

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101842111 A

(43) 申请公布日 2010.09.22

- 
- (21) 申请号 200880113549.4 *A61K 31/34* (2006.01)
- (22) 申请日 2008.08.29 *A61K 47/48* (2006.01)
- (30) 优先权数据 *C12M 1/00* (2006.01)  
60/969,394 2007.08.31 US
- (85) PCT申请进入国家阶段日  
2010.04.27
- (86) PCT申请的申请数据  
PCT/US2008/074804 2008.08.29
- (87) PCT申请的公布数据  
W02009/029801 EN 2009.03.05
- (71) 申请人 密执安州立大学董事会  
地址 美国密执安  
申请人 创新生物制剂疗法公司
- (72) 发明人 H·D·休姆斯 D·巴芬顿
- (74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专  
利商标事务所 11038  
代理人 袁志明
- (51) Int. Cl.  
*A61K 38/49* (2006.01)

权利要求书 3 页 说明书 39 页 附图 34 页

---

(54) 发明名称  
选择性细胞隔离装置及其相关方法

(57) 摘要

本发明涉及用于治疗 and / 或预防受治疗者患有炎性病症的系统 and 装置及其相关方法。更具体地, 本发明涉及隔离白细胞 and / 或血小板并随后抑制它们的炎性活动的系统、装置 and 相关方法。

1. 一种治疗白细胞的系统,所述系统包括:

定义通道的装置,以用于生物样品的流动,该通道包括配置用以隔离来自于样品的白细胞的区域;和

试剂,其能够抑制从白细胞释放促炎性物质,或使该白细胞失活。

2. 根据权利要求1所述的系统,还包括与所述定义通道的装置相连的第二装置。

3. 根据权利要求1所述的系统,其中,所述试剂与所述通道的表面相关联。

4. 根据权利要求1所述的系统,其中,所述试剂被灌输到所述通道中。

5. 根据权利要求1所述的系统,其中,所述试剂包括钙螯合剂。

6. 根据权利要求5所述的系统,其中,所述钙螯合剂包括柠檬酸盐。

7. 根据权利要求1所述的系统,其中,所述试剂包括免疫抑制剂、丝氨酸白细胞抑制剂、氧化氮、多形核白细胞抑制因子、分泌性白细胞抑制剂和钙螯合剂,其中,该钙螯合剂为由柠檬酸盐、六聚偏磷酸钠、乙二胺四乙酸(EDTA)、三乙烯四胺、二亚乙基三胺、o-菲罗啉和草酸所组成的组中的一个或多个。

8. 根据权利要求1所述的系统,其中,配置用以隔离白细胞的所述区域包括膜。

9. 根据权利要求8所述的系统,其中,所述膜是多孔的。

10. 根据权利要求8所述的系统,其中,所述膜具有大于大约 $0.2\text{m}^2$ 的表面积。

11. 根据权利要求1所述的系统,其中,配置用以隔离白细胞的所述区域被配置成使得该区域中的剪切力小于大约1000达因/厘米<sup>2</sup>。

12. 根据权利要求1所述的系统,其中,配置用以隔离白细胞的所述区域包括细胞-粘附分子。

13. 一种用于处理含在体液中的白细胞的方法,该方法包括:

(a) 体外隔离致敏的或活化的白细胞;和

(b) 处理该白细胞,来抑制促炎性物质的释放或使该白细胞失活。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中,所述白细胞被隔离一段时间,该时间足以抑制促炎性物质的释放或使该白细胞失活。

15. 根据权利要求13所述的方法,其中,所述白细胞被隔离一段延长的时间。

16. 根据权利要求15所述的方法,其中,所述白细胞被隔离至少一小时。

17. 根据权利要求13所述的方法,还包括步骤:将步骤(b)中生成的白细胞返回到受治疗者。

18. 根据权利要求13所述的方法,其中,在步骤(b)中,钙螯合剂抑制促炎性物质的释放或使白细胞失活。

19. 一种治疗处于正在发展或正患有炎症病症风险的受治疗者的方法,该方法包括:

(a) 体外隔离来自于受治疗者的致敏的或活化的白细胞;和

(b) 处理该白细胞,来降低与炎症病症相关的发展中的炎症的风险,或减缓与炎症病症相关的炎症。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中,所述炎症病症选自,由全身炎症反应综合征(SIRS)、心肺分流术综合症、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、败血症、风湿性关节炎、全身性红斑狼疮、炎性肠病、多发性硬化症、牛皮癣、同种异体移植排斥、哮喘、慢性肾功能衰竭、心肾综合症、肝肾综合症,和心肌、中枢神经系统、肝、肾或胰腺的缺血再灌注损伤引起的急性

器官衰竭所组成的组。

21. 根据权利要求 13 或 19 所述的方法,其中,步骤 (a) 通过使用一种定义通道的装置来完成,该通道包括配置用以隔离白细胞的区域。

22. 一种用于治疗血小板的系统,该系统包括:

定义通道的装置,以用于生物样品的流动,该通道包括配置用以隔离来自于样品的血小板的区域;和

试剂,其能够抑制从血小板释放促炎性物质,或使该血小板失活。

23. 根据权利要求 22 所述的系统,还包括与所述定义通道的装置相连的第二装置。

24. 根据权利要求 22 所述的系统,其中,所述试剂被灌输到所述通道中。

25. 根据权利要求 22 所述的系统,其中,所述试剂包括钙螯合剂。

26. 根据权利要求 25 所述的系统,其中,所述钙螯合剂包括柠檬酸盐。

27. 根据权利要求 22 所述的系统,其中,配置用以隔离血小板的所述区域包括膜。

28. 根据权利要求 27 所述的系统,其中,所述膜是多孔的。

29. 根据权利要求 27 所述的系统,其中,所述膜具有大于大约  $0.2\text{m}^2$  的表面积。

30. 根据权利要求 22 所述的系统,其中,配置用以隔离血小板的所述区域被配置成使得该区域中的剪切力小于大约 1000 达因 / 厘米<sup>2</sup>。

31. 一种用于处理含在体液中的血小板的方法,该方法包括:

(a) 体外隔离活化的血小板;和

(b) 处理所述血小板,以抑制促炎性物质的释放,或使血小板失活。

32. 根据权利要求 31 所述的方法,其中,所述血小板被隔离一段时间,该时间足以抑制促炎性物质的释放或使该血小板失活。

33. 根据权利要求 31 所述的方法,其中,所述血小板被隔离一段延长的时间。

34. 根据权利要求 33 所述的方法,其中,所述血小板被隔离至少一小时。

35. 根据权利要求 31 所述的方法,还包括步骤:将步骤 (b) 中生成的血小板返回到受治疗者。

36. 根据权利要求 31 所述的方法,其中,在步骤 (b) 中,钙螯合剂抑制促炎性物质的释放或使该血小板失活。

37. 一种用于治疗处于正在发展或正患有炎症病症风险的受治疗者的方法,该方法包括:

(a) 体外隔离来自于受治疗者的活化的血小板;和

(b) 处理该血小板,来降低与炎症病症相关的发展中的炎症的风险,或减缓与炎症病症相关的炎症。

38. 根据权利要求 37 所述的方法,其中,所述炎症病症选自,由全身炎症反应综合征 (SIRS)、心肺分流术综合症、急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)、败血症、风湿性关节炎、全身性红斑狼疮、炎性肠病、多发性硬化症、牛皮癣、同种异体移植物排斥、哮喘、慢性肾功能衰竭、心肾综合症、肝肾综合症,和心肌、中枢神经系统、肝、肾或胰腺的缺血再灌注损伤引起的急性器官衰竭所组成的组。

39. 根据权利要求 31 或 37 所述的方法,其中,步骤 (a) 通过使用一种定义通道的装置完成,该通道包括配置用以隔离血小板的区域。

40. 一种用于治疗处于正在发展或正患有炎症病症风险的受治疗者的方法,该方法包括:

- (a) 选择性地体外隔离来自于受治疗者的与炎症相关的致敏的或活化的细胞;和
- (b) 处理该细胞,来降低与炎症病症相关的发展中的炎症的风险,或减缓与炎症病症相关的炎症。

41. 根据权利要求 40 所述的方法,其中,与炎症相关的活化的细胞选自血小板和白细胞所组成的组。

42. 根据权利要求 40 所述的方法,其中,与炎症相关的致敏的细胞是白细胞。

## 选择性细胞隔离装置及其相关方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2007 年 8 月 31 日提交的序列号为 60/969,394 的美国临时专利申请的权益和优先权,其全部公开内容通过引用结合到本文中。

[0003] 有关联帮赞助研究或发展的声明

[0004] 本发明借助国立卫生研究院 (National Institutes of Health) 颁发的编号为 DK080529 和 DK074289 的拨款在政府的支持下进行。政府在本发明中具有特定权利。

### 技术领域

[0005] 本发明涉及用于治疗 and / 或预防受治疗者中的炎性病症的系统、装置和方法。更具体地,本发明涉及隔离与炎症相关的细胞,例如白细胞和血小板,并随后降低它们的炎性活性的系统、装置和相关方法。

### 背景技术

[0006] 多种医疗病症都是由不期望的炎症引起,加重的,和 / 或由所述炎症表征的。感染,如细菌、病毒和真菌感染;外伤,如跌倒、车祸、枪伤和刀伤;心血管病状,如动脉瘤和与手术有关的局部缺血;以及内源性炎症反应,如胰腺炎和肾炎,常常会导致调节心血管和调节免疫系统功能所涉及的稳态机制的严重的功能障碍。几种如局部缺血和感染这样的病症,通过免疫系统异常或过量的激活,可能导致在几小时至几天时间内发展成心血管功能障碍,并且在某些情况下,能引起生命危险,甚至是致命的。

[0007] 某些细胞类型对于心血管系统和免疫系统的功能障碍是至关重要的。例如,白细胞,特别是中性白细胞,在各种炎性病症的发病机制及进展中起到重要作用,所述炎性病症包括全身炎症反应综合征 (SIRS)、败血症、局部缺血 / 再灌注损伤和 ARDS (见,例如, Kaneider 等人 (2006) FEBS J 273 :4416-4424 ; Maroszynska 等人 (2000) Ann. Transplant. 5 (4) :5-11)。此外,活化的血小板能增强白细胞粘附性和促进白细胞活化。虽然炎症和全身免疫反应在某些情况下是有益的,但是也可能是致命的。

[0008] 器官的炎性损伤可能导致由白细胞活化和聚集以及血小板活化和聚集诱发的微血管损伤。这些活化的细胞可以通过释放毒性化合物到患者的组织中来促进微血管淤滞和再灌注损伤。在急性炎症中,活化的白细胞和血小板在脉管中呈凝胶样结构相互作用。这导致组织的弱灌注,这些组织通常是由毛细血管补给氧气和营养物质的。活化的白细胞还通过从内皮细胞外渗到组织中而导致损伤,在组织中,白细胞释放通常会消灭入侵微生物或清除坏死碎屑的毒性物质。活化的血小板还能通过增强白细胞的活性和白细胞的内皮迁移 (endothelial transmigration) 而导致损伤。当这些过程没有加以控制时,它们可能导致组织损伤和死亡。

[0009] 在美国, SIRS 是引起死亡的第 13 大主要原因。在美国,每年,伴有 SIRS 的严重败血症患者达 200,000 人,即使在重症监护室和使用广谱抗生素的情况下,其死亡率也达 30-40%。SIRS 的诊断主要依靠观察生理学的变化,例如体温的增加 (发热) 或减少 (低体

温)、心率增快(心动过速)、呼吸次数增加(呼吸急促)、白血细胞数升高或降低,以及组织和器官灌注不足。血压下降是与 SIRS 相关的发生在综合症晚期的一个并发症。具体而言,血压下降可以表现为休克的发展(development of shock),并促进多脏器衰竭,这是导致这些受治疗者死亡的主要原因。感染性休克是一种病症,它包括出现感染和血压下降的临床观察,尽管液体复苏(fluid resuscitation)和适当的心脏血液输出(proper cardiac blood output)。类似的疾病是败血症综合征,包括类似的生理信号,却没有任何类型感染的迹象。诱发败血症样的疾病的其他损伤包括胰腺炎、烧伤、局部缺血、多发性创伤及组织损伤(通常是由于手术和移植造成的)、出血性休克和免疫介导的器官功能障碍。

[0010] SIRS 和感染性休克的标准疗法包含,施用抗生素以使感染得到控制,以及流体/胶体治疗以维持循环血容量。通常情况下,也施用帮助维持血压的药物,如多巴胺和后叶加压素。

[0011] 心肺分流术(CPB)能够强烈诱导 SIRS 的发生,激活补体和凝血系统,并刺激细胞因子的产生。多种用于在 CPB 过程中限制白细胞活化和积聚的治疗方法正在研究中。事实上,动物和早期临床数据表明,在 CPB 手术过程中,使用白细胞排除过滤器(leukocyte depletion filter)能够改善对肺脏和肾脏的损害(见,例如,Gu 等人(1996)J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 112 :494-500 ;Bolling 等人(1997)J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 113 :1081-1090 ;Tang 等人(2002)Ann. Thorac. Surg. 74 :372-377 ;Alaoja 等人(2006)J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 132 :1339-1347)。然而,似乎透析能产生暂时中性粒细胞减少症(见 Kaplow 等人(1968)JAMA 203 :1135)。

[0012] 用于开发更多种的靶向疗法来治疗败血症的近期策略都不尽人意。此外,新一代抗感染试剂中的许多分子物质价格非常昂贵,并且能够产生不良的免疫和心血管反应,这使它们在某些情况下被禁止使用,例如非菌血症休克。

[0013] 仍然需要一种有效的治疗炎症病症的方法,这些炎症病症如心源性休克(cardiovascular shock)、败血症、全身炎症反应综合征和过敏反应。

[0014] 发明概述

[0015] 受治疗者产生的炎症病症,一部分是来源于与炎症相关的细胞活化,如白细胞和血小板。本发明涉及通过隔离(sequester)白细胞或血小板,和抑制或消除它们的炎性作用,来治疗和/或预防这种病症的系统、装置和方法。本发明的系统、装置和方法在体外隔离白细胞和血小板中的一种或两种,并抑制它们的炎性作用。例如,这些细胞可以被灭活,和/或可以抑制其释放促炎性物质。虽然有许多方法来实现本发明,但其中一种方法是在一个装置的内部隔离白细胞和血小板中的一种或两种,该装置提供了这些细胞可以结合(associate)的表面,并提供了能够灭活细胞和/或抑制其释放促炎性物质的试剂。在一个非限制性实施方式中,该装置含有中空纤维,而细胞则结合在这些纤维的外表上。柠檬酸盐被提供来灭活细胞和/或预防其释放促炎性物质。使用本发明的这种及其他实施方式进行指导的实验,在最大化受治疗者的存活率上取得了前所未有和出人意料的成功。这些结果体现了本发明的系统、装置和方法在一系列炎症疾病和病症中起到的引人注目的效用。

[0016] 因此,本发明的一方面提供了一种处理白细胞的系统,该系统包括定义通道的装置,该通道允许生物样品流动穿过,并且该装置还包含配置用以隔离一种或多种来源于样品的白细胞的区域。该系统还包括能够抑制白细胞释放促炎性物质或灭活白细胞的试剂。

[0017] 本发明的这个方面可以有一种或多种以下特征。白细胞可以被活化和 / 或致敏 (prime)。该系统可以进一步包含第二装置, 该第二装置与定义通道的装置相连。试剂可以与通道的表面相结合。在一定环境条件下, 试剂可以灌注入该通道。试剂可以包含免疫抑制剂、丝氨酸白细胞抑制剂、氧化氮、多形核白细胞抑制因子、分泌性白细胞抑制剂, 以及钙螯合剂, 其中, 钙螯合剂可以是柠檬酸盐、偏聚磷酸钠、乙二胺四乙酸 (EDTA)、三乙烯四胺、二亚乙基三胺、菲罗啉, 或草酸。不过, 试剂优选是钙螯合剂, 如柠檬酸盐。

[0018] 配置用以隔离白细胞的区域可以包含膜。这种膜可以是多孔的、半多孔或非多孔的, 和 / 或该膜的表面积可以大于约  $0.2\text{m}^2$ 。配置用以隔离白细胞的区域可以配置成使得该区域内的剪切力足够低, 从而使白细胞比血液或液体的其它成分在该区域内停留的时间更长。例如, 配置用以隔离白细胞的区域内的剪切力可以低于大约 1000 达因 / 厘米<sup>2</sup>。可替代地, 和 / 或结合在一起, 配置用以隔离白细胞的区域可以含有细胞粘附分子 (cell-adhesion molecule), 以使白细胞比血液或液体的其它成分在该区域内停留的时间更长。

[0019] 另一方面, 本发明提供了一种处理体液内含有的白细胞的方法。该方法包括: (a) 在体外隔离已致敏的或已活化的白细胞, 和 (b) 处理白细胞, 来抑制白细胞释放促炎性物质和 / 或灭活白细胞。本发明的这个方面可以有以下一种或多种特征。白细胞可以被隔离一段时间, 该时间足以抑制从白细胞释放促炎性物质和 / 或灭活白细胞, 和 / 或被隔离一段延长的时间, 和 / 或被隔离至少一小时。本方法还进一步包括: 将步骤 (b) 中产生的白细胞返回到受治疗者体内的步骤。在步骤 (b) 中, 钙螯合剂可以用来抑制释放促炎性物质和 / 或灭活白细胞。步骤 (a) 可以使用定义通道的装置来实现, 其中, 该通道包含配置用以隔离白细胞的区域。

[0020] 另一方面, 本发明提供了一种治疗处于正在发展或正患有炎症病症风险的受治疗者的方法。该方法包括: (a) 在体外隔离来自于受治疗者的致敏的或活化的白细胞, 和 (b) 处理白细胞, 以降低与炎症病症相关的发展中的炎症的风险, 或减轻与炎症病症相关的炎症。这种方法可以治疗的炎症病症包括, 但不限于: 全身炎症反应综合征 (SIRS); 心肺分流术综合症; 急性呼吸窘迫综合征 (ARDS); 败血症; 风湿性关节炎; 全身性红斑狼疮; 炎症肠病; 多发性硬化症; 牛皮癣; 同种异体移植排斥; 哮喘; 慢性肾功能衰竭; 心肾综合征; 肝肾综合征; 心肌、中枢神经系统、肝、肾或胰腺的局部缺血再灌注损伤引起的急性器官衰竭; 以及毒性损伤例如化疗引起的急性器官功能衰竭。步骤 (a) 可以使用定义通道的装置来实现, 其中该通道包含配置用以隔离白细胞的区域。

[0021] 本发明的系统、装置和方法并不局限于某一特定类型或种类的白细胞抑制剂。在一些实施方式中, 白细胞抑制剂是任何能够抑制白细胞释放促炎性物质和 / 或灭活白细胞的试剂。白细胞抑制剂的例子包括但不限于: 免疫抑制剂、丝氨酸白细胞抑制剂、氧化氮、多形核白细胞抑制因子和分泌性白细胞抑制。在一些实施例中, 白细胞抑制剂是一种钙螯合剂 (如柠檬酸盐)。本发明并不局限于某一特定类型或种类的钙螯合剂, 其中包括但不限于, 柠檬酸盐、偏聚磷酸钠、乙二胺四乙酸 (EDTA)、三乙烯四胺、二亚乙基三胺、o- 菲罗啉和草酸等。

[0022] 可以理解, 本发明中任何上述确定的方面或实施方式同样适用于隔离和灭活或抑制血小板 (例如, 活化的血小板)、白细胞与血小板的组合, 或与炎症相关的细胞。据此, 在

另一个方面,本发明提供了一种治疗处于正在发展或正患有炎性病征的风险的受治疗者的方法。该方法包括:(a) 选择性地体外隔离来自于受治疗者的与炎症相关的致敏的或已活化的细胞,和(b) 处理细胞,以减轻与炎性病征相关的发展中的炎症的风险,或减轻与炎性病征相关的炎症。在一些实施方式中,与炎症有关的活化的细胞可以选自血小板和白细胞组成的组。在一些实施方式中,与炎症有关的致敏的细胞是白细胞。

[0023] 应当理解的是,本发明中不同的实施方式,包括本发明中在不同方面下所描述的实施方式,旨在普遍适用于本发明的所有方面。任何实施方式都可与任何其他的实施方式联合,除非有不适当的情况发生。所有的例子都是说明性的和非限制性的。

[0024] 附图概述

[0025] 本发明的上述方面和实施方式,通过参考下述的详细描述和权利要求可以得到更充分的理解。

[0026] 图1是本发明的系统中的装置的示范性实施方式的一部分的示意图。在图中,(1) 受治疗者血液中的致敏的白细胞被(2) 系统中的上游装置,例如,血液过滤装置,活化。在上游装置中,血液流经通过一个中空室的内部空间,而超滤液(UF) 则被过滤通过该室的壁。在血液流出第一装置后,血液然后沿着中空纤维的外面流入第二装置,例如,选择性细胞隔离抑制装置(SCID),同时超滤液(UF) 通过中空纤维的内部空间流动。沿着中空纤维的外面流动的血液暴露于条件(3),这个条件(3) 允许血液中的白细胞,例如,通过附着到中空纤维的外表面而被隔离,从而便于(4) 利用白细胞抑制剂抑制白细胞释放促炎性物质和/或灭活白细胞,所述白细胞抑制剂例如是能够减少离子钙( $Ca_i$ ) 的柠檬酸。

[0027] 图2A是本发明的系统中的一个实施方式的图示,包括SCID555,它是系统中唯一的装置,并且包含一种两末端被覆盖(capped) 的毛细管内空间(intracapillary space) (ICS)。图2B是一个类似于图2A实施方式的图示,只不过超滤液(UF) 是从SCID655中收集到的,SCID655只具有覆盖的ICS的一端。图2C是本发明的系统中的一个实施方式的图示,它包含了第一装置,例如,一种血液过滤装置210,和包含两末端被覆盖的ICS的SCID555。图2D是一个类似于图2C的实施方式的图示,只不过超滤液(UF) 是从SCID655中收集到的,SCID655只具有覆盖的ICS的一端。

[0028] 图3是本发明的系统中的一个实施方式的图示,包括其ICS没有被覆盖的SCID755。

[0029] 图4A-4F是本发明系统结构的实施方式的图示,如应用于CPB回路。图4A-4C中,经由包含两末端被覆盖的ICS的SCID555(图4A和4B),或经由一末端被覆盖的SCID655处理的血液,循环回流入在静脉贮血器450和充氧器460之前的一段回路中。图4D-4F中,经由包含两末端被覆盖的ICS的SCID555处理的血液,与回路中处于充氧器460之后的一部分中的血液再组合。HF/HC代表血液滤器/血液浓缩器,P代表泵504,而UF代表收集超滤液的容器。

[0030] 图5显示了本发明SCID555的实施方式的图示,其具有两末端被覆盖的ICS。

[0031] 图6显示了本发明SCID655的实施方式的图示,其具有一末端被覆盖的ICS。

[0032] 图7显示了本发明SCID755的实施方式的图示,其具有两端都未被覆盖的ICS入口745和ICS出口746。

[0033] 图8显示了本发明SCID855的另外一个实施方式。

[0034] 图 9 显示了经本发明系统处理的猪模型组的平均动脉压,如实施例 1 所述。

[0035] 图 10 显示了经本发明系统处理的猪模型组的心输出量,如实施例 1 所述。

[0036] 图 11 显示了经本发明系统处理的猪模型组的红细胞比容水平,如实施例 1 所述。

[0037] 图 12 显示了经本发明系统处理的猪模型组的存活曲线,如实施例 1 所述。

[0038] 图 13 显示了在各动物组中 ( $n = 2$  或  $3$ / 每组) 经细菌攻击 (bacterial challenge) 后,再经 SCID 接触一段时间后的平均总白血细胞数,如实施例 1 所述。

[0039] 图 14A-14D 显示了含有中空纤维膜的 SCID 经三种不同动物的 H&E 染色的光学显微照片。图 14A 是低倍显微照片 ( $160\times$ ), 显示了每个中空纤维周围的粘附细胞。图 14B 及 14C 是稍高倍显微照片 ( $400\times$ ), 显示了沿中空纤维外表面聚集的白细胞。图 14D 是高倍显微照片 ( $1600\times$ ), 显示了粘附细胞簇中主要的多形核细胞与单核细胞。

[0040] 图 15 是一图表, 显示了受治疗者经 SCID 与柠檬酸盐或肝磷脂疗法治疗后存活率的差异。

[0041] 图 16A 和 16B 是图表, 分别比较了在本发明的单泵和双泵系统配置中, 白血细胞 (WBC) 和中性白细胞数。

[0042] 图 17 是一图表, 显示了本发明系统配置的两个示例性实施方式中血小板的数量。

[0043] 图 18 是一图表, 显示了经 SCID 和柠檬酸盐或 SCID 和肝磷脂处理的动物中平均髓过氧化物酶 (MPO) 水平。

[0044] 图 19 是一图表, 显示了经 SCID 和柠檬酸盐或 SCID 和肝磷脂处理的动物中 CD11b 的表达量, CD11b 是中性白细胞的膜蛋白, 负责中性白细胞与内皮组织的结合。

[0045] 图 20 是一图表, 显示了在经 SCID 和柠檬酸盐或 SCID 和肝磷脂处理的动物中, 依据本发明系统的动脉输血导管和静脉输血导管中中性白细胞的数目。

[0046] 图 21 是一图表, 显示了经 SCID 和柠檬酸盐或 SCID 和肝磷脂处理后的动物中, 存活的败血症动物的百分率与时间的函数。

[0047] 图 22A-22F 是图表, 分别显示了实施了心肺旁路术且经包括 SCID 和柠檬酸盐的本发明系统处理的动物中全身性总白血细胞 (WBC)、全身性中性白细胞、全身性淋巴细胞、全身性单核细胞、全身性嗜酸性细胞和全身性血小板的浓度。

[0048] 图 23A 和 23B 是图表, 分别显示了实施了心肺旁路术且经包括 SCID 和柠檬酸盐的本发明系统处理的动物中的全身性钙和回路钙 ( $Ca_i$ )。

[0049] 详述

[0050] 与炎症有关的细胞, 如白细胞 (或白血细胞) 和血小板, 通常能防御身体以免受到感染和伤害。然而, 许多疾病状态和医疗操作程序可以激活和 / 或致敏这些细胞, 从而可以引起不期望的可致命性免疫和炎症反应。本发明涉及配置用以治疗和 / 或预防受治疗者出现的炎性病症的系统 and 装置, 及相关的方法。本发明的系统、装置和方法, 在体外隔离白细胞和血小板的一种或两种, 并抑制其炎性作用。特别地, 本发明包括系统、装置和方法, 用于在白细胞返回受治疗者之前, 隔离白细胞, 如激活的和 / 或致敏的白细胞, 并抑制白细胞释放促炎性物质和 / 或灭活白细胞。本发明还包括系统、装置和方法, 用于在与炎症相关的其他类型细胞返回受治疗者之前, 隔离这些与炎症相关的其他类型细胞, 如血小板 (如活化的血小板), 并抑制这些细胞释放促炎性物质。

[0051] 虽然有很多方法来实践本发明, 但其中一个方法是在装置内部隔离白细胞和血小

板中的一种或两种,该装置提供了这些细胞可以结合的表面,并且该方法提供能够灭活细胞和 / 或抑制其释放促炎性物质的试剂。在一个非限制性实施方式中,该装置包含中空纤维,而所述细胞可以与这些纤维的外部结合。柠檬酸盐被提供来灭活细胞和 / 或防止其释放促炎性物质。虽然本发明在此处是关于血液来描述的,但是本发明可以应用于任何能够在体外回路流动穿过的生物样品,如受治疗者体内含有这些细胞的任何液体。例如,示例性的体外回路在序列号为 6,561,997 的美国专利中进行了叙述。

#### [0052] 1. 综述

[0053] 本发明的系统、装置和方法源于意想不到的观察,即特定的装置和系统配置不仅可用于隔离活化的和 / 或致敏的白细胞,还能够抑制其炎性作用,从而降低了炎性疾病和病症的多器官的效应,如败血症及 SIRS 的多器官的效应。这些急性作用也有可能影响到慢性炎性状态,如伴随晚期肾病 (ESRD) 而发生的慢性促炎性状态。这些系统装置和方法还显示出对血小板的有效隔离。利用本发明的实施方式指导的实验在最大限度的增大受治疗者存活率上,获得了前所未有的且出人意料的成功(见,例如,实施例 3),并证明了这些系统、装置和方法在治疗、诊断和研究应用一系列疾病和病症时的引人注目的效果。

[0054] 图 1 显示了一个示例性实施方式的图示。如图所示,血液接触到了第一装置。此后,白细胞被活化(和 / 或致敏)。随后,活化的(和 / 或致敏的)白细胞进入一个通常称为选择性细胞分离抑制装置 (SCID) 的装置,在该装置中,活化的白细胞被隔离。可以理解,白细胞更可能由于主要的患者病症或其次的其它类型的医疗干预而被活化(和 / 或被致敏),而不是被所述第一装置活化。

[0055] 换言之,在 SCID 中,血液中活化的(和 / 或致敏的)白细胞被隔离,例如,暂时吸附到 SCID 内部的一个或多个表面。白细胞的隔离可以通过多种方法来完成,例如,通过在 SCID 的通道或通道区域中与结合白细胞例如活化的和 / 或致敏的白细胞的分子相联合,或通过设置血流在装置中的流量来降低白细胞上的剪切应力,以使他们在 SCID 内与一个或多个表面联合。然后,这些被隔离的白细胞与试剂接触,例如,与柠檬酸盐接触,而灭活白细胞或抑制其释放促炎性物质。这些系统和装置同样适用于其它类型的细胞,如血小板。

[0056] 虽然没有理论的论证,但人们认为,钙螯合剂,如柠檬酸盐,导致装置中的低  $Ca_i$  环境,抑制白细胞释放促炎性物质和 / 或灭活白细胞。促炎性物质可包括白细胞产生的破坏性酶类和 / 或细胞因子。这些抑制和 / 或灭活作用导致了对白细胞炎性状态的改善。这样,在如图 1 所示的示例性实施方式中(和本发明的其他实施方式),SCID 隔离白细胞,例如,中性白细胞和单核细胞,并抑制白细胞释放促炎性物质和 / 或灭活白细胞,例如,在柠檬酸盐和 / 或低  $Ca_i$  环境下。血小板的隔离和抑制和 / 或失活能以类似的方式实现。

[0057] 已经证明,在本发明的包括含有用于隔离白细胞的中空纤维的外壳的装置中,添加一种钙螯合剂,如柠檬酸盐,在改善受治疗者的先天免疫系统方面获得了意想不到的结果。相应的,本发明的系统、装置和方法能够通过直接处理受治疗者的包含白细胞(如活化的和 / 或致敏的白细胞)或血小板(如活化的血小板)的血液来治疗或预防多种炎性疾病(无论是作为原发性疾病情况或是由于医疗介入而引起的情況)。处理之后,血液返回到受治疗者体内。

[0058] 此外,可以使用任何隔离白细胞或血小板(如活化的白细胞、致敏的白细胞或活化的血小板)和灭活此类细胞,或防止这些细胞释放促炎性物质的系统、装置和方法。相应

的,以下各节描述:(1)可用于治疗炎性病症的系统配置,(2)如何隔离与炎症相关的细胞的实施例,(3)说明如何灭活此类细胞和/或抑制其释放促炎性物质的实施例,和(4)可使用此处描述的这些系统、装置和方法处理的炎性病症。虽然随后各节中的讨论大致描述了隔离和抑制和/或灭活特定类型的细胞(例如白细胞),但可以理解,相同的原理可被用于隔离和抑制和/或灭活其它类型的与炎症相关的细胞(例如血小板,如活化的血小板)。

## [0059] 2. 系统配置

[0060] 本文提到的术语“细胞隔离(cytopheresis)”或“选择性细胞隔离(selective cytopheresis)”是指从血液中隔离特定的颗粒。选择性细胞隔离用来从血液中隔离特定细胞,如白细胞(例如,活化的和/或致敏的白细胞)或血小板(例如,活化的血小板),目的是促进抑制此类细胞释放促炎性物质和/或灭活此类细胞。可以理解,这种抑制和/或灭活可能发生在隔离之前、期间和/或之后。

[0061] “选择性细胞隔离装置(selective cytopheresis device)”,“选择性细胞隔离抑制装置(selective cytopheresis inhibitory device)”,“SCD”和“SCID”是指本发明的用于隔离特定细胞,如白细胞(例如,活化的和/或致敏的白细胞)或血小板(例如,活化的血小板)的实施方式。这些实施方式也可以在隔离之前、期间和/或之后灭活和/或抑制这些细胞释放促炎性物质。

[0062] 本发明的系统被配置为实现选择性细胞隔离。在基本形式中,该系统包括SCID、让血液从血源(例如受治疗者,如患者)流出进入SCID的液体连接装置(fluid connection),和让处理后的血液从SCID流入接收体(例如,返回受治疗者)的液体连接装置。所述SCID用于隔离白细胞,如活化的和/或致敏的白细胞,并且促进抑制白细胞释放促炎性物质和/或灭活白细胞。白细胞的隔离可以通过随后的第3节中描述的任何技术来完成。抑制白细胞释放促炎性物质和/或灭活白细胞可以通过随后的第4节中所述的任何技术来完成。

[0063] 在一些实施方式中,该系统可以包含SCID,该SCID在没有附加处理装置的情况下,可选地,还能够实行其他血液处理。见,例如,图2A-2B和图8。该系统中的其它实施方式可以包括SCID,其可以在同时拥有附加血液处理装置的情况下,可选地实行对其他血液的处理。见,例如,图2C-2D和图4A-4F。例如,附加装置可以在血液进入SCID之前或之后,过滤、充氧或用另外的方式处理血液。此外,系统中的SCID和/或附加装置可以包含用于以其它或补充的方式处理血液的一个以上的组件,例如,多孔过滤器、氧气泵和/或xenographic或allographic细胞(例如,xenographic或allographic肾细胞,如肾小管细胞)。在某些实施方式中,系统中的便于选择性细胞隔离的装置不包含这些附加组件。例如,本发明的SCID可能不包含诸如xenographic或allographic细胞的细胞(如xenographic或allographic肾细胞)。这些基本原则详述如下。

## [0064] 2. A 单装置系统

[0065] 如前所述,该系统可以包含SCID,该SCID可用于实现选择性细胞隔离,并且可选择地,可在系统中没有附加处理装置时实现其它血液处理(见图第2A-2B)。图5概略的显示了所述SCID的一个实施方式。在图5中,SCID555包含多个多孔膜,这些膜是中空纤维552(为了清楚,只明确标记了一个)。这些纤维的管腔内的空间被称为毛细管内空间(“ICS”)540。在这个实施方式中,ICS入口和ICS出口被覆盖544。围绕中空纤维552并

在 SCID555 的外壳 554 中的空间 542 被称为毛细管外空间 (“ECS”)。含有白细胞的血液进入 ECS 入口 548, 并移动进入到围绕纤维 552 的 ECS542 中 (即移动进入管道中)。白细胞在装置中被隔离, 例如被隔离在中空纤维 552 的外表面上, 并被暴露在试剂下, 例如柠檬酸盐, 而该柠檬酸盐能够抑制白细胞释放促炎性物质和 / 或灭活白细胞。试剂能够被注入 ECS 入口 548 的上游导管 (a line upstream), 或可能通过一个口注入 SCID 本身。可替换地, 或另外地, 可以在使用 SCID 之前, 用该试剂致敏 SCID。ECS542 中的流速可以在本文所述范围中进行选择, 以使得在纤维 552 的表面上有低剪切力 (在本文所述的范围中), 从而使白细胞能够与其联合。这样就完成或启动了抑制和 / 或灭活白细胞。然后, ECS 中的血液经过 ECS 出口 550 流出 SCID, 进入了流出物导管。

[0066] 图 2A 显示了根据本发明循环中的图 5 的示例性 SCID555 的循环。受治疗者的血液进入输血导管, 并经由泵 204 而移动通过该导管。在同一输血导管中, 白细胞抑制剂 (如柠檬酸盐) 可在孔 206 处注入, 可选择地, 可用泵注入。输血导管中的血液接着进入 ECS 入口 548, 再从 ECS 出口 550 流出 SCID555。ECS 入口 548 和出口 550 处的输血导管分别使用带有锁定机制 256 的输血导管连接器来连接。在中空纤维 552 的外表面上, 白细胞显示已被隔离在 ECS542 中。ECS 出口 550 处的血液流出物导管将血液返回受治疗者。另外的试剂, 如钙 (例如, 氯化钙或葡萄糖酸钙), 可在这条血液流出物导管上的孔 258 处注入, 以使血液被准备好重新进入受治疗者。在某些实施方式中, ICS 可以包含 xenographic 或 allographic 细胞, 例如, 肾小管细胞, 这些细胞在每条纤维的 ICS540 的衬里 (lining) 导管上单层培养, 从而为血液的进一步处理提供帮助。然而, 在其他实施方式中, ICS 是无细胞的。在图 2A 中的循环中, SCID555 的管腔 540 中充满了生理盐水。

[0067] 图 2B 的循环包括了与图 2A 相同的组件, 并且以同样的方式运作, 不同的是, 图 2B 利用了图 6 所示的 SCID655, 并且, 由 SCID655 来产生超滤液。SCID655 包含多个多孔膜, 这些多孔膜是中空纤维 652。纤维内的管腔内的空间是 ICS640, 而处在纤维 652 的外部并在 SCID 外壳 654 内部的周围空间是 ECS642。含有白细胞的血液进入 ECS 口 648, 并移动进入到围绕纤维 652 的 ECS642, 再从 ECS 出口 650 流出。白细胞的隔离和抑制和 / 或灭活可以按以上所描述的来完成。然而, 在 SCID655 中, 只有 ICS 的入口被覆盖 644。ICS 的出口 646 没有被覆盖。据此, 根据多孔中空纤维 652 的特征 (例如, 渗透率和孔径), 在 ECS642 中, 血液中的一部分可以穿过中空纤维 652, 并且作为超滤液 (UF) 进入 ICS640。ICS 出口 646 处可以连接一个管, 用以收集被作为废物排除的超滤液 (UF)。

[0068] 在具有单处理装置的该系统的另一实施方式中, SCID 可以是如图 8 所示的装置。血液进入 SCID855 的一个端 810, 并穿过中空纤维 802, 而超滤液穿过该中空纤维 802 进入中空空间 804。经中空纤维 802 滤过的血液进入 ECS806, 并围绕含有超滤液的中空纤维 808, 其中超滤液是穿过中空纤维 804 得到的。ECS 中的血液流过充满超滤液的中空纤维 808, 之后白细胞即被隔离在其上了。在本文所述的范围内选择流速, 以使得在超滤液中空纤维 808 的表面形成一个剪切力 (在本文所述范围内), 从而使白细胞能够结合在纤维上。血液最终从侧口 812 流出该装置, 同时超滤液作为废弃物经由末端口 (end port) 813 流出。超滤液中空纤维 808 的内部可选择地含有肾小管细胞。SCID 的该实施方式可以被置于针对如图 2A-2B 的 SCID 所述的循环中。

[0069] 在具有图 5、6 或 8 的 SCID 的图 2A-2B 循环中所示的实施方式中, 流速和膜特征可

以如下描述。例如，ECS 流速可能会从大约 100 毫升 / 分钟到大约 500 毫升 / 分钟。超滤液废弃物的流速（例如图 6 和图 8 所示的 SCID）例如，流速从约 5 毫升 / 分钟到大约 50 毫升 / 分钟。

[0070] 2. B 作为血液透析或血液过滤系统一部分的选择性细胞分离抑制装置

[0071] 如前所述，在一些实施方式中，SCID 是带有用于处理血液的其他装置的系统的一部分。例如，SCID 可以作为血液过滤系统、血液透析系统和 / 或血液透析过滤系统的一部分，在这些系统中，还包括一个或多个与系统内的 SCID 相分离的过滤筒 (filtration cartridge)。当描述系统中这些非 SCID 的部分时，术语“血液过滤”是指血液透析、血液透析过滤、血液过滤和 / 或血浓缩，而术语“血液滤器”可以包括一个实现血液透析、血液透析过滤、血液过滤和 / 或血浓缩中的一种或多种的装置（例如筒）。血液过滤筒配置成在体外血液循环中与 SCID 并联或串联，而相关的血液泵和管道可用以使血液在体外循环中移动。例如，如图 2C 和图 2D 所示，血液从受治疗者流入输血导管中。血液经由泵 204 流入输血导管。白细胞抑制剂（如柠檬酸盐）可以在孔 206 处灌注进入相同的输血导管，可选择地，使用泵。血液接着流经常规的血液滤器 210 中的中空纤维 214。透析液被灌注入围绕中空纤维 214 且在血液滤器 210 的外壳内的 ECS 中，而透析发生时，溶质作为“废弃物”跨过血液滤器滤过膜 214（中空纤维）而进入透析液中，从而被从血液中移除。相对于血液来说，透析液以逆流的形式流动，且透析液由于透析液泵 218 而流动。此外，血液中的分子和液体可以作为超滤液而通过血液滤器滤过膜 214（中空纤维），这取决于膜孔径的大小。

[0072] 图 2C 中的示范性的系统显示了带有图 5 中的 SCID555 的循环。血液从血液滤器 210 中流出，并从 ECS 入口 548 进入 SCID555。接着，血液流过 SCID，该 SCID 按前述图 2A-2B 所述的方式在中空纤维 552 中隔离白细胞，以及抑制从白细胞释放促炎性物质和 / 或灭活白细胞。进出 SCID555 的输血导管由带锁定机制 256 的结合器联接。血液接着从 ECS 出口 550 经由血液流出物导管返回到受治疗者。另一种试剂，如钙，可以在该血液流出物导管上的孔 258 处注入，以便使血液被准备好重新返回受治疗者。在某些实施方式中，SCID 的毛细管内空间 (ICS) 可以包含 xenographic 或 allographic 细胞，例如肾小管细胞，这些细胞在每条纤维的管腔的衬里上单层培养，从而为血液的进一步处理提供帮助。然而，在其它的实施方式中，ICS 是无细胞的。在图 2C 的循环中，SCID555 的 ICS540 充满了生理盐水，并且 ICS 的末端口被覆盖 544。

[0073] 图 2D 中的循环包括了和图 2C 中相同的组件，并且用同种方式操作，不同的是，图 2D 利用了图 6 中的 SCID655，且超滤液是由 SCID655 产生的。前文中，结合图 2B 叙述了血液经过 SCID655 的流动。此外，SCID655 的功能在前文的图 2B 中叙述了。如上所提及的，SCID655 仅有 ICS 入口 644 被覆盖了。ICS 出口 646 没有被覆盖。相应的，根据多孔中空纤维 652 的特性，在 ECS642 中，血液的一部分可以穿过中空纤维 652，并作为超滤液 (UF) 进入 ICS。ICS 出口 646 处可以连接一个管，用以收集被作为废物排除的超滤液 (UF)。

[0074] 不希望受到理论的约束，设想，在 SCID 系统的这些实施方式（以及图 1、2A-2B、3 和 4A-4F 所示的那些实施方式）中，流体的几何形态允许白细胞在 SCID 的 ECS 中在低剪切力的环境下存活，并且因此，结合在 SCID 的一个或多个内表面上，例如中空纤维。相反的，在血液过滤筒的典型的应用（例如图 2C 和 2D 中循环的第一装置 210）中，流过中空纤维的小直径管腔的血液产生了较高的剪切力（较在 SCID 中而言），这样就阻止了在装置内部白

细胞与中空纤维的结合和白细胞的隔离。据此,具有常规的流体循环来支持其相反的操作的血液过滤装置(即血液更倾向于在中空纤维外流动而不是在中空纤维内部流动),可以作为 SCID 来隔离潜在的损伤性和循环活化的白细胞。这些隔离的白细胞可以用白细胞抑制剂(如柠檬酸盐)来处理。

[0075] 此外,设想,在低  $Ca_i$  存在的情况下(例如,由柠檬酸盐引起),在隔离之前、期间和/或之后,被隔离的白细胞的炎性反应被抑制,和/或被灭活。低  $Ca_i$  环境可能抑制白细胞的炎性作用,或灭活白细胞。

[0076] 在某些实施方式中,仅有超滤液是由血液滤器(例如,在图 2C 和 2D 中的血液滤器 210)产生的,而非透析液和超滤液都由此产生。血液在超滤过程中被分成超滤液和截留物,超滤液已经被过滤通过介质,如膜,而截留物并不能通过介质。这种类型系统的一个例子是图 7 的 SCID755,如图 3 所示系统中。简单来说,在这个系统中,血液经 SCID755 的 ECS 入口 748 流入,进入由 SCID 外壳 754 和中空纤维 752 定义的 ECS742,再经 SCID755 的 ECS 出口 750 流出。此外,血液滤器 210 处的超滤液导管 320 经由 ICS 入口 745 与 SCID755 的 ICS740 相连通,并为 ICS740 提供超滤液。滤过的血液(在 ECS742 中)和超滤液(在 ICS740 中)是分隔开的,但是可以通过中空纤维 752 的膜相互作用。ICS740 中的超滤液和 SCID755 的 ECS742 中的滤过的血液可以以平行或逆流的方式流动。处理后的超滤液在 SCID755 的 ICS 出口 746 处排出 ICS740,并可以作为废弃物来处理。相应的,在这个实施方式中,ICS 入口 745 和 ICS 出口 746 没有被覆盖,但是,SCID755 在其他方面与图 5 和图 6 中所示的基本相同。

[0077] 更具体地说,在应用依照图 7 的 SCID755 的图 3 的系统中,血液通过输血导管从受治疗者(例如,患者或任何动物)中移出。血液由泵 204 泵送穿过输血导管。白细胞抑制剂,如柠檬酸盐,可以在孔 206 处注入,可选地,使用泵。血液接着进入血液滤器 210 的中空纤维,并且,按照以上针对图 2C-2D 所描述的方式沉积在血液滤器 210 的 ECS 之中。超滤液经过血液滤器 210 的中空纤维产生,并沉积在血液滤器 210 的 ECS 之中。超滤液接着从血液滤器 210 中经过超滤液导管 320,并从 ICS 入口 745 流进 SCID755。超滤液通过中空纤维 752 的 ICS740 移动,并从 ICS 出口 746 流出。中空纤维可以是多孔的、半多孔的或非多孔膜。

[0078] 保留在血液滤器 210 的中空纤维的 ICS(即血液滤器 210 中的中空纤维的管腔)中的滤过的血液流出血液滤器 210,并由泵 300 泵送进入 SCID755 的 ECS 入口 748。可选地,该泵可以置于 SCID 和受治疗者之间的输血导管上,或者第三个泵(没有显示)可以置于 SCID 和受治疗者之间的输血导管上。血液流入围绕中空纤维 752 的 ECS742 中,(即在通道中移动)。白细胞,例如活化的和/或致敏的白细胞,在装置中被隔离,例如,被隔离在中空纤维 752 的外表面上。血液接着从 ECS 出口 750 流出 SCID755,并返回受治疗者。带有锁定机制的输血导管连接器 256 将输血导管连接在 ECS 入口 748 和 ECS 出口 750 处。另外的试剂,如钙,可以在返回受治疗者的血液流出物导管上的孔 258 处注入,以准备好重新进入受治疗者的血液。而且,超滤液泵 304 将超滤液从 ICS740 移送至废弃物处。然而,根据系统中泵的流速,没有、一部分或全部的超滤液可能穿过中空纤维 752,并返回到 ECS742 的滤过的血液中。

[0079] 图 7 的 SCID 在图 3 所示循环中的应用,已经经过 100 余种大型动物的临床前实验

和将近 100 位患者的第 I、第 IIa 及第 IIb 期临床研究,没有出现与 SCID 和灌注循环相关的意料之外的不良情况。尽管 ICS 可以是无细胞的,但可以理解,本系统中可选地也有可能在 ICS740 中包含细胞,如肾小管细胞。选择血液的流动速率,以使多孔的中空纤维表面有足够低的剪切力(在本文所述的范围内),从而使白细胞能够通过结合纤维而隔离,例如,血液流速为从约 100 毫升/分到约 500 毫升/分。可替代地,血液经过体外循环、经过血液滤器 210 的中空纤维的管腔和经过 SCID755 的 ECS742 的流动速率约为 120 毫升/分。超滤液可以在本文所述范围内的流速移动,例如,流速小于 50 毫升/分,从约 5 毫升/分到约 50 毫升/分,和从约 10 毫升/分到约 20 毫升/分。可替代地,超滤液流速可以保持在 15 毫升/分。可选地,平衡的电解质替代溶液(electrolyte replacement solution)(例如含有重碳酸盐基质的溶液)可以以体积比 1 : 1 的比例置换产生的超滤液,而被灌注入输血导管。液体(如超滤液)和血液(或含有白细胞的血液)可以以相同或相反的方向流动。

[0080] 在这个和其他实施方式中,通过 SCID 的血液流动配置与通过典型的血液过滤筒的血液流动配置相反。也就是说,与在 SCID 的中空纤维的外部周围流动相比,血液按照其预期用途流经血液过滤筒的中空纤维的内部。通过 SCID 的这种非传统的血液流动配置,允许在 ECS 内在中空纤维的外表面处有较低的剪切力,相对而言,血液滤器的中空纤维的管腔中的剪切力则较高,因此能够促进 SCID 中 ECS 内白细胞的隔离。相反的,血液流动经过血液滤器的中空纤维内部时,由于血液流经中空纤维的小直径的管腔而产生了高剪切力,从而阻止了白细胞的隔离。例如,试验显示,血液滤器的中空纤维内部的血液产生了  $1.5 \times 10^7$  达因/厘米<sup>2</sup> 的剪切力,而血液流经 SCID 的特定实施方式的 ECS 产生了 5.77 达因/厘米<sup>2</sup> 的剪切力,或者说缩小  $10^6$  倍的剪切力。为了比较,典型动脉壁处的剪切力为 6 至 40 达因/厘米<sup>2</sup>,而典型静脉壁处的剪切力为 1 至 5 达因/厘米<sup>2</sup>。因此,毛细血管壁的剪切应力小于 5 达因/厘米<sup>2</sup>。

[0081] 因此,在一些实施方式中,本发明在配置用于隔离白细胞的通道区域表面,用相当低的剪切力使白细胞能够结合在该表面上和隔离白细胞,例如该区域中活化的和/或致敏的白细胞。例如,在一些实施方式中,在配置用于隔离白细胞的通道区域表面处,剪切力小于 1000 达因/厘米<sup>2</sup>、或小于 500 达因/厘米<sup>2</sup>、或小于 100 达因/厘米<sup>2</sup>、或小于 10 达因/厘米<sup>2</sup>、或小于 5 达因/厘米<sup>2</sup> 是可用的。应该理解的是,这些剪切力在本文所述的任何 SCID 实施方式中都是可用的。在特定的拥有两套装置的实施方式中,如血液滤器和 SCID,血液流过血液滤器和血液流过 SCID 时剪切力的差异至少可达 1000 达因/厘米<sup>2</sup>。

[0082] 在这些和其他实施方式中,只要非传统的流动配置(即血液在中空纤维外流动,而不是在中空纤维内流动)产生必需的剪切力,则 SCID 可包括常规的 0.7m<sup>2</sup> 的聚砜血液滤器(polysulfone hemofilter)(例如, F40 型, Fresenius Medical Care North America, Waltham, MA, U. S. A.), 聚砜血液滤器被 FDA 批准用于急性和慢性的血液透析。相似的,本实施方式或任何其它的实施方式中的体外灌注循环,可以使用标准动静脉血液透析管(standard dialysis arteriovenous blood tubing)。筒和血液管可以放置在任何目前正用于慢性透析的透析液输泵系统中(例如, Fresenius 2008H)。

[0083] 在一个示例性的系统中,系统包括来自受治疗者的输液管(输血导管),且一包柠檬酸盐溶液由注入器灌注到输液管中。在柠檬酸盐进入输血导管后的一点处,将第一 F40

血液滤器筒与输血导管连接起来。输血导管中的血液接着从末端入口孔到末端出口孔流经筒内的中空纤维内部 (ICS), 而透析液在筒内部和中空纤维外部 (ECS), 以相对血液流动呈逆流的方式从一侧孔流动到第二侧孔。收集从第二侧孔流出的透析液 / 超滤液混合物。基本上没有血细胞、血小板或血浆 (plasma) 从 ICS 穿到 ECS, 并且基本上没有白细胞吸附到中空纤维的内部。中空纤维以束形彼此平行排列, 且每个纤维的直径大约为 240 微米。此外, 中空纤维的孔足够小, 以阻止约为 30 埃的清蛋白 (albumin) 分子通过纤维, 并且在整条纤维上, 孔基本都是这个大小。滤过的血液接着继续从末端出口孔, 经输液管, 进入第二 F40 筒 (即 SCID) 的侧孔入口。血液流过第二 F40 筒的 ECS, 再从一个侧孔出口流出筒。第二 F40 筒中产生的任何超滤液都进入 ICS 并通过一个末端孔流出。筒的另一个末端孔是被覆盖的。基本上没有血细胞、血小板或血浆从 ECS 穿到 ICS, 并且, 白细胞吸附到中空纤维的内部一段时间。从第二 F40 筒流出的血液进入输液管中, 在该输液管中, 由注入器将钙溶液灌注入血液。最后, 输液管将处理过的血液返回受治疗者。在某些实施方式中, 系统的血液流动速率不能超过 500 毫升 / 分, 并且血液在系统中的任何点都不能代替空气。此外, 考虑到电解质和总白细胞数的床边读数 (bedside reading), 泵送和灌注的速率需要手动调节。手提的监测装置 An **i-STAT**<sup>®</sup> 能够从少量提取自受治疗者的血液中产生这些读数。

[0084] 使用本系统的风险和伴随血液透析疗法产生的风险相似, 并且包括, 例如, 灌注循环的凝固, 空气进入循环中, 导管或输血管扭结或断开, 和温度失调。然而, 血液透析装置和相关的血液透析灌注装置已被设计为用警报系统在治疗中鉴定这些问题, 并用凝块过滤器和气泡捕捉器减轻受治疗者的任何凝块或空气栓塞。这些泵系统和输血管设备是被 FDA 批准的, 可用于治疗适应症 (treatment indication)。

[0085] 如上提及的, 可以在 SCID 的局部、或系统的部分或全部区域灌注白细胞抑制剂, 例如柠檬酸盐。在这个或任何的实施方式中, 柠檬酸盐也可以作为抗凝血剂使用, 在这种情况下, 遍及系统的灌注是有效的。临床经验显示, 如果在血液过滤系统中发生凝血, 则它将在第一透析筒中启动。抗凝试验设计 (anticoagulation protocol), 例如全系统的肝磷脂或区域的柠檬酸盐, 是目前制定的并在临床血液透析中常规使用的。

[0086] 2. C 作为心肺分流系统的一部分的选择细胞分离抑制装置

[0087] 如本文中图 4A-4F 所示和实施例 8 和实施例 9 中所描述的, SCID 可以在心肺分流术 (CPB) 循环中应用, 用于治疗 / 或预防由手术 (如分流手术) 续发的炎症病症。图 4A、4B、4D、4E 和 4F 显示了在示例性的 CPB 系统的图 5 中的 SCID。图 4C 显示了在示例性的 CPB 系统中的图 6 中的 SCID。CPB 是用于从心肺左右两侧转向血液。这是通过从心脏的右侧引血和灌流动脉循环完成的。然而, 由于全身对肺络 (systemic-to-pulmonary collateral)、全身对全身络 (systemic-to-systemic collateral) 和手术部位出血将血液返回到心脏的左侧, 因此, 在 CPB 过程中, 心脏的左侧需要特殊的引流机制。可选择地, 心搏停搏液 (cardioplegia) 可通过一个特殊泵和管道机制传递。一个标准的 CPB 系统有多个特征, 可以大致划分为三个子系统。第一个子系统是供应氧气并从血液中清除二氧化碳的充氧通气子系统 (oxygenating-ventilating subsystem)。第二子系统是温度控制系统。第三子系统包括导管内监测器 (in-line monitor) 及安全装置。

[0088] 如图 4A 所示的实施方式, 血液经由静脉插管 400 从受治疗者移出进入输血导管 410。血液流过输血导管 410, 经过与 SCID 流出导管 430 联接的再循环结合处 420。SCID 流

出导管 430 包括了用 SCID 装置 555 处理的血液。输血导管 410 中的血液与 SCID 处理后的血液相混合,并继续进入静脉贮血器 450 和充氧器 460,在充氧器 460 中,血液被氧化。氧化的血液接着从充氧器 460 流入与 SCID 流入导管 480 的结合处 470。输血导管 410 中的一部分血液经由 SCID 流入导管 480 转向 SCID555,用于 SCID555 的处理。血液穿过 SCID 流入导管 480 的流量由泵 504 控制。SCID555 被设计用于隔离选择的与炎症相关的细胞,例如,白细胞或血小板。在这些实施方式中,不在血液进入 SCID555 时添加白细胞抑制剂。包含白细胞的血液进入 ECS 入口 548,并移动进入围绕中空纤维 552 的 ECS542。白细胞在装置中被隔离,例如,被隔离在中空纤维 552 的外表面上。泵 504 处的流速可以在本文所述范围内选择,这样,在中空纤维 552 的表面就有一个低剪切力(在本文所述范围内),于是允许白细胞结合在此。ECS542 中的血液经 ECS 出口 550 流出 SCID,并进入 SCID 流出导管 430。在结合处 470,输血导管 410 中的部分血液在从动脉插管 495 返回受治疗者之前,还继续前进至动脉过滤器/气泡捕捉器 490。

[0089] 图 4B 中的循环和图 4A 中的循环拥有相同的流动方式,所具有的附加特征为,用柠檬酸盐加料装置 435 和柠檬酸盐泵 436 将柠檬酸盐添加到 SCID 流入导管 480 的血液中,并且由钙加料装置 445 和钙泵 446 将钙添加到 SCID 流出导管 430 的血液中。在血液流入 SCID555 时,从柠檬酸盐加料装置 435 将柠檬酸盐(或其他本文所述的白细胞抑制剂)添加到血液中,来抑制和/或灭活与炎症相关的细胞,如白细胞。钙可以添加入血液中,以准备好重新进入受治疗者的血液。

[0090] 图 4C 的循环与图 4B 的循环功能形式相似,但图 4C 附加了与血液滤器/血液浓缩器(HF/HC)476 相关的特征。具体来说,在结合处 470 经由 SCID 流入导管 480 转向 SCID655 的一部分氧合的血液,进一步在结合处 472 分离,其中一部分流向 SCID655,而隔离的部分经由流 HF/HC 流入导管 474 向 HF/HC476 流入。HF/HC 可以在超滤液从装置经由废弃物管 477 通过的过程中过滤或浓缩血液。滤过的或浓缩的血液经 HF/HC 流出导管 479 流出 HF/HC476, HF/HC 流出导管 479 将滤过的或浓缩的血液在结合处 444 返回 SCID 流出导管 430。如前所述,图 4C 所示 SCID 是图 6 中的 SCID。血液从 SCID 流入导管 480 流出,进入 ECS 入口 648,经过 ECS,从 ECS 出口 650 流出,并进入 SCID 流出导管 430。超滤液可能在通过 SCID 的中空纤维(从 ECS 到 ICS)时产生,同时超滤液从 SCID 的 ICS 出口 646 处通过进入废弃物管 478。

[0091] 流向 SCID655 的血液可以通过泵 504 来控制。泵 504 优选地保持实施方式的恒流,这些实施方式灌注了抑制或灭活白细胞的试剂,如柠檬酸盐,和/或在 SCID 治疗后,灌注其他的试剂,如钙。可替换地,流向 SCID 的血液可以通过选择口径来控制,在接合处 472 和 SCID655 之间的 SCID 流入导管 480 的口径相对于 HF/HC 流入导管 474 的口径更小,以至于仅有大约 200mL/5L(流量的大约 4%)在接合处 472 处被转向进入 SCID。这造成了 SCID 中的有利于隔离的低剪切力的结果。

[0092] 图 4D-4F 中所示的循环与图 4A-4C 中所示循环不同,不同之处在于,它们在循环中没有使血液再循环,例如,在再循环接合处 420。此外,如图 4D 所示,血液经由静脉插管 400 从受治疗者中流出进入输血导管 410,血液通过输血导管 410 直接流向静脉贮血器 450 和氧化血液的充氧器 460。氧化的血液接着从充氧器 460 流入 SCID 流入导管 480 上的接合处 470。在此处,如上述图 4A 所述,为了由 SCID555 隔离白细胞,输血导管 410 中的部分血

液经由 SCID 流入导管 480 被转向进入 SCID555。从 SCID555 流出的血液进入 SCID 流出导管 430,并在接合处 422 与氧化的血液混合。在源自 SCID 的血液与输血导管 410 中的血液混合后,血液在由动脉插管 495 返回受治疗者之前,继续在输血导管 410 中流向动脉过滤器 / 气泡捕捉器 490。

[0093] 图 4E 中的循环和图 4D 中的循环拥有相似的流动方式,所具有的附加特征为,柠檬酸盐加料装置 435 和柠檬酸盐泵 436 将柠檬酸盐添加到 SCID 流入导管 480 的血液中,并且由钙加料装置 445 和钙泵 446 将钙添加到 SCID 流出导管 430 的血液中。如图 4B 所述,从柠檬酸盐加料装置 435 将柠檬酸盐或其他任何的白细胞抑制剂添加到血液中,来抑制和 / 或灭活与炎症相关的细胞,如白细胞。钙可以添加入血液,来制备重新进入受治疗者的血液。

[0094] 除了将输血导管 410 中的部分血液转向到 SCID 流入导管 480 的接合处,和通过 SCID 流出导管 430 将 SCID 处理后的血液返回输血导管 410 的接合处,在循环中被定位在了动脉过滤器 / 气泡捕捉器 490 之后之外,图 4F 中所示的循环与图 4E 中所示的循环拥有相似的流动方式。这两处接合处分别标记为 492 和 494。图 4F 还描述了其它的子系统和特征,例如热交换器、附加泵、气表 (gas meter) 和交换机,以及显示器,这些可以在上述的任何实施方式中使用。此外,图 4A-4F 所述的任何实施方式中的 SCID 都可以配置有与本文所描述的任何实施方式相一致的特征 (例如,装置的诸如 SCID、膜特征、流速的配置)。

[0095] 2. D. 选择细胞分离抑制装置的附加特性

[0096] 在一些实施方式中,本发明的装置配置用于处理和 / 或预防某种病症。然而,可以理解,大量的不同的配置可以用于处理和 / 预防特定的病症。

[0097] 此外,任何实施方式的 SCID 可以被水平或垂直地定向放置于温控环境中。在 SCID 运转过程中,含有细胞的 SCID 的温度优选为保持在大约 37°C 至大约 38°C,以确保 SCID 中细胞的最佳功能。例如,可以用加温的毯子来保持 SCID 处于适当的温度,但不限于此。如果系统中使用了其它的装置,最适操作可能需要不同的温度。

[0098] 在一些实施方式中,本发明的装置和系统由处理器控制 (例如电脑软件)。在这样的实施方式中,该装置可配置用于检测受治疗者体内活化的白细胞水平的改变,并将这些信息提供给处理器 (例如,关于白细胞水平和 / 或增加的发展成为炎性病症风险的信息)。在一些实施方式中,当达到某一活化的白细胞水平,或受治疗者被认为有一定程度上发展为炎性病症的风险 (例如 SIRS) 时,为了减少发展为炎性病症的可能性,受治疗者的血液要经过 SCID 的处理。在一些实施方式中,响应于这些测量数据,该装置或系统自动通过 SCID 处理受治疗者的血液。在另一些实施方式中,有卫生专业人士警觉到受治疗者体内白细胞水平升高或危险增加,并且由专业人士启动治疗。

[0099] 设想,本发明的装置可以包含于不同的成套工具或系统中。例如,成套工具或系统可能包含本发明的装置或装置的不同部分,例如,中空纤维血液过滤器筒、白细胞抑制剂 (例如钙螯合剂,如柠檬酸盐)、allographic 细胞 (如肾小管细胞) 或其他部分。此外,成套工具或系统可以与在受治疗者体内植入过滤装置所需要的不同的手术器械相联合。

[0100] 3. 与炎症相关的细胞的隔离

[0101] 虽然本发明的系统和装置应该被配置用于从受治疗者隔离白细胞和改善 (例如抑制) 它们的炎性活性 (如炎症反应),但本发明的系统、装置和方法不仅限于用于隔离白细胞和促进抑制从白细胞释放促炎性物质,和 / 或灭活白细胞的特定设计和技术。白细胞

(例如活化的和 / 或致敏的白细胞) 的隔离可以由任何系统、装置或其组件完成。术语“样品”和“样本”使用他们最广义的词义。另一方面, 它们意味着包括样品或培养液。另一方面, 它们意味着包括生物和环境样品。这些术语包括从人类和其它动物获得的所有类型的样品, 包含但不限于, 体液如尿液、血液、血清、血浆、粪便、脑脊髓液 (CSF)、精液和唾液以及固体组织。然而, 这些例子不能解释为用来限制可应用于本发明的样品类型。本发明说明书内容的术语“样品”多指为源自受治疗者的血液。术语“血液”涉及血液的任何方面, 例如全血、处理后的血液、滤过的血液或任何从血液得到的液体。

[0102] 在本发明的系统或装置中, 一个或多个的用于生物样品流动的通道, 或者一个或多个其区域可以被配置为用于隔离白细胞的多种方法中的任何一种。如果使用了一个以上的通道, 则它们可以被定位为串联和 / 或并联。在一些实施方式中, 筒内, 例如可丢弃的筒内, 可以包含一个或多个通道。通道或通道区域可以由任何数目的表面来限定, 例如 1、2、3、4、5、10、20、50、100, 或者更多的表面。表面的例子包括但不限于, 装置的壁, 例如圆柱装置壁和平面装置壁, 和 / 或本文所述的中空纤维的外表面。

[0103] 定义了通道或通道区域的表面可以从隔离白细胞的多种形式中选择。例如, 平的表面 (如板)、弯曲的表面 (如中空管或纤维)、图形化的表面 (如 z 字形板或凹面)、不规则形状的表面, 或其它可用于通道 (或其区域) 的配置。任何这些表面可以包含孔, 并且可以是多孔、选择性多孔或半多孔的。例如, 表面可以是膜。术语“膜”指的是在两面都能接收液体的表面, 或者一面接收液体而另一面接收气体的表面。典型的膜都是多孔的 (例如选择性多孔或半多孔), 以至于它能让液体或气体流动通过。可以理解, 此处使用的术语“多孔的”描述了表面或膜, 这种表面或膜通常包含了多孔、选择性多孔和 / 或半多孔的表面或膜。此外, 通道或通道区域 (这些区域可能定义或没有定义该通道) 中的附加的表面, 可以促进白细胞的隔离, 例如微粒 (如小球) 表面, 伸入通道中的一个或多个突出物 (projection) 的表面, 或暴露于流动的生物样品的一个或多个膜的表面。这些附加的表面也可以在平的表面、弯曲表面、图形化表面、不规则形状表面, 和其他上述配置以及下述材料之中选择, 并且, 这些附加的表面可具有下述增强作用。

[0104] 通道表面或通道区域表面 (例如中空纤维外表面) 定义了通道或通道区域和 / 或是通道或通道区域的一部分, 该通道或通道区域配置用于隔离白细胞, 这些通道表面或通道区域表面不限制于特定的类型、种类或大小, 并且这些表面可以由任何合适的材料制成。例如, 表面可以是任何的生物相容的聚合物, 包括尼龙、聚乙烯、聚氨基甲酸酯、聚对苯二甲酸乙酯 (PET)、聚四氟乙烯 (PTFE)、聚芳基醚砜、CUPROPHAN (铜纺) (一种用铜铵法再生的纤维, 从 Enka 获得)、HEMOPHAN (一种经改良的生物相容性修饰的铜纺, 从 Enka 获得)、CUPRAMMONIUM RAYON (铜氨人造丝) (多种铜纺, 从 Asahi 获得)、BIOMEMBRANE (生物膜) (从 Asahi 获得的铜氨人造丝)、皂化的醋酸纤维素 (例如从 Teijin 或 CD 医药获得的纤维)、醋酸纤维素 (例如从 Toyobo Nipro 获得的纤维)、纤维素 (例如用修饰铜铵法或用粘胶法再生的纤维素, 分别从 Terumo 或 Textikombinat (Pirna, GDR) 获得)、聚丙烯腈 (PAN)、聚砜、丙烯酸酯共聚物 (如丙烯腈钠甲基丙烯磺酸钠共聚物, 从 Hospal 获得)、聚碳酸酯共聚物 (如从 Gambro 获得的纤维 GAMBRONE)、聚甲基丙烯酸甲酯共聚物 (如从 Toray 获得的纤维), 和乙烯乙烯基共聚物 (ethylene vinylcopolymer) (如 EVAL, 从 Kuraray 获得的乙烯-乙醇共聚物)。可替代地, 表面可能是尼龙网、棉网、或无纺布纤维 (woven fiber)。这些表面

可以等厚度或不规则厚度。在一些实施方式中,表面可以包含硅,例如,硅喷涂蒸汽膜(见,例如编号为 20040124147 的美国专利申请)。在一些实施方式中,表面可以包含聚砜纤维。现有技术中介绍了其它合适的生物相容性纤维,例如,在 Salem 和 Mujais (1993) 的透析的辅助器具 (Dialysis Therapy) 第二版, Ch. 5 中:透析仪 (Dialyzers), Eds. Nissensen 和 Fine, Hanley & Belfus, Inc., Philadelphia, PA. 包含中空纤维的药筒不限制于特定的尺寸(例如,长度、宽度、重量或其它尺寸)。

[0105] 通道可以包括任何表面的组合。例如,通道或通道区域的表面可以包括任何平的、弯曲的、图形化的和 / 或不规则形状局部面的组合。此外,通道或通道区域可以由一种以上材料的表面限定,或者包含一种以上材料的表面。更进一步,通道可以包括两个或更多的区域。这些不同的区域可以拥有相同的或相异的表面。

[0106] 如上所述,一个成功使用 SCID 的实施方式包括了含有中空纤维的外壳。血液的通道由外壳的内部和中空纤维的外部所限定。血液中的白细胞和通道内特定的区域相接合,具体来说,是和中空纤维的外表面相接合。因此,在特定实施方式中,配置用于隔离白细胞的通道区域可包括多孔膜,该多孔膜能够允许较小分子通过,但迫使较大分子和 / 或细胞沿着该膜流动。此外,在特定实施方式中,配置用于隔离白细胞的通道区域由外壳的表面界定,并且由中空纤维的外表面界定,或包括中空纤维的外表面,而这些表面被配置成使得生物样品(例如受治疗者的血液或滤过的血液)流过这些表面(即流过中空纤维)。见,例如,图 1。这些中空纤维可以是多孔、半多孔或非多孔的,并且不同的流体(如超滤液)可能可选地流过或出现在中空纤维内。这些纤维可以由本文所述的任何适宜的材料制成。

[0107] 在一些实施方式中,本发明的系统、装置和方法配置用于在任何所需的时间内隔离白细胞,例如,从 1 秒到 59 秒,从 1 分钟到 59 分钟,从 1 小时到 24 小时,从 1 天到 7 天,一周或一周以上,一个月或一个月以上,一年或一年以上。在一些实施方式中,该装置配置用于在充足的时间内隔离白细胞,以允许后继抑制从白细胞释放促炎性物质和 / 或灭活白细胞。

[0108] 可以促进隔离白细胞的任何技术或技术的组合都可以使用,包括如生物的、化学的、机械的和 / 或物理的技术。在一些实施方式中,使用了生物的或化学的技术来隔离白细胞。这样的技术包括利用组织、细胞、活质分子(例如蛋白质或核酸),或小分子来隔离白细胞。当白细胞处于活化状态时,白细胞能产生选择蛋白(selectin)。这种改变的选择蛋白的产生可以促进白细胞与其他白细胞的结合。反过来讲,白细胞之间的结合也可以促进其他已结合的白细胞产生选择蛋白,产生白细胞指数的结合。因此,选择蛋白在增强隔离方面是有用的。已知的与白细胞结合相关的蛋白质、蛋白质复合物和 / 或蛋白质组分包括:CD11a、CD11b、CD11c、CD18、CD29、CD34、CD44、CD49d、CD54、podocalyxin、endomucin、粘多糖细胞粘附分子-1 (GlyCAM-1)、粘膜细胞粘附分子-1 (MAdCAM-1)、E-选择蛋白, L-选择蛋白、P-选择蛋白、表皮淋巴细胞抗原 (CLA)、P-选择蛋白糖蛋白配基 1 (PSGL-1)、白细胞功能抗原-1 (LFA-1 的)、MAc-1, 白细胞表面抗原 p150、95, 白细胞整合素 CR4、很晚期抗原-4 (very late antigen) (VLA-4 的)、集合淋巴小结粘附分子-1 (LPAM-1)、细胞间粘附分子-1 (ICAM-1)、细胞粘附分子-2 (ICAM-2)、细胞粘附分子-3 (ICMA-3)、灭活的 C3b (C3bi)、纤维蛋白素原、纤维结合蛋白、外周淋巴结地址素 (PNAd), 血管内皮细胞粘附蛋白 1 (VAP-1)、fract 快、CCL19、CCL21、CCL25 和 CCL27。已知的与白细胞结合的其他大分子

包括,透明质酸,氨基葡聚糖(GAGs)和岩藻糖化寡糖及其前体。在某些实施方式中,用于分离白细胞的小分子或粘附分子,可以包括但不限于,肽,如氨基酸组成序列为精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)的肽,和包含唾液酸的分子。因此,任何这些材料都可以用来提高隔离效果。

[0109] 在使用中,任何这些生物或化学材料都可以结合到本发明的系统或装置的表面(例如在SCID的通道内),用于促进或增强隔离。二选一或是联合的,任何这些材料都可以处于本发明的系统或装置的溶液中。在这种情况下,这些材料可以和附加技术联合来隔离白细胞。例如,这些材料可以在溶液中与白细胞结合,使它们凝聚,以相对于单个白细胞的尺寸来说增加总体尺寸。这些凝聚的白细胞接着可以被特定孔径的膜捕捉。

[0110] 在一些实施方式中,本发明的系统或装置在机械力的控制下完成对白细胞的贮留。例如,白细胞可以在通道或通道区域(例如多孔中空纤维的外部)的表面(或在其中)被隔离,这种隔离是利用流速和用于最小化表面与白细胞之间剪切力的装置配置来完成的,从而允许白细胞与表面结合。流动的白细胞和隔离表面之间的有用剪切力包括小于1000达因/厘米<sup>2</sup>、或者小于500达因/厘米<sup>2</sup>、或者小于100达因/厘米<sup>2</sup>、或者小于10达因/厘米<sup>2</sup>、或者小于5达因/厘米<sup>2</sup>的剪切力。血液经过根据本发明中系统和装置的有助于实现这些剪切力的示例性流速包括,例如小于约500毫升/分,从约100毫升/分到约500毫升/分,和从约200毫升/分到约500毫升/分。

[0111] 在一些实施方式中,例如,装置可以用物理方法将白细胞保留在一个或多个通道表面或它们的区域上,通过利用如膜或过滤器的表面或通过暴露白细胞到增加的通道表面积,例如,表面积大于约0.2m<sup>2</sup>、或从约0.2m<sup>2</sup>到约2.0m<sup>2</sup>、或从约0.5m<sup>2</sup>到约1.0m<sup>2</sup>、或约0.7m<sup>2</sup>,以增加隔离的白细胞总数和/或增加白细胞在装置中被隔离的时间。

[0112] 在一些实施方式中,该系统可以通过使白细胞受到一系列装置的影响来完成隔离,例如,2、4、10、20或更多的药筒(例如中空纤维药筒),每个包含一个或多个隔离通道或通道区域,以此增加了配置用于隔离白细胞的区域的长度,和白细胞在此处的保留时间。在任何一个上述的实施方式中,该装置被配置用于在隔离之前、之中、或之后,以允许抑制从白细胞释放促炎性物质和/或灭活白细胞的方式完成白细胞隔离。抑制从白细胞释放促炎性物质和/或灭活白细胞,可以在隔离过程和经过本发明的通道、通道区域或整个系统的转运过程中完成。

[0113] 应该理解,此处叙述的隔离技术也可以应用于血小板。对于血小板,前述的相似的生物、化学、机械和/或物理的技术可以用于隔离血小板。在某些实施方式中,用于隔离血小板的试剂包括糖蛋白Ib $\alpha$ (GPIb $\alpha$ )、糖蛋白IIb(GPIIb)、糖蛋白IIIa(GPIIIa)、CD41、CD61、血管假性血友病因子、 $\beta_2$ -整合巨噬细胞抗原-1、诸如P-选择蛋白的选择蛋白、以及细胞粘附分子中的一种或几种。

[0114] 4. 与炎症相关的细胞的抑制和/或灭活

[0115] 本发明的系统和装置被配置用于,以及本发明的方法被设计用于,抑制从白细胞释放促炎性物质和/或灭活白细胞,如受治疗者血液中致敏的或活化的白细胞,以使受治疗者的炎症反应得到预防或减轻。可以使用多种技术。例如在一些实施方式中,系统和装置可以通过将白细胞(例如隔离的活化的和/或致敏的白细胞)暴露在白细胞抑制剂下,来抑制从白细胞释放促炎性物质和/或灭活白细胞。白细胞抑制剂可以共价地或非共

价地结合到通道表面,如中空纤维。此外或可代替地,白细胞抑制剂可以在隔离白细胞之前、之中或之后被灌注入装置或系统中,例如在膜表面或其附近。如所提及的,概念性的 (proof-of-concept) 用柠檬酸盐处理白细胞的 SCID,致使受治疗者的存活率增加。

[0116] 本发明并不限于使用特定类型或种类的白细胞抑制剂。白细胞抑制剂包括,例如消炎生物制剂、消炎小分子、消炎药物、消炎细胞和消炎膜。在一些实施方式中,白细胞抑制剂是任何能够抑制活化的白细胞活性的材料或复合物,包括但不限于,非甾体抗炎药 (NSAID)、抗细胞因子、甲磺酸伊马替尼、sorafenib、舒尼替苹果酸 (sunitinib malate)、反趋化因子、免疫抑制剂、丝氨酸白细胞抑制剂、氧化氮、中性粒细胞抑制因子、分泌性白细胞抑制因子和钙螯合剂。钙螯合剂的例子包括,但不限于,柠檬酸、偏聚磷酸钠、乙二胺四乙酸 (EDTA)、三乙烯四胺、二亚乙基三胺、*o*-菲罗琳、草酸等。白细胞抑制剂可以是任何已知的用于抑制白细胞或免疫细胞的蛋白质或肽,包括但不限于,血管生成因子、MARCKS、MANS、补体因子 D、含有血管生成因子片段 LHGGSPWPPC<sup>92</sup>QYRGLTSPC<sup>39</sup>K (SEQ ID NO :1) 的二硫化合物 C39-C92,和相同的同源合成物;该试剂还可以是这些蛋白质、肽,和据报道的同源物质 (Tschesche 等人 . (1994) J. Biol. Chem. 269 (48) :30274-80, Horl 等人 . (1990) PNAS USA 87 :6353-57, Takashi 等人 . (2006) Am. J. Respirat. Cell and Molec. Biol. 34 : 647-652,和 Balke 等人 . (1995) FEBS Letters 371 :300-302) 这些物质可能促进抑制从白细胞释放促炎性物质和 / 或灭活白细胞。此外,白细胞抑制剂可以是抑制从白细胞释放促炎性物质和 / 或灭活白细胞的已知的核酸。白细胞抑制剂可以是溶液或低压冻干的。

[0117] 任何剂量或浓度的白细胞抑制剂可以用于抑制从白细胞释放促炎性物质和 / 或灭活白细胞。白细胞抑制剂可以用已知现有技术的任何方法引入通道、通道区域、装置、装置区域或系统的系统区域。例如,白细胞抑制剂可以从孔中被灌注。被灌注入通道的白细胞抑制剂的剂量,可以足以在同一个通道或邻近的通道中,抑制从被隔离的白细胞释放促炎性物质和 / 或灭活被隔离的白细胞。在一些实施方式中,白细胞抑制剂,例如柠檬酸盐,可以被灌注入系统、系统的区域、或系统内的一个或多个装置,包括实施其它功能而非用于隔离白细胞的装置。更具体地说,白细胞抑制剂 (如柠檬酸盐) 可以被灌注入隔离白细胞的通道的上游、中部或下游。可代替地,白细胞抑制剂可以被包含于一个或多个通道、通道区域、装置或系统内的系统区域中。例如,白细胞抑制剂可以以足以抑制从白细胞释放促炎性物质和 / 或灭活白细胞的剂量,结合到配置用于隔离白细胞的通道或其它通道的表面上。

[0118] 抑制从白细胞释放促炎性物质和 / 或灭活白细胞,可以在隔离白细胞之前、之中和 / 或之后暂时出现。此外,白细胞可以在隔离之后的一段时期内保持抑制或灭活状态。在某些实施方式中,白细胞可以被抑制或灭活一段时间,在这段时间中,白细胞暴露于靶浓度的白细胞抑制剂或暴露于由于暴露于白细胞抑制剂,如柠檬酸盐来形成的靶浓度的  $Ca_i$  (典型的是从约 0.20mmol/L 到约 0.40mmol/L)。白细胞暴露于靶浓度的白细胞抑制剂或靶浓度的  $Ca_i$  的时间可以在白细胞被隔离之前、之中和 / 或之后。在某些实施方式中,白细胞在暴露于白细胞抑制剂之后的一段时间内,可以持续成为或保持抑制或灭活的状态。

[0119] 暴露于白细胞抑制剂的时间可以依据所用试剂、白细胞活性程度、产生的促炎性物质的程度和 / 或炎性病症损害患者健康的程度而改变。暴露时间可以是,例如,从 1 秒到 59 秒,从 1 分钟到 59 分钟,从 1 小时到 24 小时,从 1 天到 7 天,一周或一周以上,一个月或

一个月以上,或一年或一年以上。白细胞抑制剂可以在运作系统之前或之中应用于系统。在某些实施方式中,白细胞抑制剂可以在系统运作过程中应用,并且应用于系统的白细胞抑制剂的剂量是可以受监控的。

[0120] 在一些实施方式中,白细胞抑制剂可以被滴加进入系统中(例如在图 2A-2D 和图 3 所示的孔 206,或在图 4B、4C、4E 和 4F 所示的加料装置 435 和泵 436 处)。可以相对于监控的血液特征来调节滴定。例如,可以将柠檬酸盐滴加进入系统,以使血液中的  $Ca_i$  维持在一定水平,例如维持在  $Ca_i$  浓度为约 0.2 到约 0.4mmol/L。任何生物上适合的柠檬酸盐类型都可以使用,例如 0.67% 柠檬酸钠或 0.5% 柠檬酸钠。参见,例如, Tolwani 等人, (2006) Clin. J. Am. Soc. Nephrol. 1 :79-87。在一些实施方式中,在抑制从白细胞释放促炎性物质和/或灭活白细胞之后,第二种溶液可以被添加到系统中(例如,在图 2A-2D 和图 3 所示的孔 258,或在图 4B、4C、4E 和 4F 所示的加料装置 445 和泵 446 处),用于重新调整要重新进入受治疗者的血液。例如,在钙离子螯合剂作为白细胞抑制剂的实施方式中,在血液重新返回进入受治疗者之前,可以将钙重新添加回血液中。

[0121] 在一个实施方式中,一个 1000mL 含有柠檬酸盐溶液的包,例如 ACD-A (Baxter Fenwal, Chicago IL; 每 100mL 成分:葡萄糖 2.45g, 柠檬酸钠 2.2g, 柠檬酸 730mg, pH4.5-5.5, 25°C), 可以被附加在本系统的灌注泵和接着附加在动脉导管上(从受治疗者流出流向装置)(例如,在孔 206;从处于 CPB 情况下的受治疗者流出的导管称作静脉导管,并且灌注发生在如加料装置 435 和泵 436 处)。负压阀可以用于改善柠檬酸盐泵功能(灌注进入邻近血液泵的负压区域)。柠檬酸盐灌注的初始速度可以是不变的,例如约 1.5 倍于血液流速单位,单位为 mL/h, 而血液流速单位为 mL/min (例如如果血液流速是大约 200mL/min, 那么柠檬酸盐灌注的初始恒定速率可以是约 300mL/h)。此外,在浓度约为 20mg/mL 灌注的氯化钙可以在系统中静脉孔附近添加(例如孔 258;CPB 情况下类似如图 4B、4C、4E 和 4F 所示的加料装置 445 和泵 446 处的位置)。初始钙灌注速率可以设定为柠檬酸盐灌注速率的 10% (如 30mL/h)。  $Ca_i$  可以连续地或在任意时刻受到监控,例如,前 8 小时每 2 小时一次,然后在接下来的 16 小时里每 4 小时一次,然后再此后的时间每 6 至 8 小时一次。可以根据需要增加监控次数,和在系统中设置一个以上的监控点,例如在柠檬酸盐灌注后和钙灌注之后。

[0122] 示例性的柠檬酸盐和氯化钙滴定试验设计分别如表 1 和表 2 所示。在这个实施方式中, SCID 中的目标  $Ca_i$  的范围从约 0.20mmol/L 到约 0.40mmol/L, 通过柠檬酸盐灌注(例如 ACD-A 柠檬酸盐溶液)来达到  $Ca_i$  靶浓度。在这个动态过程中,柠檬酸盐灌注速率可能需要改变,以使 SCID 中达到目标  $Ca_i$  范围。这样做的试验设计如下,并在上述灌注点进行灌注。

[0123] 表 1

[0124] 柠檬酸盐灌注滴加指导方针

[0125]

循环中的离子 $\text{Ca}^{2+}$ (在 SCID 和患者之间)	用 ACD-A 柠檬酸盐溶液调整灌注 (如上所述)
若循环中的离子 $\text{Ca}^{2+}$ 小于 0.20 mmol/L	则以 5mL/h 的速率减小柠檬酸盐灌注
若循环中的离子 $\text{Ca}^{2+}$ 在 0.20 到 0.40mmol/L 之间 (最佳范围)	则不改变柠檬酸盐的灌注速率
若循环中的离子 $\text{Ca}^{2+}$ 在 0.41 到 0.50mmol/L 之间	则以 5mL/h 来增加柠檬酸盐灌注的速率
若循环中的离子 $\text{Ca}^{2+}$ 大于 0.50 mmol/L	则以 10mL/h 来增加柠檬酸盐灌注的速率

[0126] 表 2

[0127] 钙灌注滴加指导方针

[0128]

患者的离子 $\text{Ca}^{2+}$ (患者的全身)	$\text{Ca}^{2+}$ 灌注 (20mg/mL $\text{CaCl}_2$ ) 调整
若患者的离子 $\text{Ca}^{2+}$ 大于 1.45 mmol/L	则以 10mL/h 来减小 $\text{CaCl}_2$ 灌注的速率
若患者的离子 $\text{Ca}^{2+}$ 为 1.45mmol/L (最大允许量)	则以 5mL/h 来减小 $\text{CaCl}_2$ 灌注的速率
若患者的离子 $\text{Ca}^{2+}$ 为 0.9mmol/L (最小允许量)	则以 5mL/h 来增加 $\text{CaCl}_2$ 灌注的速率
若患者的离子 $\text{Ca}^{2+}$ 小于 0.9mmol/L	则给以 10mg/kg $\text{CaCl}_2$ 丸剂, 并以 10mL/h 来增加 $\text{CaCl}_2$ 灌注的速率
默认范围 (优选靶浓度)	1.0-1.2mmol/L

[0129] 应该理解, 此处叙述的灭活技术也可以应用于血小板。在某些实施方式中, 用于灭活血小板和 / 或抑制从血小板释放促炎性物质的试剂, 包括但不限于, 抑制凝血酶的试剂、抗凝血酶 III、meglatran、herudin、蛋白 C 和组织因子途径抑制物 (Tissue Factor Pathwayinhibitor)。此外, 一些白细胞抑制剂可以作为血小板抑制剂, 例如, 钙螯合剂, 如柠檬酸、偏聚磷酸钠、乙二胺四乙酸 (EDTA)、三乙烯四胺、二亚乙基三胺、o- 菲罗啉和草酸都可以灭活血小板和 / 或抑制从血小板释放促炎性物质。

## [0130] 5. 适应症

[0131] 本发明的系统、装置和方法可以用于治疗和 / 或预防与炎症相关的大量病症。在此处使用的术语“炎症病症”，包括在机体的免疫细胞被活化之处的任何炎症性疾病、任何炎症性紊乱和 / 或任何白细胞活化紊乱。这样的病症可以表征为：(i) 伴随病理学后遗症的持续炎症反应，和 / 或 (ii) 导致组织破坏的白细胞渗透，例如单核细胞和中性白细胞。炎症病症包括受治疗者出现的原发性炎症性疾病，和 / 或医疗过程应答出现的续发炎症性紊乱。本发明的系统、装置和方法可以治疗任何受治疗者的任何炎症病症。在此处使用的术语“受治疗者”指的是任何动物（如哺乳动物），包含但不仅限于，人类（如患者）、非人类的灵长类、啮齿动物等等，这些动物是具体诊断性试验或疗法的接受者。

[0132] 白细胞如中性白细胞，是许多临床炎症病症发病和发展的主要贡献者，这些炎症病症包括全身炎症反应综合征（SIRS）、败血症、局部缺血 / 再灌注损伤和急性呼吸窘迫综合征（ARDS）。存在几种不同的和不同类型的白细胞；然而，它们都产生于和源于骨髓中被称为造血干细胞的多潜能细胞（pluripotent cell）。

[0133] 白细胞也被称为白血细胞，能在身体的各处包括血液和淋巴系统中被发现。白细胞有若干不同种类，包括粒性白细胞和无粒白细胞。粒性白细胞是具有，在光显微镜下观察时其细胞质中出现不同染色颗粒特征的白细胞。这些颗粒含有膜结合酶，此酶主要在消化细胞内吞粒子时作用。有三种类型的粒性白细胞：中性白细胞、嗜碱粒细胞和嗜酸粒细胞，这些是根据它们的染色性质命名的。无粒白细胞是在其细胞质中没有颗粒的特征的白细胞，且包括淋巴细胞、单核细胞和巨噬细胞。

[0134] 血小板，或凝血细胞，也有利于炎症病症以及体内平衡。血小板在活化后聚集形成血小板栓，并且，它们分泌细胞因子和化学增活素，以吸引和活化白细胞。血小板在身体循环的各处被发现，并且源于巨核细胞。

[0135] 主要负责引起白细胞和血小板粘附到内皮的分子分别为 P- 选择蛋白和血管假性血友病因子。这些分子在上皮细胞的相同颗粒中被发现，这些颗粒被称为怀布尔 - 帕拉德体（Weibel-Paladebody）。当内皮细胞活化时，怀布尔 - 帕拉德体移动到细胞膜，在上皮细胞表面暴露出 P- 选择蛋白和可溶解的血管假性血友病因子。这反过来又诱发了级联的白细胞和血小板活化和聚集。

[0136] 因此，本发明的系统、装置和方法可以治疗和 / 或预防任何炎症病症，包括受治疗者出现的原发性炎症性疾病，和 / 或医疗过程（如，透析或心肺分流术）应答出现的续发炎症性紊乱。适用的炎症病症实例包括炎症性疾病和 / 或紊乱，包括但不限于全身炎症反应综合征（SIRS）、心肺分流术综合症、急性呼吸窘迫综合征（ARDS）、败血症、全身性红斑狼疮、炎症肠病、胰腺炎、肾炎、多发性硬化症、牛皮癣、同种异体移植物排斥、哮喘、慢性肾功能衰竭、心肾综合症、肝肾综合症，和心肌、中枢神经系统、肝、肺、肾或胰腺的局部缺血再灌注损伤引起的急性器官衰竭。

[0137] 另外的炎症病症实例包括但不限于，移植（如器官移植、急性移植、异种器官移植）或异种移植或同种移植（如用于烧伤治疗）排斥反应；局部缺血或再灌注损伤，如在采集（harvest）或器官移植、心肌梗死或中风期间遭受的局部缺血或再灌注损伤；移植耐受诱导；关节炎（如类风湿关节炎、银屑病关节炎或骨关节炎）；呼吸道和肺部疾病，包括但不限于，慢性阻塞性肺疾病（COPD）、肺气肿和支气管炎；溃疡性结肠炎和克罗恩病

(Crohn' s disease); 移植物与宿主病; T 细胞介导的过敏性疾病, 包括接触性超敏反应、迟发型超敏反应和谷蛋白敏感性肠病 (乳糜泻 (Celiac disease)); 接触性皮炎 (包括由于常春藤毒素 (poison ivy) 引起的); 淋巴瘤性甲状腺肿; 干燥综合征; 自身免疫性甲状腺功能亢进, 如格雷夫斯病; 阿狄森氏疾病 (肾上腺自身免疫性疾病); 自身免疫性多腺体病 (也称为自身免疫性多腺体综合征); 自身免疫性秃顶; 恶性贫血; 白癜风; 自身免疫性脑下垂体机能减退; 传染性神经元炎; 其他自体免疫性疾病; 肾小球肾炎; 血清病; 荨麻疹 (urticaria); 诸如呼吸道变态反应 (花粉症、过敏性鼻炎) 或皮肤变态反应的变应性疾病; 硬皮病; 蕈样肉芽病; 急性炎症和呼吸道反应 (如急性呼吸窘迫综合征和局部缺血 / 再灌注损伤); 皮炎; 结发性脱发症 (alopecia areata); 慢性光化性皮炎; 湿疹; 贝切特病; 掌跖脓疱病 (Pustulosis palmoplantis); 坏疽性脓皮病 (Pyoderma gangrenosum); 塞杂瑞综合征 (Sézary' s syndrome); 特应性皮炎; 全身性硬化症; 局限性硬皮病; 创伤, 如枪、刀、交通事故、跌倒、或战斗创伤; 和细胞疗法, 如自体的、异源的或异种细胞替换。另外的炎症病症, 在本文其他地方或其他已知的现有技术中叙述。

[0138] 本发明的系统、装置和方法也可以用于在体外支持发育和使用组织和器官。例如, 本发明可用于支持为了移植的活体摘除器官程序, 组织工程的应用, 在体外进行器官培育和制造和应用生物微机电系统 (bio-microelectromechanical system) (MEMS)。

[0139] 鉴于以上所述, 下文的具体的非限制实施例用于说明本发明的目的, 而不是为了以任何方式限制本发明范围。

## 实施例

[0140] 实施例 1. 在动物模型中与急性败血症和急性肾功能衰竭相关的炎症疗法

[0141] 这个实施例描述了一系列用于评价本发明的一种治疗关于急性败血症和急性肾功能衰竭的炎症的实施方式的实验。

[0142] (I) 背景和原理

[0143] 白细胞, 尤其是中性白细胞, 是许多临床炎症病症发病和发展的主要贡献者, 这些炎症病症包括 SIRS、败血症、局部缺血 / 再灌注损伤和急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)。正在研究大量的治疗方法, 以限制白细胞在炎症部位活化和组织积累, 以减少组织破坏和疾病的进展。在美国, 每年伴随 SIRS 出现的严重败血症受治疗者达 200,000 人, 即使在重症监护室和使用广谱抗生素的情况下, 其死亡率也达 30-40%。

[0144] 本研究的出发点源于正在进行的鼓舞人心的利用肾小管祖细胞在体外装置中治疗急性肾功能衰竭 (ARF) 的临床前的和临床研究。ARF 源于一系列最后导致多器官衰竭和坏死的病状中由肾毒的和 / 或局部缺血肾小管细胞损伤继发的急性肾小管坏死 (ATN)。需要换肾治疗的 ATN 受治疗者的死亡率达 50% 到 70%。尽管对疾病的病理生理学有了更好的理解, 和对血液透析和血液过滤疗法有了更好改进, 如此高的死亡率仍然持续了近十几年。

[0145] 应用肾小管祖细胞作为这些病症的治疗物, 是基于肾小管细胞在败血症休克中起到了重要的免疫调节作用的论断。具体来说, 在败血症休克的猪模型中已经证明, 严重的败血症休克在菌血症几小时内就能导致急性肾小管坏死 (ATN) 和 ARF。由于观察急性损伤后血液尿素氮和血清肌酐的上升需要几天的时间, 因此, 在早期败血症休克病程中的 ARF 发展了一个临床上不容易被鉴别的期限。在 ARF 和 ATN 中肾免疫调节功能的丧失, 其结果

倾向于发展成为 SIRS、败血症、多器官衰竭和死亡的高风险。最近的一份报告表明,在心脏直视手术的术后过程发生 ARF 的患者中,败血症病状从 3.3% 上升到近 60%。

[0146] ARF 或 ATN 病症,可能特别适合与连续血液滤过技术相结合的治疗,因为尽管在体外合成材料及体外循环都很先进的情况下,单独的急性血液透析或血液过滤,尚不能够将 ATN 死亡率减少到百分之五十以下。ATN 的发展主要是由于肾脏肾小管上皮细胞 (renal proximal tubule cell) 的损伤和坏死。在败血症休克并发的 ATN 发作期间,早期对这些细胞功能的替换,可以提供与血液过滤联合的几乎全部的肾脏代替疗法。代谢活动如产氨作用 (ammoniogenesis) 和谷胱甘肽的再生 (reclamation), 内分泌活动如维生素 D3 的激活,与细胞因子稳态 (cytokine homeostasis) 的额外增加,可提供额外的生理替代活动,以改变当前疾病进展的自然状态。

[0147] 一个用来测试在所述情况下的肾小管祖细胞效应的系统,由一个串联在肾辅助装置 (RAD) 之后的过滤装置构成 (传统的高通量血液滤器),通常如序列号为 6,561,997 的美国专利所述。在那些早期实验中,RAD 指的是使用了标准的血液过滤筒的体外系统,这个血液过滤筒含有沿着纤维内表面生长的人类肾脏上皮细胞。这种排列使滤液能够进入中空纤维网络的内部间隔,与肾小管细胞呈线性 (lined with renal tubule cells),调整运输和代谢功能。血液从受治疗者泵出进入第一血液滤器的纤维,超滤液 (UF) 在此形成,并分配进入血液滤器下游 RAD 内的中空纤维空腔。从 RAD 流出的经处理的 UF 被收集并作为“尿”排除。从初始血液滤器流出的滤过的血液通过毛细管外空间 (ECS) 孔流入 RAD,分散在装置的纤维中。在流出 RAD 后,处理过的血液经过第三泵返回受治疗者体内。此体外血液循环的基础是,其血液泵系统和血液导管与肾衰竭患者使用的连续或间歇血液透析疗法中的完全相同。

[0148] 在 RAD 内对肾小管祖细胞的体外研究表明,细胞保留了分化的主动转移特性,分化的代谢活动和重要的内分泌过程。其他研究表明,在急性尿毒症犬模型中,当与体外血液灌注循环的血液过滤筒串联整合时,RAD 能代替肾脏的过滤、运输、代谢和内分泌功能。此外,RAD 减轻了急性尿毒症动物的内毒素休克。

[0149] 为了更好地理解肾小管细胞疗法的免疫调节作用,用支气管肺泡灌洗 (BAL) 来评价经受或未经受 RAD 治疗的败血症的组织特异性结果。BLA 样品用于评价 SIRS 引起的肺微血管损伤和炎症。以下详细的原始数据显示,肾细胞疗法与更小的蛋白质从破坏的血管泄露和更小的炎症相关。

[0150] 在这个实验模型系统中,肾细胞疗法对全身的和组织特异性炎症过程的作用,可以由第二系列的评价方法更仔细地评估。同时,在评估 RAD 的临床试验中,登记 (enrollment) 的障碍是需要含有肝磷脂的全身抗凝,以保持体外血液导管和透析筒中的血液灌注。在过去十年中,为了减轻全身肝素化和更好保持连续肾替代疗法 (CRRT) 循环的血液灌注,使用柠檬酸盐作为钙结合剂的局部抗凝成为了标准的治疗方法。

[0151] 因此,将在使用假的无细胞药筒 (sham non-cell cartridge) 和含细胞药筒的临床前动物模型进行对比实验,证实了血液循环中的柠檬酸盐和低  $Ca_i$  水平并不能降低全身肝磷脂处理下观察到的肾小管细胞疗法的效用。详情如下,柠檬酸盐在一个双药筒系统中抗凝,显示了深刻而意想不到的结果。

[0152] (II) 实验 A- 动物模型的初步试验

[0153] 为了初始评价本实验的实施方式,使用了败血症猪模型建立的可再生 SIRS 模型。(见,例如, Humes 等人. (2003) Crit. Care Med. 31 :2421-2428.)

[0154] 方法和材料

[0155] 通过插入合适的导管制备普通猪 (30-35kg) 来评价心血管参数和应用连续静脉血液过滤的治疗 (CVVH)。在猪腹腔以  $30 \times 10^{10}$  细菌 /kg 体重注射大肠杆菌。在细菌灌注后 15 分钟内,动物被置于含有双药筒的 CVVH 循环中,第一药筒是血液滤器,第二药筒是含有多孔中空纤维的肾辅助装置 (RAD)。对本实验而言,RAD 指的是图 3 所示循环中的图 7 概要显示的装置。图 7 中,RAD 包含了多个膜,其为中空纤维 752 (为了清晰只标注了一个)。这些纤维的管腔内的空间被称为毛细管内空间 (“ICS”) 740。围绕中空纤维的空间被称为 RAD 外壳 754 中的毛细管外空间 (“ECS”) 742。含有活化白细胞的血液进入 ECS 入口 748,流入围绕纤维 752 的 ECS 742,并经由 ECS 出口 750 流出 RAD,进入流出物导管。对本实验而言,RAD 的中空纤维 752 是多孔的,并含有 allographic 肾小管细胞,该肾小管细胞在每条纤维的管腔 740 导管上单层培养。对照组是仅不含有肾小管细胞的,其它都和 RAD 相同的假 RAD。

[0156] 如图 3 所示,从动物流出的血液被泵送进入第一血液滤器的纤维,超滤液 (UF) 在此形成并分配进入血液滤器下游 RAD 中空纤维 752 内的 ICS 740。从 RAD 流出的经处理的 UF 被收集并被作为“废弃物”由 UF 泵 304 排除。从初始血液滤器流出的滤过的血液通过毛细管外空间 (ECS) 入口 748 流入 RAD,并分散在装置的纤维 752 中。经由 ECS 出口 750 流出 RAD 后,处理过的血液返回受治疗者体内。血液经由血液泵 204 和 300 和第三血液泵在系统中移动穿过,泵 204 和 300 被放置在血液过滤装置之前和之后,同时第三血液泵 (未在图 3 中显示) 放置在 RAD 和动物之间。柠檬酸盐或肝磷脂从 206 添加到系统中,如果需要,还可以在血液重新进入受治疗者之前从 258 处添加第二种试剂 (用于制备重新进入的血液)。

[0157] 在细菌灌注接下来的第一个小时内,灌注体积组成为 80mL/kg 类晶体和 80mL/kg 胶质的丸剂 (Hepspan),以使动物复苏。在细菌灌注后第 15 分钟,动物注射 100mg/kg 的抗生素头孢三嗪,复制临床表现。没有动物注射血管加压药或正性肌力药。

[0158] 结果和讨论

[0159] 本研究测量了血压、心输出量、心率、肺毛细血管楔压、全身血管阻力和肾血流量。使用该模型,表明 RAD 疗法比对照组保持了更好的心血管性能,如心输出量和肾血流量所测定的。肾血流量的改善是因为与对照组相比,RAD 动物组有较低的肾血管阻力。

[0160] 改善的心血管参数导致了更长的存活时间。对照组动物 (由不含肾小管细胞的假 RAD 处理) 都在 7 小时内死亡,然而,所有 RAD 处理的动物都存活超过了 7 小时。与对照组的  $5 \pm 1$  小时相比,RAD 组存活了  $10 \pm 2$  小时 ( $p < 0.02$ )。与对照组相比,败血症休克的白细胞介素 (IL-6),预后炎性症候,和  $\gamma$ -干扰素 (IFN- $\gamma$ ) 及细胞因子炎性反应启动物质在血浆中的水平 RAD 组更低。

[0161] 原始数据表明猪模型是一种可靠的急性败血症休克模型,也表明了 RAD 疗法改良了与细胞因子外形变化有关的心血管性能,并且导致了显著的存活优势。原始数据还表明,RAD 疗法可以改善败血症休克引起的多器官功能障碍。

[0162] 为了改善本模型的可重复性,在给予细菌灌注类晶体 / 胶体丸剂之后,紧接着容量复苏试验设计 (volume resuscitation protocol) 立即从 100mL/h 增加到 150mL/h。除了

改善本复苏试验设计外,采用支气管肺泡灌洗 (BAL) 评价经由或未经 RAD 疗法的败血症的组织特异结果,以便更好地理解肾小管细胞疗法的免疫调节作用。BLA 样品用于评价 SIRS 引起的肺微血管损伤和炎症。结果表明,肾细胞疗法与减小蛋白质从破坏的血管泄露,和减小 BAL 液体样品炎症,及改进其它 SIRS 的心血管效应相关。

[0163] 上述的容量复苏完善的动物模型 (refined animal model) 被用于一系列的研究,来评价柠檬酸盐局部抗凝的 RAD 治疗效果与全身肝磷脂抗凝是否相似。因此,开始通过对比假-RAD (无细胞) 药筒和 RAD (含细胞) 药筒的临床前动物模型来评价,血液循环中的柠檬酸盐和低  $Ca_i$  水平是否能够负面影响在全身肝磷脂治疗中观察的肾小管细胞疗法的效果。

[0164] 意想不到的是,结果表明,使用无肾细胞的 RAD 柠檬酸盐抗凝 (即用柠檬酸盐处理的 SCID) 在改善源自 SIRS 的肺损伤的效果显著,和在减少这些大型动物模型的源于败血症休克的心血管功能紊乱和死亡时间上几乎一样有效,详述如下。

[0165] (III) 实验 B- 使用或缺失肾上皮细胞系统的大型动物模型对比

[0166] 上文所述的改进的猪败血症休克模型,用于评价用肾辅助装置 (RAD) 或选择细胞抑制装置 (SCID) 的多器官效应。在本实验中, RAD 和 SCID 两者都指的是图 3 循环中图 7 所示的装置,如上所述。然而, RAD 系统在 RAD755 的 ICS740 中含有猪肾上皮细胞,并且用肝磷脂抗凝疗法。SCID 系统在 SCID755 的 ICS740 中不含有细胞,并且使用柠檬酸盐疗法 (不含有肝磷脂)。下述数据源自总共 14 头动物。7 头动物用假控制治疗,所述假控制是指 ICS 内无猪上皮细胞的 RAD 和用肝磷脂抗凝疗法,如图 9-13 中记作“假 / 肝磷脂”。4 头动物用 RAD 处理,其中含有猪肾上皮细胞的 RAD 和全身肝磷脂疗法,在图 9-13 中记作“细胞 RAD”。3 头动物用 SCID 处理,其中在 ICS 中不包含细胞的 SCID 和使用柠檬酸盐局部抗凝,在图 9-13 中记作“假 / 柠檬酸盐”。

[0167] 心血管参数的观察

[0168] 如图 9 所阐释,上述的在猪腹腔中给予细菌,能够导致各组均产生快速、严重和最终致命的平均动脉压 (MAP) 衰退。早期数据显示使用柠檬酸盐的 SCID 相较于假 / 肝磷脂对照组减弱了对 MAP 的影响。图 10 详细说明了每组的心量输出 (CO)。相对于其他组来说, RAD 组的 CO 基本上较高。柠檬酸盐在更多的动物上显示出了重要的效果,尽管相较于假 / 肝磷脂对照组不如 RAD 的效果显著。各组中观察到的心搏出量也与此相似。

[0169] 作为所述败血症过程诱导产生的全身毛细血管泄露的一个近似的测量,图 11 显示了红细胞比容的变化。在图 11 中,假 / 肝磷脂对照组随时间的增长速率较高,反映了从假对照组的血管内室减少的体积速率较 RAD 和 SCID 组更大。这些变化在初步评估阶段,相较于假 / 肝磷脂组而言是与 RAD 和 SCID 组中的实质上的生存优势相关的 (见图 12)。假 / 肝磷脂组的平均存活时间为  $7.25 \pm 0.26$  小时, SCID (假 / 柠檬酸盐) 组为  $9.17 \pm 0.51$  小时,而 RAD (ICD 空间中含有细胞) 组为  $9.56 \pm 0.84$  小时。这些数据表明, RAD (ICD 空间中含有细胞),出乎意料的,还有 SCID,相较于假 / 肝磷脂对照组,两者均提高了心输出量、肾血流量和存活时间。

[0170] 炎性指标的观察

[0171] 为了研究猪 SIRS 模型的各种治疗介入 (treatment intervention) 的效果,在猪死亡时获得支气管肺泡灌洗 (BAL) 液体,并评价其作为微血管损伤、多种炎性细胞因子和

多形核细胞的绝对总数 (PMN) 的指标的蛋白质含量。如表 3 所总结, 原始数据显示, 在 SIRS 涉及肺的早期阶段, RAD 和 SCID 疗法均导致了较少的血管损坏和蛋白质泄露, 以及较少的炎性细胞因子的释放。IL-6、IL-8 和肿瘤坏死因子 (TNF)- $\alpha$  的水平在治疗介入时均低于假对照组。IL-1 和 IL-10 的水平没有差异。假对照组的嗜中性细胞绝对数量在 1000 细胞/mL 以上, 而 RAD 和 SCID 组趋于更低, 尽管每组的  $n = 1$  或 2。

[0172] 表 3

[0173] 源自败血症休克的猪的支气管肺泡灌洗 (BAL) 液体的蛋白质和细胞因子水平

[0174]

	蛋白质 ( $\mu$ g/mL)	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	IL-1 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-8 (pg/mL)
假对照组 (n = 6)	143 $\pm$ 11	21 $\pm$ 1	18 $\pm$ 2	63 $\pm$ 14	126 $\pm$ 42
RAD (n = 3)	78 $\pm$ 10	18 $\pm$ 5	18 $\pm$ 5	32 $\pm$ 6	33 $\pm$ 10
SCD (n = 2)	110 $\pm$ 12	13 $\pm$ 2	14 $\pm$ 8	33 $\pm$ 2	84 $\pm$ 62

[0175] 注: 平均值  $\pm$  标准差。在死亡之时完成 BAL。

[0176] 白细胞隔离观察

[0177] 关于血液透析的文献表明, 经过单药筒中空纤维的血液循环导致短暂的一小时嗜中性白细胞减少反应 (见, 例如, Kaplow 等人。(1968) JAMA 203:1135)。为了测试血液流过第二个药筒的毛细管外空间是否能够导致循环的白细胞附着速率的升高, 测量了总白细胞 (WBC) 数量及其在败血症动物之间的差别。结果如图 13 所示。

[0178] 如图 13 所示, 每组均出现了体外循环的白细胞反应, 在 2 小时时发展到达低谷并在 7 小时时恢复。这些动物的从基线至 3 小时时的平均差分数量, (每组中  $n = 1-2$ , 总数 = 5) 详载于表 4。所有白细胞亚型均有减少, 最显著的为中性白细胞。

[0179] 表 4

[0180]

	总 WBC	中性白细胞	淋巴细胞	单核细胞
基线 (0 小时)	15,696	6,422	6,792	306
最低值 (3 小时)	2,740	684	1,856	94

[0181] 注: 数值是 5 头动物的平均数: 1 头假对照, 2 头 RAD 处理的, 和 2 头 SCD 处理的动物

[0182] 为了说明在 SCID 中的白细胞隔离, 图 14A-D 描述了在中空纤维外表面吸附的白细胞的密度。这些图片说明了在 SCID 中白细胞的隔离。经过这种处理试验的正常动物, 在 8 小时的治疗过程中其 WBC 不会低于 9000, 表明了致敏或活化的白细胞吸附在第二膜系统上

可能是必需的。

[0183] 这些数据证实,RAD相较于假/肝磷脂对照组,改善了心输出量、肾血流量(数据未显示)和存活时间。此外,还意外地发现,柠檬酸盐与第二、低剪切力的中空纤维药筒(即SCID)联合使用,具有强大的抗炎作用,即使ICS没有包含细胞。

[0184] 实施例2. 白细胞隔离和抑制和/或灭活的体外研究

[0185] 在本实施例中所描述的实验结果表明,吸附在透析膜上的白细胞在柠檬酸盐存在下能够被抑制和/或灭活。此外,已有其他数据表明,柠檬酸盐抗凝可以在晚期肾脏疾病(ESRD)患者透析过程中废除中性白细胞脱颗粒(一种钙依赖病状)。为了更详细的评价这一过程,并将其范围扩大至其他白细胞总群和细胞因子的释放,进行了如下体外试验。

[0186] 方法和材料

[0187] 用已建立的方法从正常健康的个体中分离白细胞。白细胞(每孔 $10^6$ 个细胞)被放置于含有 $14 \times 14$ mm正方形聚砜膜(Fresenius, WalnutCreek, CA)的12孔组织培养板中,在RPMI培养基中 $37^\circ\text{C}$ 吸附60min。移去培养基,用PBS洗涤细胞,然后取上清液用于分析细胞释放。下表5叙述了用于达到各种 $\text{Ca}_i$ 水平的含有柠檬酸盐( $\text{Ca}_i = 0.25\text{mmol/L}$ )或不含有柠檬酸盐( $\text{Ca}_i = 0.89\text{mmol/L}$ )的RPMI培养基。每种钙条件也含有或未含有用于活化白细胞的脂多糖(LPS,  $1 \mu\text{g/mL}$ )。

[0188] 将细胞暴露在这些条件下60s,然后从培养基中移去,以评价乳铁蛋白(LF)和髓过氧化物酶(MPO)、源自中性白细胞的胞外分泌小囊泡(exocytotic vesicle)的蛋白质的释放,和由白细胞释放的细胞因子、IL-6和IL-8。用市场上买得到的Elisa成套工具(R&D Systems, Cell Sciences, and EMD BioSciences)来测定这些化合物。

[0189] 结果和讨论

[0190] 结果见表5。

[0191] 表5

[0192]

	乳铁蛋白 ( $\text{ng/mL}/10^6$ 细胞)		髓过氧化物酶 ( $\text{ng/mL}/10^6$ 细胞)		IL-6 ( $\text{pg/mL}/10^6$ 细胞)		IL-8 ( $\text{ng/mL}/10^6$ 细胞)	
	基线	激活态	基线	激活态	基线	激活态	基线	激活态
正常 $\text{Ca}_i$ ( $0.89\text{mmol/L}$ )	205	416	437	886	3.9	4.4	29.9	35.0
柠檬酸盐 $\text{Ca}_i$ ( $0.25\text{mmol/L}$ )	221	187	268	270	3.3	2.9	25.8	19.4

[0193] 注:WBC 是从两种不同的正常对照中分离的;每个条件重复两次分析,基线不含 LPS,激发态含有 LPS(1  $\mu$ g/mL)。

[0194] 低  $Ca_i$  含有柠檬酸盐的培养基未增加 LF、MPO、IL-6,或 IL-8,相反,正常的  $Ca_i$  的培养基能够显著地增加这些炎性蛋白质。这些结果证明,吸附在透析膜上的白细胞总群的激活在柠檬酸盐存在下能够被抑制和/或灭活,而柠檬酸盐降低了培养基中的  $Ca_i$  水平。低  $Ca_i$  水平导致了细胞质钙水平的改变,抑制了白细胞的多发炎症反应(例如释放促炎性物质)和/或灭活白细胞。

[0195] 实施例 3. 与人类急性肾功能衰竭 (ARF) 相关的炎症治疗

[0196] 本实例中叙述的实验显示了,与那些经肝磷脂处理系统中用相似的装置治疗的患者相比较,在由本发明中名为 SCID 的实施方式治疗的人类受治疗者中出现了料想不到的存活率,该 SCID 含有中空纤维导管,且处于由柠檬酸盐处理过的系统中。具体来说,在本实验中,SCID 指的是图 3 中循环所示的图 7 中的装置。SCID 中的 ICS 不含有肾细胞。

[0197] 背景

[0198] 对 10 位之前经持续静脉血液过滤 (CVVH) 的 ARF 和多器官衰竭的病危患者,在第 I/II 期临床试验 (Phase I/II trials) 中研究了肾细胞疗法的安全与有效性(见,例如, Humes 等人.(2004)Kidney Int. 66(4):1578-1588)。这些患者的预期住院死亡率平均在 85% 以上。在先前报道的实验中所使用的装置,种有分离自肾脏的人类肾近端小管细胞,这些肾脏来自于尸体移植捐献,但发现由于解剖学或纤维变性的缺陷而不适合于移植。这一临床试验的结果表明,试验性治疗在与 CVVH 联合使用时,在研究试验设计指导方针下可以安全的释放长达 24 时。临床数据表明,该所述系统显示并保持了在临床环境中的可行性、耐久性和功能性。如当时与治疗相关联的尿排出量所测定的,保持了患者的心血管稳定性,并增加了天然的肾功能。

[0199] 用于先前临床研究中的系统,也表明有分化的代谢和内分泌活动。如急性生理学评分评价,除一位患者外,所有接受超过 3 天追踪治疗的患者都显示了改善。10 例受治疗的患者中 6 例在肾功能恢复后存活超过了 28 天,尽管使用 APACHE 3 评分系统预测的这 10 例患者的死亡率平均为 85%。血浆细胞因子水平表明,该细胞疗法根据患者独特的病理生理情况产生了动态的和个性化的反应

[0200] 良好的第 I/II 期临床试验结果导致了后续的 FDA 批准的、随机的、受控的、在 12-15 临床试点的第 II 期调查,以确定此细胞疗法是否能够达到改变患者死亡率的目的。一项涉及 58 例患者的第 II 期研究,其中 40 例被随机分配到 RAD 疗法组,其余 18 例组成了对照组,具有序贯性器官衰竭评价 (SOFA) 评分的可比的人口统计和严重的病情。早期结果与第 I/II 期的结果同样令人注目。肾细胞疗法将 28 天死亡率从传统的血液过滤疗法对照组的 61% 降低到了细胞疗法组的 34%(见,例如, Tumlin 等人 (2005) J. Am. Soc. Nephrol. 16:46A)。这种存活影响一直持续到 90 天和 180 天的随访期 ( $P < 0.04$ ), Cox 比例危害比 (Cox proportional hazard ratio) 显示死亡风险为在传统的 CRRT 组中观察到的 50%。为了各种无关的 ARF 病原学器官衰竭数 (1 到 5 以上),或败血症的出现,观察这种肾细胞疗法的存活优势。

[0201] 方法

[0202] 为了评价商用细胞制造过程和附加的柠檬酸盐局部抗凝,进行了附加的研究。分

析这些患者治疗组的结果,比较具有全身肝磷脂抗凝和柠檬酸盐局部抗凝下的由 SCID (ICS 不含细胞) 治疗的患者的死亡率。如上所述,如图 3 所示循环中的图 7 概略显示了本实验中使用的装置。然而,在本实验中,第二血液导管泵在 SCID 和受治疗者之间(并为在图 3 所示的装置之间)。

[0203] 结果

[0204] 表 6 显示了 SCID/ 柠檬酸盐系统将存活率在 28 天和 90 到 180 天之间产生了显著的增加。

[0205] 表 6

[0206]

	存活率				SOFA	OF	MOF	败血症
	(N)	28 d	(N)	90-180 d				
SCID/柠檬酸盐	9/12	75%	8/12	67%	11.9	3.8	2.6	58%
SCID/肝磷脂	6/12	50%	3/12	25%	12.3	4.1	2.65	58%

[0207] 注:SOFA 为序贯性器官衰竭;OF 为器官衰竭数;MOF 为多器官衰竭数。

[0208] 图 15 用图像显示了在用柠檬酸盐(“SCID”/柠檬酸盐)代替肝磷脂(“SCID”/肝磷脂)的装置治疗的患者中,从 0 天到 180 天,存活率有显著增加。尽管这些患者组如 SOFA 评分所测量显示的有相似的疾病活性和器官衰竭数,存活率仍然出现了差异。每组的系统中第二药筒内的 ICS 均不含细胞。

[0209] 讨论

[0210] 这些临床的效果是未料想到的。这些结果在最大化患者存活率上提供了空前的和令人惊奇的成功。尽管这些临床数据源自 AFR 患者,可以考虑到这些观测将应用于更广泛的情况,例如,用于 SIRS、ESRD 和其他炎性病症。通过组织学评价无细胞药筒在柠檬酸盐处理和肝磷脂处理的组,从而完成对潜在机制的进一步评价。与上述动物模型得到的数据相似,柠檬酸盐/SCID 系统含有第二药筒中空纤维的外表面,在此药筒的血液侧覆盖了白细胞。在肝磷脂/SCID 系统中可见相似的结合。

[0211] 实施例 4. 单装置系统的炎症疗法

[0212] 在某些情况下,使用单治疗装置的治疗系统(即没有其他治疗装置的 SCID)可能是有益的。如前所讨论的,本发明的某些实施方式在体外循环中使用了第一治疗装置(例如血液滤器),除了完成其主要治疗作用外,还可活化白细胞(以不想要的型式)。系列中的第二治疗装置 SCID(例如图 2C 和 2D 所示),实现了在 ECS 的低阻力空间内的吸附和全身隔离。因此,如果并不需要第一治疗装置执行其主要职能,则移除此装置并减少不必要的白细胞活化可是有益的。在其他实施方式中,如败血症,循环中的白细胞可能已经活化,血液流过单装置的 SCID 系统(例如图 2A 和 2B 所示)的 ECS 低阻力空间时,白细胞可以充分地吸附和隔离。在这个循环中,输血导管上仅需要一个泵,从而简化了治疗介入。

[0213] 本试验评价了受治疗者体内的选择细胞分离的效用,和存活率和逐渐缩小的和/

或预防的炎症反应的效果（例如，发生炎症反应的，或有发展为炎症反应风险的动物或人类患者）。具体来说，本实验比较了系统中仅有一个 SCID 的单装置系统，和含有 SCID 以及其他处理血液的系统组件的双装置系统，例如，含有一个或多个血液过滤筒的系统。对于发生或有风险发生如 SIRS 病症的受治疗者，单装置系统可以是显著有效的，在此单装置系统中，白细胞隔离和可选择地白细胞灭活和 / 或抑制从白细胞释放促炎性物质，且此单装置系统是体外循环的主要治疗装置。双装置（或多装置）系统在受治疗者需要多余一种的体外循环治疗时是有用的，例如，同时需要肾透析治疗和白细胞隔离的，以及可选择的白细胞灭活和 / 或抑制从白细胞释放促炎性物质的急性肾衰竭受治疗者。

[0214] 第一测试系统将包括如图 2A 或 2B 分别所示循环中图 5 或图 6 所示的单 SCID。第二测试系统将包括如图 2C 或 2D 分别所示多装置循环中图 5 或图 6 所示的 SCID。该两个测试系统中，SCID 中空纤维药筒或整个系统将包含柠檬酸盐。对于该两个系统中，SCID 的 ICS 中均不包含超滤液和细胞。

[0215] 两组受治疗者（如猪）将给予细菌以诱发败血症和 SIRS，如上述实施例 1 所述。每组将接着由所述测试系统之一进行治疗，和采取例如在实施例 1 中所描述方法测量。比较两组的测量结果。除了所描述的单装置和双装置系统配置外，还对其它装置配置，和含有这些装置的系统配置进行了测试。

[0216] 可以预期到，在单装置和双装置系统之间暂态白细胞减少和中性白细胞减少幅度是可比的。单装置和双装置系统的 WBC 数量与对心血管和肺功能指标影响、全身和肺部炎症指标、和白细胞活性标记的改变的关系，可以证实不需要第二治疗装置的简单单装置系统或双装置系统是否对病症有效，尽管预期的是单装置和双装置配置都将有效。

[0217] 实施例 5. 白细胞隔离表面积的比较

[0218] 本试验评估了，具有不同细胞分离表面积的一个或多个 SCID 中空纤维筒在实施选择细胞分离时的效果，以预防炎症反应，和增大测试受治疗者的存活率。测试了若干膜大小。初步测试将包括了分别比较表面积为约  $0.7\text{m}^2$  和约  $2.0\text{m}^2$  的 SCID 膜。附加测试组可以包括膜表面积在约  $0.7\text{m}^2$  和约  $2.0\text{m}^2$  之间的比较，和 / 或膜表面积大于约  $2.0\text{m}^2$  的比较。

[0219] 在一研究中，如上所述，将准备具有中空纤维筒的 SCID，其中的中空纤维筒具有不同的白细胞隔离表面积。如图 5 大体设计的 SCID 将置于图 2A 或 2C 的循环中，或者如图 6 大体设计的 SCID 将置于图 2B 或 2D 的循环中。如上述实施例 1 所述，受治疗者（如猪）将给予细菌，以诱发败血症和 SIRS。各组受治疗者，将接着由本文所述的一个或多个系统治疗。每个系统的测试，至少将测试两种不同的 SCID 膜表面积大小（例如， $0.7\text{m}^2$  和  $2.0\text{m}^2$ ）。将采用如实施例 1 中所述的测量方法，并比较每个组的测量数据。

[0220] 在另一研究中，将研究进行过 CPB 的受治疗者（如猪或牛犊）。经 CPB 治疗可以引起器官功能障碍，包括急性肾损伤 (AKI) 和急性肺损伤 (ALI)。将在 CPB 循环中测试 SCID，这些 SCID 具有含有不同白细胞隔离表面积的中空纤维筒。

[0221] CPB 将如本文实施例 8 和实施例 9 中所述，在受治疗者上实施，使用如图 4A-4F 中任一所示循环配置的 SCID。对于每个系统，至少将测试两种不同的 SCID 膜表面积大小（例如， $0.7\text{m}^2$  和  $2.0\text{m}^2$ ）。端点测量将包括本文所描述的，例如，在实施例 1 或实施例 8 中。此外，CPB 诱导的 AKI 和 CPB 诱导的 ALI 的严重程度可作为 SCID 膜隔离表面积的功能评价。

[0222] 人们预期，增加膜表面积将增加白细胞结合并且导致延长 SCID 引起的白细胞减

少的时间间隔。此外,人们预期,具有较大隔离表面积的 SCID(相对较小的隔离表面积)将提高选择细胞分离的效果(例如,通过改进的存活率和/或改进的减少和/或预防炎症反应的效果来测量),并更有利于减轻与 CPB 相关的并发症,例如,与 CPB 相关的器官损伤(例如 AKI 和 ALI)。

[0223] 实施例 6. 伴随急性肾损伤的败血症休克模型中的选择细胞分离装置

[0224] 本实施例中所描述的实验,描述了在伴随 AKI 的败血症休克的猪模型中,带有 SCID 的单泵和双泵系统,和柠檬酸盐或肝磷脂抗凝给药的临床前试验。本实验一般是针对两个评价。首先,实验评价了使用单泵循环 SCID(例如图 2D 循环中图 6 所示 SCID)的功效,和与之相比的双泵循环 SCID(例如图 3 循环中图 7 所示 SCID)的功效。“单泵”或“双泵”指的是如所示循环中的血液导管上的泵的个数,例如,图 2D 中的泵 204(单泵系统)或图 3 中泵 204 和 300(双泵系统)。使用单泵循环的一个优点是,流出透析装置可以不需要使用以提供床边照顾(deliver care at the bedside)的附加训练或泵系统。此外,本实验评价在使用柠檬酸盐和与之相对的肝磷脂情况下,SCID 隔离活化的白细胞,并抑制其活化状态的作用机制。

[0225] 材料和方法

[0226] 为了评价 SCID 在单泵与双泵循环中的效果,准备了下面两个测试系统。首先,单泵测试系统包括图 2D 所示循环中图 6 的 SCID。其次,双泵测试系统包括图 3 中所示循环中图 7 的 SCID。这两个测试系统还包括柠檬酸盐或肝磷脂,但在 SCID 的 ICS 中并不包括细胞。

[0227] 本实施例中的实验,利用了已建立的伴随 AKI 和多器官机能障碍的败血症休克的猪模型,如实施例 1 所示。(见,例如,Humes 等人.(2003) Crit. Care Med. 31 :2421-2428.)。简单来说,如上述实施例 1 所述,给予两组受治疗者(猪)细菌来诱导败血症和 SIRS。每组接着选用单泵或双泵测试系统中的一个进行治疗。每个单泵和双泵系统都有两个处理亚组,用柠檬酸盐灌注或肝磷脂灌注的治疗。因此,患有败血症和 SIRA 的受治疗者中的一组用由柠檬酸盐或肝磷脂处理过的单泵系统治疗;另一患有败血症和 SIRA 的受治疗者的组用由柠檬酸盐或肝磷脂处理过的双泵系统治疗。

[0228] 测量白血细胞、中性白细胞和血小板,以评价单泵和双泵系统的相对效果。此外,为了评价由含有柠檬酸盐与肝磷脂的 SCID 隔离和抑制活化白细胞的反应机制,在应用柠檬酸盐或肝磷脂的系统中检测了若干指标。评价指标包括,作为中性白细胞活化的指标的髓过氧化物酶(MPO)和 CD11b。对于 CD11b 的测量,采取动物血液样品,加入与白细胞表面表达的 CD11b 结合的荧光抗体。细胞分类将白血细胞分为不同亚型,而中性白细胞门中的中性粒细胞接着进行荧光强度分析,荧光强度与表面的与荧光抗体结合的 CD11b 分子数成正比。分析全部的中性白细胞,以平均荧光强度(MFI)作为数值上评价 CD11b 表达活性水平的指标。评价指标还包括动物的存活率。

[0229] 结果

[0230] 图 16A、16B 和 17 显示了单泵和双泵系统对白细胞计数、中性白细胞计数及血小板计数的影响结果。由于白细胞隔离(图 16A)、中性白细胞隔离(图 16B)和血小板隔离(图 17),在柠檬酸盐处理和肝磷脂处理的单泵系统下,与在柠檬酸盐处理和肝磷脂处理的双泵系统下基本相同,这些图比较显示了两个单泵亚组的平均值与两个双泵亚组平均值。

图 18-21 显示了柠檬酸盐处理或肝磷脂处理系统的结果。由于,对于由柠檬酸盐处理的单泵和双泵系统与由肝磷脂处理的单泵和双泵系统而言,图 18-21 测量的特性基本相同,所以这些图比较显示了两个柠檬酸盐亚组的平均值与两个肝磷脂亚组的平均值。

[0231] 双泵与单泵测试系统的比较。为了评价在单泵和双泵循环之间的压力和 / 或流量对两个测试系统的 SCID 隔离白细胞的可能影响,检测了全身血液中的白细胞 (WBC) 和中性白细胞计数。单泵和双泵系统的有关 WBC 和中性白细胞细胞计数的结果分别如图 16A 及图 16B 所示。如图详示,在这些指标中没有观察到单泵系统 ( $n = 5$ ) 和双泵系统 ( $n = 5$ ) 之间的差异。

[0232] 血小板隔离。血小板计数也用于评价用单泵或双泵系统治疗的动物。如图 17 所示,含有 SCID 的单泵和双泵系统,在由 SCID 治疗后的随后的至少 9 小时内,均降低了血小板计数。这些数据表明,所述系统具有 SCID 隔离血小板。

[0233] 中性白细胞活化。活化的中性白细胞响应侵入微生物或组织损伤而释放了多种酶,以启动组织修复。嗜中性粒释放的主导酶是髓过氧化物酶 (MPO)。相应地,测量 MPO 的全身水平,来显示在受治疗者体内的中性白细胞活性水平。图 18 显示了,由 SCID 和柠檬酸盐 (SCID 均值,  $n = 5$ ) 治疗的动物中的平均 MPO 水平,低于与由 SCID 和肝磷脂 (SCID 均值,  $n = 3$ ) 治疗的动物组。中性白细胞活化水平也可以通过测量 CD11b 的表达量来定量分析,CD11b 是负责结合到内皮组织上的膜蛋白,这个结合是在炎症位点离开循环的第一步。如图 19 详示,诱导发生败血症 6 小时时,与由 SCID 和柠檬酸盐 (柠檬酸盐 (全身的);  $n = 4$ ) 治疗的动物组相比,在由 SCID 和肝磷脂 (肝磷脂 (全身的);  $n = 4$ ) 治疗的动物中,全身循环中性白细胞的 MFI 有显著增加。

[0234] 通过评价在循环的动脉和静脉输血导管中的中性白细胞 MFI,以获得整个循环的平均值,更进一步完善了所述分析。从循环的动脉输血导管和循环的静脉输血导管中同时采取样品,动脉输血导管是血液从受治疗者流出进入输血导管之处,静脉输血导管是血液从输血导管流出重新进入受治疗者之处。肝磷脂组 ( $n = 4$ ) 和柠檬酸盐组 ( $n = 4$ ) 的 MFI (动脉 - 静脉) 的差异在 3 和 6 小时时显著不同,如图 20 所示。这些数据表明,柠檬酸盐灌注抑制 (suppresses) 循环中的中性白细胞活性水平,这可以由相同时期内循环的中性白细胞的全身性活性降低来印证。

[0235] 动物存活率。对含有柠檬酸盐的 SCID 和含有肝磷脂的 SCID 效果的最终评价是存活效应。如图 21 所示,在柠檬酸盐组和肝磷脂组中观察动物的持续的存活时间优势。由含有柠檬酸盐的 SCID 治疗的动物的平均存活时间为  $8.38 \pm 0.64$  小时 ( $n = 8$ ),相对来说由含有肝磷脂的 SCID 治疗的动物的平均存活时间为  $6.48 \pm 0.38$  小时 ( $n = 11$ )。

[0236] 其他评价也在考虑之中。例如,用于评价全身肝素化与局部柠檬酸盐抗凝的 SCID 的效果,或单泵或双泵系统的效果的数据集可以包括:1 心血管指标 (心率;收缩压、舒张压、和 MAP;心输出量;全身血管阻力、心搏出量;肾动脉血流量;中心静脉压;肺毛细血管楔压);2. 肺指标 (肺动脉收缩压和舒张压、肺 (pulmonary)、血管阻力、肺泡动脉氧的梯度);3. 动脉血气体 ( $pO_2$ 、 $pCO_2$ 、pH、总  $CO_2$ );4. 全血球计数 (红细胞比容 (从毛细血管泄露间接测量);WBC 和差异);5. 炎症指数 (细胞因子的全身血清水平 (IL-6、IL-8、IL-1、INF- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ ));和 6. 通过 BAL 液体的肺炎性指标 (蛋白质含量 (血管泄漏);有差异的总细胞计数;TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8、IL-1、INF- $\gamma$ 、中性白细胞髓过氧化物酶和弹性蛋白酶);

从 BAL 液体得到的肺泡巨噬细胞,及在 LPS 刺激后评价的细胞因子的基线和激活态水平)。此外,可以测量 SCID 炎性指标(不同细胞因子(IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 、IL-1、INF- $\gamma$ )的前血液滤器、前第二药液筒、后第二药液筒中血清水平)和中性白细胞胞吐化合物(exocytotic compound)(髓过氧化物酶、弹性蛋白酶和乳铁蛋白),以评估白细胞的活性,并且这些元素的同时测量,也可以在 UF 中完成,这些 UF 来自治疗过程中和血液相联系的前和后第二药液筒及 UF 导管。此外,以通过气相色谱法和质谱分析法来测定血清氧化标志物和 BAL 液体,以评价各组中炎性诱发的氧化应激。

#### [0237] 结论

[0238] 本实验的数据证实了,包含了 SCID 和柠檬酸盐处理的体外循环,可以有效地隔离和抑制从白细胞释放促炎性物质或灭活白细胞。具体来说,这些数据表明,白细胞在单泵和双泵循环中的隔离效果是相似的。此外,在败血症休克的动物模型中,与 SCID 和肝磷脂处理的系统相比较,SCID 和柠檬酸盐处理的系统减少了中性白细胞活性的水平。SCID 和柠檬酸盐处理系统的效果导致了在败血症致死的动物模型中存活时间的增加。此外,单泵系统和双泵系统均能有效隔离血小板至少 9 小时。根据这些数据,人们预计血小板的隔离和灭活血小板和 / 或抑制从血小板释放促炎性物质,可能具有有益的影响,这些影响如整个说明和实施例所述,和隔离白细胞和灭活白细胞和 / 或抑制从白细胞释放促炎性物质相似。

#### [0239] 实施例 7. 人类肾晚期疾病的治疗

[0240] 本实施例所描述的试验设计用于评价由本发明的实施方式治疗的人类受治疗者的存活率,这个实施方式即是,由包含经柠檬酸盐处理的系统,与由肝磷脂处理的系统中的中空纤维的药液筒相比较。配置用于本试验的系统将是分别为图 2C 或 2D 之一的循环中所示的图 5 或图 6 之一的 SCID,其中 SCID 的 ICS 中不含有细胞。方法和观测可以包括,在 SCID 药液筒中不含有附加的肾细胞的柠檬酸盐和肝磷脂系统的对比。

#### [0241] 背景

[0242] 一个与慢性促炎性状态有关的疾病例子是肾终末期疾病(ESRD)。(见,例如, Kimmel 等人.(1998)Kidney Int. 54 :236-244 ;Bologa 等人.. (1998)Am. J. Kidney Dis. 32 : 107-114 ;Zimmermann 等人.(1999)Kidney Int. 55 :648-658)。主要疗法、透析,关注的是移除小分子废物和体液平衡。然而,它并不能解决与 ESRD 相关的慢性炎症。在 ESRD 患者中,严重的发病率和令人无法接受的高达 21% 的年死亡率相关(见,例如,USRD 系统,USRDS 2001 年刊数据报道 :美国肾终末期疾病图谱,2001,国立卫生研究院,国立糖尿病和消化的和肾疾病研究院 :Bethesda. p. 561)。

[0243] 肾终末期疾病患者的预期寿命平均为 4 至 5 年。血管变性、心血管疾病、血压控制不佳、频繁感染、慢性疲劳和骨骼退化显著影响生活质量,并产生高发病率、频繁住院和高成本。ESRD 患者的死亡率主要原因是心血管疾病,ESRD 总死亡率的近 50% (见,例如,USRD 系统,USRDS 2001 年刊数据报道 :美国肾终末期疾病图谱,2001,国立卫生研究院,国立糖尿病和消化的和肾疾病研究院 :Bethesda. p. 561),其次是感染事件。

[0244] ESRD 患者发展慢性炎症状态,容易使他们同时患心血管疾病和急性感染性并发症。ESRD 患者尽管经过充分的血液透析,还是对感染敏感。长期血液透析诱发了细胞因子模式改变,相当于慢性促炎性状态(见,例如,Himmelfarb 等人.(2002)Kidney Int. 61(2) :

705-716 ;Himmelfarb 等人 . (2000) *Kidney Int.* 58(6) :2571-2578), 不依赖膜活化、炎症, 和清除。这些小蛋白可以被血液滤器过滤, 但由于产率的提高, 血浆水平并不会改变 ( 见, 例如, Kimmel 等人 . (1998) *supra* ;Bologa 等人 . (1998) *supra* ;Zimmermann 等人 . (1999) *supra* ;Himmelfarb 等人 . (2002) *supra* ;Himmelfarb 等人 (2000) *supra*)。增强暴露接受血液透析的 ESRD 患者的氧化应激, 进一步中和了免疫系统和增强了对感染的敏感性 ( 见, 例如, Himmelfarb 等人, (2002) *supra* ;Himmelfarb 等人, (2000) *supra*)。

[0245] 临床上, ESRD 患者出现的慢性炎性状态, 由于伴随促炎性反应细胞因子水平升高而出现的 CRP 水平升高而明显, CRP 是一个新兴的临床指标, 促炎性反应细胞因子包括 IL-1、IL-6 和 TNF- $\alpha$  ( 见, 例如, Kimmel 等人 . (1998) *supra* ;Bologa 等人 . (1998) *supra* ; Zimmermann 等人 . (1999) *supra*)。所有这些指标都与增加的 ESRD 患者死亡率相关。具体来说, IL-6 已被确定为一个与血液透析患者的死亡率密切相关的单一预测因子。每增加 1 皮克 / 毫升 IL-6, 就使心血管疾病死亡风险相对的增加 4.4% ( 见, 例如, Bologa 等人 . (1998) *supra*)。事实上, 越来越多的证据表明, 促炎性状态是由于 ESRD 患者体内中性白细胞的致敏和活化。( 见, 例如, Sela 等人 . (2005) *J. Am. Soc. Nephrol.* 16 :2431-2438)。

#### [0246] 方法

[0247] 终末期肾功能衰竭的患者的血液将经体外循环处理, 该循环包含了血液过滤装置、SCID、和柠檬酸盐, 或作为对照包含血液过滤装置、SCID、和肝磷脂 ( 即分别为图 2C 或 2D 之一的循环中所示的图 5 或图 6 之一的 SCID, 经柠檬酸盐或肝磷脂治疗)。本研究还可能在每个 SCID 中包含肾小管细胞 ( 这样, SCID 也可以作为肾辅助装置, 或 RAD)。血液将从患者流出, 进入血液滤器装置, 到达 SCID, 然后回到患者。也可以包括适当的泵和安全过滤器, 以促进血液流动返回患者。

[0248] 评价经柠檬酸盐或肝磷脂处理的 SCID 效果的数据集, 将包括 SCID 炎性指标 ( 不同细胞因子 (IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 、IL-1、INF- $\gamma$ ) 的血前液滤器、前第二药液筒、后第二药液筒的血清水平) 和中性白细胞胞吐化合物 ( 髓过氧化物酶、弹性蛋白酶和乳铁蛋白), 测量的这些指标用于评价在 SCID 内不同药液筒组件中的白细胞活性。若使用了含 SCID 和 UF 的循环 ( 例如图 3 循环中图 7 的 SCID), 则这些元素的同时测量也可以在和血液相联系的 UF 前和后第二药液筒中完成, 和在治疗过程中 UF 导管中完成。

#### [0249] 结果和讨论

[0250] 人们期望血液是经含有 SCID 和柠檬酸盐的体外循环处理的这些患者, 比另一些血液是经含有 SCID 和肝磷脂的体外循环处理的患者将显示明显更好的结果。具体而言, 人们期望在接受经柠檬酸盐处理的 SCID 治疗的患者中, 促炎性反应标志相对于那些接受肝磷脂处理的 SCID 治疗患者更低。

#### [0251] 实施例 . 8 作为部分心肺分流术循环的选择细胞装置

[0252] 本实施例所述实验应用了单血液滤器药筒作为 SCID 与体外循环相联接 ( 例如, 图 5 或图 6 所示 SCID), 这个 SCID 具有并联循环中的血流量 (200mL/min), 以增大循环的流量容量。使用柠檬酸盐局部抗凝来改善此并联循环以及灭活白细胞装置的抗凝, 这些白细胞沿着 SCID 内的膜外表面隔离。

[0253] 该试验设计包括在牛犊模型中的具有 SCID 的体外 CPB 循环。在每个循环中使用 SCID, 具有与循环白细胞的实质降低, 和大部分的中性白细胞暂时的相关。这种下降在没有

突破隔离效果的操作中一直持续。图 4B 和 4C 所示的循环被设计用于将 SCID 简单合并到现有的 CPB 循环中,并且不会引起安全性问题。

#### [0254] 背景

[0255] 心脏外科手术的进展,已完全依赖于 CPB 技术。不幸的是,人们已认识到全身炎症反应的发生与 CPB 相关,并导致术后多器官功能障碍。在 CPB 中多发性损伤被显示能启动和扩大此类炎症反应,包括血液组件(膜充氧器)的人工膜活化、手术创伤、器官缺血-再灌注损伤、体温改变、心脏切开吸引中的血液活化、和内毒素释放。这些损伤加速了复杂的炎症反应,包括白细胞活化、细胞因子释放、补体激活,和自由基生成。这些复杂的炎症反应过程往往有助于 ALI、AKI、出血障碍、肝功能改变、神经系统功能衰竭、最终多器官衰竭(MOF)的发展。

[0256] 在需要使用 CPB 的手术后普遍出现肺功能障碍。这种急性肺损伤可以是轻度的,从术后呼吸困难到暴发性 ARDS。近 20% 的患者在需要 CPB 的心脏外科手术后,需要超过 48 个小时的机械换气。ARDS 中有约 1.5-2.0% 发展成为 CPB 患者,并且其死亡率超过了 50%。伴随 AKI 的肾功能不全也普遍出现在 CPB 术后的成年患者中。这些患者中,发展至血清肌酸酐和 BUN(尿素氮)上升的患者高达 40%,其中的 1-5% 需要透析支持,术后死亡率达到了 80%。

[0257] 导致 CPB 后的多器官功能障碍的机制有许多,相互关联且复杂,但越来越多的证据表明,在 ARDS 发展成为 CPB 诱发后泵综合征(CPB-induced post-pump syndrome)的过程中,循环的血液白细胞活化起到了关键的作用,特别是中性白细胞。越来越多的证据支持,在 ARDS 和后泵综合征两者中的急性肺损伤是伴随肺中 PMN 的隔离的主要由中性白细胞介导的。隔离的和活化的 PMN 迁移到肺组织,导致了组织损伤和器官功能障碍。现有技术中描述的指向 CPB 过程中白细胞排除的治疗干预,已经在前临床动物模型和早期临床研究中均进行了评价。使用现有技术的白细胞排除过滤器,在 CPB 过程中循环白细胞计数没有降低,却略微促进了氧的需求,这样的结果是相矛盾的。现有技术中,实施了带有白细胞排除过滤器的选择性冠状动脉旁路搭桥术(CABG)的患者中并没有出现显著的临床改善。相反,本发明的系统、装置和方法将产生有益的作用,如下所述。用血液分离器排除白细胞可以改进术后肺部气体交换功能。

#### [0258] 方法和结果

[0259] 对三头牛犊分别实施手术,标号分别为 SCID102、SCID103 和 SCID107。每头牛犊(约 100 公斤),被实施全身麻醉,并且和 CPB 循环连接,以设置一个心室辅助装置(VAD)。通过心搏停搏液和主动脉交叉钳夹,在 60-90 分钟之间完成 CPB。在如图 4B 或图 4C 所示位点处安放 SCID,对每个动物进行如下鉴定。图 22A-22F 及 23A-23B 总结了三头动物的结果(SCID102、SCID103 和 SCID107)。

[0260] 手术的细节和结果。对于 SCID102,循环的建立如图 4B 所示,使用 F40 型药液筒(Fresenius Medical Care,德国)作为循环中的 SCID。如图第 22A-22F 所示,可见白细胞和血小板计数出现了降低。如图 22E 所示,出现了嗜酸细胞计数的降低,而嗜酸细胞计数在急性肺损伤中有重要地位。

[0261] 对 SCID103,循环的建立如图 4B 所示,使用 HPH1000 血液浓缩器(Minntech Therapeutic Technologies, Minneapolis, MN)作为循环中的 SCID。SCID 治疗持续了 75

分钟,在 SCID 治疗结束 15 分钟后再次取样。如图第 22A-22E 所示,观察到了时间依赖的白细胞下降。在 75 分钟时中断 SCID,15 分钟内中性白细胞出现了大的反弹。没有观察到凝血出现。

[0262] 对于 SCID107,循环的建立如图 4C 所示,使用 HPH1000 血液浓缩器 (Minntech Therapeutic Technologies,Minneapolis,MN) 作为循环中的每个 SCID 和血液滤器 / 血液浓缩器。在 SCID 并入前 15 分钟启动 CPB,且 SCID 治疗持续了 45 分钟。在 SCID 治疗结束 15 分钟后再次取样。如图第 22A-22F 所示,在 SCID 并入循环之前,白细胞和血小板数均下降。在此手术中,获得了压力分布图,并证明了 UF 流量为 50mL/min。

[0263] 如图 23A 和 23B 所示,维持了全身的  $Ca_i$ ,且 SCID 循环中  $Ca_i$  也在靶范围内。作为此类手术的普通记录,并未在更低的 SCID 压力中观察到超滤液 (UF)。

[0264] 结论

[0265] 本实施例所述试验表明,SCID 装置并入体外循环,例如 CPB 循环,可隔离白细胞和血小板,并增强手术中临床结果成功的可能性。

[0266] 实施例 9. 动物模型中与心肺分流术诱导的急性肺损伤 (ALI) 和急性肾损伤 (AKI) 相关的炎症疗法

[0267] 作为实施例 8 所述的实验延伸,本实施例所述试验,设计用于表现本发明的装置在 CPB 诱导的 ALI 和 AKI 治疗中,隔离白细胞和抑制其炎性反应的效果。

[0268] 具体而言,本实施例的目的是得到有效治疗 CPB 诱导的 ALI 或 AKI 的最优 SCID 试验方案。为了实现这一目标,采用如图 4B、4C、4E 或 4F 中任一所述的 CPB 循环治疗动物,每个循环都含有 SCID 和柠檬酸盐加料装置。可替代地,测试了如图 4A 或 4D 所示的 CPB 循环,每个循环中包括了无柠檬酸盐灌注的 SCID。此外,当治疗发生时,在 CPB 中使用的 SCID 可以用新的 SCID 代替,和 / 或一个或多个 SCID 可以在图 4A-4F 中的任一图中的“SCID”位置上进行串联或并联。

[0269] 文献报道了大量用于评价 CPB 诱导的 ALI 的机制和治疗干预的猪模型。例如,早期猪模型已证明,可论证的附加损伤能够增强诱导 ALI,这种附加损伤包括:(1)CPB 的时间长度由 60 至 120 分钟;(2) 主动脉交叉钳夹和心脏的冷心脏停搏法产生的局部缺血 / 再灌注损伤;(3) 开放性容器的心脏切开吸引促进血液成分的活化(白细胞、血小板和补体);以及(4)CPB 后的内毒素灌注促进 SIRS 反应,与患者中观察到的相似,这些患者是由于可探测水平的 CPB 后内毒素,推测可能是由于在心外科手术以及轻微的局部缺血 / 再灌注损伤后的肠胃屏障功能障碍 (gastrointestinal barrier dysfunction) 导致的。

[0270] 已报道了 CPB 诱导的 ALI 已建立的猪实验方案,该方案 CPB 后 3.5 小时和持续的脂多糖 (LPS ;60 分钟  $1 \mu g/kg$ ) 后 2 小时内,肺功能和在支气管肺泡的 (BAL) 液体的分子标记有显著改变。此报道的方案使用了股骨 - 股骨低温分流术操作,随后,在 CPB 中断后 30 分钟时开始 60 分钟的 LPS 灌注。观察在这些连续损伤达 2 小时时测量的肺指标和显著损伤指标。可以发展其它方案,以在 CPB 参与的临床实践有更多的反射效果时的 4 小时内,产生可测量的 ALI。

[0271] 本实施例将使用一个利用了 60 分钟 CPB、主动脉交叉钳夹和心脏的冷心脏停搏法作为基线方案的 ALI 和 AKI 临床相关的模型,以及在 CPB 到开放的静脉贮血器过程中的心切开术和心脏抽痰法抽吸术 (cardiac suctioning),以促进增加的损伤。若这些处

理还不足以引起可测量的 ALI 和 AKI,那么再在 CPB 完成后附加 30-60 分钟的大肠杆菌 LPS(0.5-1.0  $\mu$ g/kg) 灌注。以下将详细描述该 CPB 猪模型的一般方法。

#### [0272] CPB 方案

[0273] 在一个示例性方案中,约克夏 (Yorkshire) 猪 (30-35kg) 在术前给药,为 IM 阿托品 (0.04mg/kg)、阿扎哌隆 (4mg/kg) 和氯胺酮 (25mg/kg),然后用 5  $\mu$ g/kg 芬太尼和 5  $\mu$ g/kg 硫喷妥钠麻醉。在用 8 毫米气管内插管 (Mallinckrodt Company, Mexico City, 墨西哥) 插管后,猪以仰卧位放置。通过持续灌注 5mg/kg/小时硫喷妥钠和 20  $\mu$ g/kg/小时芬太尼来保持猪麻醉状态。用 0.2mg/kg 双哌雄双酯诱发肌肉松弛,随后间歇再注入 0.1mg/kg 以达到最佳外科手术和通气状态 (ventilatory condition)。

[0274] 通过使用一个总容量为 10mL/kg 的容量循环通风机建立通风,并且吸气的氧分数为 1,不含呼气末正压通气。聚乙烯监控导管放置在颈外静脉、股动脉和静脉中。插入食管和直肠温度传感器。实施正中胸骨切开术。一个 16 或 20mm 的超音速血管流量探测器放置在肺动脉主干中,并且米勒 (Millar) 微尖 (microtip) 压力传感器放置在肺动脉和左心房中。CPB 启动之前,读取基线肺动脉压力和流量以及左心房压力读数,以确定心输出量。在全身肝素化 (300U/kg) 后,18F Medtronic DLP 动脉插管放置在升主动脉中,同时,24F Medtronic DLP 单级静脉插管放置在右心房中。

[0275] 用 1000mL 乳酸化林格氏 (Ringer's) 溶液和 25mEq 的 NaHCO<sub>3</sub> 致敏 CPB 循环。此循环由美敦力生物离心 (Medtronic Biomedicus Centrifugal) 血液泵、带整体式热交换器的美敦力亲和 (Medtronic Affinity) 中空纤维充氧器,和心脏切开术储血器组成。美敦力亲和 38 微米过滤器放置在动脉支路上以捕获微粒碎片。用 12-Ga 美敦力标准主动脉根部插管和与 Sarns 滚压泵和心脏切开术储血器相连的通用管,给左心室通气。净化的血液由心脏切开吸引导管再利用,该导管也与 Sarns 滚压泵和心脏切开术储血器相连接。启动心肺分流术,中断通气,全身灌注维持在 2.4L/min/m<sup>2</sup> 身体表面积。采用适度的灌注低体温 (32°C, 直肠温度),通过改变流速和静脉苯肾上腺素滴注 (0-2  $\mu$ g/kg/min) 使平均主动脉压保持在 60-80mmHg。升主动脉交叉夹紧,并且在 7 度将心搏停搏液递送入主动脉根部插管,此心搏停搏液是用密歇根大学的标准停搏液以 4:1 的比例用血液稀释组成的。该溶液由柠檬酸盐-磷酸盐和葡萄糖 (CPD)、氨基丁三醇、和氯化钾组成。心搏停搏液的分配总剂量是 1L,每 20 分钟重复 500mL。40 分钟后开始全身复温,60 分钟后中断体外循环 (夹紧时间为 45 分钟)。在 CPB 中断之前,使肺部膨胀到呼吸气道压力为 30-cmH<sub>2</sub>O,持续 10 秒,共进行 3 次呼吸,同时,用同一通风机设置重新开始机械通气。在 CPB 中断期间,滴入肾上腺素冷浸剂 (0-1  $\mu$ g/kg/min) 以使主动脉血压维持在正常范围内。在体外循环中断的 30 分钟内,充氧器中的血液转移回到循环中,肝磷脂由鱼精蛋白 (每毫克 100U 肝磷脂) 逆转 (reversed),且直肠温度回到常温。在 CPB 之前、之中和 CPB 之后 4 小时,记录生理测量。

#### [0276] 体外循环

[0277] 通过实质的改变产生 ALI 和 AKI 的 CPB 猪模型,SCID 在改善器官损伤发面的效果可以直接被测定。单药筒 SCID 将放置于膜充氧器之后的并联的循环中 (例如如图 4F 所示)。考虑到,膜充氧器将会活化循环白细胞,这些循环白细胞接下来将在 SCID 中被隔离。在局部 SCID 并联血液循环中将添加柠檬酸盐,以降低血液中离子 Ca<sub>i</sub>, 以使其处于靶浓度范围内,例如,约 2.0 到约 0.4mM,以在并联循环的末端 Ca<sup>2+</sup> 再注入的方式。评价和比较两组动

物的情况。第一组将接受 SCID 和肝磷脂抗凝治疗,第二组将接受 SCID 和柠檬酸盐抗凝治疗。每组各有 3 个动物被治疗后对两组初始分析,每组将有 6 个动物。利用标准的实验溶液和临床试验方案,将达到局部柠檬酸盐抗凝。柠檬酸盐通过与钙离子结合而成为抗凝剂。这样,结合钙将不能用于触发凝固因子。在血液即将返回动物之前,在血流中添加钙,以恢复全身  $Ca_i$  水平,这个恢复的钙水平将给予足够的凝固和心脏功能。

[0278] 当今的基于柠檬酸盐抗凝作用的连续肾脏替代疗法的标准实验方案也将用于此。ACD-A 柠檬酸盐 IV 溶液 (Baxter 健康护理) 将连接到一个柠檬酸盐注射泵和 SCID 之前的 SCID 血液注入孔的导管中。在 SCID 之后,钙将经由一个输注孔而被投入返回的血液中,以恢复全身的钙。柠檬酸盐灌注流速 (mL/小时) 为血液流速 (mL/分钟) 的 1.5 倍,以使前-药筒达到 0.2 和 0.4mmol/L 的  $Ca_i$  水平。

[0279] SCID 血流速度设定在 200mL/min,并由一个放置在 SCID 之前的血液循环中的泵控制,流速设置在 200mL/min。将氯化钙 (20mg/mL, 0.9% N.S.) 灌注入 SCID 之后的血液导管中,以使全身的 (动物血液中的值) 的  $Ca_i$  水平达到 0.9 ~ 1.2mmol/L 之间。初始  $Ca^{2+}$  灌注速率是柠檬酸盐灌注速率的 10%。在泵系统反映全身  $Ca_i$  水平之前,将评估 CPB 循环的动脉末端的  $Ca_i$  水平,以及 SCID 并联循环的静脉末端的  $Ca_i$  水平。所有的  $Ca_i$  将由一台 **i-STAT**<sup>®</sup> 诊断仪 (AbbottLabs) 来测量。

[0280] 急性肺损伤 (ALI) 的测量

[0281] 肺功能。CPB 之后的 ALI 会导致肺泡动脉的氧梯度、肺内分流部分、肺内顺应性、以及肺循环血管阻力的增加。这些指标将在 CPB 之后的 4 个小时时期内里每 30 分钟进行一次测量。

[0282] 肺组织分析。ALI 在后泵综合征与中性白细胞在肺脏中的积累和组织液中的增加有关。通过从没用于 BAL 的切片上获取的肺组织,中性白细胞的聚集将在研究方案的最后阶段进行评估。组织的样品将用于评估嗜中性组织渗透反映的髓过氧化酶组织活性,半定量的中性白细胞计数的组织学处理,和已经通过测量干燥前后重量的差异,通过湿重百分比 [(湿重 - 干重) / 湿重], 评估肺脏组织中水的重量。

[0283] BAL 液体分析。通过在肺的右中叶插入管,连续三次注入 20ml 生理盐水然后再慢慢抽吸出来的方法获取 BAL 液。该液体用来评价蛋白质含量 (微血管损伤的反映) 和细胞因子浓度 (IL-1、IL-6、IL-8、IL-10、IFN- $\gamma$ , 和 TNF- $\alpha$ )。用一片细胞离心涂片器,采用细胞学染色法,来提供总数和各种细胞成分的百分比,包括上皮细胞、嗜中性粒细胞和嗜中性的巨噬细胞 / 单核细胞,以此来测定 BAL 液中的细胞计数。肺泡巨噬细胞将被分离,过夜培养,然后在第二天评价他们的细胞因子对于 LPS 的响应。细胞-金属蛋白酶 -2 和 -9、弹性酶以及髓过氧化酶的液体水平作为组织损伤过程中重要的活性嗜中性白细胞分泌物的反映,将通过已经成熟的测定法来测量。

[0284] 急性肾损伤 (AKI) 测量

[0285] 近期的临床数据清楚表明,嗜中性白细胞明胶酶联合的脂钙蛋白 (lipocalin) (NGAL) 是对 CPB 后的 AKI 的一个早期的生物标记。CPB 之后 2 小时,尿液和血清中 NGAL 的含量是一个非常特殊和敏感的 AKI 的前兆性标记,随后在血清肌氨酸酐和 BUN 中不断增加。血清和尿液要在基线处收集,即在所有动物 CPB 之后一小时 CPB 终止和 q 时。NGAL 水平将由对猪敏感的 ELISA 测定法来测定。NGAL 水平的差异将反映出这个动物模型的 AKI 的程

度。

[0286] 血清化学 (Serum chemistries) 将用一个全自动的化学分析仪来测量。包括：IL-1、IL-6、IL-8、IL-10、IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  (R&D Systems) 的细胞因子的水平, 将采用市售的对猪细胞因子特异反应的 ELISA 分析成套工具测量。获取 BAL 液来测定细胞计数和细胞类型分布, 作为测量血管泄漏的蛋白质, 以及细胞因子水平, 包括：IL-1、IL-6、IL-8、IL-10、IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$ 。

[0287] 心血管及生化的数据将用反复测量方差法 (ANOVA) 来分析。利用 T 检验 (Student's T test) 方法, 适当选取成对的或非成对的数据, 对不同部分的血浆水平和存活时间进行比较。

[0288] 预期, 接受包含 SCID 的 CPB 系统中局部柠檬酸盐抗凝的动物将少有肺功能障碍和肺感染, 以及用 NGAL 测定的 AKI。同样还预期, 伴随嗜中性白血球减少症和白血球减少症的全身 WBC 计数度将在 3 小时降到最低值, 但两组具有相同的数量级。同样还预期, 与肝磷脂组相比, 在柠檬酸盐组中白细胞炎性指示物的释放将被抑制。

[0289] 通过引用并入

[0290] 为了所有的目的, 本文所涉及的每件出版物和专利文件的全部公开内容通过引用其全文而被并入, 如同每个独立的出版物或专利文件已被独立地表示出来。

[0291] 等同

[0292] 在不背离其精神和本质特性的情况下, 本发明可以以其他特定形式实施。因此, 上述实施方式被认为在其所有方面都是对本文所描述的发明的说明而非限制。因此, 本发明的范围是通过附加的权利要求书所指明, 而非前述的说明书, 并且认为, 所有落入本权利要求的等价的意思和范围内的改变都包含在其中。

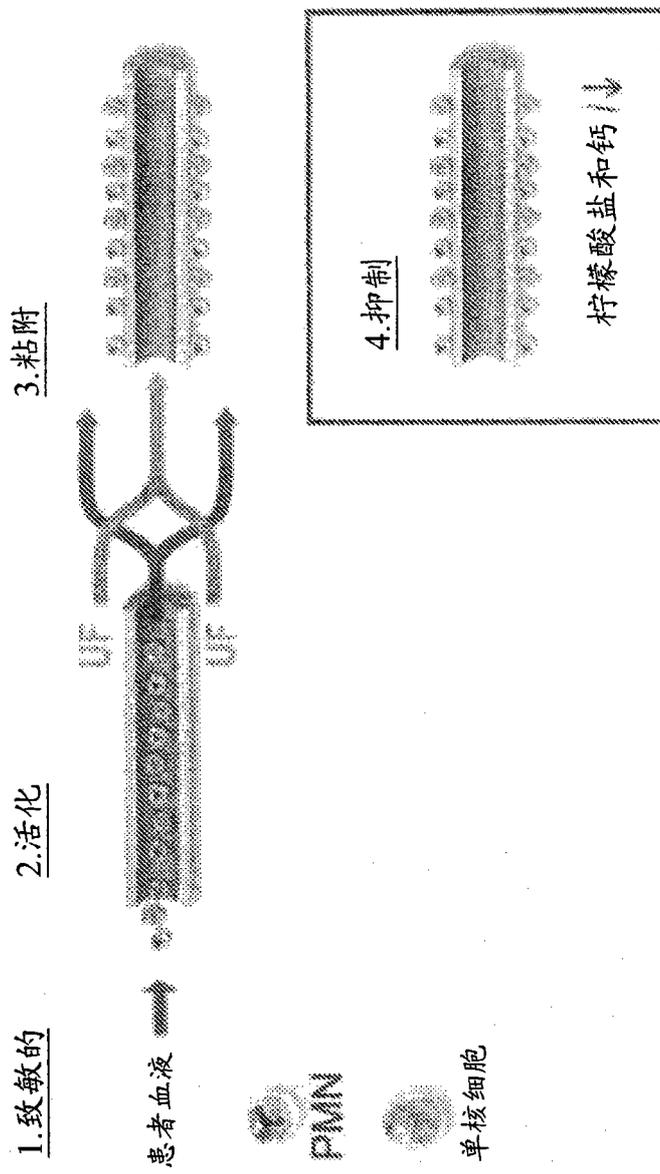


图 1

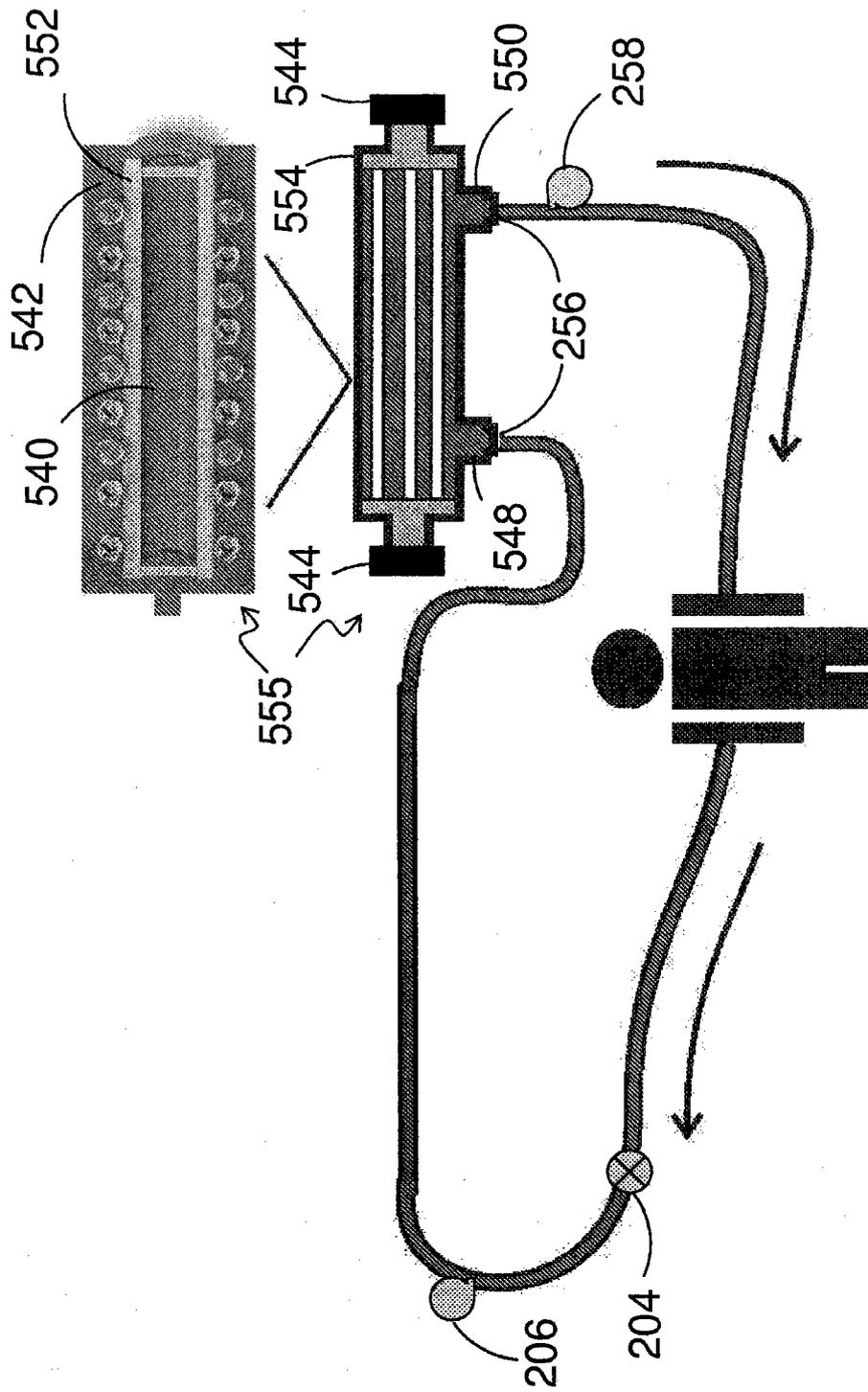


图 2A

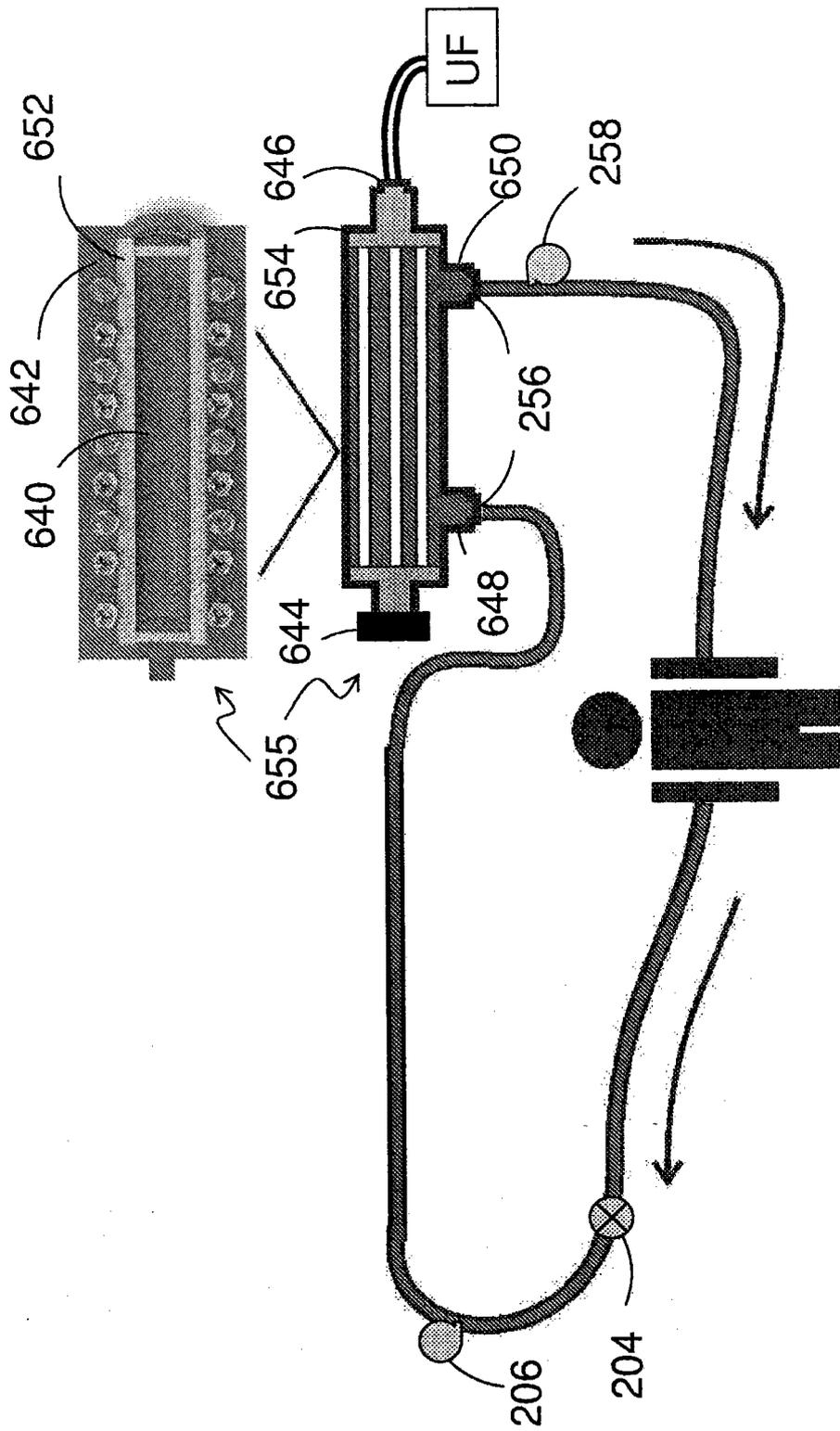


图 2B



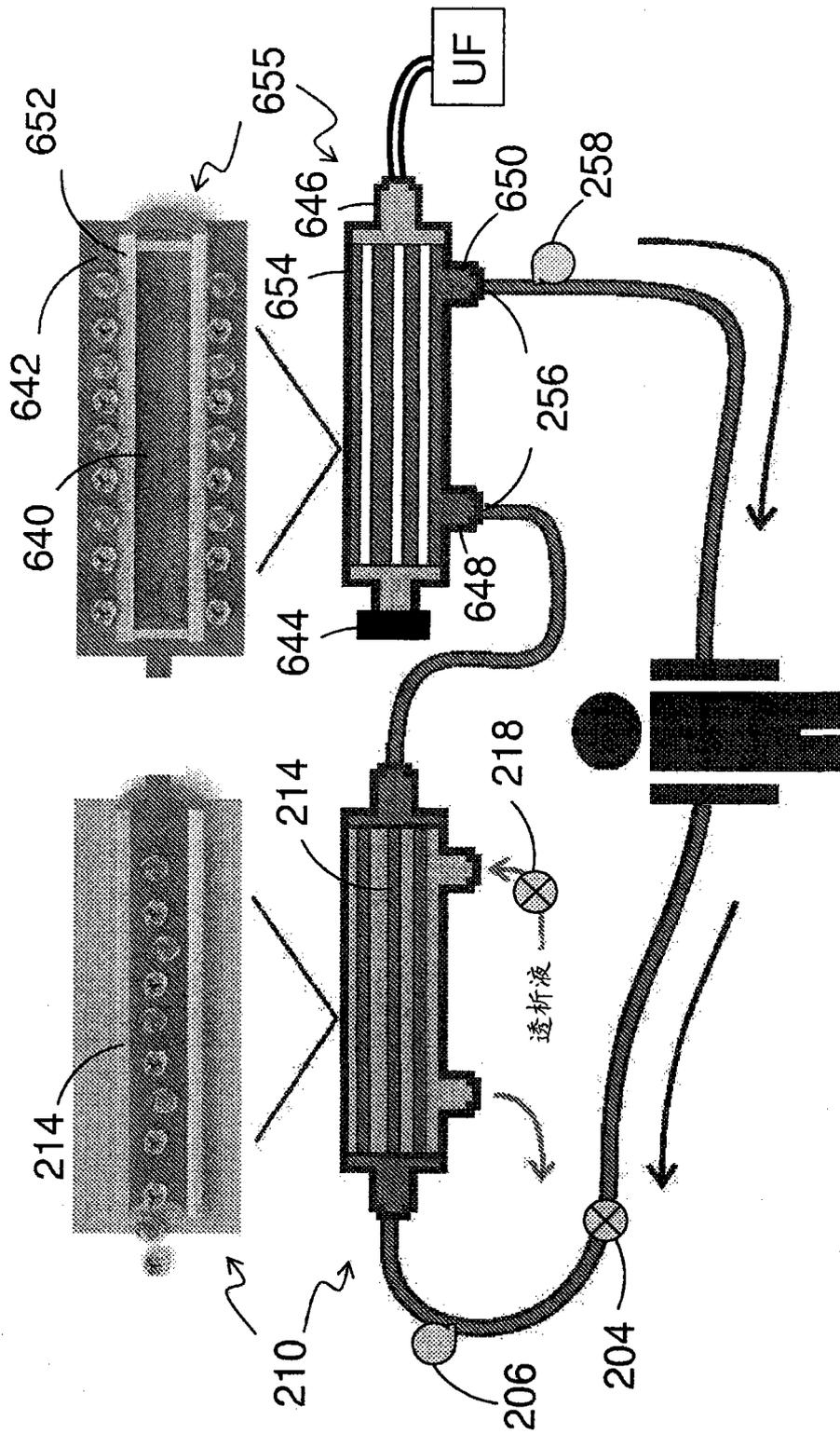


图 2D

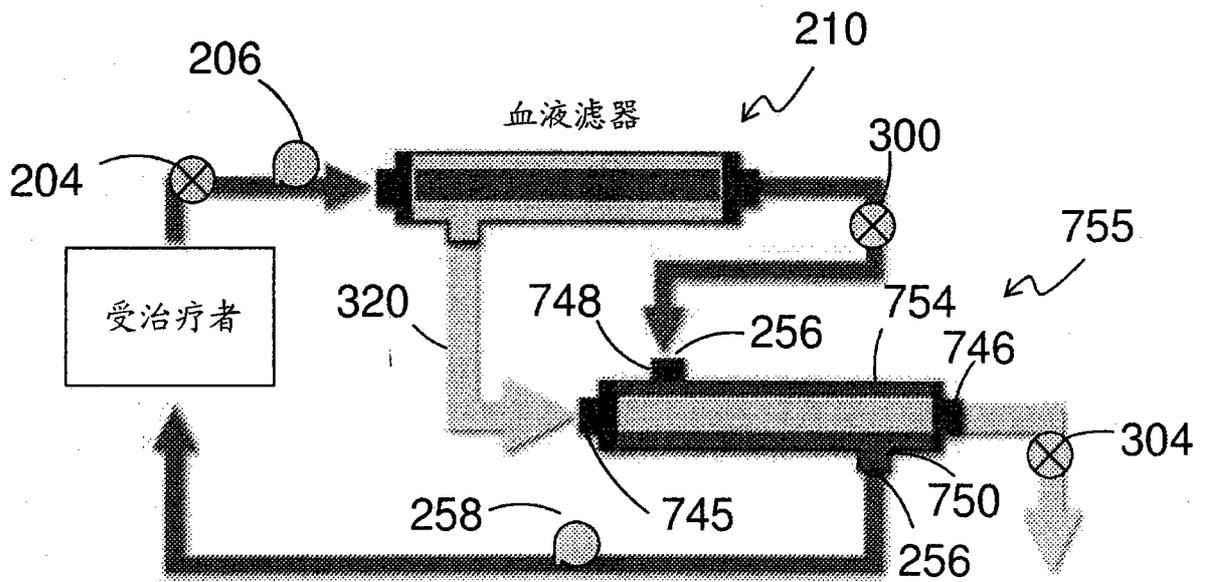


图 3

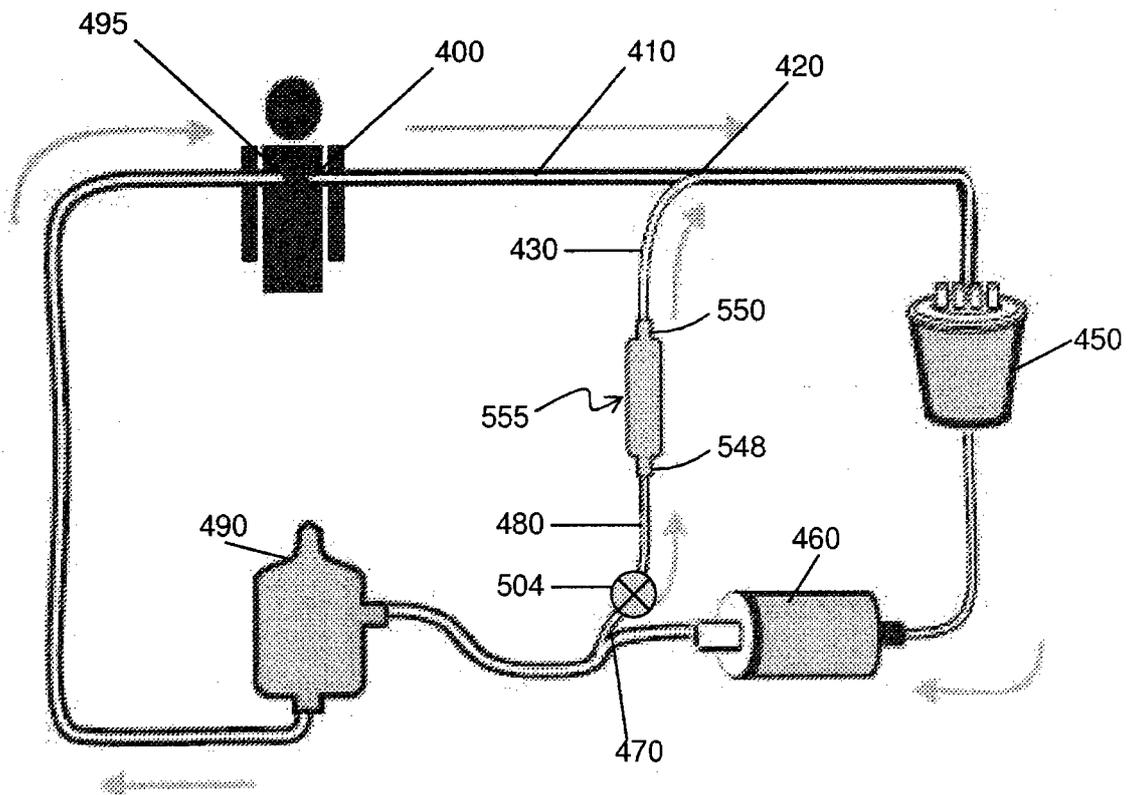


图 4A

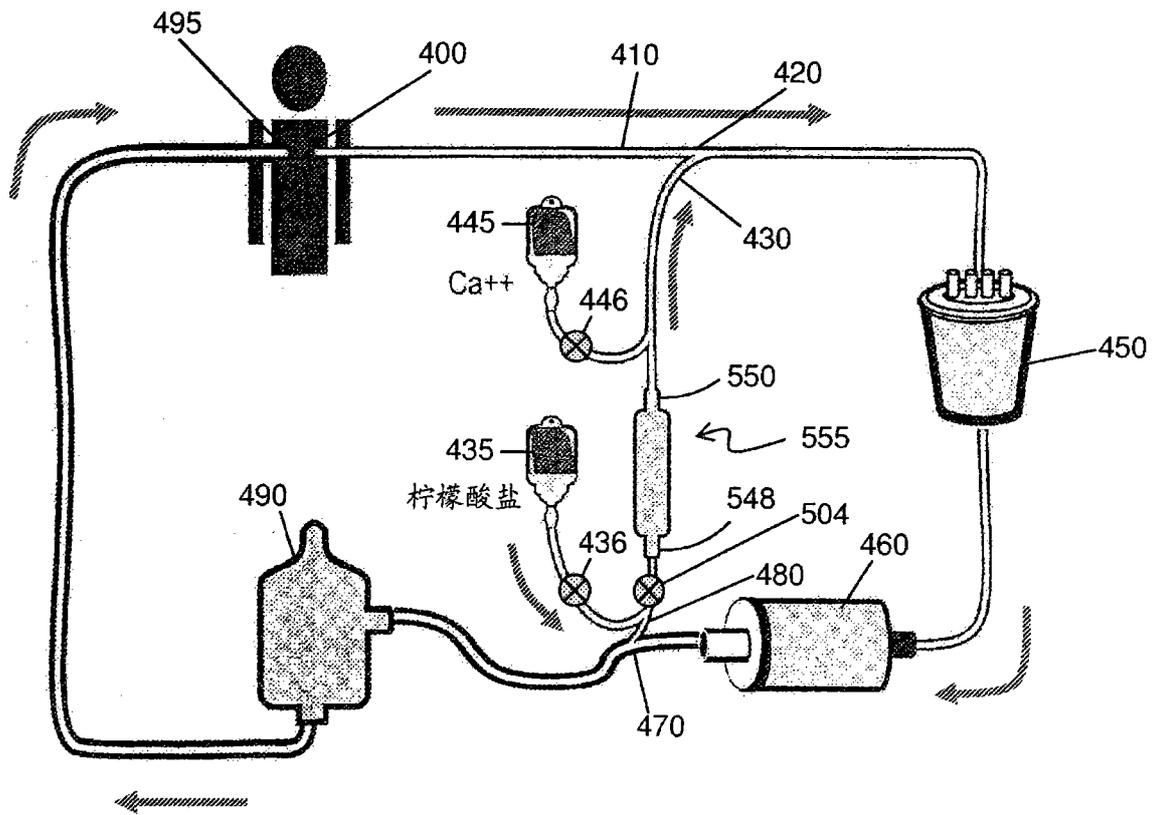


图 4B

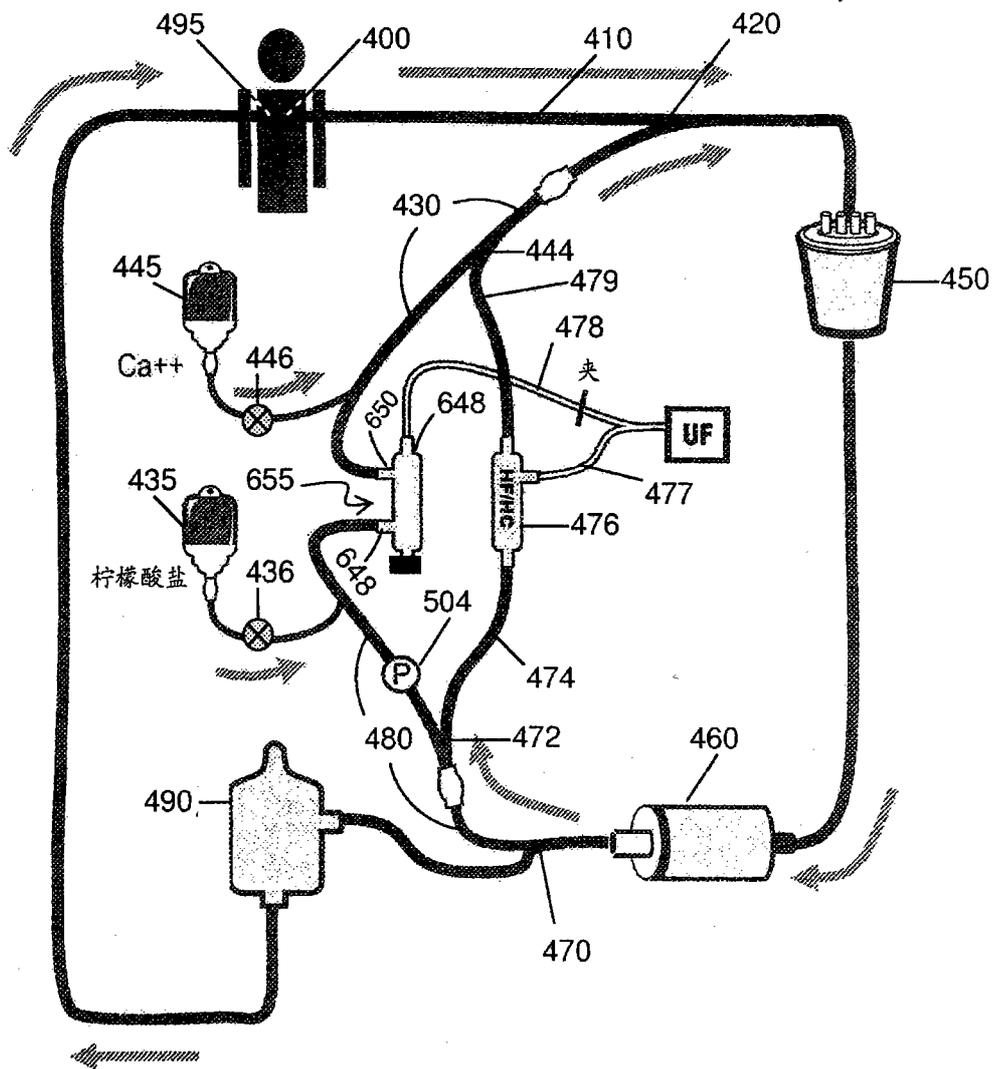


图 4C



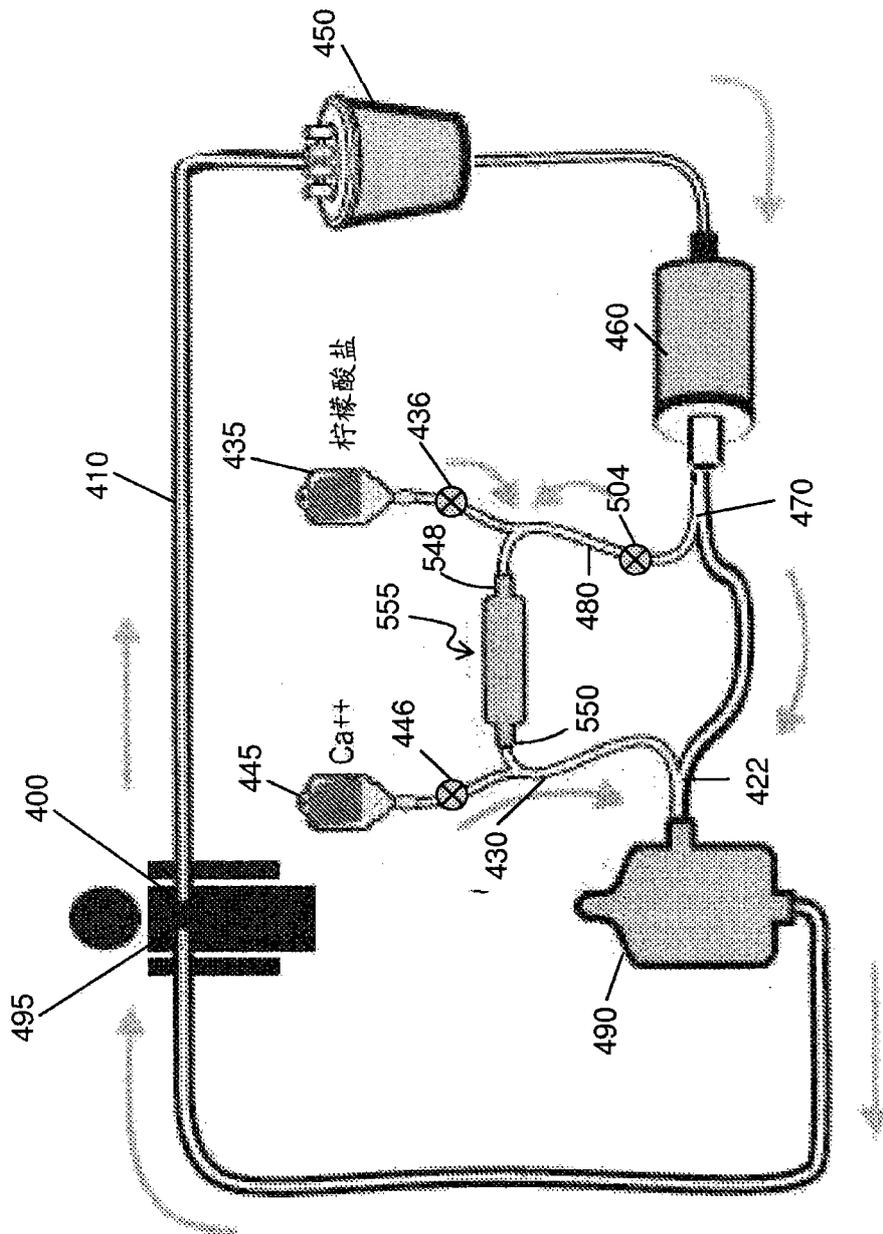


图 4E

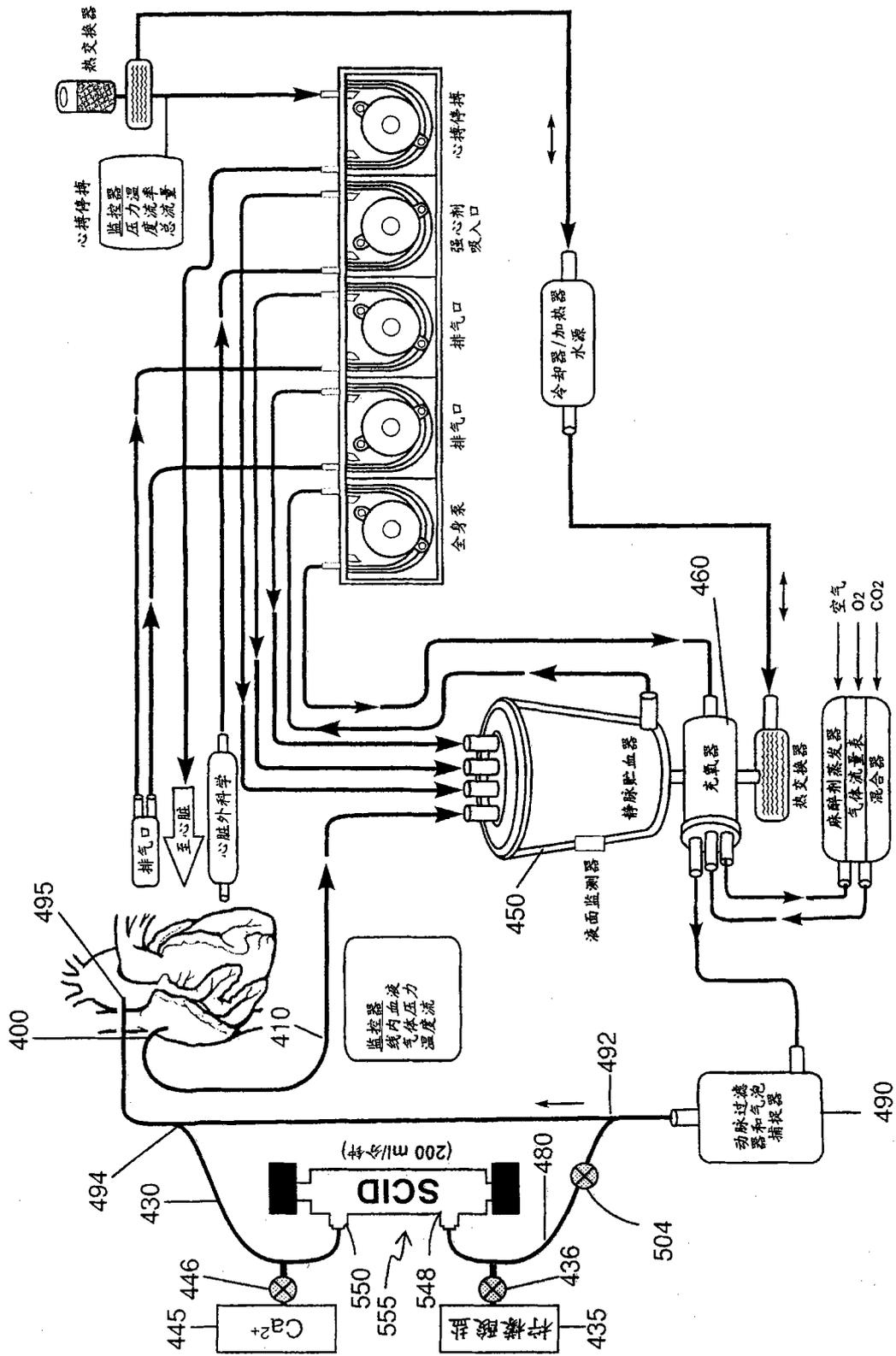


图 4F

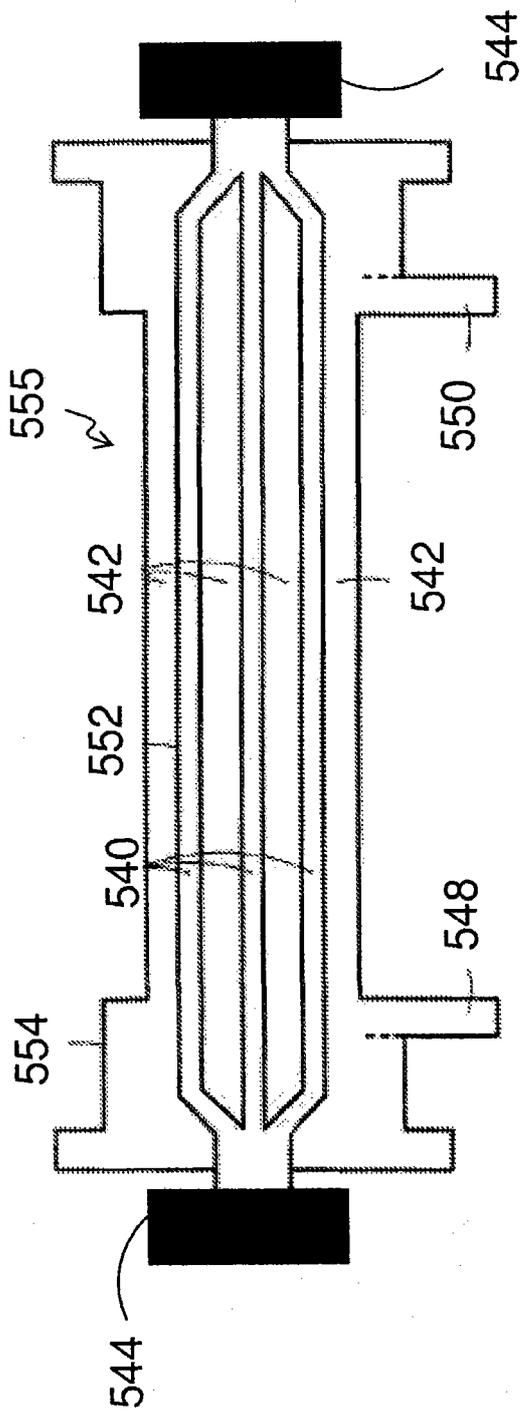


图 5

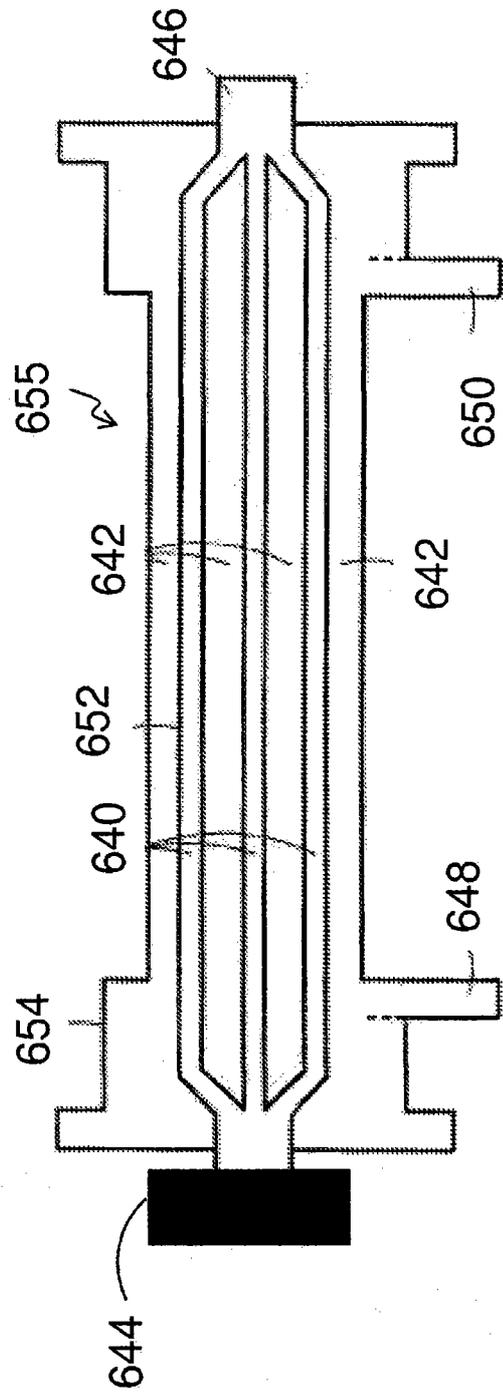


图 6

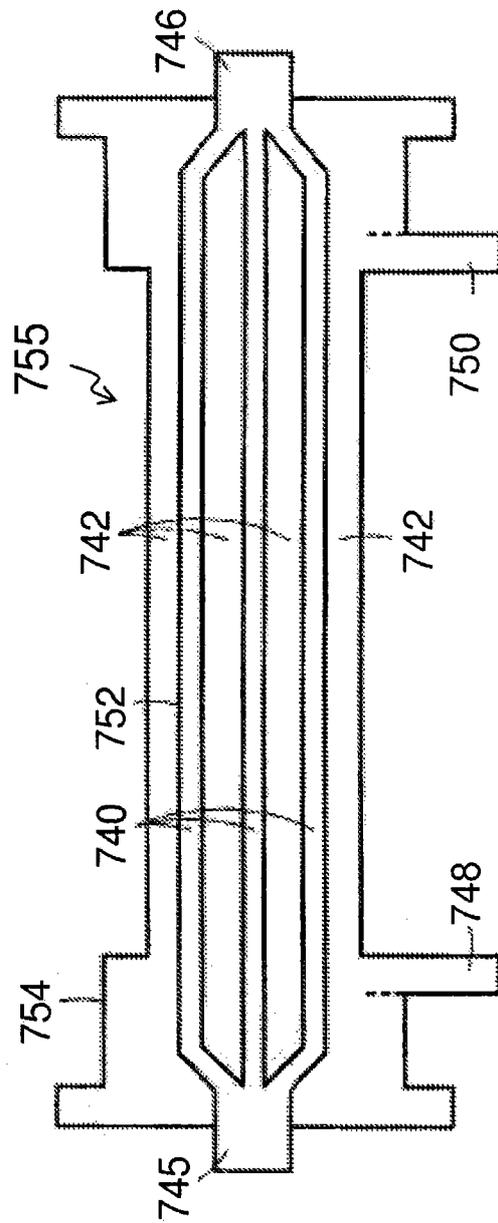


图 7

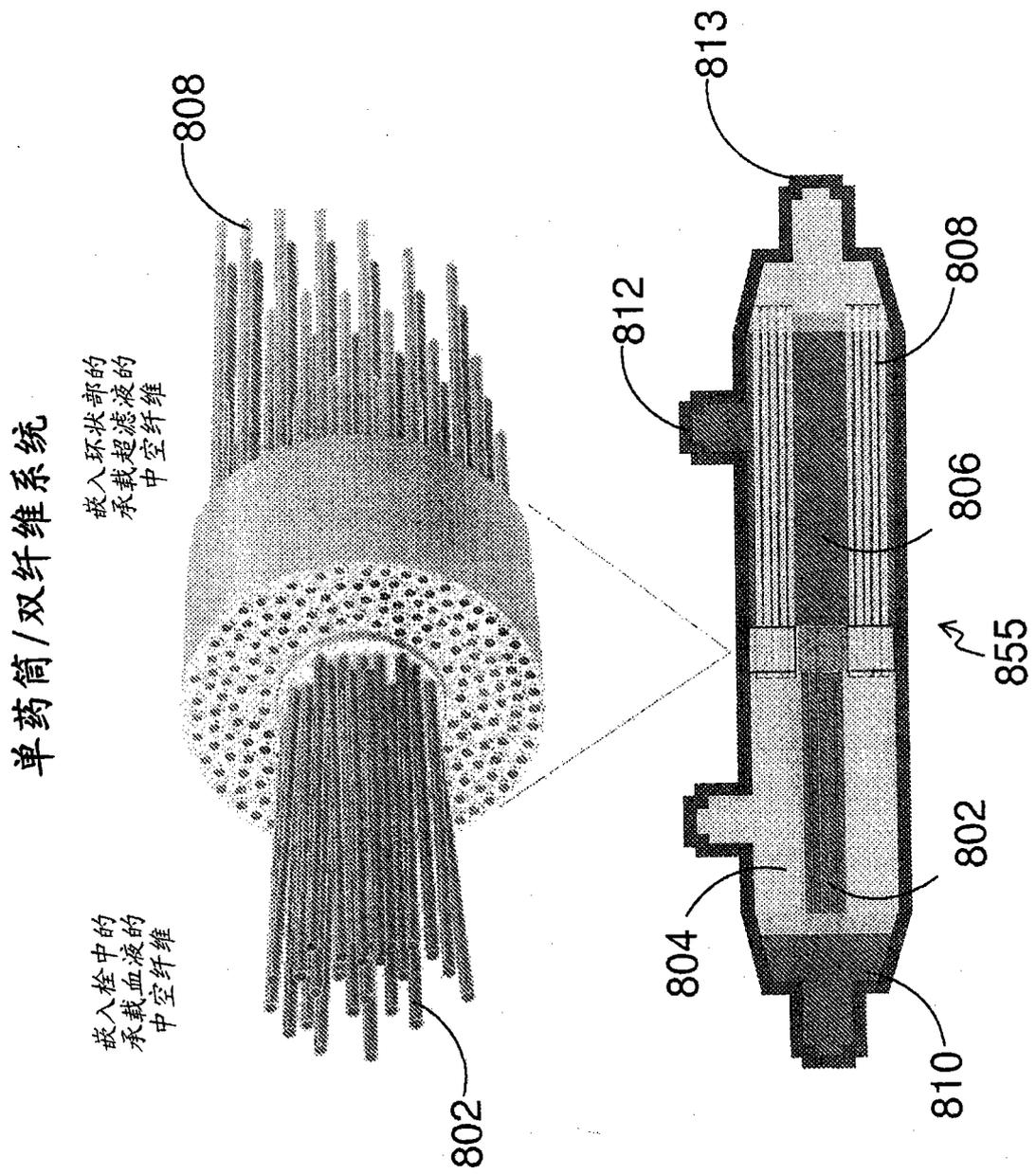


图 8

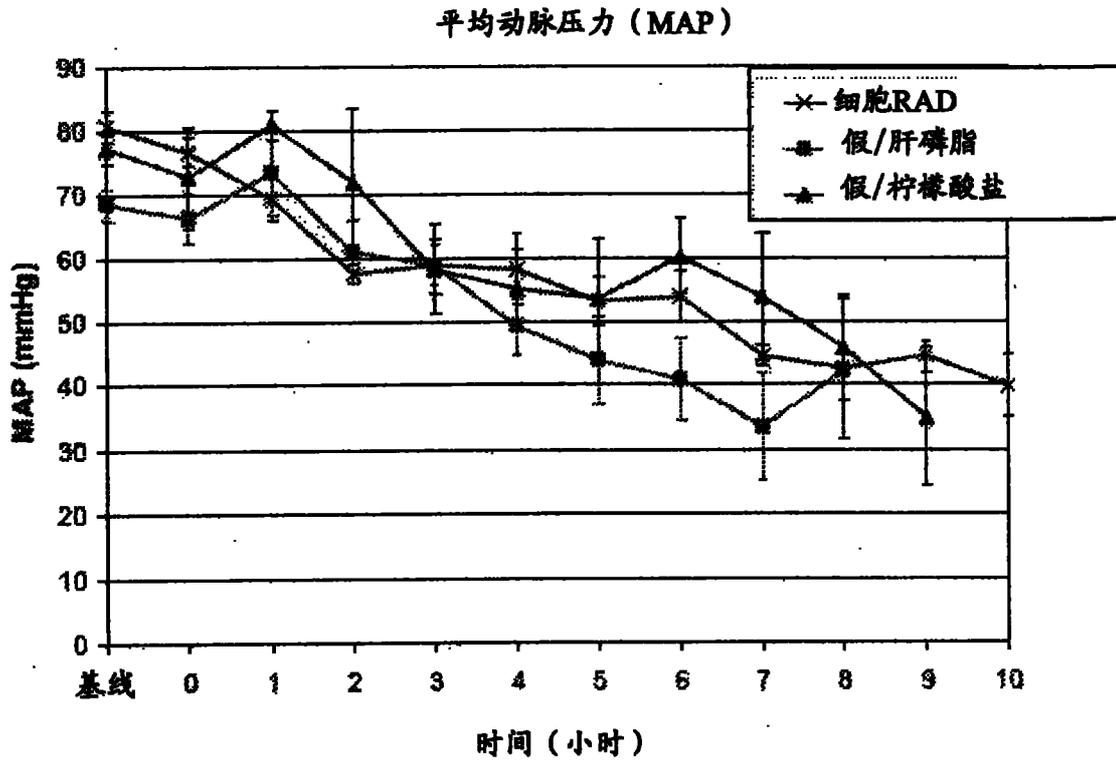


图 9

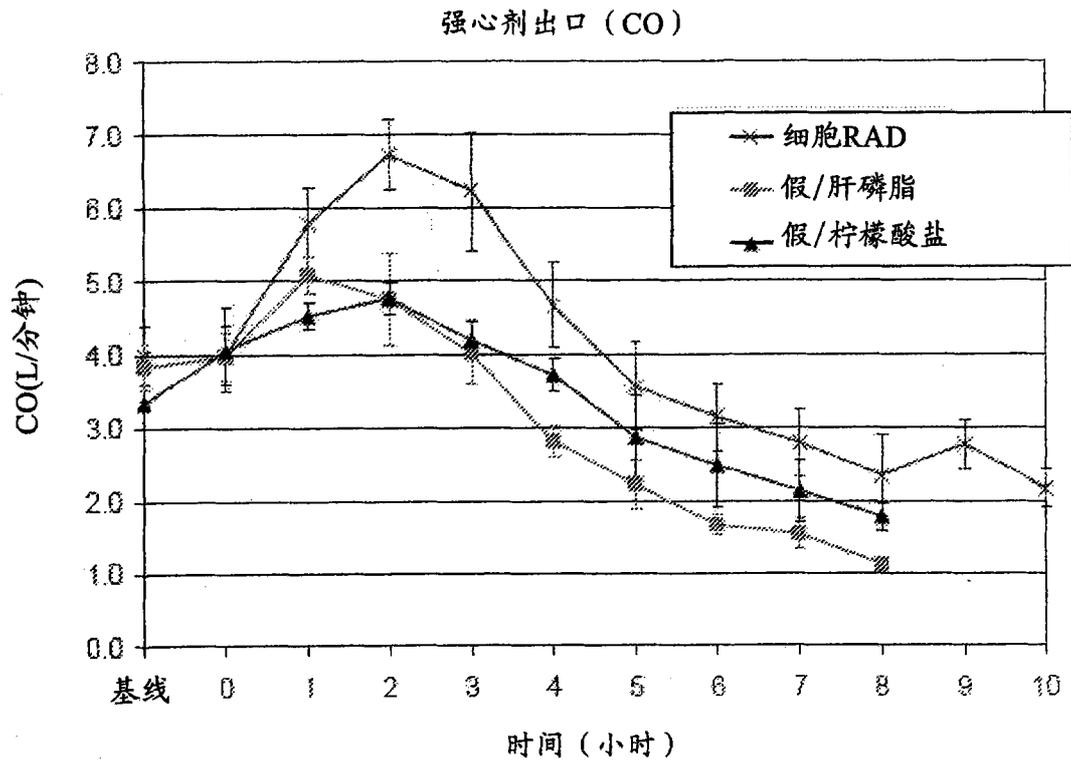


图 10

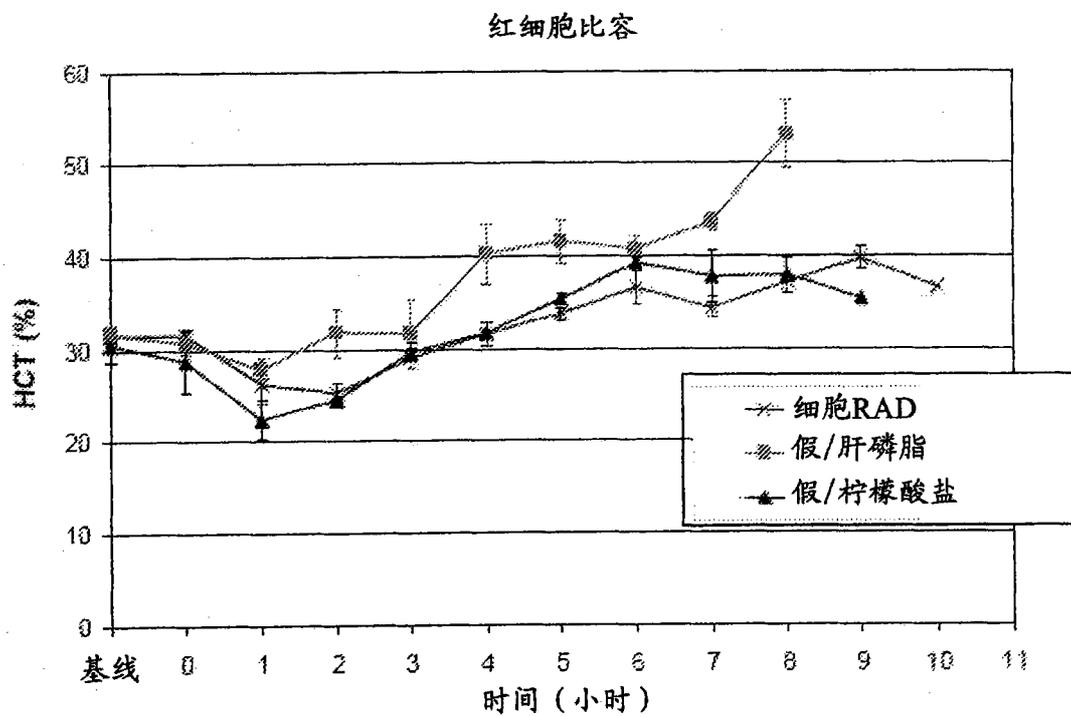


图 11

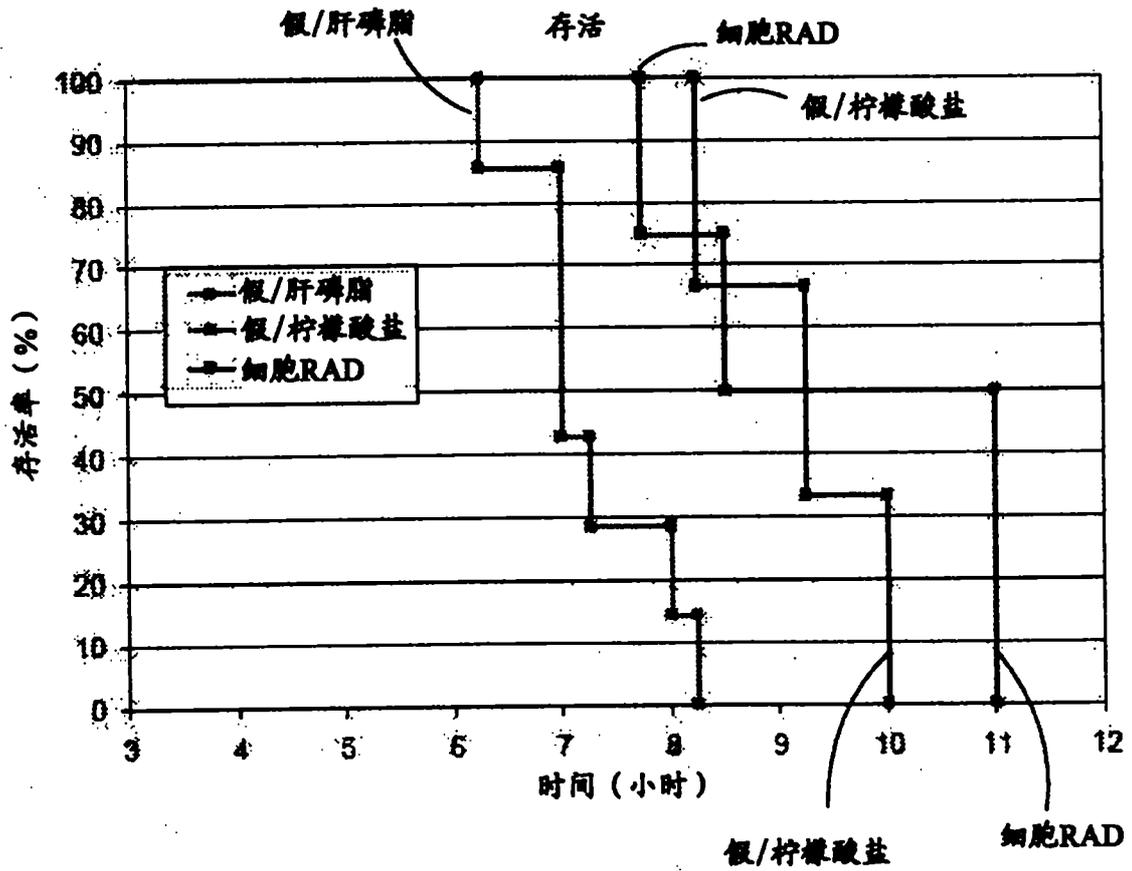


图 12

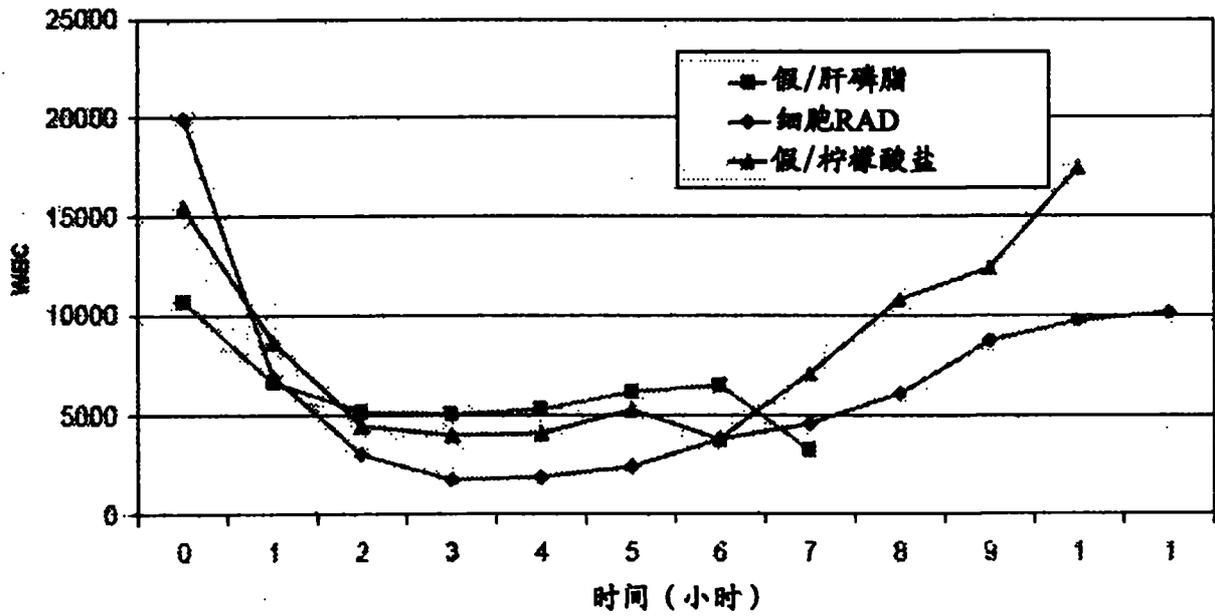


图 13

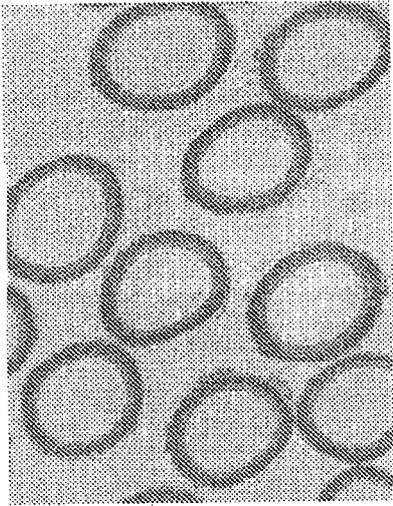


图 14A

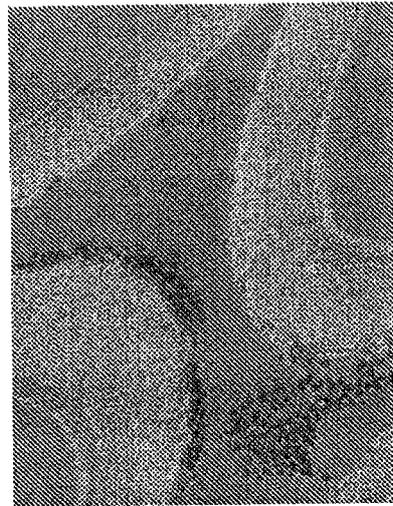


图 14B

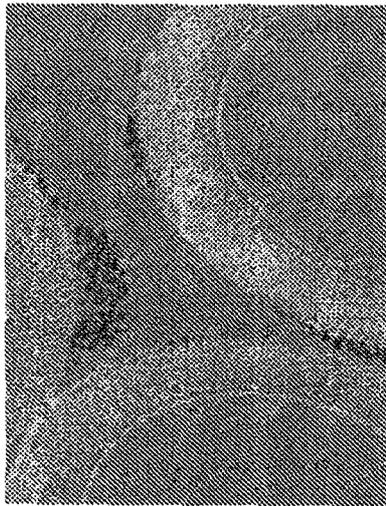


图 14C

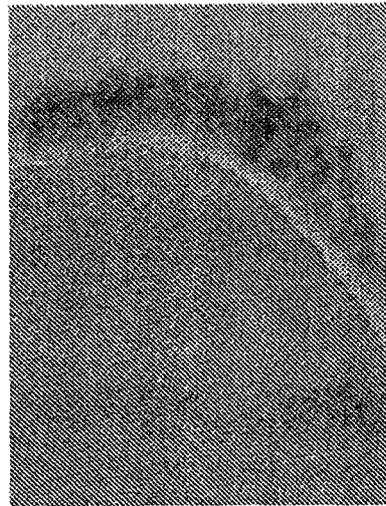


图 14D

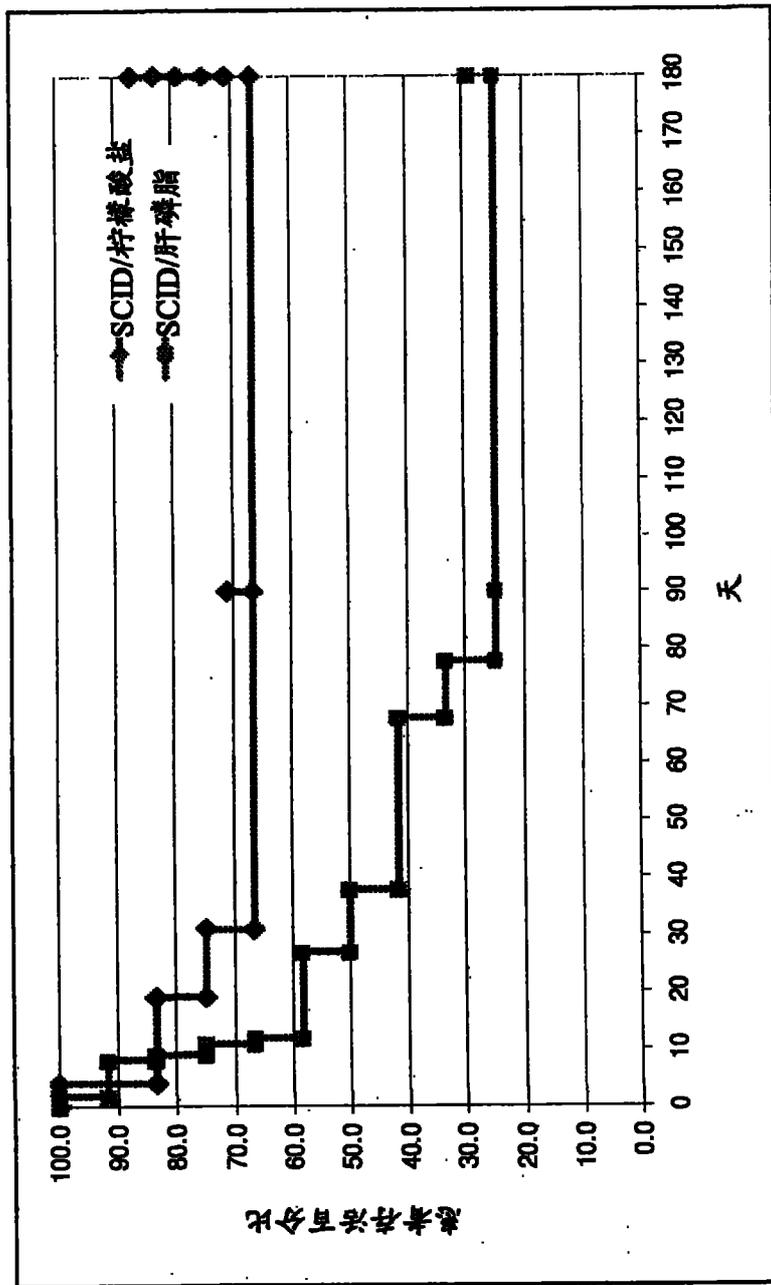


图 15

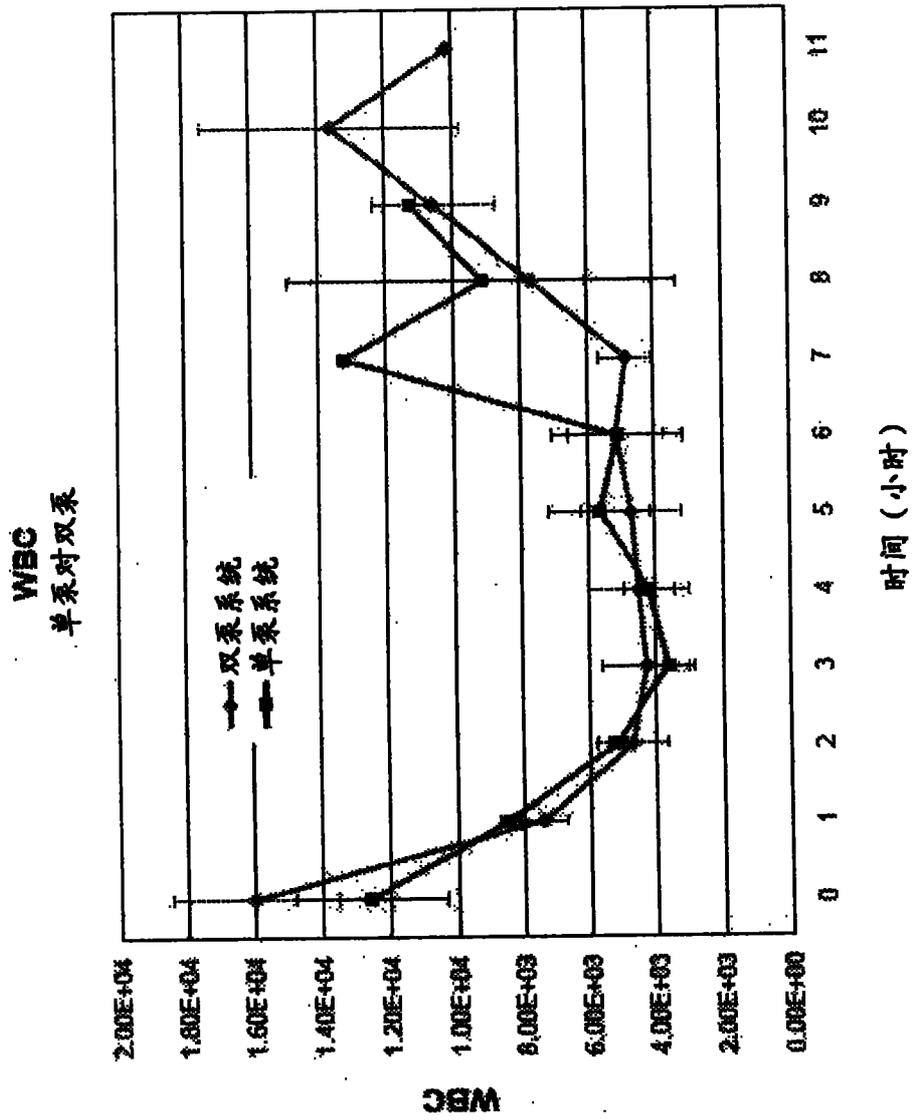


图 16A

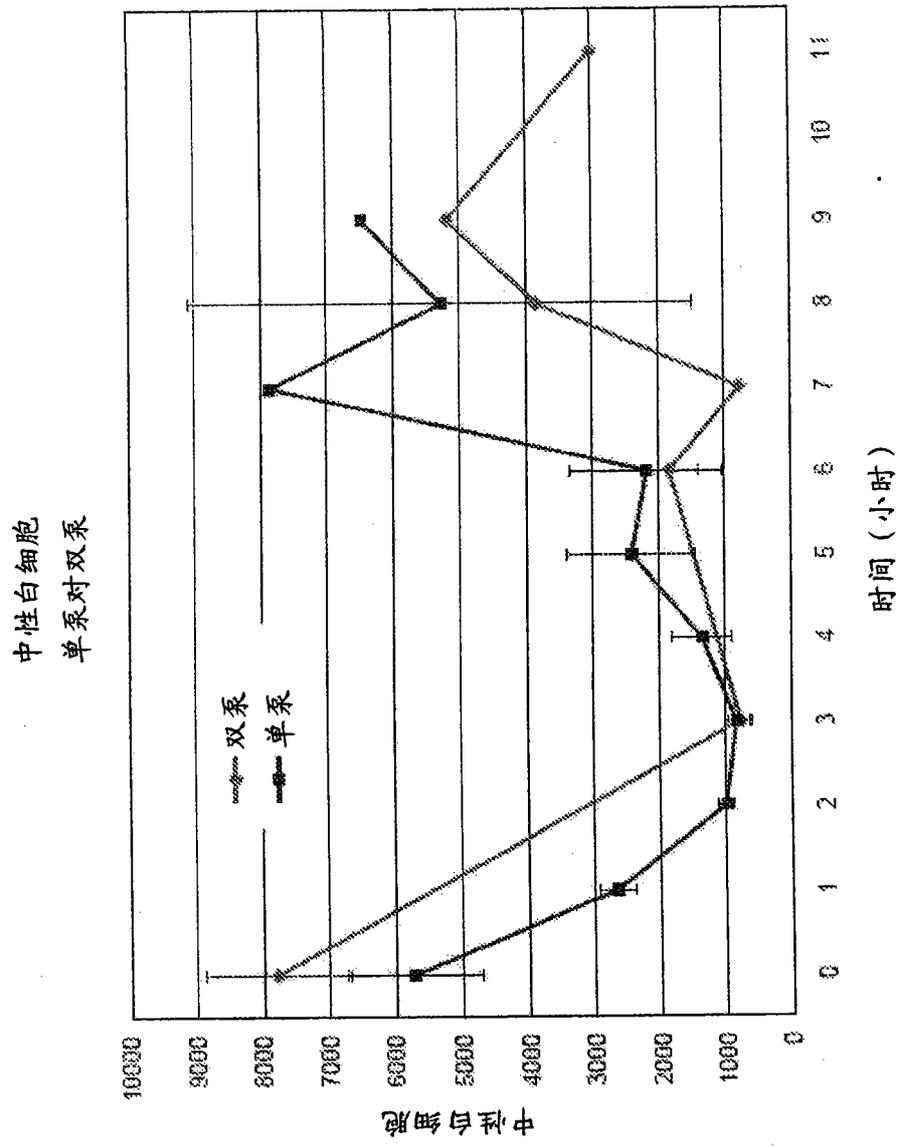


图 16B

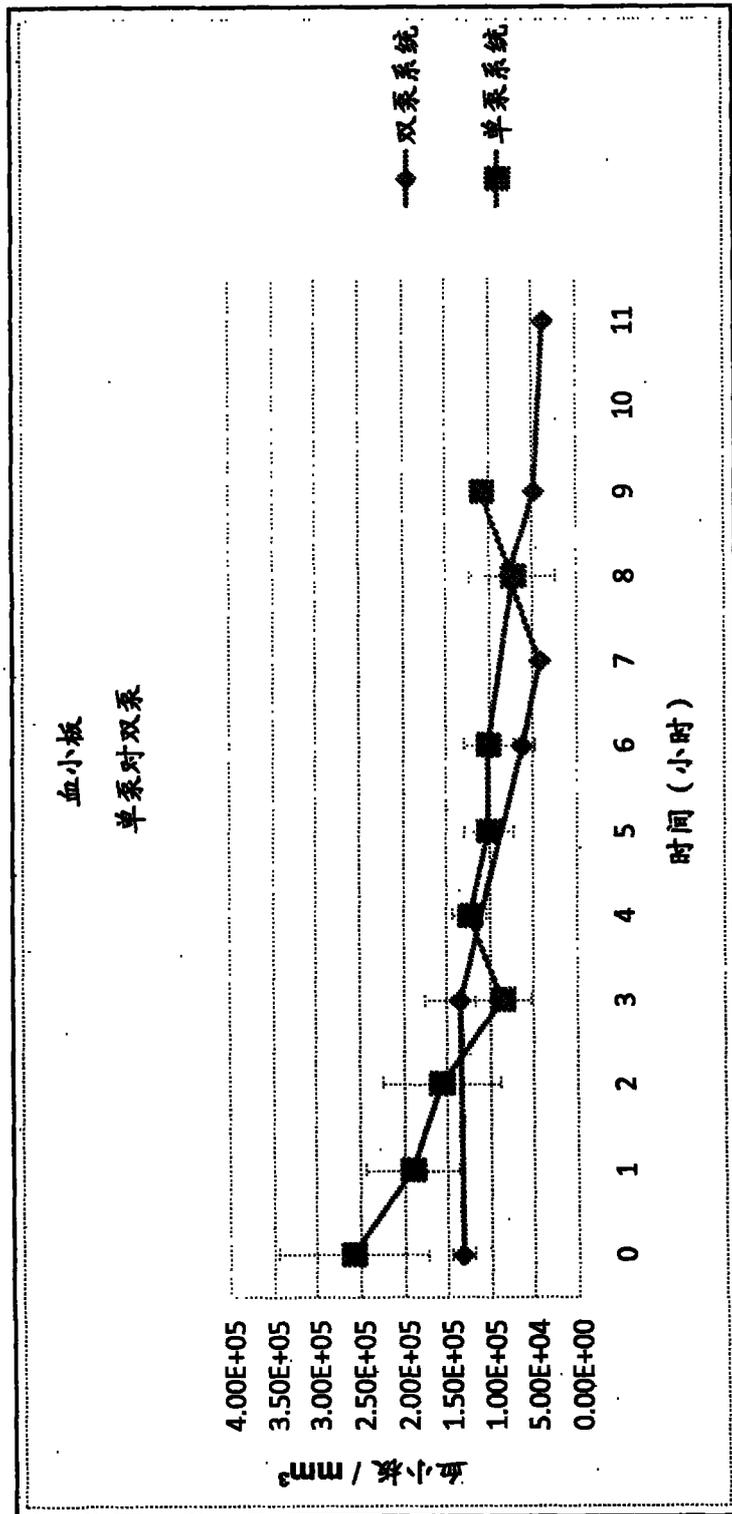


图 17

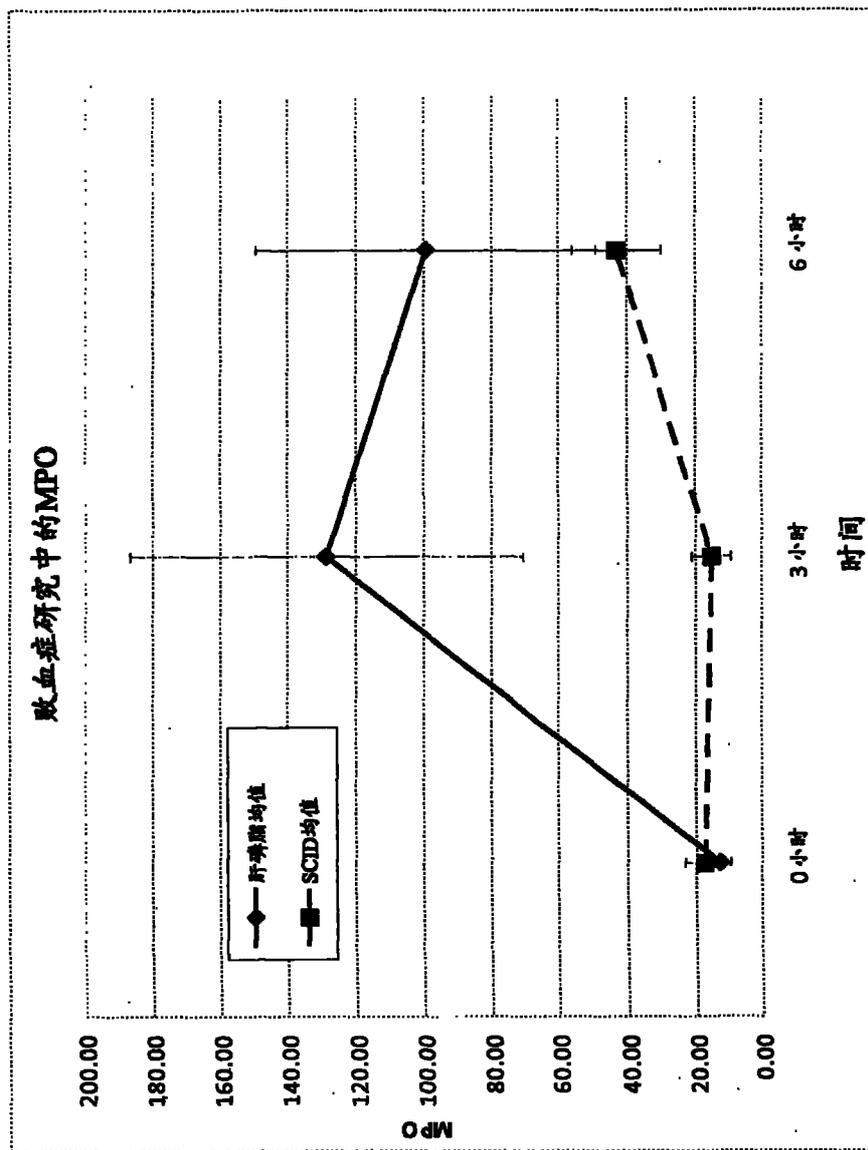


图 18

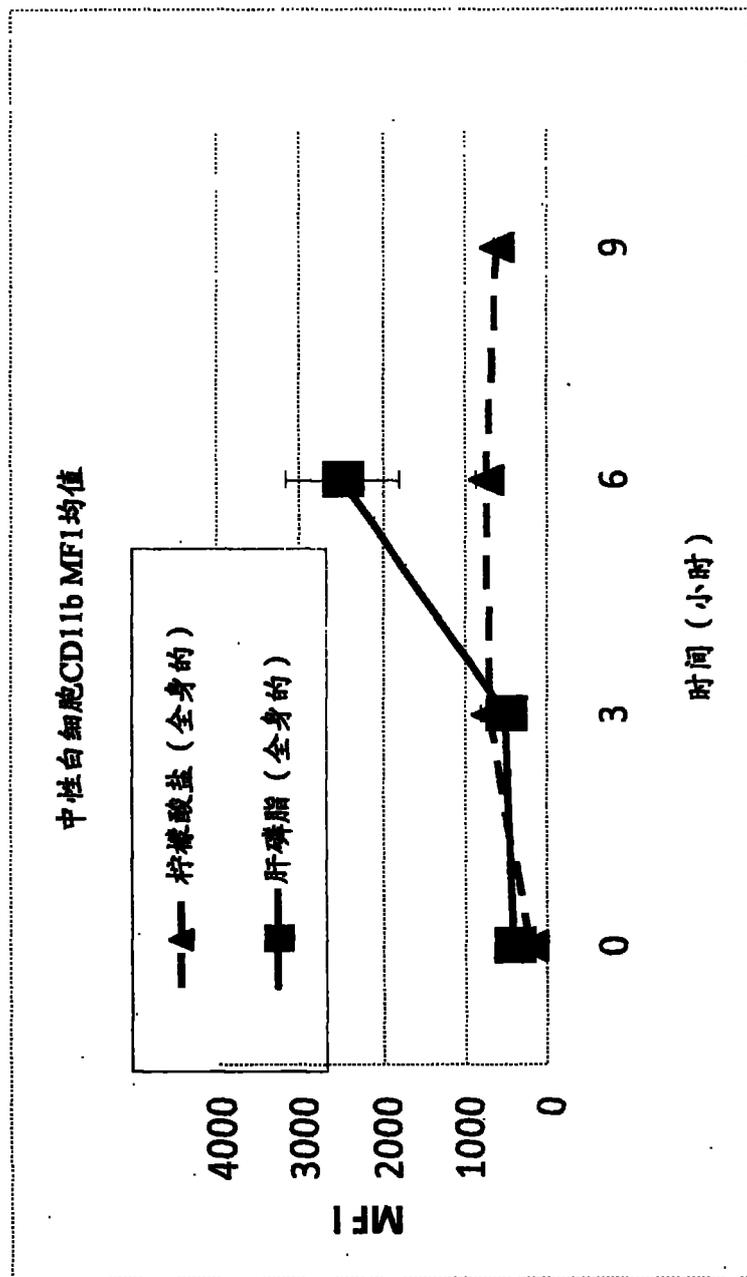


图 19

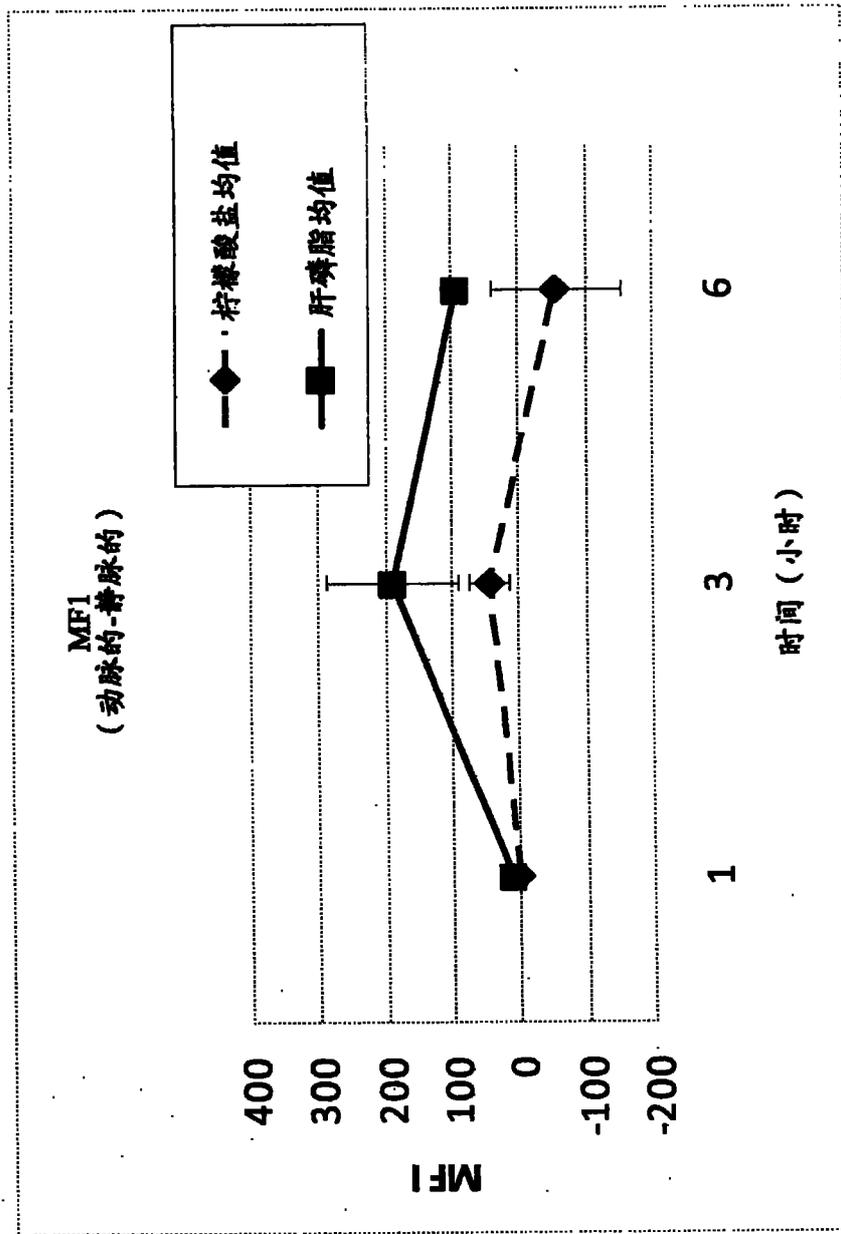


图 20

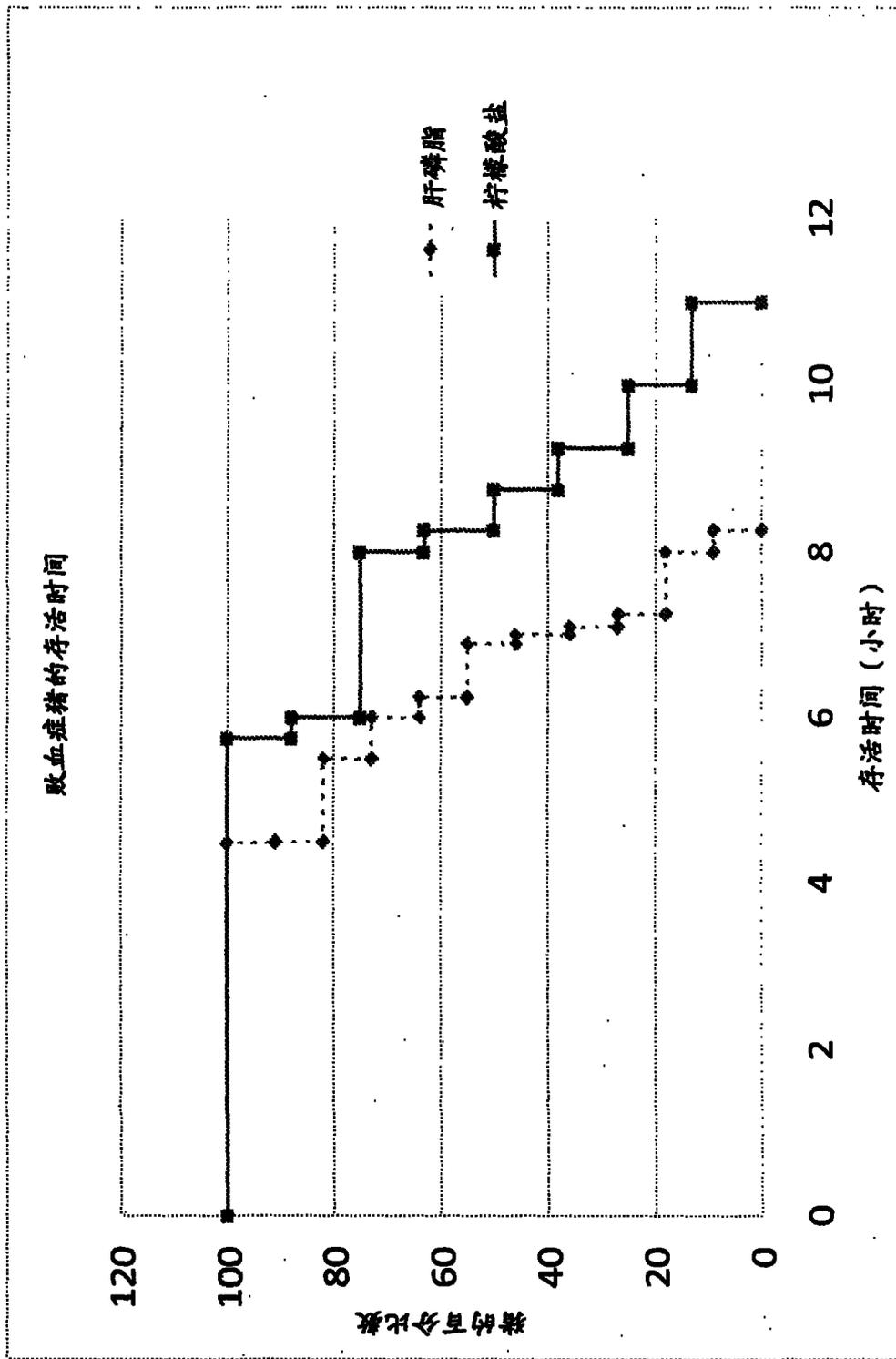


图 21

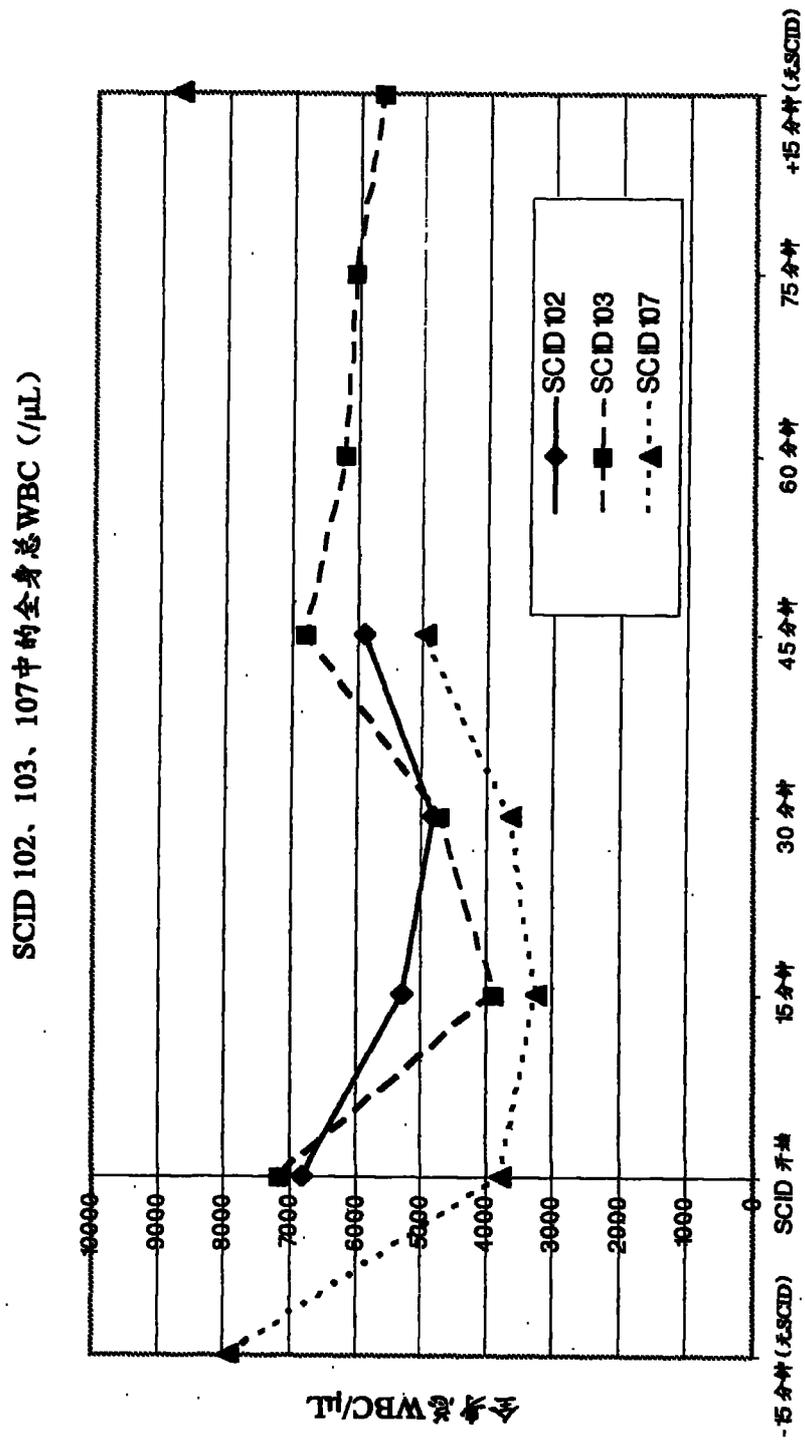


图 22A

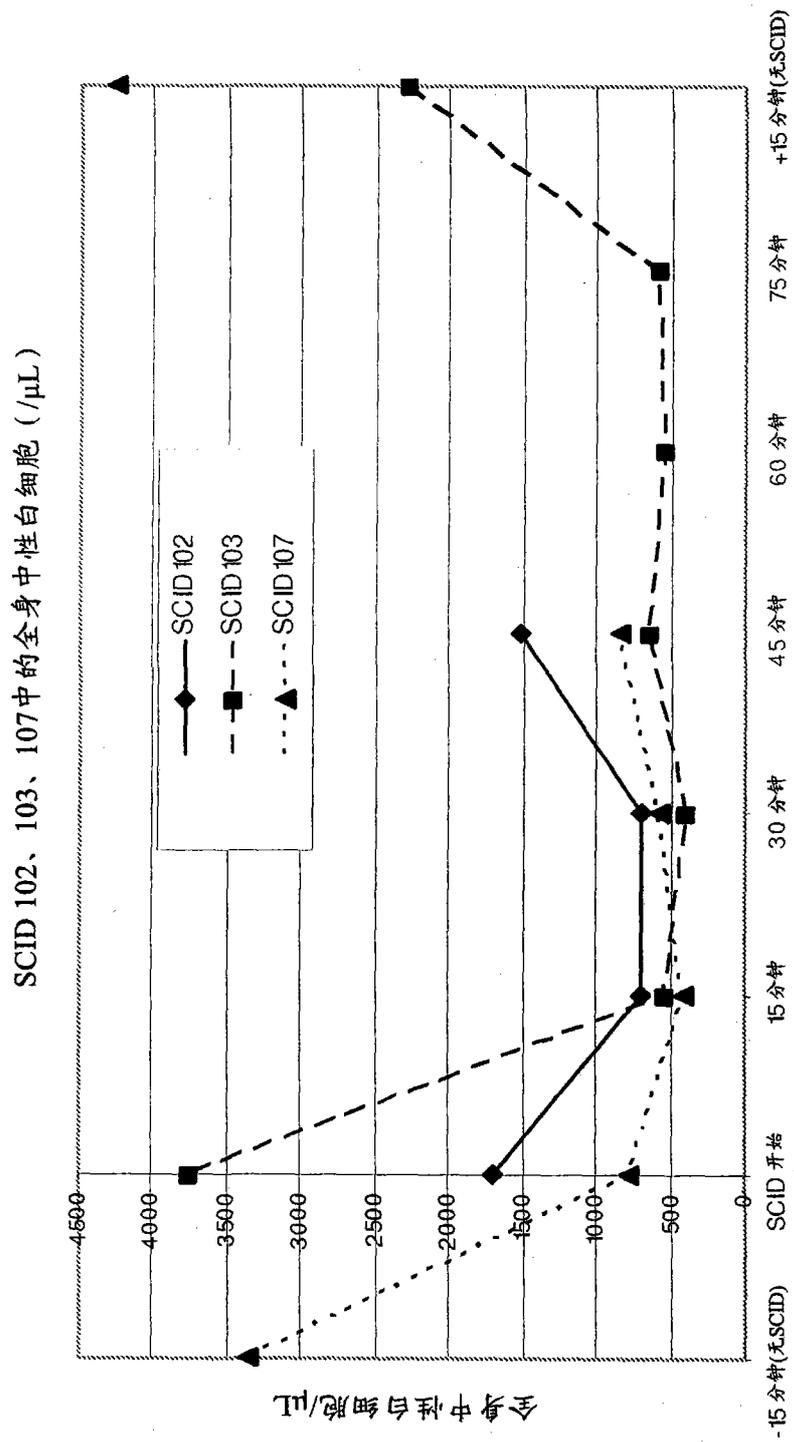


图 22B



SCID 102、103、107中的全身总单核细胞( $\mu\text{L}$ )

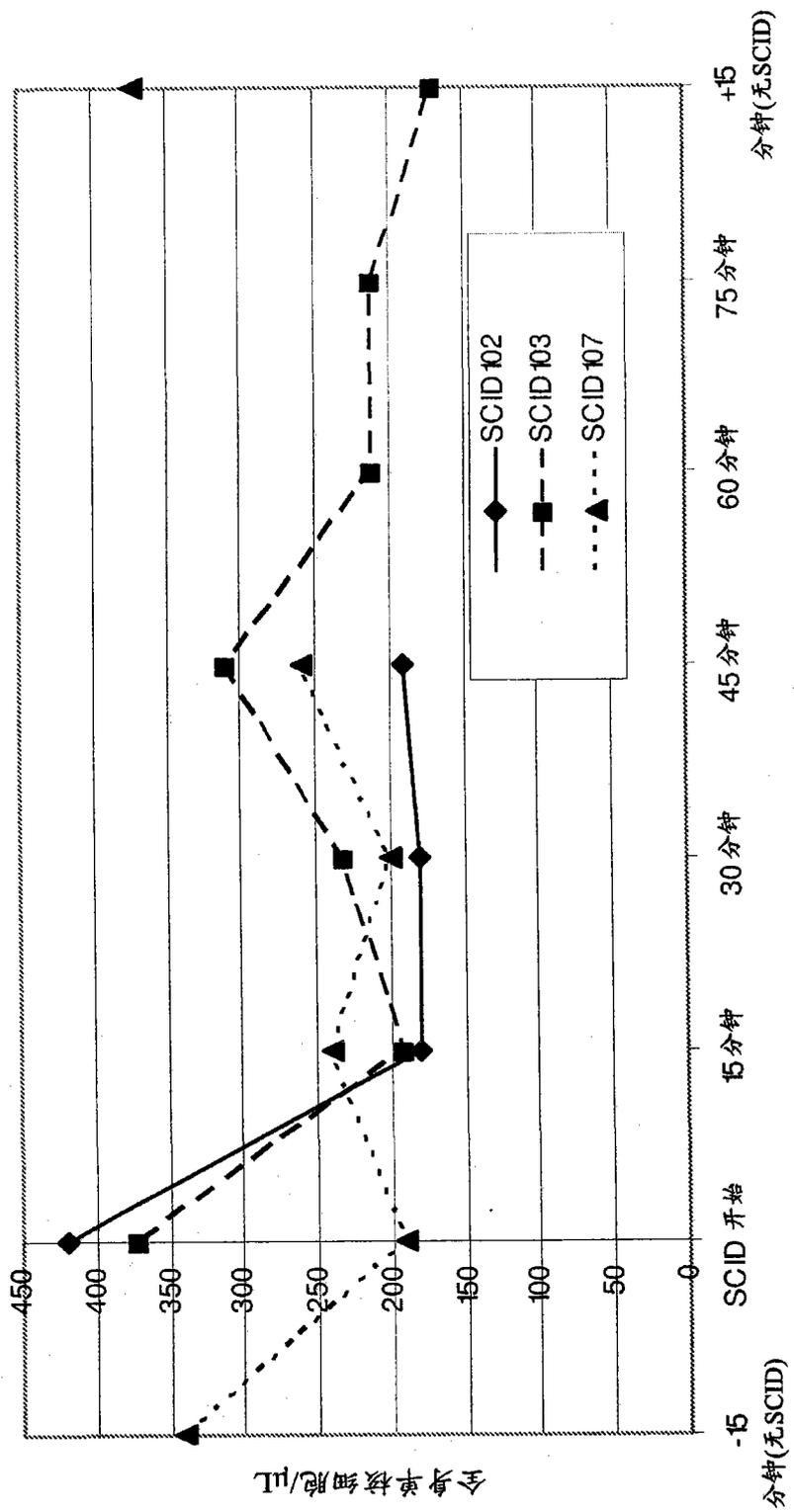


图 22D

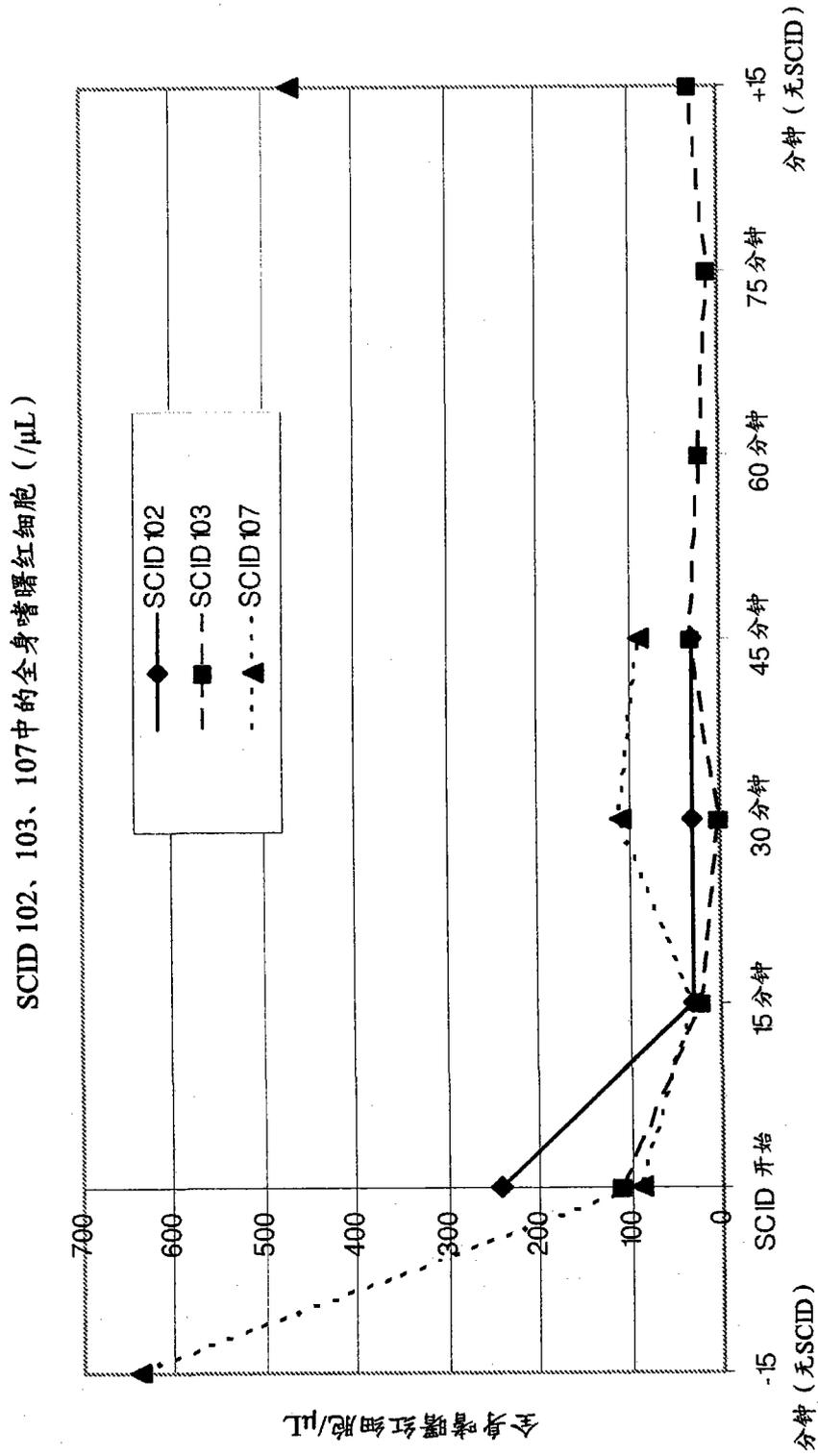


图 22E



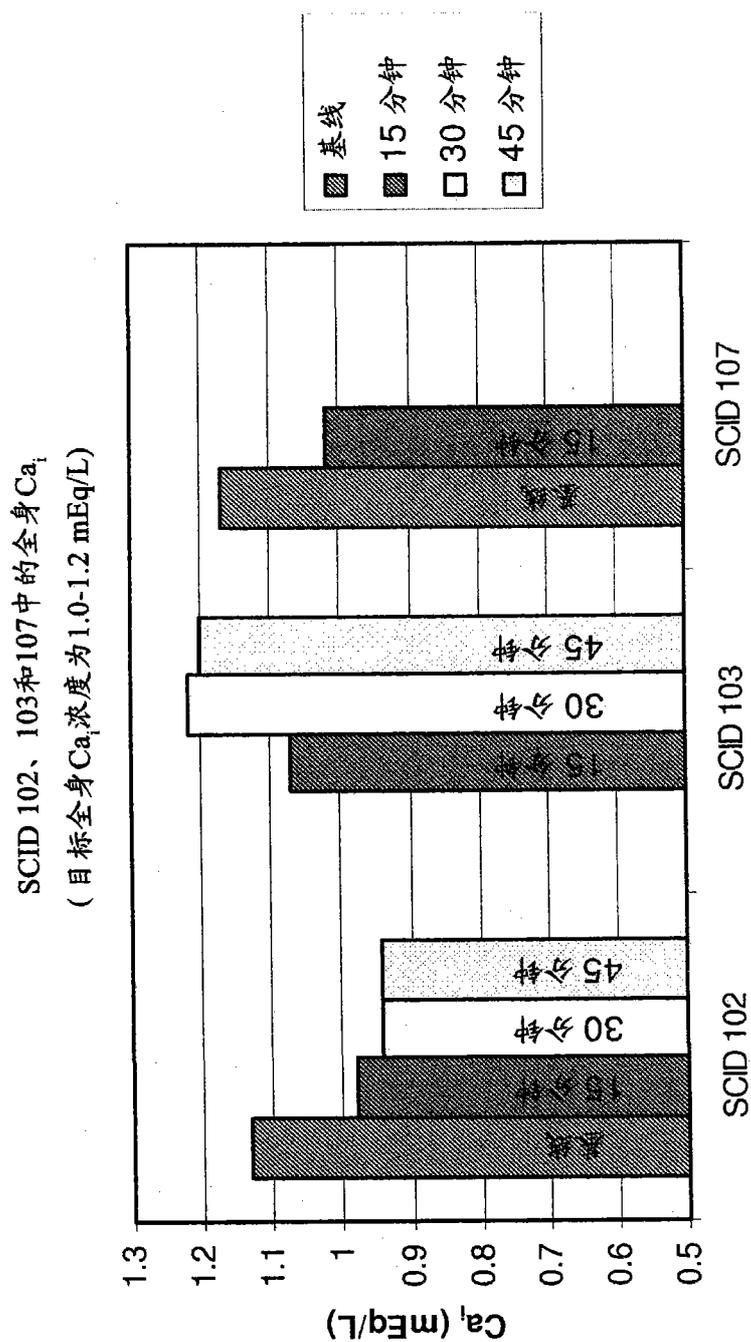


图 23A

SCID 102和107中的回路Ca<sub>i</sub>浓度  
(目标回路Ca<sub>i</sub>浓度为0.2-0.4 mEq/L)

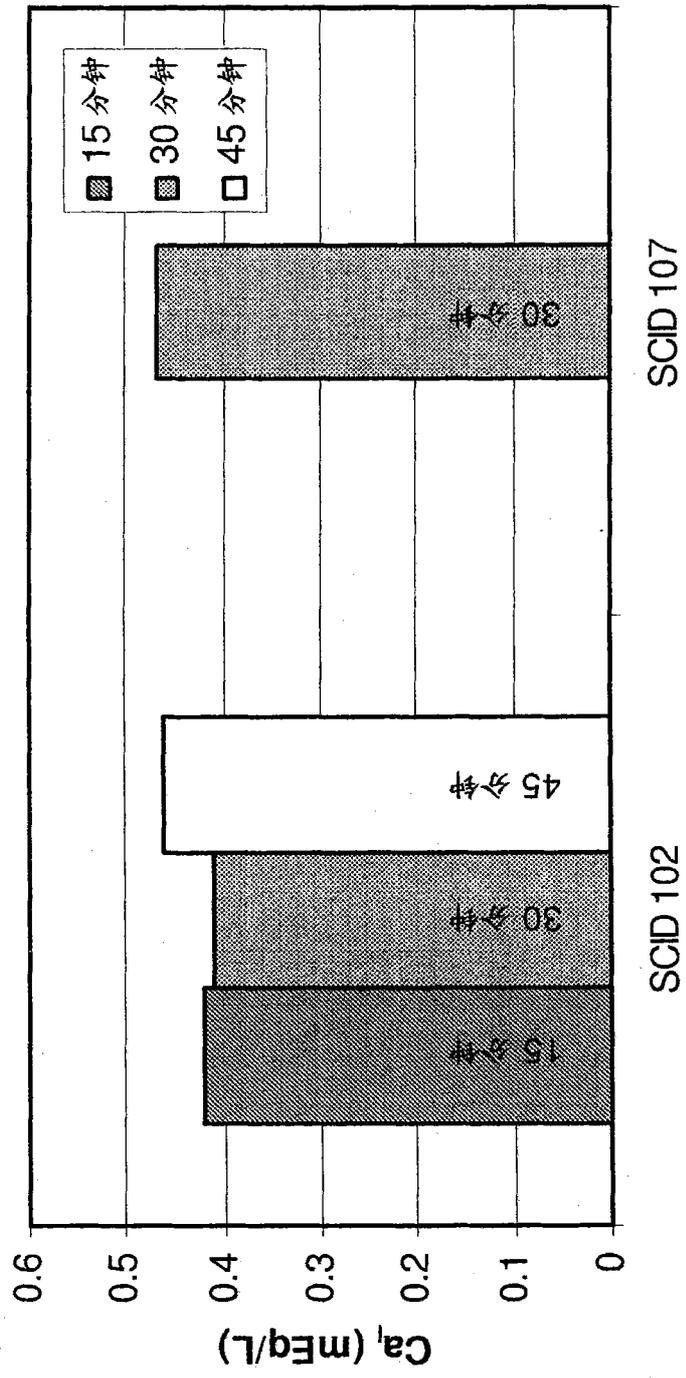


图 23B