

修饰血红蛋白作为红细胞代用品的研究进展和挑战

Development and Challenge of Modified Hemoglobins as Red Blood Cell Substitutes

路秀玲*

LU Xiu-Ling*

中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室 北京 100080

National Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, PO Box 353, Beijing 100080

摘 要 血源紧缺和病毒污染问题推动了血液代用品的研究,以血红蛋白为代表的红细胞代用品成为研究的重点。为克服血红蛋白直接使用的毒副作用,各种修饰技术得到了迅速发展,其中包括双阿司匹林交联、戊二醛交联、棉子糖交联、聚乙二醇偶联、脂质体包埋、生物可降解高分子包埋等。其中一些技术已经形成规模化制备工艺,产品进入临床试验,有的已在个别国家上市。鉴于这项研究意义重大,我国有关研究已经起步并正在迅速发展,各国同行的研究有重要的参考价值,因此有必要对近年来血红蛋白作为红细胞的代用品研究状况进行分析,明确面临的挑战,这将有利于发展更全面和有效的研究方案,以期取得突破性进展。

关键词 红细胞代用品,血红蛋白,修饰,交联,偶联,包埋

中图分类号 Q51 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)01-0007-12

Abstract The problems of blood shortage and the virus infection risk of blood transfusion have promoted the study of blood substitutes. Modified hemoglobin has become the focus of the research because of its excellent oxygen carrying ability. To overcome the toxicity effect on direct use of purified native hemoglobin, various modification technologies have been developed, including diaspirin cross-linking, glutaraldehyde polymerization, O-raffinose polymerization, polyethylene glycol conjugation, liposome encapsulation and biodegradable polymer encapsulation. Some of the products have been in clinical trials, and one of the products has been approved in a country for clinical use. Research on red blood cell substitutes in China has also developed fast. This paper provides an overview of the history and current status in development of different hemoglobin-based red blood cell substitutes, especially the problems encountered, the challenges faced, and the prospects in future.

Key words Red blood cell substitutes, hemoglobin, modification, cross-linking, conjugation, encapsulation

输血常常是抢救生命的重要手段之一。在第二次世界大战中,至少有 50% 以上的人员伤亡是由于没有得到及时的输血抢救。在战场恶劣的条件下不可能有充足的血源供应,而且也没有充足的时间和

条件来验对血型。我国在抗美援朝中也有大量伤员由于抢救不及时而失去年轻的生命。近年来台风、海啸、地震等突发事件也造成大量人员死亡,其中无法及时输血抢救是原因之一。人体血液由血浆、红

细胞、白细胞和血小板组成,成分非常复杂,要制造出一种完全代替血液的溶液非常困难,或者说几乎不可能,但研制一种临时替代品,在急需情况下短时间内代替血液中某种组分的作用却具有可行性。血液紧缺在平时就已经是个难题。在我国,各大城市几乎都发生过“血荒”,一些手术不得不等待血液到来才能实施。血液的运输、保存都需要特殊的低温条件,而且保存期最多不过一个月。艾滋病、肝炎等病毒也可通过输血传染。多年来,人们一直在探索是否能够造出一种血液代用品,在紧急时刻不需验对血型即可直接使用,而且可以长期保存以备急需^[1]。

美国是自第二次世界大战以来对血液代用品研究投入最多的国家,先后有多家公司的产品进入临床。日本和加拿大也做了大量工作。国际上这几年又掀起血液代用品的高潮。从 Pubmed 上检索,1996 年以来共有近 1000 多篇关于血液代用品的文章,研究范围包括血浆代用品、血小板代用品和红细胞代用品。其中白蛋白、羟乙基淀粉、右旋糖苷等溶液作为血浆代用品已被应用于临床,主要作用是维持血液的渗透压、酸碱平衡及血容量^[2]。血小板代用品十分重要,但仍正处于研究初期。红细胞代用品由于具有载氧功能,是研究的重点,发展很快。2005 年 6 月,第 10 届国际血液代用品大会在美国举行,以修饰血红蛋白作为红细胞代用品的研究论文占多数。鉴于我国血液代用品已经起步并正在迅速发展,各国同行的研究有重要的参考价值,回顾和分析血红蛋白作为红细胞代用品研究的成就和问题,有利于明确面临的挑战,取得突破性进展。

1 血红蛋白的分离纯化 ——最初的挑战

在脊椎动物血液中,血红蛋白位于红细胞内。红细胞表面的糖基决定血型,存在血型匹配问题。但血红蛋白没有血型问题,只是随物种不同序列和结构不同。红细胞不稳定,但血红蛋白要稳定得多,可在溶液状态和冻干状态下保存^[3]。人血红蛋白由 $\alpha_1\alpha_2\beta_1\beta_2$ 四个亚基构成,含量占红细胞胞内蛋白质 90% 以上,具有在高氧分压下载氧、低氧分压下释氧的功能。早在 1916 年就有将初步纯化的人血红蛋白用于贫血症治疗的尝试,然而事与愿违,出现了明显的肾毒性^[4]。后来发现,这种初步纯化的血红蛋白含有杂质,有细胞膜磷脂,还有提取过程混入的细

菌内毒素。红细胞代用品输入量大,即使存在痕量的杂质也能出现明显的累积毒性,所以血红蛋白的分离纯化非常重要,这也是血红蛋白作为红细胞代用品首先遇到的挑战。

血红蛋白的分离纯化过程主要包括红细胞与血浆分离、红细胞释放血红蛋白、从红细胞破裂液中纯化血红蛋白等。红细胞可以通过简单的离心或过滤与血浆分离,然后充分洗涤红细胞。通过控制溶液的渗透压使红细胞溶胀但不破碎,血红蛋白渗出以利于后续纯化^[5]。

膜分离和色谱技术是血红蛋白纯化的关键。膜分离技术可以去除病毒、热源等,但产品纯度不高。采用色谱技术可以得到高纯度的产品,众多的工艺中,新发展的透过式离子交换色谱技术实现了只吸附杂质而使血红蛋白直接透过,回收率达 90%,适合于规模制备,但不足之处是纯度相对不高^[6]。我国开发的聚乙二醇伴随的透过式离子交换层析纯化血红蛋白工艺,制备出色谱纯和电泳纯的产品,单步收率均在 95% 以上,基本解决了大量高纯度血红蛋白的制备问题^[7-9]。

血红蛋白溶液可以用巴斯德法、超滤法和化学法等方式消毒灭菌,除去引起 AIDS、乙型肝炎等的病原微生物^[3]。但随后发现,高纯度的血红蛋白仍然面临着体内半衰期短和氧亲和过力高两个严重问题。人血红蛋白失去红细胞内 2,3-二磷酸甘油酸(2,3-DPG)调节,氧亲和力升高,半饱和氧分压 P_{50} 从 3.47kPa 降到 0.67kPa,即不能向组织有效供氧。另外,脱离红细胞的血红蛋白四聚体结构不稳定,易分解成二聚体和单体,透过血管进入器官及组织间质,引起严重的副作用,在循环中的半衰期仅为 2~4h。因此,即使是高纯度血红蛋白也不能直接用作红细胞代用品。

2 进行分子内交联,防止四聚体解离 ——焦点之一

人们首先着眼于将血红蛋白分子进行化学修饰,降低未有 2,3-DPG 调节的血红蛋白的氧亲和性,稳定四聚体结构。2,3-DPG 是靠非共价键与血红蛋白结合的,在血液代用品中加入大量 2,3-DPG 会造成毒性。但是如果能找到一种类似于 2,3-DPG、且能与血红蛋白上与 2,3-DPG 结合位点进行交联的分子,则可能解决 2,3-DPG 的问题。吡哆醛衍生物 5-磷酸吡哆醛(PLP)大小和电荷性质与 2,3-DPG 相似,

可与脱氧血红蛋白 β 亚基的 2,3-DPG 结合位点形成共价键,从而调节氧亲和力^[10],是最早应用的修饰剂之一。还有人合成了两个吡哆醛的双醛基衍生物 NFPLP,可与脱氧血红蛋白反应,在 $\beta 1$ (NA1) 缬氨酸和 $\beta 2$ (EF6) 赖氨酸间形成双键连接,降低氧亲和力,防止解聚^[11]。而替代 2,3-DPG 的最著名的试剂是双阿司匹林 [bis(3,5-dibromosalicyl) fumarate],简称 DBBF。

2.1 用双阿司匹林进行血红蛋白的分子内交联

双阿司匹林分子如图 1 所示,它在脱氧条件下对人血红蛋白的交联发生在血红蛋白两个 α 亚基各自第 99 位的赖氨酸(Lys)上^[12](图 1)。由于 α 亚基和 β 亚基之间的结合比较牢固,所以两个 α 亚基之间的交联就有效地防止了血红蛋白四聚体结构的破坏。通过控制反应物浓度的配比,可以使 DBBF 的反应只发生在血红蛋白的分子内部,而不会出现大量分子之间的交联。DBBF 交联产物比较均一,容易控制,同时反应产物的氧亲和力得到改善^[12],因而一度受到学术界和商业界的青睐。美国 Baxter 公司将双阿司匹林分子内交联入血红蛋白(DCLHb)进行了 I、II、III 期临床^[13-14],取得了一些振奋人心的结果,如证实 DCLHb 不会产生细胞毒素或造成缺血组织损伤等。人们对它寄予了很大希望。但遗憾的是,III 期临床后期发现,在对失血性休克伤员的抢救中没有表现超乎寻常的效果,一部分伤员死亡。进而发现输入 DCLHb 增加平均动脉血压,容易携带 NO 透过血管壁,引起血管收缩。因此, Baxter 公司不得不于 1998 年中断了临床试验^[12]。这是血液代用品研究的一个挫折。

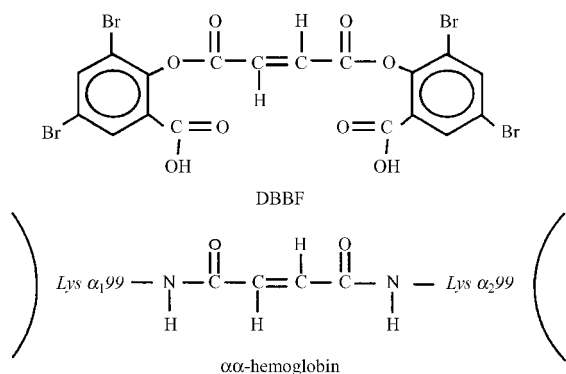


图 1 双阿司匹林分子内交联血红蛋白

Fig. 1 Reaction of bis(3,5-dibromosalicyl) fumarate (DBBF) with hemoglobin

2.2 重组血红蛋白

美国 Somatogen 公司的科学家与英国的医药研

究委员会合作,将人血红蛋白基因进行改造,在大肠杆菌中表达,商品名为 OptroTM。其独特之处在于用基因工程方法将两个 α 链首尾连接,形成共价键。除此之外,还修饰了 2,3-DPG 所处的中央孔穴,改进了结合与释放氧的特性,使血红蛋白氧平衡曲线类似于正常人的红细胞。这种基因工程血红蛋白无需化学修饰就解决了四聚体稳定的问题,又不引入化学试剂,是其长处。临床试验给病人输入 100g 产品,没有明显的副作用^[15]。但是,类似于 DCLHb,采用基因工程手段内交联的血红蛋白同样会结合 NO 并透出循环系统,从而引起高血压反应^[16]。1998 年 3 月, Somatogen 被 Baxter Healthcare 兼并,之后 OptroTM 由于出现副作用而被中断临床试验^[17]。Baxter 公司现正致力于发展第二代基因工程血红蛋白,处于临床前期研究阶段。

3 增大分子量,提高半衰期,开发动物血源

稳定的四聚体结构虽然使得肾毒性问题有所缓解,但各种修饰的单分子血红蛋白在临床试验中不断因出现明显的副作用而中断。此后,开发各种分子量大于四聚体的血红蛋白衍生物作为红细胞代用品成为研究的热点。分子量增大的血红蛋白可在血红蛋白浓度较高时仍保持低渗透压,并防止血红蛋白透出血管壁,半衰期延长。与此同时,动物血红蛋白的开发逐渐引起重视。

动物血红蛋白来源广泛,价格低廉。而且牛血红蛋白比人血红蛋白更稳定,还不需要 2,3-DPG 来调节载氧能力,唯一的问题是免疫原性。牛血红蛋白和人血红蛋白的同源性在 85% 以上,仅使用 1 次或 2 次往往不会引起明显的免疫反应^[3]。如果有适当的修饰方法,一方面克服血红蛋白单独使用的毒性,另一方面屏蔽免疫原性,则更是一举两得。

3.1 戊二醛聚合牛血红蛋白

HemopureTM (HBOC-201) 是美国 Biopure 公司研制的戊二醛交联的牛血红蛋白。其交联产物是寡聚血红蛋白的混合物,存在 2 个、3 个或更多的牛血红蛋白聚集体。在以绵羊为模型的研究中,将全血的 95% 置换成戊二醛交联的牛血红蛋白未见异常^[18],但产品的循环半衰期不长,仅为 52.7 ± 18.0 h,而且高铁血红蛋白的含量增加^[19]。高铁血红蛋白不具备载氧活性,甚至对人体有不利作用,应限制在较低的水平,一般不超过 5%,所以降低高铁血红蛋白含

量是聚合血红蛋白产品研究要解决的一个问题。另外,为了避免疯牛病等病毒污染,牛血红蛋白应取自严格管理和专门饲养的牛,这样也增加了成本。HBOC-201 已经被 400 多位患者试用,剂量累计高达 240g。2001 年该产品通过了 III 期临床试验,在非洲被批准用于临床输血,而在美国被批准用于宠物治疗。Biopure 公司一直希望产品在美国上市,但遇到 FDA 的阻力,要求提供某些临床和临床前试验的数据详细资料。因此,美国 Biopure 公司的产品还处于 FDA 的审查中。尽管如此,戊二醛聚合牛血红蛋白是血液代用品的一个成功范例,极大地鼓舞了学术界和商业界。

3.2 聚合人吡哆醛化的血红蛋白

美国 Northfield 公司将人血红蛋白经吡哆醛进行分子内交联后再以戊二醛聚合,形成人血红蛋白的寡聚物 poly-SFH-p,商品名为 PolyHeme。和 Biopure 公司牛血红蛋白寡聚物 Hemopure™ 类似, PolyHeme 也是一个不同分子量的混合物,区别是一个为牛血红蛋白,一个为人血红蛋白。Northfield 公司是最早开展血液代用品的公司之一,具有悠久历史,曾经进行过大量人体换血试验,表明其产品的安全有效性。与输入全血相比,输入 poly-SFH-P 没有引起肺动脉压力及肺部毛细血管压力发生明显改变^[20]。临床实验研究表明, poly-SFH-P 可以维持由于红细胞损失而降低的血红蛋白浓度,未发现副作用。目前 poly-SFH-P 正在进行 III 期临床,试验其在急性外伤和紧急手术中的作用效果,是一个有发展潜力的产品。

3.3 棉子糖衍生物交联人血红蛋白

棉子糖衍生物交联人血红蛋白是加拿大 Hemosol 公司开展的一项有特色的研究^[31]。与其它采用化学合成的交联剂不同, Hemosol 公司的交联剂是从天然寡糖中衍生的。他们将 O-棉子糖上相邻的两个同位羟基用高碘酸盐氧化,生成二醛;由于醛基活泼,可以和血红蛋白上的氨基等基团反应,用来交联人血红蛋白。这种棉子糖衍生物交联血红蛋白的反应产物也是混合物,有 63% 的聚合血红蛋白和 37% 的分子内交联血红蛋白^[21]。

Hemosol 公司的应用是冠心病患者冠状动脉搭桥中的输血,在手术中,病人出血量很大,需要及时补充血液。血液代用品有望取代人血用于手术中。在 I 期临床试验过程中, O-棉子糖血红蛋白没有显著的副作用,受试者没有出现血液凝集、肾毒性、免

疫或其它血液动力学的不良反应^[22]。但 2003 年初,发现 II 期临床中 O-棉子糖血红蛋白对心脏产生副作用的比率较高,原因不明。Hemosol 公司不得不停止了 II 期 b 试验。

3.4 高分子聚合物偶联牛血红蛋白

血红蛋白与大的惰性分子如右旋糖苷、聚氧乙烯(POE)、聚乙二醇(PEG)、羟乙基淀粉和菊糖(inulin)等连接可增大分子量,所得到的偶联物有效地延长了血红蛋白的循环半衰期^[23-25]。

美国 Enzon 公司曾研制 PEG 偶联的牛血红蛋白,用琥珀酰亚胺活化的 PEG 修饰血红蛋白,增加了分子大小,改善了血红蛋白表面性能,降低了免疫原性,得到较长的体内循环半衰期^[26](大鼠约 20h,兔子约 50h)。PEG 化的血红蛋白避免了肾小球的快速滤过,不引起急性的肾管损伤,也没有任何细胞死亡的迹象^[27]。Enzon 公司将 PEG-血红蛋白用于固体组织缺氧肿瘤的放射治疗。研究表明 PEG-血红蛋白传递氧气至组织缺氧的肿瘤部位,能够增加放射治疗的效果^[28]。但有报道指出 PEG 偶联的血红蛋白能够快速从肠胃黏膜渗出,并使阻塞血管的物质从肠黏膜进入血液循环^[29], Enzon 公司被迫中断了临床试验。

近年来,美国 Sangart 公司报道了一种 PEG 修饰的人血红蛋白,称为 MP4 或 Hemospar(商品名)^[30]。与 Enzon 公司的修饰技术不同, Sangart 先用马来酰亚胺与血红蛋白的氨基进行共价偶联,然后用 PEG 与马来酰亚胺的自由巯基进行偶联。这种二步偶联法制备的产物具有均匀的修饰度,每个血红蛋白分子偶联的 PEG 数量相近,产品均一性比较好。据 Sangart 报道,他们的产品显示了良好的生物学特性,已经通过了 I 期临床, II 期临床也已近结束,未见出现副作用的报道,也没有使血压升高或造成肠胃不适的现象^[30]。美国纽约爱因斯坦医学院也报道了相同的 PEG 偶联技术^[31]。

德国 Apex Bioscience 公司发展了一种经磷酸吡哆醛修饰,并用聚氧乙烯交联的氧亲和力和低的高分子量血红蛋白衍生物^[32],商品名为 PHP(pyridoxalated hemoglobin polyoxyethylene)。PHP 的 I / II 期临床试验表明, PHP 具有恢复正常血液动力学效应的潜能,可以减少对血管加压药物的需求。另外,其具有很好的耐受性,过量的 PHP 未见有临床副作用或实验异常现象,现正在进行 III 期临床试验。

4 仿红细胞——更接近血液特性的发展

4.1 血红蛋白和其它酶协同包埋

血红蛋白分子修饰产品仅是红细胞代用品的一部分。在这些产品中并没有保护性的膜包覆血红蛋白分子,因而它们的纯度必须很高,以避免输入体内后有副反应发生。另外,它们还缺乏红细胞中存在的酶类,循环半衰期也很短。

早在1964年TMS Chang就报道用人工膜包埋血红蛋白和酶,制备了人造红细胞,其氧合曲线与红细胞相似^[33]。随后,有人用交联蛋白、双层磷脂复合蛋白和硅胶等其它聚合物包埋血红蛋白^[34]。现有的包埋血红蛋白主要包括脂质体包埋血红蛋白和可降解聚合物微胶囊包埋血红蛋白。

4.1.1 脂质体包埋血红蛋白:一般构成脂质体膜的主要成分为天然磷脂,其分子中均含有不饱和脂肪酸链,易氧化水解成过氧化物、丙二醛、脂肪酸及溶血卵磷脂等。1980年,Djordjevich和Miller^[35]制备了粒径为0.2 μm的脂质体人造红细胞,循环半衰期已超过24 h。通过对过氧化氢酶(Cat)和超氧化物歧化酶(SOD)的协同包埋,部分地解决了贮存时及输血后高铁血红蛋白的形成问题。但血红蛋白脂质体仍存在以下不足:循环半衰期仍不能满足多数临床需要,贮存期间及输入体内后的稳定性较差,磷脂对网状内皮系统具潜在影响,磷脂易发生过氧化和载药量偏低等。脂质体包埋血红蛋白(简称LEH)是日本血液代用品研究的主攻产品,历经多年研究^[36]。从2005年日本第12次血液代用品年会上获知,早稻田大学研究的LEH已在日本一家公司进行放大和试制。

4.1.2 可降解聚合物微胶囊包埋血红蛋白:聚乳酸和聚乙二醇类物质会在体内降解,降解速率可通过聚合物的分子量和类型加以调节。随着药物缓释的研究发展,制备粒径为200 nm微胶囊已成为可能。20世纪90年代初期,Chang等用界面聚合法、乳液扩散法和界面沉淀法进行了Hb微胶囊的制备^[3]。作为新一代红细胞代用品,Hb微胶囊具有许多优点。用于包埋的聚乳酸(PLA)等聚合物具生物可降解性,在完成载氧任务后,可降解为对人体无害的乳酸、水和CO₂排出体外,聚合物膜可制备成多孔,机械强度优于脂质体磷脂膜,微胶囊所需膜材较少,形成微胶囊后,血红蛋白的P50、Bohr效应和Hill系数

不发生变化,SOD、Cat和高铁血红蛋白还原酶可与血红蛋白协同包埋,体外实验表明该法对高铁血红蛋白的转化有很好的效果^[3]。我国学者也研究了用聚乳酸-聚乙二醇嵌段聚合物包埋血红蛋白,报道了制备过程的优化研究^[37]。

4.2 血红蛋白与其它蛋白质偶联

红细胞含有过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)等酶类。在临床治疗中风、心肌梗塞或大出血休克时,易出现再灌注损伤。红细胞中的这些氧化还原酶可在一定程度上抑制这种变化。然而,对血红蛋白纯化的同时也除去了这些酶类,因而在严重缺氧时,输入修饰的血红蛋白容易发生再灌注损伤。为抑制这种变化,可以把适量的过氧化氢酶和超氧化物歧化酶交联到血红蛋白分子上形成PolyHb-SOD-CAT^[36]。与单纯聚合血红蛋白相比,PolyHb-SOD-CAT在很大程度上消除了氧自由基及过氧化物。它也能使修饰的血红蛋白稳定,减少Fe³⁺及血红素的析出。另外,它还能抑制聚合血红蛋白制备过程中高铁血红蛋白的形成^[38]。大鼠换血试验结果表明,PolyHb-SOD-CAT对于减少再灌注损伤的机体内羟基再生具有明显效果,有潜力成为一种再灌注损伤治疗剂。目前正在进行临床前动物试验。

我国学者研制的血红蛋白与人血清白蛋白的偶联物(Hb-HSA),兼具有血红蛋白的载氧功能和白蛋白运载营养物质的作用,制备的偶联物具有接近于血液的良好的理化特性,并经大鼠换血试验初步证实其作为红细胞代用品的安全性和有效性^[39]。

4.3 含血红素的重组人血清白蛋白

日本早稻田大学Tsuchida研究小组将合成的血红素共价结合在重组人血清白蛋白分子上,制成的白蛋白-血红素(Albumin-heme)^[40],如图2所示,每个白蛋白分子具8个血红素,与血红蛋白相比具有更高的载氧能力,并且该分子大小适中,较好保持了白蛋白原有特性,不容易透过循环系统而被迅速代谢。动物换血试验显示了产品的有效性^[41]。

上述各种血红蛋白修饰和改性技术都有其独特之处,所开发的产品也有不同的用途,产品开发亦处于不同阶段。总的说来,美国对血液代用品的投资最多,其研究走在世界的前列,已有六家公司研制的修饰血红蛋白进入临床试验。加拿大、日本和德国也有产品进行了临床试验。表1列出了基于血红蛋白的红细胞代用品临床试验情况。



Fig. 2 Albumin-heme solution is obtained by mixing of synthetic heme with albumin solution

表 1 基于血红蛋白的红细胞代用品研究开发情况^[2, 15, 17, 42]

Table 1 Hb-based blood substitute products in clinical trials

| 产品 | 研究或开发单位 | 采用技术 | 开发进展 | 应用 | 副作用 |
|------------------------------|---|---|------------|--------------------|-------------|
| DCLHb (HemAssist) | 美国 Baxter Healthcare 公司 | 双阿司匹林分子内交联人血红蛋白 | Ⅲ期临床结束后中断 | 外科手术 | 血管收缩, 血压升高 |
| PHP | 德国 Apex Bioscience 公司 | 吡哆醛化人血红蛋白-聚氧乙烯交联物 | Ⅲ期临床 | 脓血症引起的急性低血压休克 | 血压升高 |
| HBOC-201 (Hemopure) | 美国 Biopure 公司 | 戊二醛聚合牛血红蛋白 | Ⅲ期临床结束 | 外科手术(南非); 宠物治疗(美国) | 血管收缩 心脏输出降低 |
| poly-SFH-P (Polyheme) | 美国 North field 公司 | 吡哆醛化的聚合人血红蛋白 | Ⅲ期临床 | 部分外科手术, 外伤 | 未见报道 |
| O-raffinose Hb (Hemolink) | 加拿大 Hemosol 公司 | 开环棉子糖交联人血红蛋白 | Ⅲ期临床(暂停) | 冠状支路搭桥手术 | 血管收缩 |
| RHb1.1/1.2 (Optro) | 美国 Baxter Healthcare 公司/美国 Somatogen 公司(1998年前) | 基因工程血红蛋白 | Ⅱ期临床中断 | 外伤 | 血管收缩, 血压升高 |
| Hemospan | 美国 Sangart 公司 | 马来酰化的 PEG 偶联人血红蛋白 | Ⅱ期临床 | 部分手术 | 未见报道 |
| PEG-Hb | 美国 Enzon 公司 | PEG 修饰血红蛋白 | I 期临床 b 中断 | 放射治疗促进剂 | 引起肠胃上皮细胞脱落 |
| HbV | 日本早稻田大学 | 包埋血红蛋白 | I 期临床 | 外伤 | 循环半衰期短 |
| RHb2.0 | 美国 Baxter Healthcare 公司 | 基因重组人血红蛋白 | 临床前试验 | | |
| HemoZyme | 美国 SynZyme 公司 | 聚合的多硝酰基人血红蛋白(polymerized polynitroxyl hemoglobin) | 临床前试验 | | |
| PolyHb-SOD-CAT | 加拿大 McGill 大学 | 聚合牛血红蛋白与超氧化物歧化酶和过氧化氢酶偶联 | 临床前试验 | | |
| HemoTech | 美国 HemoBioTech 公司 | O-ATP、 α -腺苷和谷胱甘肽修饰的血红蛋白 | 临床前试验 | | |
| OxyVita | 美国 IPBL Pharm. 公司 | 癸二酰阿司匹林交联的血红蛋白 | 临床前试验 | | |

5 修饰血红蛋白主要理化性质及其对功能的影响

修饰血红蛋白的理化特性直接影响其是否适合用作红细胞代用品。Sakai 等人^[43]从粒径、分子量、膜透性、胶体渗透压、粘度、引起红细胞聚集及氧亲和力等几个方面研究了双阿司匹林分子内交联血

红蛋白(XLHb)、聚氧乙烯-磷酸吡哆醛化的血红蛋白(POE-PLP-Hb)、羟乙基淀粉-交联血红蛋白(HES-XLHb)、戊二醛聚合的交联血红蛋白(Poly-XLHb)等非细胞型交联血红蛋白以及细胞型的表面偶联了聚氧乙烯的血红蛋白微囊体(POE-HbV)等修饰血红蛋白的理化性质(表2),并探讨修饰对血红蛋白功能的影响。

表 2 基于血红蛋白的携氧剂及人血红细胞的理化性质

Table 2 Physicochemical properties of Hb-based O₂ carriers and human red blood cell (RBC)

| Parameters | XLHb | POE-PLP-Hb | Poly-XLHb | HES-XLHb | POE-HbV | Blood (RBC) |
|----------------------------------|-------|------------|-----------|----------|--------------|-------------|
| Particle diameter/nm | 7 ± 2 | 22 ± 2 | 47 ± 17 | 68 ± 24 | 224 ± 76 | 8000 |
| Mn/kD | 72 | 186 | 510 | 431 | | |
| Mw/kD | 66 | 189 | 2154 | 2782 | | |
| P ₅₀ /kPa | 4.27 | 1.87 | 2.67 | 2.93 | 2.4(4.27) | 3.73 |
| Hill coefficient | 2.0 | 1.3 | 2.2 | 2.2 | 2.1 | 2.7~3.0 |
| Oxygen transporting efficiency/% | 32 | 17 | 8.0 | 27 | 20 | 28 |
| Content of ferric Hb (MetHb) % | 2.2 | 4.5 | 2.7 | 4.5 | 2.5 | <0.5 |
| Monomeric Hb/% | 100 | 4.4 | 5 | 3.3 | Not detected | |
| [Hb] (g/dL) | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 12~17 |
| Lipid (g/dL) | 0 | 4.5 | 0 | 3.4 | 2.9 | |
| Colloid osmotic pressure/kPa | 2.11 | 9.36 | 0.27 | 1.27 | 0(2.67) | 3.33 |
| Viscosity/cP | 1.0 | 6.1 | 1.5 | 2.2 | 2.6(3) | 3~4 |

5.1 分子大小,分子量及微孔滤膜的透过性

毛细血管及前毛细血管的直径为 5~8 μm ,一些血液循环不好的区域则更小。一个半径 8 μm 两面凹形的红细胞变形成为降落伞形即能够透过窄的毛细血管,而红细胞不能通过小于 3 μm 孔。基于血红蛋白的氧载体均比红细胞小很多,能够透过直径为 0.4 μm 的孔。这些血红蛋白溶液对于血栓或血液阻塞,红细胞流动不充分的组织供氧非常有效。POE-Hbv 在 0.2 μm 孔径的流速几乎为 0,其平均分子直径为 224 μm ,因此 0.2 μm 是它的透过极限。Poly-XLHb 和 HES-XLHb 的膜透过性不如 XLHb, XLHb 对于 0.1 μm 的孔通过性最高。

Hb 在血液中循环时间和内皮细胞的透过性与分子大小相关。XLHb 在 Wistar 鼠体内循环半周期为 1.6h(输入全血的 10%)。其它修饰血红蛋白,如 poly-XLHb 和 POE-Hbv 的循环半寿期长些,分别为 3h 和 4h。血红蛋白分子能够透过网状内皮细胞进入肝脏间隙, Hb 结合 NO,导致明显的窦状小管收缩。Nakai 等人^[44]指出 Hb 的分子大小影响 Hb 对内皮细胞层的透过性及进入平滑肌吸附 NO 的能力。因此,最小的 XLHb 最易透过上皮细胞层,使血管收缩及高血压症状尤为突出。聚合的牛或人血红蛋白在临床试验时期,也有研究报道其影响血管活性,引起高血压。这些理化结果表明需要优化分子粒径。

5.2 粘度

血液在体内的流动是动脉系统血管舒张协同性的重要表征。用扩容剂稀释会降低血液粘度,进而降低剪切力。为了维持壁剪切力和直径,就需要提高粘度。XLHb 的粘度为 1.0cP 并不受剪切速率影响,说明溶液为牛顿型流体,当 Hb 浓度提高到 10

g/dL 时粘度增加到 1.3cP,剪切速率为 332s⁻¹,粘度仍低于血液。对于 POE 偶联的血红蛋白,即使 Hb 浓度仅为血液中 Hb 浓度(15g/dL)的 1/3,溶液粘度也已增加至 6.1cP,明显高于血液的粘度。Poly-XLHb 表现出牛顿型流体特征,粘度为 1.5cP,与临床试验的聚合血红蛋白粘度(1.3~2.2cP)一致。同样 5g/dL 的 HES-XLHb 也显示出牛顿型流体特征,粘度为 2.2cP,但浓度提高至 10g/dL 时粘度也明显提高,为 7.8cP,剪切速率为 332s⁻¹,体现出非牛顿型流体特性,说明可能出现蛋白质聚集。POE-Hbv 悬于 HSA 溶液中,浓度为 5g/dL 和 10g/dL 时,粘度分别为 3cP 和 4cP,与人血液类似。

非细胞型 Hb 溶液粘度较血液低,可能由于低剪切力而引起血管收缩。从粘度和血流速率关系看, XLHb 和 polyXLHb 的粘度与血液相比过低, HES-XLHb 和 POE-Hbv 的 HSA 溶液较合适。

5.3 胶体渗透压

胶体渗透压(COP)与水的静压作用力相反,共同维护血液与组织间隙的液流分布与平衡。COP 是聚集特性参数,取决于有作用力的蛋白质浓度,尤其是大分子蛋白质所占的比例。高 COP 的溶液会引起组织间隙的水穿透毛细血管进入血管腔。

XLHb 的 COP 是 2.11kPa,浓度为 5g/dL,而聚合 XLHb 由于聚合多个血红蛋白分子, COP 降到 0.33kPa, POE-PLP-Hb 的 COP 最高,达 9.61kPa,约为血液的 3 倍(3.33kPa),而此时 Hb 浓度 5g/dL 只有血液浓度的 1/3。用 POE 偶联的牛血红蛋白进行换血,增加了血液的体积和平均动脉压力,换血后血压没有降低^[45]。但 Baldwin 等人报道输入的 POE-Hb 能够促进 POE-Hb 和血浆蛋白的外渗,引起组织水

肿最终导致肠炎^[46]。POE-Hbv 的 COP 为 0kPa, 因为在这种大颗粒悬液中, 与 POE-PLP-Hb 同样 Hb 浓度但颗粒数目不足 POE-PLP-Hb 分子的万分之一。HES-XLHb 由于增加了高度亲水性的 HES, 其 COP 高于 polyXLHb(1.27/3.33kPa)。Poly-XLHb 的 COP 极低, 若要大剂量输入需补充血浆扩容剂以调整溶液的 COP 达到血液水平, 添加剂量取决于 Hb 的浓度和扩容剂蛋白质的分子量。POE-Hbv 没有渗透压效应, 微粒需要悬浮在血浆扩容剂中, 得到的悬液的 COP 与悬浮基质的 COP 完全相同。当 POE-Hb 悬于 5% HSA 溶液中, COP 为 2.67kPa, 不受 Hb 溶液的影响, HSA 的浓度为 8% 时, COP 为 5.20^[47]。

5.4 红细胞聚集

加了 EDTA 的人血与一定体积的每种 Hb 样品分别混合, 用光学显微镜观察红细胞的形状。POE-PLP-Hb 和 HES-XLHb 能够使红细胞聚集, 表明二者组分间的相互作用很强, 活化的 HES 没有表现出明显的聚集, poly-XLHb 混合液形成缙钱体, 说明组分间的相互作用较弱, POE-Hbv 和 XLHb 不使红细胞聚集。通过测定体内粘度证实, 聚集的形成是可逆的。但一旦体内血管中的细胞发生聚集, 血液流动速率和剪切力较低, 将导致血液循环弱区的血流速率和剪切力均降低。据报道, 高分子量的葡聚糖(1000kD)引起 RBC 聚集并降低了周围组织的血流速率^[48]。用 POE-Hb 交换血液产生 RBC 聚集, 提高周围组织的抗性, 导致血液流速降低^[49], POE-Hbv 不引起 RBC 聚集, 说明 RBC 间无相互作用。偶联 POE 通过静电斥力也能够阻止微囊间聚集^[50]。

5.5 氧亲和力

纯化后的无基质 Hb 氧的亲合力很高, $P_{50} < 0.67\text{kPa}$, 由于缺少原存在于血液中的 2,3-DPG 作为变构效应因子, P_{50} 的值影响氧传递效率(OTE), 其由动脉与静脉氧分压(5.33kPa 和 14.67kPa)所对应的氧饱和率的差来表示。人血红细胞和纯化后的血红蛋白的氧传递效率分别为 23% 和 0%, 所以研究基于血红蛋白的氧载体需要提高 P_{50} , 以使其在周围组织循环过程中快速放氧。XLHb 的氧亲和力最低, (P_{50} 高达 4.27kPa), 吡哆醛化的 Hb 减弱了氧亲和力, P_{50} 为 2.80kPa。尽管 POE 交联物增加了氧亲和力, P_{50} 降至 0.53kPa, Hill 系数仅为 1.3, OTE 非常低, 仅 17%, Hill 系数明显降低, 说明四聚体构象从 T 态改变为 R 态, A 个亚基的协同性可能被结合的 POE

链破坏。脱氧条件下(T 态)用戊二醛聚合 XLHb, P_{50} 从 4.27kPa 降至 2.93kPa, 而在氧合条件下(R 态) P_{50} 降至 1.067kPa。因此在脱氧(T 态)条件下聚合防止氧亲和力和升高非常重要。HES 交联的 XLHb 在 T 态下合成能够尽量减少氧亲和力的升高, P_{50} 达 2.93kPa, Hbv 的 P_{50} 可调整到 0.67kPa ~ 20kPa, 通过包埋适当的 PLP 或六磷酸肌醇作为变构因子^[51], 其中 PLP 与 Hb 摩尔数相同, P_{50} 可调整至 2.40kPa, 当摩尔比 PLP:Hb = 3:1 时, P_{50} 为 4.27kPa。

血液氧亲和力 P_{50} 是决定对组织传递及释放氧能力的关键因素。相对于红细胞, O_2 平衡曲线右移(低 O_2 亲和力, 高 P_{50})利于氧向组织中释放, 降低心脏输出, 增强血管对氧消耗量或血压缺乏变化时的抵抗力。另一方面, O_2 平衡曲线左移只在严重缺氧情况下才有优势。据推测对于这种氧载体, 只有与红细胞的氧亲和力相同或更低时, 才能提高氧传递效率, 使 O_2 释放。对于基于 Hb 的氧载体, 最适 P_{50} 的确切数值在目前仍未有定论。

表 3 列出了 4 种已经进入临床试验的红细胞代用品的产品特性, 包括血红蛋白浓度、高铁血红蛋白浓度、 P_{50} 、希尔系数(Hill coefficient)等^[10]。从中可以看出有些性能或指标的差异很大, 例如 P_{50} , 最低为 0.72kPa, 最高达 5.07kPa。

6 红细胞代用品研究面临的挑战

生物体具有复杂性和多样性。创造一种新的溶液暂时替代与生命密切相关的血液或红细胞, 这是对人类一项的挑战。通过近一个世纪的不懈努力, 红细胞代用品研究已经取得显著进展。目前还有以下一些难题需要解决。

6.1 修饰血红蛋白的最适生理指标仍无定论

生物自身存在的即是最优和最适的, 开发的各种红细胞代用品均无法保持红细胞原有的各种生理特性。修饰血红蛋白溶液不含有红细胞内众多的微量组分, 大部分制备的红细胞代用品也不具备红细胞的膜结构, 因此胶体渗透压、粘度等特性与血液差异较大。更重要的是修饰血红蛋白的分子量大小和氧亲和力 P_{50} 这两个参数, 它们是决定在体内能否行使载氧功能, 是否会产生副作用的关键因素。分子量过小, 如单体血红蛋白和分子内交联的血红蛋白, 容易透过血管壁和肾小球, 循环半衰期短, 且可能造成血压升高等副作用。据报道, 分子量过高

(> 500kD),可能会阻塞循环系统,引起网状内皮系统功能阻断及刺激免疫应答等不良反应^[3]。而确切

的最佳分子量需要通过单一分子量的临床试验才能确定,至今尚无定论。

表3 典型修饰血红蛋白产品特性

Table 3 Properties of typical modified hemoglobin

| Property | HBOC-201 | Polyheme | Hemospan | Hemolink™ |
|----------------------------------|-----------------------------|--|----------|--|
| Hemoglobin(g/dL) | 12 ~ 14 | 12 ~ 14 | 4.2 | 10 |
| Methemoglobin/ % | < 10% | < 5% | < 5% | < 10% |
| P ₅₀ /kPa | 5.07 | 2.40 ~ 2.93 | 0.72 | 4.53 |
| Hill coefficient | 1.3 | 1.3 | 1.2 | 1 |
| pH | 7.6 ~ 7.9 | 7.4 | | 7.5 |
| Endotoxin(EU/mL) | < 0.5 | < 0.5 | | < 0.06 |
| Colloid osmotic pressure/kPa | 2.4 | 2.67 ~ 3.33 | 6.53 | 3.20 |
| Molecular weight distribution/kD | 130 ~ 500 | 64 ~ 400 (Number average molecular weight 150kD) | 90 | 32kD ≤ 5% 64kD 33 ± 10% 128 ~ 600kD 63 ± 12% > 600kD ≤ 3% |
| Half-life in humans | 24 ~ 36h | 24h | | 18 ~ 20h |
| Shelf life | 2 years at room temperature | 1 year refrigerated | | 1 year refrigerated |

修饰的血红蛋白 P₅₀ 相对于天然血红蛋白有较大改变,通常与正常的 3.73kPa 相比过高或过低。如已进入 II 期临床试验的 PEG 修饰的血红蛋白 (Hemospan™)P₅₀ 约为 0.67kPa^[30],已用于宠物失血休克治疗的戊二醛聚合血红蛋白 (HBOC-301)P₅₀ 约 4.53kPa^[10]。后者经大量动物和临床试验证明,治疗缺血缺氧症效果显著。但也有研究指出,较低 P₅₀ 的血红蛋白在体内氧分压较低的组织或部位 (如血液循环末端),能够释放所运载的氧气,使血红蛋白在最缺乏氧气的部位发挥传氧功能。而 P₅₀ 过高,即氧释放能力过强的血红蛋白,刚刚结合氧气,还未抵达需要的组织就已提前释放,没能起到输血补氧的功能,因此略低的 P₅₀ 要优于过高 P₅₀,并有助于提高输入红细胞代用品的利用效率^[43]。最适合的氧亲和力还需要在临床上长期的探索。

6.2 产品组成复杂,不易推断产生副作用的原因

某些红细胞代用品在临床前或临床试验中出现了副作用,分析和鉴定产生不良反应的原因,往往需要排除其它因素干扰,逐项考察。但由于大部分修饰血红蛋白产品的组成复杂,是分子量分布不均一的混合物,使得对原因的推断具有一定的局限性。这也是如今大部分血红蛋白类红细胞代用品共有的难题。

修饰血红蛋白产品组成不均一,主要是由于修饰反应复杂,不易控制。目前有研究采用新的修饰方式增强反应的可控性。如 Sangart 公司采用修饰血红蛋白表面的氨基同时引入巯基的方式,偶联马

来酰化的 PEG,使 PEG 修饰反应具有较强的专一性,得到平均分子量 90kD、分布均一的 PEG 修饰血红蛋白^[30]。本研究小组发展了固相辅助修饰技术,利用固相介质吸附的空间作用和蛋白质之间的位阻效应,制备了分子量均一的两个蛋白质的偶联物^[52,53]。现有的控制修饰技术还处于发展阶段,仅局限于部分修饰血红蛋白产品,需要建立一系列修饰技术平台,以实现多种产品的控制性制备,并结合相应产品的临床试验综合研究。

6.3 临床试验出现意外

至今已有很多进行动物试验以及临床试验的血红蛋白类红细胞代用品,经试验证明均具有一定的生物安全性和有效性。但随着研究和试验的深入,这些产品又不断受到安全性和有效性的挑战。尤其有些红细胞代用品顺利通过 I 期临床试验,但在其后的 II、III 期临床中出现各种明显副作用。临床前的动物实验没能完全预见临床试验可能出现的副作用。由于试验动物的基因和生理情况与病人不完全相同,而且使用的动物基本上都是年轻和健康的,并在麻醉的条件下使其失血,因此不能模拟处于疾病状态的患者的真实情况^[41]。这些差异为客观判断红细胞代用品的安全和效用带来困难。目前,如何减少或降低临床试验结果与临床前试验的不一致性问题仍有待进一步探索。

7 发展新趋势——氧治疗剂

随着研究和临床试验的深入,人们发现制造完

全的血液代用品或者红细胞代用品难度极大,由于其组成极其复杂,很难真正模拟血液,但是作为氧治疗剂进行开发研究具有很强的现实意义。氧是身体的基本要素,因此氧治疗剂的定义非常广泛,甚至包括现有的用作红细胞代用品的人工携氧剂,负责将氧传递到缺氧的组织和器官。典型的发展是用于肿瘤治疗,肿瘤组织的血液灌注困难,用放射治疗可以更有效供氧。最新动物试验表明,聚合血红蛋白溶液能够在放射治疗中促进肿瘤组织的灌注,是有效的氧治疗剂^[3]。Chang 研究组等进一步发展了聚合血红蛋白与酪氨酸酶的复合物,在为肿瘤放射治疗供氧的同时,降低肿瘤滋长所需的酪氨酸含量,遏制肿瘤扩散^[54]。

8 我国的红细胞代用品研究

我国红细胞代用品研究起步于 20 世纪 70 年代,中国科学院上海有机化学研究所成功地合成了氟碳携氧剂,进行了 300 多例临床试验。20 世纪 90 年代,中国科学院过程工程研究所致力于修饰血红蛋白作为红细胞代用品的研究,解决了血红蛋白在分离纯化中的不稳定性,获得了高纯度、高收率的血红蛋白,探索了 PEG 修饰血红蛋白、戊二醛交联血红蛋白、辛二酸二琥珀酰亚胺酯修饰血红蛋白等人红细胞代用品^[52, 53, 55-58]的工程化技术。由国家科技部组织的“863”重大项目《人工血液代用品的研究》发展了 PEG 化血红蛋白技术,经北京凯正生物工程发展有限责任公司开发产品,已于 2003 年进入 I 期临床,是我国唯一被批准进入临床试验的红细胞代用品。在已有工作的基础上进一步发展,我国科研人员设计并研制了血红蛋白与人血清白蛋白偶联物^[39],作为新一代的红细胞代用品,申请了国际发明专利^[58]。2003 年和 2005 年分别在日本和美国召开的国际血液代用品大会上,我国的研究成果得到了国内外专家的高度评价。除了中科院过程工程研究所和凯正公司的研究外,医科院成都输血研究所和西北大学进行了聚合血红蛋白用作红细胞代用品的探索,中科院上海生物化学研究所、军事医学科学院、浙江大学、天津大学等单位近年来也开展了修饰血红蛋白理化性质方面的研究^[59, 60]。可以说红细胞代用品的研制正日益受到更广泛的关注。

血液代用品的研究涉及人类健康,关系到紧急情况下抢救生命的需求,是一项宏伟、充满希望的探索,同时也是一条艰难坎坷之路。生物体具有复杂性和多样性。创造一种新的溶液暂时替代与生命密

切相关的血液或红细胞,这是对人类一项的挑战。通过近一个世纪的不懈努力,红细胞代用品研究已经取得显著进展。而美国、加拿大、日本的同行已经走在我们的前面。至今与红细胞代用品相关的欧美日专利已有 150 篇左右,几乎都来自美国、加拿大和日本,而目前我国只有一篇国际专利^[58]。因此需要开发更多的具有我国自主知识产权的红细胞代用品。作为拥有 13 亿多、约占世界 1/4 人口的国家,在进行现代化建设的同时,必须提高人民健康水平,做好应对各种突发事件的准备,各种血液代用品的研究意义重大。虽然我国起步晚,但所采用的是有自主知识产权的制备技术,有潜力和能力达到国际先进水平,关键是扎扎实实地开展研究,在产物结构设计和工艺设计上达到最优,在中试和生产上达到严格的 GMP 标准,在生物学实验和临床应用上进行深入探索。

致谢 感谢中国科学院过程工程研究所的苏志国研究员审阅本综述。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Winslow RM. Hemoglobin-Based Red Cell Substitute. Baltimore and London: John Hopkins University Press, 1992
- [2] Liu Q (刘谦), Su ZY (苏志国), LIN JH (林锦湖). Artificial Blood Substitutes. In Biotechnology Drug. Beijing: Science Press, 2001
- [3] Chang TMS. Blood Substitutes: Principle, Methods, Products and Clinical Trials. Basel: Karger Publisher, 1997
- [4] Kim HW, Greenburg AG. Artificial oxygen carriers as red blood cell substitutes: a selected review and current status. *Artificial Organs*, 2004, **28**(9): 813-828
- [5] Sheffield CL, Spates GE *et al.* Preparation of lipid-free human hemoglobin by dialysis and ultrafiltration. *Biotechnol Appl Biochem*, 1987, **9**: 230-238
- [6] Shorr RG, Nho K, Cho MO. Process for Hemoglobin Extraction and Purification. US Patent 5264555, 1993-11-23
- [7] Lu XL, Zhao DX, Su ZG. Purification of hemoglobin by ion exchange chromatography in flow-through mode with PEG as an escort. *Art Cells Blood Subs and Biotech*, 2004, **32**(2): 209-227
- [8] Zhao DX (赵东旭), Wei XG (韦新桂), Gu ZY (谷振宇) *et al.* Preparation of bovine lipid-free hemoglobin. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报) 2002, **18**(5): 609-613
- [9] Lu XL, Zhao DX, Ma GH, Su ZG. Polyethylene glycol increases purification and recovery, alters retention behavior in flow-through chromatography of hemoglobin. *J Chromatogr A*, 2004, **1059**(1-2): 233-237
- [10] Rudolph AS, Rabinovici R, Feuerstein GZ. Red Blood Cell

- [11] Bleeker WK , Van Der Plas J *et al.* Prolonged vascular retention of a hemoglobin solution modified by cross-linking with 2-nor-2-formyl pyridoxal 5'-phosphate. *J Lab Clin Med* , 1986 **108** :448 – 55
- [12] D 'Agnillo F , Alayash A I. Site-specific modifications and toxicity of blood substitutes , the case of diaspirin cross-linked hemoglobin. *Advanced Drug Delivery Reviews* , 2000 , **40** :199 – 212
- [13] Barve A , Sen AP , Saxena PR *et al.* Dose response effect of diaspirin crosslinked hemoglobin (DCLHb) on systemic hemodynamics and regional blood circulation in rats. *Art Cells Blood Subs Immob Biotech* , 1997 , **25** :75 – 84
- [14] Palaparthi R , Wang H , Gulati A. Current aspects in pharmacology of modified hemoglobins. *Advanced Drug Delivery Reviews* , 2000 , **40** :185 – 198
- [15] Looker D , Abbott-Brown D , Cozart P *et al.* A human recombinant hemoglobin designed for use a blood substitute. *Nature* , 1992 , **356** :258 – 260
- [16] Rioux F , Drapeau G , Marceau F. Recombinant human hemoglobin (rHb1.1) selectively inhibits vasorelaxation elicited by nitric oxide donors in rabbit isolated aortic rings. *J Cardiovasc Pharmacol* , 1995 **25** :587 – 594
- [17] Winslow RM. Current status of blood substitute research : towards a new paradigm. *J Internal Med* , 2003 **253** :508 – 517
- [18] Vlahakes GJ , Lee R , Jacobs EEJ , Austen WG *et al.* Hemodynamic effects and oxygen transport properties of a new blood substitute in a model of massive blood replacement. *J Thorac Cardiovasc Surg* , 1990 , **100** :379 – 388
- [19] Lee R , Neya K , Svizzero TA *et al.* Limitations of the efficacy of hemoglobin-based oxygen-carrying solutions. *J Appl Physiol* , 1995 , **79** :236 – 242
- [20] Johnson JL , Moore EE , Offner PJ *et al.* Resuscitation of the injured patient with polymerized stroma-free hemoglobin does not produce systemic or pulmonary hypertension. *Am J Surg* , 1998 , **176** :612 – 617
- [21] Scatena R , Giardina B. O-raffinose-polymerised haemoglobin. A biochemical and pharmacological profile of an oxygen carrier. *Expert Opin Biol Ther* , 2001 , **1**(1) :121 – 127
- [22] Cheng DC. Safety and efficacy of o-raffinose cross-linked human hemoglobin (Hemolink) in cardiac surgery. *Can J Anaesth* , 2001 , **48** :S41 – 48
- [23] Herod S. Mechanistic studies of the oxidation of pyridoxalated hemoglobin polyxyethylene conjugate by nitrogen monoxide. *Arch Biochem Biophys* , 1999 , **372** :393 – 398
- [24] Conover CD , Malatesta P , Lejeune L *et al.* The effects of hemodilution with polyethylene glycol bovine hemoglobin (PEG-Hb) in a conscious porcine model. *J Invest Med* , 1996 **44** :238 – 246
- [25] Jammicki M , Bombeli T , Seifert B *et al.* Low-and medium-molecular-weight hydroxyethyl starches : comparison of their effect on blood coagulation. *Anesthesiology* , 2000 , **93**(5) :1231 – 1237
- [26] Conover CD , Gilbert CW , Shum KL *et al.* The impact of polyethylene glycol conjugation on bovine hemo globin 's circulatory half-life and renal effects in a rabbit top-loaded transfusion model. *Art Organs* , 1997 , **21** :907 – 915
- [27] Nakai K , Ohta T , Sakuma I *et al.* Inhibition of endothelium-dependent relaxation by hemoglobin in rabbit aortic strips : comparison between acellular hemoglobin derivatives and cellular hemoglobins. *J Cardiovasc Pharmacol* , 1996 , **28** :115 – 123
- [28] Nozue M , Lee I , Manning JM *et al.* Oxygenation in tumors by modified hemoglobins. *J Surg Oncol* , 1996 **62** :109 – 114
- [29] Conover CD , Lejeune L , Shum K *et al.* Physiological effect of polyethylene glycol conjugation on stroma-free bovine hemoglobin in the conscious dog after partial exchange transfusion. *Art Organs* , 1997 , **21** :369 – 378
- [30] Winslow RM. MP4 , a new nonvasoactive polyethylene glycol-hemoglobin conjugate. *Art Organs* , 2004 , **28** :800 – 806
- [31] Acharya SA , Intaglietta M , Tsai AG *et al.* Enhanced molecular volume of conservatively PEGylated Hb (SP-PEG5K)6 -HbA is non-hypertensive. *Art Cells Blood Subs and Biotech* , 2005 , **33**(3) :238 – 248
- [32] Iwasaki K , Iwashita Y. Preparation and evaluation of hemoglobin-polyethylene glycol conjugate (pyridoxalated polyethylene glycol hemoglobin) as an oxygen-carrying resuscitation fluid. *Art Organs* , 1986 **10** :411 – 416
- [33] Chang TMS. Semi-permeable microcapsules. *Science* , 1964 , **146** :524 – 525
- [34] Chang TMS. Recent and future developments in modified hemoglobin and microencapsulated hemoglobin as red blood cell substitutes. *Art. Cells , Blood subs. , and Immob. Biotech* , 1997 , **25**(1-2) :1 – 24
- [35] Djordjevich L , Miller IF. Synthetic erythrocytes from lipid encapsulated hemoglobin. *Exp Hematol* , 1980 , **8** :584
- [36] Kobayashi K , Tsuchida , Horinouchi H. *Artificial Oxygen Carrier*. Tokyo : Springer-Verlag. 2005
- [37] Meng FT , Ma GH , Liu YD *et al.* Microencapsulation of bovine hemoglobin with high bio-activity and high entrapment efficiency using a W/O/W double emulsion technique. *Colloid & Surfaces B : Biointerfaces* , 2004 , **33** :177 – 183
- [38] D 'Agnillo F , Chang TMS. Polyhemoglobin-superoxide dismutase-catalase as a blood substitute with antioxidant properties. *Nature Biotechnol* , 1998 , **16**(7) :667 – 671
- [39] Lu XL , Zheng CY , Shi XD *et al.* Conjugate of bovine hemoglobin and human serum albumin as a candidate for blood substitute : characteristics and effects on rats. *Art Cells Blood Subs and Biotech* , 2005 , **33**(2) :83 – 99
- [40] Komatsu T , Hamamatsu Y , Takeoka S *et al.* Human serum albumin-bound synthetic heme as an oxygen carrier : determination of equilibrium Constants of Heme Binding to Host Albumin. *Art Cells Blood Substit & Biotech* , 1998 , **26** :519 – 528
- [41] Tsuchida E , Komatsu T , Hamamatsu K *et al.* Exchange transfusion of albumin-heme as an artificial O₂-infusion into anesthetized rats : physiological responses , O₂-delivery and reduction of the oxidized heme sites by red blood cells. *Bioconjugate Chem* , 2000 , **11** :46 – 50

- [43] Sakai H , Yuasa M , Onuma H *et al.* Synthesis and physicochemical characterization of a series of hemoglobin-based oxygen carriers : objective comparison between cellular and acellular types. *Bioconjugate Chem* , 2000 , **11** : 56 – 64
- [44] Nakai K , Sakuma I , Ohta T *et al.* Permeability characteristics of hemoglobin derivatives across cultured endothelial cell monolayers. *J Lab Clin Med* , 1998 , **132** : 313 – 319
- [45] Migita R , Gonzales A , Gonzales ML *et al.* Blood volume and cardiac index in rats after exchange transfusion with hemoglobin-based oxygen carriers. *J Appl Physiol* , 1997 , **82** : 1995 – 2002
- [46] Baldwin AL , Wilson LM , Valeski JE. Ultrastructural effects of intrascularily injected polyethylene glycol-hemoglobin in intestinal mucosa. *Am J Physiol* , 1998 , **275** : H615 – 625
- [47] Sakai H , Tsai AG , Rohlfis RJ *et al.* Microvascular responses to hemodilution with Hb vesicles as red blood cell substitutes : influence of O₂ affinity. *Am J Physiol* , 1999 , **275** : H553 – 562
- [48] Gustafsson L , Appelgen L , Myrvold HE. Blood flow and in vivo apparent viscosity in working and nonworking skeletal muscle of the dog after high and low molecular weight dextran. *Circ Res* , 1981 , **48** : 465 – 469
- [49] Alonsozana GLG , Elfath MD , Mackenzie C *et al.* In vitro interference of the red cell substitute pyridoxalated agulation , and clinical chemistry testing. *J Cardiothoracic Vasc Anesth* , 1997 , **11** : 845 – 850
- [50] Sakai H , Takeoka S , Park SI *et al.* Surface-modification of hemoglobin vesicles with poly(ethylene glycol) and effects on aggregation , viscosity and blood flow during 90%-exchange transfusion in anesthetized rats. *Bioconjugate Chem* , 1997 , **8** : 15 – 22
- [51] Wang L , Morizawa K , Tokuyama S *et al.* Modulation of oxygen-carrying capacity of artificial red cells(ARC). *Polym Adv Technol* , 1992 , **4** : 8 – 11
- [52] Hu T , Su ZG. A solid phase adsorption method for preparation of bovine serum albumin-bovine hemoglobin conjugate. *J Biotechnol* , 2003 , **100** : 267 – 275
- [53] Hu T , Su ZG. Bovine serum albumin-bovine hemoglobin conjugate as a candidate blood substitute. *Biotechnol Lett* , 2002 , **24**(12) : 1027 – 1030
- [54] Yu BL , Chang TMS. In vitro and in vivo effects of polyhemoglobin-tyrosinase on murine B16F10 melanoma. *J Melanoma Research* , 2004 , **14**(3) : 197 – 202
- [55] Lu XL , Zheng CY , Xu YH *et al.* Disuccinimidyl suberate cross-linked hemoglobin as a novel red blood cell substitute. *Science in China* , 2005 , **48**(1) : 48 – 60
- [56] Li WJ , Zhang DL , Su ZG. Purification and identification of PEGylated hemoglobin , a potential blood substitute , by chromatography and capillary electrophoresis. *Chromatographia* , 2000 , **52** : 451 – 454
- [57] Hu T , Su ZG. Preparation of well-defined bovine poly-hemoglobin based on di-methyl adipimidate and glutaraldehyde cross-linkage. *BBRC* 2002 , **293** : 958 – 961
- [58] Su ZG , Lu XL , Zheng CY *et al.* Hemoglobin conjugate and the preparation method and its use. WO 2004089404 , 2004-10-21
- [59] Hong M(洪民) , Song WJ(宋文俊) , Li SY(李士云) *et al.* The influence on oxygen carrying capacity of porcine hemoglobin while attached PEG to increase its total molecular weight. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报) 2000 , **16**(1) : 22 – 26
- [60] Bai JS(白坚石) , Bu FR(卜凤荣) , Li S(李松) *et al.* Preparation of Erythrocyte Substitute by Modification of Bovine Hemoglobin with mPEG. *Clin J Biologicals*(中国生物制品学杂志) , 2002 , **15**(2) : 97 – 100