



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2010년06월21일
 (11) 등록번호 10-0964604
 (24) 등록일자 2010년06월10일

- (51) Int. Cl.
A61K 35/14 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2004-7010847
- (22) 출원일자(국제출원일자) 2003년01월10일
 심사청구일자 2007년12월12일
- (85) 번역문제출일자 2004년07월12일
- (65) 공개번호 10-2004-0081451
- (43) 공개일자 2004년09월21일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2003/000696
- (87) 국제공개번호 WO 2003/059363
 국제공개일자 2003년07월24일
- (30) 우선권주장
 60/347,741 2002년01월11일 미국(US)
 10/114,400 2002년04월01일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
 US05585484 A1*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자
 생가트, 인코포레이티드
 미국 캘리포니아 92121 샌디에고 러스크 블러바드 6175
- (72) 발명자
 원슬로우, 로버트, 엠.
 미합중국 캘리포니아주 92037 라졸라 인스퍼레이션 드라이브 1210
 반데그리프, 킴, 디.
 미합중국 캘리포니아주 92101 샌디에고 포스 예비뉴 #610 311
- (74) 대리인
 황주명

전체 청구항 수 : 총 14 항

심사관 : 이민정

(54) 산소 친화도가 높은 개질된 헤모글로빈을 포함하는 산소 전달용 조성물 및 방법

(57) 요약

본 발명은 혈액 제품에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 높은 산소 친화도를 가지는 개질된 산화 헤모글로빈을 포함하는 조성물 및 상기 조성물을 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 조성물은 자동산화에 대한 안정성이 개선되고 산소 운반 특성이 우수하다.

특허청구의 범위

청구항 1

표면-개질된 산화 헤모글로빈을 포함하고,

상기 표면-개질된 산화 헤모글로빈은 헤모글로빈이 산화된 상태에 있는 동안 헤모글로빈 분자 표면에 노출된 아미노산 측쇄(side-chain)의 표면 티올기(thiol group)를 통하여 폴리에틸렌 글리콜이 공유결합으로 부착되어 있는 헤모글로빈이고,

상기 폴리에틸렌 글리콜은 알킬기를 통해 결합되고,

상기 표면-개질된 산화 헤모글로빈은 동일한 조건하에서 측정하였을 때 동일한 동물 소스(source) 유래의 천연 무지질(stroma-free) 헤모글로빈의 P50의 2/3이하의 P50을 갖는 것을 특징으로 하는 인공 혈액제.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

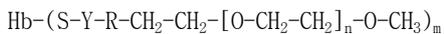
삭제

청구항 7

제1항에 있어서,

표면-개질된 산화 헤모글로빈을 포함하고,

상기 표면-개질된 산화 헤모글로빈은 하기 일반식을 갖고:



상기 식에서,

Hb는 사량체(tetrameric) 헤모글로빈이고;

S는 표면 티올기(thiol group)이고;

Y는 숙신이미딜(succinimidyl) 공유 결합(covalent link)이고;

R은 알킬기(alkyl group)이고;

n은 중합체(polymer)의 길이를 의미하는 것이며, 4 이상이고;

m은 헤모글로빈의 표면에 부착된 PEG 중합체의 개수이고;

상기 표면-개질된 산화 헤모글로빈은 동일한 조건하에서 측정하였을 때 동일한 동물 소스(source) 유래의 천연 무지질(stroma-free) 헤모글로빈의 P50의 2/3이하의 P50을 갖는 것을 특징으로 하는 인공 혈액제.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 m은 4 내지 5인 것을 특징으로 하는 인공 혈액제.

청구항 9

제1항 또는 제7항에 있어서,

상기 표면 개질 이전에 상기 헤모글로빈이 티올화(thiolated) 된 것을 특징으로 하는 인공 혈액제.

청구항 10

제1항 또는 제7항에 있어서,

0.10 미만의 메트헤모글로빈(methemoglobin)/총 헤모글로빈의 비를 갖는 것을 특징으로 하는 인공 혈액제.

청구항 11

제1항 또는 제7항에 있어서,

상기 표면 개질된 산화 헤모글로빈은 10 토르(torr)(1333 Pa) 미만의 P50을 갖는 것을 특징으로 하는 인공 혈액제.

청구항 12

제1항 또는 제7항에 있어서,

상기 표면 개질된 산화 헤모글로빈은 7 토르(torr)(933 Pa) 미만의 P50을 갖는 것을 특징으로 하는 인공 혈액제.

청구항 13

제1항 또는 제7항에 있어서,

PEG-헤모글로빈 접합체(conjugate)를 포함하여 24℃에서 자동산화(autooxidation)에 대해 안정하고, 상기 메트 헤모글로빈/총 헤모글로빈의 비는 0.10 미만이고, 상기 PEG-헤모글로빈 접합체(conjugate)는 10 토르(torr)(1333 Pa) 미만의 P50을 갖는 것을 특징으로 하는 인공 혈액제.

청구항 14

제1항에 있어서,

상기 헤모글로빈은 말(horse) 헤모글로빈인 것을 특징으로 하는 인공 혈액제.

청구항 15

수용성 희석제(aqueous diluent) 중에 제1항 또는 제7항에 따른 인공 혈액제를 포함하는 인공 혈액용 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 헤모글로빈의 농도는 0.1 내지 4.0 g/dl인 것을 특징으로 하는 인공 혈액용 조성물.

청구항 17

제1항 또는 제7항에 있어서,

인간 또는 동물체의 치료 방법에 유용한 것을 특징으로 하는 인공 혈액제.

청구항 18

제1항에 있어서,

상기 인공 혈액제는 외상(trauma), 빈혈(ischemia), 혈액희석(hemodilution), 패혈증 쇼크(septic shock), 암(cancer), 만성빈혈증(chronic anemia), 겸상 적혈구 빈혈증(sickle-cell anemia), 심장마비(cardioplegia) 또

는 저산소증(hypoxia)의 치료를 위한 약제 제조에 사용되는 것을 특징으로 하는 인공 혈액제.

청구항 19

제1항에 있어서,

상기 인공 혈액제는 상해로 인한 혈액손실(loss of blood due to injury), 용혈성 빈혈증(haemolytic anemia), 전염성 빈혈증(equine infectious anemia), 고양이 전염성 빈혈증(feline infectious anemia), 박테리아 감염(bacterial infection), 인자 IV 분열(factor IV fragmentation), 비대증(hypersplenation)과 비종대(splenomegaly), 가금류에서의 출혈증후군(hemorrhagic syndrome in poultry), 발육부전성 빈혈(hypoplastic anemia), 재생불량성 빈혈(aplastic anemia), 본태성 면역 용혈 상태(idiopathic immune haemolytic condition), 철 결핍(iron deficiency), 동족면역 용혈성 빈혈(isoimmune haemolytic anemia), 미세혈관성 용혈성 빈혈(microangiopathic haemolytic anemia) 또는 기생(parasitism)의 수의학적 치료를 위한 약제 제조에 사용되는 것을 특징으로 하는 인공 혈액제.

명세서

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 미국법 35 U.S.C. 제119조(e)에 의거하여 2002년 1월 11일에 출원된 미국 출원번호 제60/347,741호를 기초로 우선권을 주장한다.

기술분야

[0003] 본 발명은 혈액 제품에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 산소 친화도가 높은 개질된 헤모글로빈을 포함하는 조성물 및 상기 조성물을 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0004] 순환계 및 헤모글로빈의 특성

[0005] 혈액은 조직에 영양소를 운반하고 배설을 위해 조직으로부터 노폐물을 제거하는 기능을 한다. 혈액은 적혈구(RBCs 또는 erythrocytes), 백혈구(WBCs) 및 혈소판이 부유되어 있는 혈장으로 구성되어 있다. 혈액에 있는 세포의 약 99%가 적혈구이고 적혈구의 기본적인 기능은 조직에 산소를 운반하고 조직으로부터 이산화탄소를 제거하는 것이다. 심장의 좌심실은 순환계의 동맥과 소동맥을 통하여 혈액을 펌프질한다. 그러면 혈액은 영양소와 세포 노폐물의 교환이 주로 일어나는 모세혈관으로 들어간다.(A.C.Guyton, "Human Physiology And Mechanisms Of Disease"(3rd.ed.;W.B.Saunders Co., Philadelphia, Pa.), pp228-229(1982)). 그 이후, 혈액은 소정맥과 정맥을 통해 운반되어 심장의 우심방으로 들어온다. 비록심장으로 들어온 혈액은 심장으로부터 펌프되어 나간 것과 비교하여 산소가 적으나, 들어온 혈액에는 적어도 원래 산소 함유량의 약75%가 포함되어 있다.

[0006] 적혈구(RBCs)의 가역적 산소공급 기능(즉, 산소 전달)은 헤모글로빈 단백질에 의해 수행되는 것이다. 포유동물의 헤모글로빈은 분자량이 약 64,000달톤이고, 약 6% 헴(heme)과 94% 글로빈(globin)으로 구성되어 있다. 헤모글로빈의 천연 형태는 각각 하나의 헴과 글로빈 폴리펩티드 체인을 포함하는 2쌍의 서브유닛(즉, 사량체(teramer))로 이루어져 있다. 수용액에서, 헤모글로빈은 사량체 형태(MW 64,000)와 이량체 형태(MW 32,000) 사이에 평형상태로 존재한다; RBC 중에서, 이량체 형태는 신장에 의해 조기에 배출된다(약 2-4 시간의 혈장 반감기). 헤모글로빈을 수반하는 RBCs는 단백질, 콜레스테롤 및 인지질을 포함하는 지질(stroma, RBC 막)를 함유한다.

[0007] 외인성 혈액 제품

[0008] 병원과 다른 기관에서 혈액 제품에 대한 수요 때문에 인공 혈액과 혈장 증량제의 개발에 관한 연구가 증가되고 있다. 인공 혈액은 산소를 조직에 운반 및 공급할 수 있는 혈액 제품이다. 인공 혈액은 외과 수술 동안 및 과급성 출혈 이후 손실된 혈액 보충용 및 외상 이후 재생 수술용을 포함하여 다수의 용도를 가지고 있다. 혈장 증량제는 일반적으로 산소를 운반할 수 없는 혈관계에 투여되는 인공 혈액이다. 혈장 증량제는 예컨

대, 화상으로 유실된 혈장 대체용, 저혈량 쇼크 치료용 및 혈액희석(예컨대, 정상혈액량을 유지하고 혈액 점도를 낮추는데 사용)에 유효하게 사용될 수 있다. 특히, 인공혈액은 상기 목적 또는 현재 저장된 혈액이 환자에게 투여되는 모든 목적에 사용될 수 있다.(Bonson 등의 미국 특허 제 4,001,401호 및 Morris 등의 미국 특허 제 4,061,736호 참조).

[0009] 현재 인간의 혈액 공급에는 여러 가지 한계가 있으나, 이는 외인성 인공 혈액의 사용에 의해 완화될 수 있다. 이는 광범위한 유용성을 가지는 안전하고 유효한 인공 혈액이 타가 혈액(allogeneic blood)의 부족을 감소하는 것으로 설명될 수 있다. 더욱이, 그런 인공 혈액은 교차시험(cross-matching)(혈액용에는 필수적임)과 상관없이 외상 이후 재생 과정에서 주입이 될 수 있으므로 허혈성 조직에 산소를 재공급하는 시간을 감소시킬 수 있다. 그리고 인공 혈액은 이후 과정에서 다시 회복될 수 있는 환자로부터 자가 혈액 채취가 허용되는 외과 수술 전의 환자에게 투여될 수 있고, 필요에 따라서는 수술 후에도 투여될 수 있다. 따라서 외인성 혈액 제품을 사용하는 것은 환자가 타가 수혈에 노출되는 것을 보호해줄 뿐만 아니라, 자가 혈액 또는 타가 혈액을 적절한 용도로 사용되게 한다.

[0010] 현재 인공 혈액의 한계점

[0011] 지금까지 생산이 시도된 인공 혈액(때로는 “산소-운반 혈장 증량제”로 언급됨)은 한계 효용을 가진 제품 또는 장황한 제품 및/또는 고가의 제품이다. 그런 제품을 생산하는 비용은 특히, 상기 제품이 가장 필요한 시장(예컨대, 신흥 제3 세계 국가)에서 상기 제품이 광범위하게 사용되는 것을 방해할 만큼 고가이다.

[0012] 인공 혈액은 하기 3개의 카테고리로 나뉘어진다: i) 퍼플루오르카본계 유제, ii) 리포솜에 캡슐화된 헤모글로빈, 및 iii) 개질된 무세포성 헤모글로빈.

[0013] 하기에서 논의되는 것과 같이, 비록 개질된 무세포성 헤모글로빈을 포함하는 제품이 가장 유력하게 생각되고는 있지만 상기 어떤 것도 성공한 것은 없다. 퍼플루오르화합물계 조성물은 리간드로서 산소에 결합하는 것과는 반대로 산소를 용해시킨다. 생물계에 사용되기 위하여, 퍼플루오르화합물은 일반적으로 난황 인지질인 지질에 유화된다. 퍼플루오르카본 유화제가 제조하는데 저렴하기는 하지만 임상적으로 유효한 내성 용량(tolerated dose) 만큼 산소를 운반하지는 못한다. 반대로, 리포솜에 캡슐화된 헤모글로빈은 효과적이기는 하지만, 너무 고가이기 때문에 범용적이지 못하다.(Winslow, Robert M., “Hemoglobin-based Red Cell Substitutes,” John Hopkins University Press, Baltimore(1992) 참조).

[0014] 오늘날 임상적으로 시도되고 있는 인공 혈액 제품의 대부분은 개질된 헤모글로빈을 기초로 한다. 종종 헤모글로빈계 산소 운반체(HBOCs)라고 불리는 상기 제품은 적혈구 잔여물(스트로마)이 없는 화학적으로 개질된 헤모글로빈의 균질한 수용액을 포함한다. 비록, 인간의 무지질 헤모글로빈(SFH)이 HBOC 제조용 공급원으로 가장 일반적이기는 하나, 다른 기원의 헤모글로빈도 사용되고 있다. 예컨대, 헤모글로빈은 동물 혈액(예컨대, 소 또는 돼지 헤모글로빈), 세균 또는 효모, 또는 목적으로 하는 헤모글로빈 제품을 생산하도록 분자적으로 변형된 형질전환 동물 또는 식물로부터 추출될 수 있다. 일반적으로 헤모글로빈을 개질하기 위한 화학적 변형은 분자 내 교차결합, 올리고머화 및/또는 고분자 접합(polymer conjugation) 중 하나이다. 상기 방법에 의해 개질된 헤모글로빈은 개질되지 않은 헤모글로빈에 비하여 순환계에서 더 오래 지속되고 산소 결합 특성이 혈액과 유사하게 된다. 상기한 바와 같이 조기에 배출되는 이량체의 형성을 억제하기 위하여 사량체 헤모글로빈의 서브유닛이 서로 분자내 교차결합으로 화학적으로 결합된다(Rausch 등의 미국 특허 제5,296,465호).

[0015] HBOC 제품을 만드는 비용이 고가이기 때문에 상업적 유용성에 한계가 있다. 게다가 본 발명자들은 종래 HBOCs가 모세혈관 보다 소동맥벽에 있는 조직에 과량의 산소를 방출하는 경향이 있다는 것을 규명하였다. 이는 HBOC에 의해 모세혈관 주변 조직으로 운반될 수 있는 산소가 불충분하다는 것으로 귀결될 수 있다. 이와 같은 사실에도 불구하고 HBOC의 초기 산소 적재량은 친화도가 낮은 변이체를 제외하고 천연 적혈구에 비해 상당히 높다.

[0016] 대부분의 경우, HBOC는 천연 헤모글로빈의 경우와 비교하여 낮거나 동일한 산소 친화도를 갖도록 제조되었다. 그러나 상기한 바와 같이, 이는 조직으로 산소를 불충분하게 운반하는 결과를 초래할 수 있다. 따라서 본 발명은 수성 희석제에 용해되어 있는 높은 산소 친화도를 가지는 HBOC를 포함하는 인공 혈액에 관한 것이다.

[0017] 발명의 요약

[0018] 본 발명의 방법과 조성물은 응급실, 수술실, 전쟁터, 암 병동 및 가축 병원을 포함한 여러 시설에서 유용하게 사용될 수 있다. 본 발명은 독성이 적고 안정성이 높아서 인공 혈액의 효능이 상실됨 없이 실온에서 보

관이 가능하다. 또한 본 발명은 혈액형 교차 실험 및 관련 실험을 하지 않아도 되기 때문에 더 빨리 안정하게 환자 치료에 사용될 수 있다. 본 발명은 낮은 독성, 긴 저장성 및 범용성 때문에 특히 인공 혈액에 유용하게 사용될 수 있다.

[0019] 본 발명은 동일 조건에서 동일한 동물 소스(source)(즉, 동일한 종의 동물) 유래의 천연 무지질(stroma-free) 헤모글로빈 보다 P50이 적은 표면이 개질된 산화 헤모글로빈을 포함하는 인공 혈액제를 제공한다. 적합한 동물 소스(source)로는, 예를 들면, 인간(human), 젓소(cow), 돼지(pig) 및 말(horse)을 포함한다.

[0020] 바람직한 실시예에서, 인공 혈액제는 표면이 개질된 산화 헤모글로빈과 수성 희석제를 포함하는 조성물 형태이다. 또한 본 발명의 바람직한 실시예에서 표면이 개질된 산화 헤모글로빈은 10토르(torr) 미만, 더욱 바람직하게는 7토르(torr) 미만의 P50을 갖는다.

[0021] 또한 본 발명은 하나 이상의 폴리알킬렌 산화물이 상기 산화 헤모글로빈에 공유 결합되어 있는 인공 혈액제를 제공한다.

[0022] 본 발명의 일 실시예에서, 인공 혈액제는 일반식 $H(OCH_2CH_2)_nOH$ 으로 나타내어지고, 상기에서 n은 4보다 크거나 동일한 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 같은 폴리알킬렌 산화물의 중합체(polymer)가 공유결합되어 제조된다. 바람직하게는 상기 인공 혈액제에서 메트헤모글로빈/총 헤모글로빈의 비율은 0.1 보다 작다.

[0023] 또한 본 발명은 메트헤모글로빈/총 헤모글로빈의 비율이 0.1 보다 작고 10 토르 보다 작은 P50을 가지는 PEG-헤모글로빈 접합체를 포함하는 24°C에서 자동산화에 안정한 인공 혈액제를 제공한다.

[0024] 또한 본 발명은

[0025] a) 메트헤모글로빈/총 헤모글로빈의 비율이 0.1 보다 작은 헤모글로빈을 제조하는 단계;

[0026] b) 폴리알킬렌 산화물을 헤모글로빈에 공유결합시켜 10토르 보다 적은 P50을 가지는 표면이 개질된 산화 헤모글로빈을 형성하는 단계; 및

[0027] c) 적절한 희석제에 표면이 개질된 산화 헤모글로빈을 현탁시키는 단계를 포함하는 인공 혈액제를 제조하는 방법을 제공한다. 바람직하게는 상기 헤모글로빈을 제조하는 단계는 적혈구로부터 헤모글로빈을 분리하는 단계를 추가로 포함한다.

[0028] 또한, 상기 헤모글로빈을 제조하는 단계는 메트헤모글로빈/총 헤모글로빈의 비율이 0.1 이상인 헤모글로빈을 적혈구로부터 분리하는 단계 및 상기 헤모글로빈을 대기에 충분한 시간동안 노출시켜 메트헤모글로빈/총 헤모글로빈 비율을 0.1 이하로 낮추는 단계를 더 포함한다. 이 단계는 티올 함유 환원제의 부재하에 수행될 수 있다.

[0029] 본 발명은 수성 희석제 내의 인공 혈액제를 그들이 필요한 포유동물에 투여하는 것을 포함하는 조직에 산소가 전달되도록 인공 혈액을 사용하는 방법을 제공한다.

[0030] 본 발명의 다른 측면은 명세서 전체 기재에 기재되어 있다.

[0031] 도면의 간단한 설명

[0032] 도 1은 Ma1PEG-Hb 및 SFH의 FPLC 크로마토그램을 나타낸 것이다.

[0033] 도 2는 Ma1PEG-Hb 및 SFH에 대한 산소 평형 곡선을 나타낸 것이다.

[0034] 도 3은 두 종류의 PEG-개질된 헤모글로빈(PHP 및 POE) 및 개질되지 않은 헤모글로빈(SFH)의 FPLC 용출 패턴을 나타낸 것이다. PHP 및 POE의 패턴이 정량적으로가 아니라 정성적으로 유사함을 유념하라. 또한, POE 곡선에서 명백히 개질되지 않은 헤모글로빈의 작은 피크를 유념하라.

[0035] 도 4는 2 종류의 PEG-개질된 헤모글로빈(PHP 및 POE)의 산소 평형 곡선을 나타낸 것이다. 상기 두 용액은 모두 유의적인 협동성(cooperativity)을 가지고 있지 않음을 유념하라.

[0036] 도 5는 Ma1PEG-헤모글로빈이 실온에 있는 경우 시간에 따른 산화율을 나타낸 것이다. 시료는 동일한 방법으로 2개의 별개의 시료병으로부터 2번 반복하여 측정하였다. 산화율은 시간 당 총 헤모글로빈의 1%로서,

10시간 동안 5.0% 에서 5.5%로 증가하였다.

- [0037] 도 6은 PHP 또는 POE를 수혈받은 동물 두 그룹의 카프란-메이어(Kaplan-Meier) 생존 분석을 나타낸 것이다.
- [0038] 도 7은 두 종류의 PEG-개질된 헤모글로빈(PHP 및 POE)을 수혈받은 동물의 평균 동맥압을 나타낸 것이다. 상기 반응은 PHP를 수혈받은 동물에서 신속하고 보다 크게 나타났다. 한편, 출혈 기간동안 압은 POE 동물에서 더 유지되었다.
- [0039] 도 8은 MalPEG-Hb를 -20℃에서 6일간, +4℃에서 5일간 및 실온(24℃)에서 10시간 동안 저장한 경우 시간에 따른 다양한 산화율의 변화를 나타낸 것이다.
- [0040] 도 9는 MalPEG-Hb를 +4℃에서 5일간 저장한 경우 시간에 따른 산화율을 나타낸 것이다.
- [0041] 도 10은 MalPEG-Hb를 실온에서 10시간 동안 저장한 경우 시간에 따른 산화율을 나타낸 것이다.

발명의 상세한 설명

[0042] 본 발명은 높은 산소 친화도를 가지는 HBOCs를 포함하는 인공 혈액(blood substitutes)에 관한 것이다. 몇몇 적용에서, 상기 조성물들은 천연 헤모글로빈에 유사한 산소 친화도를 가지는 인공 혈액보다 더 효율적으로 산소를 조직에 운반할 수 있다.

[0043] 정의

[0044] 본 발명의 이해를 돕기 위하여, 본 명세서에 사용된 많은 용어들을 하기와 같이 정의한다.

[0045] "헤모글로빈(hemoglobin)"이라 함은 산소를 운반하는 적혈구 세포 내에 포함되어 있는 단백질을 일반적으로 말한다. 헤모글로빈의 각 분자는 4개의 서브유닛, 2개의 α 체인 및 2개의 β 체인을 가지며, 이들은 사량체 구조(tetrameric structure)로 배치되어 있다. 각 서브유닛은 하나의 헴(heme) 그룹을 포함하는데, 상기 헴 그룹은 산소와 결합하는 철-함유 센터(iron-containing center)이다. 따라서, 각 헤모글로빈 분자는 4개의 산소분자와 결합할 수 있다.

[0046] "개질된 헤모글로빈(modified hemoglobin)"은, 이에 제한되지는 않으나, 분자내 및 분자간 교차 결합(intra- and inter-molecular cross-linking), 유전적 조작(genetic manipulation), 중합반응(polymerization) 및/또는 다른 화학기(chemical group)(e.g., 폴리알킬렌 산화물, 예컨대, 폴리에틸렌 글리콜; 또는 단백질, 펩타이드, 탄수화물, 합성 폴리머 등과 같은 다른 부가물)와의 접합과 같은 화학적 반응에 의해 변경된 헤모글로빈을 포함한다. 본질적으로, 헤모글로빈의 구조적 또는 기능적 특성이 그의 천연 상태에서부터 변경되었다면 상기 헤모글로빈은 "개질된 (modified)" 것이다. 본 발명에서 "헤모글로빈" 자체는 개질된 헤모글로빈 뿐 아니라 천연의 비개질된 헤모글로빈을 모두 말한다.

[0047] "표면이 개질된 헤모글로빈(표면-개질 헤모글로빈)(surface-modified hemoglobin)"이라 함은 텍스트란이나 폴리알킬렌 산화물과 같은 화학기가 부착된, 보다 일반적으로는 공유결합으로 부착된, 상기에서 언급한 헤모글로빈을 말한다. "표면이 개질된 산화 헤모글로빈(surface modified oxygenated hemoglobin)"은 표면이 개질될 때 "R" 상태에 있는 헤모글로빈을 의미한다.

[0048] "무지질 헤모글로빈(stroma-free hemoglobin)"은 모든 적혈구 세포막이 제거된 헤모글로빈을 말한다.

[0049] "메트헤모글로빈(methemoglobin)"은 3가 이온 상태(ferric state)의 철분자를 함유하며, 산소 운반체로서 기능을 할 수 없는 헤모글로빈의 산화된 형태를 말한다.

[0050] "MalPEG-Hb"는 말레미딜에 의해 활성화된 PEG(malemidyl-activated PEG)가 접합된 헤모글로빈을 말한다. 상기 MalPEG는 다음의 일반식일 수 있다.



[0052] 상기에서, Hb는 사량체 헤모글로빈을 말하고, S는 표면 티올기(surface thiol group)이고, Y는 Hb와 Mal-PEG 사이에 있는 숙신이미도 공유결합(succinimido covalent link)이다. R는 알킬, 아미드, 카바메이트 또는 페닐

기(원재료의 기원(source) 및 화학적 합성 방법에 의존됨)이다. $[O-CH_2-CH_2]_n$ 은 PEG 폴리머의 백본(backbone)을 구성하는 옥시에틸렌 유닛으로, 여기서 n은 폴리머의 길이(예: MW=5000)을, $O-CH_3$ 는 말단 메톡시기(terminal methoxy group)를 나타낸다. PHP와 POE는 2개의 다른 PEG로 개질된 헤모글로빈이다.

- [0053] "퍼플루오르카본(perfluorocarbons)"은 불소(fluorine) 원자를 포함하는 합성, 비활성 분자들을 말하며, 이들은 전체적으로 할로젠(Br, F, Cl)과 탄소원자로 구성된다. 에멀전 형태에서 이들은 인공 혈액으로서 개발되는데, 이는 이들이 동량의 혈장이나 물보다 수배 많은 산소를 용해(dissolve)할 수 있는 능력을 가지고 있기 때문이다.
- [0054] "혈장 증량제(plasma expander)"는 실혈(blood loss)를 치료하기 위해 개체에 제공될 수 있는 용액이다.
- [0055] "산소 운반능(oxygen carrying capacity)" 또는 간단히 "산소능(oxygen capacity)"은 산소를 운반하는 인공 혈액의 능력이나, 산소를 운반(deliver)하는 효율성과 필연적으로 연관되어 있지는 않다. 헤모글로빈의 g 당 1.34ml의 산소가 결합하는 것으로 알려졌으므로, 산소 운반능은 일반적으로 헤모글로빈의 농도로부터 산출된다. 그러므로, 헤모글로빈 농도(g/dl)에 인자(factor) 1.34를 곱하면 산소능(ml/dl)이 산출된다. 헤모글로빈 농도는 당업계에 공지된 방법, 예컨대 β -헤모글로빈 포토미터(β -Hemoglobin Photometer; HemoCue, Inc., Angelholm, Sweden)를 이용하여 측정될 수 있다. 유사하게, 산소능은 연료 전지 장치(fuel cell instrument) (예: Lex-O₂-Con; Lexington Instruments)와 같은 장치를 이용하여 헤모글로빈 샘플 또는 혈액 샘플로부터 방출된 산소의 양으로 측정될 수 있다.
- [0056] "산소 친화도(oxygen affinity)"는 헤모글로빈과 같은 산소 운반체가 산소 분자(molecular oxygen)에 결합하는 결합활성(avidity)을 말한다. 이 특성은 산소의 부분압(partial pressure)(X축)과 산소와 결합되어 있는 헤모글로빈 분자의 포화 정도(Y축)에 대한 산소 평형 곡선(oxygen equilibrium curve)에 의해 결정될 수 있다. 이 곡선의 포지션(position)은 산소 운반체가 산소를 반포화(half-saturated)시키는 산소의 부분압, 즉 P50이라는 수치(value)에 의해 표시된다. P50은 산소 친화도에 반비례한다. 즉, P50이 낮을수록 산소 친화도는 높다. 전체 혈액(및 적혈구 및 헤모글로빈과 같은 전체 혈액의 구성성분)의 산소 친화도는 당업계에 공지된 여러 방법들에 의해 측정될 수 있다(Winslow *et al.*, *J. Biol. Chem.* 252(7):2331-37 (1977)). 산소 친화도는 또한 상업적으로 판매되고 있는 HEMOX™ 분석기(TCS Scientific Corporation, New Hope, Pennsylvania)를 이용하여 측정될 수 있다(Vandegriff and Shrager in "Methods in Enzymology" (Everse *et al.*, eds.) 232:460 (1994)).
- [0057] "고장성(hypertonic)"이라 함은 혈액(>약 25-27mmHg)보다 교질 삼투압(colloidal osmotic pressure)(팽창한(oncotic))을 가지는 교질 용액을 의미한다. 교질 삼투압은 웨스커 기계(Wescor instrument)와 같은 적당한 테크닉을 이용하여 측정될 수 있다.
- [0058] "산소-운반 성분(oxygen-carrying component)"이라 함은 광범위하게는 인체의 순환계에서 산소를 운반하고 상기 산소의 일부를 조직에 전달(deliver)할 수 있는 물질을 말한다. 바람직한 실시예에서, 상기 산소-운반 성분은 천연 또는 개질된 헤모글로빈일 수 있으며, 또한 본 발명에서는 이를 "헤모글로빈에 기초한 산소 운반체(hemoglobin based oxygen carrier)" 또는 "HBOC"라 말한다.
- [0059] "혈역학적 지표(hemodynamic parameters)"라 함은 광범위하게는 혈압, 유동(flow) 및 부피 상태(volume status)를 표시하는 치수로서, 혈압, 심박출량(cardiac output), 우동맥압(right atrial pressure) 및 좌심실 확장말기압(left ventricular end-diastolic pressure)과 같은 치수를 포함한다.
- [0060] "결정질(crystalloid)"이라 함은 염, 당 및 완충용액과 같은 작은 분자(통상 10Å 미만)를 말한다. 교질(colloids)과는 달리, 결정질은 삼투적 활성형 성분(oncologically active components)을 포함하지 않으며, 순환계(circulation)와 간질성 공간(interstitial spaces)의 사이를 매우 빠르게 평형화시킨다.
- [0061] "교질(colloids)"은, "결정질"과 반대로, 크기 및 전하에 의존하는 생물학적 막을 가로질러 평형시키는 큰 분자(통상 10Å 보다 큼)를 말하며, 펜타스타치(pentastarch) 및 헤타스타치(hetastarch)와 같은 전분 뿐 아니라 알부민과 젤라틴과 같은 단백질을 포함한다.
- [0062] "교질 삼투압(colloid osmotic pressure)"이라 함은 막을 가로질러 유동의 밸런스를 평형화시키기 위해 교질에 의해 가해진 압력을 말한다.
- [0063] "자동산화에 대한 안정(stable to autooxidation)"이라 함은 자동산화를 낮은 속도로 유지하는 HBOC의 능력을

말한다. HBOC는, 만약 메트헤모글로빈/총 헤모글로빈 비율(ratio)이 24℃에서 10시간 후에 2% 보다 크지 않다면, 24℃에서 안정한 것으로 본다. 예컨대, 만약 자동산화 속도가 0.2hr^{-1} 이면, 그리고 메트헤모글로빈의 초기 퍼센트가 5%이고, 상기 퍼센트가 7%보다 크지 않다면, HBOC는 10시간 동안 실온에서 안정한 것으로 볼 수 있다.

[0064] "메트헤모글로빈/총 헤모글로빈 비율(methemoglobin/total hemoglobin ratio)"이라 함은 총 헤모글로빈에 대한 산소가 제거된(deoxygenated) 헤모글로빈의 비율을 말한다.

[0065] "혼합물(mixture)"이라 함은 각 물질의 특성을 소실시킬 수 있는 반응의 생성없이 2개 이상의 물질이 함께 혼합된 것을 말한다; "용액(solution)"이라 함은 액체 혼합물(liquid mixture)를 말한다; "수용액(aqueous solution)"이라 함은 약간의 물을 포함하는 용액을 말하며, 다중성분 용액(multi-component solution)을 형성하기 위해 하나 이상의 다른 액체 성분을 포함할 수도 있다; "약(approximately)"이라 함은 표시된 수치의 범위(예: 10%) 내에 있는 실제 수치를 말한다.

[0066] "폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol)"이라 함은 일반식 $\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$ (여기서, n은 4이상)으로 나타내어지는 액체 또는 고체 중합체를 말한다. 치환되거나 치환되지 않은 어떤 PEG 제제도 사용될 수 있다.

[0067] 본 발명에 사용된 다른 용어에 대한 의미는 당업계에서 통상의 지식을 가진 자(당업자)라면 용이하게 이해할 수 있다.

[0068] 산소 운반 및 소비의 특성(The Nature of Oxygen Delivery and Consumption)

[0069] 본 발명의 조성물 및 방법을 성공적으로 이용하는데 산소 운반 및 소비의 근원적인 기초를 이해할 필요가 없다 할지라도 이들 추정되는 기초의 일부를 이해하는 기본적인 지식은 다음에 기재된 논고(discussion)를 이해하는데 도움을 줄 수 있다. 일반적으로 모세관은 산소를 조직으로 운반하는 주 운반자로 생각되어져 왔다. 그러나, 휴지기의 조직에 관한 최근의 연구 결과 세동맥(arteriolar)과 모세관 산소 방출 사이에 거의 평형을 이루고 있다고 추정한다. 즉, 동맥계의 헤모글로빈은 세동맥 네트워크에 산소 함량의 약 1/3을 운반하고 모세관에 약 1/3을 운반하며, 남아있는 산소는 정맥계를 통한 미세순환으로 배출되는 것으로 생각되어진다.

[0070] 동맥 자체는 산소를 이용하는 장소이다. 예컨대, 동맥벽은 혈관 저항에 대한 수축을 통하여 혈류를 조절하기 위해 에너지를 필요로 한다. 즉, 동맥벽은 혈액의 산소 배출을 확산하기 위해 중요한 부위이다. 그러나, 현재의 산소-운반 조성물(예: HBOCs)은 동맥계에서 그들의 산소 함량을 과도하게 방출할 수 있으며, 이는 모세혈관 관류(capillary perfusion)에서 자동조절의 저하를 초래한다. 따라서, 인공 혈액의 산소 운반의 효율성은 사실상 산소 친화도가 너무 낮거나 또는 산소가 너무 많아서 제한받는다.

[0071] 정맥벽에 의한 산소 소비율, 즉, 생화학적 합성에 필요한 산소 및 기작적 활동에 필요한 산소의 조합은 정맥벽의 기울기(gradient)를 측정함으로써 결정할 수 있다(Winslow, *et al.*, in "Advances in Blood Substitutes" (1997), Birkhauser, ed., Boston, MA, pages 167-188). 현재 기술은 다양한 혈관에서 정확한 산소부분압 측정을 가능하게 한다. 측정된 기울기는 측정된 부위에 있는 조직에 의한 산소 이용 속도에 정비례한다. 이러한 측정은 혈관벽이 염증과 수축의 증가에 따라 증가하고 이완에 의해 감소하는 산소 이용의 기준선(baseline)을 가지고 있음을 보여준다.

[0072] 혈관벽 기울기는 조직의 산화(oxygenation)에 반비례한다. 혈관 수축(vasoconstriction)은 산소 기울기 조직 대사(oxygen gradient tissue metabolism)를 증가시키는 반면, 혈관 확장(vasodilation)은 기울기를 감소시킨다. 기울기가 클수록 혈관벽에 의해 사용되는 산소가 많다는 것을 나타내는 반면, 기울기가 작을 수록 조직에 사용될 수 있는 산소가 적다는 것을 의미한다. 동일한 현상은 미세순환 동안 내내 존재하는 것으로 여겨지고 있다.

[0073] 혈관 수축과 산소 친화도의 관계(The Relationship Between Vasoconstriction and Oxygen Affinity)

[0074] 높은 산소 친화도를 가지는 HBOC를 개발하는 근본적인 이유는 적혈구 수혈에 대한 대체물(alternatives)로서 무세포 헤모글로빈(cell-free hemoglobin)을 이용한 지난 연구에 일부 바탕을 두고 있다. 이러한 용액들에서 몇몇 생리학적 효과는 완전하게 이해되지 않고 있다. 이들 중 아마도 혈관 수축을 일으키는 성향에 대하여 가장 많이 논쟁되고 있으며, 상기 혈관 수축은 동물과 인간에서 고혈압으로 나타나기도 한다(Amberson, W., "Clinical experience with hemoglobin-saline solution,". *Science* 106:117-117 (1947))(Keipert, P., A. Gonzales, C. Gomez, V. Macdonald, J. Hess, and R. Winslow, "Acute changes in systemic blood pressure

and urine output of conscious rats following exchange trasnfusion with diaspirin-crosslinked hemoglobin solution," *Transfusion* 33:701-708, (1993)). 비스-디브로모살리실-퓨마레이트(bis-dibromosalicyl-fumarate, $\alpha\alpha$ Hb))를 가지는 α 체인 사이에 교차결합된 인간 헤모글로빈이 인공산소운반체 모델로서 미육군(U.S. Army)에 의해 개발되었으나, 폐 및 전신성 혈관 저항이 심각하게 증가되는 것이 증명된 후에 폐기되었다(Hess, J., V. Macdonald, A. Murray, V. Coppes, and C. Gomez, "Pulmonary and systemic hypertension after hemoglobin administration," *Blood* 78: 356A (1991)). 상업화를 위한 제품도 제3상 임상 실험이 실패한 후에 폐기되었다(Winslow, R. M. " $\alpha\alpha$ -Crosslinked hemoglobin: Was failure predicted by preclinical testing?" *Vox sang* 79: 1-20 (2000)).

[0075] 무세포 헤모글로빈에 의해 초래된 혈관 수축에 대한 가장 일반적이고 진보된 설명은 그것이 내피성 이완 인자 (endothelium-derived relaxing factor)인 산화질소(nitric oxide, NO)와 쉽게 결합한다는 것이다. 실제로 NO 에 대한 친화도가 감소된 재조합 헤모글로빈이 제조되었으며, 이것은 탑-로드 랫트 실험(top-load rat experiments)에서 고혈압을 덜 일으키는 것으로 나타났다(Doherty, D. H., M. P. Doyle, S. R. Curry, R. J. Vali, T. J. Fattor, J. S. Olson, and D. D. Lemon, "Rate of reaction with nitric oxide determines the hypertensive effect of cell-free hemoglobin," *Nature Biotechnology* 16: 672-676 (1998))(Lemon, D. D., D. H. Doherty, S. R. Curry, A. J. Mathews, M. P. Doyle, T. J. Fattor, and J. S. Olson, "Control of the nitric oxide-scavenging activity of hemoglobin, " *Art Cells, Blood Subs., and Immob. Biotech* 24: 378 (1996)). 그러나, NO 결합이 헤모글로빈의 혈관활성(vasoactivity)에 대한 유일한 설명이 아닐 수 있다는 연구 결과들이 나오고 있다. 폴리에틸렌 글리콜(PEG)로 개질된 헤모글로빈 분자들과 같은 몇몇 큰 헤모글로빈 분자들은, 그들의 NO 결합율이 고혈압을 극심하게 일으키는 $\alpha\alpha$ Hb의 NO 결합율과 동일함에도 불구하고, 고혈압을 일으키는 효과(hypertensive effect)가 사실상 없음이 규명되었다(Rohlfes, R. J., E. Bruner, A. Chiu, A. Gonzales, M. L. Gonzales, D. Magde, M. D. Magde, K. D. Vandegriff, and R. M. Winslow, "Arteial blood pressure response to cell-free hemoglobin solutions and the reaction with nitric oxide," *J Biol Chem* 273: 12128-12134 (1998)). 더욱이, 출혈(hemorrhage) 전에 PEG-헤모글로빈을 교환수혈로 제공하였을 때 상기 PEG-헤모글로빈이 출혈의 결과를 억제하는데 매우 효과적임이 밝혀졌다(Winslow, R. M., A. Gonzales, M. Gonzales, M. Magde, M. McCarthy, R. J. Rohlfes, and K. D. Vandegriff, "Vascular resistance and the efficacy of red cell substitutes, " *J Appl Physiol* 85: 993-1003 (1998)).

[0076] 고혈압이 발생되지 않는 것과 관련이 있는 상기 효과는 현재까지 헤모글로빈을 기초로 한 제품들(hemoglobin-based products)이 실패했던 이유가 혈관 수축임을 나타내는 것이다. 상기 결과를 근거로 하여 대체물로서의 혈관 수축, 또는 가능하게는 NO 결합의 효과를 설명하기 위한 가설이 세워졌다. 어떤 특정한 이론에 의해 제한 되는 것을 원하지 않더라도, 헤모글로빈의 혈관 활성 효과의 실제적인 성분은 무세포 공간에서 헤모글로빈의 확산에 대한 반사성 반응이라고 생각되고 있다. 이러한 가설은 시험관 내 모세관 구조(*in vitro* capillary system)에서 시험되어졌으며, 감소된 확산 상수(reduced diffusion constant)를 가지는 PEG-헤모글로빈이 천연 적혈구 세포와 매우 비슷한 방식으로 O₂를 전달함이 규명되었다(McCarthy, M. R., K. D. Vandegriff, and R. M. Winslow, "The role of facilitated diffusion in oxygen transport by cell-free hemoglobin; Implications for the design of hemoglobin-based oxygen carriers, " *Biophysical chemistry* 92: 103-117 (2001)). 헤모글로빈으로부터 혈관벽까지 포화도(saturation)의 변화가 헤모글로빈 자체의 확산 기울기(diffusion gradient)를 결정하는 요인이므로, 혈장에서 헤모글로빈에 대한 확산을 촉진시키는데 산소 친화도가 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

[0077] 소동맥에서 혈관벽으로의 O₂ 방출은 혈관수축을 일으키므로, 무세포 헤모글로빈의 산소 친화도는 혈관 긴장도 (vascular tone)을 조절하는 부가적인 역할을 할 수 있다(Lindbom, L., R. Tuma, and K. Arfors, "Influence of oxygen on perfusion capillary density and capillary red cell velocity in rabbit skeletal muscle, " *Microvasc Res* 19: 197-208 (1980)). 햄스터 피하지방(skinfold)에서 상기 관내 PO₂는 20-40 토르(torr)이며, 이 때 정상 적혈구 세포의 산소 평형 곡선은 최대 경사를 이룬다(Intaglietta, M., P. Johnson, and R. Winslow, "Microvascular and tissue oxygen distribution, " *Cardiovasc Res* 32: 632-643 (1996)). 따라서 이론학적으로 무세포 헤모글로빈의 P50이 적혈구보다 낮은 것이 (즉, 산소 친화도가 높다) 소동맥 조절 관 (arteriolar regulatory vessels)에서 O₂의 방출을 저해하기 위해 중요하다고 할 수 있다.

[0078] 산소-운반 성분(Oxygen-Carrying Component)

[0079] 바람직한 실시예에서, 산소 운반체(즉, 산소-운반 성분)은 헤모글로빈을 기초로 한 산소 운반체(hemoglobin-

based oxygen carrier) 또는 HBOC이다. 헤모글로빈은 천연(비개질)일 수 있고, 분자내 또는 분자간 교차결합, 중합반응 또는 화학기(예: 폴리알킬렌 옥사이드 또는 다른 부가물)의 부가과 같은 화학적 반응에 의해 개질된 것일 수도 있으며, 또는 재조합 조작될 수 있다. 인간 알파- 및 베타-글로빈 유전자들은 모두 클로닝되었으며 서열분석되었다.(Liebhaber, *et al.*, P. N. A. S. 77: 7054-7058 (1980); Marotta, *et al.*, J. Biol. Chem. 353: 5040-5053 (1977)(베타-글로빈 cDNA)). 게다가, 재조합적으로 생산된 많은 개질된 헤모글로빈들이 현재 부위특이적 돌연변이기술(site-directed mutagenesis)를 이용하여 제조되고 있다. 그러나, 이들 다양한 "돌연변이체" 헤모글로빈들이 바람직하지 않은 높은 산소 친화도를 가지고 있음이 보고되었다(Nagai, *et al.*, P. N. A. S., 82: 7252-7255 (1985)).

[0080] 본 발명은 헤모글로빈의 기원(source)에 제한받지 않는다. 예컨대, 헤모글로빈은 동물 및 인간으로부터 유래할 수 있다. 특정 적용에서 헤모글로빈의 바람직한 기원은 인간, 소 및 돼지일 수 있다. 게다가, 헤모글로빈은 화학적 합성 및 재조합 기술을 포함하는 다른 방법에 의해 제조될 수 있다. 헤모글로빈은 유리 형태로 혈액 제품 조성물에 첨가될 수 있다. 또한, 합성 입자, 마이크로벨론(microballon) 또는 리포솜과 같은 베지클(vessicle)에 캡슐화될 수 있다. 본 발명의 바람직한 산소-운반 성분은 무지질이어서 하고 내독소가 없어야 한다. 산소-운반 성분의 대표적인 예는 미국특허에 개시되어 있다: 호시아(Hsia)의 미국특허 제4,857,636호; 왈더(Walder)의 미국특허 제4,600,531호; 모리스(Morris) 등의 미국특허 제4,061,736호; 마주르(Mazur)의 미국특허 제3,925,344호; 타이(Tye) 등의 미국특허 제4,529,719호; 스캔논(Scannon)의 미국특허 제4,473,496호; 보키(Bocci) 등의 미국특허 제4,584,130호; 클루거(Kluger) 등의 미국특허 제5,250,665호; 호프만(Hoffman) 등의 미국특허 제5,028,588호; 및 세갈(Sehgal) 등의 미국특허 제4,826,811호 및 5,194,590호.

[0081] 앞서 언급한 헤모글로빈의 기원 이외에, 말 헤모글로빈이 본 발명의 조성물에서 산소 운반 성분으로서 몇몇 이점이 있음이 최근 규명되었다. 한 이점은 상업적으로 판매되는 많은 양의 말 혈액을 말 헤모글로빈을 정제하는데 매우 쉽게 이용할 수 있다는 점이다. 또다른 예기치 않은 이점은 말 헤모글로빈은 본 발명의 인공 혈액에서 그것의 유용성을 강화시킬 수 있는 화학적 특성을 나타낸다는 점이다.

[0082] 이전 보고에서는 말 헤모글로빈이 인간 헤모글로빈보다 더 빨리 메트헤모글로빈으로 자동산화되고, 이는 인공 혈액 성분으로서 별로 바람직하지 않을 것이라고 제시하였다(J. G. McLean and I. M. Lewis, *Research in Vet. Sci.*, 19:259-262 (1975)). 자동-산화를 최소화하기 위해, 맥린과 루이스는 적혈구 세포를 용해시킨 후에 환원제인 글루타치온을 사용하였다. 그러나, 본 발명의 조성물을 제조하기 위해 사용되는 헤모글로빈은 헤모글로빈의 기원이 인간이나 말이나에 상관없이 적혈구 세포의 용해 후에 자동-산화를 저해하기 위하여 환원제의 사용을 필요로 하지 않는다.

[0083] 보다 최근에, 말 헤모글로빈이 인간 헤모글로빈과 다른 산소 친화도를 가지고 있음이 보고되었다(M. Mellegrini, *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 268:3313-3320 (20010)). 상기 차이점은 인간 헤모글로빈과 유사한 인공 혈액을 제조하기 위하여 말 헤모글로빈을 선별하는 것을 단념하게 만들었다. 그러나, 본 발명의 조성물에 혼합될 때 산소 친화도에 있어서 인간 헤모글로빈을 함유하는 접합체와 말 헤모글로빈을 함유하는 접합체 간에 큰 차이(10% 미만)가 없음이 관찰되었다.

[0084] 따라서, 겉으로 보이는 이들의 바람직하지 않은 특성과는 반대로, 본 발명의 조성물에서, 말 헤모글로빈은 인간 헤모글로빈보다 더 우수하지 않을 지라도 동등하다.

[0085] 본 발명에서 이용되는, HBOC는 동일한 조건에서 측정했을 때 전체 혈액보다 더 큰, 바람직하게는 전체 혈액의 2배의 산소 친화도를 가지거나, 또는 양자택일적으로 무지질 헤모글로빈(stroma-free hemoglobin, SFH)보다 더 큰 산소 친화도를 가지고 있다. 대개의 경우에, 이는 인공혈액에서 HBOC가 10, 바람직하게는 7보다 적은 P50을 가지게 될 것임을 의미한다. 유리 상태에서, SFH의 P50이 약 15 토르(torr)인 반면, 전체 혈액의 P50은 약 28 토르(torr)이다. 비록 SFH의 P50보다 낮은 P50은 수용되지 않는다고 암시되어 있었지만, 산소 친화도가 증가, 즉 P50이 감소되면 조직에 산소전달이 증가될 수 있다고 전예부터 제안되어 왔다(Winslow, *et al.*, in "Advances in Blood Substitutes" (1997), Birkhauser, ed., Boston, MA, at page 167, 및 미국특허 제 6,054,427호). 이러한 제안은 인공 혈액으로서 사용하기 위해 개질된 헤모글로빈은 더 낮은 산소 친화도를 가져야 하고, 또한 전체 혈액에 가까운 P50s를 가져야 한다고 여겨온 견해에 모순되는 것이다. 그러므로, 많은 연구자들은, 피리독실레이티드(pyridoxylated) 헤모글로빈이 SFH보다 더 쉽게 산소를 방출하므로, SFH의 P50을 10에서 약 20-22로 증가시키기 위하여 피리독실 포스페이트(pyridoxyl phosphate)를 이용하여 왔다.

[0086] 높은 산소 친화도를 가지는 HBOCs(즉, SFH보다 낮은 P50s을 가지는 HBOCs)를 제조하기 위하여 많은 다양한 과학적 접근이 있었다. 예컨대, B-93 시스템과 같이 산소 친화도에서 역할을 하는 아미노산 잔기를 규명하려는

연구가 진행되어 왔다. 또한 산소 친화도를 원하는 수준으로 조작하기 위하여 부위특이적 돌연변이기술이 용이하게 사용될 수 있다(미국특허 제5,661,124호). 다른 많은 방법은 미국특허 제6,054,427호에 개시되어 있다.

- [0087] 헤모글로빈-결합 독성(Hemoglobin-Associated Toxicity)
- [0088] 헤모글로빈은 2가(ferrous, Fe²⁺)에서 3가(ferric, Fe³⁺) 또는 메트헤모글로빈 형태로 가역적으로 변화할 때 자동산화하는 것으로 알려져 있다. 상기와 같은 현상이 일어날 때, 산소 분자(molecular oxygen)는 옥시헤모글로빈으로부터 과산화 음이온(superoxide anion, O₂⁻)의 형태로 해리된다. 이는 헴-글로빈 복합체의 불안정을 야기시키고 결과적으로 글로빈 체인의 변성을 초래한다. 산소 라디칼 형성과 단백질 변성은 모두 HBOCs의 체내 독성에서 역할을 하는 것으로 사료된다(Vandegriff, K. D., Blood Substitutes, Physiological Basis of Efficacy, pages 105-130, Winslow *et al.*, ed., Birkhauser, Boston, MA (1995)).
- [0089] 대개의 HBOCs에서는 산소 친화도와 헤모글로빈 산화 사이에 부정적인 상호관계가 있다. 예를 들면, 산소 친화도가 높을 수록 자동산화율은 낮다. 그러나, 산소 친화도 및 자동산화율에 대한 다른 헤모글로빈 개질의 효과는 항상 예측할 수 있는 것이 아니다. 게다가 산소 친화도와 자동산화율 간의 최적 밸런스는 여전히 규명되지 않았다.
- [0090] 본 발명은 본 발명의 PEG-Hb 접합체가 낮은 자동산화율을 나타낸다는 예기치 않는 규명에 관한 것이다. 산화율 측정시 이 수치는 가능한 한 낮아야 한다(즉, 실온에서 적어도 3시간, 보다 바람직하게는 적어도 10시간 동안, 시간 당 총 헤모글로빈의 0.2%, 보다 바람직하게는 0.1%). 따라서 본 발명의 HBOCs는 투여 및/실온에서의 저장 동안에 안정하게 유지될 수 있다.
- [0091] 산소-운반 성분의 개질(Modifications of the Oxygen-Carrying Component)
- [0092] 바람직한 실시예에서, 산소-운반 성분은 개질된 헤모글로빈이다. 헤모글로빈의 바람직한 개질은 "표면-개질(surface-modification)" 즉, 헤모글로빈 분자 상에 노출된 아미노산 측쇄(side chain)에 화학기가 공유결합으로 부착되는 것이다.
- [0093] 개질은 주로 헤모글로빈의 분자적 크기를 증가시키기 위해 수행되는 것으로서, 대부분 합성 중합체(synthetic polymers), 탄수화물, 단백질 등과 같은 중합체의 모이어티(polymeric moieties)를 공유결합으로 부착시킴으로써 수행된다. 일반적으로 합성 중합체가 바람직하다.
- [0094] 바람직한 합성 친수성 중합체는, 그 중에서도 특히, 폴리에틸렌 옥사이드(polyethylene oxide, (CH₂CH₂O)_n), 폴리프로필렌 옥사이드(polypropylene oxide, (CH(CH₃)CH₂O)_n) 또는 폴리에틸렌/폴리프로필렌 옥사이드 공중합체(copolymer)((CH₂CH₂O)_n-(CH(CH₃)CH₂O)_n)와 같은 폴리알킬렌 옥사이드(polyalkylene oxide)를 포함한다. 본 발명을 실시하기에 적합한, 끝은 사슬, 끝가지 사슬 및 임의로 치환된 합성 중합체는 의약 분야에 공지되어 있다.
- [0095] 매우 일반적으로, 헤모글로빈에 부착된 화학기는 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol)이며, 그 이유는 그의 약학적 흡수성 및 상업적 유용성 때문이다. PEGs는 일반적인 화학식 H(OCH₂CH₂)_nOH(여기서, n은 일반적으로 4보다 크거나 같음)를 가지는 중합체이다. PEGs 제제는 주로 그들의 평균 분자량과 일치하는 숫자가 다음에 온다. 예컨대, PEG-200은 평균 분자량이 200이며, 190-210의 범위의 분자량을 가진다. PEGs는 많은 다른 형태로 상업적으로 입수할 수 있으며, 대개의 경우에는 전환성화되어 있고 단백질과 접합되기 쉽다.
- [0096] 본 발명의 바람직한 실시예의 중요한 양상은 헤모글로빈이 산화(산소화)되거나 "R" 상태에 있을 때 표면 개질이 일어난다는 것이다. 이는 접합(conjugation) 전에 헤모글로빈을 대기와 평형을 이루도록 함으로써 용이하게 수행될 수 있다(또는 양자택일적으로, 활성 산소화(active oxygenation)를 수행할 수 있다). 산화된 헤모글로빈과 접합을 시킴으로써 제조된 헤모글로빈의 산소 친화도가 증가된다. 많은 연구자들이 산소 친화도를 감소시키기 위해 결합 전 탈산소화를 기술했기 때문에(미국특허 제5,234,903호), 일반적으로 상기 스텝은 금기로 간주된다.
- [0097] 여러가지 면에서 헤모글로빈의 표면을 개질시키는 것이 헤모글로빈과 변형체(예: PEG) 간의 결합(linkage)과 무관함에도 불구하고, 유동성이 더 커서 변형될 수 있는 양상의 결합을 하는 링커들과 비교할 때에 C₁-C₆의 불포화 지방족 또는 방향족 링커 치환기와 같이 좀 더 단단한 링커들이 접합체의 제조 및/또는 특성을 강하게 할 수 있는 것으로 사료된다.
- [0098] 헤모글로빈 분자에 부착될 수 있는 PEGs의 수는 PEGs의 크기에 따라 다양할 수 있다. 그러나, 제조된 개질 헤

모글로빈의 분자 크기는 원하는 반감기(half-life)에 도달할 수 있도록 신장에 의해 제거되는 것을 피할 수 있을 정도로 충분히 커야 한다. 블루멘스테인 등은 상기 크기가 84,000 분자량 이상이어야 한다고 하였다 (Blumenstein, *et al.*, in "Blood Substitutes and Plasma Expanders," Alan R. Liss, editors, New York, New York, pages 205-212 (1978)). 상기 문헌에서 저자는 다양한 분자량의 텍스트란에 헤모글로빈을 접합시켰다. 그들은 헤모글로빈(분자량 64,000)과 텍스트란(분자량 20,000)의 접합체가 순환으로부터 서서히 제거되었으며, 신장을 통한 제거는 무시할 만 하였다. 그러나 분자량이 84,000 이상으로 증가된 것은 제거 곡선(clearance curves)를 변형시키지 않았다. 따라서, 블루멘스테인 등이 결정한 바와 같이, HBOC는 84,000 이상의 분자량을 갖는 것이 바람직하다.

[0099] 본 발명의 일 실시예에서, HBOC는 "MalPEG"이며, 이는 말레미딜에 의해 활성화된 PEG에 헤모글로빈이 접합된 것이다. 상기 MalPEG는 하기의 화학식일 수 있다.

[0100] $Hb-(S-Y-R-CH_2-CH_2-[O-CH_2-CH_2]_n-O-CH_3)_m$ 화학식 I

[0101] 상기에서, Hb는 사량체(tetrameric) 헤모글로빈을 말하고, S는 표면 티올기(surface thiol group)이고, Y는 Hb와 Mal-PEG 사이에 있는 숙신이미도 공유결합(succinimido covalent link)이다. R는 알킬, 아마이드, 카바메이트 또는 페닐기(원재료의 기원(source)과 화학적 합성 방법에 의존함)이다. $[O-CH_2-CH_2]_n$ 은 PEG 폴리머의 백본(backbone)을 구성하는 옥시에틸렌 유닛으로, 여기서 n은 폴리머의 길이(예: MW=500)를 나타낸 것이고, $O-CH_3$ 는 말단 메톡시기(terminal methoxy group)이다.

[0102] 결정질 성분(Crystalloid Component)

[0103] 본 발명의 일 실시예에서, 인공혈액은 결정질로도 이루어질 수 있다. 상기 결정질 성분은 인공혈액 조성물의 형태에서 인공혈액을 "고장화(hypertonic)"할 수 있도록 800 mOsm/l 보다 높은 삼투압을 갖는 결정질이 라면 어느 것이라도 바람직하다. 인공혈액에서 적절한 결정질 및 농도로는 예를 들면, 3% NaCl, 7% NaCl, 7.5% NaCl 및 6% 텍스트란에 용해되어 있는 7.5% NaCl이 포함된다. 더욱 바람직하게는, 인공혈액은 800 내지 2400 mOsm/l의 삼투압을 갖는다. 재조합 방법에 의해 생산되고 300-800 mOsm/l의 삼투압을 가지며 콜로이드(텍스트로스보다 확산이 덜 되는 분자)가 추가로 함유되어 있는 헤모글로빈 용액의 용도가 종래에 보고된 바 있다. 미국특허 US 5,661,124를 참고로 하라. 한편, 상기 특허는 800 이상의 삼투압을 갖는 인공혈액의 생산은 교시하고 있지 않으며 헤모글로빈 농도가 6-12 g/dl라고 제시되어 있다. 반면, 본 발명의 조성물의 산소 운반 효율은 6 g/dl 이상 또는 4 g/dl 이상과 같이 사용되는 헤모글로빈의 농도가 보다 낮을 수 있도록 한다. 인공혈액이 결정질을 추가로 포함하며 고장성인 경우에 본 발명의 조성물은 콜로이드 성분을 포함하는 다른 종류의 인공혈액 조성물 보다 혈액학적 지표의 신속한 회복을 위한 향상된 기능성을 제공할 수 있다. 작은 부피의 고장성 결정질 주입(예를 들어, 1-10 ml/kg)은 제어된 출혈에서 허용되는 혈액학적 지표의 신속하고 지속적인 회복에 있어서 유의적인 이익을 제공한다(Przybelski, R. J., E.K. Daily and M. L. Birnbaum, "The pressor effect of hemoglobin--good or bad?" In Winslow, R. M., K.D. Vandegriff, and M. Intaglietta, eds. *Advances in Blood Substitutes. Industrial Opportunities and Medical Challenges*. Boston, Birkhauser (1997), 71-85). 한편, 고장성 결정질 용액 단독으로는 충분히 뇌의 산소 운반이 회복되지 않는다(D. Prough, *et al.*, "Effects of hypertonic saline versus Ringer's solution on cerebral oxygen transport during resuscitation from hemorrhagic shock," *J. Neurosurg.* 64:627-32 (1986)).

[0104] 제형

[0105] 본 발명의 인공혈액은 적절한 희석제와 함께 산소 운반체 및 다른 종류의 임의의 부형제와 혼합함으로써 제형화될 수 있다. 희석제 내의 산소 운반체의 농도는 그 사용에 따라 특히, 바람직한 실시예에서 예상되는 투여후(post-administration) 희석제에 따라 다양하지만, 향상된 산소 운반 및 치료 효과를 제공하는 본 발명의 조성물의 다른 특징으로 인하여 일반적으로 산소 운반체는 6 g/dl 이상이 필요하지 않으며 0.1 내지 4 g/dl이 가장 바람직하다.

[0106] 적절한 희석제(즉, 정맥 주사를 위해 약학적으로 허용될 수 있는 것)는 단백질, 당단백질, 다당류 및 다른 종류의 콜로이드 중에서 하나(*intra alia*)를 포함한다. 상기의 예시는 어느 특정한 희석제를 제한하고자 하는 의도가 아니다. 따라서, 상기 희석제는 알부민, 다른 종류의 콜로이드 또는 다른 종류의 비-산소 운반체

성분의 수용성 무세포 용액을 포함하며 상기 수용액은 2.5 cP 이상의 점도를 갖는다. 바람직한 실시예에서, 수용액의 점도는 2.5 내지 4 cP이다. 또한, 본 발명은 6 cP 이상의 점도를 갖는 용액도 포함한다.

[0107] 적용

[0108] A. 임상 적용

[0109] 본 발명과 실시예는 O₂ 수준 또는 증가된 O₂ 수준의 신속한 회복 또는 O₂ 수준의 복구가 임상적으로 나타나는 곳에 적용하는데 유용할 것이다. 미국특허 제 US 6,054,427호를 참고하라. 본 발명의 방법과 조성물에 사용될 수 있는 다수의 셋팅은 다음을 포함한다.

[0110] 외상(Trauma). 전체혈액(whole blood)의 급성 손실은 피부와 내장을 포함하는 낮은 우선순위의 기관으로부터 유출된 혈액이 전환되는 동안 혈액의 손실된 부피를 대체하기 위해 세포조직 사이 및 세포내 공간으로부터 체액 이동(fluid shift)을 일으킬 수 있다. 기관으로부터 유출된 혈액의 전환이 감소되고 때때로 상기 기관 내에서의 O₂ 수준이 제거되어 진행성 조직의 죽음이 유발된다. 상기와 같은 급성 혈액 손실을 겪고 있는 환자에서 조직이 유의적으로 회복되면 O₂ 수준의 신속한 회복이 관찰된다.

[0111] 빈혈(Ischemia). 빈혈에서, 특정 기관(또는 기관들)은 산소가 "결핍(starved)"되어 있다. 경색부(infarcts)라고 알려진 기관의 소구획은 O₂의 부족으로 죽기 시작한다. O₂ 수준의 신속한 회복은 중요한 조직에서 경색 형성을 방해하여 매우 중요하다. 빈혈의 결과 일어나는 상태는 심장마비, 발작 또는 뇌혈관 외상을 포함한다.

[0112] 혈액 희석(Hemodilution). 이러한 임상적 적용에서, 인공혈액은 수술전의 제거된 혈액을 대체하기 위해 요구된다. 환자의 혈액 제거는 수술 후 동종 수혈에 대한 요구를 방지하기 위해 수행되는 것으로 사료된다. 이러한 적용에서, 인공혈액은 제거된 자가혈액의 O₂ 수준을 대체(또는 대응)하기 위해 투여된다. 이는 수술 도중 및 수술 후 필수적인 수혈을 위해 제거된 자가혈액의 사용을 허용한다. 수술 전 혈액 제거가 요구되는 수술 중 하나는 심폐의 혈관 이식 수술이 될 수 있다.

[0113] 패혈증 쇼크(Septic Shock). 대부분의 패혈증에서, 어떤 환자들은 대량 수액 치료 및 혈관수축제 치료에도 불구하고 고혈압이 될 수 있다. 이러한 경우, 산화질소(NO)의 과생산은 혈압을 낮춘다. 그러므로, 헤모글로빈은 O₂와 대등하게 NO에 결합하기 때문에 이러한 환자의 치료를 위한 이상적인 약제에 가까운 것이다.

[0114] 암(Cancer). 종양 덩어리의 저산소성 내부 중심으로 O₂를 운반하는 것은 방사선치료 및 화학치료에 대한 종양의 감수성을 증가시킨다. 종양의 미세혈관은 다른 조직의 것과 다르기 때문에 O₂ 수준의 증가를 통한 감작은 저산소성 중심 내에서 제거된 O₂를 요구한다. 바꾸어 말하면, O₂ 수준을 증가시키면서 O₂의 초기 제거를 방지하고 방사선 치료 및 화학치료에 대한 종양의 최적 감작을 보증하기 위해 P50은 매우 낮아야 한다.

[0115] 만성 빈혈증(Chronic anemia). 이러한 환자들에서, 손실되거나 대사된 헤모글로빈을 대체하는 것은 위태롭거나 또는 완전히 결여되어 있다. 인공혈액은 상기 환자에게 감소된 O₂ 수준을 효과적으로 대체하거나 증가시킬 것으로 사료된다.

[0116] 겸상 적혈구 빈혈증(Sickle cell anemia). 겸상 적혈구 빈혈증에서 환자는 겸상 프로세스 동안 발생하는 O₂ 수준의 손실과 적혈구의 매우 높은 교체율에 의해 쇠약해진다. 상기 겸상 프로세스는 PO₂가 낮을수록 겸상율이 증가하는 곳에서 나타나는 PO₂의 작용이다. 이상적인 인공혈액은 겸상 단계 동안 정상 범위로 환자의 O₂ 수준을 회복시킬 것으로 사료된다.

[0117] 심장마비(Cardioplegia). 심장의 외과적 시술에 있어서, 특정 전해액과 환자의 체온 저하에 의해 심장은 정지한다. 체온의 저하는 일반적인 생리적 조건하에서 O₂의 배출을 방지할 수 있는 P50을 유의적으로 감소시킨다. O₂ 수준을 복구하는 것은 상기와 같은 시술 동안의 조직 손상 및 사망이 감소될 것으로 사료된다.

[0118] 저산소증(Hypoxia). 극단적인 조건하에 있는 군인들, 고지에 사는 사람들 및 세계적인 선수들은 폐에서 외기로부터 O₂의 추출이 제한되어 있기 때문에 O₂ 수준이 감소되는 것을 겪는다. 나아가 상기 감소된 O₂ 추출은 O₂ 운반을 제한한다. 인공혈액은 상기와 같은 개체에 있어서 O₂ 수준을 복구하거나 증가시킬 것으로 사료된다.

다.

[0119] 기관 관류(Organ Perfusion). 기관이 생체 외(ex-vivo)에서 유지되는 동안 O₂ 함유량의 유지는 구조적 및 세포적으로 완전한 상태를 보존하고 경색 형성을 최소화하기 위해 필수적이다. 인공혈액은 상기와 같은 기관을 위한 O₂ 요구량을 유지시킬 것으로 사료된다.

[0120] 세포 배양(Cell Culture). 상기 요건은 O₂ 소비율이 보다 높다는 것을 제외하고 기관 관류와 실질적으로 동일하다.

조혈(Hematopoiesis). 인공혈액은 조혈과정 동안 새로운 헤모글로빈을 합성하는데 사용되는 헴과 철의 기원으로서 제공될 수 있다.

[0121] B. 수의학적 적용

[0122] 또한, 본 발명은 인간이 아닌 동물에게도 사용될 수 있다. 본 발명의 방법과 조성물은 가축 및 반려 동물(예를 들어, 개, 고양이, 말, 새, 파충류)과 같은 사육동물과 실험수족관, 동물원, 해양수족관 및 동물을 기르는 기타 시설에 있는 동물에 사용될 수 있다. 본 발명은 상해, 용혈성 빈혈증 등으로 인한 혈액의 손실을 겪고 있는 사육동물 및 야생동물의 응급치료에서의 유용성이 있을 것으로 사료된다. 예를 들어, 본 발명의 일 실시예는 말 전염성 빈혈증(equine infectious anemia), 고양이 전염성 빈혈증(feline infectious anemia), 화학물질 및 다른 종류의 물리적 요소에 의한 용혈성 빈혈증(hemolytic anemia), 박테리아 감염, 인자 IV 분열(Factor IV fragmentation), 비장 비대증(hypersplenation)과 비종대(splenomegaly), 가금류에서의 출혈 증후군(hemorrhagic syndrome in poultry), 발육부진성 빈혈(hypoplastic anemia), 재생불량성 빈혈(aplastic anemia), 본태성 면역 용혈 상태(idiopathic immune hemolytic conditions), 철 결핍, 동종면역 용혈성 빈혈(isoimmune hemolytic anemia), 미세혈관성 용혈성 빈혈(microangiopathic hemolytic), 기생(parasitism) 등과 같은 상태에서 그 유용성이 관찰되었다. 특히, 본 발명은 발견하기 힘든 희귀 및/또는 외래종 동물에 대한 혈액 제공자로 유용하다.

실시예

[0123] 실시예 1

[0124] 무지질(Stroma-Free) 헤모글로빈의 생산

[0125] 단계-1-보관되어 있는 적혈구 세포의 획득

[0126] 보관되어 있는 농축 적혈구 세포는 샌디에고(San Diego) 혈액은행 또는 미국 레드 크로스(Red Cross)와 같은 상업적인 출처로부터 획득하였다. 바람직하게, 보관되어 있는 성분은 수집시간으로부터 45일 이상되지 않은 것을 받았다. 농축 적혈구(pRBCs)는 추가로 가공될때까지 4±2°C에서 보관하였다(1-7일). 모든 유닛들을 바이러스 감염에 대해 검색하였고 사용하기 전에 핵산 테스트를 수행하였다.

[0127] 단계-2-보관되어 있는 혈액의 풀링(pooling)

[0128] 농축 적혈구를 깨끗한 설비 내에서 멸균된 용기에 풀링(pooling) 하였다. 농축 적혈구 부피를 기록하고 헤모글로빈 농도를 상업적으로 사용되는 코-옥시미터(co-oxymeter) 또는 당분야에 알려진 다른 방법을 사용하여 결정하였다.

[0129] 단계-3-백혈구 감소(Leukodepletion)

[0130] 백혈구 감소(즉, 백혈구의 제거)는 멤브레인 여과를 사용하여 수행하였다. 이 단계의 효율을 모니터하기 위하여, 초기 및 최종 백혈구 카운트를 하였다.

[0131] 단계-4-세포 분리 및 세포 세척

[0132] 적혈구를 0.9% 염화나트륨 6 부피를 이용하여 세척하였다. 이 단계는 4±2°C에서 수행하였다. 혈장 성분이 제거되었음을 확인하기 위해 상기 세척된 세포를 알부민용 분광분석법으로 분석하였다.

[0133] 단계-5-적혈구 용해 및 세포 잔해의 제거

[0134] 세척된 적혈구를 물 6 부피를 사용하여 4±2°C에서 교반하면서 4시간 이상 또는 하룻밤 동안 용해하였

다. 용해물을 차가운 조건에서 가공하여 헤모글로빈을 정제하였다. 상기 가공은 용해물을 0.16 μ m 멤브레인을 통과시킴으로써 수행하였다. 정제된 헤모글로빈을 피로젠(pyrogen)이 제거된 멸균 용기에 수집하였다. 이 가공과정에서 모든 단계는 4 \pm 2 $^{\circ}$ C에서 수행하였다.

[0135] 단계-6-바이러스 제거

[0136] 바이러스 제거는 4 \pm 2 $^{\circ}$ C에서 한외여과(ultrafiltration)에 의해 수행하였다.

[0137] 단계-7-농축 및 용매 교환(solvent exchange)

[0138] 용해물과 한외여과로부터 정제된 헤모글로빈을 10 kD 멤브레인을 사용하여 링거 젯산(Ringer's lactate, RL) 또는 인산-완충 염수(PBS, pH 7.4)로 교환하였다. 그 다음 상기 헤모글로빈을 동일한 멤브레인을 사용하여 최종 농도 1.1-1.5 mM(사량체 내에서)이 되도록 농축하였다. RL 또는 PBS 10 내지 12 부피를 용매 교환에 사용하였다. 이 가공과정은 4 \pm 2 $^{\circ}$ C에서 수행하였다. RL로 제조된 용액의 pH는 7.0-7.6으로 조정하였다.

[0139] 단계-8-멸균 여과

[0140] 화학적 개질 반응(chemical modification reaction)을 수행하기 전에 PBS 또는 링거 젯산(RL)내의 헤모글로빈을 0.45 또는 0.2 μ m 일회용 필터 캡슐을 사용하여 멸균 여과하고, 4 \pm 2 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

[0141] 헤모글로빈을 정제하기 위한 다른 방법들은 당업계에 공지되어 있다. 또한, 세포 용해 후 자동-산화를 방지하기 위한 환원제(예를 들면, 글루타티온 또는 다른 종류의 티올 함유 환원제)의 사용은 일반적으로 필요하지 않다.

[0142] 실시예 2

[0143] 무지질 헤모글로빈의 개질

[0144] 단계-1-티올화(Thiolation)

[0145] 티올화는 헤모글로빈의 10 배가 넘는 몰농도의 이미노티올렌(iminothiolane)을 사용하여 연속적으로 교반하면서 4 \pm 2 $^{\circ}$ C에서 4시간 동안 수행하였다.

[0146] 반응 조건:

[0147] · RL(pH 7.0-7.5) 또는 PBS(pH 7.4)에 함유된 헤모글로빈(사량체) 1 mM

[0148] · RL(pH 7.0-7.5) 또는 PBS(pH 7.4)에 함유된 이미노티올렌 10 mM

[0149] 1:10의 SFH:이미노티올렌의 비율과 반응 시간은 PEG화(PEGylated)된 티올 기의 수를 최대화하고 산물의 이질성을 최소화하도록 최적화되었다.

[0150] 단계-2-티올화된 헤모글로빈의 PEG화

[0151] Mal-PEG(알킬 링커를 가진)를 사량체 헤모글로빈 초기농도의 20배가 넘는 몰농도로 사용하여 티올화된 헤모글로빈을 PEG화하였다. 첫째로 상기 헤모글로빈을 산화하기 위해 상기 헤모글로빈을 대기로 평형시켰다. 반응은 연속적으로 교반하면서 4 \pm 2 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 수행하였다.

[0152] 반응 조건:

[0153] · RL 또는 PBS(pH 7.4)에 함유된 티올화된 헤모글로빈 1 mM

[0154] · RL 또는 PBS(pH 7.4)에 함유된 Mal-PEG 20 mM

[0155] 단계-3-반응하지 않은 시약의 제거

[0156] 과잉의 반응하지 않은 시약 또는 헤모글로빈을 제거하기 위해 70 kD 멤브레인을 이용하여 PEG화된 Hb를 가공하였다. 반응하지 않은 시약의 제거를 확인하기 위하여 20 부피의 여과를 수행하였고, 540nm 및 280nm에서 크기-배제 크로마토그래피(size-exclusion chromatography)에 의해 모니터하였다. 상기 단백질 농도는 4 g/dl로 희석하였다. pH는 1N NaOH를 사용하여 7.3±0.3으로 조정하였다.

[0157] 단계-3-멸균 여과

[0158] 최종 MalPEG-Hb 산물을 0.2 μm 멸균 일회용 캡슐을 사용하여 멸균 여과하고 피로젠이 제거된 멸균 용기에 4±2℃에서 수집하였다.

[0159] 단계-4-MalPEG-Hb의 제형화

[0160] PEG화된 Hb를 4 g/dl RL로 희석하고 pH를 7.4±0.2로 조정하였다.

[0161] 단계-5-멸균 충전

[0162] 상기 최종 인공혈액 조성물을 멸균-여과하고(0.2 μm) 멸균된 유리 바이알에 중량에 의해 분별하였다. 이후, 무균 조제대에서 밀봉제(crimped seals)와 함께 멸균된 고무 마개로 밀폐하고, 사용할 때까지 -80℃에서 보관하였다.

[0163] 실시예 3

[0164] MalPEG-Hb의 생리화학적 분석

[0165] 생리화학적 분석을 위한 방법

[0166] MalPEG-Hb 인공혈액의 균질성과 분자 크기는 액체 크로마토그래피(LC)에 의해 분석하였다. LC 분석은 PEG화된 헤모글로빈의 균질성과 반응하지 않은 Mal-PEG의 제거 정도를 측정하기 위해 사용하였다. 540nm에서의 흡광도는 피크 위치에 의해 헤모글로빈을 측정하고 반응하지 않은 헤모글로빈으로부터 PEG화된 헤모글로빈을 분석하기 위해 사용하였다. 280nm에서의 흡광도는 유리 Mal-PEG로부터 PEG화된 헤모글로빈을 분석하기 위해 사용되었고, MalPEG에 있는 고리 구조로 인해 자외선(UV) 스펙트럼에서 이를 흡수한다.

[0167] 다성분 분석법에 의해 헤모글로빈 농도와 메트헤모글로빈(methemoglobin) 백분율을 분석하기 위하여 광학 스펙트럼을 소렛(Soret)과 가시 영역에서의 신속 스캐닝 다이오드 어레이 분광광도계(Milton Roy 2000 또는 Hewlett Packard Model 8453)를 이용하여 수집하였다(Vandegriff, K.D., and R.E., Shrager. Evaluation of oxygen equilibrium binding to hemoglobin by rapid-scanning spectrophotometry and singular value decomposition. Meth. Enzymol. 232:460-485(1994)).

[0168] MalPEG-Hb 농도와 메트헤모글로빈의 백분율은 코-옥시미터(co-oxymeter)를 사용하여 결정하였다. 점도는 레오미터(Rheometer)를 사용하여 측정하였다. 교질 삼투압은 교질 삼투압 측정기(colloid osmometer)를 사용하여 측정하였다. 산소 결합 지표는 산소 평형 곡선으로부터 결정하였다.

[0169] 인공혈액 조성물의 바람직한 세부 사항은 하기 표 1에 나타내었다.

[0170] 표 1

테스트	세부 사항
헤모글로빈 농도(g/dl)	4.2±0.2
메트헤모글로빈(%)	<10

pH	7.4±0.4
전도율(mS/cm)	12±4
내독소(EU/mL)	<0.5
FPLC 머무름 시간(분)	43±3
절반 높이에서 FPLC 피크 넓이(분)	6±2
점도(cPs)	2.5±1.0
COP(mmHg)	50±20
P50(torr)	6±2
힐 넘버(Hill number, P50에서)	1.2±0.5
무균상태	통과

[0172] MalPEG-Hb에서 PEG화된 사이트의 수

[0173] 표면 개질을 위하여, 일반식 I에서 "m"의 수는 헤모글로빈의 표면에 부착된 PEG 폴리머의 수로 정의된다.

[0174] $Hb-(S-Y-R-CH_2-CH_2-[O-CH_2-CH_2]_n-O-CH_3)_m$ 일반식 I

[0175] 상기 수를 결정하기 위하여, 디티오피리딘 비색 분석법(dithiopyridine colorimetric assay)(Ampulski, R., V. Ayers, and S. Morell. Determination of the reactive sulfhydryl groups in heme proteins with 4,4'-dipyridinesdisulde. *Biochem. Biophys. Acta* 163-169, 1969)을 사용하여 티올화 전후 및 Hb PEG화 후에 Hb 사량체(tetramer)의 표면에 이용할 수 있는 티올기의 수를 측정하였다. 인간 헤모글로빈은 β93Cys 잔기에 2개의 고유한 반응성 티올기를 포함한다. 이는 디티오피리딘 반응에 의해 확인된다. 1:10의 SFH:이미노티올렌(iminethiolane) 비율에서 SFH의 티올화 후, 반응성 티올기의 수는 디티오피리딘 반응을 기초로 하여 2 내지 6 티올로 증가하였다. PEG화 반응 후 반응성 티올기의 수는 1.3으로 감소하였다. 이는 MalPEG-Hb에 4-5 PEG화된 사이트가 있다는 것을 나타낸다.

[0176] MalPEG-Hb vs. SFH의 크기-배제 크로마토그래피 분석

[0177] FPLC는 최종 MalPEG-Hb 산물의 분석을 위해 수행하였다. 개질되지 않은 SFH와 비교한 MalPEG-Hb의 크로마토그램을 도 1에 나타내었다. SFH의 머무름 시간은 약 57분이었다. MalPEG-Hb의 머무름 시간은 약 44분이었다.

[0178] MalPEG-Hb의 생리적 및 화학적 특성

[0179] MalPEG-Hb의 생리적 특성을 혈액 및 개질되지 않은 인간 헤모글로빈(SFH)와 비교하여 하기의 표 2에 나타내었다.

[0180] 표 2

	혈액	SFH	MalPEG-Hb
P50 (torr)	28	15	5
N50 (힐 넘버)	2.9	2.9	1.2
보여 효과 ($\Delta \text{Log P50} / \Delta \text{pH}$)	--	-0.46	-0.20
점도(cPs) ¹	4.0	0.9	2.5
COP(mm Hg) ¹	27	16	50
MW (kD) ²	N/A	65	90
분자 반경(nm)	4000	3.2 ²	9

[0182] ¹ 전체혈액(whole blood)은 15 g/dl, 헤모글로빈 용액은 약 4 g/dl에서 측정함.

[0183] ² COP 측정과 FPLC에 의해 결정함.

[0184] 산소 친화도

[0185] 헤모글로빈-산소 평형 결합 곡선은 종래에 기술된 방법에 의해 측정하였다(Vandergriff, K.D., R.K.Rohlf, M.D.Magde, and R.M. Winslow. Hemoglobinoxygen equilibrium curves measured during enzymatic oxygen consumption. *Anal. Biochem.* 256:107-116, 1998). MalPEG-Hb는 높은 산소 친화도(P50=5 mmHg)와 낮은 협동성(cooperativity)(n50=1.0-1.4)을 나타냈다. 도 2는 무지질 헤모글로빈(SFH)과 MalPEG-Hb 용액을 비교한 곡선을 나타낸 것이다.

[0186] 점도

[0187] 상기 MalPEG-Hb의 용액 특성은 폴리에틸렌 글리콜 체인과 용매 물 분자 사이의 강한 상호작용에 기인한 것이다. 이는 2가지 이유에서 인공혈액의 중요한 특성으로 생각되고 있다: 1) 높은 점도는 PEG-Hb 분자와 용매를 통해서 확산되는 기체 리간드 분자의 확산 상수를 감소시키고, 2) 높은 점도는 내피 벽에 대한 용액 흐름의 전단 스트레스를 증가시키고 혈관수축(vasoconstriction)을 방해하는 혈관확장제(vasodilators)의 방출을 유도한다. 표 2에 나타낸 바와 같이, MalPEG-Hb 용액의 점도는 2.5 cPs이다.

[0188] 교질 삼투압(COP)

[0189] 개질되지 않은, 분자내 및 분자간 교차 결합된, 또는 PEG-표면-결합 헤모글로빈을 포함하는 헤모글로빈 용액의 COP는 이들의 고분자 용액 특성을 결정하기 위해 측정하였다(Vandegriff, K.D., R.J.Rohlf, and R.M.Wislow. Colloid osmotic effects of hemoglobin-based oxygen carriers. In Winslow, R.M., K.D.Vandegriff and M.Intaglia, eds, *Advances in Blood Substitutes Industrial Opportunities and Medical Challenges*. Boston, Birkhauser, pp.207-232 (1997)). 사랑채 헤모글로빈은 이상적인 용액 상태를 나타낸 반면, PEG 결합된 헤모글로빈은 유의적으로 더 높은 교질 삼투활성을 가지며 비-이상적인 용액으로 나타났다(Vandegriff, K.D., M.Mcarthy, R.J.Rohlf and R.M.Winslow. Colloid osmotic properties of modified hemoglobins: chemically cross-linked versus polyethylene glycol surface-conjugated. *Biophys. Chem.* 69:23-30 (1997)). 표 2에 나타낸 바와 같이, MalPEG-Hb 용액의 COP는 50이다.

[0190] 안정성

[0191] PEG-표면-결합된 헤모글로빈을 포함하는 헤모글로빈 용액의 안정성은 자동산화율을 측정함으로써 결정하였다. 도 5에 나타낸 바와 같이 실온에서 MalPEG-Hb의 자동산화는 10시간 동안 약 5% MetHb에서 5.5% MetHb로 증가하였다. MalPEG-Hb의 자동산화율은 시간당 0.05%였다.

[0192] 실시예 4

[0193] 다른 P50을 가진 개질된 헤모글로빈의 비교

[0194] 폴리옥시에틸렌(POE)에 접합됨으로써 개질된 헤모글로빈을 이용한 무세포 헤모글로빈의 유효성에 있어서 산소 친화도의 역할은 특히 인공혈액과 같은 물질의 유효성 연구와 관련이 있다. 이와시타와 그의 동료들에 의해 처음으로 설명된 상기 개질은(Ajisaka, K. and Y.Iwashita, "Modification of human hemoglobin with polyethylene glycol: A new candidate for blood substitute, *BBRC* 97:1076-1081 (1980))(Iwasaki, K., K.Ajisaka, and Y.Iwashita, "Modification of human hemoglobin with polyoxyethylene glycol: A new candidate for blood substitutes", *Biochem Biophys Res Comm* 97:1076-1981 (1980)), 고혈압 효과를 유지하며 패혈증 쇼크의 치료에 매우 유용함이 발견되었다. 상기 산물의 제조를 위한 일부분으로서, P50을 인간 혈액과 근접하도록 P50을 상승시키기 위해 헤모글로빈을 피리독살-5-인산(PLP)과 반응시켰다. 따라서, PLP로 전-개질(prior-modification)된 것과 PLP로 전-개질되지 않은 두 종류의 POE-개질된 헤모글로빈 용액을 제조할 수 있다. 상기 용액은 P50을 제외하고 모든 면에서 동일하였다. 심한 출혈(혈액 부피의 60%)을 하는 랫트의 생

리적 기능을 유지하는 상기 용액의 능력을 시험하였다.

[0195] 재료 및 방법:

[0196] 인공혈액

[0197] "PHP"를 형성하기 위해 PLP 개질된 또는 개질되지 않은 개질된 헤모글로빈 용액을 상기 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조하였다.

[0198] 동물

[0199] 본 연구를 위해 웅성 스프라그-다우레이 랫트(Sprague-Dawley rats)를 사용하였다. 수축기 혈압과 확장기 혈압, 최대 및 최소 혈압을 연구하는 동안 각각 모니터하였고 동맥압의 평균(MAP)은 확장기 압력 +1/3(수축기 압력-확장기 압력)이었다. dP/dt 는 각 압력 사이클에 대한 최대 양성 기울기(slope)로부터 계산하였다. 심박동수, 수축기압, 확장기압, 평균 동맥압, 맥압 및 dP/dt 는 매 분(minute)의 결과의 평균이다.

[0200] 혈액 가스, 혈액학적 및 젖산 측정

[0201] 동맥 pH, PCO_2 및 PO_2 를 헤파린이 처리된(heparinized) 혈액 시료 100 μ l를 사용하여 혈액 가스 분석기에서 측정하였다. 젖산은 젖산 분석기를 사용하여 동맥혈에서 측정하였다. 총 CO_2 , 표준 중탄산염(HCO_3^-) 및 과잉염기(base excess, BE)은 이전에 기술된 알고리즘을 사용하여 PCO_2 , pH 및 헤모글로빈 농도로부터 계산하였다(Winslow, R., "A model for red cell O_2 uptake,". *Int J Clin Monit Comput* 2:81-93 (1985)). 총 헤모글로빈 및 혈장 헤모글로빈은 상업적으로 이용가능한 기기를 사용하여 각각 측정하였다. 헤마토크리트(Hematocrit)는 미세원심분리에 의해 약 50 μ l의 동맥혈 시료를 사용하여 측정하였다.

[0202] 교환 수혈

[0203] 교환 수혈은 추정되는 혈액 부피의 50%와 동일한 용액의 총부피로 약 0.5 ml/min의 속도로 수행하였다. 혈액 부피는 65 ml/kg으로 가정하였다. 연동 펌프는 시험 물질이 주입되는 것과 정확히 동일한 속도로 혈액이 제거되도록 작동시켰다. 시험 용액은 주입 전에 37°C의 수욕에서 보온하였고 주입하는 동안에 따뜻하게 유지하였다.

[0204] 출혈

[0205] 출혈 프로토콜은 한논과 웨이트 모델을 기초로 하여 사용하였다(Hannon, J.C. Wade, C.Bossone, M.Hunt, R.Coppes, and J.Loveday, "Blood gas and acid-base status of conscious pigs subjected to fixed-volume hemorrhage and resuscitated with hypertonic saline dextran," *Circ Shock* 32:19-29 (1990)). 출혈은 60분까지 혈액 부피의 60%를 제거하기 위해 0.5 ml/min의 속도로 대퇴부 동맥으로부터 동맥혈을 펌프로 배출하는 것에 의해서 교환 수혈이 완료된 후 약 3분에 시작하였다. 혈액 시료(0.3 ml)를 혈액학적 및 혈액 가스 분석을 위해 10분 간격으로 채취하였다.

[0206] 통계 및 생존 분석

[0207] 생존 분석을 위하여, 출혈이 시작된 후 최소 120분간 동물들을 관찰하였다. 결과를 10분 간격으로 그룹화하였고 각 간격마다 누적 생존 비율과 이의 표준 오차를 계산하였다.

[0208] 결과:

[0209] 용액 특성

[0210] 사용된 용액은 하기의 표 3에 기재되어 있다. 총 헤모글로빈 농도, 점도 및 교질 삼투압(COP)은 잘 일치하는 것으로 나타났다. PHP의 P50(19.7 Torr)은 POE의 P50(12.2 Torr)보다 높았다. 협동성 정도(혈의 지표, n)는 두 종류의 용액이 동일하게 나타났다.

[0211] 두 종류의 용액의 FPLC 패턴은 도 3에 나타난 바와 같다. 개질되지 않은 헤모글로빈에 대응하는 작은

피크가 나타나는 동안에 대부분의 헤모글로빈이 개질되지 않은 헤모글로빈(SFH)보다 유의적으로 더 먼저 용출된 이질적인 피크 세트에서 나타났다. 두 종류의 PEG-개질된 헤모글로빈의 패턴은 정성적으로 유사하였다.

[0212]

표 3

[0213]

시험 용액의 특성

[0214]

	PHP	POE
Hb, g/dl	8.0	8.3
점도 (cP)	2.8	2.8
COP, mm Hg	62.7	56.5
* a ₁ (×10 ⁻¹)	1.368	2.228
* a ₂ (×10 ⁻³)	9.680	21.070
* a ₃ (×10 ⁻⁵)	0.752	46.500
* a ₄ (×10 ⁻⁵)	1.537	8.766
P50	19.7	12.2
n50	1.48	1.49

[0215]

* 37°C, pH 7.4에서 측정된 산소 친화도.

[0216]

POE의 산소 친화도는 PHP 보다 유의적으로 높게 나타났다(도 4). 한편, 두 종류 모두 유의적인 협동성 (cooperativity)은 나타내지 않았다.

[0217]

동물 실험

[0218]

모든 실험은 표 4에 요약되어 있다. 다수의 동물이 POE(11)보다 PHP(18)를 수혈 받았고 PHP 동물의 평균 체중은 POE 그룹에 비해 유의적으로 큰 것으로 나타났다(P<0.001). 한편, 상기 체중의 차이는 총 혈액 부피가 65 ml/kg이라고 가정하여 출혈 정도를 계산하는데 고려되었다. 따라서, 교환 수혈과 출혈의 결과로 인한 부피는 차이가 있다. 그럼에도 불구하고, 사망 평균 시간은 POE 동물(116분)에 비해 PHP 동물(93분)이 유의적으로 짧게 나타났다. 이러한 차이는 통계학적으로 유의적이었다(P<0.02). 출혈 시작 후 120분간의 관찰 기간 동안 동물이 생존한다면, 동물들은 카프란-메이어 생존 분석(Kaplan-Meier survival analysis)의 목적을 위해 "검열(censored)"이 고려되었다(도 5).

[0219]

표 4

[0220]

		WT(g)	*혈액부피(ml)	출혈부피(ml)	출혈부피(%)	사망시간(분)
PHP	n	18	18	18	18	18
	PHP	291	18.89	11.10	58.79	93
	sd	24	1.59	0.90	0.35	29
POE	n	11	11	11	11	11
	POE	334	21.74	12.78	58.77	116
	sd	41	2.65	1.60	0.39	12
	P	0.001	0.001	0.001	0.915	0.020

[0221]

* 총 혈액 부피 65 ml/kg를 기초로 함.

[0222]

혈액학 및 산-염기 조절

[0223]

ET 후(post-ET) 및 출혈 후(post-hemorrhage)(60분) 기준선 측정은 표 5에 나타낸 바와 같다. 헤마토크리트(hematocrit)의 평균값은 PHP 동물에 비해 POE에서 약간 높게 나타났다. 그러나, 교환 수혈 후에 상기 값은 두 그룹이 동일한 것으로 나타났다. 출혈 기간이 종료될때, POE 동물의 헤마토크리트 평균값은 PHP 동물

에 비해 다시 약간 높아졌다. POE 동물이 모든 샘플링 포인트에서 약간 높게 나타났고 총 헤모글로빈 값에서 유사하게 작은 차이가 발견되었다. 혈장 헤모글로빈은 두 그룹에서 차이가 없었으나 교환 기간 후 POE 동물에서 유의적으로 높게 나타났다.

[0224] 동맥의 젖산 농도는 본 연구의 모든 단계에서 PHP 동물에 비해 POE가 유의적으로 높게 나타났다. 과잉 염기(base excess) 값은 POE 그룹에 비해 PHP가 낮게 나타났으나 두 그룹 사이에 유의적인 차이는 없었다. 나아가, PHP 동물의 기준선 값(10.24 mEq/l)간의 차이는 POE 동물(7.01 mEq/l)에 비해 높은 것으로 나타났다.

[0225] 표 5

		n	PHP	sem	n	POE	sem	P
HCT	기준선	17	39.80	0.57	10	43.15	0.23	0.0032
	ET 후	17	17.89	0.43	10	19.25	0.62	0.3568
	60분	15	13.29	0.47	10	15.85	0.14	0.0015
HB	기준선	17	13.59	0.22	10	15.08	0.17	0.0057
	ET 후	17	8.70	0.18	10	9.74	0.07	0.0007
	60분	15	6.34	0.21	10	7.38	0.06	0.0016
PLHB	기준선	16	0.00	0.00	10	0.00	0.00	
	ET 후	16	2.86	0.07	10	2.99	0.09	0.6785
	60분	15	1.93	0.07	10	2.47	0.02	0.0001
LACT	기준선	9	0.70	0.06	7	2.68	0.16	0.0001
	ET 후	9	1.59	0.10	7	4.21	0.24	0.0004
	60분	9	10.62	0.89	7	17.27	1.18	0.0360
BE	기준선	17	6.22	1.28	9	5.41	0.08	0.6530
	ET 후	17	6.20	1.41	5	5.60	0.13	0.8101
	60분	15	-4.02	1.60	6	-1.60	0.53	0.4678

[0227] 교환 수혈 동안 동맥압의 평균

[0228] 교환 수혈 동안의 동맥압 평균은 도 6에 나타내었다. 평균 동맥압의 기준선은 두 그룹이 차이가 없었다. 그러나, PEG-헤모글로빈의 주입에 반응하는 혈압은 두 그룹 사이에 유의적인 차이가 있었다. MAP의 초기 상승은 POE 동물에 비해 PHP가 더 크게 나타났고, 주입 기간 동안 유지되었다. 반대로, POE 동물에서 MAP는 주입의 종료됨에 따라 기준선으로 복귀되었다.

[0229] 출혈이 시작되었을때, MAP의 하강은 PHP 동물에서 즉시 일어났고 POE 그룹에서는 지연되었다. 나아가, PHP 동물에서 MAP는 기준선 값으로 복귀되지 않았으나 POP 동물에서 MAP는 전체 출혈 및 그 다음에도 기준선 값 또는 유사한 값으로 유지되었다. 특히, PHP 동물에서, 증가된 표준 오차로 나타내어지는 데이터의 산포도는 PHP 그룹에서 나오된 동물과 같이 시간에 따라 증가하였다.

[0230] 토의 :

[0231] 본 연구에서, 본 발명자들은 심각한 출혈(혈액 부피의 60%)로부터 랫트를 보호하는 능력에 대하여 두 개의 근접하게 대등되는 개질된 헤모글로빈 용액(인공혈액)을 조사하였다. 상기 능력을 시험하기 위하여, 먼저 동물에게 상기 두 종류의 시험 용액 중 하나로 50%(혈액 부피의) 교환 수혈을 받도록 하였다. 상기 용액들은 그들의 산소 친화도에서만 차이가 있으며 FPLC 패턴, 삼투압, 점도 및 농도는 매우 유사하였다. 생리적 과정의 특이적인 변수의 영향을 보기 위해 시도된 다른 연구에서 대등한 용액을 비교한 적은 없었다(Sakai,H., Hara,H., Tsai,A.G., Tsuchida,E., Johson,P.C., and Intaglietta,M., "Change in resistance vessels during hemorrhagic shock and resuscitation in conscious hamster model", *Am J Physiol* 276(45), H563-H571. (1999), Sakai,H., H.Hara, M.Yuasa, A.Tsai, S.Takeoka, E.Tsuchida, and M.Intaglietta, "Molecular dimensions of Hb-based O₂ carriers determine constriction of resistance arteries and hypertension", *Am J Physiol* 279:H908-H915, (2000)). 상기 실험 결과는 근접하게 대등한 용액을 유의적으로 차이가 있는 P50이라는 하나의 변수만으로 비교할 수 있음을 나타내는 첫번째 예시이다.

[0232] POE를 수혈받은 그룹의 동물들은 헤마토크리트, 총 헤모글로빈 및 혈장 헤모글로빈 수준이 다소 유의적으로 높게 나타났다. 그러나, 이러한 차이가 실험의 결과 또는 해석을 설명할 수 없다. 명확하게는, 도 4에

나타낸 바와 같이 두 종류의 용액이 다른 방식으로 혈압에 영향을 준다. 주입 시점에서, 혈압의 영향은 수혈받은 동물이 아니라 주입되는 용액 특성으로 인한 것이다. 혈압 반응은 POE 동물에 비해 PHP가 더 높았다.

[0233] 동물의 생존은 이전에 몇몇 연구자들이 제시한 바와 같이 헤모글로빈 용액의 혈압 상승과 명확하게 관련이 없다. 이는 혈압의 영향은 적거나 일시적인 PHP 동물에 비해 POE 동물이 더 잘 생존(및 더 작은 기본 결손의 제시)하기 때문이다. Przybelski, R.J., E.K.Daily, and M.L.Birnbaum, "The pressor effect of hemoglobin--good or bad?" In Winslow, R.M., K.D.Vandegriff, and M.Intaglietta, eds. *Advances in Blood Substitutes. Industrial Opportunities and Medical Challenges*. Boston, Birkhauser (1997), 71-85를 참고로 하라.

[0234] 상기 결과들은 P50이 낮을수록 산소 운반체로서 무세포 헤모글로빈의 사용이 유리하다는 가설을 지지해 준다. 상기 가설은 두가지 개념에 기초로 한다. 첫째, 무세포 헤모글로빈의 확산 기울기(gradient)는 산소 기원(source), 적혈구 및 혈관 사이의 산화헤모글로빈 기울기의 관계이다. 상기 기울기는 산소 평형 곡선의 형태와 위치에 좌우된다(McCarthy, M.R., K.D.Vandegriff, and R.M. Winslow, "The role of facilitated diffusion in oxygen transport by cell-free hemoglobin: Implications for the design of hemoglobin-based oxygen carriers," *Biophysical Chemistry* 92:103-117 (2001)). 둘째로, 산소 친화도(낮은 P50)가 높으면 빈혈 또는 저산소 조직과 같이 PO₂가 매우 낮은 곳에서 혈액 순환 영역에 운반체 헤모글로빈 분자가 도착할때까지 혈액 순환으로부터 O₂를 효과적으로 "잠복시킨다(hides)"는 생각이 본 발명자들의 가설의 두번째 개념의 기초를 유도한다.

[0235] 실시예 5

[0236] MalPEG-Hb의 안정성

[0237] 본 연구의 목적은 제 1상 임상 시험(Phase I clinical trials)용 시료의 보관 및 조작 조건의 모의 실험 동안에 MalPEG-Hb의 안정성을 결정하기 위한 것이다. 실험의 3 단계 동안의 안정성을 평가하였다. 단계 (stage) I 은 생산 설비에 냉동 보관으로부터 임상하는 장소로 이동하는 동안의 온도 조건으로 옮기는 것을 나타낸 것이다(냉동 보관 연구). 단계 II는 MalPEG-Hb를 24시간 동안 +4°C로 녹인 다음 5일 동안 +4°C에서 보관하는 것을 나타낸 것이다(냉장 연구). 단계 III는 MalPEG-Hb를 24시간 동안 +4°C로 녹인 다음 환자에게 투여하기 전 MalPEG-Hb를 실온에서 몇 일간 보관하는 것을 나타낸 것이다(실온 연구).

[0238] 실험 방법

[0239] 안정성은 MalPEG-Hb 시험 물질의 산화율로부터 정의된다. 시료내의 메트헤모글로빈(methemoglobin)의 백분율은 코-옥시미터(IL Co-oximetry 682)를 사용하여 측정하였다. 실험과정에 따라 각 시점에서 2번 반복(duplicate)하여 측정하였다.

[0240] 온도는 온도계 또는 온도 차트 기록기를 사용하여 모니터하였다. 냉동 보관 연구는 -21.0±3.0°C의 온도 범위에서 수행하였다. 냉장 연구는 +4.0±0.2°C의 온도 범위에서 수행하였다. 실온 온도 연구는 +21.0±1.0°C의 온도 범위에서 수행하였다.

[0241] 온도, 총 헤모글로빈 및 메트헤모글로빈의 백분율은 각 시점마다 기록하였다. 냉동 및 냉장 연구에서, 0 시간(완전히 녹음), 1시간 후 및 5일간 24시간 마다 측정하였다. 실온 연구에서, 0 시간(완전히 녹음) 및 10시간 동안 매 1시간 마다 측정하였다.

[0242] 결과

[0243] 도 8에 나타낸 바와 같이, MalPEG-Hb를 -20°C에서 6일간 보관하는 동안 메트헤모글로빈의 백분율은 변화가 없었다. 도 9에 나타낸 바와 같이, 유사하게 MalPEG-Hb를 +4°C에서 5일간 보관하는 동안 메트헤모글로빈의 백분율도 변화가 없었다. 도 10에 나타낸 바와 같이, 실온에서 보관하는 동안 MalPEG-Hb는 10시간 동안 메트헤모글로빈이 1% 이하로 증가하는 것으로 나타났다.

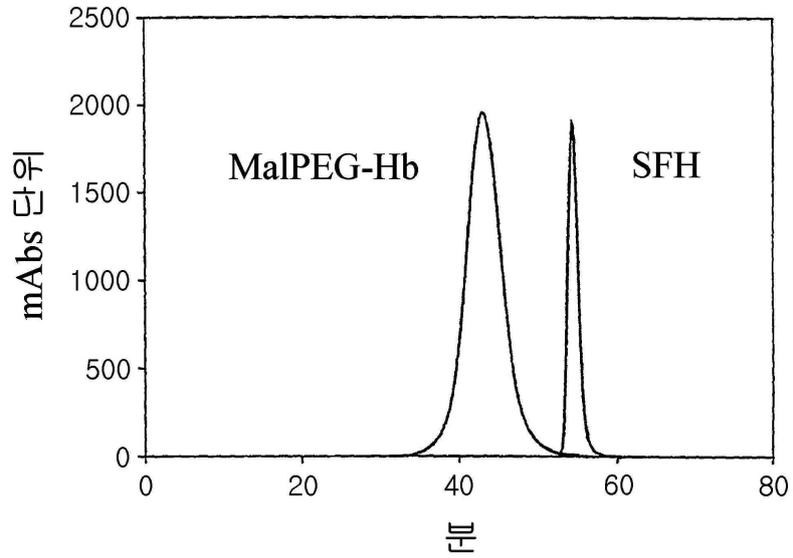
[0244] 상술한 상기 실시예는 바람직한 실시예의 조성물의 제조법 및 용도의 설명과 서술을 당업자에게 제공하는 것이며 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명을 수행하기 위한 상기 기술된 방법의 변형은 당업자에게 명백한 하기의 청구항의 범위 내에서 이루어질 수 있다. 간행물, 특허 또는 특허 출원이 명확하고 개별적으로 참고하기 위해 본 명세서에 포함되도록 나타낸 바와 같이 본 명세서에 인용된 모든 간행물,

특허 및 특허 출원은 본 명세서에 참고문헌으로서 포함된다.

도면

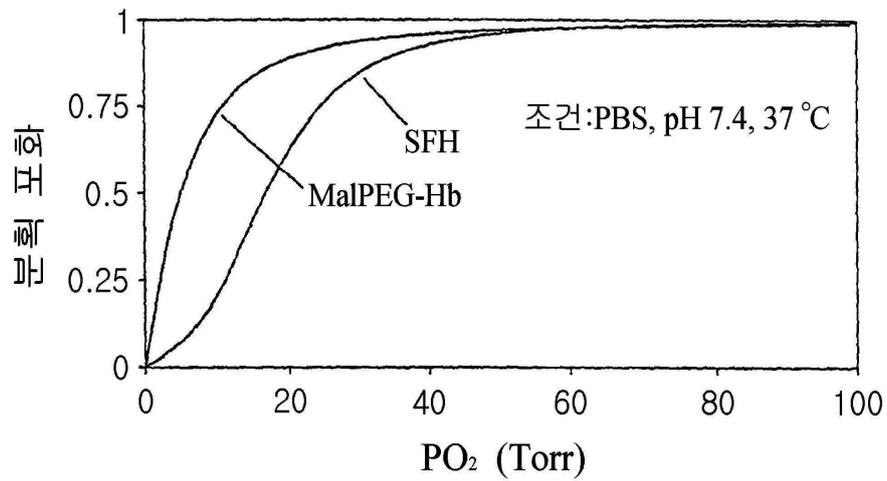
도면1

MalPEG-Hb와 SFH의 FPLC 크로마토그램

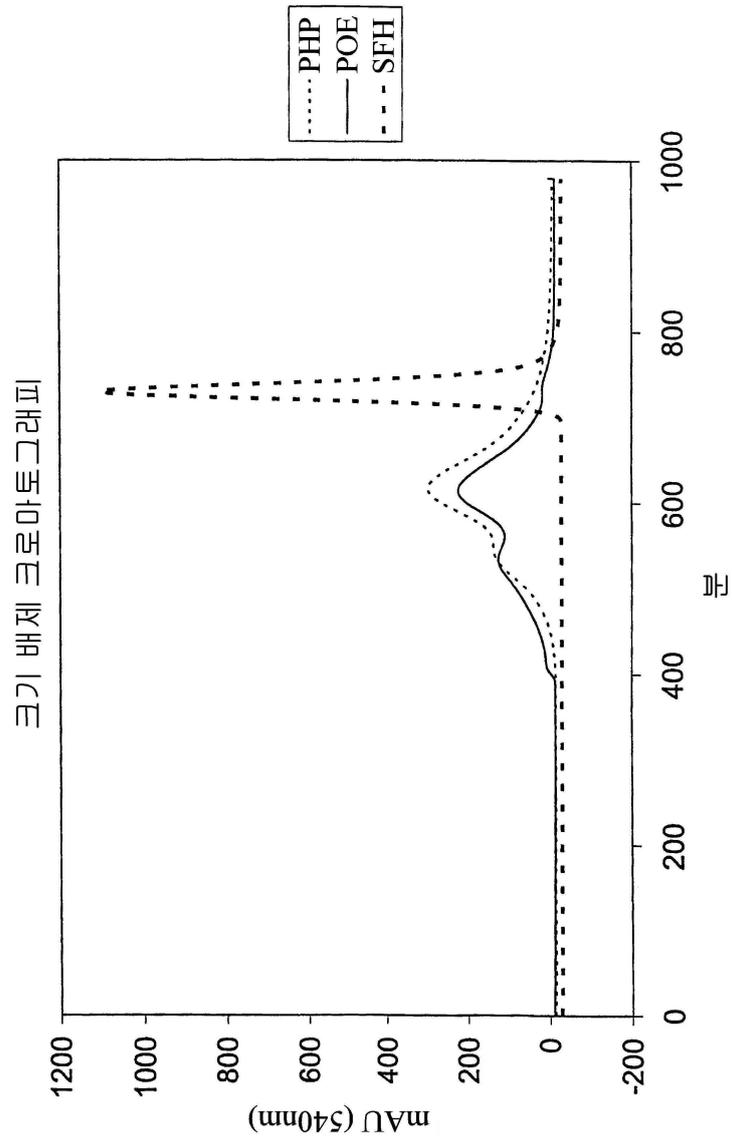


도면2

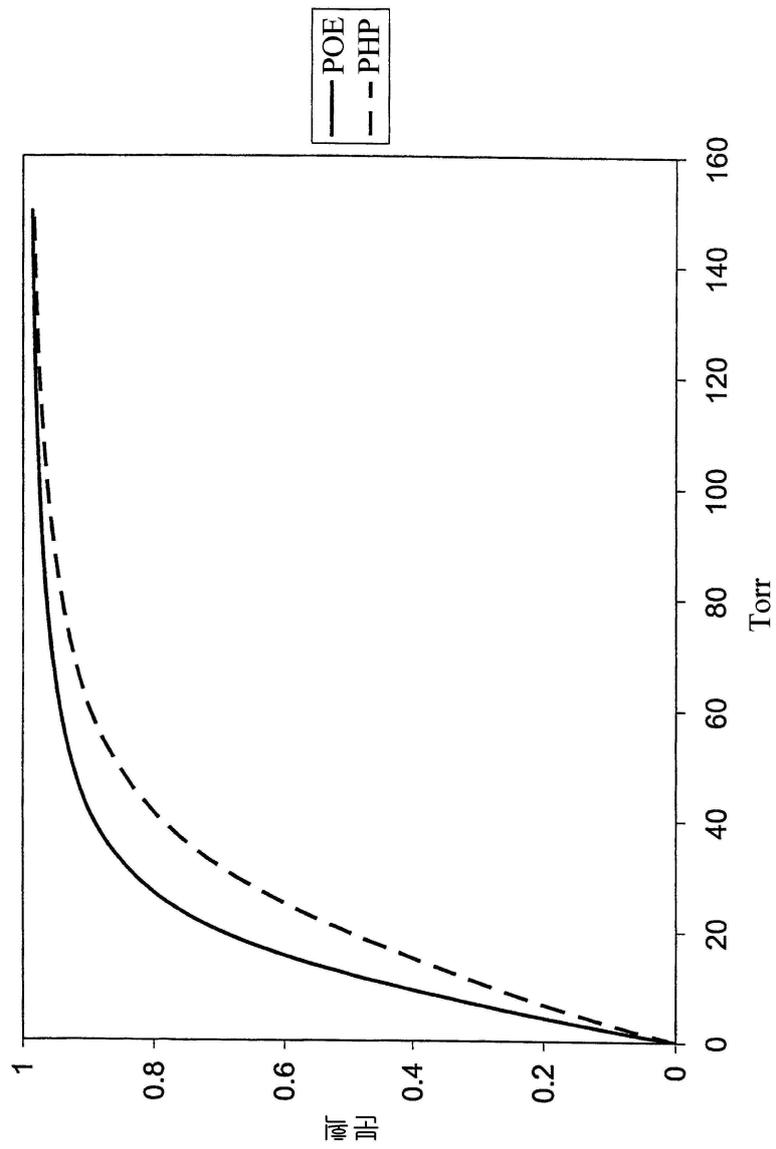
SFH와 MalPEG-Hb의 산소 평형 곡선



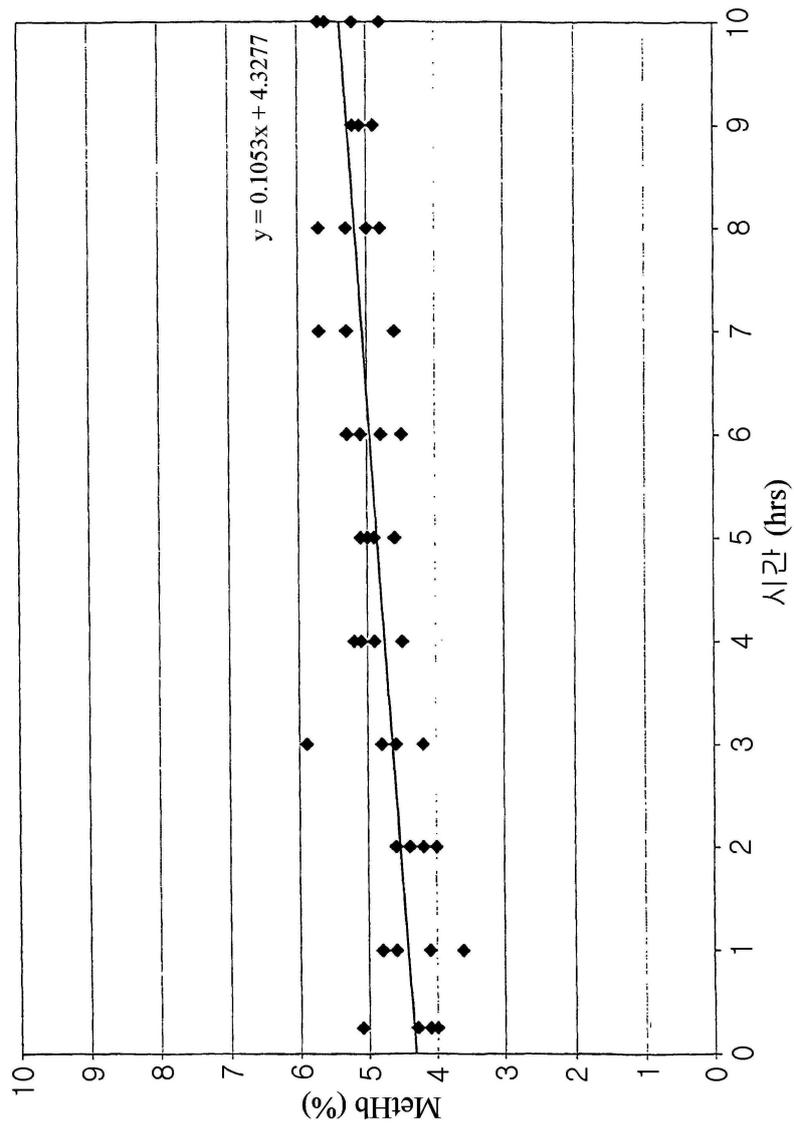
도면3



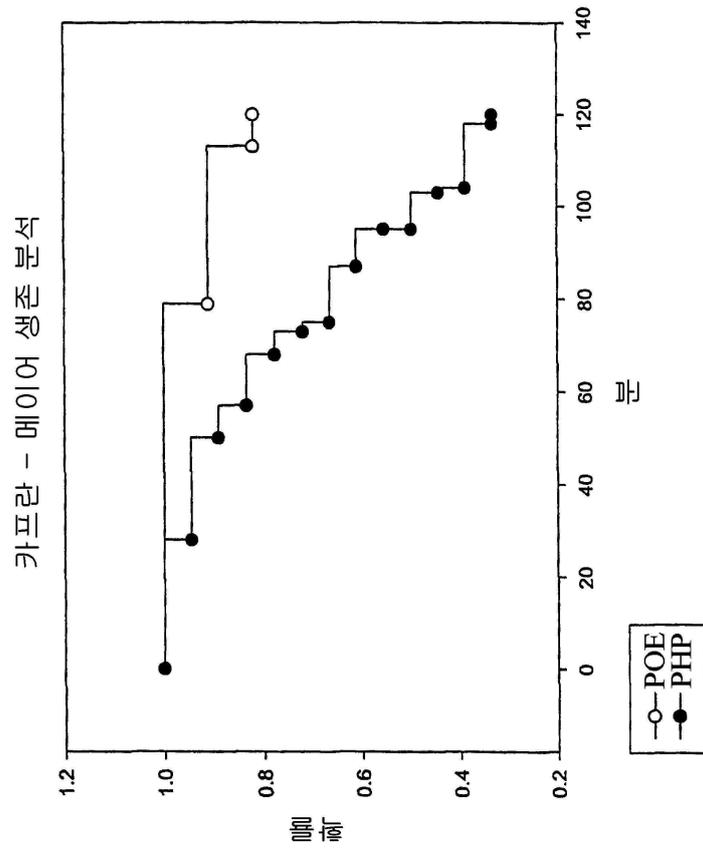
도면4



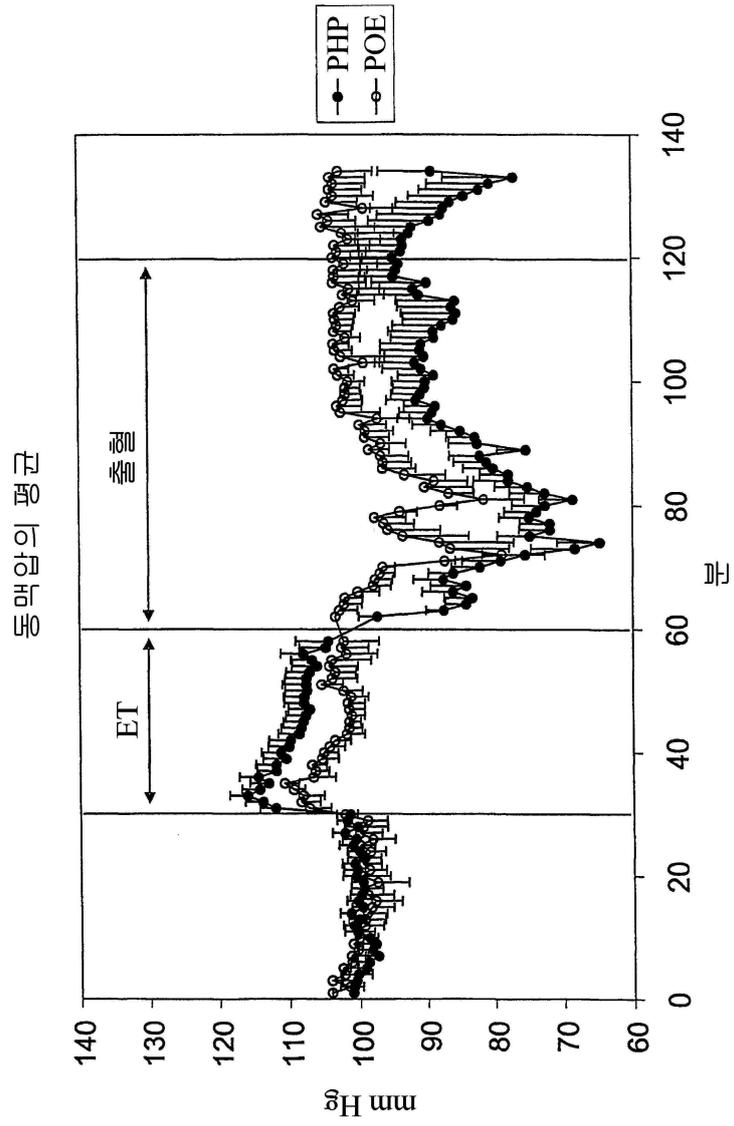
도면5



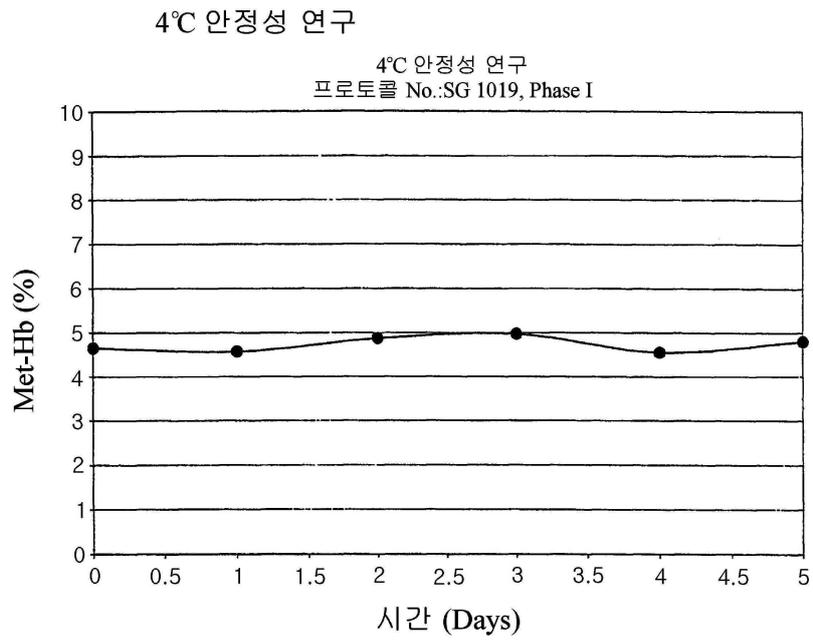
도면6



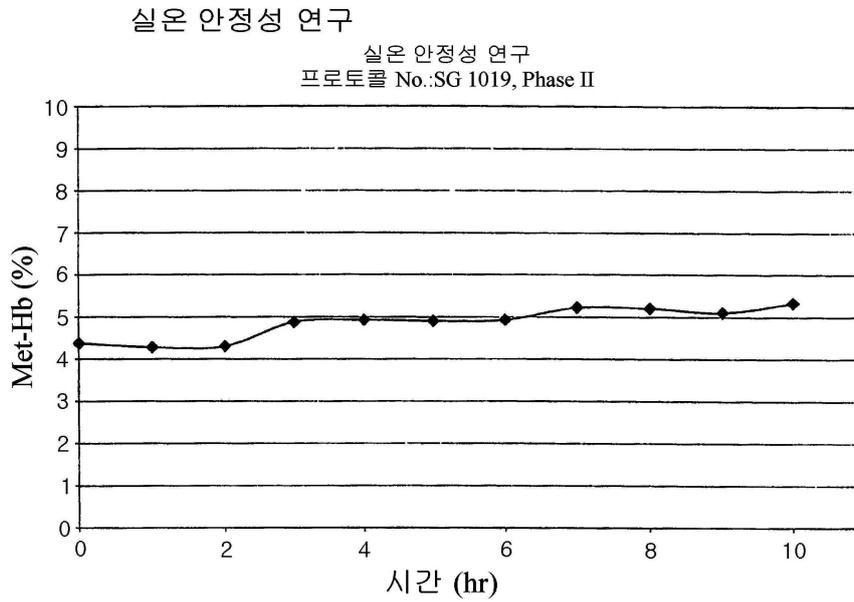
도면7



도면8

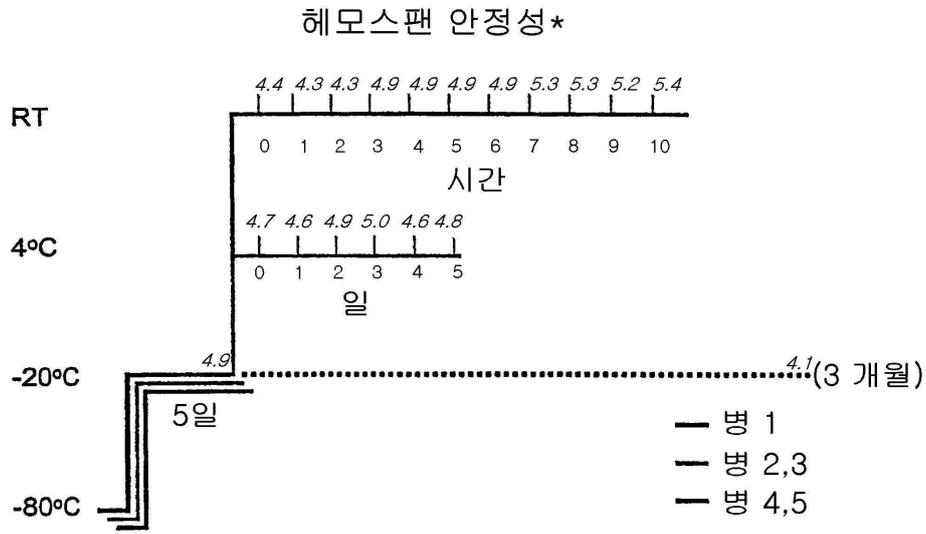


도면9



도면10

헤모스팬 안정성 프로파일의 개요



* 메트헤모글로빈 백분율을 푸른색으로 나타냄