



[12] 发明专利申请公开说明书

A61K 35/18

G01N 33/72

C07K 3/20

[11] CN 86 1 04458 A

[43] 公开日 1987年7月1日

[21] 申请号 86 1 04458

[22] 申请日 86.6.26

[30] 优先权

[32] 85.6.26 [33] 加拿大 [31] 485.392

[71] 申请人 希莫索尔公司

地址 加拿大安大略省

[72] 发明人 夏仁长

[74] 专利代理机构 中国专利代理有限公司

代理人 王 巍

[54] 发明名称 以亲和层析法纯化血红蛋白及改良血红蛋白

[57] 摘要

本发明揭示有关一种借亲和层析法 (affinity chromatography) 技术纯化血红蛋白之方法。与目前所相信的相反, 氧及选择的多元阴离子与血红蛋白之束缚并非互相独占的。新颖的方法包括制动一多元阴离子, 它是特别的经其多元阴离子束缚处束缚血红蛋白于一层析的凝胶, 且经由凝胶把含溶液或混合物之血红蛋白传送。因此, 血红蛋白被保留在凝胶中, 而杂质从凝胶洗提出。此新颖方法亦可用于由一液体反应混合物含改良血红蛋白及未改良血红蛋白, 把未改良血红蛋白分离出来。

1. 一种由含(氧)血红蛋白溶液或混合物隔离(氧)血红蛋白之方法, 包括:

(a) 制动一多元阴离子特定的束缚血红蛋白经由其多元阴离子束缚处于一层析的凝胶; 及

(b) 经由凝胶传送该含(氧)血红蛋白溶液或混合物, 其中该(氧)血红蛋白保留于凝胶上, 而同时溶液或混合之其他成份被洗提(eluted)。

2. 一种由(氧)血红蛋白溶液或混合物隔离(氧)血红蛋白之方法, 包括:

(a) 提供一层析的凝胶它具有一制动多元阴离子, 特定的经由其多元阴离子束缚处束缚血红蛋白; 及

(b) 经由凝胶传送含(氧)血红蛋白溶液或混合物, 其中(氧)血红蛋白是选择上保留于凝胶上, 而同时其他成份经由此传送。

3. 如权利要求第1项或第2项所述之方法, 其中该多元阴离子由下列所选择, 包括核苷三磷酸盐(nucleoside triphosphate), 1,3-二磷酸甘油酸盐(diphosphoglycerate), 一肌醇磷酸盐及一肌醇硫酸盐(inositol sulphate)。

4. 如权利要求前项所述之方法, 其中该层析的凝胶是由下列所选择, 包括了交联聚蔗糖凝胶(cross linked polysaccharide gels)及硅胶(silica gel)。

5. 如权利要求前项所述之方法, 其中该多元阴离子是藉一疏水性化学空间群连接至层析的凝胶。

6. 如权利要求第5项所述之方法, 其中该空间群是由下列之剂类选择, 包括己二酸(adipic acid), 二氨基己烷及己二酸二肼(adipic acid dihydrazine)。

7. 如权利要求前项所述之方法, 其中该多元阴离子是三磷酸腺苷

(adenosine triphosphate)或肌醇四或戊磷酸盐。

8 . 如权利要求前项所述之方法，其中该凝胶为琼脂糖凝胶 (agarose gel) 。

9 . 如权利要求第8 项所述之方法，其中所述化学空间群剂为己二酸。

10 . 如权利要求第1 项或第2 项所述之方法，其中包括了随后之步骤：

(c) 引入一阴离子进入层析的凝胶，它与在原有凝胶之多元阴离子竞争，其中(氧) 血红蛋白由凝胶被洗提。

11 . 如权利要求第10 项所述之方法，其中该竞争阴离子，由递减效能是从下列选择包括肌醇己磷酸盐，三磷酸腺苷，吡哆醛磷酸盐 (pyridoxal phosphate) ，二磷酸甘油酸盐，二磷酸腺苷，磷酸盐离子及氯离子。

12 . 一种由一液体溶液含无基质血红蛋白中分离无基质血红蛋白 (stroma-free hemoglobin) 的方法，包括：

(a) 经由一凝胶复合物传送含溶液无基质血红蛋白，它包括一层析的凝胶具有制动一多元阴离子，特定的束缚血红蛋白经由多元阴离子束缚处，及

(b) 引入一阴离子进入该凝胶复合物，它与原先含于凝胶中之多元阴离子竞争，其中纯化了的无基质血红蛋白由凝胶被洗提。

13 . 如权利要求第12 项所述之方法，其中于步骤(b) 所引入之阴离子及无基质血红蛋白溶液两者皆包括一适当缓冲剂，它并不干扰血红蛋白之束缚于多元阴离子。

14 . 一种由一液体反应混合物含改良的及未改良的血红蛋白分离未改良的血红蛋白之方法，包括：

(a) 经由一多元阴离子 / 层析的凝胶复合物传送该反应混合物，复

合物含一多元阴离子它特定的束缚血红蛋白经由其多元阴离子束缚处，在一层析凝胶上制动，其中未改良血红蛋白是保留在凝胶上而改良的血红蛋白经过该凝胶；及(b)引入一多元阴离子进入凝胶复合物，它与原先在凝胶之多元阴离子竞争，其中纯化的未改良血红蛋白由凝胶洗提出。

1 5 . 如权利要求第1 4 项所述之方法，其中所述之多元阴离子 / 层析的凝胶复合物为ATP - 琼脂糖凝胶 (ATP-agarose gel)。

1 6 . 如权利要求第1 4 项或第1 5 项所述之方法，其中该竞争阴离子以递减有效能由下列选出，包括肌醇己磷酸盐，三磷酸腺苷，吡哆醛磷酸盐，二磷甘油酸盐，二磷酸腺苷，磷酸盐离子及氮离子。

1 7 . 如权利要求第1 4 项所述之方法，其中该改良的血红蛋白为二羟醋酸化的血红蛋白 (glyoxylated hemoglobin) 。

1 8 . 如权利要求第1 4 项所述之方法，其中改良的血红蛋白为ATP-血红蛋白。

1 9 . 如权利要求第1 5 项所述之方法，其中该改良的血红蛋白为吡哆醛磷酸盐一血红蛋白。

以亲和层析法纯化血红蛋白及改良血红蛋白

本发明系关于血红蛋白基无细胞递氧体(hemoglobin-based acellular oxygen carriers), 尤其系一种藉亲和层析法技术纯化血红蛋白及改良的血红蛋白。

研究于发展无细胞递氧溶液以应用为一血液取代注重两方面, 即血红蛋白基之溶液及过氟碳物质(perfluorocarbon substances)如在必罗(Biro)之例子说明(Can. Med. Assoc. J, Vol. 129, 1983, Pp. 237-244)。目前的工作已指示, 过氟碳类为较不适合, 原因是, 例如, 特别的临床条件为其应用上之需要及毒性问题。因此, 现在的研究系聚焦于潜在血红蛋白基血液取代。因为血红蛋白于溶液(而非它在自然发现于红血球中)在生理而言并非为满意递氧体, 发展具有优良递氧及循环特征之血红蛋白衍生物被委任。

于本研究中血红蛋白之主要来源是目前“落后”输血者“红血球在自然上含有丰富之血红蛋白。从这此来源血红蛋白之隔离藉数种方法而已达成, 该等方法为牵涉从其他红血球细胞蛋白质及从细胞基质(cell stroma)之血红蛋白分离方法。

纯化血红蛋白之标准技术为离子交换层析法(ion-exchange chromatography)。此技术已经很广泛的被用于分析(analytical)及诊断(diagnostic)应用(例如, 参考Benesch and Benesch, Meth Enzymol., Vol. 76, PP. 174-179, 1981; 及Hsia et al, J. Chromatog., Vol. 303, PP. 425-428, 1984)。

然而, 一种较迅速及特殊之纯化技术为亲和层析法, 它选择上隔

离生物分子，藉其对某种分子、原子团、离子、或基称为配合基 (ligands) 而与生物分子形成复合物之束缚特殊性。一般上，在此技术中，配合基在一层析的凝胶上是制动的，而一含所需分子之溶液经由凝胶而传送。所需之分子是保留在凝胶上，是凭藉其特殊束缚配合基，而同时其他存在于此溶液之成份被洗提。

已得晓，血红素特别的束缚小多元阴离子性分子，尤其是2, 3 - 二磷酸甘油酸盐 (2, 3 - diphosphoglycerate) (DPG) 及三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate) (ATP)，自然的存在于哺乳类红血球 (Benesch and Benesch Nature, Vol. 221, P. 618, 1969)。血红素之束缚处位置即束缚进行位置是位于或接近血红素之四聚物结构之中心 (Arkone, A., Nature, Vol. 237, P. 146, 1972)。这些多元阴离子性分子束缚血红素于位置为重要的在于调整氧束缚亲和力，因多元阴离子性分子之束缚异形位阻上影响了血红素之组成进而引起这些和氧束缚亲和力之减少 (Benesch and Benesch, Biochem, Biophys. Res. Comm., Vol. 26, P. 162, 1967) 相反的，氧束缚于血红素异形位阻上减少了血红素对多元阴离子之亲和力。因此，氧血红素 (Oxyhemoglobin) 很弱的束缚 DPG 及 ATP。这在奥卡大 (Ogata) 及麦康尼尔 ((McConnell) (Ann. N.Y. Acad. Sc. Vol. 222, P. 56, 1973) 描述之旋转标记 ATP (spin-labelled ATP) 束缚氧血红素及无氧血红素有表示。

较特定的，上述多元阴离子性分子之束缚处是一般上介于血红素之 B- 血球蛋白 (B-globin) 链之间，而可被认为是介于链之间的一“裂缝”。在红血球之自然条件下，这裂缝是由一 DPG (于其醛类形式) 之分子所占据。当血红素与氧束缚时以形成氧血红素，一结构重组形成而产生 DPG 由裂缝冒出而它被认为裂缝关闭之有效性。氧的一分子束缚该四聚物的血红素实际上增加其氧亲和力，以束缚至一第二、第三及第四个氧分子。

以往，血红蛋白的研究及尝试以制备无细胞溶液血红蛋白以用于血液取代，曾揭露一广泛种类之多元阴离子性基及分子将在束缚处或裂缝处自然的由DPG 所占据束缚。某种此研究，曾经是尝试的一部份以提供四聚物性血红蛋白之B-键于溶液中之束缚以抵消(counteract)四聚物性血红蛋白之不期望之倾向以解离成二聚物。在血细胞之自然血红蛋白，此功能至少在某部份由裂缝里的DPG 来满足，然而在溶液里，该DPG 趋向由溶液扩散。于那些物质将会在裂缝束缚当做“DPG 取代”为各种有机磷酸盐、二磷酸盐(diphosphates)及聚磷酸盐，例如吡哆醛磷酸盐(pyridoxal phosphate)；磷酸类或核酸类例如ADP,ATP,嘌呤核苷(guanosine)磷酸盐，胞嘧啶磷酸盐(cytosine phosphates),胸腺嘧啶磷酸盐(thymine phosphates)，尿嘧啶磷酸盐(uracil phosphate)等；肌醇磷酸盐(inositol phosphates)碳水化合物磷酸盐及硫酸盐；单碳水化合物及聚碳水化合物等。对于熟悉此技术者，有各种此类的束缚物质为习知的，及出版在相关之科学文献里。

因为血红蛋白的氧化作用而形成氧血红蛋白有效的使血红蛋白之多元阴离子性束缚处(“关闭裂缝”)不活泼，根据习知技术，是有必要开发血红蛋白之多元阴离子束缚之特性，或的确进行调整氧束缚亲和力，是藉化学上改良多元阴离子束缚处，而该血红蛋白为脱氧。然而，血红蛋白存在于溶液中或混合物以基氧状况曝露于空气，i.e (氧)血红蛋白。的确，很难维持血红蛋白溶液于未氧化作用情况，经步骤涉到溶液与空气的接触，eg一层析步骤。因为此种难题，亲和力层析法之技术不曾用于习用上以纯化血红蛋白。

出乎意料的，它被发现(氧)血红蛋白可利用亲和力层析法技术来隔离及纯化。当然，所描述的技术，可应用于未氧化作用血红蛋白的隔离及纯化作用。

本发明包含了利用亲和力层析法以隔离及从完整血液或其他来源或

混合物之纯化，是凭藉血红蛋白之可逆束缚经其多元阴离子束缚处至一多元阴离子制动于一层析的凝胶支持。此一发现允许了血红蛋白在那状态之纯化，其中在正当试验室条件下它占优势。

根据本发明，提供一种从含(氧)血红蛋白溶液或混合物以隔离(氧)血红蛋白的方法，包括：

(a) 制止一特定束缚血红蛋白由其多元阴离子束缚处之多元阴离子于层析的凝胶；及

(b) 经该凝胶传递含(氧)血红蛋白溶液或混合物，其中该(氧)血红蛋白是保留于凝胶中，而溶液或混合物的其他成份被洗提。

尤其是，如果(氧)血红蛋白溶液传过ATP-琼脂糖凝胶时(商业上可获得或以习知方法来制备)，它被观察到血红蛋白是被凝胶所保留，而产生了被称为“红凝胶(red gel)”。在红凝胶中，血红蛋白之氧束缚特征，就如由氧解离曲线(oxygen dissociation curve)所表示，是与其溶解ATP复合物(P_{50} -35mmHg)相同而较在Bis-Tris缓冲剂溶液(P_{50} -7mmHg)之血红蛋白相同。因此，在红凝胶之血红蛋白由ATP束缚异形位阻上改良至该多元阴离子处。另外一些证据，含任何各种竞争阴离子溶液的引入造成血红蛋白由凝胶之洗提(elution)。这一些竞争阴离子，由递减的有效性之按次序为肌醇己磷酸盐 > ATP $\rightleftharpoons$ 比哆醛磷酸盐 $\rightleftharpoons$ DPG > 二磷酸腺苷 > 磷酸盐离子 > 氯离子。除了红凝胶之氧解离动力外，这种特殊及可逆束缚表示了(氧)血红蛋白的特殊束缚至多元阴离子亲和力凝胶之功能上的表现。

此发现，与氧及多元阴离子相互独占束缚之报告有矛盾，是归于下列。第1，该ATP-琼脂糖胶给予血红蛋白一高局部ATP浓度，化学计算上为有利于束缚。第2，它被相信，疏水性空间分子(spacer molecule)连接ATP至凝胶，及琼脂糖凝胶物质本身，扮演以增加ATP束缚至血红蛋白之多元阴离子束缚处。然而，它并非推断本发明是限制于任何特别理

论或作用方式，或者它被限制于琼脂糖凝胶，ATP 配合基及特殊疏水性空间分子之特别应用。

因此，亲和力层析法技术可被应用于(氧)血红蛋白之隔离及纯化作用。这表示了对传统技术的改良，它特定的在一1步骤层析法上隔离高纯度的血红蛋白，利用温和条件而不分裂蛋白质之原始结构，它可容易的适合用于大规模批式制备，对大规模生产血红蛋白基血液之取代是必须的。最后，有关于本产物之功能品质，此步骤选择上隔离血红蛋白与其束缚多元阴离子完整之能力，而产生了功能上完整血红蛋白而同时排除了不期望之杂质。

本发明之程序通常被实施，由提供一塔(column)含有该层析的凝胶及使含(氧)血红蛋白溶液流过该塔，随后，再由适当洗提试剂处理，此一步骤之操作并非必要的。如果需要，可在一关闭槽器中具有搅拌器混合该溶液及凝胶，固体及液体被分离，例如，以过滤法或离心法，及随后以液体洗提剂重覆该操作步骤。

于本发明实施例中之目的，(氧)血红蛋白是由在亲和力凝胶上之亲和力层析法隔离，包括一多元阴离子性分子由一疏水性空间群(交联剂)连接至一层析的凝胶，以习知方法支持。多元阴离子性配合基之例子为二磷酸甘油酸盐(diphosphoglycerate)，核苷磷酸盐(nucleoside phosphate)，肌醇磷酸盐及硫酸盐等等。的确，任何多元阴离子配合基，它能束缚于束缚处或裂缝自然的由血红蛋白之DPG所占据将可被利用。如前述曾经讨论，此种例子为习知及出版。

更佳，用于层析的凝胶配合基，至少用于试验室目的为ATP。然而，在一较大规模，ATP趋向于纯化的困难度，该配合基不应坚固的束缚于该(氧)血红蛋白，而使(氧)血红蛋白从凝胶的洗提面临困难。如果(氧)血红蛋白束缚太过坚固，那么，在应用适当强洗提试剂，例如变性蛋白质(protein denaturing)可会造成副反应。如果应用有机多元磷酸

盐，配合基至（氧）血红蛋白之键强度呈现增强当磷酸盐基增加时，最适当键强度是由三，四，及戊一磷酸盐类所衍出，使得较佳形成配合基化合物为核苷三及四磷酸盐，例如ATP。肌醇四磷酸盐，股醇戊一磷酸盐及其类似，包括其混合物。配合基分子是化学上键合至凝胶基，使得磷酸盐，硫酸盐或碳水化合物官能基为完整的与多元阴离子束缚处或在血红蛋白之裂编进行反应。在ATP情况时，它可被键合于凝胶经由腺苷（adenosine）之N-6位置或8-位置，或例如，经由过碘酸盐（periodate）氧化的核糖部份。

层析的凝胶提供了一交联剂或空间群，它是一有效的化学链群共键的联接至凝胶的一端及提供了一反应性基于另一端给予配合基之化学联接。这些空间群并不需要为直线化学基，它将提供一空间介于凝胶脊及配合基连接的反应基，为至少大约5 Å，而较佳为至少6 Å。实际上，这表示它应含至少为4个直线按排的原子，由官能基分离凝胶。要不然，不充足的配合基负荷于层析的凝胶将会发生。该空间群将为疏水性，使得在层析法程序时应用含水溶液时它们不会断裂。它们对于混合物之所有将被分离之成份，应该为安定及惰性，及对于将被应用之洗提试剂。适合之试剂被应用与凝胶之反应以提供适合空间群之例子为己二酸（adipic acid），二氨基己烷（diamiohexane）及其衍生物，例如己二酸二肼（adipic dihydrazide）及其他习知二酸类（diacids）及二氨基化合物。

适合的层析的凝胶之选择是介于习知技术，及可由各种商业上可获得之产物而制备，只要某种基本准则被观察。凝胶需要大致上是不溶于水，可被衍导及无毒性。它需要能容忍重生条件及处理程序，以符合消毒（sterile），卫生的输送需要。因此，它一定容易的可消毒，而不损害到其化学性质。

层析的凝胶架例子为琼脂糖（agarose）及矽胶。

一般上，改良的交联多糖类层析的凝胶为有效，如由那些商业上可获得的所举例，如从汛马，A.S.(Pharmacia A.S.)而得的商品，其商品名称如，士哈力士(sephadex)士哈拉士(sepharase)、士哈里(sepharyl)及士哈糖(sepharose)。商业上可获得层析的凝胶及改良的矽胶也适合。在很多情况，该凝胶可获得时已有空间官能基连接。它们可具有官能氨基(amino)、环氧基(Epoxy)或羟基(hydroxy groups)，除此之外，它们将具有适当的配合基，化学上连接至该空间群，使得有效的预备用于本发明之程序。

层析的步骤如下列进行。一含(氧)血红蛋白及其他成份的溶液，成份如，红血球胞质蛋白质，与空气平衡被注入亲和力凝胶及在对血红蛋白束缚于凝胶上之有利条件下洗提，根据习知的亲和力层析法。渐渐的，非血红蛋白成份从凝胶洗提而血红蛋白被保留，而使得血红蛋白呈现红色。条件之后转换成有利于从凝胶血红蛋白的解离，及它洗提为一纯血红蛋白部分。较佳之条件以使血红蛋白从凝胶之洗提为利用一缓冲剂，该剂含一阴离子与亲和凝胶之多元阴离子部份竞争特殊束缚于血红蛋白，因此，由凝胶上取代。缓冲剂为不影响血红蛋白之束缚于多元阴离子部份 Bis-Tris 缓冲剂，PH7.0 已发现为适合。

根据本发明的另一目的，申请者之血红蛋白纯化技术可被用于由一液体反应混合物含改良的血红蛋白及未改良的血红蛋白，以移出未改良血红蛋白之残余，随着血红蛋白之化学上之改良以改良其递氧及循环特征。该反应牵涉到血红蛋白的改良为典型的未完成及产生了未改良及改良的血红蛋白混合物。未改良血红蛋白残余在体内呈现问题，这是由于过量的氧束缚亲和力，它之迅速的由循环活动中排泄，及可能的血管缩小活动(Vasoconstrictor activity)。虽然这种未改良的血红蛋白目前从改良的血红蛋白含反应混合物所移出，在一分析规模上以离子交换层析法，一般上，但是它并不以一大规模来制备。在未移出大致上所有未改良的血红

素之前，该产品是不能被人类所接受。

在此及以后，本申请者之技术很明显的由改良的反应混合物（在一制备规模上）移出未改良血红蛋白残余，这包括了在血红蛋白改良过程的一重要品质管制步骤当做无细胞递氧溶液之一制备的起始物质。

尤其系，在此改良的血红蛋白为纯化，无细胞血红蛋白，其多元阴离子束缚处一DPG 同类物已共价键的由习知的方法连接，为了(a)安定溶液中之血红蛋白之原始四聚物结构，及(b)异形位阻上降低了血红蛋白氧束缚亲和力，模仿该规定，它是在红血球中，由DPG 或其自然发生同类物，例如，肌醇戊磷酸盐 ATP 等所自然的呈现。

该反应混合物包含了改良反应的产物，被认为是含有改良的血红蛋白，及血红蛋白残余，此残余为未改良血红蛋白，它的存在是因未完成自然改良反应，及DPG 同类物，例如ATP，其他核苷磷酸盐，肌醇三，四及戊一磷酸盐，吡哆醛磷酸盐，乙醛酸(glyoxylic acid)等。

反应混合物根据习知的亲和力层析法传过多元阴离子亲和力塔。在未改良的血红蛋白分子，该多元阴离子束缚处是未被占据及因此，该分子藉凝胶而保留，经由凝胶多元阴离子部份之特殊束缚至此处而保留。相反的，在改良的血红蛋白分子中，多元阴离子束缚处是由共价键的连接的多元阴离子或其他改良据所占据。因此，改良的血红蛋白将不特定的束缚于凝胶上，且是以不保留的部份被洗提。

因此，多元阴离子亲和力层析法是可容易的由一混合物之非血红蛋白成份分离血红蛋白，这是根据本发明之第1 目的，及同时也可从未改良的血红蛋白分离改良的血红蛋白，不管利用何种改良步骤，基于多元阴离子束缚处之状态。这允许血红蛋白之纯化，尤其系从非传统来源，其传统纯化技术的利用为不合理的，及亦允许制备一实际纯的改良而红素部份，藉加入一层析步骤于任何习知的改良步骤。

当本发明之程序被用于分离未改良血红蛋白，由一改良血红蛋白适于血

液之取代用，例如，ATP-血红蛋白，吡哆醛磷酸盐(PYP)-血红蛋白或二羟醋酸化的(G) 血红蛋白，该产生的纯化改良血红蛋白显示意外的及未预测的优点。例如，因此纯化的改良血红蛋白用为一血液取代显示一明显的血管缩小活动的减少，此一问题是以往应用此化合物所面临之问题。另外，该纯化产物显示了有效的减少氧之亲和力，如与由其他方法纯化之改良血红蛋白做比较。因此被获得之一APT-血红蛋白具有大致上相同于完整血液之氧束缚性质。

下列之圆式说明为本发明之实施例：

图 1 为于一ATP-琼脂糖亲和力塔层析之血红蛋白之洗提描绘。

10 μ l (50 μ g) 之无基质血红蛋白(stroma-free hemoglobin)(SFH) 于一分析毛细管塔填有10 μ l 之AGATP 凝胶之层析谱。由缓冲剂 A (50mM Bis-Tris缓冲剂，PH7.0) 之SFH 洗提表示只有高峰“a”，未保留部份(点线部份)。置入缓冲剂 B 之斜率(10mM ATP于缓冲剂 A，以断线表示斜率) 产生了一保留部份之洗提，高峰“b”(实线)。实验之条件如下：流量0.1 ml/min，温度大约为20℃，利用-FPLC 层析系统(Pharmacia Model LCC 500型)。该层析的凝胶为一琼脂糖凝胶以CNBr 及己二酸二肼(adipic dihydrazide)处理以提供化学空间群，而以O-ATP 为配合基。它是商业上以此形式而购得，随时可用。

图 2 为藉AGATP 凝胶SFH 之氧亲和力之改良。

SFH 在AGATP 凝胶(实线)及简单琼脂糖凝胶(断线)于50 mM Bis-Tris缓冲剂，PH7.0 于37℃下之氧解离曲线。该曲线是藉一Hem-O-Scan氧解离分析器而获得，应用相同的层析凝胶。

图 3 为SFH 在醋酸纤维素(cellulose acetate) 之电游子透入图形，于AGATP 凝胶层析法前及后

电游子透入法(Electrophoresis) 在二乙基丙二腈缓冲剂，PH8.8 进行。路径1 及2 按顺序的为保留的及未保留的部份(参阅图

一)。路径3 为起始SFH 之标准样品。箭头“c”及“d”指示SFH 之不明少部份成份，在未保留部份为多。电游子透入法于米拉(Mylax) 支撑醋酸纤维于200V进行45分钟及并染以春红S(Ponceau S)。

例1

藉琼脂糖-ATP亲和力层析法纯化无基质血红素

于本例子中，(氧) 血红素之来源是无基质血红素。琼脂糖- 己二酸- 腺苷酸- 5'- 三磷酸盐(AGATP)(Agarose-adipic-adenosine-5' - triphosphate) 是由莱姆等氏(Lomed et al)(Biochem Biophys Acta, Vol 304,P.231,1973) 方法所制备。无基质血红素(SFH) 是由拉美娜等氏(Rabiner et al)(J.Exp.Med.,Vol.126,P.1127,1967) 之方法所制备。SFH 首先渗析3 次改变，50mM Bis-Tris 缓冲剂，PH7.0 (缓冲剂A)，及随后500 μ l (20mg) 的SFH 溶液用于- Pharmacia HR5/5 塔填有大约1 ml的AGATP 凝胶以相同之缓冲剂来平衡。该塔以10个床体积之缓冲剂A，以流量为0.5ml/min 来清洗。至到洗提液(eluent)为清澈之后经由一直斜率置入缓冲剂R(缓冲剂A含1 - mM ATP) 以洗提该保留部份。保留的及未保留的部分者皆被收集，浓缩及渗析缓冲剂A。对于各部份，醋酸纤维素电游子透入法于二乙基丙二酰脲缓冲剂，pH8.8 (高解度缓冲剂，Gelman Sciences)被制备，利用起始SFH 制备成一标准样品。对于氧解离研究一小量之红凝胶再浮悬于2 μ l 之缓冲剂A及其氧解离曲线利用-Hem-O-Scan 氧解离分析器来测量。为了成一标准样品，SFH 与琼脂糖凝胶之混合悬浮在溶液中而其氧解离曲线相同的获得。

图1显示了血红素之束缚于缓冲剂A之AGATP 凝胶上，及该选择斜率洗提描绘是由加入10mM ATP于缓冲剂A所产生。这显示血红素是特殊的保留经束缚凝胶之ATP 部份至其多元阴离子束缚处。本特殊性之另一证明为SFH 系由下列阴离子从凝胶取代，按下列之递减有效性：肌醇己磷酸盐 > ATP $\rightleftharpoons$ 吡哆醛磷酸盐 $\rightleftharpoons$ 二磷酸甘油酸盐 > 二磷酸腺苷 > 磷酸盐

离子> 氯离子(结果没显示)。图2 显示一典型接至AGATP 凝胶血红蛋白之氧解离曲线。该血红蛋白-AGATP复合物被显示具 P_{50} 之35mmHg, 相同于SFH, 在四克分子当量之ATP 存在时, 当做比较时, 标准SFH-琼脂糖混合物具有 $-P_{50}$ 之12mmHg。

因此, (氧) 血红蛋白被显示具有AGATP 之足够亲和力以形成一稳定复合物。束缚SFH 至AGATP 降低了SFH 之氧亲和力至一水平相等于可溶的SFH-ATP 复合物, 显示该复合物的形成是因为SFH 之特定束缚于凝胶之ATP 部份。SFH之醋酸纤维素电游子透入法指示了少量成份(图3) 之存在, 其中有两者从保留部份中消失。这些少量带之两者在未保留部份(路径2) 呈增加, 而其一在保留部份(路径2) 增加。另外, 在未保留部份高度电游子透入流动时, 血红蛋白亦增加。因此, 多元阴离子亲和力层析法被显示为改良了SFH 之纯度及品质。

很庆幸的虽然例1 应用无基质血红蛋白为(氧) 血红蛋白之来源, 其他的(氧) 血红蛋白来源亦可被应用, 包括用过血液(例如从开心手术), 人类胎盘萃取(human placental extract), 及血红蛋白含有由生物技术上方法生产之溶液。

例2

藉琼脂糖-ATT亲和力层析法纯化二羟醋酸化血红蛋白

在此例子中, 显示本发明的第2 目标, 改良二羟醋酸化血红蛋白(G-Hb)根据阿卡耶等氏(Acharya et al)(Fed Proc., Fed. Amer. Soc. Exp Biol., Vol 41, P.1174, 1982) 之方法制备。利用一康宁2500 CO-奥西表(corning 2500 CO-oximeter)测量血红蛋白之浓度。琼脂糖-己烷-腺核-5'-三磷酸盐(ATP-琼脂糖)(第4种)于每ml之凝胶含有9.2 μ 莫耳之ATP, 是由Pharmacia P-L 生物化学所购得。血红蛋白溶液之亲和力层析法是利用-Pharmacia快速蛋白质液体层析系统来进行。所利用之实验条件是相同于例1 所描述的。

为了测试ATP-琼脂糖亲和力层析法是否能纯化改良的血红蛋白，该血红蛋白二羟醋酸化混合物(G-Hb 反应混合物)经过塔及其馏出部份之特征有如上述例1。这产生了一相同洗提描绘(其结果没显示)由谢尔等氏(Hsia et al)所报导的(J.Chrom.,Vol 303,PP.425-428,1984)表示一未保留高峰G-Hb-I及一保留高峰G-Hb-II。

起始溶液之氧解离曲线及其ATP-琼脂糖部份表示下列 P_{50} 之顺序：

G-Hb-II < G-Hb反应混合物 < G-Hb-I

G-Hb-I P_{50} 是大约2 倍G-Hb-II。再次的，其结果是相同于谢尔等氏(Hsia et al)所报导的(J.Chrom.,Vol 303,PP.425-428,1984)。此结果再次确定于二羟醋酸化血红蛋白制备中异代生殖(heterogeneity)是由于二羟醋酸化作用之延伸变化。氧解离曲线向右移是与二羟醋酸化之延伸相比。因此，琼脂糖-ATP亲和力层析法能以适当氧亲和力纯化改良的血红蛋白(G-Hb-I)。

因此，本纯化技术一般上可用于纯化改良血红蛋白，(例如，吡哆醛磷酸盐及ATP 改良血红蛋白)。所产生的纯改良血红蛋白被认为是一优越起始原料以制备血红蛋白基血取代，因为它具有适当的向有转移氧亲和力及它与血管收缩的未改良血红蛋白无关。

例3

过时的红血球可从加拿大红十字会(Canadian Red Cross)获得。无基质血红蛋白(SFH)如例1 中所制备。三磷酸腺苷(Adenosine triphosphate)及偏过碘酸钠(Sodium Metaperiodate)是由适马化学公司(Sigma Chemical Company, St Louis Missouri)购得。过碘酸盐氧化的ATP 是根据罗等氏(Lowe et al)(Biochem Soc.Trans.,Vol.7(1979) P.1131)之方法制备。ATP-琼脂糖是由莱姆等氏(Lamed et al)之方法制得(请参阅例1)。

ATP-血红蛋白是依据格林堡及马佛(Greenburg and Maffuid)之改良

方法制备参阅“临床及生物研究之进展”(Progress in clinical and Biological Research) Vol 22, 血液取代研究之进展(Advances in Blood Substitute Research), Alan R. Liss, Inc., New York (1983) 9。在这改良步骤中, 2ml 的辛醇 (caprylic alcohol) 加入每 100 ml 的 7 % 血红蛋白于 5 mM 磷酸盐缓冲剂, PH7.0。吹入氮气 2 小时以使血红蛋白溶液脱氧。需要过碘酸盐氧化的 ATP 于 50 mM Bis-Tris 缓冲剂 PH7.0 之含量, 该剂曾在氮气脱氧随后加入脱氧的血红蛋白溶液而产生一克分子比率为 1.2:1 ATP:血红蛋白, 以氮气吹入反应混合物 (ATP- 血红蛋白溶液) 90 分钟, 锡佛 (Schiff) 基之 ATP-血红蛋白共轭物以硼氢化钠 (NaBH_4) 还原, 于 1 mM 氟氧化钠 (NaOH) 于一克分子比为 20:1 NaBH_4 / 血红蛋白。再次的, 利用 N_2 吹入混合物中 2 小时。

在完成还原步骤后, 该溶液被氧化作用及渗析 50 mM Bis-Tris, PH7.0 溶液的层化 (aliquots) 部份含有大约 50 mg 之血红蛋白随后经过-塔填有 5 ml 之 ATP-琼脂糖凝胶 (大约 30 % 之塔容量), 它亦已以 50 mM Bis-Tris, PH7.0 平衡。未保留血红蛋白部份是藉 5 个体积相同缓冲剂洗提, 而保留部份随后以 0.2 M NaCl 于 50 mM Bis-Tris, PH7.0 平衡。未保留血红蛋白部份是藉 5 个体积相同缓冲剂洗提, 而保留部份随后以 0.2 M NaCl 于 50 mM Bis-Tris, PH7.0 来洗提。馏出部份被收集, 浓缩, 及渗析 50 mM Bis-Tris, PH7.0 平衡。未保留血红蛋白部分是藉 5 个体积相同缓冲剂洗提, 而保留部份随后以 0.2 M NaCl 于 50 mM Bis-Tris, PH7.0 来洗提。馏出部份被收集, 浓缩, 及渗析 50 mM Bis-Tris, PH7.0, 以一薄膜浓缩器进行, 该仪器制造公司为 P-Micro proDicon, Pierce, Rockford, Illinois。各部分之氧解离曲线是由 Aminco Hem-O-Scan 氧解离分析器进行测量, 该仪器制造者为美国仪器公司 (American Instrument Company, Silver Spring, Maryland)。P₅₀ 是直接的由氧解离曲线读得。该未保留血红蛋白部份, 即, ATP-血红蛋白具有 -P₅₀ 为 35, 而保留部份, 氧

血红蛋白有 $-P_{50}$ 为5 mmHg。

不超过100 μg 之血红蛋白于0.01 M之丙二酸盐(malونات), PH5.7 (缓冲剂 A) 之样品应用于—HR5/5 莫若士(Monos) 预填塔(Pharmacia) 以缓冲剂 A平衡。馏出部份以一直线斜率之缓冲剂 B(0.3 M LiCl缓冲剂 A) 在一Pharmacia LCC 500 FPLC系统上洗提, 该系统系由 Pharmacia, Montreal, Canada 所制备。

从塔而得之产物洗提描绘(elution profile) 指示了未改良血红蛋白, 具有其多元阴离子束缚处完整, 是能束缚于ATP-琼脂糖及因此, 保留于塔上同时由改良的血红蛋白, 含一或多个ATP 分子共价键的占据其阴离子束缚处, 是以未保留部份洗提。该未改良的血红蛋白可容易的回收以进行另外的改良。该结果显示, 接近藉ATP-琼脂糖亲和力层析法从反应混合物的改良血红蛋白及未改良的血红蛋白之定量分离。

例4

吡哆醛磷酸盐改良血红蛋白(Pyp-Hb)是以F.地文杜多(F. Devenuto)及A.奇那(A. Zegna)的方法制备。(J.Surg.Res.34, PP.205-212, 1983)。该反应混合物产物含有大约75% Pyp-Hb, 而其他剩余的为残余未改良Hb。混合物以琼脂糖-ATP凝胶处理而液体残余由固体物理上分离。液体残余进行分析而发现大致上为纯Pyp-Hb。固体凝胶是以ATP 处理(第1批)而另外一批以氯离子处理, 成为竞争阴离子, 而大致上纯血红蛋白由此回收。

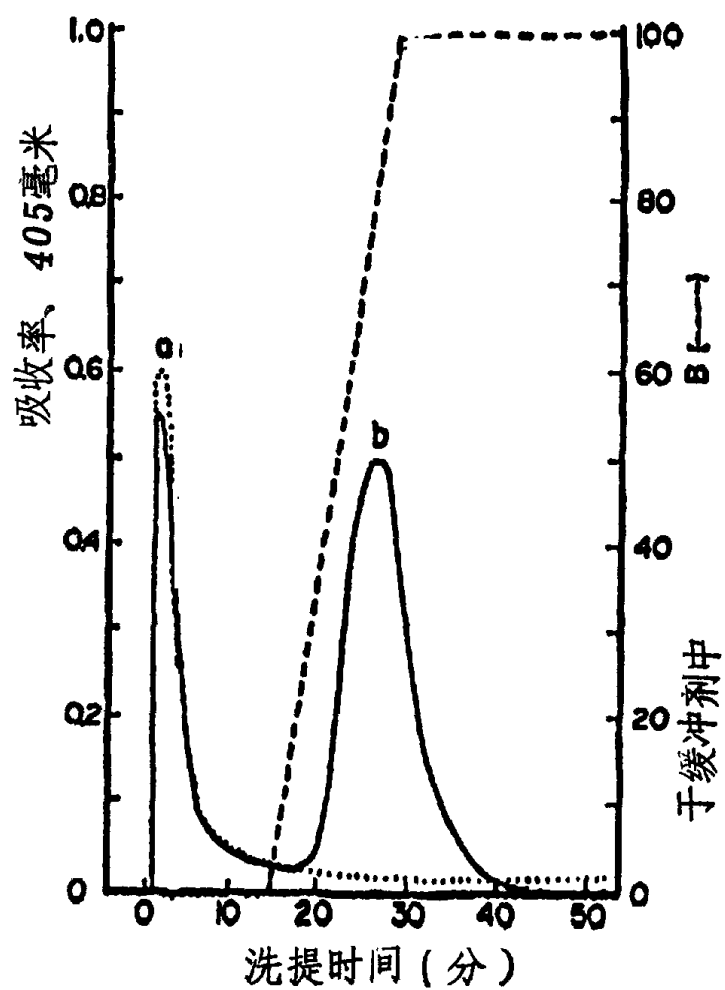


图 1

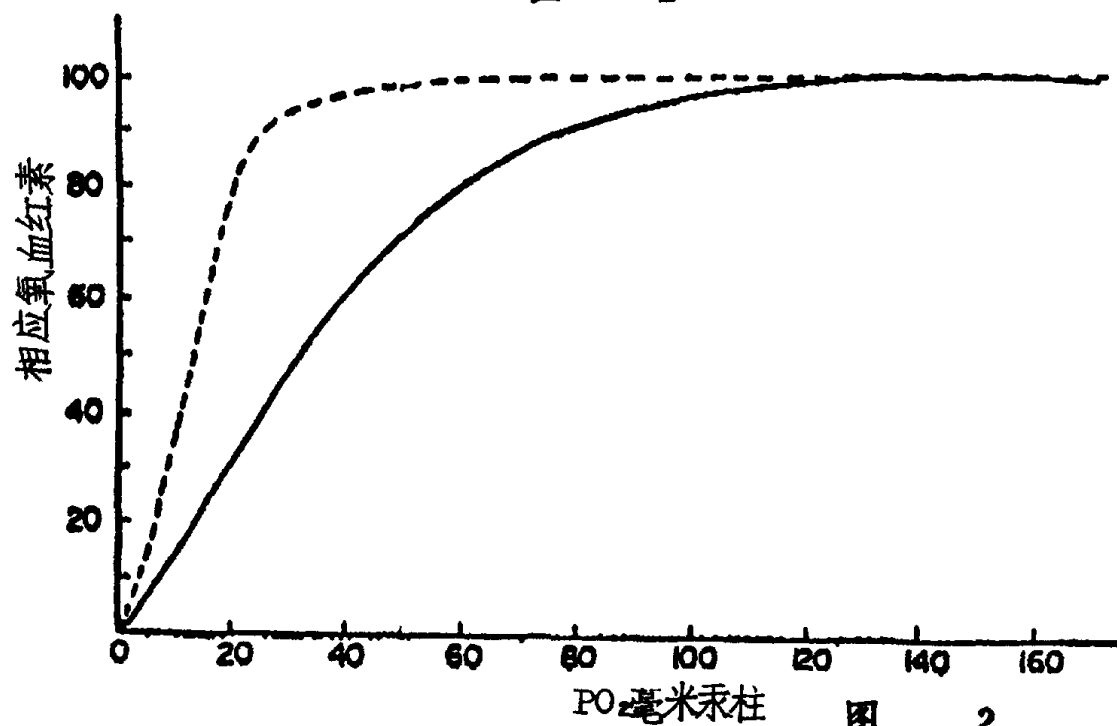


图 2

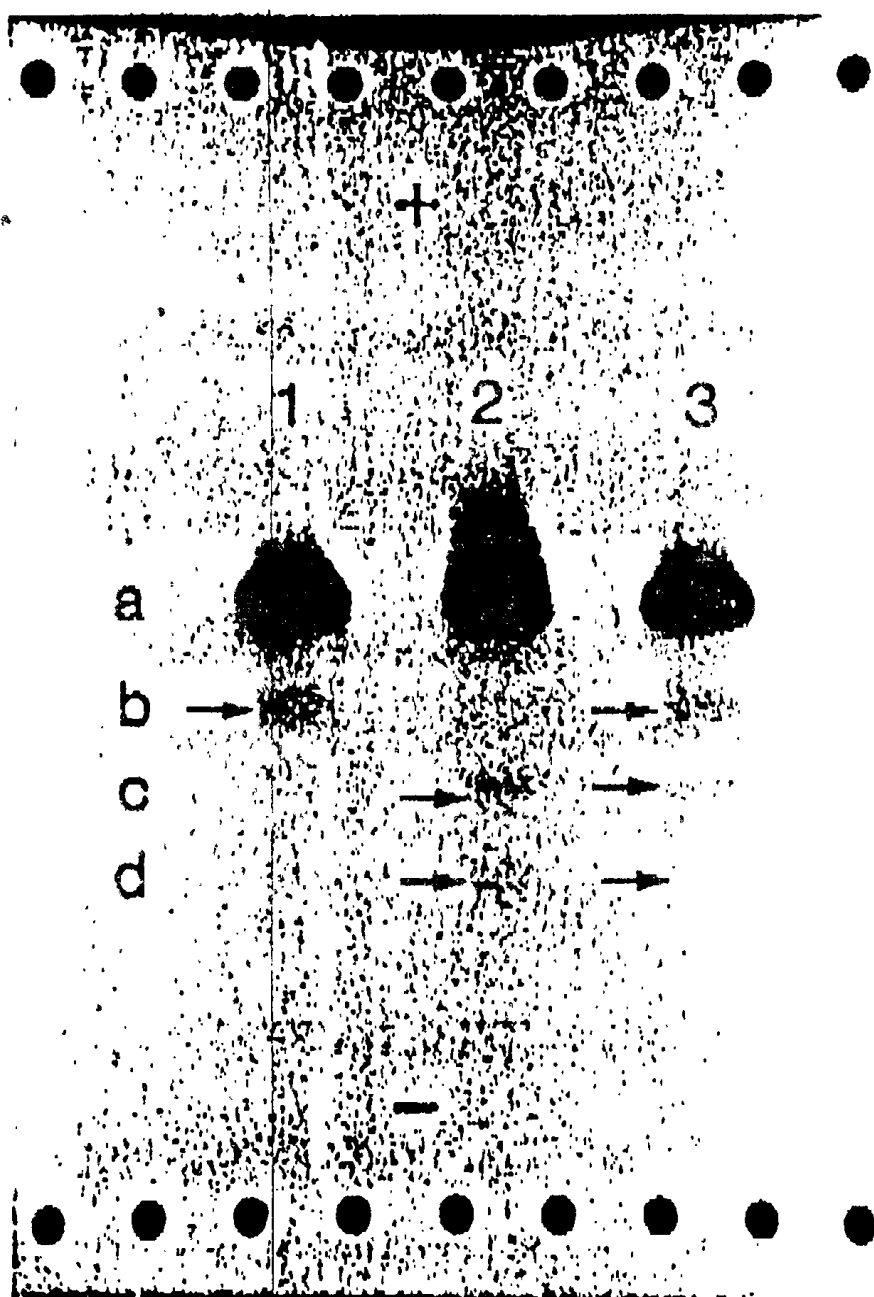


图 3