



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104644613 A

(43) 申请公布日 2015.05.27

(21) 申请号 201510069253.9

A61P 9/10(2006.01)

(22) 申请日 2015.02.10

A61P 35/00(2006.01)

(71) 申请人 中国人民解放军军事医学科学院野
战输血研究所

地址 100850 北京市海淀区太平路 27 号

(72) 发明人 周虹 赵莲 王瑛 卢明子 陈赣
王权 尤国兴 赵敬湘 王波
尹玉静

(74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限
公司 11322

代理人 鲁兵

(51) Int. Cl.

A61K 9/51(2006.01)

A61K 47/34(2006.01)

A61K 38/42(2006.01)

A61P 7/08(2006.01)

A61P 39/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书11页 附图6页

(54) 发明名称

PEG-PLGA 包裹血红蛋白

(57) 摘要

本发明公开了一种血红蛋白氧载体—PEG-PLGA 包裹血红蛋白。本发明的 PEG-PLGA 包裹血红蛋白是将血红蛋白用聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸嵌段共聚物 (PEG-PLGA) 纳米粒包裹后得到的包裹血红蛋白,其粒径分布均一,分散性好,氧亲和力高,具备良好的供氧效果,可应用于全身或局部缺氧,或者体外需要供氧的体系。本发明的血红蛋白氧载体—PEG-PLGA 包裹血红蛋白将作为血液代用品在医学领域中发挥重要作用,应用前景广阔。

1. 一种血红蛋白氧载体—PEG-PLGA 包裹血红蛋白,是将血红蛋白用聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸嵌段共聚物 (PEG-PLGA) 包裹后得到的包裹血红蛋白纳米粒子。

2. 根据权利要求 1 所述的 PEG-PLGA 包裹血红蛋白,其特征在于:所述 PEG-PLGA 包裹血红蛋白的平均粒径为 143.1-267.4nm,具体为 143.1nm、150.6nm、155.9nm、159.1nm、168.4nm、170.2nm、175.2nm、180.5nm、185.3nm、190.6nm、196.3nm、200.6nm、205.8nm、216.8nm、230.9nm、248.1nm 或 267.4nm,优选 196.3nm,且粒径分布均一,多分散性指数 (PDI) 为 0.149,粒径分布集中。

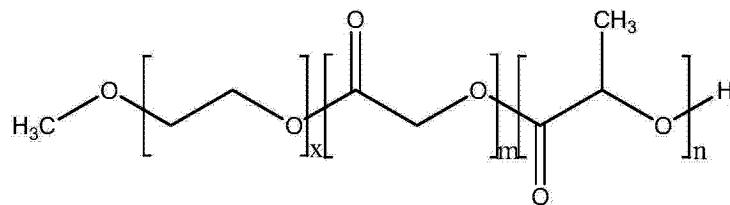
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的 PEG-PLGA 包裹血红蛋白,其特征在于:所述 PEG-PLGA 与血红蛋白的质量比为 5:4-5:12,具体为 5:4、5:5、5:6、5:7、5:8、5:9、5:10、5:11 或 5:12,优选为 5:6。

4. 根据权利要求 3 所述的 PEG-PLGA 包裹血红蛋白,其特征在于:所述 PEG-PLGA 对血红蛋白的包封率为 43.75-75.00%,具体为 43.75%、44.60%、50.89%、53.00%、55.00%、57.92%、62.00%、64.17%、70.00%、72.00% 或 75.00%,优选为 55.00%。

5. 根据权利要求 1 所述的 PEG-PLGA 包裹血红蛋白,其特征在于:所述 PEG-PLGA 包裹血红蛋白具备携放氧功能,其 P50 值为 13-17,具体为 13.06、13.98、14.20、14.59、16.37、16.63,氧亲和力高。

6. 根据权利要求 1 至 5 任一所述的 PEG-PLGA 包裹血红蛋白,其特征在于:所述血红蛋白来源于过期人血、猪血或牛血等,优选为牛血红蛋白。

7. 根据权利要求 1 至 6 任一所述的 PEG-PLGA 包裹血红蛋白,其特征在于:共聚物 PEG-PLGA 结构式为:



其中,x、m、n 为整数,x 取值范围为 90-130,m 取值范围为 60-90,n 取值范围为 70-100;

可选择的,共聚物 PEG-PLGA 中聚乙二醇链段的重均分子量为 1000-5000Da,具体为 000Da、2000Da、3000Da、4000Da 或 5000Da,聚乳酸羟基乙酸链段的重均分子量为 4500-45000Da,具体为 4500Da、5000Da、7500Da、9000Da、10000Da、20000Da、30000Da、40000Da 或 45000Da;

可选择的,聚乳酸羟基乙酸链段由乳酸和羟基乙酸两种单体聚合而成,其中乳酸和羟基乙酸两种单体的摩尔比为 75:25 或 50:50。

8. 根据权利要求 1 至 7 任一所述的 PEG-PLGA 包裹血红蛋白,其特征在于:用以下步骤制备得到:

1) 将 PEG-PLGA 溶于有机溶剂乙酸乙酯得到 PEG-PLGA 溶液,再将其与血红蛋白的水溶液混合、超声,形成初乳;PEG-PLGA 溶液的浓度为 10-30mg/mL,具体为 10mg/mL、11mg/mL、12mg/mL、15mg/mL、17mg/mL、19mg/mL、20mg/mL、22mg/mL、24mg/mL、26mg/mL、27mg/mL、28mg/mL、29mg/mL 或 30mg/mL,优选为 20mg/mL;血红蛋白水溶液的浓度为 60-240mg/mL,具体为 60mg/mL、70mg/mL、80mg/mL、90mg/mL、100mg/mL、110mg/mL、120mg/mL、140mg/mL、160mg/mL、

180mg/mL、190mg/mL、200mg/mL、210mg/mL、220mg/mL、230mg/mL 或 240mg/mL, 优选为 120mg/mL;

2) 向初乳中加入表面活性剂溶液, 混合、超声, 形成复乳; 表面活性剂为聚乙烯醇 (PVA) 水溶液或 PVA 与丙二醇嵌段聚醚 (F68) 水溶液的混合物; PVA 水溶液和 F68 水溶液的总体积为 10 体积份, 其中, PVA 水溶液和 F68 水溶液的体积比为 1:1-9:1, 具体为 1:1、2:1、3:1、3:2、4:1、4:2、4:3、5:1、5:2、5:3、5:4、6:1、6:5、7:1、7:2、7:3、7:4、7:5、7:6、8:1、8:3、8:5、8:7 或 9:1, 优选为 7:3; 所述 PVA 水溶液和 F68 水溶液的浓度为 2wt%;

3) 将复乳在室温下减压旋转蒸发以挥发除掉乙酸乙酯, 离心, 除去上清液, 得到 PEG-PLGA 包裹血红蛋白。

9. 根据权利要求 8 所述的 PEG-PLGA 包裹血红蛋白, 其特征在于:

步骤 1) 中的超声处理条件为: 用超声细胞破碎仪在 80-100W 功率下于冰水浴中超声 3-5min 以形成初乳;

步骤 2) 中的超声处理条件为: 用超声细胞破碎仪在 200-250W 功率下于冰水浴中超声 3-5min 以形成复乳;

步骤 3) 中用旋转蒸发器减压旋转蒸发, 6000-13000rpm 离心 8-15min 后除去上清液。

10. 权利要求 1-9 任一所述的血红蛋白氧载体-PEG-PLGA 包裹血红蛋白作为血液代用品在医学领域中的应用。

PEG-PLGA 包裹血红蛋白

技术领域

[0001] 本发明属于医学领域中的血液代用品,特别是涉及一种新型血红蛋白氧载体—PEG-PLGA 包裹血红蛋白及其应用。

背景技术

[0002] 输血在外科医学和战伤救治中具有举足轻重的作用,血液的供给来源和安全性问题越来越受到人们关注。由于血液代用品具有“通用性好、安全性高、保质期长”的优点,使得血液代用品的研发具有重要意义且备受关注。其中,基于血红蛋白的氧载体(hemoglobin-based oxygen carriers, HBOCs)是血液代用品领域的研究热点,其分为化学修饰的血红蛋白、血红蛋白和各种酶体的偶联物、类细胞结构包裹血红蛋白三类。其中,类细胞结构包裹血红蛋白是将血红蛋白外面用膜包裹,使之更加接近红细胞的实际结构,称作包裹血红蛋白,可避免血红蛋白直接与周围组织及血液的其它成分直接作用,防止血管收缩、避免肾毒性、提高体内循环时间。类细胞结构包裹血红蛋白根据材料不同可分为脂质体包裹血红蛋白和高分子材料包裹血红蛋白。脂质体包裹血红蛋白过程中会发生脂质体过氧化,还原酶系统不能穿过脂质体膜使血红蛋白易氧化。与脂质体相比,生物可降解的高分子材料在包裹血红蛋白中具有以下优势:机械强度高;制备过程易于控制粒子大小、颗粒厚度;体内循环时间和稳定性更强;其设计的灵活性和智能化更易连接更长的 PEG 链。

[0003] 生物可降解的聚乳酸-羟基乙酸共聚物 [poly(D, L-lactide-co-glycolid), PLGA] 是由丙交酯 (LA) 和乙交酯 (GA) 两种单体聚合而成的高分子共聚物,是目前大量应用于载药控释系统的合成高分子生物降解材料,其降解机制为在体内水解脱脂生成乳酸单体,并在乳酸脱氢酶作用下生成丙酮酸,作为能量代谢物质之一参与体内三羧酸循环。PLGA 具有良好的生物相容性,没有明显的炎症反应、免疫反应和细胞毒性反应。PLGA 已被美国 FDA 批准正式作为药用辅料进了美国药典,近年来也用于缓释药物载体以及其它人体植入的装置材料之一。以 PLGA 为载体制成的纳米粒具有缓释性,可减少给药次数和药量,增强其靶向作用及药效,因此得到广泛应用。Chang 等在 1997 年曾用 PLA、PLGA 和 polyisobutyrylcyanoacrylate 混合物作为一种包材包裹血红蛋白,粒径分布从 70nm 到 1110nm,但其安全性和体内有效性未见报道 (Chang TMS, Yu WP. Biodegradable polymer membrane containing hemoglobin for oxygen carrier. US Patent 5670173, 1997.)。

[0004] PEG (英文全称: polyethylene glycol, 中文名称: 聚乙二醇) 是一种由环氧乙烷与水或乙二醇逐步加成聚合而成的材料,具有亲水性好、减少蛋白质附着 / 覆盖在纳米粒子表面、减少单核吞噬细胞系统 (mononuclear phagocyte system, MPS) 中巨噬细胞吞噬、延长体内的循环时间等优点,因此,可应用于隐形眼镜用液、合成润滑油、制作亲水性抗凝血聚氨酯、医用高分子材料表面改性和药物缓释及固定化酶的载体等。PEG 同样没有毒性,无免疫原性,并且可生物降解,其降解产物易于从体内排出而不蓄积。

[0005] CN1419936A 公开了一种血红蛋白微胶囊血液代用品及其制备方法,该发明通过双乳化法制备的微胶囊含有一种或多种聚乳酸单甲氧基聚乙二醇共聚物和血红蛋白,此发明

制备得到的血红蛋白微胶囊的粒径为几个微米,粒径较大,容易被单核吞噬细胞系统中巨噬细胞吞噬,在体内的循环时间较短。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种新型血红蛋白氧载体—PEG-PLGA 包裹血红蛋白。

[0007] 本发明所提供的 PEG-PLGA 包裹血红蛋白,是将血红蛋白用聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸嵌段共聚物 (PEG-PLGA) 纳米粒包裹后得到的包裹血红蛋白。

[0008] 其中所述 PEG-PLGA 与血红蛋白的质量比为 5:4-5:12,发明人制备中使用的数据例如有 5:4、5:5、5:6、5:7、5:8、5:9、5:10、5:11 或 5:12,优选为 5:6。

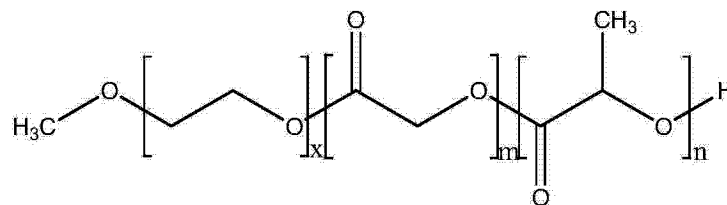
[0009] 其中所述 PEG-PLGA 对血红蛋白的包封率为 43.75-75.00%,发明人已成功制备的例如有 43.75%、44.60%、50.89%、53.00%、54.00%、57.92%、62.00%、64.17%、70.00%、72.00%或 75.00%,优选为 55%。

[0010] 所述 PEG-PLGA 包裹血红蛋白的平均粒径为 143.1-267.4nm,发明人已成功制备的粒子其平均粒径例如有 143.1nm、150.6nm、155.9nm、159.1nm、168.4nm、170.2nm、175.2nm、180.5nm、185.3nm、190.6nm、196.3nm、200.6nm、205.8nm、216.8nm、230.9nm、248.1nm 或 267.4nm,优选使用平均粒径 196.3nm 的 PEG-PLGA 包裹血红蛋白。粒径分布均一,多分散性指数 (PDI) 为 0.149,粒径分布集中。

[0011] 所述 PEG-PLGA 包裹血红蛋白具备携放氧功能,其 P50 值均小于血红蛋白的 P50(血红蛋白 P50 为 22-24),发明人已成功制备的测试数据例如有 13.06、13.98、14.20、14.59、16.37、16.63,表明氧亲和力高。

[0012] 这里,共聚物 PEG-PLGA 结构式如下:

[0013]



[0014] 其中, x、m、n 为整数, x 取值范围为 90-130, m 取值范围为 60-90, n 取值范围为 70-100。

[0015] 优选地,乙二醇-聚乳酸羟基乙酸嵌段共聚物中聚乙二醇链段的重均分子量为 1000-5000Da,例如 1000Da、2000Da、3000Da、4000Da 或 5000Da;聚乳酸羟基乙酸链段的重均分子量为 4500-45000Da,例如 4500Da、5000Da、7500Da、9000Da、10000Da、20000Da、30000Da、40000Da 或 45000Da,聚乳酸羟基乙酸链段由乳酸和羟基乙酸两种单体聚合而成,其中所述乳酸和羟基乙酸两种单体的摩尔比为 75:25 或 50:50,即所述聚乳酸羟基乙酸链段由 75%乳酸和 25%羟基乙酸组成或由 50%乳酸和 50%羟基乙酸组成(即为 PLGA75/25 或 PLGA50/50)。

[0016] 血红蛋白可来源于过期人血、猪血或牛血等,优选为牛血红蛋白,原因是过期人血应用于工业生产尚存在国内人源血供应短缺、血液传播疾病等危害问题,而猪血应用受到限制是由于宗教信仰导致伊斯兰国家和地区穆斯林难以接受,牛血释氧能力强、结构更稳

定,适于在世界范围内广泛推广。

[0017] 本发明中,制备 PEG-PLGA 包裹血红蛋白可包括以下步骤:

[0018] 1) 将 PEG-PLGA 溶于有机溶剂乙酸乙酯,再将其与血红蛋白的水溶液混合、超声,形成初乳;

[0019] 2) 向初乳中加入聚乙烯醇 (PVA) 水溶液和丙二醇嵌段聚醚 (F68) 水溶液的混合物,混合、超声,形成复乳;

[0020] 3) 将复乳在室温下减压旋转蒸发,挥发除掉乙酸乙酯,离心,除去上清液,得到 PEG-PLGA 包裹血红蛋白。

[0021] 制备中,步骤 1) 中 PEG-PLGA 溶液的浓度为 10-30mg/mL,发明人使用的例如有 10mg/mL、11mg/mL、12mg/mL、15mg/mL、17mg/mL、19mg/mL、20mg/mL、22mg/mL、24mg/mL、26mg/mL、27mg/mL、28mg/mL、29mg/mL 或 30mg/mL;优选为 20mg/mL。

[0022] 步骤 1) 中血红蛋白水溶液的浓度为 60-240mg/mL,发明人使用的例如有 60mg/mL、70mg/mL、80mg/mL、90mg/mL、100mg/mL、110mg/mL、120mg/mL、140mg/mL、160mg/mL、180mg/mL、190mg/mL、200mg/mL、210mg/mL、220mg/mL、230mg/mL 或 240mg/mL;优选为 120mg/mL,原因是以该血红蛋白浓度为原料制得的类细胞结构包裹血红蛋白的粒径分布更均一,且包封率更高。

[0023] 步骤 1) 中 PEG-PLGA 溶液的体积为 2 体积份,血红蛋白水溶液的体积为 0.4 体积份,PEG-PLGA 溶液与血红蛋白水溶液的质量比为 5:4-5:12(根据上述 PEG-PLGA 溶液和血红蛋白水溶液不同浓度范围与溶液体积相乘算得,发明人使用的例如有 5:4、5:5、5:6、5:7、5:8、5:9、5:10、5:11 或 5:12),优选为 5:6。

[0024] 步骤 1) 中的超声处理条件为:用超声细胞破碎仪在 80-100W 功率下于冰水浴中超声 3-5min,以形成初乳。

[0025] 步骤 2) 中 PVA 水溶液和 F68 水溶液的总体积为 10 体积份,其中,PVA 水溶液和 F68 水溶液的体积比为 1:1-9:1,发明人使用的例如有 1:1、2:1、3:1、3:2、4:1、4:2、4:3、5:1、5:2、5:3、5:4、6:1、6:5、7:1、7:2、7:3、7:4、7:5、7:6、8:1、8:3、8:5、8:7 或 9:1,优选为 7:3;发明人还单一使用 PVA 水溶液;所述 PVA 水溶液和 F68 水溶液的浓度均为 2wt%。

[0026] 步骤 2) 中的超声处理条件为:用超声细胞破碎仪在 200-250W 功率下于冰水浴中超声 3-5min,以形成复乳。

[0027] 本发明提供了以 PEG-PLGA 作为包裹材料制备的包裹血红蛋白。其原理是:将 PEG-PLGA 溶于乙酸乙酯等有机试剂,再加入血红蛋白溶液,此时由于有机试剂为有机相,血红蛋白溶液为水相,二者不相溶,会在容器中分两层,在超声作用下,溶有 PEG-PLGA 的有机相被分散在血红蛋白水相中,形成乳液状,即为初乳;加入 PVA 和 F68 乳化剂水溶液,超声形成复乳,即在 PVA 和 F68 乳化剂的作用下,稳定水包油界面,经有机试剂挥发后,离心可以得到包裹血红蛋白的 PEG-PLGA 纳米粒子。这里,步骤 1) 形成了初乳,目的是将溶有 PEG-PLGA 的有机相分散在血红蛋白水相中,步骤 2) 加入 PVA 和 F68 乳化剂,超声形成了复乳,目的是形成稳定的水包油界面,步骤 3) 挥发有机试剂,离心去除上液(包括乳化剂、水等水相),目的是得到包裹血红蛋白的 PEG-PLGA 纳米粒子。

[0028] 本发明中,把 PEG 接枝在 PLGA 形成二嵌段共聚物,这类含有不相容链段的共聚物具有微观相分离的形态。聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸嵌段共聚物 (PEG-PLGA) 具备优良的

生物降解性和组织相容性,且降解产物不会在重要器官聚集。同时,PEG-PLGA具有良好的物理、化学性能,其机械性能、强度、降解速率等可通过共聚物的组成及配比、控制分子量得以方便的调节,而且制品的形状可从微球、纤维到膜、模塑成品等。同时,包裹材料原料丰富,具有低成本,可生物降解,良好生物相容性和生物亲和性、无毒、易于化学改性等优点。

[0029] 本发明提供的 PEG-PLGA 包裹血红蛋白可作为血红蛋白的氧载体,用作血液代用品,由于其具有较小的粒径,可在血浆中稳定较长的时间,避免了输血过程中血红蛋白直接与周围组织及血液其他成分直接作用而带来的血管收缩、肾毒性的问题,也可避免血红蛋白被氧化所引起的严重的不良反应。

[0030] 因此,本发明具有以下有益效果:

[0031] 1) PEG-PLGA 包裹血红蛋白具有确定的平均粒径,粒径分布较窄且粒径分布均一;

[0032] 2) PEG-PLGA 包裹血红蛋白具有核壳结构,呈单分散的规则球体,无团聚现象,体系较稳定,可防止纳米粒子巨噬细胞吞噬,延长体内的循环时间;纳米粒的多分散性指数(PDI)为 0.149,粒径分布集中;

[0033] 3) 具备携放氧功能,例如其 P50 值为 13.06-16.37,氧亲和力高;负载过程不破坏血红蛋白的二级结构,与全血有近似的流变特性,稳定性高,不会引起血红蛋白大量的渗漏,并且具备良好的血液相容性,不引起全血凝血功能的变化、不会引起红细胞聚集、不引起溶血,适于用作血液代用品。

[0034] 4) 包裹过程不破坏血红蛋白的二级结构,与全血有近似的流变特性,稳定性高,不会引起血红蛋白大量的渗漏;

[0035] 5) 具备良好的血液相容性,不引起全血凝血功能的变化、不会引起红细胞聚集、不引起溶血;通过将血红蛋白负载在载体中,既解决了血红蛋白与周围组织及血液其他成分直接作用而带来的血管收缩、肾毒性的问题,也可避免血红蛋白被氧化所引起的严重的不良反应。

[0036] 6) 具备良好的供氧效果,可应用于全身或局部缺氧,或者体外需要供氧的体系,例如,可应用于休克、心肌缺血、脑梗塞等疾病的治疗,以及体外循环或器官移植中;另外,在肿瘤治疗中能够提高肿瘤细胞对放化疗的敏感性,改善治疗效果。

[0037] 综上所述,本发明的血红蛋白氧载体—PEG-PLGA 包裹血红蛋白可作为血液代用品在医学领域中发挥重要作用,应用前景广阔。

[0038] 下面结合具体实施例对本发明做进一步详细说明。

附图说明

[0039] 图 1 为 PEG-PLGA 包裹血红蛋白的透射电镜观察结果

[0040] 图 2 为 PEG-PLGA 包裹血红蛋白粒径分布图

[0041] 图 3 为 PEG-PLGA 包裹血红蛋白放置过程中粒径变化情况

[0042] 图 4 为 PEG-PLGA 包裹血红蛋白的可见光谱图

[0043] 图 5 为 PEG-PLGA 包裹血红蛋白的携放氧曲线

[0044] 图 6 为 PEG-PLGA 包裹血红蛋白的二级结构

[0045] 图 7 为 PEG-PLGA 包裹血红蛋白的流变特性

[0046] 图 8 为 PEG-PLGA 包裹血红蛋白对全血流变性的影响

- [0047] 图 9 为 PEG-PLGA 包裹血红蛋白对红细胞聚集的影响
- [0048] 图 10 为 PEG-PLGA 包裹血红蛋白对凝血功能的影响
- [0049] 图 11 为 PEG-PLGA 包裹血红蛋白对失血性休克小鼠复苏过程中平均动脉压的影响
- [0050] 图 12 为 PEG-PLGA 包裹血红蛋白对失血性休克小鼠复苏过程中混合静脉血氧分压的影响

具体实施方式

[0051] 实施例中描述到的各种生物材料的取得途径仅是提供一种实验获取的途径以达到具体公开的目的,不应成为对本发明生物材料来源的限制。事实上,所用到的生物材料的来源是广泛的,任何不违反法律和道德伦理能够获取的生物材料都可以按照实施例中的提示替换使用。

[0052] 实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施,给出了详细的实施方式和具体的操作过程,实施例将有助于理解本发明,但是本发明的保护范围不限于下述的实施例。

[0053] 通过双乳法制备 PEG-PLGA 包裹血红蛋白,由于聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸嵌段共聚物在水介质中自组装形成的纳米粒子,其中的疏水链段之间由于疏水相互作用而聚集成粒子的内核,亲水链段则形成粒子的外壳,因此可以负载抗癌药物,蛋白质, RNA 等活性成分。

[0054] 主要仪器及试剂

[0055] 超声细胞破碎仪:宁波新芝生物科技股份有限公司,型号:Scientz-II D

[0056] 旋转蒸发仪:上海亚荣生化仪器厂,型号:RE52CS-2

[0057] 透射电子显微镜:日本电子公司,型号为 JEM-200CX

[0058] 激光粒度仪:马尔文仪器有限公司,Zetasizer Nano ZS,英国

[0059] 紫外分光光度计:美国热电公司,He λ ios β

[0060] 血氧分析仪:北京凯正生物工程有限责任公司,KZ-176

[0061] 圆二色谱:佳司科(上海)贸易有限公司,J-810

[0062] 半自动血液流变测试仪:博莱特(中国),BT-300

[0063] 倒置显微镜,COIC,XDS-1B

[0064] 聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸嵌段共聚物材料:购自济南岱罡生物工程有公司,其中聚乙二醇链段的重均分子量为 5000Da,聚乳酸羟基乙酸链段的重均分子量为 45000Da,且聚乳酸羟基乙酸链段为 PLGA75/25。聚乙烯醇(PVA)购自化学试剂国药控股有限公司(Sinopharm Chemical Reagent Co.,Ltd),丙二醇嵌段聚醚 F68 购自阿达玛斯试剂有限公司(Adamas Reagent Co.,Ltd)。

[0065] 血红蛋白:从健康的雄牛(实验动物来自北京锦绣大地农业观光园)中提取血液,通过离心使红细胞膜渗透破裂,得到血红蛋白溶液,使用普通生理盐水稀释,得到不同浓度的血红蛋白水溶液,备用。该方法制备的血红蛋白中高铁血红蛋白含量少于 3%。

[0066] 实施例 1、制备 PEG-PLGA 包裹血红蛋白

[0067] 本发明 PEG-PLGA 包裹血红蛋白的制备,包括以下步骤:

[0068] 1) 将 PEG-PLGA 溶于乙酸乙酯,使其浓度为 20mg/mL(10-30mg/mL 均可),再将 2mL PEG-PLGA 溶液与 0.4mL 120mg/mL(60-240mg/mL 均可)血红蛋白的水溶液按质量比

5:6 混合 (5:4-5:12 均可),用超声细胞破碎仪在 80W(80-100W 均可)下于冰水浴中超声 3min(3-5min 均可),形成初乳;

[0069] 2) 将表面活性剂的水溶液 10mL,本例中为 2wt% PVA 水溶液 7mL 和 2wt% F68 水溶液 3mL 混合 (体积比 7:3,体积比 1:1-9:1 均可,也可使用单一 PVA 水溶液),向步骤 1) 所得初乳中加入 10mL PVA 水溶液和 F68 水溶液的混合物,混合,用超声细胞破碎仪 250W(200-250W 均可)下于冰水浴中超声 5min(3-5min 均可),形成复乳;

[0070] 3) 将步骤 2) 所得复乳在室温下用旋转蒸发仪减压旋转蒸发,挥发除掉乙酸乙酯,13000rpm(6000-13000rpm 均可)离心 10min(8-15min 均可),除去上清液,得到 PEG-PLGA 包裹血红蛋白。

[0071] 实施例 2、PEG-PLGA 包裹血红蛋白的理化性质检测

[0072] 对实施例 1 制备的 PEG-PLGA 包裹血红蛋白粒子的理化性质进行以下检测:

[0073] 1、透射电镜观察粒子

[0074] 用透射电镜 (型号 JEM-200CX,购自日本电子公司)观察粒子形态。

[0075] 结果如图 1 所示,制备的 PEG-PLGA 包裹血红蛋白为球形粒子,这些粒子分散均匀,且无团聚现象,初步确定制备的 PEG-PLGA 包裹血红蛋白是粒径分布集中的纳米粒胶体分散体系。实施例 1 制备中参数变化得到的各 PEG-PLGA 包裹血红蛋白粒子形态与图 1 结果没有分别。

[0076] 2、动态光散射测定纳米粒的粒径分布情况

[0077] 用激光粒度仪 (型号 Zetasizer Nano ZS,购自英国马尔文仪器有限公司)测定纳米粒的粒径分布情况以及平均粒径及多分散性指数 (PDI,反映粒径分布的指标,该值越小反映粒径分布越集中)。

[0078] 结果如图 2 (横坐标为粒径,纵坐标为强度)所示,制备的 PEG-PLGA 包裹血红蛋白的平均粒径为 196.3nm,粒径分布均一,多分散性指数 (PDI) 为 0.149,粒径分布集中。实施例 1 制备中参数变化得到的各 PEG-PLGA 包裹血红蛋白粒径分布情况列于表 3。

[0079] 3、动态光散射观察粒子粒径大小变化情况

[0080] 将制备的 PEG-PLGA 包裹血红蛋白在室温下放置 7 天,通过动态光散射观察粒子粒径大小变化情况。

[0081] 结果如图 3 (横坐标为天数,纵坐标为平均粒径大小)所示,制备的 PEG-PLGA 包裹血红蛋白粒径在 7 天内基本保持不变,表明纳米粒子稳定性较高。同样,实施例 1 制备中参数变化得到的各 PEG-PLGA 包裹血红蛋白粒子粒径也无明显变化。

[0082] 4、测定 PEG-PLGA 包裹血红蛋白纳米粒的包封率

[0083] 通过氰化高铁血红蛋白法测定未包入纳米粒子的血红蛋白浓度,具体方法为将血红蛋白通过高铁氰化钾氧化为高铁血红蛋白,与氰离子结合成氰化高铁血红蛋白,它在 540nm 有一吸收峰,通过测定其光密度而得血红蛋白含量,根据公式 $EE\% = (tHb - fHb) / tHb \times 100\%$,计算 PEG-PLGA 包裹血红蛋白纳米粒的包封率,其中 tHb 是总血红蛋白总质量, fHb 是未包入纳米粒子的血红蛋白总质量。

[0084] 结果 PEG-PLGA 包裹血红蛋白纳米粒的包封率为 55.00%,表明用该方法制备的 PEG-PLGA 包裹血红蛋白包裹效率较高。

[0085] 实施例 1 制备中参数变化得到的各 PEG-PLGA 包裹血红蛋白粒子包封率数据列于

表 3。

[0086] 5、PEG-PLGA 包裹血红蛋白的可见光谱图

[0087] 用紫外-可见分光光度计(型号 Helios β , 购自 Thermo 公司)扫描 PEG-PLGA 包裹血红蛋白样品的全波长样品观测 PEG-PLGA 包裹血红蛋白纳米粒子内血红蛋白特征光谱变化情况,仪器的检测参数带宽 bandwidth 设定为 2nm,扫描 350-650nm 波长的全波长光谱,通过观察 400-430nm 处的特征峰位移情况判断血红蛋白被氧化的情况。

[0088] 结果如图 4(横坐标为波长,纵坐标为吸光度)所示,PEG-PLGA 包裹血红蛋白纳米粒子在 400-430nm 处的特征峰在 412nm 左右,主要表现为氧合血红蛋白,表明该条件下制备过程不会严重引起血红蛋白氧化(高铁血红蛋白,即氧化的血红蛋白特征峰主要在 405nm 左右)。

[0089] 实施例 1 制备中参数变化得到的各 PEG-PLGA 包裹血红蛋白粒子可见光谱与图 4 无实质差异。

[0090] 6、测定 PEG-PLGA 包裹血红蛋白的携放氧曲线和 P50 值

[0091] 用 Hemox analyzer 仪器(购自 TCS Scientific Corp 公司)测定 PEG-PLGA 包裹血红蛋白样品的携放氧曲线,仪器温度设定为 37 $^{\circ}$ C,将 PEG-PLGA 包裹血红蛋白样品加入 4mL Hemox 缓冲液(购自 TCS Scientific Corp 公司)、10 μ L 消泡剂(购自 TCS Scientific Corp 公司)和 20 μ L 白蛋白 A(购自 TCS Scientific Corp 公司),通入氧气,仪器稳定后调氧分压为 150mmHg 后开始充入氮气脱氧并测量。用 P50 值确定该样品的氧亲和力,从而确定 PEG-PLGA 包裹血红蛋白纳米粒的携放氧功能。

[0092] PEG-PLGA 包裹血红蛋白样品的携放氧曲线如图 5(横坐标为氧分压,纵坐标为氧饱和度)所示,随着氧分压降低,氧饱和度降低,与血红蛋白有近似的携放氧曲线,表明 PEG-PLGA 包裹血红蛋白具有释氧能力。

[0093] P50 是指血红蛋白 50% 氧饱和度时氧分压数,反映血氧运送能力和血红蛋白与氧的亲和力,值越低表明其氧亲和力越高。实测 PEG-PLGA 包裹血红蛋白样品的 P50 值为 14.59,血红蛋白的 P50 值为 22-24,表明 PEG-PLGA 包裹血红蛋白比血红蛋白的氧亲和力更高。

[0094] 实施例 1 制备中参数变化得到的各 PEG-PLGA 包裹血红蛋白粒子 P50 值数据列于表 3。

[0095] 7、测定 PEG-PLGA 包裹血红蛋白的二级结构

[0096] 将 PEG-PLGA 包裹血红蛋白样品加入圆二色谱仪(型号 J-800,购自 Jasco 公司)测试槽中,仪器的检测参数:设置路径长度 path length 为 1cm,带宽 bandwidth 1.0nm,时间常数为 2s,波长从 190-260nm。测定 190-260nm 处的圆二色谱图,从而获得该样品的制备过程对血红蛋白二级结构的影响。

[0097] 结果如图 6(横坐标为波长,纵坐标为椭圆率)所示,PEG-PLGA 包裹血红蛋白在 194nm 处出现最大值,在 210nm 和 224nm 处出现最小值,与血红蛋白的圆二色谱图近似,表明 PEG-PLGA 包裹血红蛋白与血红蛋白二级结构近似,包裹过程不会破坏血红蛋白二级结构。

[0098] 实施例 1 制备中参数变化得到的各 PEG-PLGA 包裹血红蛋白粒子二级结构与图 6 无实质差异。

[0099] 8、测定 PEG-PLGA 包裹血红蛋白的流变特性

[0100] 将 PEG-PLGA 包裹血红蛋白样品加入到外旋式血液流变测试仪（型号 BT-300，购自北京博莱特公司）中，将样品在 37℃ 孵育 10min，缓慢加入样品池，设定剪切速率分别在 1、3、20、100、180 和 210s⁻¹，检测其 1-210s⁻¹ 的粘度和剪应力。

[0101] 结果如图 7（横坐标为剪切速率，纵坐标为粘度（左侧）和剪应力（右侧））所示，随着剪切速率升高，样品粘度下降，PEG-PLGA 包裹血红蛋白样品与全血粘度变化趋势和剪应力变化趋势近似，且低于全血，表明 PEG-PLGA 为一种非牛顿流体，且其流变特性与全血近似，流变粘度略低于全血。

[0102] 实施例 1 制备中参数变化得到的各 PEG-PLGA 包裹血红蛋白粒子流变特性与图 7 结论无明显不同。

[0103] 9、PEG-PLGA 包裹血红蛋白的血液粘度影响

[0104] 通过将 300 μL PEG-PLGA 包裹血红蛋白样品与 700 μL 全血混合，以生理盐水组作为阴性对照，加入到外旋式血液流变测试仪（型号 BT-300，购自北京博莱特公司），检测其 1-210s⁻¹ 的流变特性，设定剪切速率分别在 1、3、20、100、180 和 210s⁻¹。

[0105] 结果如图 8（横坐标为剪切速率，纵坐标为粘度（左侧）和剪应力（右侧））所示，PEG-PLGA 包裹血红蛋白的加入不引起全血流变特性明显变化，表明 PEG-PLGA 包裹血红蛋白不会影响全血流变特性。

[0106] 实施例 1 制备中参数变化得到的各 PEG-PLGA 包裹血红蛋白粒子对血液粘度影响与图 8 结论无明显不同。

[0107] 10、PEG-PLGA 包裹血红蛋白对红细胞聚集性的影响

[0108] 将 PEG-PLGA 包裹血红蛋白样品与红细胞悬液混合，通过光学显微镜（型号 XDS-1B，购自重庆 COIC 公司）观察 PEG-PLGA 包裹血红蛋白对红细胞聚集性的影响，调节物镜为 40 倍，目镜为 10 倍。

[0109] 结果如图 9 所示，以 PEG-PLGA 包裹血红蛋白样品与红细胞悬液混合后红细胞未聚集，表明 PEG-PLGA 包裹血红蛋白不引起红细胞聚集。

[0110] 实施例 1 制备中参数变化得到的各 PEG-PLGA 包裹血红蛋白粒子对红细胞聚集性影响与图 9 结论无明显不同。

[0111] 11、PEG-PLGA 包裹血红蛋白对溶血率的影响

[0112] 10mL 生理盐水加入 PEG-PLGA 样品，孵育 30min 后，加入新鲜兔血孵育 1h，记为样品组，测定其在 545nm 处的吸光度。10mL 生理盐水加入新鲜兔血孵育 1h，记为生理盐水组，作为阴性对照。10mL 蒸馏水加入新鲜兔血孵育 1h，记为蒸馏水组，作为阳性对照。通过公式：溶血率 = (D 测 - D- / D+ - D-) × 100%（D 测为样品组在 545nm 处的吸光度值，D- 为生理盐水组在 545nm 处的吸光度值，D+ 为蒸馏水组在 545nm 处的吸光度值）计算样品的溶血率。

[0113] PEG-PLGA 包裹血红蛋白对红细胞溶血的影响如表 1 所示，样品组溶血率为 2.27%，通过 ISO/TR 7405 - 1984(f)14 知溶血率小于 5% 说明样品不引起红细胞溶血，表明 PEG-PLGA 包裹血红蛋白对红细胞溶血无影响。

[0114] 表 1 PEG-PLGA 包裹血红蛋白对红细胞溶血的影响

[0115]

组别	OD 值	溶血率

阴性对照组	0.0006±0.0003	/
阳性对照组	0.7732±0.0098	/
样品组	0.0182±0.0008	2.27% ±0.15%

[0116] 测得实施例 1 制备中参数变化得到的各 PEG-PLGA 包裹血红蛋白粒子（见表 3）的溶血率数据，均低于 5%。

[0117] 12、PEG-PLGA 包裹血红蛋白对凝血功能的影响

[0118] 通过血栓弹力图及凝血弹性描记仪（型号 Niles, 购自美国 Haemoscope 公司）测定 PEG-PLGA 包裹血红蛋白样品对全血凝血功能的影响。检测方法为：将抽取的志愿者全血（加入枸橼酸钠抗凝）分别与 PEG-PLGA 包裹血红蛋白样品、生理盐水、稀释一倍 PEG-PLGA 包裹血红蛋白样品以体积 4:1 混合，孵育 30min 后，加入组织凝血活酶，进行血栓弹力图测定。

[0119] 血栓弹力图如图 10 所示，三组样品血栓弹力图近似，表明 PEG-PLGA 包裹血红蛋白不引起凝血功能障碍。

[0120] 与图 10 相似，实施例 1 制备中参数变化得到的各 PEG-PLGA 包裹血红蛋白粒子同样不引起凝血功能障碍。

[0121] PEG-PLGA 包裹血红蛋白对凝血功能的影响如表 3 所示，三组样品的 R 值、K 值、Angle 值、MA 值和 G 值均在正常值范围，进一步表明 PEG-PLGA 包裹血红蛋白不引起凝血功能障碍。

[0122] 表 2 PEG-PLGA 包裹血红蛋白对凝血功能的影响

[0123]

	生理盐水组 (n=3)	稀释 PEG-PLGA 包裹血红蛋白样品组 (稀释一倍) (n=3)	PEG-PLGA 包裹血红蛋白样品组 (n=3)	正常值范围
R (min)	6.6±1.0	6.9±0.4	6.7±0.4	5-10
K (min)	1.9±0.1	1.9±0.1	1.83±0.1	1-3

[0124]

Angle(°)	64.0±1.5	64.2±1.8	63.9±0.5	53-72
MA(mm)	57.1±0.8	57.4±0.9	56.8±1.2	50-70
G(dyne/s)	6.7±0.2	6.8±0.3	6.6±0.4	4.5-11.0

[0125] 表 2 中各指标意义：

[0126] R 凝血反应时间，与凝血因子相关。

[0127] K 血细胞凝集块形成时间,与血小板、纤维蛋白原有关。

[0128] Angle 血细胞凝集块形成速率,反应纤维蛋白原水平。

[0129] MA 血凝块的最大强度或硬度及血凝块形成的稳定性,反应血小板功能。

[0130] G 血凝块强度,即最大切应力强度。

[0131] 13、PEG-PLGA 包裹血红蛋白样品的有效性评价

[0132] 选取体重在 25-30g 血压为 100-130mmHg 的雄性小鼠 30 只(购自北京维通利华有限责任公司),分组为生理盐水组即 NaCl 组(10 只)、悬浮红细胞组(Hb 浓度为 3-4g/dL)即 RBC 组(10 只)和 PEG-PLGA 包裹血红蛋白组即 PEG-PLGA 包裹血红蛋白组(10 只)。首先制备失血性休克模型,小鼠以 2mL/min 速度放血全身血量的 30%,稳定 10min 中后等体积回输液体(生理盐水/悬浮红细胞/PEG-PLGA 包裹血红蛋白样品),复苏观察 1h 后,用多道生理仪(型号 MP150,购自 BIOPAC Systems 公司)测定失血性休克小鼠复苏过程中的平均动脉压,用血气分析仪(型号 ABL90C00X,购自丹麦 Radiometer 公司)测定混合静脉氧分压,通过其混合静脉氧分压确定 PEG-PLGA 包裹血红蛋白对组织供氧的效果。

[0133] PEG-PLGA 包裹血红蛋白对失血性休克小鼠复苏过程中平均动脉压的影响如图 11(横坐标为休克复苏不同阶段,基础值为小鼠插管术后时间点,休克值为失血后稳定 10min 后的时间点,复苏值 T0、T30、T60 分别表示输注复苏液后稳定 0min、30min 和 60min 的时间点,纵坐标为平均动脉压大小;#P<0.05 与生理盐水组和 PEG-PLGA 组相比,#P<0.05 与 NaCl 组相比)所示,PEG-PLGA 包裹血红蛋白组和红细胞组在复苏后平均动脉压显著性高于生理盐水组,在 T60 点红细胞组高于 PEG-PLGA 包裹血红蛋白组和生理盐水组,表明 PEG-PLGA 包裹血红蛋白在平均动脉压维持方面优于生理盐水。

[0134] PEG-PLGA 包裹血红蛋白对失血性休克小鼠复苏过程中混合静脉血氧饱和度的影响如图 12(横坐标为三个实验组:生理盐水组、红细胞组和 PEG-PLGA 包裹血红蛋白组,纵坐标为混合静脉氧分压;#P<0.05 与 NaCl 组相比)所示,红细胞组和 PEG-PLGA 包裹血红蛋白组的混合静脉氧分压优于生理盐水组,表明 PEG-PLGA 包裹血红蛋白发挥与红细胞近似的在体供氧效果。

[0135] 实施例 1 制备中参数变化得到的各 PEG-PLGA 包裹血红蛋白粒子有效性上与图 11 和图 12 的结论相同。

[0136] 表 3 实施例 1 PEG-PLGA 包裹血红蛋白的制备参数变化及理化特性

[0137]

序号	PEG-PLGA 溶液浓度	血红蛋白 溶液浓度	PEG-PLGA 与血红蛋 白质量比	初乳 超声	表面活性剂 10体积份	复乳 超声	包封率	平均粒 径	P50
1-1	10mg/ml	120mg/ml	5:12	80W	PVA: F68 7:3	250W	43.75%	143.1nm	13.98
1-2	15 mg/ml	120mg/ml	5:8	100W	PVA	200W	50.89%	168.4nm	14.20
1-3	20 mg/ml	120mg/ml	5:6	80W	PVA: F68 7:3	250W	55.00%	196.3nm	14.59
1-4	30 mg/ml	120mg/ml	5:4	80W	PVA: F68 9:1	250W	64.17%	248.1nm	16.37
1-5	15 mg/ml	60 mg/ml	5:4	80W	PVA: F68 8:2	200W	75.00%	159.1nm	13.06
1-6	20 mg/ml	240mg/ml	5:12	90W	PVA: F68 5:5	230W	44.60%	267.4nm	16.63

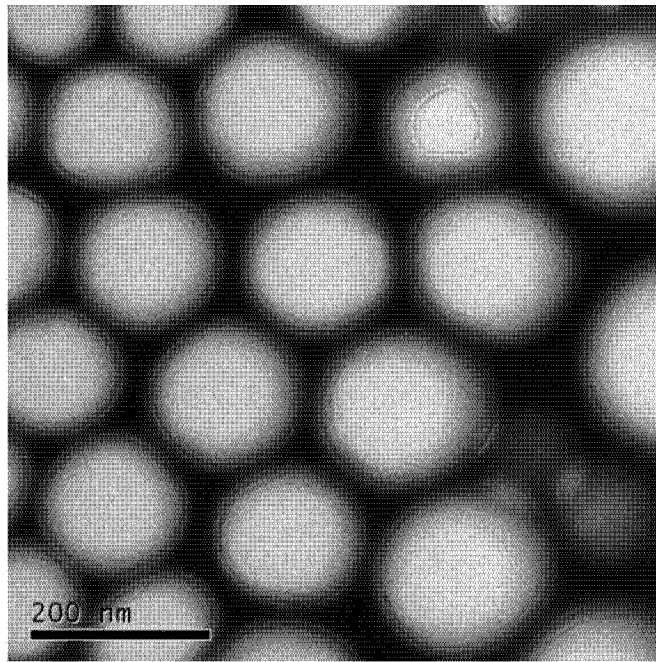


图 1

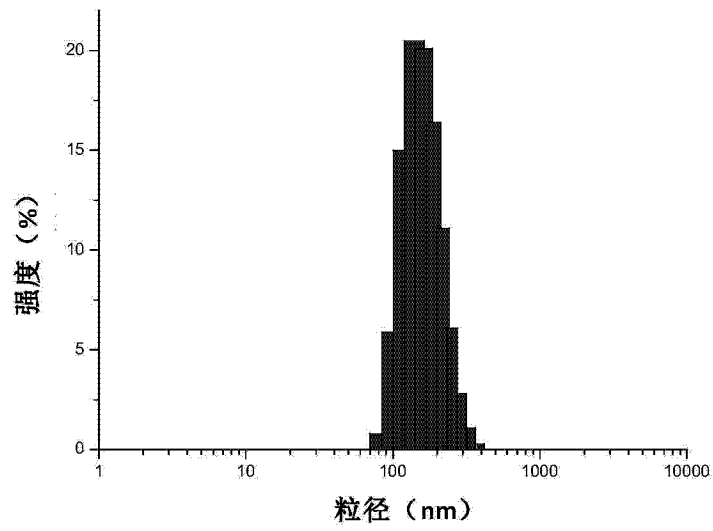


图 2

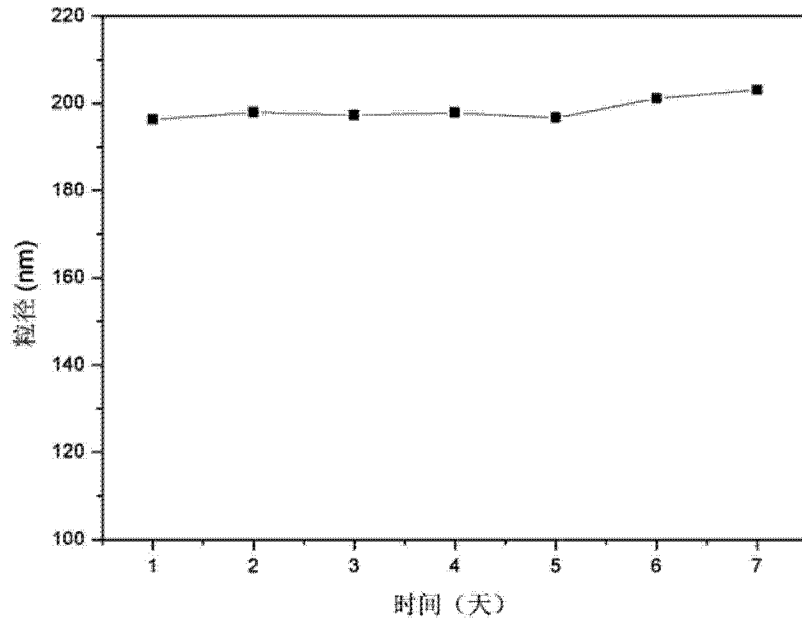


图 3

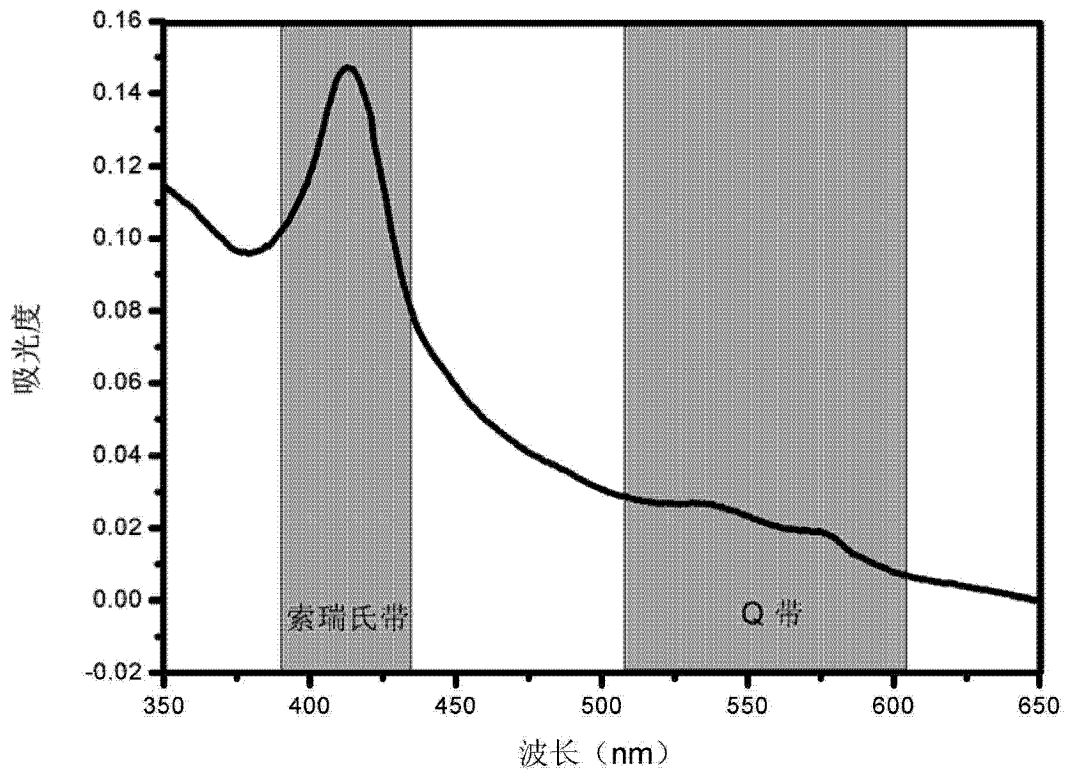


图 4

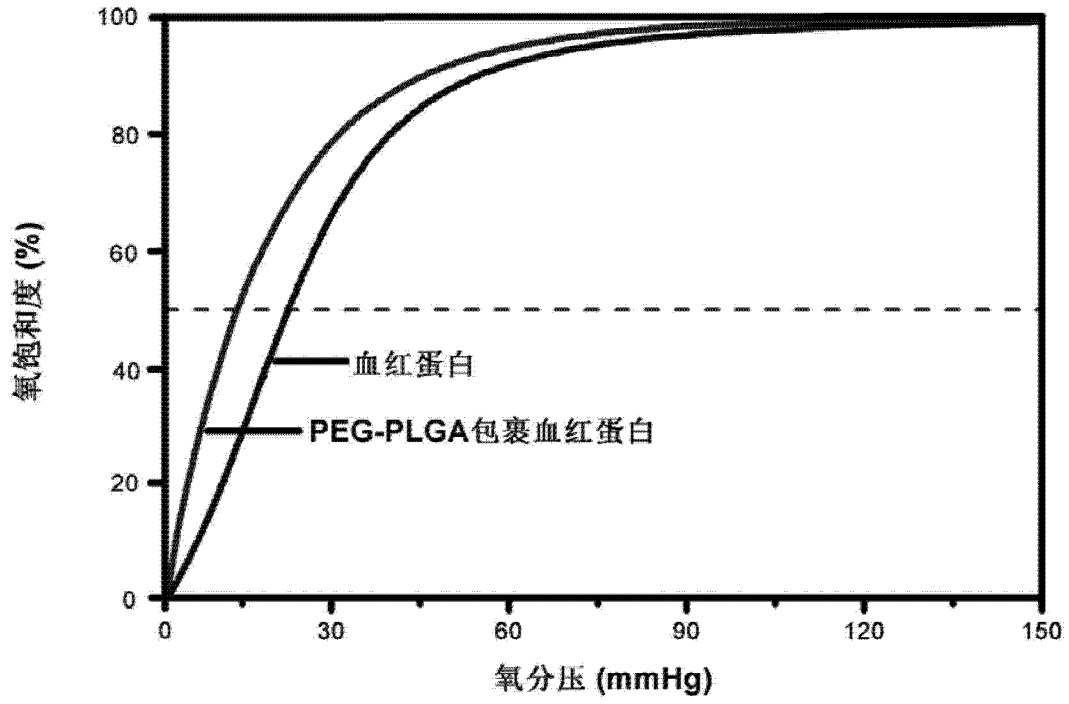


图 5

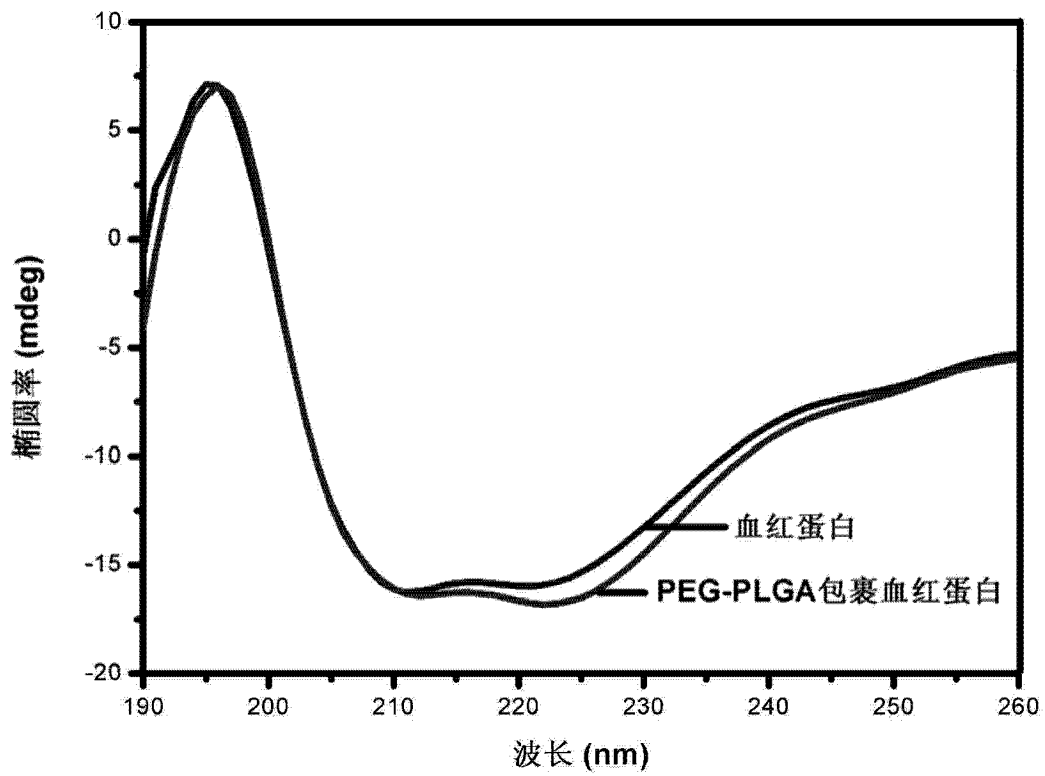


图 6

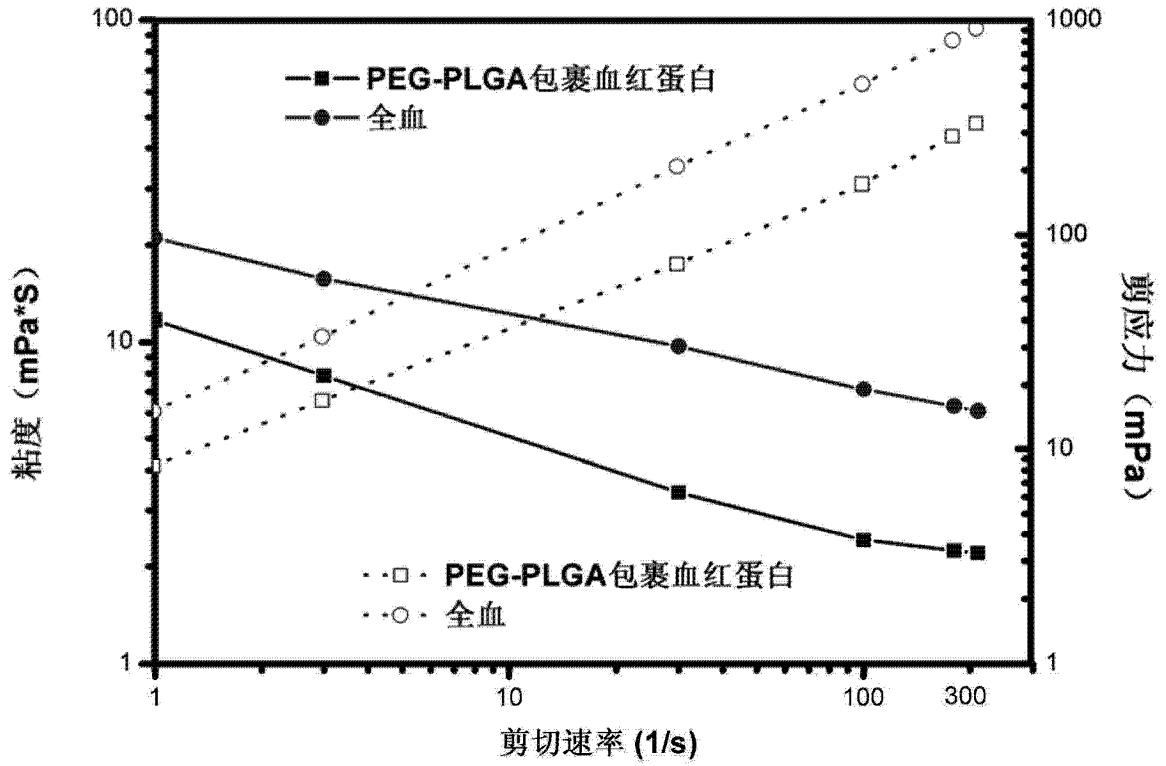


图 7

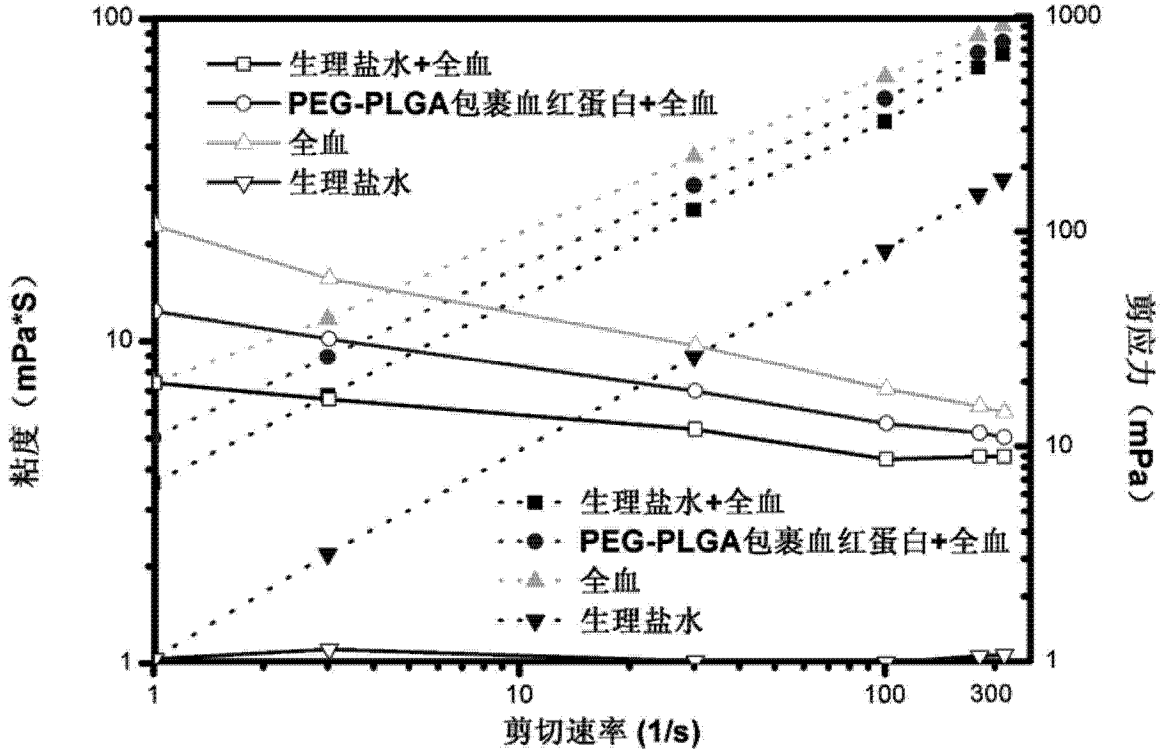


图 8

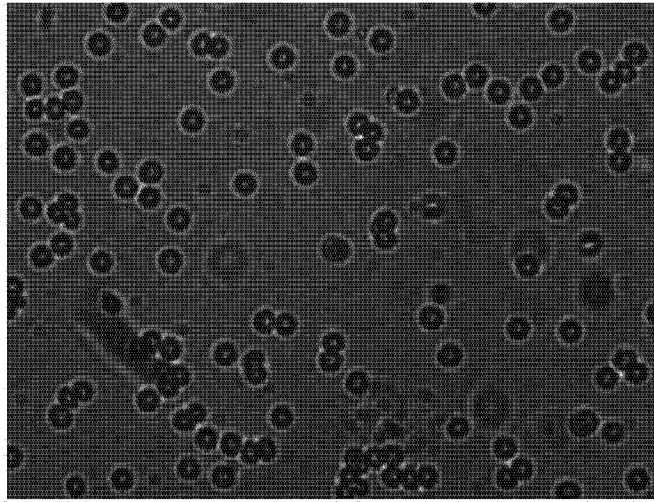


图 9

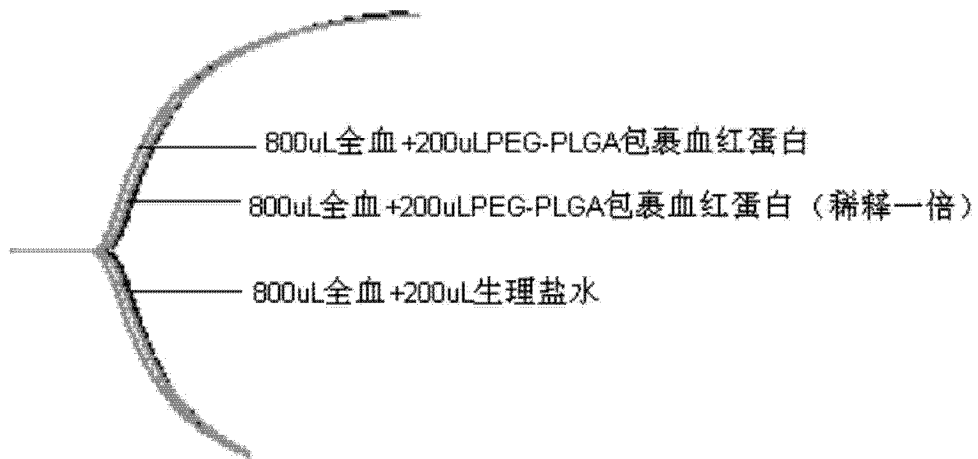


图 10

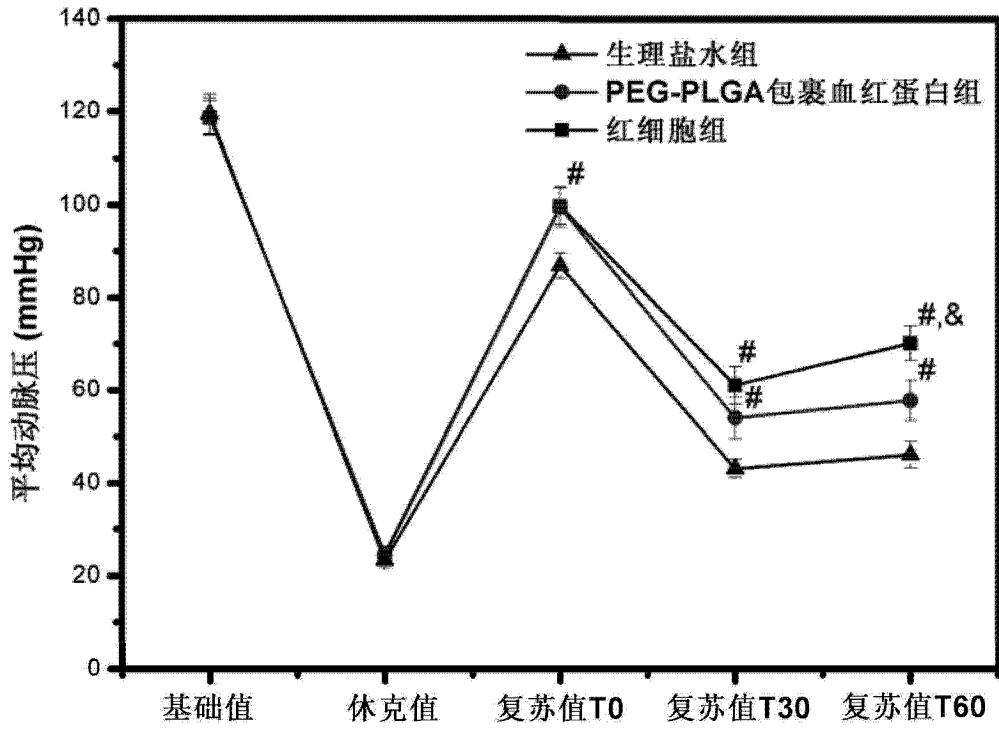


图 11

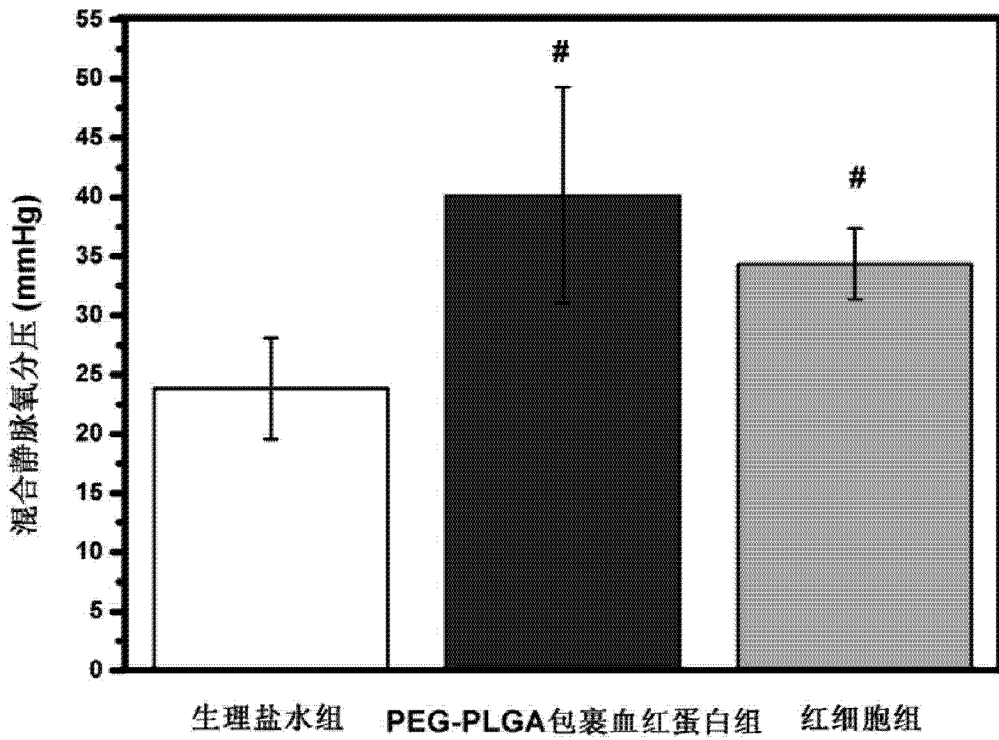


图 12