构。其基本特点是稳定的自由基。从结构上来说，下式的氮氧化物是优选的，其中R_1－R_4是给电子基，而A是杂环的其余环原子。

14



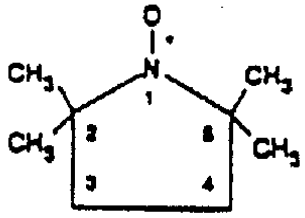
在这些杂环结构中，A代表5元（吡咯烷基或带有一个双键的PROXYL，即吡咯啉基）或6元（哌啶基或DOXYL）杂环结构的其余碳原子，并且其中一个碳原子可以被氧原子取代（噁唑啉基或DOXYL），而某些氢原子可以被多至两个溴原子取代。此种杂环结构中，可以利用稳定的同位素（例如N_{15}，氘）。α碳原子的取代作用应当使未配对电子基本保持于πP轨道构型。R_1 －R_4是烷基（直链或支链），或者芳基，但优选甲基或乙基。任何氮氧化物的α碳原子上的取代基都应当是强给电子基，以增加稳定性，因此虽然其它较长碳链也可以使用，但甲基（CH_3）或乙基（C_2H_5）作为优选基团。实际上，考虑采用硬脂基（长链烷基）可以将氮氧化物限定在实用和经济的范围内。优选使用于本发明的氮氧化物包括下述结构的化合物：



DOXYL

（4,4－二甲基－3－噁唑啉氧基－）

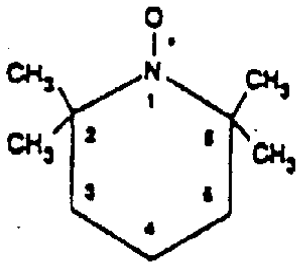
（4,4－二甲基噁唑烷－N－氧基）



PROXYL

（2,2,5,5－四甲基－1－吡咯烷氧基）

（2,2,5,5－四甲基吡咯烷－N－氧基）

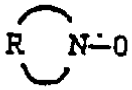


TEMPO

（2,2,6,6－四甲基－1－哌啶氧基-）

（2,2,6,6－四甲基哌啶－N－氧基）

从上面很明显看出，大部分适宜的氮氧化合物可以基本上由下述结构式来代表：



其中R基从能保护自由基稳定性的构型中选取。

本发明中可采用的氮氧化物结构上是多种多样的，因其必不可少的性质是它们能够通过模拟超氧物氧化酶，超氧物歧化酶，及过氧化氢酶活性，而在该过程中基本不消耗，从而影响HRCS中超氧物阴离子阶式反应的过程。虽然本发明可用的氮氧化物范围很广，但该氮氧化物应是生理学上可接受的，要求于极小浓度能缓解HRCS中的氧毒性。在评估一种可操作品种时，值得注意的是氮氧化物的相对低毒性，使其上NHR成像中作为反差剂得以开发应用（见U. S.专利4，834，964、4，863，717、5，104，641）。

分离和提纯血红蛋白溶液，使其达到生理学上相容性的很多方法

对本领域专业人员来说是已知的。一般来说，经提纯的血红蛋白组合物，其蛋白总重的至少99%为血红蛋白，总磷脂含量小于约3μg/ml，磷脂酰丝氨酸或磷脂酰乙醇胺均小于1μg/ml，而失活血红素色素少于6%。本发明所用经提纯的血红蛋白溶液，可使用各种常规技术来制备，包括（但不限于）Cheung等人，Anal Biochem. 137：431－484 (1984)，De Venuto等人，J. Lab. Clin. Fled. 89：509－516 (1977)和Lee 等人，Vith International Symposium on Blood Substitutes, San Diego, CA. Mar. 17－20 Abstract H51 (1993) 等文中所公开的方法。

本发明所用经提纯的血红蛋白溶液应是基本上无氧的。通过与化学还原剂混合，血红蛋白在溶液中可以脱氧，所述还原剂可使血红蛋白释放出氧，并使其保持基本脱氧状态。一个优选的使血红蛋白溶液脱氧的方法，是将其暴露于惰性的，基本无氧的气体中，例如氮气和一氧化碳气中，使除去血红蛋白所键合的氧，并在溶液中将血红蛋白转化成缺氧的脱氧血红蛋白或一氧化碳－血红蛋白。此外，通过一种能透过氧，而透不过血红蛋白的膜，可将血红蛋白暴露于真空或气体中。例如将血红蛋白溶液通过有膜壁的渗滤小室，血红蛋白溶液顺壁流过，氧可以透过膜壁，而血红蛋白则不能透过。惰性气体沿膜壁与血红蛋白溶液相对一侧循环，由此除去氧并将溶液中的血红蛋白转化成脱氧状态。在氮氧化物标记、交联、聚合、或共轭处理期间，优选将该脱氧血红蛋白维持在基本无氧环境中。

除去所有键合氧之后，将氮氧化物共价连接于血红蛋白上。正常情况下至少一个氮氧化物分子，优选一个以上该分子共价连接于单个血红蛋白分子上。氮氧化物可在血红蛋白分子上几个位点之任何一个与之共价连接，包括

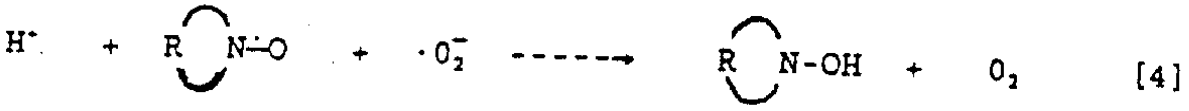
（a）、连于一个或多个游离巯基（－SH）上，例如，在β－93位上；

（b）、连于任何活性氨基（$-NH_2$）上，例如β－链的缬氨酸-1和/或β－链的赖氨酸－82、和/或α－链的赖氨酸－99等DPG位点上。

（c）、连于任何非特异性表面氨基（$-NH_2$）或羧基(－COOH)上。

氮氧化物还可以与参与血红蛋白交联和聚合的二价或多价交联剂的任何醛残基、环氧残基、或活性羧基残基键合，或者与用于共轭血红蛋白的葡聚糖（Dx）、羟乙基淀粉（HES）、或聚氧乙烯（POE）之类试剂上的任何活性残基键合。

正如上面式［1］所述，贮存期间，HBOC溶液中的血红蛋白会慢慢被氧自氧化，而形成偏－血红蛋白和超氧物阴离子。然而，本发明主题之HRCS，在贮存期间所形成的超氧物阴离子，将还原氮氧化物生成羟胺衍生物，而超氧物阴离子本身将被氧化形成分子氧，其反应如下：



［4］

式［4］所述之超氧物阴离子转化为分子氧的作用避免了超氧物阴离子的集结，并避免了随后形成过氧化氢。本文称之为“超氧物氧化酶”的此种活性，在当组合物中原有氧含量保持极小值时最为有效，此时组合物贮存于基本无氧环境，而氮氧化物浓度足以阻止超氧物阴离子及过氧化氢形成。因此优选HRCS贮存于基本无氧的容器中。

保证溶液贮存于无氧环境的容器体系是已知的，因为许多以非血红蛋白为基础的静脉溶液均对氧敏感。例如可以使用在充注有密封过

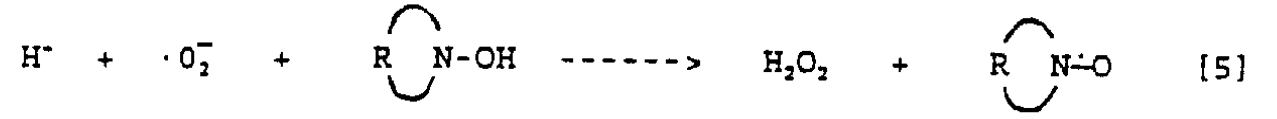
18

程中氧被除尽的玻璃容器。也可使用有上盖封严，对氧密闭的弹性塑料容器。基本上说来，可阻止氧与溶液中血红蛋白相互作用的任何容器均适用。

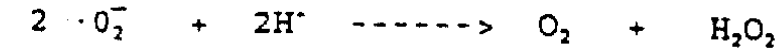
为证明氮氧化物的“超氧物氧化酶”活性，将氮氧化物标记血红蛋白溶液样品维持于加速氧化贮存条件下，并用电子自旋共振光谱研究该氮氧化物随时间推移其氧化还原之状态。例如，将用4－氨基－TEMPO标记的O－棉子糖聚合血红蛋白溶液，在密封玻璃容器中，以其氧化状态贮存（图1A）。在这种状态下，溶液中超氧物阴离子和偏血红蛋白形成的速度很快，足以使氮氧化物转化为其羟胺衍生物的反应很容易检测出来（见式［4］，比较图1A和1B）。式［4］表明氮氧化物转化为其抗磁羟基衍生物的同时也伴随着转化超氧物阴离子回复到分子氧状态。确证此种转化反应的实验证据示于图1A和1B中。就TEMPO共价键合于血红蛋白的电子自旋共振光谱（图1A）来说，若于4℃，将其样品贮存30天，TEMPO转化为其抗磁衍生物之后，其结果便使上述谱图中的共振峰完全消失（图1B）。在血红蛋白存在时，氮氧化物能转化为其羟胺衍生物，便认为该氮氧化物具有类似超氧物氧化酶活性。

通过证明羟胺衍生物可再转化为氮氧化物(见式［5］与式[4])来证明HBOC溶液中氮氧化物的超氧物歧化酶活性。因已知在图1A和1B所述实验条件下氮氧化物完全转化为羟胺衍生物（见式［4］），那么如式［5］所示，只要提供更多的超氧物阴离子氮氧化物便可再产生。为证明该反应机理，用等体积未标记血红蛋白稀释图1A样品，从而提高血红蛋白（也就是提高超氧物阴离子）对氮氧化物的相对浓度。比较图1A和图1C，看出由于该稀释效果，氮氧化物的信号强度恢复到约50%。另一方面，于4℃冷贮存30天之后，正如式

[5]所预言的，氮氧化物部分再产生（见图 1 D ）。伴随羟胺衍生物再转化为氮氧化物同时，超氧物阴离子也形成过氧化氢这与上述结论一致。



将[4][5]两式相加得到：



该式证明了氮氧化物作为低分子量的，无金属的，于HBOC溶液中类似SOD的作用。氮氧化物的电子自旋共振光谱检测（图 1 D ），也与超氧物阴离子与羟胺（ R⌒N－OH ）反应，结果形成氮氧化物（ R⌒N·－O ）和过氧化氢（ H_2O_2 ）相一致。最近，氧铵阳离子已被建议纳入催化歧化超氧化物的氮氧化物中间体之列（Krishna等人，Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89 5537 - 5541 (1992)）。

每个血红蛋白分子上的氮氧化物分子数可以在约 1 － 4 0 个的范围内，而对于特异性标记最优选约为 2 。但由于药物动力学，毒性学及免疫学等方面的考虑，该氮氧化物－血红蛋白之比例应保持极小值。例如，以 3 －马来酰亚氨基－PROXYL之类的氮氧化物共价键合溶液中的血红蛋白，可按下述过程进行：首先在乙醇中配制氮氧化物的100mM溶液作为载体溶剂，该氮氧化物以相对血红蛋白为 2 摩尔当量之量直接加入到Lactated Ringer氏液中的DCL－Hb（ 8 g／dl ）中，并与之混合。该反应混合物于 2 2 ℃下反应并搅拌，直至 9 0 %以上氮氧化物共价连接于DCL－Hb上。通常在 1 小时内。用分子量截流值为30000道尔顿的交叉流膜过滤系统，采用以 1 0 体积的Lactated Ringer氏溶液洗 3 次的方法，将未反应的氮氧化物除去。此血红蛋白

浓度被调节到7－14 g／dl，无菌过滤，于4℃贮存。输注之后，当该HRCS完全被氧化后，可望该氮氧化物起SOD类似物作用，并同时起类似过氧化氢酶的作用。作为SOD类似物，它将超氧物阴离子歧化为过氧化氢（见式［2］），结果保护内皮中的氧化氮不受破坏，从而避免血管收缩。作为过氧化氢酶类似物，通过将过氧化氢转化成无害的水（见式［3］）而防止过氧化氢毒性。

正如上面指出的，氮氧化物被共价键合于血红蛋白上，以研究血红蛋白分子本身的共操作氧结合特性。然而该研究中，尚未使用经稳定化处理过的血红蛋白溶液，即未用过经生理学上相容的交联、聚合、包封或共轭处理的血红蛋白溶液。血红蛋白和氮氧化物的已知化学知识，提示我们若在血红蛋白分子上选择一个不会被用于稳定化、聚合或共轭血红蛋白分子之特定化合物所阻隔的可用位点，那么被化学交联或通过重组技术交联的血红蛋白，可以进行相似的氮氧化物标记。因为下述某些稳定化或聚合形式的血红蛋白现已纳入临床试验，所以氮氧化物与这些稳定化的和聚合的，以血红蛋白为基础的氧载体的连接，描述于下述第二、第三及第五优选方案中，证明本发明的去氧毒功能，对现有血红蛋白溶液是适用的。

本文中以氮氧化物－HBOC为例说明的氮氧化物标记技术，很容易利用来生产具有有益的抗氧化酶类似活性的其它氮氧化物标记的大分子，例如氮氧化物标记血清白蛋白和氮氧化物标记的免疫球蛋白。可以容易地以此种技术用氮氧化物标记的血清白蛋白形式是单体(正常)白蛋白、白蛋白均二聚体、低聚物及聚集态（微球）。

氮氧化物标记大分子、血红蛋白、或本文所述的其它适宜大分子的抗氧化酶类似效果，也可用于其它应用领域，医药或需使用抗氧化催化的地方。

实施本发明的方式

Ⅰ．第一优选实施方案－氮氧化物标记HBOC的容器或滤器

在这些配方中，不用对血红蛋白进行化学修饰，便可对现有HBOC溶液赋予去氧毒功能。将氮氧化物共价连接到贮存HBOC的容器内表面，本发明便可缓解现有制剂所出现的由氧毒所引起的各种生理学效应。

本发明主题之盛装含血红蛋白溶液的容器应是生理学上相容的，应与静脉流体所用任何容器有相似特征。一般来说，玻璃和生物相容性塑料均宜。本发明实施方案中，含血红蛋白溶液放置于容器之后多长时间，容器均应当无氧，并能排氧密封。对玻璃容器而言，传统的塞子和瓶盖等器件即可。但是目前可购得的某些弹性塑料容器却是能透氧的。在这种情况下，可以使用外包箔式其它密封机械，以使氧和溶液中的血红蛋白隔绝。

为将氮氧化物施用于容器内表面，可直接将氮氧化物高聚物的非沥滤层或粘稠氮氧化物共聚物涂于该内表面。含氮氧化物高聚物可以根据通用已知聚合作用原则，采用多种工艺制备，只要在其聚合过程中保持自由基的稳定性即可。

此外，HBOC容器内表面可以改性，使之含可以键合氮氧化物的物质涂层，例如涂亲水性酰肼类化合物，它们能用氮氧化物的酮基或醛基反应形成稳定的腙衍生物。涂布反应直接进行，例如，将乙酸盐缓冲液（pH5.0）中的氮氧化物（100mM）加入到以酰肼活化的塑料容器中，即方便地形成腙键。

一旦容器准备好，便加入生理学相容溶液。该溶液可以是稳定的并纯化的HBOC，或本文公开的HRCS，但也可以包括需与血红蛋白共输注的任何静脉胶体溶液或类晶体溶液。该溶液然后放入基本上无氧的环境中。

除了处理内表面的容器，也可使用滤器型的园筒，该筒装有Luer锁进口和出口，筒内含凝胶或固体基质，氮氧化物固定于该基质上，可以除去活性氧衍生的活性物种，而血红蛋白溶液则可通过该筒。在这些应用法中，氮氧化物被键合于软凝胶或硬凝胶上，HBOC可通过其中，其功能基本上是输注之前作为无菌配套滤器用。像化学改性玻璃和塑料表面技术一样，将少量配位体（如氮氧化物）连接于固态基质的各种方法是亲合色谱技术领域熟知的。与无菌溶液相容的几种类型的基质已知包括琼脂糖凝胶，以聚砜为基础的材料，胶乳等等。

在滤筒法中，固体基质共价与氮氧化物相连，并置于滤器腔体（或其它类似器件）中，以便血红蛋白溶液可以流过该器件，并使之与氮氧化物接触，同时输入患者体内。一个实用的方法是使用普通易得的活化琼脂糖凝胶作为基质，并将该基质置于无菌Luer锁滤筒中，在输注含血红蛋白溶液时，只要把该筒插入该流体给药线路中即可。实际上，含滤器腔体，其中填有氮氧化物，且血红蛋白可以通过其中的此种结构，可以由各种已知结构提供。现参考图 1 2 腔体 1 含氮氧化物标记的琼脂糖凝胶，例如 4 －溴乙酰氨基－TEMPO标记ω－氨己基－琼脂糖（见图 2 A ），或 1，4 －二（ 2，3 －环氧丙氧基）丁烷琼脂糖与 4 －氨基－TEMPO偶合（见图 2 B ）。

输注期间，含血红蛋白溶液的静脉输注线路连接于Luer进口 2，使其进入腔体 1，在这里血红蛋白溶液将遇到与基质 4 相结合的氮氧化物，除去与氧相关的毒性物种。该血红蛋白溶液然后通过Luer出口流出筒外，并直接输入患者体内。 4 －氨基－TEMPO标记的环氧琼脂糖的电子共振光谱示于图 2 A。此外，ω－氨基己基－琼脂糖可以和 4 －（ 2 －溴乙酰氨基）－TEMPO反应形成TEMPO标记琼脂糖，该电子自旋共振光谱示于图 2 B 中。还有一个方法是借助碳二亚胺，通过碳

酰氨键，使4－羧基－TEMPO与氨基－琼脂糖偶合。反过来，则4－氨基－TEMPO借助碳二亚胺也很容易与琼脂糖凝胶上的羧基偶合，所述碳二亚胺例如是1－乙基－3－（3－二甲基氨基－丙基）碳二亚胺。

将100mM 4－氨基－TEMPO（Sigma Chme. Co.）的Lactated Ringer氏溶液，通过醛Auidchrom滤筒（Unisyn Tech. Inc.），于室温下循环1小时，接着用氰基硼氢化钠还原6小时，由此制备以4－氨基－TEMPO标记的滤筒。然后该滤筒腔体的内部以Lactated Ringer氏溶液彻底清洗。

根据上述程序，用3－氨基－PROXYL代替4－氨基－TEMPO，可同样制备以3－氨基－PROXYL标记的滤筒。

II．第二优选实施方案－氮氧化物标记的经稳定化处理的血红蛋白

为防止血红蛋白离解成其亚单元成分，借助化学或重组法使其亚单元交联，而进行其分子内稳定化处理。本文中所谓“稳定化”血红蛋白指通过化学或重组交联加以稳定化处理的血红蛋白单体，也指其构成成分血红蛋白分子用环葡聚糖和其磺化衍生物交联而加以稳定化处理的二聚体、三聚体和较大低聚体。

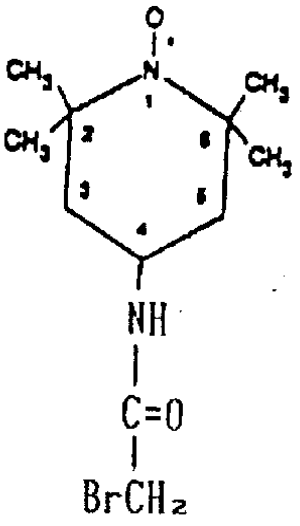
将氮氧化物与稳定化血红蛋白相连的优选工艺和最好模式是将氮氧化物共价连接到稳定化血红蛋白二个β－链的β－93巯基上。虽然，为研究构型，曾有人作过示范在天然人血红蛋白的β－93位进行特异性标记（见由McConnell等人，在Quart. Rev. Biophys. 3：91（1970)上所作综述），但尚未有人报道过此种交联血红蛋白的特异性标记。正如上面已指出的，有几种类型的以血红蛋白为基础的氧载体被开发出，并通过以DBBF进行化学交联而加以稳定化处理，即双

阿斯匹林交联血红蛋白和以O－棉子糖稳定化及低聚处理的血红蛋白。

在我们的美国专利No. 4，857，636中所述的开环糖产生由二糖类、低聚糖类或优选O－棉子糖之类的三糖类衍生的多价醛。这些化合物既可提供分子内稳定作用（交联）也可提供分子间聚合反应。若控制我们早期专利所公开的该反应，该多价醛可以用来生产上面定义的“稳定化”血红蛋白，却不发生聚合反应。在另一情况下，氮氧化物可以共价键合于稳定化血红蛋白或聚合血红蛋白上。因此，使用该多价醛加以稳定化处理的以血红蛋白为基础的溶液，在本方案中考虑为“稳定化”血红蛋白，而在其后的方案中考虑为“聚合”血红蛋白。

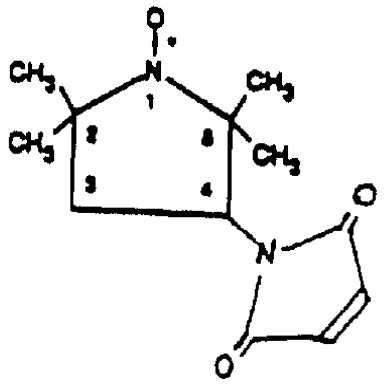
已证明经化学修饰的血红蛋白β－93位，不存在氮氧化物连接的空间障碍，因而确信氮氧化物可以共价连接于DBBF－Hb的β－93位。

在本方案中，DBBF－Hb与两种类型氮氧化物（TEMPO和PROXYL）反应，该两种氮氧化物含两种类型与巯基反应的特异性官能团，其结构如下：



(I)

4－（2－溴乙酰氨）－TEMPO



(II)

3－马来酰来氨－PROXYL

25

DBBF－Hb是以二（3，5－二溴水杨基）甲酸酯，通过已知技术交联经提纯的脱氧血红蛋白溶液而制备的，所得产物由柱色谱提纯。将2摩尔当量用甲醇作载体溶剂的氮氧化物（该氮氧化物为3－马来酰亚氨基－PROXYL，其浓度为约100mM）加入到浓度约为8 g／dl的1 ml DBBF－Hb Lactate Ringers溶液中，由此完成3－马来酰亚氨（2，2，5，5－四甲基－吡咯烷－N－氧基），即3－马来酰亚氨－PROXYL的共价连接。该DBBF－Hb于22－23℃混合反应约30分钟。由未反应的氮氧化物的电子自旋共振信号强度的消失百分比，来评估交联程度。为了除去未反应的氮氧化物，用带有阻隔公称分子量极限（NMWL）值为30 kDa的聚乙烯砜（PES）膜的Filtron Stire筛孔（Filtron Technology Co.），以10体积过量Lactated Ringer氏将反应混合物洗涤3次。用Bruker ESR 光谱仪，记录氮氧化物标记血红蛋白的电子自旋共振光谱测量结果。图3A表示4－（2－溴乙酰氨基）－TEMPO标记的DBBF－Hb之电子自旋共振光谱。同样以3－马来酰亚氨－PROXYL标记的DBBF－Hb的电子自旋共振光谱示于图3B中。

本方案中，氮氧化物共价连接于血红蛋白两条β－珠蛋白链的孤立巯基上。因此，在99.00%脱氧－血红蛋白条件下，氮氧化物与血红蛋白键合之氧的比例约为200：1，因为有二个氮氧化物分子连接于血红蛋白二个β－珠蛋白链上。但是输注之后，脱氧HRCS中堆积肺部的氧，在100%脱氧时，氮氧化物对血红蛋白键合之氧的比例变成约为1：2，因为此时有四个氧分子键合于血红蛋白的4个珠蛋白链上，而同时只有两个氮氧化物保留在β－珠蛋白上。

若用血红蛋白对氮氧化物比例为1：2，那么大于90%的氮氧化物被共价连接于DBBF－Hb上。也可以用马来酰亚氨和PROXYL部分

之间带有间隔基（例如额外的甲基）的氮氧化物（即3－马来酰亚氨甲基－PROXYL）来共价标记的DBBF－Hb，该标记物的共振谱与图3B谱相似。其它氮氧化物可以共价连接于DPG键合位（例如β－Val－1、β－Lys－82和α－Lys－99）中的特异性氨基，或可以连接于血红蛋白其余40－plus表面赖氨酸ε－氨基的情况均是有价值的。TEMPO的异硫氰酸酯衍生物及PROXYL氮氧化物也与氨基具反应活性。例如，可以以约10：1的摩尔比，将4－异硫氰酸酯－TEMPO加入血红蛋白中。以此种氮氧化物在其它位点标记的血红蛋白共振谱（未示出），与图3A谱图相似。

氮氧化物在DBBF－Hb的几个位点连接的能力表明，以α－珠蛋白二聚体加以稳定化处理的重组血红蛋白（D. Looker等人，Nature 356：258（1992））可以同样地以氮氧化物标记。也能够制备氮氧化物标记之交联剂（例如TEMPO标记琥珀酸酯）的DBBF类似物（见U. S. 专利4，240，797）。

图4是下述物质在Lactated Ringer氏溶液中，于室温下记录的ESR光谱：（A）2－（溴乙酰氨基）－TEMPO，（B）2－（溴乙酰氨）－TEMPO－标记的HBOC，（C）$^{15}ND_{17}$ TEMPOL（TEMPOL是4－羟基－2，2，6，6－四甲基哌啶－1－氧基）。图4A和4B之间的差别表示小分子量氮氧化物与共价连接于血红蛋白之类大分子上的氮氧化物之间流动性的差别。图4C表示核自旋1／2的稳定同位素氮^{15}N产生两个共振峰，而核自旋1的天然同位素^{14}N产生3个共振峰（比较4A－4C）。此处所述的一组实验中，这些共振峰的区分，用于证实酶类似物及小分子量和大分子量氮氧化物在体内和体外的氧化／还原反应。

氮氧化物对血红蛋白摩尔比例不同的氮氧化物标记HBOC制备如下：

将固体粉末状4－（2－溴乙酰氨）－TEMPO　2，4和8摩尔当量直接加入到清洁通风橱中的三个分开的15ml　Vacutainer中。放回橡胶隔片之后，随即将4－（2－溴乙酰氨基）－TEMPO溶解于200μl氯仿中。然后通过橡胶隔片，用规格27号针头将这些Vacutainer连于高真空体系（5mmHg），同时除去氯仿，留下涂于Vacutainer下半部的4－（2－溴乙酰氨基）－TEMPO膜。借助无菌转移，通过橡胶隔片引入适当量HBOC后，以间歇式涡旋器每隔约5分钟混合一次，于室温下使该溶液反应1／2小时（在氮氧化物与血红蛋白比例为4和8摩尔时不是所有的固体完全溶解），然后将Vacutainer都放入冰箱，于4℃过夜。第二天早上于室温下恢复涡旋混合1／2小时，直至可看出所有固体4－（2－溴乙酰氨基）－TEMPO从Vacutainer表面消失为止。

将该反应混合物和对照物都无菌转移到透析管中，以Lactated Ringer氏液透析，直至检测不出未标记游离4－（2－溴乙酰氨基）－TEMPO的电子自旋共振（ESR）信号为止。该4－（2－溴乙酰氨基）－TEMPO标记HBOC，在4－（2－溴乙酰氨基）－TEMPO对Hb为2，4和8摩尔当量时的ESR光谱分别示于图5A－5C中。在4－（2－溴乙酰氨基）－TEMPO对血红蛋白为2摩尔当量时，透析与否其ESR光谱基本相同，这说明共价标记是定量进行的。在HBOC情况下，看来β－珠蛋白链的二个SH－基是共价连接位点（这可以由以N－乙基－马来酰亚氨标记4－（2－溴乙酰氨基）－TEMPO的选择性阻隔，或用反相HPLC分析血红蛋白链得到证实）。值得注意的是，2，4和8（摩尔当量）的ESR信号强度（峰Mo）比例，与按比例降低仪器敏感度所记录的光谱有近似相同的比例。

28

而且，可预期甚至以更高的摩尔比例，则更多的4－（2－溴乙酰氨基）－TEMPO可以连接于Hb上，比如在体内作为辐射保护剂用。

如下所述，血替代品制剂中，优选的氮氧化物与血红蛋白的摩尔比是3：1。

参考图6，该图是4－（2－溴乙酰氨）－TEMPO－标记HBOC与$^{15}ND_{17}$－TEMPOL的ESR光谱，其中4－（2－溴乙酰氨基）－TEMPO的中央峰（由向下箭头表示）和$^{15}ND_{17}$－TEMPOL（由朝上箭头表示）的高场峰被调到相似强度。

共振峰的区分，同时也就监测出体外和体内（鼠）反应中，涉及小分子量氮氧化物（TEMPOL）及其大分子共轭物的自由基和类酶活性物。例如，在体内，两种氮氧化物的血浆半衰期可参考不同氮氧化物的独特光谱特性加以比较。很明确，鼠体内的以血红蛋白为基础的ESR研究若使用3：1的氮氧化物与血红蛋白比例进行（见图5C），取得高ESR信号强度的优势。首先，小分子量氮氧化物（$^{15}ND_{17}$－TEMPOL，见图4C）和大分子量4－（2－溴乙酰氨基）－TEMPOL－标记HBOC（见图4B）的近似血浆半衰期。通过制备该两物混合物并调节ESR信号强度近似相等来测定（见图6）。麻醉下将0.5ml该混合物注射入热炽灯下被扩张的鼠尾静脉中。将鼠尾插入ESR腔，注射后10分钟之内记录光谱（见图7A）。

参考图7A、7B和7C，检测不出$^{15}ND_{17}$－TEMPOL信号，但4－（2－溴乙酰氨基）－TEMPO标记HBOC却能很清楚分辨出（见血浆半衰期试验所得的图7B和7C，其中7C是7B的继续）。因为曾有人报道过，HBOC的血管收缩作用，在大鼠体内将HBOC快速浓注射后

的5－15分钟内即完全显现出来，因此氮氧化物标记HBOC之参与自由基氧化还原反应，需在于小鼠体内输注后立即测量。雌性CH3小鼠的尾静脉于麻醉下以插管法输入80%氧化氮，20%氧，和3%异荧烷。在热炽灯下，该鼠尾静脉明显扩张，将由30号规格的皮下注射用针头连于1呎长聚乙烯管组成的插管插于该鼠尾静脉，并用氰基丙烯酸酯胶将其固定住。为进行体内ESR测量，麻醉下将该插管的小鼠转移到经改造过的50ml锥形离心管中，该管改造后，鼠尾能从锥形端伸出，而麻醉气体则可从管的开口端继续流入。该鼠尾插进一塑料管中，然后该塑料管固定入TE102腔内。该插管周期性地注入肝素（100单位／ml）保证血管开放。插管靠近尾根部，留于ESR腔之外，以便快速浓注射之后，立即可以测到来自鼠尾的纯正信号。0.5ml样品（见图8）从插管注入，光谱仪设置于1／2分钟间隔反复扫描模式（见图8A和8B）。图8A中，磁场提高2Gaus，而8B中，磁场降低2Gaus，以便使共振光谱叠合。注射之后2.5分钟内$^{15}ND_{17}$－TEMPOL信号消失。相同时间内，4－（2－溴乙酰氨基）－TEMPOL标记HBOC也以相似速度降低。

但是氮氧化物－HBOC信号在血浆中表现出是稳定的（图8B）。因此，将图8B与图7结果结合起来看出，氮氧化物标记HBOC之类的大分子，与小分子量氮氧化物（例如$^{15}ND_{17}$－TEMPOL）比较起来，具明显较长血浆半衰期。

所观察到的自由基反应特征包括两种途径：

1．快速相看来包括氮氧化物被自由基（例如超氧物）氧化成其氧铵阳离子中间体，接着，该中间体被还原为氮氧化物稳定的羟胺衍生物。此种还原反应涉及血管腔中存在的一种或两种还原等同物（例如NADH）参加。氮氧化物还原为其羟胺导至ESR信号强度迅速

降低，在4－（2－溴乙酰氨基）－TEMPO标记HBOC为8：1摩尔比的情况下，表示约25%4－（2－溴乙酰氨基）－TEMPO在HBOC上。该相既涉及小分子，也涉及大分子氮氧化物。

2．根据氮氧化物参与循环自由基反应（如类似SOD反应）这一反应机理，慢速相（见图8B）看来表示HBOC上的其余75%4－（2－溴乙酰氨基）－TEMPO的抗氧化类酶活性。这里氮氧化物自由基像SOD类似物一样基本上不消耗，ESR信号强度的慢速降低可能主要因为上述反应机理，而其次是因为HBOC浓度降低，因为其作为血浆半衰期的函数，从血管腔内慢慢消失。

该结果证明，氮氧化物标记的HBOC在体内用于去除自由基毒性。此种应用被定义为所谓通过氮氧化物在体内起类似酶的作用，而赋予短期内（几分钟）清除自由基，并持续（几小时）阻止氧化反应的效果。

根据图8的光谱分析，氧化／还原（redox）循环反应，涉及约73%以其自由基状态保留的4－（2－溴乙酰氨基）－TEMPO标记的HBOC。这表明TEMPOL在体内参与限制于血管空间内的氧化还原反应。

III．第三优选方案－氮氧化物标记稳定化血红蛋白高聚物

能从交联单体生产稳定化血红蛋白二聚体，同时也能从稳定化或天然血红蛋白生产血红蛋白高聚物。血红蛋白高聚物溶液包含单体、二聚体、三聚体、四聚体及其它低聚体的混合物。含聚合血红蛋白的溶液被用作HBOC时，同稳定化单体血红蛋白相比，具有较长血浆循环时间和较高载氧容量。此种聚合血红蛋白，可以使用几种不同聚合试剂，通过很多途径制备(见U．S．专利4001200、4857636、4826811)。引入氮氧化物到聚合血红蛋白溶液的优选方法，仍然是将氮氧化物共价连接到血红蛋白的二个β－珠蛋白链的β－93巯基上。尚不知这

些巯基参与稳定化作用或聚合过程与否，所以优选将血红蛋白单体稳定化或聚合处理以前，将氮氧化物共价连接于血红蛋白上。

例如，根据上述第二方案的程序，将氮氧化物共价连接于DBBF－Hb，随后根据Sehgal等人的U. S.专利4826811所述方法，以戊二醛使其聚合。图4B是以3－马来酰亚氨－PROXYL标记，并用戊二醛聚合的DBBF－Hb的电子自旋共振光谱。同样，与戊二醛聚合的DBBF－Hb也可以用4－（2－溴乙酰氨基）－TEMPO按同样方法标记。

使用相似方法，聚合血红蛋白中间体，例如含未反应醛基的戊二醛聚合的、O－棉子糖聚合的或O－环葡聚糖聚合的血红蛋白中间体，可以通过还原胺化作用，将其与4－氨基－TEMPO或3－氨基－PROXYL共价连接，产生氮氧化物标记的血红蛋白高聚物。有关还原胺化作用，反应的顺序和时间很重要。聚合反应完成之后，再将4－氨基－TEMPO加入戊二醛聚合血红蛋白中，但该加入时间要在引起氮氧化物与聚合血红蛋白共价连接的还原反应之前。同样，O－棉子糖聚合血红蛋白的氮氧化物标记，也可以在还原胺化反应之前加入4－氨基－TEMPO或3－氨基－PROXYL来完成。例如，4－氨基－TEMPO标记O－棉子糖聚合血红蛋白按照我们的美国专利4857636所述方法来制备，所不同之处是6摩尔当量4－氨基－TEMPO在聚合完成之后，而在以20摩尔过剩甲硼烷二甲胺配合物还原之前加入。正如本文所述，血红蛋白可以使用衍生自二糖类或开环糖（包括低聚糖，或优选O－棉子糖之类的三糖）的多价醛进行交联和聚合。同样，虽然较高分子量的糖是优选的，但单糖亦可用于稳定化及聚合血红蛋白。透析和洗涤后的O－棉子糖聚合的，以4－氨基－TEMPO标记的血红蛋白的共振光谱示于图9A。

为了增加聚合血红蛋白之血红蛋白低聚体（Hbn，其中n＝2－

4）的收率，需要增加交联剂的多醛价键，由此便使用α－环葡聚糖，β－环葡聚糖、及γ－环葡聚糖以及它们的硫酸化衍生物（这些衍生物代表6－、7－、8－环化葡萄糖分子），开环的α－、β－、γ－环葡聚糖分别有12、14、16个活性醛基。这些开环交联剂可用来交联和聚合血红蛋白，产生低聚体较多的聚合血红蛋白。如上面所述，未反应的醛基可用来共价连接氨基－氮氧化物，例如4－氨基－TEMPO或3－氨基－PROXYL。

而且，开环硫酸化衍生物（例如硫酸化α－环葡聚糖）由于另外两个原因将是有效的交联剂：（1）硫酸根基团将模拟DPG活性，降低氧对交联血红蛋白的亲合力，由此促进氧输送性能，（2）硫酸根基团起亲合性标记作用，它可配合多个（如n＝2－4）血红蛋白形成最初的“簇”，一旦该“簇”配合物形成，环葡聚糖上的醛基同邻近的DPG键合位中的NH_2进行关环反应，这样促进了血红蛋白共价亚单元内及分子间交联、结果增加血红蛋白低聚体产量。除了抗氧化类酶活性外，开环环葡聚糖聚合和氮氧化物标记血红蛋白，同O－棉子糖及戊二醛聚合血红蛋白相比，也改善了收率和组成。

Ⅳ．第四优选方案－氮氧化物标记脂质体包封血红蛋白

脂质体是中空的球型中，由两亲分子聚集形成两层结构而组成的颗粒，该两层的极性边相对，形成含水的内腔，而外部则全是水。几种可用的形成脂质体的方法为本技术领域熟知。一般是像二棕榈酰卵磷脂这样的水溶液中分子形成脂质体。为增加稳定性，用胆固醇制备脂质体，还可包括其它材料，例如中性脂，以及表面修饰剂（如阳性或阴性电荷物质）。优选脂质体是小的球形壳包双层单薄片体。

将血红蛋白包封入脂质体中的方法也是已知的（见Farmer等人的U．S．专利4，911，921）。从本发明目的考虑，可使用很多方法将

以氮氧化物为基础的脱氧毒功能引入脂质体包封血红蛋白的溶液中。例如，可以使用如上所述氮氧化物标记天然血红蛋白，或氮氧化物标记稳定化血红蛋白作为初始原料，然后用已知工艺，进行该氮氧化物标记血红蛋白的脂质体包封加工。本实施方案中，纯化血红蛋白可以用非渗透性氮氧化物膜，例如Hsia等人的U. S.专利4，235，792所公开的用于自旋膜免疫测定的TEMPO－胆碱盐酸盐一起共包封。

此外，任何提纯的血红蛋白均可用由氮氧化物标记脂肪酸（例如7－DOXYL－硬脂酸酯、12－DOXYL－硬脂酸、16－DOXYL－硬脂酸酯等）、胆甾烷、胆固醇类似物（如3－DOXYL－胆甾烷）或磷脂（如12－DOXYL－硬脂酸标记卵磷脂）组成的脂质体包封。血红蛋白包封于由3－DOXYL－胆甾烷标记物所组成的脂质体中的制剂，可以用类似Tabushi等人（J. Am. Chem. Soc. 106：219 (1984)）所述方法来制备。首先将含脂类，包括DOXYL标记的硬脂酸和/或胆甾烷（正如下面具体指出的）的组合物在氮气流里干燥除去溶剂。然后真空干燥残留物，并将所形成的膜悬浮于2ml血红蛋白的Lactated Ringer氏溶液中。分散状态的该脂类浓度为100mM。然后将该脂质体包封的血红蛋白旋转保温（优选37℃），直至所有脂类分散形成多薄片囊状物为止。然后根据Cook等人的方法（见U. S.专利4533254），将所得含多薄片脂质体包封血红蛋白及游离未包封血红蛋白的溶液，强制通过微流化器，形成0.2微米的脂质体。该脂质体中二棕榈酰卵磷脂：胆固醇：二棕榈酰磷脂酸：3－DOXYL－胆甾烷之摩尔比为0.5：0.4：0.02：0.07。所得3－DOXYL－胆甾烷标记的脂质体包封血红蛋白的共振光谱示于图10A中。在该构形中，氮氧化物被插进脂质体膜，在脂双层水界面的内表面及外表面均可发现。该脂类组合物中，用16－DOXYL－硬脂酸代替3－DOXYL－胆甾烷示于图10A，所得

电子共振光谱示于图１０Ｂ。从共振光谱所反映出的氮氧化物迁移率，与硬脂酸的DOXYL部分主要位于脂双层的疏水内部的解释相一致，以相同摩尔比例将３－DOXYL－胆甾烷和１６－DOXYL－硬脂酸酯加入脂类组合物中，该双氮氧化物标记的脂质体包封血红蛋白的共振谱示于图１０Ｃ。图１０Ｃ的共振谱是图１０Ａ和１０Ｂ的合成，因为本方案的氮氧化物既位于水膜界面，也位于其疏水脂双层内部。通过放氮氧化物于两处，本方案提供了既在脂质双层疏水内部，也在水膜界面的去氧毒功能，这样除了保留包封血红蛋白的去氧毒能力外，还赋予了附加优点。

Ⅴ．第五优选方案－氮氧化物标记共轭血红蛋白

生理学上相容的共轭血红蛋白溶液，通过形成血红蛋白共轭物，而将生物相容性大分子用作血浆扩充剂而制成。血浆扩充剂，例如葡聚糖（Ｄｘ）、聚氧乙烯（POE）、羟乙基淀粉（HES），用来提高体内血红蛋白的循环半衰期。在此状态下，血红蛋白分子与生物相容性大分子共同称之为血红蛋白共轭物。有很多方便的方法，能将氮氧化物掺入血红蛋白共轭物中。例如，人们可以简单地以氮氧化物标记的血红蛋白（例如TEMPO标记DBBF－Ｈｂ）来代替欲被共轭的血红蛋白。这可以通过在共轭血红蛋白制剂中，用３－马来酰亚氨基－PROXYL－DBBF－Ｈｂ，或４－（２－溴乙酰氨基）－TEMPO－DBBF－Ｈｂ来代替血红蛋白或吡哆酰化血红蛋白而完成。

４－氨基－TEMPO标记葡聚糖共轭血红蛋白根据Tam等人所述方法(Proc. Natl. Acad. Sci., 73 : 2128 (1976))制备。首先，将８％血红蛋白在0.15M NaCl中的溶液，和５mM磷酸盐缓冲液（ｐＨ7.4）与高碘酸氧化的葡聚糖共轭，形成Schiff碱中间体。２０摩尔当量４－氨基－TEMPO加入到血红蛋白中，该氮氧化物和葡聚糖上剩余的活

性醛基之间形成Schiff碱。于4℃保温30分钟之后，水中的50摩尔当量二甲基胺硼烷被加进。该溶液于4℃再保温2小时。然后透析该溶液，用Lactate Ringer氏缓冲液再制，并以Filtron膜过滤单元（Filtron Technology Co.）无菌过滤。该4－氨基－TEMPO标记的葡聚糖共轭血红蛋白的电子自旋共振光谱为一尖锐的不对体三联体，反映其高度运动自由程度（见图11）。同紧紧折叠的血红蛋白分子的流动性相比，TEMPO共价连接于葡聚糖后流动性的提高与氮氧化物连接于弹性多糖葡聚糖链的情况一致（见图3A和3B）。这样，图11的共振谱证明，制备出了一种新的氮氧化物标记葡聚糖共轭血红蛋白。

Ⅵ．第六优选方案－氮氧化物标记血红蛋白的类酶活性

正如前面指出的，氮氧化物（如TEMPOL）已表明具有模拟SOD之活性的催化活性，所述SOD即能歧化超氧物为过氧化氢的金属酶。而且，生物体系氮氧化物可以与过氧化物酶及假过氧化物酶相互作用，达到能模拟过氧化氢酶的活性，该过氧化氢酶能将过氧化氢转化为氧。氮氧化物的生物学效应，包括对抗活性氧物种的细胞毒性而起到保护作用，明显降低氧化应激反应等，例如氮氧化物能保护体内和体外由离子辐射引起的损伤。因此，当体内施用氮氧化物时，表现出复合抗氧化类酶活性。

若静脉注射，则TEMPOL表现出很短的血浆半衰期，由于其分子大小和电荷特点，它很容易离开血管空间。然而，除了涉及HBOC或HRCS外，在某些医药应用中，希望具有在血管空间中持续的抗氧化酶类似物。这可以通过将氮氧化物化合物连接到血红蛋白之外的大分子上来实现，并且该物是生物学上安全的具有所希望的血浆半衰期。此种所需的大分子的典型例是人血清白蛋白（HSA）。

血清白蛋白是具有多配位键合位的血浆蛋白，且是血液中许多配位体的传输蛋白。氮氧化物可以在许多特异性配位键合位特异性地键合于人血清白蛋白上，或进行非特异性键合。

氮氧化物标记的白蛋白可用于体内，对由活性氧物种引起的细胞损害起保护作用。氮氧化物－白蛋白可以单独使用，或者与低分子量氮氧化合物（如TEMPOL）组合使用。氮氧化物标记白蛋白也可用作白蛋白的改良变体（即经改良使其具抗氧化活性），用在任何目前白蛋白常规使用的地方，包括作非肠道胶体溶液，用在生物材料中，用在生物相容性表面涂层中等等。

白蛋白可从血浆中获得，或可用重组基因手段生产。HSA可以多种形式使用，包括单体（正常血浆形式），均二聚体、低聚体和聚集体（微球）。以氮氧化物特异性标记的白蛋白可以在几个键合位形成，包括胆红素键合位，FFA键合位、吲哚键合位、或Cu^{++}键合位，使用经活化的氮氧化物，以便能赋予它们在蛋白相关位的键合特异性。一个优选例是共价键合于HSA初级胆红素键合位的2，2，6，6－四甲基－1－氧基－4－亚哌啶基琥珀酸酯（TOPS）氮氧化物。白蛋白的非特异性标记可以在约50个可接近的氨基上进行。

Ⅶ. 第七优选方案－氮氧化物标记免疫球蛋白

如上一方案所述，某些氮氧化物在静脉注射时，其血浆半衰期很短，由于希望具有长血浆半衰期的抗氧化酶类似物，氮氧化物可以连接于免疫球蛋白而提供长时间持续的抗氧化类酶活性。

免疫球蛋白是免疫体系β－细胞所产生的血浆蛋白类，以两个特异性配位键合位为特征（即抗原键合位）。过去氮氧化物被用作探针，研究一级和二级免疫反应期间的半抗原结合特异性及免疫球蛋白亲合性。

37

因有上一方案所述氮氧化物标记之白蛋白，因而上述氮氧化物－HBOC实例中所阐明的氮氧化物标记技术也容易用于生产氮氧化物标记的免疫球蛋白。

氮氧化物标记免疫球蛋白可用于体内保护，免受活性氧物种对细胞的损害作用。氮氧化物－免疫球蛋白可单独使用，亦可与低分子量氮氧化物结合使用，以延长血浆半衰期而提供扩展的抗氧化活性。

氮氧化物标记免疫球蛋白可以通过免疫球蛋白本身特异性标记，或通过在半抗原键合位共价标记而制备。为避免该氮氧化物标记免疫球蛋白被当作体内天然免疫反应的部分而清除，人们可以使用免疫球蛋白片段，例如，由根据已知工艺切断免疫球蛋白而产生的$(Fab)_2$，就非特异性标记而言，优选的氮氧化物与免疫球蛋白摩尔比可高达60：1。

虽然本发明已通过上述具体实施方案加以阐明，但由于生理学相容性血红蛋白的形式多有变化，而稳定的氮氧化物自由基结构又是各种各样，因此有可能就上述实施方案作很多修改，此种修改并不背离由下述权利要求所限定的本发明之基本精神。

图 1A

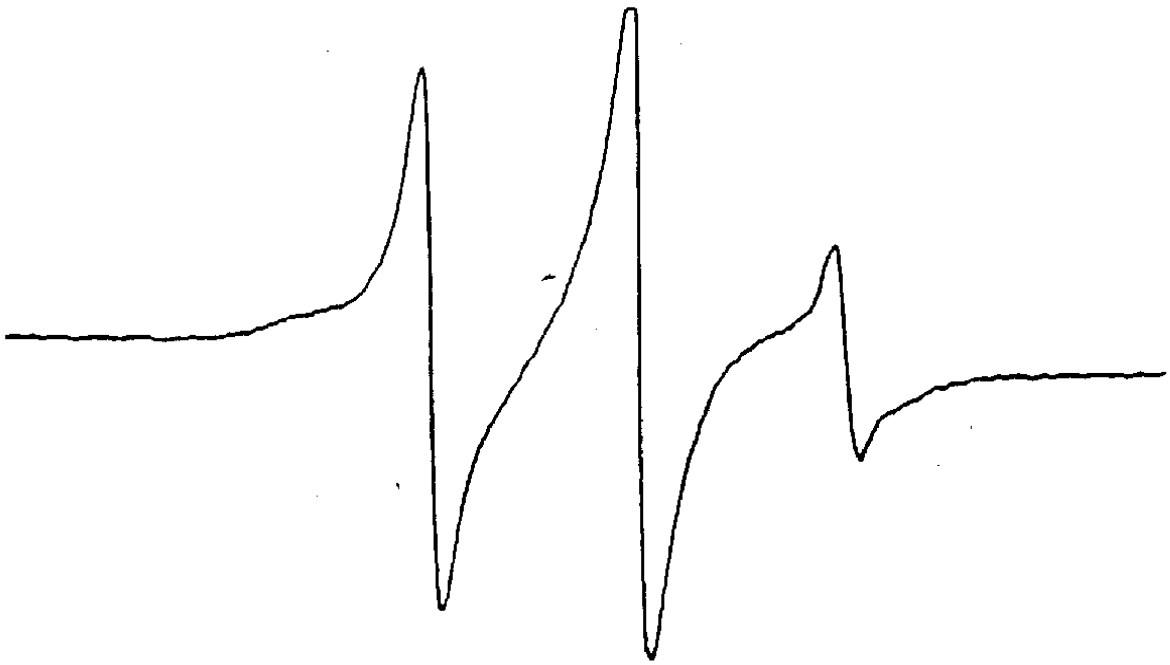


图 1B



图 1C

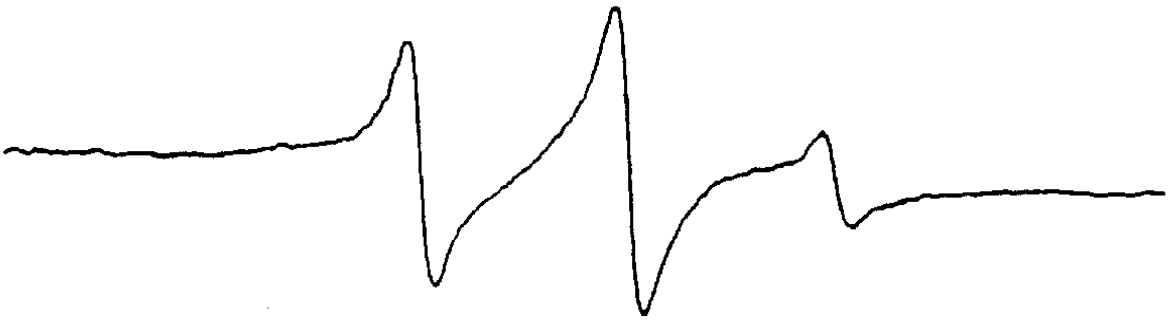


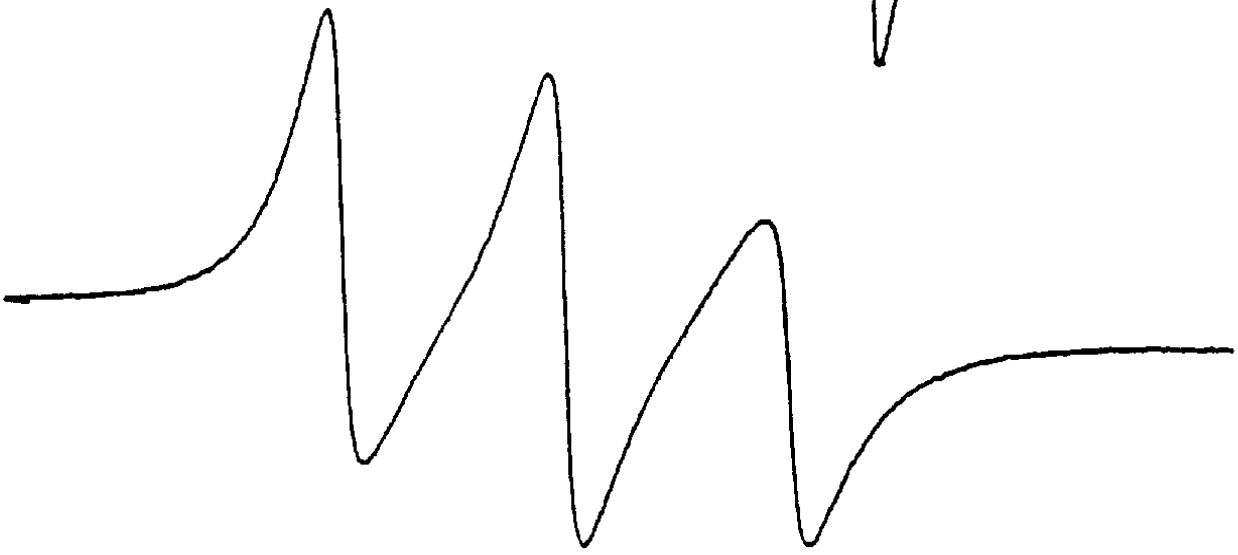
图 D



图 2A



图 2B



2

图 3A

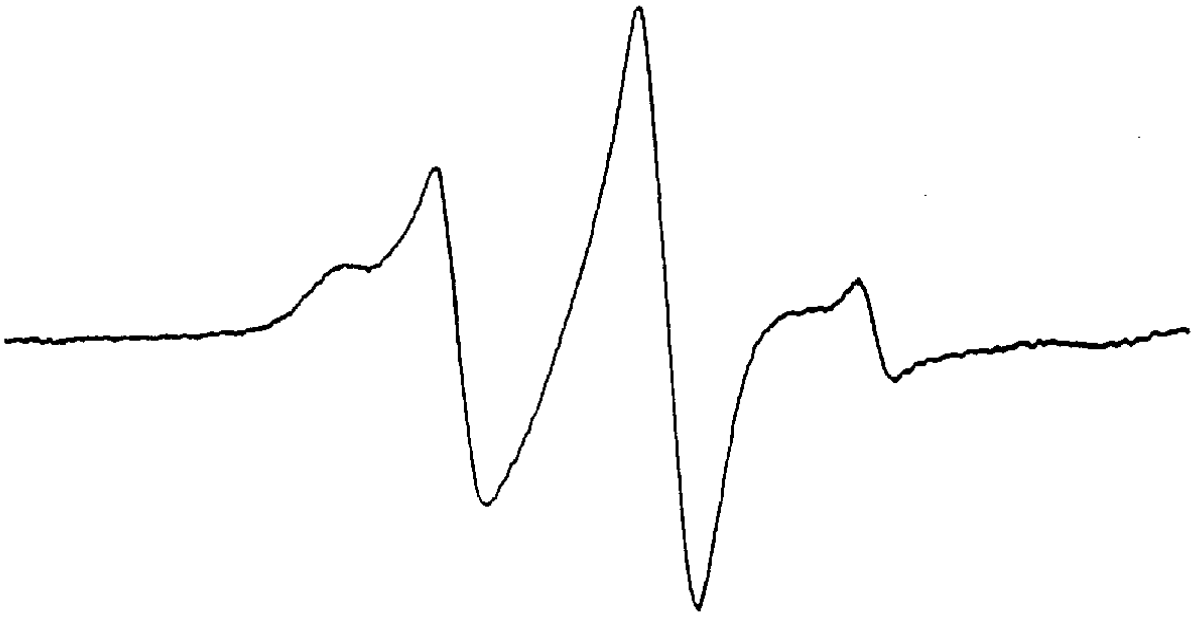
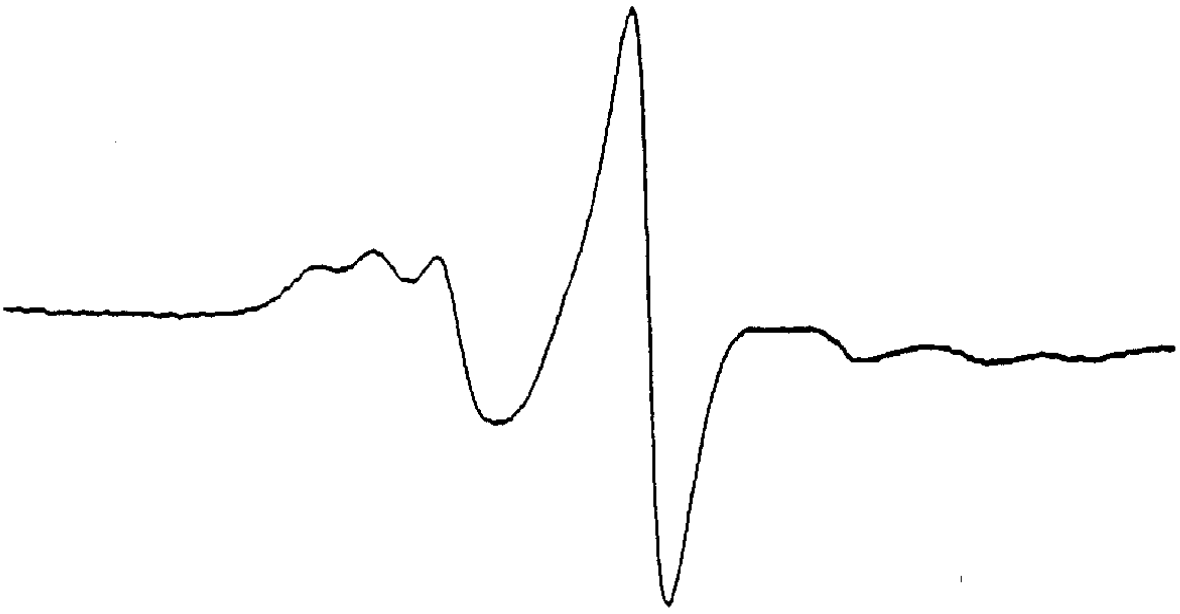


图 3B



3

图 4A

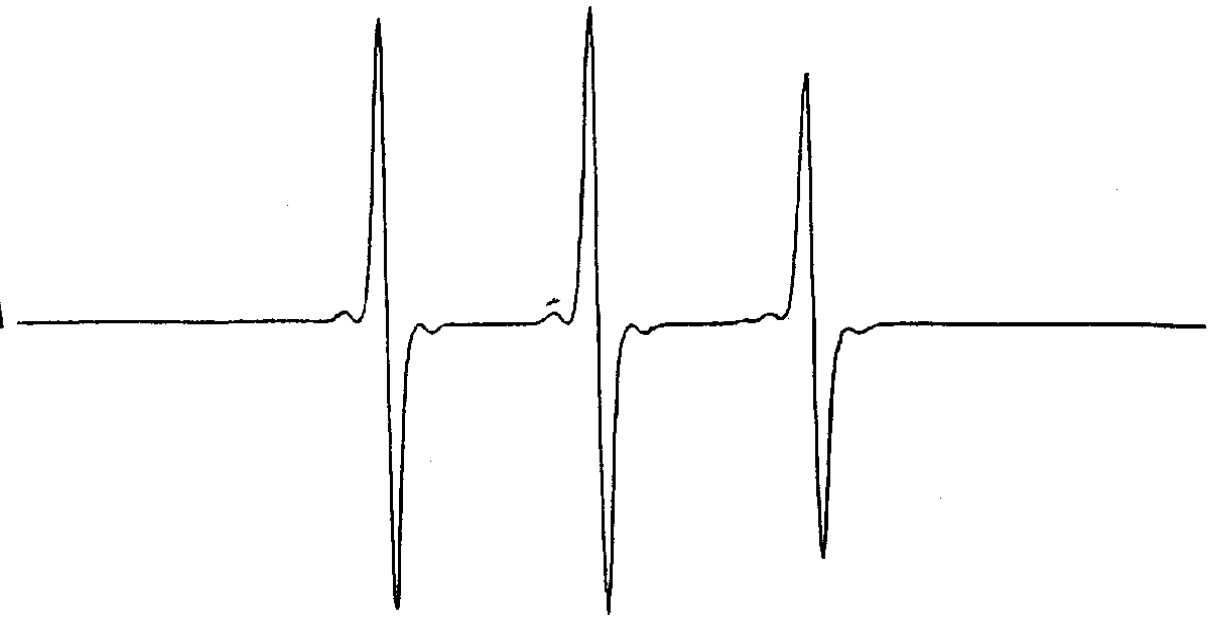


图 4B

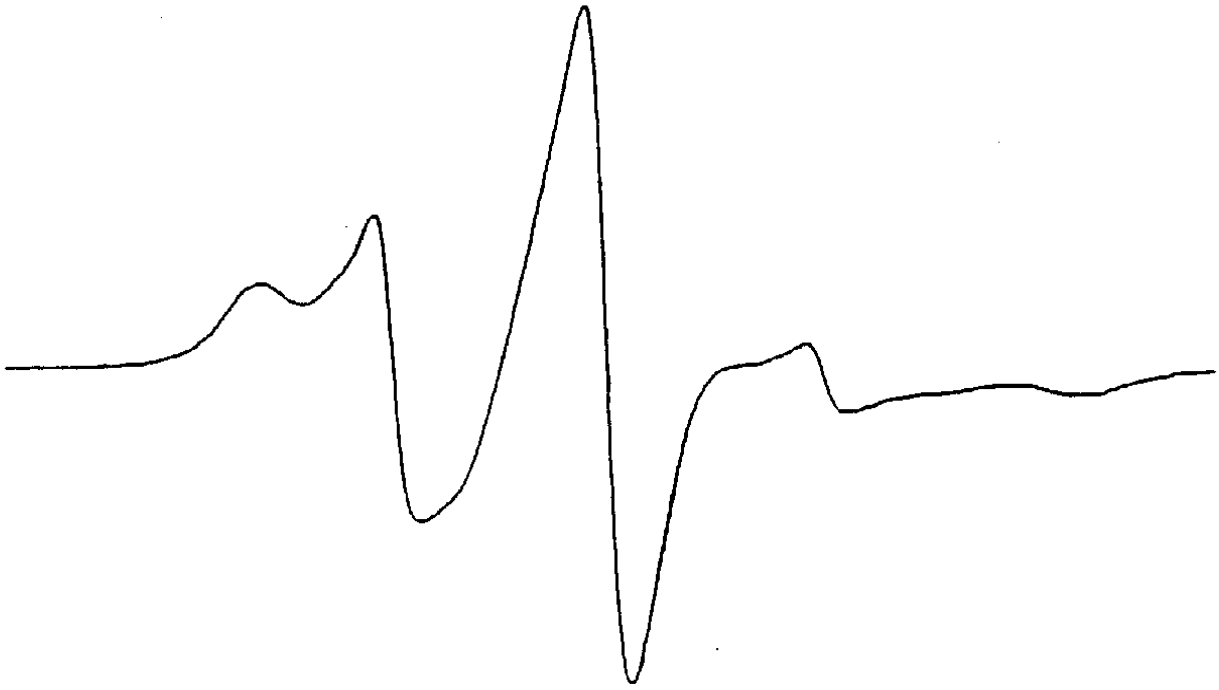


图 4C

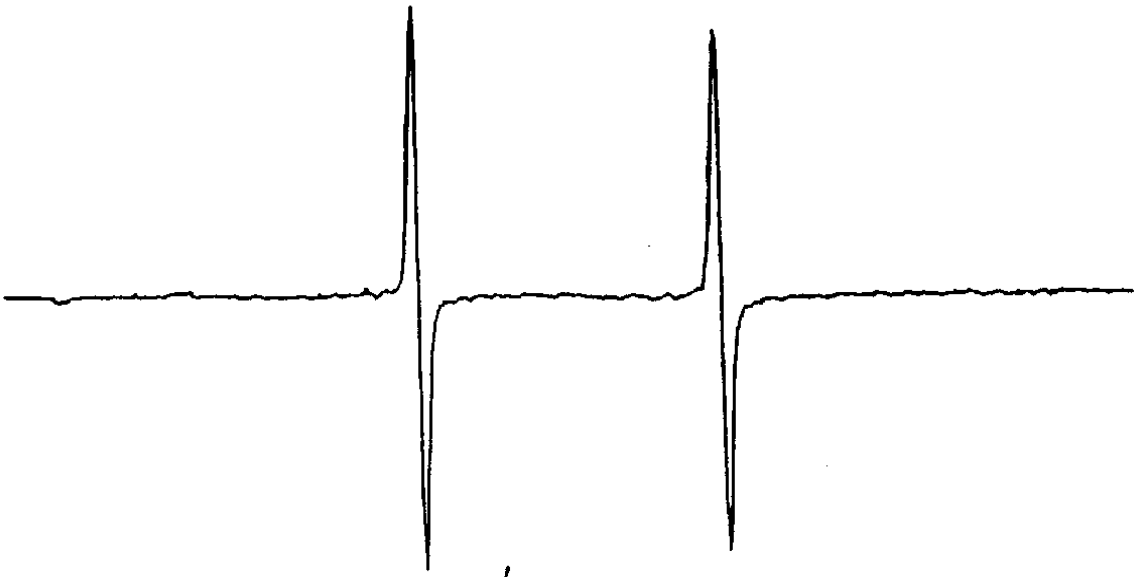




图 5A



图 5B

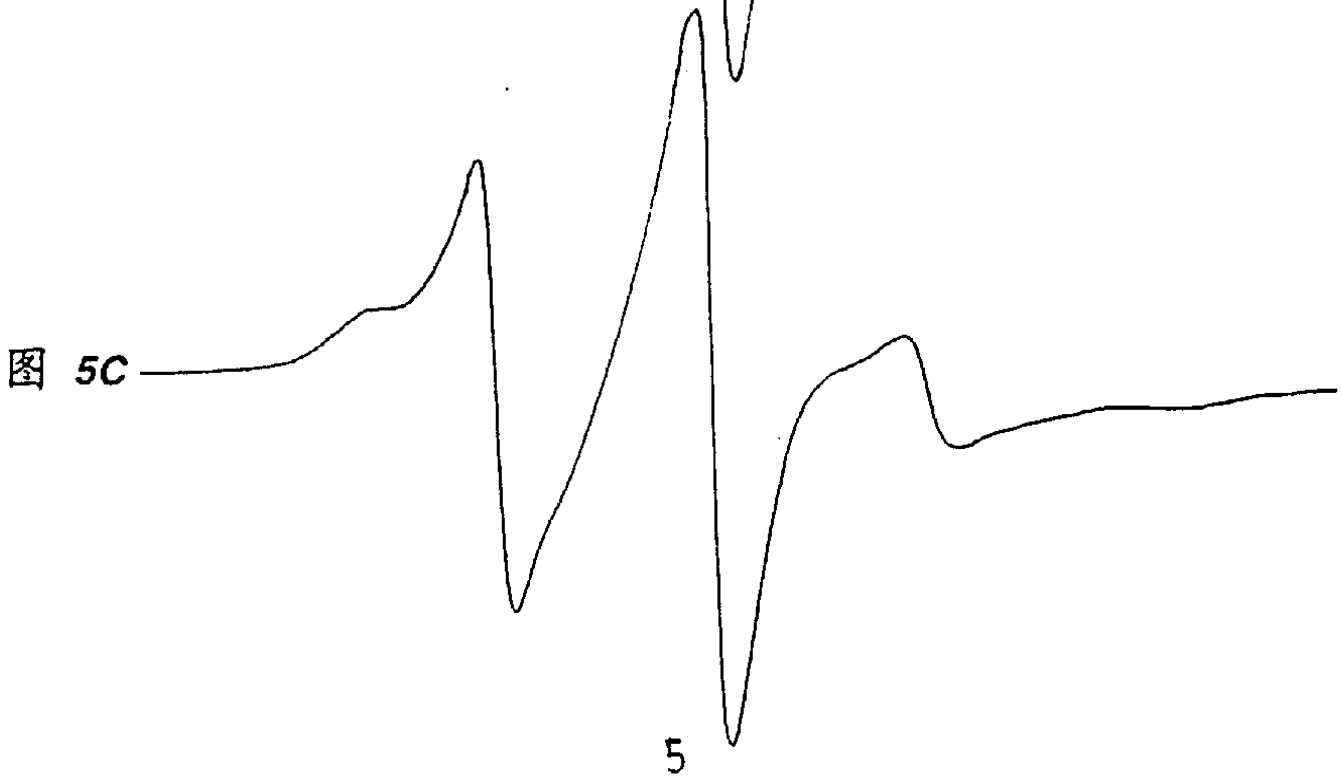
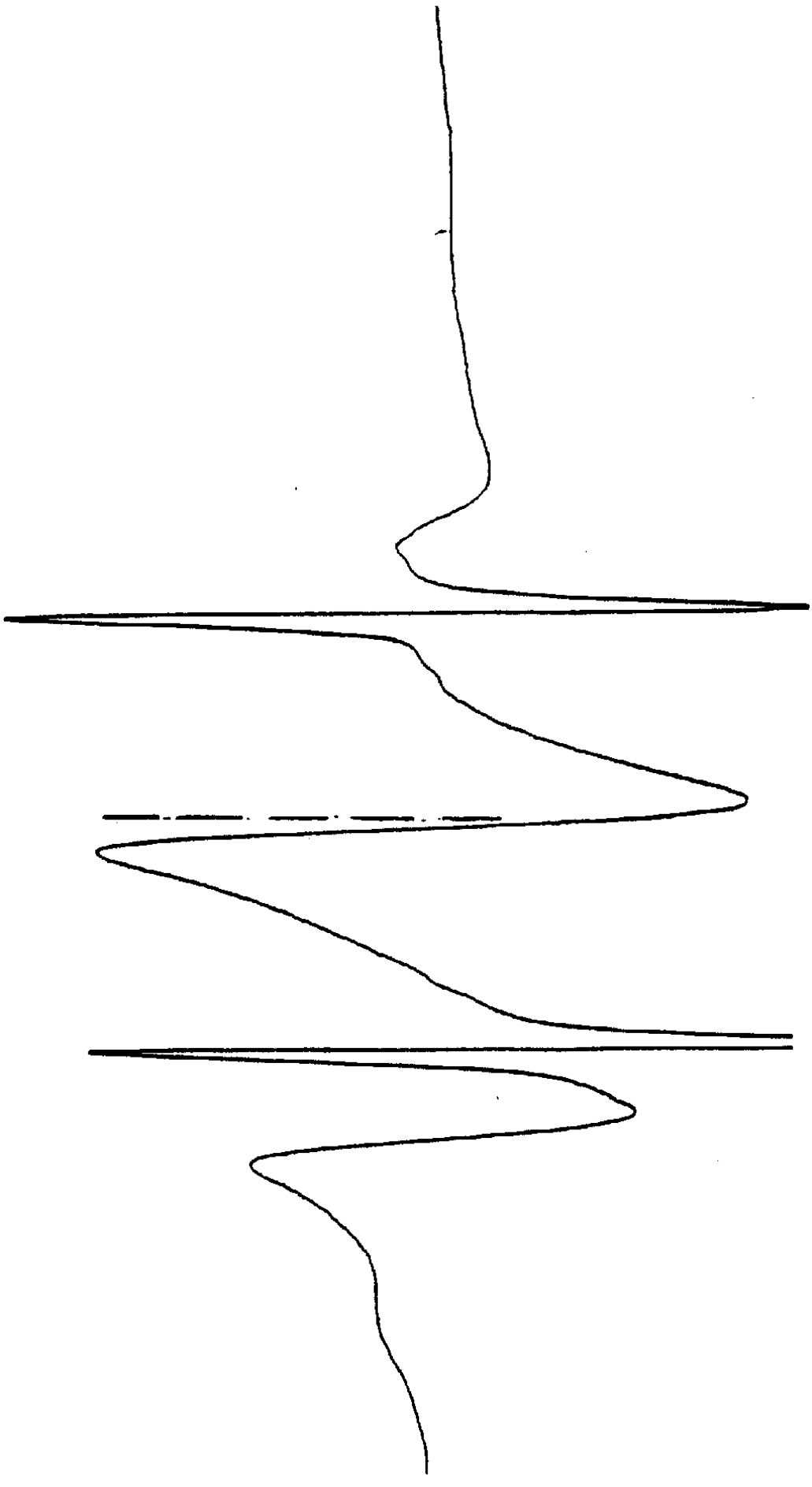


图 5C



Фиг. 6

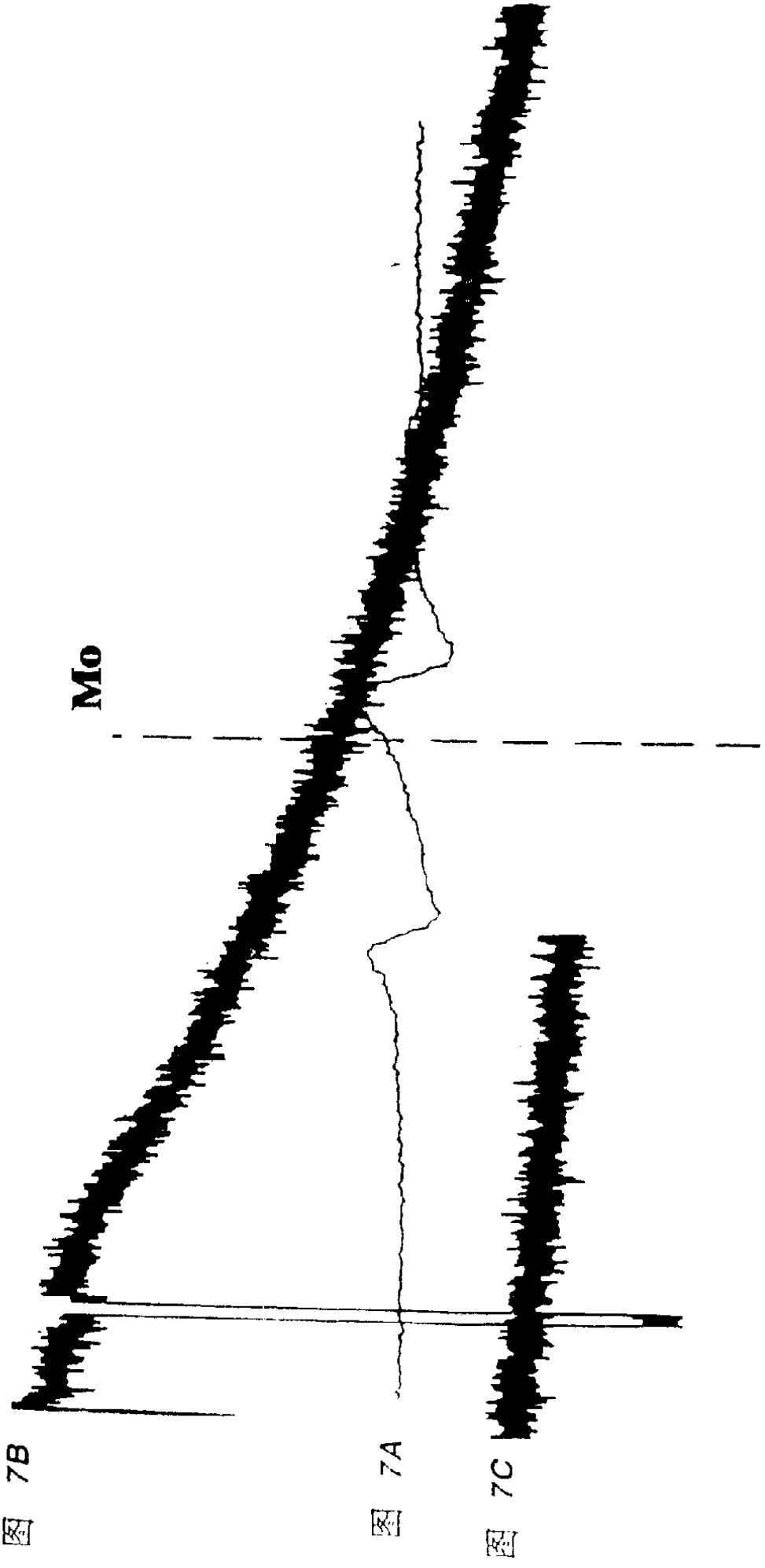

Mo
7B
7A
7C

图 8A

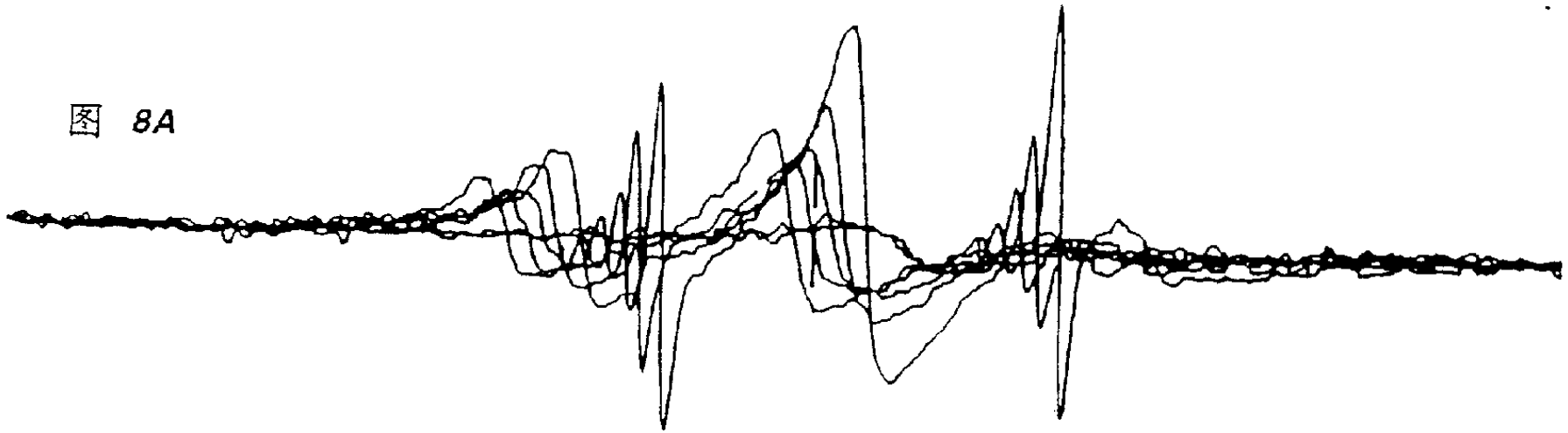


图 8B

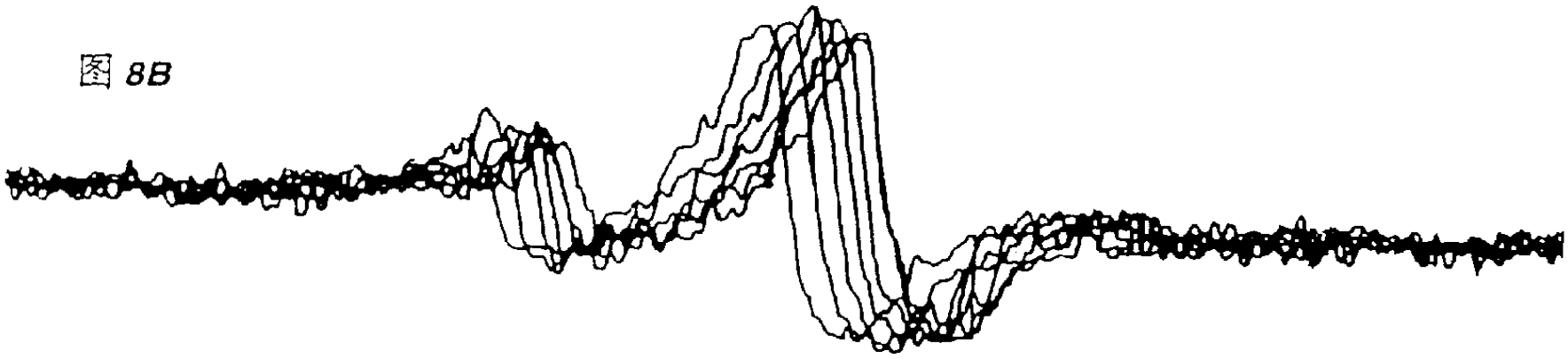


图 9A

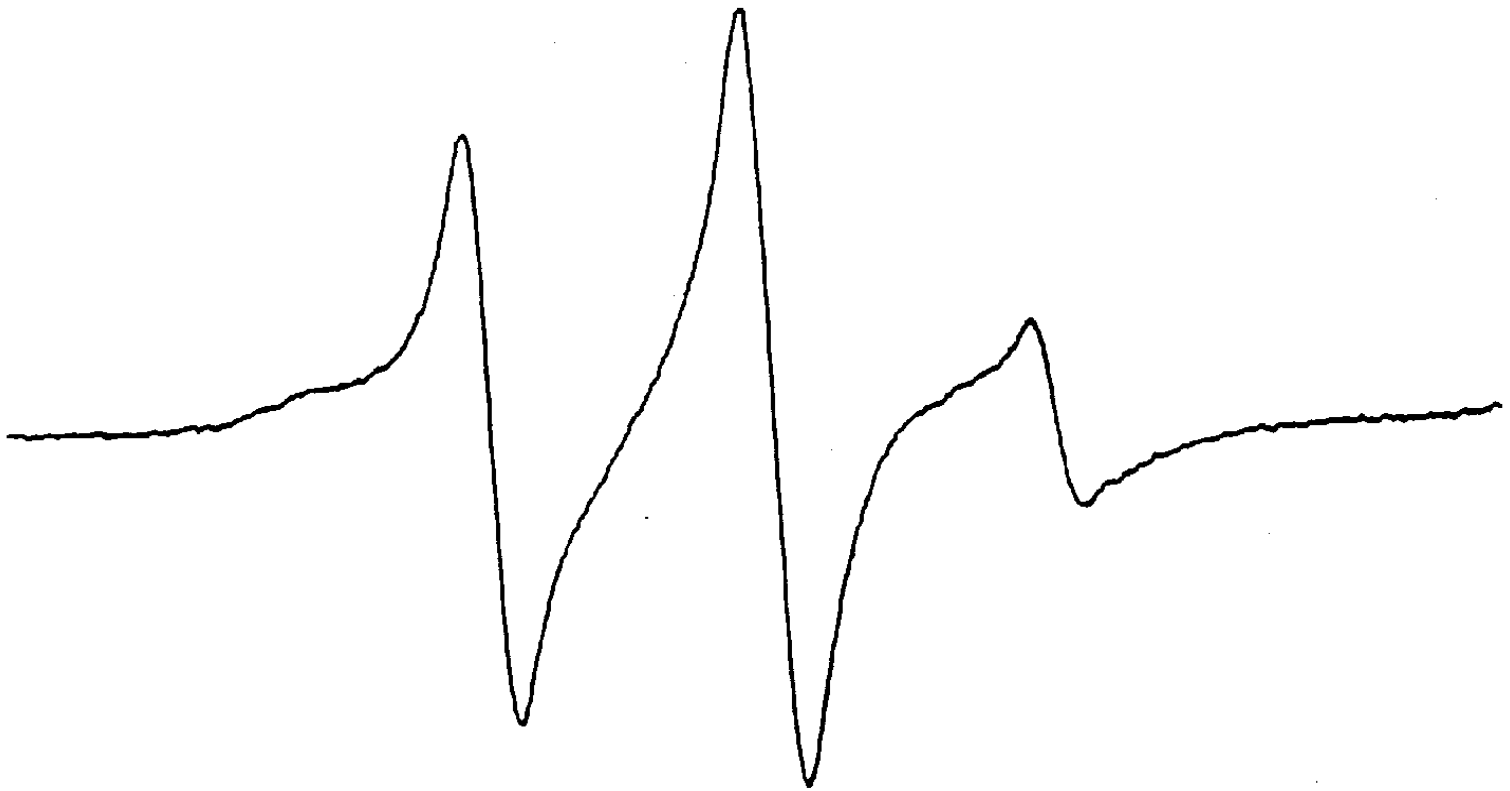


图 9B



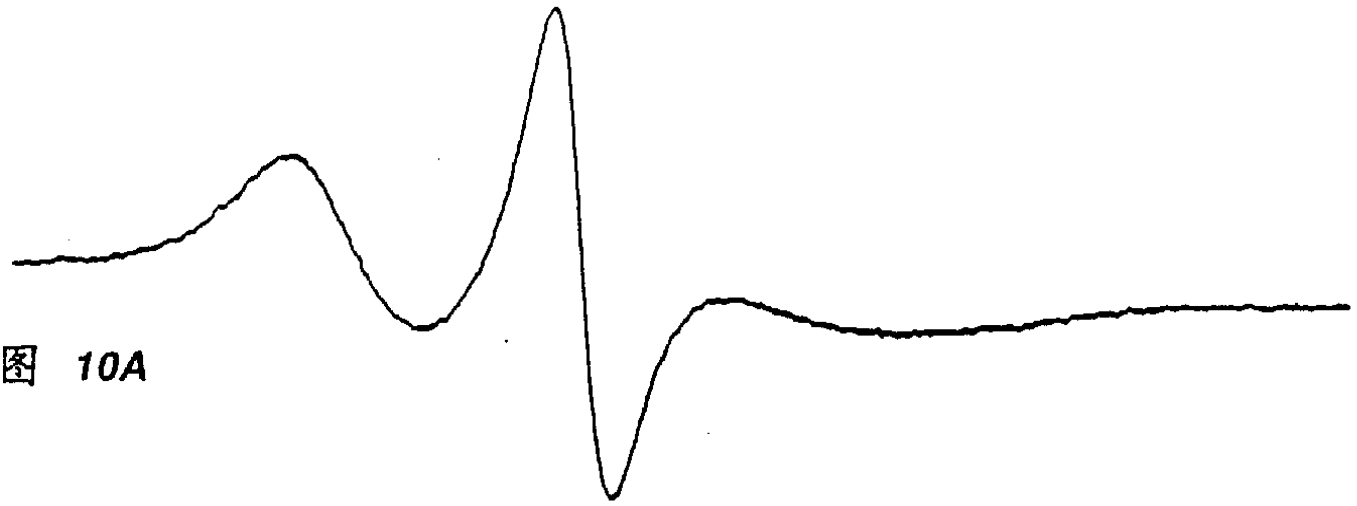


图 10A

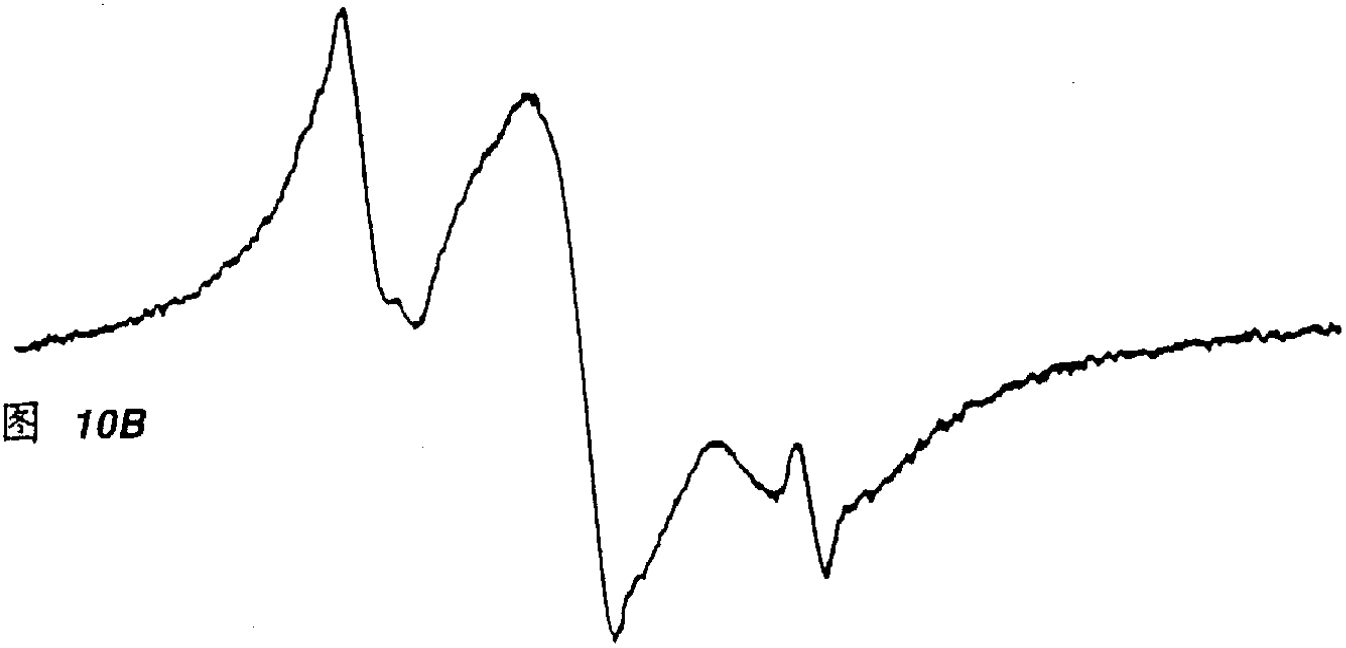


图 10B

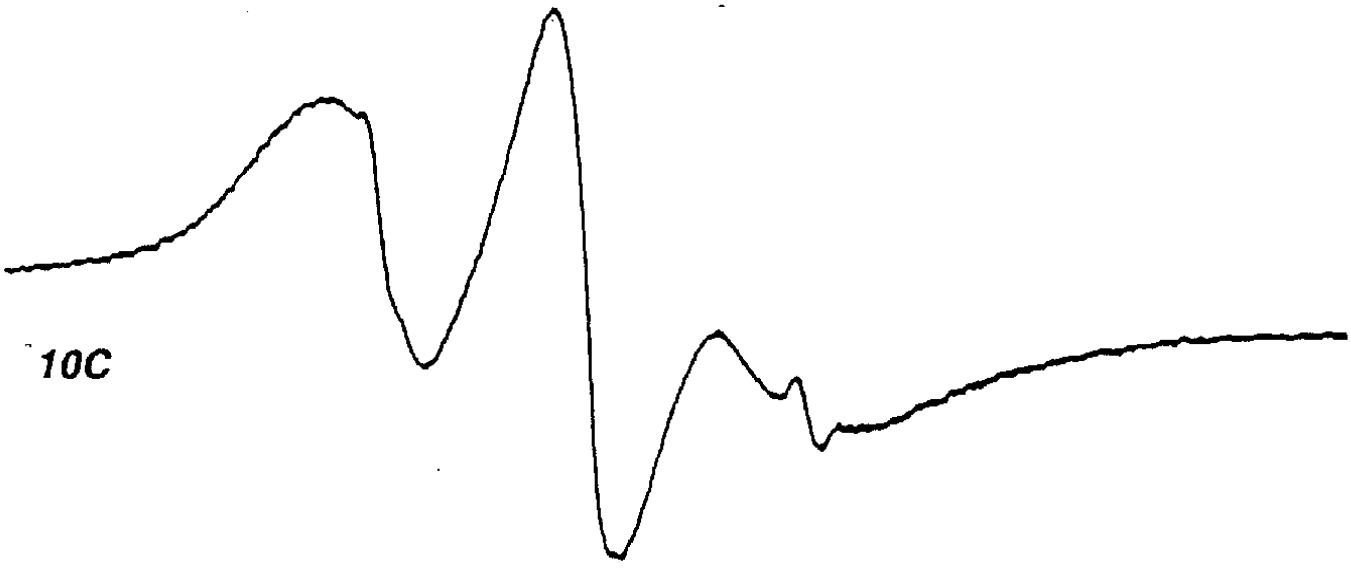
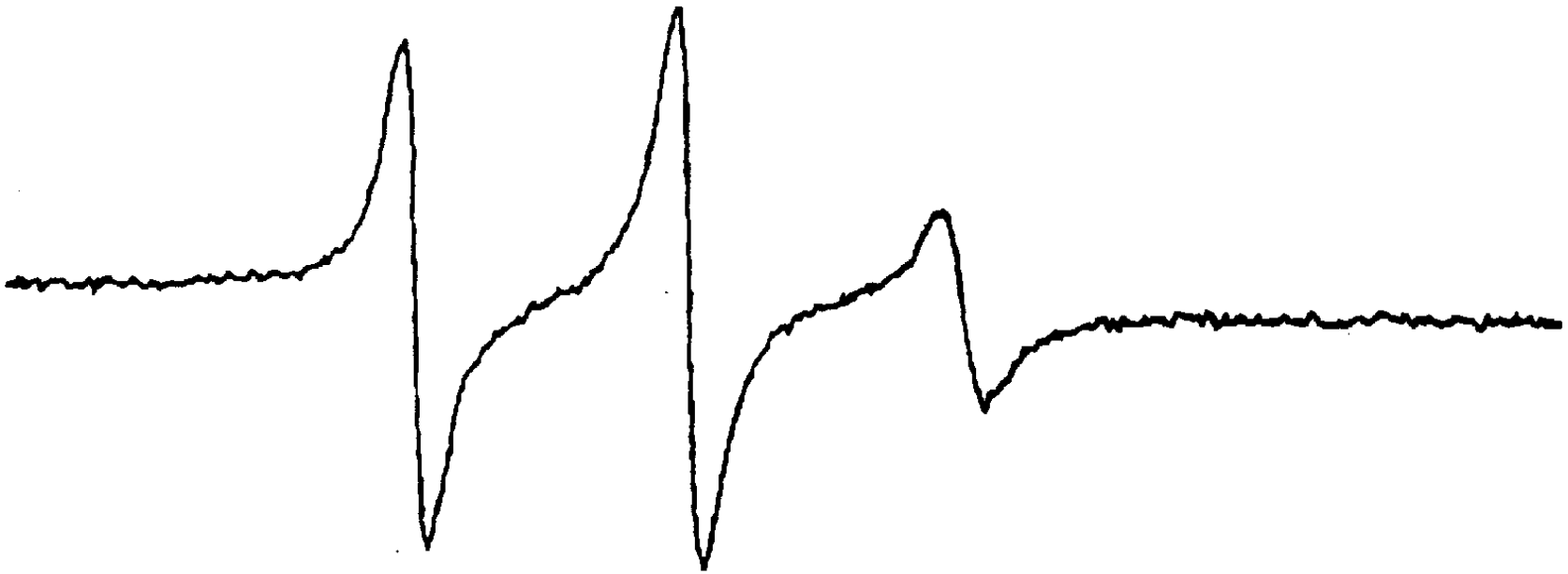


图 10C

图 11



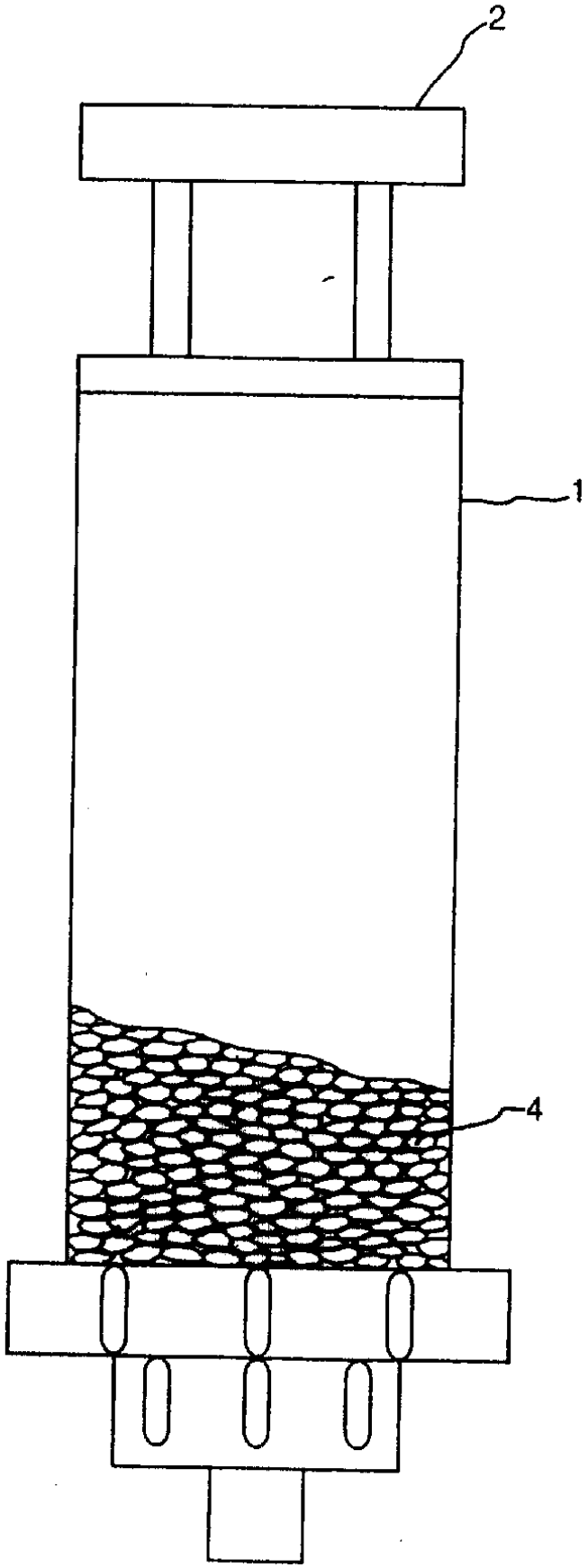


图 12