

修正  
補充

本84年6月20日

381022

A4  
C4

381022

|      |                          |
|------|--------------------------|
| 申請日期 | 82. 9. 9.                |
| 案 號  | 82107408                 |
| 類 別  | A61K 31/44, 31/42, 31/45 |

(以上各欄由本局填註)

|             |               |                                                                                                                                                                                       |  |                   |
|-------------|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|-------------------|
| 第82107408號  |               | 發 明 專 利 說 明 書                                                                                                                                                                         |  | 修正本<br>修正日期：84年6月 |
| 一、發明<br>名稱  | 中 文           | 使用氮氧化物來防止作為紅血球代用品的血紅素，特別是穩定化、聚合化、共軛化或包囊化的血紅素之氧中毒的組成物及方法                                                                                                                               |  |                   |
|             | 英 文           | COMPOSITIONS AND METHODS UTILIZING NITROXIDES TO AVOID OXYGEN TOXICITY, PARTICULARLY IN STABILIZED, POLYMERIZED, CONJUGATED, OR ENCAPSULATED HEMOGLOBIN USED AS A RED CELL SUBSTITUTE |  |                   |
| 二、發明<br>創作人 | 姓 名           | 夏 任 長                                                                                                                                                                                 |  |                   |
|             | 國 籍           | 加 拿 大                                                                                                                                                                                 |  |                   |
|             | 住、居所          | 美國加州爾灣市星峰街135號                                                                                                                                                                        |  |                   |
| 三、申請人       | 姓 名<br>(名稱)   | 夏 任 長                                                                                                                                                                                 |  |                   |
|             | 國 籍           | 加 拿 大                                                                                                                                                                                 |  |                   |
|             | 住、居所<br>(事務所) | 同 上                                                                                                                                                                                   |  |                   |
|             | 代 表 人<br>姓 名  |                                                                                                                                                                                       |  |                   |

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

修正  
補充

本84年6月20日

381022

A4  
C4

381022

|      |                          |
|------|--------------------------|
| 申請日期 | 82. 9. 9.                |
| 案 號  | 82107408                 |
| 類 別  | A61K 31/44, 31/42, 31/45 |

(以上各欄由本局填註)

|             |               |                                                                                                                                                                                       |  |                   |
|-------------|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|-------------------|
| 第82107408號  |               | 發 明 專 利 說 明 書                                                                                                                                                                         |  | 修正本<br>修正日期：84年6月 |
| 一、發明<br>名稱  | 中 文           | 使用氮氧化物來防止作為紅血球代用品的血紅素，特別是穩定化、聚合化、共軛化或包囊化的血紅素之氧中毒的組成物及方法                                                                                                                               |  |                   |
|             | 英 文           | COMPOSITIONS AND METHODS UTILIZING NITROXIDES TO AVOID OXYGEN TOXICITY, PARTICULARLY IN STABILIZED, POLYMERIZED, CONJUGATED, OR ENCAPSULATED HEMOGLOBIN USED AS A RED CELL SUBSTITUTE |  |                   |
| 二、發明<br>創作人 | 姓 名           | 夏 任 長                                                                                                                                                                                 |  |                   |
|             | 國 籍           | 加 拿 大                                                                                                                                                                                 |  |                   |
|             | 住、居所          | 美國加州爾灣市星峰街135號                                                                                                                                                                        |  |                   |
| 三、申請人       | 姓 名<br>(名稱)   | 夏 任 長                                                                                                                                                                                 |  |                   |
|             | 國 籍           | 加 拿 大                                                                                                                                                                                 |  |                   |
|             | 住、居所<br>(事務所) | 同 上                                                                                                                                                                                   |  |                   |
|             | 代 表 人<br>姓 名  |                                                                                                                                                                                       |  |                   |

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

修正  
本 年 月 日  
補充

A6  
B6

(由本局填寫)

|          |
|----------|
| 承辦人代碼：   |
| 大 類：     |
| I P C分類： |

本案已向：

美 國 ( 地區 ) 申請專利，申請日期： 案號： ， ☐有 ☐無主張優先權  
1993,8,16 08/107,543

有關微生物已寄存於：

，寄存日期：

，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

## 五、發明說明 ( 34 )

圖)。被共價地接合至葡聚糖的該TEMPO之增加的移動度，相較於一緊密摺疊的血紅素分子，之移動度相比較，相符於被鍵結至一可撓性聚醣葡聚糖鏈之氮氧化物(參見第3A及3B圖)。因此，第6圖之共振光譜證實一新穎的氮氧化物-標識的葡聚糖共軛化血紅素已被製備出。

雖然，本發明已藉由如上所述之特殊的實施例來加以說明，由於生理上可相容的血紅素之各種形式以及穩定的氮氧化物-自由基金團的結構歧異性，可以做出許多依據上述實施例的變化，且如下申請專利範圍所述的，未有逸脫出本發明之基本精神。

### 元件標號對照表

|   |      |   |      |
|---|------|---|------|
| 1 | 殼罩   | 2 | 活塞入口 |
| 3 | 活塞出口 | 4 | 基質   |

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

水

## 五、發明說明( )

### 發明領域

本發明係有關使用氮氧化物與血紅素及脂質體來減輕一活生物體內與氧有關的物種之毒性作用。特別是，本發明所揭露的組成物與方法，其特徵在於使用氮氧化物與生理上可相容的無細胞血紅素溶液及包囊化血紅素溶液，以供用作為一紅血球代用品。

### 發明背景

近幾十年來，科學家及醫師們致力於製造一種可被安全地輸血至人體內之紅血球代用品。由於經常性的血荒以及血型不符、血型必需相配和疾病傳染等問題之存在，導致工業界、學術界及官方共同努力來發展一可供大量安全的輸血而不會有顯著的生理上副作用之血液代用品。目前，一些公司正在對實驗血液代用品從事臨床測試。但是，沒有預想到的有害生理反應以及研發過程之內在的複雜性，阻礙其走向通過使用許可階段以及成為一臨床上有用的血液代用品。

美國海軍之一研究諮詢委員會在1992年8月發表一份報告，其中概述了數組從事製造血液代用品所做之努力，評估該等努力的情況，並概略地敘述所碰到的毒性問題。該美國海軍研究諮詢委員會報告反映出現今科學界一致的看法：即令現有之血液代用品產品[一般稱為“以血紅素為主的氧載體(HBOC)”]已被證實在氧氣傳輸上是有效的，某些毒性問題仍未克解決。在現有的以血紅素為主的氧載體(HBOC)之臨床研究中所看到的有害輸血反應包括了全

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( )

身性高血壓與血管收縮。這些有害反應迫使許多製藥公司必需在非常低的劑量位準下進行第一期臨床試驗。

現有的以血紅素為主的氧載體(HBOC)之毒性問題已被美國政府列為應優先解決之一事項。該美國海軍研究諮詢委員的建議已為美國國家衛生院(National Institute of Health)所採納，並以“以血紅素為主的氧載體：毒性之機轉”為主題，公開邀請研究計劃(PA-93-23)來加以推動。因此，醫界與科學界可說是苦於尋覓一種可供輸血且不具有在現有的以血紅素為主的氧載體中所看到的副作用之血液代用品。

紅血球是血液之主要組份，並具有身體的氧氣傳輸系統。已知一血液代用品的最重要特徵是其攜氧的能力。紅血球能攜氧係因其主要組份是能如同氧載體般作用的血紅素。大多數正在進行作為血液代用品的臨床試驗之產品含有血紅素，該血紅素從紅血球的細胞膜及其餘細胞組份中被分離出，並予以純化以去除實質上所有的雜質。但是，當血紅素從紅血球中被移出並以其天然形式被置放於溶液內時，其很不穩定且會迅速地分解成其組份次單元。因此，在以血紅素為主的氧載體中所用的血紅素必須予以穩定化以防止其在溶液內分解。要發展其在溶液是穩定的且其被穩定化之方式不會令其氧傳輸功能受損的血紅素產物，科學人力及資本之實質投注，是不可或缺的。現有的以血紅素為主的血液代用品之輸氧能力，已被充分地證明(參照美國專利第3,925,344；4,001,200；4,001,401；4,053,

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

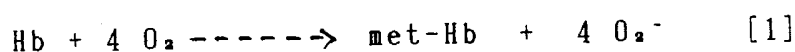
訂

錄

## 五、發明說明( )

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及5,061,688號)。

在身體內，當血液流經肺臟時，位在紅血球內的血紅素與氧分子結合，並將氧分子傳送至身體各部位以契合身體的正常代謝功能所需。但是，大部分活生物必須呼吸以維生的大氣氧氣是一種科學及醫學上的矛盾。在一方面，幾乎所有的活生物體需要氧以維生。在另一方面，各種不同的與氧有關的化學毒性物質係在正常氧代謝過程中被生成之。在氧氣的輸送過程中，血紅素(Hb)分子本身可被其所攜帶的氧氣( $O_2$ )所氧化。此自我氧化反應產生二種非所欲的產物：氧化血紅素(met-Hb)與超氧化物陰離子( $O_2^-$ )。其化學反應如下所示：



該超氧化物陰離子( $O_2^-$ )係為一帶有一額外的電子及一負電荷的氧分子。該超氧化物陰離子( $O_2^-$ )具高度反應性且且為有毒的。具有潛在破壞性的氧化壓力，係從血紅素之自我氧化所生成的超氧化物陰離子而生，並在酵素超氧化物歧化酶(SOD)之存在下，藉由下列反應而造成超氧化物陰離子之隨後轉化成有毒的過氧化氫：

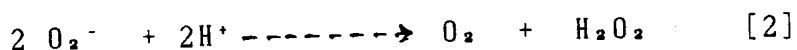
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

泉

## 五、發明說明 ( )



紅血球內的超氧化物陰離子及過氧化氫之存在，被認為是紅血球的氧化壓力之主要來源。

除了利用血紅素來輸送氧氣外，紅血球之一較少被認知到的特徵是，其含有一組特殊的酵素，該等酵素能將與氧有關的化學物種加以解毒，該等化學物質是在氧氣代謝中所產生的副產物。沒有此等特殊的酵素系統之保護，血紅素的自我氧化會造成紅血球的惡化及毀滅。但是在身體內，位在紅血球內的該等酵素系統之保存能力，藉由將在正常代謝期間中所產生的超氧化物陰離子轉變成無毒物質，可使身體免於氧中毒，並藉此控制氧化壓力之程度。但是，若此酵素系統瓦解，紅血球的完整性就會受損。一種會產生為在紅血球細胞內的保護系統之一種酵素的基因之損害會導致一可觀察到的病理狀況。例如，葡萄糖-6-磷酸去氫酶缺乏症，一種紅血球的遺傳性障礙，是過氧化氫誘發的溶血貧血症之主因。此障礙是由於被影響的細胞不能維持足供被氧化的穀胱甘肽之還原的NAD(P)H位準，而造成過氧化氫透過穀胱甘肽過氧化酶之不當的解毒[P. Hochstein, Free Radical Biology & Medicine, 5:387 (1988)]。

紅血球細胞的保護性酵素系統可經由一種二步驟化學途徑將有毒的超氧化物陰離子轉變成一種無毒的型式。該途徑的第一個步驟是經由酵素穀胱甘肽過氧化酶將超氧化

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

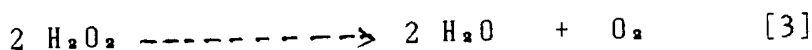
裝

訂

錄

## 五、發明說明 ( )

物陰離子轉變成為過氧化氫(參見式[2])。由於過氧化氫亦為有毒的，紅血球含有另一種酵素，觸酶，其如該途徑之第二步驟所示，將過氧化氫轉變成水(參見式[3])。



紅血球亦可使用酵素穀胱甘肽過氧化酶而將過氧化氫以及其它的毒性有機過氧化物予以解毒，該穀胱甘肽過氧化酶與穀胱甘肽反應而將過氧化氫及有機過氧化物轉變成水。紅血球亦含有一種酵素來防止由血紅素之自我氧化所產生的氧化血紅素之生成。該酵素，氧化血紅素還原酶可將氧化血紅素轉變回血紅素的天然型式。因此，在身體內，血紅素的自我氧化之毒性作用，被以酵素為主之特殊的反應途徑所防止，該途徑可消除非所欲的氧氣代謝副產物。

該等在正常的氧氣輸送過程中可使紅血球免於氧中毒的超氧化物歧化酶、觸酶及穀胱甘肽過氧化酶之酵素性氧氣解毒功能，並不存在於迄今所發展的以血紅素為主的氧載體(HBOC)內。若無氧氣解毒功能，現有的HBOC溶液之安全性會由於與氧有關的毒性物種之存在而受損。

用來製備現有的HBOC溶液之基本方法是藉由從紅血球中除出血紅素，而後將之純化以去除可能在輸血時引起不利反應的所有非-血紅素蛋白質及其它雜質(參見美國專利第4,878,210、4,831,012及4,925,574號)。氧氣解毒酵素系統之實質破壞或移除，是現有的用以產生可用於HBOCs

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

泉

## 五、發明說明( )

中的純化血紅素之分離及純化方法之一不可避免的結果。任擇地，不從紅血球中來分離及純化血紅素，已可使用重組技術來製備血紅素。但是，重組型人類血紅素亦為高度純化的，且其不含於紅血球中發現到的氧氣解毒系統。因此，用來產生一高度純化的血紅素溶液之精密技術的發展，是好是壞未可知，因為純化方法會去除有害的雜質以及正常存在於紅血球內之有利的氧氣解毒酵素，而最終會助益於與氧有關的毒性。

由現有的HBOCs之靜脈內投藥所引起之一觀察到的毒性副作用是血管收縮或高血壓。已知超氧化物歧化酶(SOD)在活體外會快速的去除超氧化物陰離子，並且增長氧化氮(NO)之血管舒張效用。氧化氮是一種其在最近被發現係為先前僅知的“內皮-衍生之鬆馳因子(EDRF)”物質之分子。氧化氮的血管鬆馳效用藉由SOD而得以延長，被認為是該SOD用以防止超氧化物陰離子及氧化氮之間的反應之能力所致者[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); Grylewski et al., Nature 320: 454 (1986)]。

但是，在活體中，由超氧化物陰離子所造成的EDRF之去活化，不曾被觀察到，且一般不被認為是可能的。然而，某些會損害SOD的病理生理上狀況會引起由超氧化物陰離子所導致的毒性作用[Ignarro et al., J. Pharmacol.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

泉

## 五、發明說明 ( )

Toxicol. 30: 535 (1990)]。在現有的HBOC溶液之臨床前動物研究中所觀察到的高血壓作用暗示了在現有的HBOCs之大量輸血中，超氧化物陰離子的濃度是EDRF的破壞及所觀察到的血管收縮及全身性高血壓的原因。

因此，區隔由氧化物陰離子與氧化氮(NO)之反應所導致的高血壓與由血管外滲作用所導致的高血壓以及血紅素對NO之結合，是十分重要的。在一HBOCs之輸血時，血紅素亦可藉由其與氧化氮反應而產生對應的亞硝醯基-原血紅素(NO-heme)加合物來壓低氧化氮的血管舒張作用。更特別的是，已知去氧-血紅素對氧化氮之結合親和力，較其對一氧化碳高的結合親和力要高上好幾個級數。這些血紅素-NO相互反應已被用於分析氧化氮及研究氧化氮的生物活性。例如，血紅素對氧化氮的血管舒張作用之拮抗作用似乎是依賴血紅素的細胞膜通透性而定。在完整的血小板中，血紅素不會抵消L-精胺酸(氧化氮的前驅物)之作用。相對地，在被分解的血小板之胞液中，血紅素係為由氧化氮所調節之L-精胺酸誘發的環GMP形成之一最有效的抑制劑。這些實驗證實了血紅素無法有效地穿透血小板膜[Radomski et al., Br. J. Pharmacol. 101:325(1990)]。因此，所想要的HBOCs之特徵之一是消除氧化氮與血紅素之相互反應。亦已知血紅素可拮抗內皮-依賴性血管舒張作用[Martin W. et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 232:708 (1985)]以及NO-激發的血管平滑肌的鬆弛作用[Grueter C.A., et al., J. Cyclic Nucleotide Res.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( )

5: 211 (1979)]。已有嘗試藉由化學地穩定化、聚合化、包裹化或共軛化位在HBOCs中的血紅素來限制血紅素的血管外滲作用及高血壓作用俾以延長循環時間。因此，雖然現今的HBOCs是為相當地膜不可通透者，並可輸送氧氣，但該等HBOCs溶液在輸血時，不具有防止超氧化物陰離子與氧化氮間反應之能力。

現有的血液代用品之毒性問題的一個理想解決方案是一種以血紅素為主的組成物，該組成物組合了現有的HBOCs之氧氣-輸送功能與紅血球的氧氣解毒功能。但是，酵素超氧化物歧化酶(SOD)至現有的HBOC溶液內之一簡單的添加不會是所想要者，蓋因藉由降低超氧化物陰離子的濃度，會助益將血紅素氧化成氧化血紅素的反應，這導致非所欲的氧化血紅素之建立(參見式[1])。又，亦不希望鼓勵一血紅素溶液中的超氧化物陰離子至過氧化氫之轉化，因為過氧化氫有毒且具有反應性，並會在儲存期間分解成有毒的羥基團或形成其它有毒的有機過氧化物。

本發明預期到穩定的氮氧化物自由基(此下稱之為“氮氧化物”)之使用，俾以對以血紅素為主的血液代用品提供紅血球的氧氣解毒功能。以前，氮氧化物已被用於電子旋轉共振光譜學以作為研究生物巨分子的結構及移動的特性之“旋轉標識”。氮氧化物亦已被用來檢測反應性自由基中間產物，因其等之化學結構提供一具有明確界定的超精細相互反應之穩定不成對的電子。此外，氮氧化物亦被觀察出能產生酵素模仿物之作用；某些低分子量氮氧化

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( )

物已被鑑定出可模擬超氧化物歧化酶(SOD)[A. Samuni et al., Biol. Chem. 263:17921 (1988)]及觸酶[R.J. Mehlichorn et al., Free Rad. Res. Comm., 17:157 (1992)]的活性。許多的研究亦顯示可通透胞膜的氮氧化物可短期地保護哺乳類細胞對抗由次黃嘌呤/黃嘌呤氧化酶所產生超氧化物陰離子以及於過氧化氫暴露所引起之細胞中毒。

已有各種不同的技術描述將一氮氧化物共價接合至一生物巨分子(包含血紅素及脂質體)上。參照McConnell et al., Quart. Rev. Biophys. 3:91 (1979); 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. 2:17 (1968); Smith I.C.P. "Biological Application of Electron Spin Resonance Spectroscopy," Swartz, H.M. et al., eds., Wiley/Interscience, New York p.483 (1972)。雖然被選用的氮氧化物已被共價地接合至血紅素分子以供研究血紅素的互助式氧氣結合機制之用,氮氧化物尚未與被特別地配方以供作為血液代用品的血紅素一起被使用之。以下所提供之實驗結果證實了氮氧化物可被連接至穩定化、聚合化、共軛化及包囊化的血紅素以供作為一血液代用品。

### 發明之概要說明

本發明揭露合併使用穩定的氮氧化物與含有血紅素的溶液之組成物及方法。特別地,穩定的氮氧化物與含有血

## 五、發明說明( )

紅素之溶液被用來製造數種有關於一具有紅血球的氧氣解毒功能之血液代用品的配方。這些配方在此處可能被敘述為以血紅素為主的紅血球代用品(HRCS)，因為以血紅素為主的氧載體(HBOC)之氧氣輸送能力可藉由提供身體紅血球之氧氣解毒功能而被增強之。此外，本發明描述其被共價地接合至一容器之內部表面或被共價地接合至被包封在一過濾器內之不溶性基質上的氮氧化物，該容器或過濾器係要為一現有的HBOC所用，俾以在該溶液被輸入一病人體內之前，清除掉該溶液內存有之與氧有關的毒性化合物。此處所述的HRCS配方可減輕由位於現有的HBOC溶液內的超氧化物陰離子之生成而造成的氧化壓力，且在輸血時，可減少一氧化氮，內皮-衍生的鬆弛因子(EDRF)，的破壞。若能防止EDRF的破壞，當現有的HBOC溶液被輸入至一病人體內所觀察到的血管收縮及全身性高血壓之問題，即可被實質地減輕之。

以下所述之HRCS配方可減緩與氧有關的毒性物種之形成，此係藉由令一氮氧化物發揮有如一“超氧化物歧化酶”之功能，一已知不會發生紅血球細胞內的酵素般反應。在這些HRCS配方中，氮氧化物防止由血紅素的自我氧化所產生的非所欲之超氧化物陰離子的蓄積(參照式[1])。在“超氧化物氧化酶”反應中，超氧化物陰離子被氧化變回氧分子，而不會走向過氧化氫的形成。此部分地伴隨著產生一儲存狀況，其中氮氧化物之濃度遠超過於氧的濃度。使用在此所揭露的方式，氮氧化物可防止非所欲之氧化反

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明( )

應的串聯，該等氧化反應造成超氧化物陰離子之開始形成。再者，在此所述之生理上可相容的HRCS溶液可提供比現有的HBOC溶液更佳的優點，因此處所述之該等配方在被輸入病人體內後，該氮氧化物會模擬超氧化物歧化酶及觸酶酵素活性。

氮氧化物與一生物可相容的巨分子之合併使用的較佳組成物包含有：1)被接合至一儲存容器內或被共價地接合至一被用作為一過濾器之不溶性基質的氮氧化物；2)被共價地連接至一藉由化學或重組交聯而被穩定化的血紅素上之氮氧化物；3)被共價地連接至一聚合化血紅素的氮氧化物；4)與血紅素被共包囊化在一脂質體內或是被嵌入於一脂質體膜上的氮氧化物；以及5)被共價地結合至一共軛化血紅素上的氮氧化物。

又，本發明揭露以膜不透性氮氧化物與血紅素之共包囊化為主的HRCS。最後，本發明揭露製備上述配方的方法，還有用以製備含有氮氧化物之過濾器和容器的方法，俾以供一現有的HBOC之儲存及解毒之用。

圖式之說明

第1A及1B圖顯示第1天(A)及第30天(B)所記錄的，4-胺基-TEMPO標識的 $\alpha$ -棉子糖聚合化血紅素之電子旋轉共振光譜。第1C圖是在第1天所記錄的，以同體積未標識的血紅素稀釋第1A圖中的樣品而得之光譜。第1D圖是第1C圖中的樣品在第30天時之記錄。

第2A及2B圖係為電子旋轉共振光譜，其分別顯示出4-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

錄

## 五、發明說明 ( )

(2-溴乙醯胺基)-TEMPO至 $\omega$ -胺己基-瓊脂糖的共價接合及4-胺基-TEMPO至1,4-雙(2:3-環氧丙氧基)丁烷-活化的瓊脂膠之共價接合。

第3A及3B圖係為電子旋轉共振光譜，其分別顯示出4-(2-溴乙醯胺基)-TEMPO及3-馬來醯亞胺-PROXYL至3,5-雙-溴甲砒基-雙反式丁烯二酸(DBBF)交聯的血紅素或二阿斯匹靈交聯的血紅素之成功的共價接合。

第4A及4B圖係為電子旋轉共振光譜，其分別顯示出4-胺基-TEMPO標識的、 $\alpha$ -棉子糖交聯的並且聚合化的人體血紅素，以及與戊二醛聚合的3-馬來醯亞胺-PROXYL標識的DBBF-血紅素。

第5A及5B圖係為電子旋轉共振光譜，其分別顯示出含有下列物質之脂質體包裹化的人體血紅素：(A) 3-DOXYL-膽甾烷，(B) 16-DOXYL-硬脂酸，以及(C) 3-DOXYL-膽甾烷及16-DOXYL-硬脂酸此二者。

第6圖係為以4-胺基-TEMPO予以標識並以葡聚糖予以共軛化的氮氧化物-標識的血紅素之一電子旋轉共振光譜。

第7圖為一過濾器室之一實施例，該過濾器室包含一其上結合有一氮氧化物之固體基質，且一含血紅素溶液可流經其中。

### 發明之詳細說明

除非在本文之描述中另有特別提出，在此所用的“血紅素”一詞通常是指氧基-、羧基-、一氧化碳基-及去氧-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( )

血紅素。本發明中所使用的血紅素可為人類的、重組型或為動物來源者，並係藉由已知的技術而獲得及純化者。該血紅素可藉由醛基與交聯的血紅素衍生物反應，而被共價地接合至吡哆醛-5'-磷酸酯中的吡哆醛基團或開環的腺嘌呤三磷酸(o-ATP)上。該等交聯的衍生物可包含多官能基的、雜雙官能基的及同雙功能基的交聯試劑，如二醛、聚醛、二環氧化物、聚環氧化物、活化的聚羧基基團與二羧基基團，例如3,5-雙-溴甲硅基-雙反式丁烯二酸及TEMPO丁二酸或TOPS(參見美國專利第4,240,797號)，環糊精及其陰離子(例如硫酸)交聯的血紅素及聚合化血紅素。所有在此描述的用於本發明之血紅素溶液是生理上可相容的。該血紅素溶液是不含細胞的俾以去除熱原、內毒素及其它污染物。

在此所使用的“氮氧化物”一詞是描述穩定的氮氧化物自由基、其前驅物及其衍生物(包含其相應的經基胺衍生物，其中該氧原子被代之以一經基，且以一鹵化氫形式而存在)。對本發明的目的而言，該等經基胺衍生物之氮鹽形式是較為適宜的。

在此所述的氮氧化物中，該不成對的電子係部分地安定的，因為其氮原子核被連接至二個碳原子，該等碳原子被強烈的電子供給者所取代的。對位於N-O鍵結的氧原子上之部分負電荷而言，該二個鄰近的碳原子一起將該不成對的電子定位在該氮原子核上。

氮氧化物通常可具有一雜環或是直鏈結構。其基礎標

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

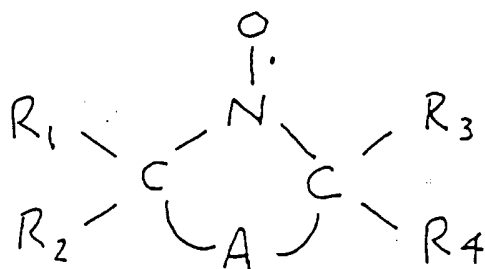
裝

訂

泉

## 五、發明說明 ( )

準是一個穩定的自由基。在結構上，具有下列結構的氮氧化物是較佳的，其中  $R_1-R_4$  為電子供給者，而 A 為一雜環之基餘成員。



在這些雜環結構中，"A"代表一個5-員環(吡咯烷基或具一雙鍵的PROXY，亦即吡咯啉)或是6-員的六氫吡啶基或TEMPO)雜環結構之其餘的碳原子，且其中一碳原子可被取代以一個氧原子(嗎啉基或DOXYL)以及某些氫可為至多二個溴原子所取代。在該等雜環結構中，可使用穩定的同位素(例如 $^{15}\text{N}$ 及氘)。位在 $\alpha$ 碳上的取代必須使得該不對稱的電子大體上被維持在一 $\pi$  p軌域結構上。 $R_1$ 以至 $R_4$ 為烷基(直鏈或支鏈)或芳基，但其較佳者為甲基或乙基。在任一氮氧化物中，位在其 $\alpha$ 碳上的取代基必須為強烈的電子供給者以增加安定性，因此甲基( $\text{CH}_3$ )或乙基( $\text{C}_2\text{H}_5$ )是較為適宜的，雖然其它較長的碳鏈物種亦可被使用之。在實施上，立體結構上的考量可能會限制實用且經濟的氮氧化物化合物的範圍。供本發明之使用的較佳氮氧化物包含具有下列結構的氮氧化物：

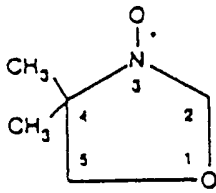
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

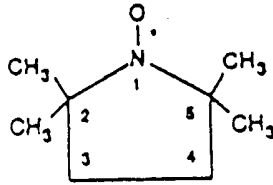
線

# 五、發明說明 ( )



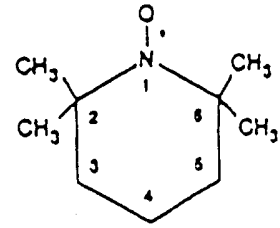
DOXPL

(4,4-二甲基-3-噁  
唑烷基氧基-)  
(4,4-二甲基噁唑  
烷-N-烴氧基)



PROXYL

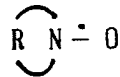
(2,2,5,5-四甲基-1-  
吡咯烷基氧基-)  
(2,2,5,5-四甲基吡咯  
烷-N-烴氧基)



TEMPO

(2,2,6,6-四甲基-1-  
六氫吡啶基氧基-)  
(2,2,6,6-四甲基六氫  
吡啶-N-烴氧基)

由上述可明顯得知，大多數適合的氮氧化物化合物基本上可以用下列化學式來代表之：



設若該R基係擇自於可維持該自由基的安定性之結構中。

其可被使用於本發明中的氮氧化物在結構上是分歧的，因為該等氮氧化物之必要性質是，其藉由模擬超氧化物氧化酶、超氧化物歧化酶以及觸酶活性，且在該過程中大體上不會被消耗掉，來影響HRCS內的超氧化物陰離子串聯(cascade)的過程之能力。雖然一廣範圍種類的氮氧化物可被用於本發明中，該氮氧化物在一減輕氧氣毒性所需之最低濃度下，應為生理上可接受的。在評估一可實施的物種時，值得注意的是，氮氧化物之相當低的毒性有助於其被發展成為NMR顯影中的對比劑(參見美國專利第4,834,964

## 五、發明說明( )

、4,863,727、5,104,641號)。

熟於此項技藝人士已知道許多用來分離及純化其為生理上可相容的血紅素溶液之方法。典型地，經純化的血紅素組成物含有至少99%血紅素(以總蛋白質量計)，一低於約3 $\mu$ g/ml的磷脂質含量，低於1 $\mu$ g/ml的磷脂醯絲胺酸或磷脂醯乙醇胺，以及一低於6%的無活性血紅素色素。其可用於本發明之純化的血紅素溶液，可使用各種傳統技術來製備，這包含但不限於，Cheung et al., Anal. Biochem. 137:481-484 (1984)、De Venuto et al., J. Clin. Med. 89:509-516 (1977)及Lee et al., Vth International Symposium on Blood Substitutes, San Diego, CA Mar. 17-20 Abstract H51 (1993)。

使用於本發明之純化的血紅素溶液，基本上應是不含氧的。溶液中的血紅素可藉由與一化可造成令血紅素釋出氧並使之保持在一實質去氧化狀態下的化學還原劑摻合而將之去氧化。將血紅素溶液去氧化之一較佳方法是藉由將該血紅素溶液暴露在一惰性的、且大體上不含氧氣的氣體(例如氮氣或一氧化碳)中，而予以進行的，俾以造成從血紅素上移除掉結合的氧，同時將位在該溶液中的血紅素轉變成一呈無氧之形式者，諸如去氧-血紅素或一氧化碳基-血紅素。任擇地，血紅素可經由一對氧具通透性但對血紅素則否之膜，被暴露在一真空或是氣體中。例如，可令一血紅素溶液流經一具有一膜壁的擴散室，藉此血紅素沿著該膜流動，而氧分子可通過該膜但血紅素則否。惰性氣體

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

頁

## 五、發明說明( )

沿著相對於血紅素溶液的膜壁之側邊循環，而造成氧的去除以及溶液內的血紅素成為去氧化狀態之轉化。較佳地，在氮氧化物標識化、交聯化、聚合化或共軛化之期間，該去氧-血紅素被維持在一大體上無氧的環境下。

在任何結合的氧之移除後，一氮氧化物被共價地接合至該血紅素上。通常是至少一個，且較佳的是一個以上的氮氧化物被共價地接合至一單個血紅素分子上。該氮氧化物可於該血紅素分子的數個位置處被共價接合至血紅素，該等位置包含：

- (a) 在一或多個自由的巰基(-SH)處，例如在 $\beta$ -93位置處。
- (b) 在任一具反應性的胺基(-NH<sub>2</sub>)處，例如在 $\beta$ 鏈的Val-1和/或 $\beta$ 鏈的離胺酸-82和/或 $\alpha$ 鏈的離胺酸-99處之DPG位置處；
- (c) 在任一非-專一性的表面胺基(NH<sub>2</sub>)或羧基(COOH)處。

一氮氧化物亦可被結合至在血紅素之交聯與聚合時所涉及之任一種具有一個二價-或三價-聯結子之殘餘的醛、環氧基或是活化的羧基基團，或是被用於共軛化血紅素之一試劑[如葡聚糖(Dx)或羥乙基澱粉(HES)或是聚氧化乙烯(POE)]上的殘餘的具有活性之基團。

如前述式[1]中所述的，在儲存期間內，HBOC溶液內的血紅素被氧氣緩慢地自我氧化而形成氧化-血紅素以及超氧化物陰離子。但是，在HRCS（其為本發明之標的）的

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

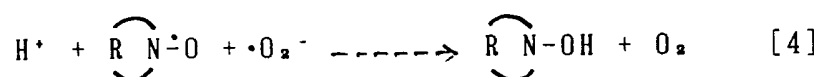
承

訂

封

## 五、發明說明 ( )

儲存期間，由此所形成的超氧化物陰離子會將氮氧化物還原成一羥基胺衍生物，且該超氧化物陰離子會經由下式反應而被氧化以形成氧分子：



式[4]所述的超氧化物陰離子至氧分子之轉化可防止超氧化物陰離子的聚集以及其後的過氧化物之形成。當該組合物內之最初氧含量被維持在一最低值時，在此被敘述為“超氧化物氧化酶”活性的這個活性會是最有效的，該組合物被維保持在一大體上無氧的環境內，且該氮氧化物的濃度足夠防止超氧化物陰離子及过氧化物的形成。因此，HRCS在一大體上無氧的容器內之儲存，是較為適宜的。

可容許一溶液被儲存在一無氧的環境內之容器系統，係為已詳知者，因為許多非-血紅素為主的靜脈溶液對氧氣是敏感的。例如，可使用一種在填充及密封過程中被淨除掉氧氣的玻璃容器。又，亦可使用其可被封裝於一用以作抗氧密封的外包裝紙(overwrap)內之可撓性塑膠容器。基本上，任何可防止氧與溶液中的血紅素反應之容器，皆可使用之。

為證實一氮氧化物之“超氧化物氧化酶”的活性，將配於溶液內的氮氧化物標識的血紅素之樣品維持在一加速的氧化儲存狀況內，並藉由電子旋轉共振光譜學來研究該氮氧化物的氧化還原狀態歷時一段時間。例如，一個被標

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

頁

## 五、發明說明( )

識以4-胺基-TEMPO的 $\alpha$ -棉子糖聚合化血紅素溶液，呈其氧化狀態被儲存於一密封的玻璃容器內(第1A圖)。在該一狀態下，溶液內的超氧化物陰離子及氧化-血紅素的形成速率速率有夠快而使得氮氧化物至其經基胺衍生物的轉化可被方便地監測之(參見式[4]及比較第1A與1B圖)。式[4]表示氮氧化物至其抗磁性經基衍生物之轉化，被偶合以該超氧化物陰離子變回氧分子之轉化。支持該一轉化的實驗證據被示於第1A及1B圖中。被共價地接合至血紅素之TEMPO的電子旋轉共振光譜(第1A圖)被轉化成其抗磁性的衍生物，這造成該樣品在4℃下儲存30天後，其共振峰消失完全的(第1B圖)。當其在血紅素之存在下被轉化成其經基胺衍生物時，該氮氧化物被認為已執行一有如“超氧化物氧化酶”活性。

一HBOC溶液內的氮氧化物之“超氧化物歧化酶”活性，是藉由顯示出該經基胺衍生物回至一氮氧化物之再轉化而予以證實的(參見式[4]及[5])。當知曉在第1A及1B圖所述的實驗條件下，氮氧化物被完全地轉化成經基胺(參見式[4])時，該氮氧化物可如式[5]所示的，經由僅提供更多的超氧化物陰離子而被再生之。為證實此反應機制，血紅素(及由此所形成的超氧化物陰離子)相對於氮氧化物的濃度，藉由以等體積之未標識的血紅素來稀釋第1A圖中的樣品，而被增加之。第1A及1C圖之一比較顯示出，因該稀釋效用而造成該氮氧化物的信號強度降低了約50%。另一方面，在30天的4℃低溫儲存後，如式[5]所預期的，該氮

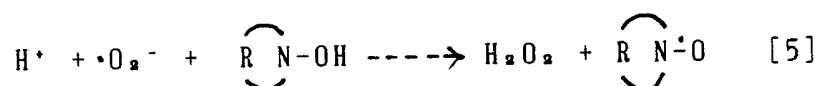
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

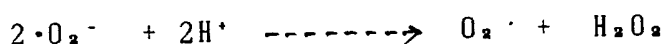
象

## 五、發明說明 ( )

氧化物被部分地再生之(參見第1D圖)。此觀察符合下列二反應之偶合：該羥基胺衍生物回至氮氧化物之再轉化以及源自超氧化物陰離子的過氧化氫之形成。



式[4]及[5]相加得到



這證實該氮氧化物在"HB0C"溶液內產生有如一低分子量、無金屬的SOD模擬物之作用。氮氧化物的電子旋轉共振光譜之檢測結果，與超氧化物陰離子和羥基胺( $\text{R} \begin{array}{c} \text{N-OH} \\ \text{---} \end{array}$ )的反應相吻合，該反應造成氮氧化物( $\text{R} \begin{array}{c} \text{N}^{\cdot}\text{O} \\ \text{---} \end{array}$ )及過氧化氫( $H_2O_2$ )的形成。

每一血紅素分子之氮氧化物的數目可在大約1至20之範圍內，而以大約為2是最為適宜者。但是，由於藥物動力學、毒性學以及免疫學上的考量，氮氧化物-血紅素比應予以保持在最低值。例如，一諸如3-馬來醯亞胺-PROXYL的氮氧化物，藉由首先製備一個100mM的配於乙醇中的氮氧化物溶液以作為載體溶液，而被共價地接合至溶液內血紅素上。將2莫耳當量的氮氧化物對血紅素直接予以混合添加至一配於乳酸化林格氏液中的DCL-Hb (8g/dl)內。容許該混合物在22℃及攪拌下反應，直至高於90%的氮氧化

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

象

## 五、發明說明 ( )

物被共價地接合至該 DCL-Hb，這通常需時 1 小時。接而使用一具有分子量截留值為 3000 道爾頓的橫流 (cross-flow) 膜過濾系統，藉由以 10 倍體積的乳酸化林格氏緩衝溶液清洗三次，而去除掉未反應的氮氧化物。將滯留物血紅素濃度調整為 7-14g/dl，予以無菌過濾並保存在 4℃ 下。在輸血後，當 HRSC 被完全地氧化，該氮氧化物被預期係發揮有如一個 SOD 模擬物及其次，一觸酶模擬物之作用。作為一個 SOD 模擬物，其將該超氧化物陰離子歧化成為過氧化氫 (參見式 [2])，且其後可保護對抗內皮中的一氧化氮的破壞以預防血管收縮。作為一個觸酶模擬物，其可經由將過氧化氫轉化成為無害的水而防止過氧化氫毒性。(參見式 [3])。

如上所述，氮氧化物已被共價地結合至血紅素以研究血紅素分子本身的互助型氧氣結合特性。但是，氮氧化物並未被用於其為生理上可相容的穩定化 (也就是交聯的) 或聚合化、包囊化或共軛化血紅素溶液。血紅素及氮氧化物之已知的化學暗示，可以藉由選擇一位在血紅素上且未被用來穩定化、聚合化、或共軛化血紅素分子之特殊化合物所堵塞的可用位置，來進行其已被化學地交聯或經由重組技術而交聯的血紅素之類似的氮氧化物標識。由於某些下列所述的穩定化及聚合化形式之血紅素，目前已涉及臨床試驗，在下面實施例 I、II 及 III 中詳細說明氮氧化物至此等穩定化及聚合化之以血紅素為主的氧載體之接合，俾以驗證本發明的氧氣解毒功能適用於現有的血紅素溶液。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明( )

## 實施例 1 --供 HBOC 之用的氮氧化物-標識的容器及過濾器

本發明在不化學地修飾現有的 HBOC 溶液內之血紅素下，可對此等配方提供本發明之氧氣解毒功能。藉由將氮氧化物共價地接合至一內儲有 HBOC 的容器之內部表面，在現有的配方中所觀察到的，由氧氣毒性所引起的不利生理作用，可為本發明減緩之。

與含血紅素溶液(其為本發明之標的)一起使用的容器必需是生理上可相容的，且具有類似於靜脈流體所使用的容器之性質。典型地，玻璃或一生物可相容的塑膠是合適的。關於本發明的實施例，其中一靜脈溶液被置放於一容器內歷時一段時間，該容器必須是無氧的且可被密封以排除氧。對一玻璃容器而言，一傳統的塞子或封閉裝置即足夠了。但是，一些現今可用的可撓性塑膠容器係為氧可通透的。在此情況下，一鋁箔外包裝紙或其他的密封機構可被使用以防止氧與溶液中的血紅素接觸。

為將氮氧化物施用至一容器的內部表面上，將一氮氧化物聚合物或一添加有氮氧化物的共聚物之一未瀝濾層直接塗覆於該內部表面。含氮氧化物聚合物可藉由許多依據一般已知的原理或聚合反應之技術，來進行製造，只要該自由基的穩定性在該聚合反應程序中可被保持之。

又，一個 HBOC 容器的內部可被修飾成含有一可與一氮氧化物結合的物質之一塗層，諸如其可與一氮氧化物之酮或醛基起反應而形成穩定的脞衍生物之親水性醯肼基團。該塗覆反應是直接進行的。例如，配於 pH 5.0 之乙酸緩衝

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

頁

## 五、發明說明 ( )

液中的氮氧化物(100mM)被加入至一醱肝活化的塑膠容器內以促進一脘鍵結之形成。

當製備好該容器後，予以加入一生理上可相容的溶液。此溶液可為一穩定化及純化的HBOC或此處所揭露的HRCS，但亦包含任一想要與血紅素共輸血的靜脈膠態或晶體溶液。該溶液而後被保持在一大體上無氧的環境內。

除了處理一容器的內部表面外，一具有一活塞(luer)鎖入口及出口且含有一可使氮氧化物固定於其上的膠質或基質之過濾器型藥室，當血紅素溶液流經該藥室時，可被使用以去除具有活性之氧氣衍生的反應性物種。在這些應用中，於輸送之前，氮氧化物可被結合至一軟性或硬性凝膠基質上，藉此發揮大體上有如一無菌的管線內過濾器之作用。各種將小型配位子(諸如氮氧化物)接合至一固體基質上之方法，係為親和力層析技術中已詳知者，就如用以化學地修飾玻璃及塑膠表面之該等技術一樣。其與無菌溶液係為可相容的數種型式的基質，已知包含有瓊脂糖凝膠、以聚甌為主的物質、乳膠等等。

在該過濾器藥室方法中，該固體基質被共價地連接以一氮氧化物，且被包含在一過濾器殼罩或是其它類似裝置中，俾使一血紅素溶液可流經該裝置，並與氮氧化物接觸，並同時被輸入至一病人體內。一實用的方法是使用一般可得的活化瓊脂糖凝膠作為基質，並將該膠質裝入一無菌具活塞鎖藥室內。該藥室接而只要在一含有血紅素的溶液之輸血期間，被插入至在流體投藥線上即可。在實施上，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明( )

可利用各種已知的結構，來提供其包含該過濾器殼罩之結構，其中該氮氧化物及血紅素流經該殼罩。例如參照第7圖，殼罩1含有一氮氧化物-標識的瓊脂糖凝膠。例如，一4-溴-乙醯胺基-TEMPO標識的 $\omega$ -胺基己基-瓊脂糖(參見第2A圖)，一被偶合以4-胺基-TEMPO之1,4-雙(2,3-環氧基氧丙基)丁烷瓊脂糖(參見第2B圖)。

在輸送的過程中，含有該溶液的靜脈輸送線會被連接至該活塞入口2，以使其進入該殼罩1內，於其中該血紅素溶液會碰到被包含在殼罩內或結合至基質4上的含氮氧化物化合物，於此過程中，該含氮氧化物組成物會被輸入並可能起反應，俾以去除該溶液內與氧有關的毒性物種。該血紅素溶液而後經由活塞出口3流出該藥室，且會被直接輸入病人體內。該4-胺基-TEMPO標識的環氧基-瓊脂糖之電子旋轉共振被示於第2A圖中。此外，一 $\omega$ -胺基己基-瓊脂糖可與4-(2-溴乙醯胺基)-TEMPO起反應而形成TEMPO標識的瓊脂。其電子旋轉共振光譜示於第2B圖中。另一選擇是經由一羧醯胺鍵結將4-羧基-TEMPO接合至具有碳化二亞胺的胺基-瓊脂糖上。相反的，該4-胺基-TEMPO可容易地經由使用碳化二亞胺，例如1-乙基-3-(3-二甲基胺基-丙基)碳化二亞胺，而被偶合至位在瓊脂糖上的羧基基團。

標識有4-胺基-TEMPO的藥室之製備如下：在室溫下令配於乳酸林格氏液內的100mM 4-胺基-TEMPO (Sigma Chem. Co.)循環流經一醛AvidChrom Cartridge (Unisyn Tech. Inc.)歷時1小時，而後以氫基氫化硼鈉予以還原歷時6小

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

頁

## 五、發明說明 ( )

時。該藥室殼罩的內部以乳酸林格氏液予以徹底地清洗。

標識有3-胺基-PROXYL的藥室，亦可依據上述方法，藉由以3-胺基-PROXYL取代4-胺基-TEMPO，被類似地製備之。

## 實施例2--氮氧化物-標識的穩定化血紅素

為防止血紅素分解成其組份次單元，血紅素分子經由其次單元之化學或是重組交聯而被分子內穩定化。在此所稱“穩定化”血紅素是描述其經由化學或重組交聯而被穩定化的血紅素單體，且亦描述二聚體、三聚體或是較大的寡聚物，其等之組份血紅素分子藉由使用環糊精及其硫酸化衍生物之交聯而被穩定化。

將氮氧化物接合至穩定化血紅素之一較佳技術是，藉由將該氮氧化物共價地接合至穩定化血紅素的兩個 $\beta$ 鏈的 $\beta$ -93巰基上。雖然在 $\beta$ -93位置處之專一性標識，已在天然的人類血紅素上就空間結構的研究而被證實了[參見McConnell等人之回顧論文，*Quart. Rev. Biophys.* 3:91 (1970)]，此種交聯的血紅蛋白之專一性標識未曾被報導過。如上所提的，已發展出數種形式之以血紅素為主的氧載體，其經由與DBBF、雙阿斯匹靈交聯的血紅素以及被 $\alpha$ -棉子糖穩定化或寡聚化的血紅素之化學交聯而被穩定之。

在本案發明人之美國專利第4,857,626號中所描述的開環糖產生多價醛，該多價醛係衍生自雙糖、寡糖或，較佳地，諸如 $\alpha$ -棉子糖之三糖。這些化合物之功能為可提供分子內的穩定化(交聯)及分子間的聚合化。藉由控制揭露

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

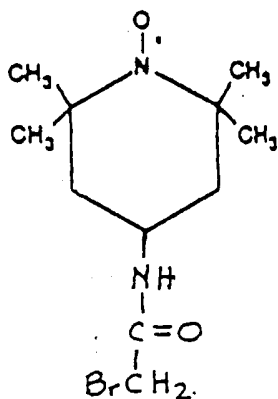
訂

## 五、發明說明( )

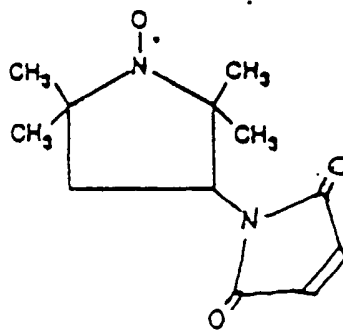
於本案發明人之先前專利中的反應，該多價醛可被用來產生如上所界定的“穩定化”血紅素而不需要聚合化。在另一例中，一氮氧化物可被共價地接合至穩定化血紅素或聚合化血紅素。因此，其使用多價醛而被穩定化之以血紅素為主的溶液，在本發明的實施例中被認為是一“穩定化”血紅素，並在其後的實施例被以為是一聚合化血紅素。

為證實經化學修飾的血紅素之 $\beta$ -93位置對於氮氧化物的接合，並未造成其立體上的不可接近性，展現出的結果確認了一氮氧化物可被共價地接合至DBBF-Hb的 $\beta$ -93位置處。

在此實施例中，DBBF-Hb與二種形式的氮氧化物(TEMPO及PROXYL)反應，該二種氮氧化物含有兩種形式的巰基專一性功能基團並且具有下列結構式：



4-(2-溴乙醯胺基)-TEMPO



3-馬來醯亞胺基-PROXYL

DBBF-Hb之製備係藉由已知的技術，將溶液內的純化的去氧化血紅素交聯以雙(3,5-二溴甲砂基)反式丁烯二酸

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( )

，且所得的產物藉由管柱層析法予以純化之。3-馬來醯亞胺基(2,2,5,5-四甲基吡咯烷-N-烴氧基)[3-馬來醯亞胺基-PROXYL]之共價接合，藉由使用甲醇作為載體溶劑，在一濃度為約100mM 3-馬來醯亞胺基-PROXYL之下，將2莫耳當量的此氮氧化物加入至配於乳酸林格氏液內之1ml的濃度為約8g/dl之DBBF-Hb中，而予以完成。容許DBBF-Hb在22-23℃下反應30分鐘，並予以攪拌之。該交聯的程度是可由未反應的氮氧化物之電子旋轉共振信號強度的消失而加以估計。為去除未反應的氮氧化物，該反應混合物使用一具一30Kd截留值表稱分子量限制(NMWL)聚乙撐基砜(PES)膜(Filtron Technology Co.)的Filtron stire室，以10倍過量體積的乳酸林格氏液予以清洗3次。該氮氧化物-標識類似地標識之DBBF-Hb的電子旋轉共振光譜顯示於第3B圖的血紅素之電子旋轉共振測量是以一Bruker ESR光譜儀予以記錄之。第3B圖顯示3-馬來醯亞胺-PROXYL標識的DBBF-Hb之電子旋轉共振光譜。其被4-(2-溴乙醯胺基)-TEMPO類似地標識之DBBF-Hb的電子旋轉共振光譜顯示於第3A圖中。

在本實施例中，氮氧化物被共價地鍵結至位在血紅素的二個 $\beta$ 鏈上之單獨的巰基處。因此，在99.00%去氧-血紅素下，該氮氧化物對血紅素-結合的氧氣比為大約200:1，蓋因有二個氮氧化物被接合至該血紅素的二個 $\beta$ 鏈上。但是，在輸血後，該去氧化的HRCs收集位在肺中的氧，而在100%的氧氣化下，該氮氧化物對血紅素-結合氧氣比變成約1:2，因為有四個氧分子被結合至該血紅素的四個球

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( )

蛋白鏈上，而該二個氮氧化物留在該 $\beta$ 球蛋白鏈上。

使用一為1:2的血紅素對氮氧化物比，高於99%的氮氧化物會被共價地接合至該DBBF-Hb上。DBBF-Hb亦可被標識以一個位於3-馬來醯亞胺與PROXYL部分之間的間隔子基團(例如一額外的甲基)(亦即3-馬來醯亞胺甲基-PROXYL)，其會展現出一類似於第3B圖的共振光譜。值得注意的是，其他的氮氧化物可被共價地接合至DPG結合位中的特定胺基(例如 $\beta$ -Val-1、 $\beta$ -Lys-82及 $\alpha$ -Lys-99)，或可被接合至血紅素上其餘的40-plus表面離胺酸 $\epsilon$ -胺基。該TEMPO及PROXYL氮氧化物的異氰酸衍生物亦可與胺基起反應。例如，4-異氰酸-TEMPO可在一莫耳比約為10:1下被加入至血紅素中。在其它位置處被標識以該氮氧化物的血紅素之共振光譜(未示出)亦是類似於第3A圖至中所示者。

將氮氧化物接合至DBBF-Hb的數個位置上之能力暗示了，被 $\alpha$ 球蛋白二聚體所穩定化的重組型血紅素[D. Loker et al., Nature 356:258 (1992)]，可被類似地標識以氮氧化物。製備一氮氧化物-標識的交聯劑(例如TEMPO標識的琥珀酸)之一DBBF類似物，亦是可能的(參見美國專利第4,240,797號)。

實施例3--穩定化血紅素的氮氧化物-標識的聚合物

雖然從交聯的單體來製造穩定化血紅素之二聚物是可行的，由穩定化或自然的血紅素產生血紅素聚合物亦是可能的。血紅素聚合物的溶液含有由單體、二聚物、三聚物、四聚物或其它寡聚體所構成之一混合物。被用來作為一

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明( )

HBOC之含有聚合化血紅素的溶液通常具有較長的血漿循環時間，且與穩定化單體血紅素相較，具有較高的攜氧能力。該聚合化血紅素是可利用許多的途徑使用不同的聚合化試劑予以製備而得(參見美國專利第4,001,200、4,857,636及4,826,811號)。將一氮氧化物引入至聚合化血紅素之一溶液內的較佳方法係藉由將一氮氧化物共價接合至該血紅素的二個 $\beta$ 球蛋白鏈之 $\beta$ -93巰基上。該等巰基尚未知是否涉及穩定化或是聚合過程。是故，最好是在血紅素單體的穩定化及聚合化之前，將氮氧化物共價地接合至血紅素。

例如，依據上述在第二實施例所述的步驟，氮氧化物被共價地接合至DBBF-Hb上，而後依據授予Sehgal等人之美國專利第4,826,811號中所述的步驟，利用戊二醛將之聚合化。第4B圖為以3-馬來醯亞胺-PROXYL標識且以戊二醛聚合化的DBBF-Hb之電子旋轉共振光譜。同樣地，其被戊二醛聚合化的DBBF-Hb亦可以相同方式被標識以4-(2-溴乙醯胺基)-TEMPO作標識。

使用一相同的方法，一含有未反應的醛基之聚合化血紅素中間產物，例如一種戊二醛-聚合化或是 $\alpha$ -棉子糖-聚合化的血紅素中間產物，可經由還原性胺化反應被用來與4-胺基-TEMPO或3-胺基-PROXYL共價接合，俾以產生氮氧化物-標識的血紅素聚合物。關於該還原性胺化反應，該反應的順序以及時間是十分重要的。該4-胺基-TEMPO是在聚合化反應完全後，但在可造成該氮氧化物共價接合至聚

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明( )

合化血紅素的還原反應之前，被加入至戊二醛-聚合化血紅素中。同樣的， $\alpha$ -棉子糖聚合化血紅素的氮氧化物標識可在還原性胺化反應之前，藉由加入4-胺基-TEMPO或是3-胺基-PROXYL而予以完成。例如，4-胺基-TEMPO標識的 $\alpha$ -棉子糖聚合化血紅素是依據本案發明人之美國專利第4,857,636號所述的步驟而予以製備的，只除了在聚合化反應完成後，並在使用20莫耳過量的二甲基胺硼複合體之還原反應之前，將6莫耳當量的4-胺基-TEMPO加入之。如此處所述的，血紅素可藉由從雙糖或是開環的糖(包含寡糖，或以諸如 $\alpha$ -棉子糖的三糖為佳)所衍生的多價醛基予以交聯化及聚合化。同樣地，單糖亦可被用來穩定化及聚合化血紅素，雖然較高分子量的糖是較佳的。一經透稀及清洗過之被標識以4-胺基-TEMPO的 $\alpha$ -棉子糖聚合化血紅素之共振光譜是顯示於第4A圖。

## 實施例4 -- 氮氧化物-標識的脂質體-包裹化血紅素

脂質體係為由兩性分子之聚集以形成一呈中空球體形式的雙層結構而被形成的顆粒體，以其極性處對面一內部水區域以及外側大量的水。數種用以形成脂質體之可接受的方法係為此技藝中已知者。典型地，像二棕櫚醯磷脂醯膽鹼之分子在水溶液中形成脂質體。脂質體可用膽固醇來配製以增加穩定性，且可包含其它物質，如中性脂質以及表面修飾劑(例如正電荷或是負電荷化合物)。較佳的脂質體是小型單薄板式雙層(unilamellar-bilayered)球形殼體。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

食

## 五、發明說明 ( )

亦已知一種用以將血紅素包囊化在一脂質體內的方法 (Farmer et al., 美國專利第4,911,921號)。為達本發明之目的，許多方法可被用來將以氮氧化物為主的氧氣解毒功能引入一脂質體-包囊化血紅素溶液中。例如，可以使用氮氧化物-標識的天然血紅素或一如上所述的氮氧化物-標識的穩定化血紅素作為起始物質，而後藉由習知技術來進行該氮氧化物-標識的血紅素之脂質體包囊化。在本實施例中，純化的血紅素亦可與一膜不可通透的氮氧化物，如在Hsia等人之美國專利第4,235,792號中對一旋轉膜免疫分析所揭露之TEMPO-膽鹼氮氧化物，一起被包囊化。

又，任一純化的血紅素可以一由氮氧化物-標識的脂肪酸 (例如7-DOXPL-硬脂酸、12-DOXYL-硬脂酸及16-DOXYL-硬脂酸酯)、膽甾烷、一膽固醇類似物 (例如3-DOXYL-膽甾烷) 或磷脂質 (例如12-DOXYL-硬脂酸-標識的磷脂醯膽鹼) 所構成的脂質體予以包囊化。可利用一類似於在Tabushi等人 [J. Am. Soc. 106:219 (1984)] 所述之方法，來製備被一由3-DOXYL-膽甾烷標識物所構成的脂質體所包囊化的血紅素。如下所載明的，一為5ml的含有脂質組成物 (包含DOXYL標識的硬脂酸和/或膽甾烷) 的氯仿溶液，首先在氮氣流中將之乾燥以去除溶劑。而後，該殘餘物予以真空乾燥，並將所形成的薄膜再散浮於2ml的配於乳酸化林格氏液內之血紅素 (24g/dl) 中。該分散液內的脂質濃度係為100 mM。該脂質體包囊化血紅素而後被旋轉且，較佳地，被培育於37℃下直至所有的脂質被分散以形成多重薄板式載體

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( )

。而後，所形成的含有多薄板式脂質體包囊化血紅素及自由的未包囊化血紅素之溶液，依據Cook等人的程序(參見美國專利第4,533,254號)，迫使其流經一微流動床以形成0.2微米脂質體。位在該脂質體內的二棕櫚醯磷脂醯膽鹼：膽固醇：二棕櫚醯磷脂酸：3-DOXYL-膽甾烷的比例係為0.5：0.4：0.02：0.07。所形成的3-DOXYL-膽甾烷標識的脂質體-包囊化血紅素之共振光譜被示於第5A圖。在此構形中，該氮氧化物被插入在該脂質體膜上，且在該脂質體的雙層水交界之內表面及外表面處皆可發現之。以16-DOXYL硬脂酸來取代第5A圖中所示的脂質組成物內之3-DOXYL-膽甾烷，會形成於第5B圖所示的電子共振光譜。由共振光譜所反映出的氮氧化物之移動性，與該硬脂酸的DOXYL-部份主要是位在該脂質雙層物的疏水性內部之解釋相符。以相同的莫耳比例將3-DOXYL膽甾烷及16-DOXYL硬脂酸加入該脂質組成物中，該雙重氮氧化物-標識的脂質體包囊化血紅素之共振光譜被示於第5C圖中。第5C圖的共振光譜是第5A及5B圖的複合體，因為在此實施例中的氮氧化物是位在該膜-水交界處及其疏水性脂質雙層內部。藉由將氮氧化物置於該二位置，此實施例在該脂質雙層疏水性內部與膜-水交界處提供氧氣解毒功能，因此對該包囊化血紅素提供氧氣解毒能力之一額外保留的附加利益。

## 實施例5 --氮氧化物-標識的共軛化血紅素

一由共軛化血紅素所構成之生理上可相容的溶液之製備係藉由形成一由血紅素及一被用作為血漿膨脹劑之生物

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( )

可相容的巨分子之共軛物。血漿膨脹劑，例如葡聚糖(Dx)、聚環氧乙烷(POE)、羥乙基澱粉(HES)，被用來增加血紅素在身體內的循環半衰期。在此狀態中，血紅素分子和該生物可相容的巨分子一起被共同地稱之為血紅素共軛物。有許多方便的方法可將一氮氧化物併入至一血紅素共軛物內。例如，有一個方法是簡單地以一氮氧化物-標識的血紅素(例如TEMPO-PROXYL標識的DBBF-Hb)來取代欲予以共軛化的血紅素。這可藉由在共軛化血紅素之製備中，以3-馬來醯亞胺-PROXYL-DBBF-Hb或4-(2-溴乙醯胺基)-TEMPO-DBBF-Hb來取代血紅素或吡哆醛基化血紅素，而被完成之。

4-胺基-TEMPO標識的葡聚糖共軛化血紅素係依據Tam et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 73:2128 (1976))所述的步驟而予以製備的。初始時，一配於0.15M NaCl及5mM磷酸緩衝液(pH 7.4)內之8%血紅素溶液被共軛化至過碘酸-氧化的葡聚糖以形成一席夫鹼(Schiff-base)中間產物。20莫耳當量的4-胺基-TEMPO被加入至血紅素中以便在氮氧化物以及位在該葡聚糖上之其餘的反應性醛基團之間形成席夫鹼。在4℃下培育30分鐘後，一為50莫耳當量且配於水內之二甲基胺硼烷被加入之。該溶液在4℃下再予以培育另2個小時。此後，該溶液被透析，以乳酸化林格氏緩衝液予以重建，並使用Filtron膜過濾單位(Filtron Technology Co.)予以無菌過濾處理。該4-胺基-TEMPO標識的葡聚糖-共軛化血紅素的電子旋轉共振光譜為非常不對稱的三條，這反映其具有一高度的移動自由度(參見第6

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 34 )

圖)。被共價地接合至葡聚糖的該TEMPO之增加的移動度，相較於一緊密摺疊的血紅素分子，之移動度相比較，相符於被鍵結至一可撓性聚醣葡聚糖鏈之氮氧化物(參見第3A及3B圖)。因此，第6圖之共振光譜證實一新穎的氮氧化物-標識的葡聚糖共軛化血紅素已被製備出。

雖然，本發明已藉由如上所述之特殊的實施例來加以說明，由於生理上可相容的血紅素之各種形式以及穩定的氮氧化物-自由基金團的結構歧異性，可以做出許多依據上述實施例的變化，且如下申請專利範圍所述的，未有逸脫出本發明之基本精神。

### 元件標號對照表

|   |      |   |      |
|---|------|---|------|
| 1 | 殼罩   | 2 | 活塞入口 |
| 3 | 活塞出口 | 4 | 基質   |

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

水

四、中文發明摘要(發明之名稱： 使用氮氧化物來防止作為紅血球代用品 )  
的血紅素，特別是穩定化、聚合化、共  
軛化或包囊化的血紅素之氧中毒的組成  
物及方法

本發明根據將氮氧化物加入至生理上可相容的溶液內而揭露了可用來減輕氧中毒之組成物及方法。特別是，本發明中所述的以血紅素為主的紅血球代用品，其特徵在於具有穩定的氮氧化物自由基以供無細胞的血紅素溶液、包囊化血紅素溶液、穩定化血紅素溶液、聚合化血紅素溶液和共軛化血紅素溶液之用。本發明中所述之氮氧化物-結合的血紅素展現出紅血球細胞的攜氧及氧解毒功能。

英文發明摘要(發明之名稱：COMPOSITIONS AND METHODS UTILIZING NITROXIDES TO AVOID OXYGEN TOXICITY, PARTICULARLY IN STABILIZED, POLYMERIZED, CONJUGATED, OR ENCAPSULATED HEMOGLOBIN USED AS A RED CELL SUBSTITUTE)

Compositions and processes to alleviate oxygen toxicity are disclosed based on the addition of nitroxides to physiologically compatible solutions. In particular, hemoglobin-based red cell substitutes are described featuring stable nitroxide free radicals for use in cell-free hemoglobin solutions, encapsulated hemoglobin solutions, stabilized hemoglobin solutions, polymerized hemoglobin solutions and conjugated hemoglobin solutions. The nitroxide-bound hemoglobin and other formulation solutions described herein exhibit both the oxygen carrying and oxygen detoxification capacities of the red blood cells.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

## 六、申請專利範圍

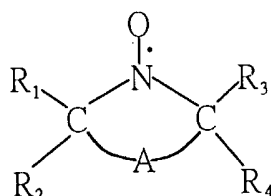
第82107408號專利再審查案申請專利範圍修正本

修正日期：87年10月

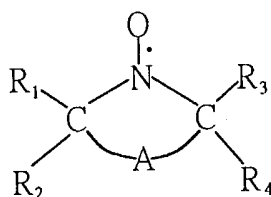
1. 一種紅血球替代物，其包含有：

配於一種生理上可相容的溶液內之穩定化血紅素，及

一種被共價地結合至該經穩定化血紅素之氮氧化物，其中該氮氧化物具有如下結構：



其中R<sub>1</sub>至R<sub>2</sub>分別為一個具有1至4個碳原子的烷基，R<sub>3</sub>至R<sub>4</sub>分別為H或一個具有1至4個碳原子的烷基，而A為一個5-員環之剩下的成員，A為未取代的或經取代的；或其中該氮氧化物具有如下結構：



其中R<sub>1</sub>至R<sub>2</sub>分別為一個具有1至4個碳原子的烷基，R<sub>3</sub>至R<sub>4</sub>分別為H或一個具有1至4個碳原子的烷基，而A為一個6-員環之剩下的成員，A為未取代的或經取代的。

2. 如申請專利範圍第1項之紅血球替代物，其中該血紅素係藉由交聯而被穩定化。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

表

訂



## 六、申請專利範圍

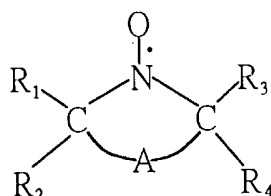
第82107408號專利再審查案申請專利範圍修正本

修正日期：87年10月

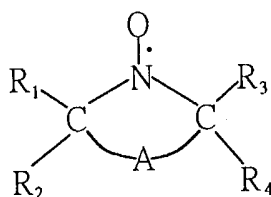
1. 一種紅血球替代物，其包含有：

配於一種生理上可相容的溶液內之穩定化血紅素，及

一種被共價地結合至該經穩定化血紅素之氮氧化物，其中該氮氧化物具有如下結構：



其中R<sub>1</sub>至R<sub>2</sub>分別為一個具有1至4個碳原子的烷基，R<sub>3</sub>至R<sub>4</sub>分別為H或一個具有1至4個碳原子的烷基，而A為一個5-員環之剩下的成員，A為未取代的或經取代的；或其中該氮氧化物具有如下結構：



其中R<sub>1</sub>至R<sub>2</sub>分別為一個具有1至4個碳原子的烷基，R<sub>3</sub>至R<sub>4</sub>分別為H或一個具有1至4個碳原子的烷基，而A為一個6-員環之剩下的成員，A為未取代的或經取代的。

2. 如申請專利範圍第1項之紅血球替代物，其中該血紅素係藉由交聯而被穩定化。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

表

訂

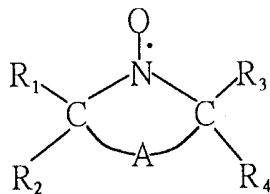


## 六、申請專利範圍

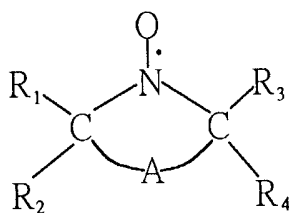
3. 如申請專利範圍第2項之紅血球替代物，其中該血紅素係為重組型。
4. 如申請專利範圍第2項之紅血球替代物，其中該血紅素係藉由一衍生自一開環線形糖的多價醛而被穩定化。
5. 如申請專利範圍第2項之紅血球替代物，其中該血紅素係藉由一衍生自一開環環形糖的多價醛而被穩定化。
6. 如申請專利範圍第2項之紅血球替代物，其中該經交鏈的血紅素係包含一衍生自一開環環形糖之陰離子性衍生物的多價醛。
7. 如申請專利範圍第2項之紅血球替代物，其中該氮氧化物之一個丁二酸衍生物被用來當作一交聯劑。
8. 如申請專利範圍第1項之紅血球替代物，其中該氮氧化物被共價地結合至血紅素上之一位置上，該位置係選自於由巰基、 $\beta$  93位置與一反應性胺基團所構成的群中。
9. 如申請專利範圍第1至8項中任一項之紅血球替代物，其中該氮氧化物為2,2,5,5-四甲基吡咯烷-N-煙氧基。
10. 如申請專利範圍第1至8項中任一項之紅血球替代物，其中該氮氧化物係為2,2,6,6-四甲基六氫吡啶-N-煙氧基。
11. 一種紅血球替代物，其包含有：  
    配在一生理上可相容的溶液內的穩定化血紅素之一聚合物，以及  
    一種被共價地接合至該經穩定化之血紅素的氮氧

## 六、申請專利範圍

化物，其中該氮氧化物具有如下結構：



其中  $R_1$  至  $R_2$  分別為一個具有 1 至 4 個碳原子的烷基， $R_3$  至  $R_4$  分別為 H 或一個具有 1 至 4 個碳原子的烷基，而 A 為一個 5-員環之剩下的成員，A 為未取代的或經取代的；或其中該氮氧化物具有如下結構：



其中  $R_1$  至  $R_2$  分別為一個具有 1 至 4 個碳原子的烷基， $R_3$  至  $R_4$  分別為 H 或一個具有 1 至 4 個碳原子的烷基，而 A 為一個 6-員環之剩下的成員，A 為未取代的或經取代的。

12. 如申請專利範圍第 11 項之紅血球替代物，其中該血紅素聚合物包含有一衍生自一開環線形糖之多價醛。
13. 如申請專利範圍第 11 項之紅血球替代物，其中該血紅素聚合物包含有一衍生自一開環環形糖之多價醛。
14. 如申請專利範圍第 11 項之紅血球替代物，其中該血紅素聚合物係由一開環環形糖之陰離子性衍生物所構成。

## 六、申請專利範圍

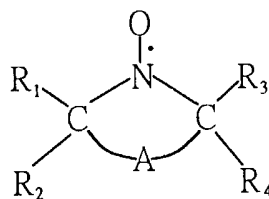
- 15.如申請專利範圍第12項之紅血球替代物，其中該多價醛係為o-棉子糖。
- 16.如申請專利範圍第13項之紅血球替代物，其中該血紅素包含血紅素及戊二醛。
- 17.如申請專利範圍第13項之紅血球替代物，其中氮氧化物被結合至位在戊二醛上之一醛基上。
- 18.如申請專利範圍第11至17項中任一項之紅血球替代物，其中該氮氧化物係為2,2,5,5-四甲基吡咯烷-N-煙氧基。
- 19.如申請專利範圍第11至17項中任一項之紅血球替代物，其中該氮氧化物係為2,2,6,6-四甲基六氫吡啶-N-煙氧基。
- 20.一種用以生成一以血紅素為主的紅血球代用品之方法，其包含下列步驟：

提供一由穩定化血紅素所構的生理上可相容的溶液；

將一氮氧化物共價地結合至該穩定化血紅素上，

將該血紅素溶液儲存在一實質上無氧的環境內，

其中該氮氧化物具有如下結構：



其中R<sub>1</sub>至R<sub>2</sub>分別為一個具有1至4個碳原子的烷基，R<sub>3</sub>至

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

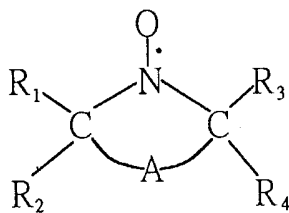
裝

訂

頁

## 六、申請專利範圍

$R_4$ 分別為H或一個具有1至4個碳原子的烷基，而A為一個5-員環之剩下的成員，A為未取代的或經取代的；或其中該氮氧化物具有如下結構：

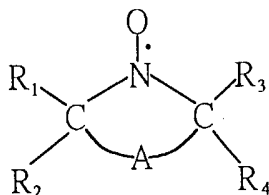


其中 $R_1$ 至 $R_2$ 分別為一個具有1至4個碳原子的烷基， $R_3$ 至 $R_4$ 分別為H或一個具有1至4個碳原子的烷基，而A為一個6-員環之剩下的成員，A為未取代的或經取代的。

- 21.如申請專利範圍第20項之方法，其中該血紅素藉由交聯被穩定化。
- 22.一種用以生成一以血紅素為主的紅血球代用品之方法，其包含下列步驟：

提供一種生理上可相容的脂質體及一種氮氧化物，

將該血紅素包囊在該脂質體內，其中該氮氧化物具有如下結構：



其中 $R_1$ 至 $R_2$ 分別為一個具有1至4個碳原子的烷基， $R_3$ 至

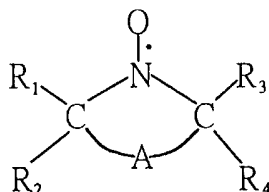
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

訂

## 六、申請專利範圍

$R_4$ 分別為H或一個具有1至4個碳原子的烷基，而A為一個5-員環之剩下的成員，A為未取代的或經取代的；或其中該氮氧化物具有如下結構：



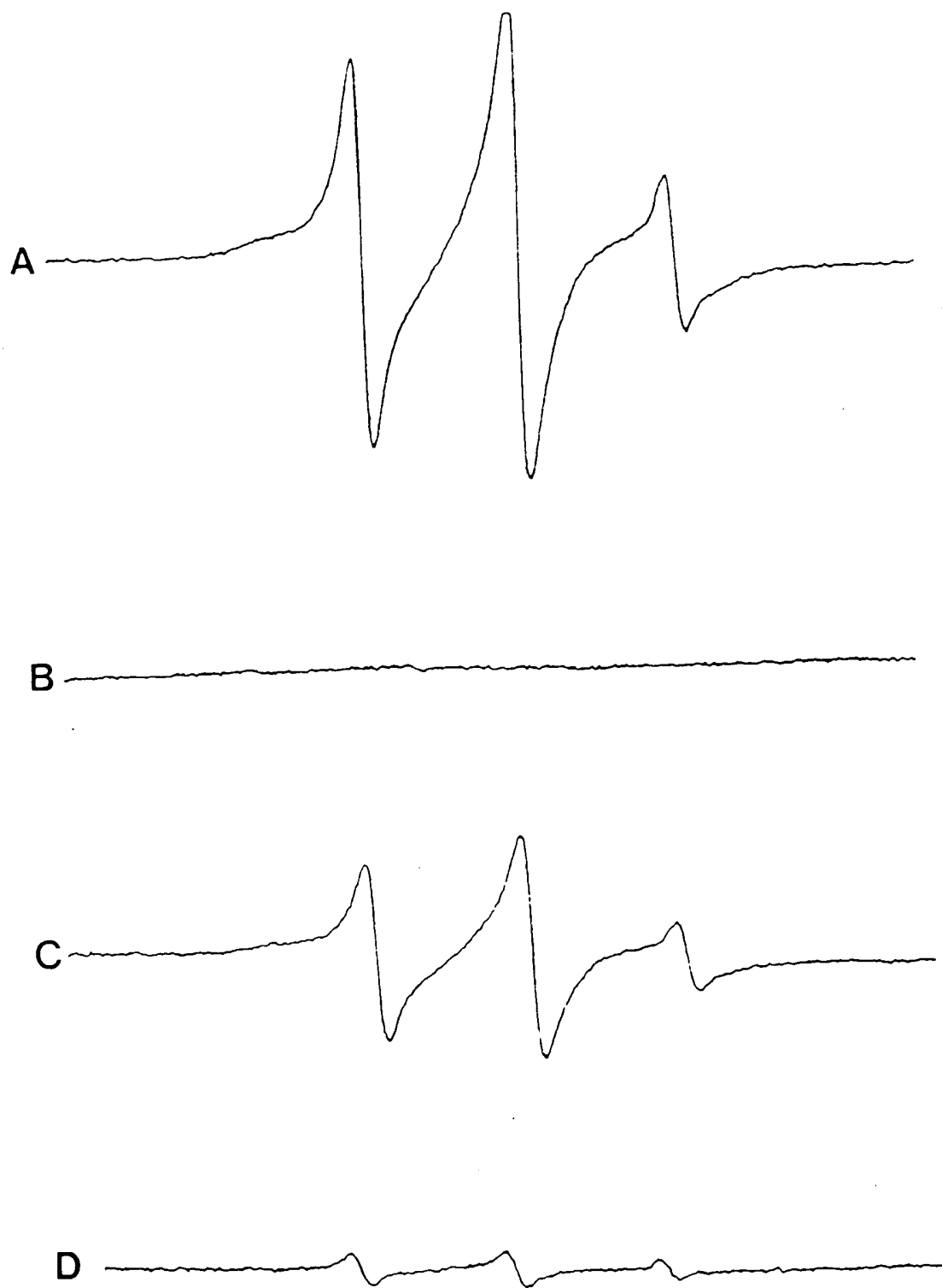
其中 $R_1$ 至 $R_2$ 分別為一個具有1至4個碳原子的烷基， $R_3$ 至 $R_4$ 分別為H或一個具有1至4個碳原子的烷基，而A為一個6-員環之剩下的成員，A為未取代的或經取代的。

- 23.如申請專利範圍第22項之方法，其中氮氧化物被插入在該脂質體膜中。
- 24.如申請專利範圍第22項之方法，其中該氮氧化物係為膜可通透的。
- 25.如申請專利範圍第22項之方法，其中該脂質體係由一種氮氧化物-標識的脂肪酸所構成的。
- 26.如申請專利範圍第22項之方法，其中該脂質體係由一種氮氧化物-標識的膽甾烷所構成的。
- 27.如申請專利範圍第22項之方法，其中該脂質體係由一種氮氧化物-標識的磷脂質所構成的。

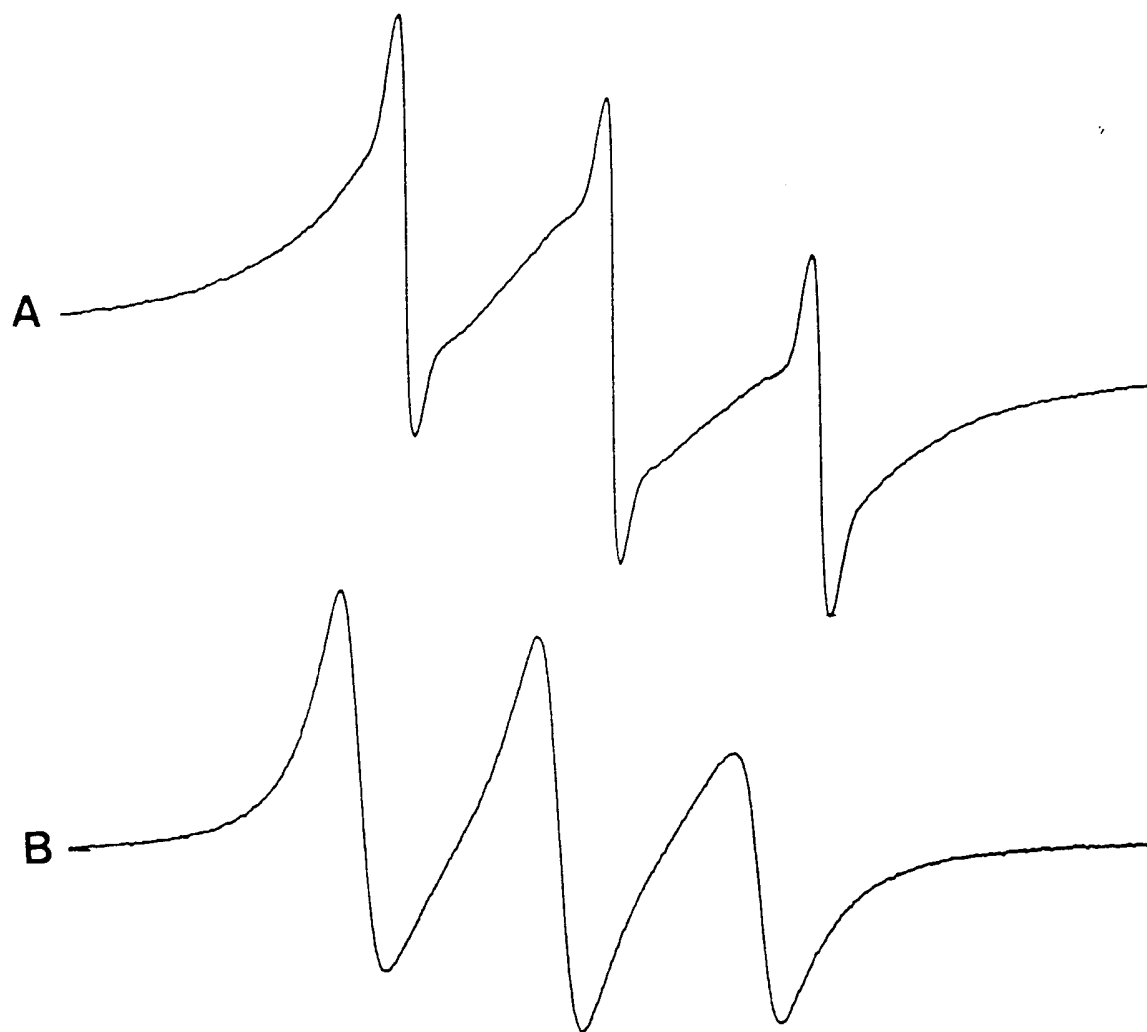
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

☆

訂

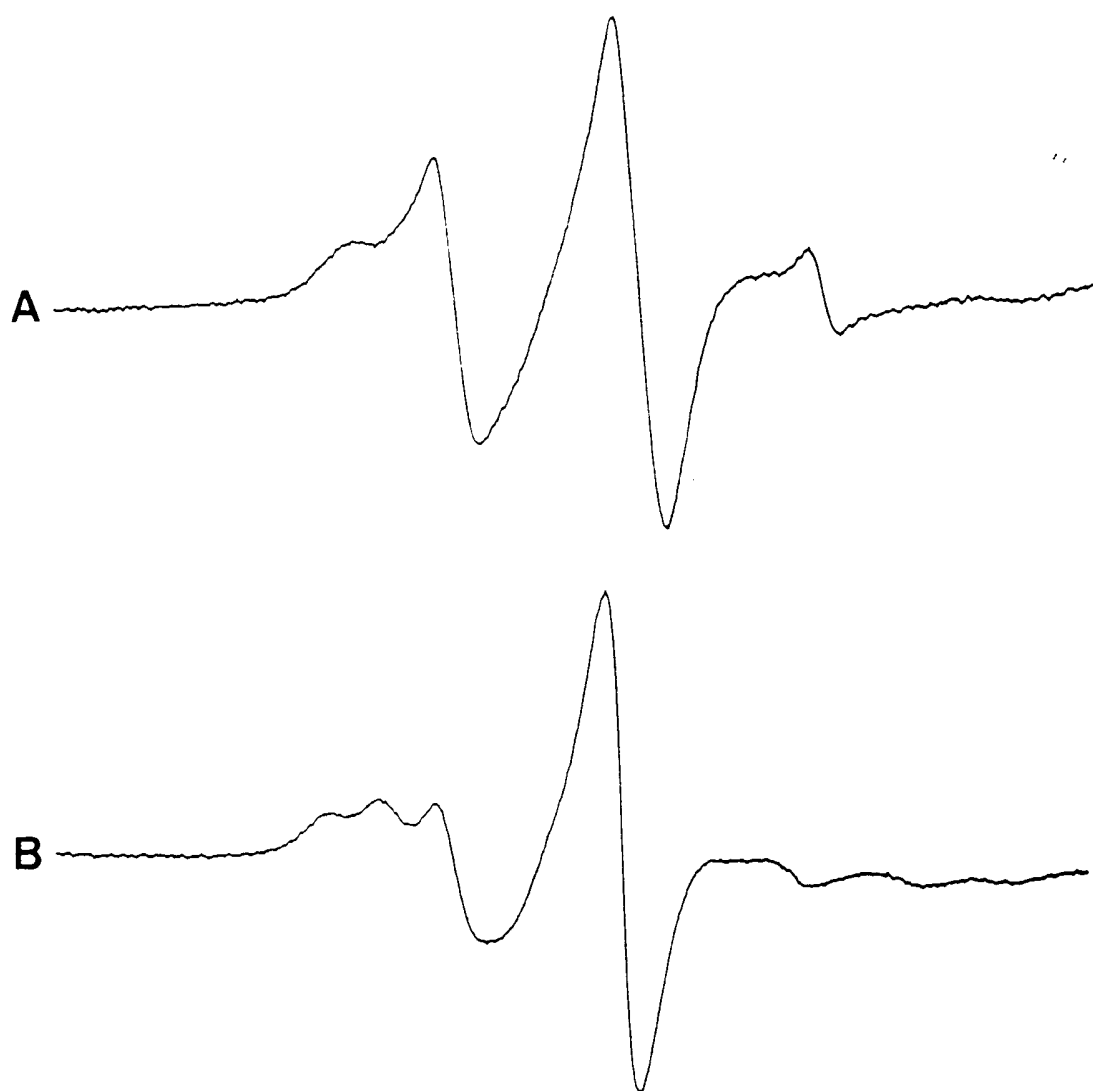


第 1 圖



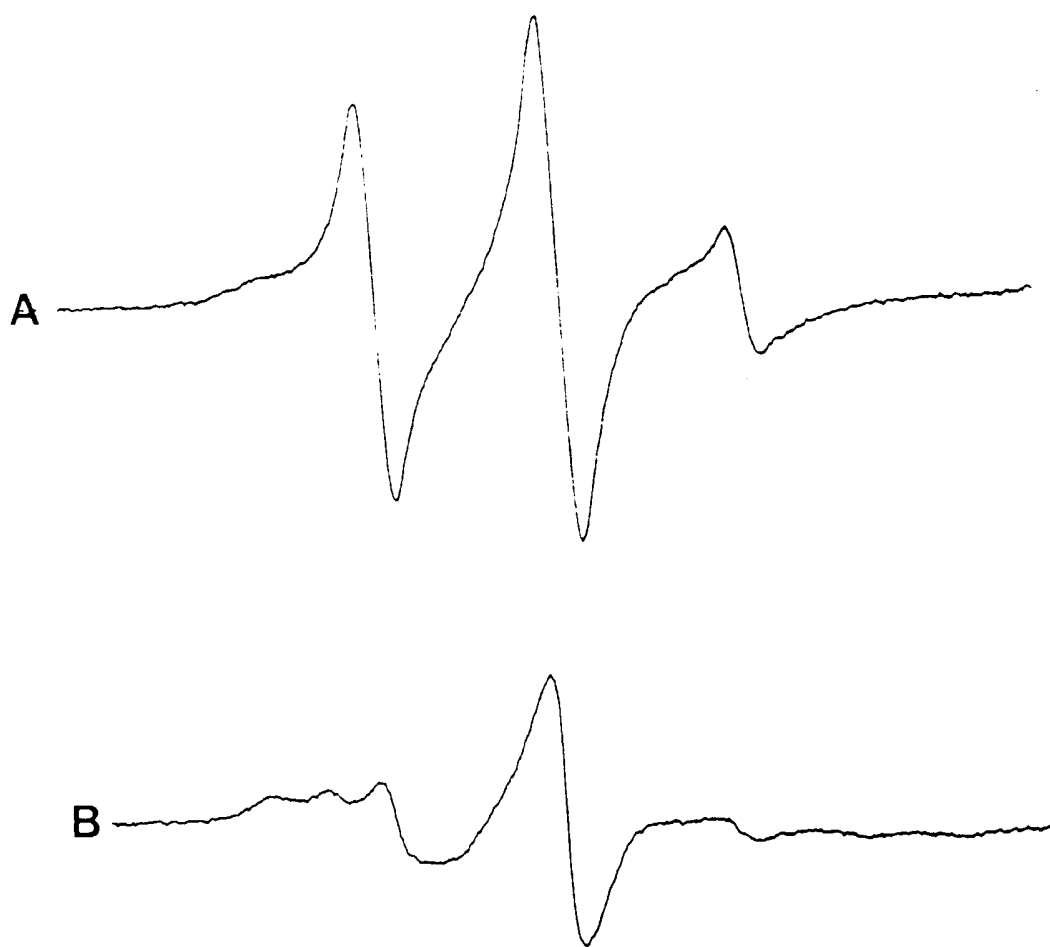
第 2 圖

381022



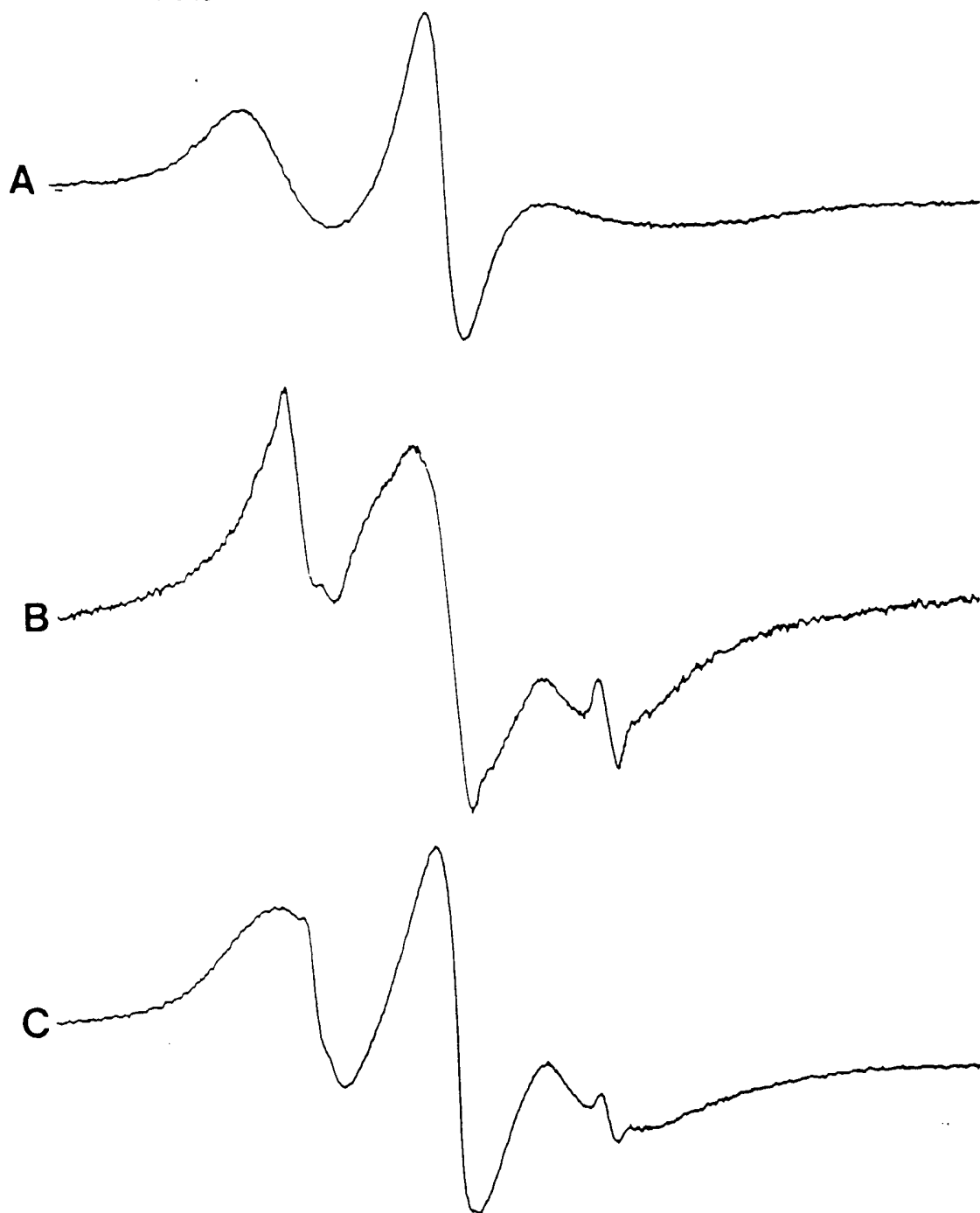
第 3 圖

381023



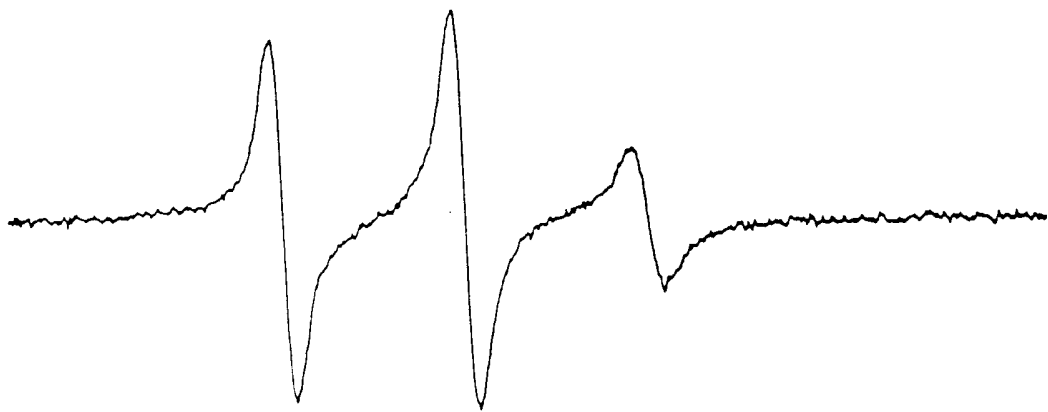
第 4 圖

381023



第 5 圖

381022



第 6 圖