

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 14/805

C07K 1/14 C07K 1/18



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 99808286.4

[45] 授权公告日 2004 年 9 月 15 日

[11] 授权公告号 CN 1166689C

[22] 申请日 1999.6.21 [21] 申请号 99808286.4

[30] 优先权

[32] 1998.7.10 [33] US [31] 09/113,953

[86] 国际申请 PCT/US1999/013922 1999.6.21

[87] 国际公布 WO2000/002921 英 2000.1.20

[85] 进入国家阶段日期 2000.1.5

[71] 专利权人 柏尔纯公司

地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 罗伯特·A·克特陈斯

卡尔·W·罗斯切

审查员 周霞

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 过晓东

权利要求书 6 页 说明书 50 页

[54] 发明名称 血红蛋白的纯化方法

[57] 摘要

一种制备纯化血红蛋白产品的方法，包括将血红蛋白溶液装入一种阴离子交换色谱柱。至少一种三(羟基甲基)氨基甲烷醋酸盐缓冲溶液注入该柱。该缓冲溶液的 pH 低于色谱柱的 pH，由此纯化的血红蛋白产品从该柱洗脱。在一项实施方案中，血红蛋白溶液在 pH 大于大约 8.7 时开始饱和。在另一项实施方案中，通过以至少大约十一柱空隙体积的缓冲溶液，在大约 8.2 和大约 8.6 之间的中间 pH，因此形成梯级 pH 梯度，清除杂质。在另一项实施方案中，采用的所有缓冲液是三(羟基甲基)氨基甲烷醋酸盐。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种制备纯化血红蛋白的方法，包括以下步骤：
 - a) 血红蛋白溶液装入一种阴离子交换色谱柱；和
 - b) 向该柱中注入至少一种三（羟基甲基）氨基甲烷醋酸盐缓冲溶液，所述的缓冲溶液的 pH 低于色谱柱的 pH，由此，纯化的血红蛋白产品从该柱洗脱。
2. 权利要求 1 的方法，其中向该柱中循序的注入至少二种三（羟基甲基）氨基甲烷醋酸盐缓冲溶液，每种所述的缓冲溶液 pH 不同，由此该柱接受梯级 pH 梯度洗脱。
3. 权利要求 2 的方法，其中在血红蛋白产品洗脱之前，该柱以至少一种所述的三（羟基甲基）氨基甲烷醋酸盐缓冲溶液饱和。
4. 权利要求 3 的方法，其中在 8.2 至 8.6 的之间 pH 范围饱和该柱。
5. 权利要求 4 的方法，其中在所述的缓冲溶液注入之前，该柱被以大于 8.7 的 pH 给予初始饱和。
6. 权利要求 5 的方法，其中的所述色谱柱的初始饱和采用三（羟基甲基）氨基甲烷醋酸盐缓冲液。
7. 权利要求 6 的方法，其中初始饱和的 pH 范围为 8.7 和 10.0 之间。

8. 权利要求 7 的方法，其中初始饱和的 pH 范围为 8.7 和 9.3 之间。
9. 权利要求 8 的方法，其中初始饱和的 pH 范围为 8.9 和 9.1 之间。
10. 权利要求 4 的方法，其中在所述的柱饱和期间，至少十一柱空隙体积的缓冲溶液注入该色谱柱。
11. 权利要求 10 的方法，其中在 8.2 和 8.4 之间的 pH 范围饱和。
12. 权利要求 11 的方法，其中的血红蛋白产品以 pH 范围为 6.5 和 7.5 之间的缓冲液洗脱。
13. 一种制备纯化血红蛋白产品的方法，包括下列步骤：
 - a) 血红蛋白溶液装入一种阴离子交换色谱柱，所述的负电荷柱被初始饱和至大于 8.7 的 pH；和
 - b) 向该柱中注入至少一种三（羟基甲基）氨基甲烷醋酸盐缓冲溶液，所述的缓冲溶液的 pH 低于 8.2，由此，纯化的血红蛋白产品从该柱洗脱。
14. 权利要求 13 的方法，其中初始饱和的 pH 范围为 8.7 和 10.0 之间。
15. 权利要求 14 的方法，其中初始饱和的 pH 范围为 8.7 和 9.3 之间。

16. 权利要求 15 的方法，其中初始饱和的 pH 范围为 8.9 和 9.1 之间。
17. 权利要求 16 的方法，其中色谱柱以三（羟基甲基）氨基甲烷醋酸盐初始饱和。
18. 权利要求 13 的方法，进一步包括如下步骤：在步骤 b 前向该负荷柱中注入至少一种 pH 低于 8.6 的三（羟基甲基）氨基甲烷醋酸盐缓冲溶液，由此该柱接受梯级 pH 梯度洗脱。
19. 权利要求 18 的方法，其中在血红蛋白产品洗脱之前，该柱以至少一种所述的三（羟基甲基）氨基甲烷醋酸盐缓冲溶液饱和。
20. 权利要求 19 的方法，其中在 8.2 和 8.6 之间的 pH 范围内用三（羟基甲基）氨基甲烷醋酸盐缓冲溶液饱和色谱柱。
21. 权利要求 20 的方法，其中在所述的柱饱和期间，至少十一柱空隙体积的所述缓冲溶液注入该色谱柱。
22. 权利要求 21 的方法，其中所述的饱和是在 pH 范围为 8.2 和 8.4 之间，用三（羟基甲基）氨基甲烷醋酸盐缓冲溶液完成的。
23. 权利要求 22 的方法，其中的血红蛋白产品以 pH 范围为 6.5 和 7.5 之间的缓冲液洗脱。

- 24.** 一种制备纯化血红蛋白产品的方法，包括下列步骤：
- a) 血红蛋白溶液装入一种阴离子交换色谱柱；
 - b) 向该柱注入至少十一柱空隙体积的饱和用的缓冲溶液，该溶液 pH 范围在 8.2 和 8.6 之间；和
 - c) 向该柱注入 pH 低于饱和缓冲溶液的三（羟基甲基）氨基甲烷醋酸盐缓冲溶液，由此，纯化的血红蛋白产品从该柱洗脱。
- 25.** 权利要求 24 的方法，其中饱和用缓冲溶液的 pH 为 8.3。
- 26.** 权利要求 24 的方法，其中向该柱中循序的注入至少二种三（羟基甲基）氨基甲烷醋酸盐缓冲溶液，每种所述的缓冲溶液 pH 不同，由此该柱接受梯级 pH 梯度洗脱。
- 27.** 权利要求 26 的方法，其中所述的缓冲溶液注入之前，在 pH 大于 8.7 时开始饱和该柱。
- 28.** 权利要求 27 的方法，其中所述色谱柱的初始饱和采用三（羟基甲基）氨基甲烷醋酸盐缓冲液。
- 29.** 权利要求 28 的方法，其中初始饱和的 pH 范围为 8.7 和 10.0 之间。
- 30.** 权利要求 29 的方法，其中初始饱和的 pH 范围为 8.7 和 9.3 之间。

- 31.** 权利要求 30 的方法，其中初始饱和的 pH 范围为 8.9 和 9.1 之间。
- 32.** 权利要求 31 的方法，其中的血红蛋白产品在 6.5 和 7.5 之间的 pH 范围洗脱。
- 33.** 一种制备纯化血红蛋白产品的方法，包括下列步骤：
- a) 血红蛋白溶液装入一种阴离子交换色谱柱，所述的负荷柱被初始饱和至大于 8.7 的 pH；和
 - b) 向该柱注入至少十一柱空隙体积的饱和用的三（羟基甲基）氨基甲烷醋酸盐缓冲溶液，该溶液 pH 范围在 8.2 和 8.6 之间；和
 - c) 向该柱中注入至少一种三（羟基甲基）氨基甲烷醋酸盐缓冲溶液，所述的缓冲溶液的 pH 低于 8.2，由此，纯化的血红蛋白产品从该柱洗脱。
- 34.** 权利要求 33 的方法，其中所述色谱柱的初始饱和采用三（羟基甲基）氨基甲烷醋酸盐缓冲液。
- 35.** 权利要求 34 的方法，其中初始饱和的 pH 范围为 8.7 和 10.0 之间。
- 36.** 权利要求 35 的方法，其中初始饱和的 pH 范围为 8.7 和 9.3 之间。
- 37.** 权利要求 36 的方法，其中初始饱和的 pH 范围为 8.9 和 9.1 之间。

-
- 38.** 权利要求 37 的方法，其中所述的饱和用缓冲溶液 pH 范围在 8.2 至 8.4 之间。
- 39.** 权利要求 38 的方法，其中的血红蛋白产品以 pH 范围为 6.5 和 7.5 之间的缓冲液洗脱。
- 40.** 权利要求 33 的方法，其中的色谱柱填充一种离子交换介质。
- 41.** 权利要求 40 的方法，其中的离子交换介质选自由含有胺—或铵—的硅胶、铝氧化铝凝胶、二氧化钛凝胶、交联的葡聚糖、琼脂糖、聚丙烯酰胺、聚羟基乙基—甲基丙烯酸或苯乙烯二乙烯基苯组成的基团。
- 42.** 权利要求 41 的方法，其中的阴离子交换介质是含有氨或铵的硅胶。

血红蛋白的纯化方法

相关申请

本申请是1998年7月10号提交的申请 U.S.S.N 09/113,953 的继续申请，申请 U.S.S.N 09/113,953 是1995年6月7日提交的申请 U.S.S.N 08/473,497 的部分继续申请，申请 U.S.S.N 08/473,497 是1995年6月2日提交的申请 U.S.S.N 08/458,916 的部分继续申请，申请 U.S.S.N 08/458,916 是1995年3月23日提交的申请 U.S.S.N 08/409,337 的继续申请，这些申请的教导通过在此引述而合并于本文。

发明背景

需要一种血液替代物，以治疗或预防失血（例如，急性失血或者外科手术期间）、贫血（例如，容量不足休克、过敏性休克、脓毒性休克、变应性性休克）引起的低氧症。血液和血液成分用于这些处理时作为血液替代物是充满缺点的。例如，全血的使用通常伴随着肝炎病毒和艾滋病毒传播的风险，它们能恶化病人康复或导致病人死亡。另外，全血的使用需要验血型 and 交叉配血，以避免免疫血液学问题和与供体之间的不亲和性。

人血红蛋白，作为一种血液替代物，具有渗透活性和运输和传递氧的能力，但它具有通过肾路线和经过血管壁的循环中迅速消除的缺点，导致一种很短的，因此，典型地不令人满意的半衰期。进一步地，人血红蛋白也常常被有毒水平的内毒素、细菌和/或病毒污染。

非人类血红蛋白也具有如人血红蛋白同样的缺陷。此外，源于非人类来源的血红蛋白也常常被蛋白质，例如抗体污染，抗体能引起接受者免疫系统反应。

先前，已经采用了至少四种其它类型的血液代用品，包括全氟化合物、合成血色素类似物、脂质—胶囊化血色素，和化学改性的血色素。然而，这些血液代用品中的许多常常具有短的血管内保留时间，被循环系统作为外来物质清除，或者贮存在肝脏、脾脏和其它器官。许多这些血液代用品都在生物学上不相容于生物系统。

发明概述

本发明涉及到一种制备纯化的血红蛋白产品的方法。

在一项实施方案中，这种方法包括血红蛋白溶液装上阴离子交换色谱柱。将至少一种三（羟基甲基）氨基甲烷丙酮缓冲液注入该柱，该缓冲溶液 pH 低于柱的 pH，由此纯化的血红蛋白产物自该柱洗脱。

在另一项实施方案中，将血红蛋白溶液装上阴离子交换色谱柱。该色谱柱初始饱和至 pH 大于 8.7，至少一种缓冲盐溶液注入该柱，该缓冲盐溶液 pH 小于 8.6，由此纯化的血红蛋白产物自该柱洗脱。

在另一项实施方案中，将血红蛋白溶液上阴离子交换色谱柱。然后，将至少十一柱体积的 pH 范围大约在 8.2 和 8.6 之间的饱和缓冲溶液注入该柱。接着将一种 pH 低于饱和缓冲溶液 pH 的缓冲溶液注入该柱，由此纯化的血红蛋白产物自该柱洗脱。

在另一项实施方案中，将血红蛋白溶液上阴离子交换色谱柱，该色谱柱 pH 开始校准至大于大约 8.7。然后，将至少十一柱体积的 pH 范围大约在 8.2 和 8.6 之间的三（羟基甲基）氨基甲烷醋酸盐饱和缓冲溶液注入该柱。接着将 pH 低于大约 8.2 的三（羟基甲基）氨基甲烷醋酸盐缓冲溶液注入该柱，由此纯化的血红蛋白产物自该柱洗脱。

本发明的方法有益于获得基本上不含有如碳酸酐酶的顽固蛋白质材料的血红蛋白产品。本方法也可以从含有许多杂质的溶液中获得相对高收率的血红蛋白。因而，自一种物种中提取的血红蛋白可以作为血液代用品成功地用于各种物种中，而且受体不会感受明显副作用。

本发明的详细说明

本发明的方法的特征和其它的细节将参照附图给予更为具体的描述并在权利要求中指出。应该理解的是，本发明的具体实施方案是以说明性给出的，它们不是对本发明的限制。本发明的原则特征在不背离本发明范围的情况下可以应用于各种实施方案中。

本发明涉及到采用色谱柱制备基本不含有其它血液蛋白成分和杂质的纯化血红蛋白产品的方法。该方法的特征在于采用 pH 梯度以洗脱血红蛋白成分。

从红细胞的破坏、分段和/或超滤得到的浓缩的 Hb 溶液，导入一个或更多个平行的色谱柱中以通过高性能液体色谱进一步使血红蛋白和其它杂质离析，例如抗体、内毒素、磷脂、酶（例如碳酸酐酶）、病毒和可传播的海绵状的脑病介质。该色谱柱含有一种适合于从非血红蛋白蛋白质中分离 Hb 的阴离子交换介质。适合的阴离子交换介质包括，例如，硅胶、氧化铝、二氧化钛凝胶、交联的

葡聚糖、琼脂糖或者衍生部分，例如聚丙烯酰胺、聚羟基一甲基丙烯酸或者苯乙烯二乙烯基苯离子交换树脂，它衍生于阳离子化学官能团，例如二乙基乙胺或季乙胺基团。用于选择吸附和解吸 Hb 的适宜的阴离子交换介质和相应的洗脱剂，与其它的很可能是溶化的红细胞相的蛋白质和杂质比较，是本领域普通技术人员能轻易确定的。

在一项更优选的实施方案中，采用这样一种方法由硅胶制备阴离子交换介质，该硅胶经热处理以增加孔径，与 γ -氧化环氧丙酸丙基硅烷接触以形成活性环氧基团，接着与 $C_3H_7(CH_3)_2NCl$ 接触以形成季铵离子交换介质。色谱法周刊，120:321-333(1976)描述了此方法，该文通过在此引述而全部合并于本文。在一项实施方案中，色谱柱，或者各个色谱柱，初始饱和至 pH 大于 8.7。优选地，色谱柱 pH 饱和范围在大约 8.7 和大约 10.0 之间。在一项特别优选的实施方案中，pH 饱和范围在大约 8.7 和大约 9.3 之间，最优选是范围是大约 8.9 和大约 9.1 之间。优选地，采用的开始饱和色谱柱的缓冲液是三（羟基甲基）氨基甲烷醋酸盐（三一醋酸盐），浓度是大约 20 毫摩尔/升（mM/l）。

血红蛋白溶液，优选地，已经逆纯水（U.S.P）透析，并且，优选地，具有大约 280 $\mu S/cm$ 的导电性和大约 6.75 至大约 7.75 之间的 pH，然后注入色谱柱介质中，从而将血红蛋白装柱。装柱的血红蛋白溶液的浓度通常的范围是大约 90 至大约 200 克/升之间。优选地，血红蛋白溶液的浓度范围是大约 90 至大约 110 克/升之间。优选地，在注入浓缩的 Hb 溶液后，色谱柱以三一醋酸盐洗脱大约十分钟（4 柱体积），以洗脱不能结合于介质的非血红蛋白成分，并促进血红蛋白与介质更强的结合。

在色谱柱中采用梯度 pH 以由 Hb 中分离出蛋白质杂质，例如碳酸酐酶、磷酸酯、抗体和内毒素。梯度 pH 可以是连续的梯度或者梯级的梯度。具有各种 pH 值的缓冲溶液随后注入该柱以产生洗脱时间内的 pH 梯度。优选在注入之前过滤缓冲液，例如以合适的 10,000 道尔顿的去除热原膜进行过滤。缓冲液应该是一价的缓冲盐，它具有低离子强度以致于 Hb 和非血红蛋白杂质的洗脱主要依赖于 pH 而不是明显依赖于离子强度。通常，大约 50mM，或者更少离子浓度的缓冲盐，具有低离子强度。

优选地，通过以梯级梯度从色谱柱洗脱分离血红蛋白溶液的杂质和血红蛋白，其中采用的缓冲剂 pH 在血红蛋白上柱时的 pH 和血红蛋白从柱中洗脱下来的最终 pH 之间。在一项实施方案中，梯级梯度包括注入一种合适的缓冲溶液至柱中。该缓冲溶液 pH 低于血红蛋白装柱时初始的柱 pH。该柱以缓冲溶液饱和。优选地，至少大约六柱体积的缓冲溶液注入该柱中。这里定义的“柱体积”，是柱的体积，并不包括填充材料。通常，用于本发明的合适的填充材料，即交换介质，引起大约 0.525 总柱体积的空隙度。六柱体积，因此，等于大约 11.7 “柱空隙体积”。一般地，至少 11 柱空隙体积的缓冲溶液注入该柱中。

优选地，缓冲溶液的 pH 低于大约 8.6。更优选地，缓冲溶液的 pH 在大约 8.2 和大约 8.4 之间。在一项特别优选的实施方案中，缓冲溶液是三（羟基甲基）氨基甲烷醋酸盐（三一醋酸盐）。通过以这种方式饱和柱，血红蛋白溶液的杂质自柱中洗脱。

其后，缓冲剂注入该柱以洗脱血红蛋白。优选地，缓冲溶液是三（羟基甲基）氨基甲烷醋酸盐。更优选地，三一醋酸盐溶液的 pH 范围为大约 6.5 和大约 7.5 之间。该血红蛋白洗脱物是纯化的血红蛋白产品。

在—项优选的实施方案中，废弃最开始的 3%至 4%Hb 洗脱物和最末尾的 3%至 4%Hb 洗脱物，以确保 Hb 洗脱物的纯度。通过无菌滤器滤过 Hb 洗脱物是优选的。适合的无菌滤器包括 0.22 μm 滤器，例如 Sartorius Sartobran Cat# 5232507 G1PH 滤器。

在重复使用这里的色谱柱时，需要通过第四缓冲液洗脱残留在柱上的非—血红蛋白蛋白质和内毒素杂质。合适的缓冲溶液的实例是 NaCl/三—醋酸盐溶液（浓度大约 1.0 M NaCl 和大约 20 mM 三—醋酸盐；pH 大约 8.4 至大约 9.4，优选大约 8.9—9.1）。在—项最优选地实施方案中，所有缓冲溶液都是三（羟基甲基）氨基甲烷醋酸盐。通常，在大约 0 $^{\circ}\text{C}$ 至大约 50 $^{\circ}\text{C}$ 之间使用该缓冲溶液。缓冲液温度优选地是大约 12.4 \pm 1.0 $^{\circ}\text{C}$ 。此外，该缓冲液通常在大约 9 $^{\circ}\text{C}$ 至大约 11 $^{\circ}\text{C}$ 之间贮存。

如这里描述的，血液代用品是用于人类、哺乳动物和其它脊椎动物的、—种血红蛋白基氧原子运载成分，它适于运输和转移氧原子至重要的器官和组织，至少，能保持充分的血管内膨胀压。脊椎动物是如经典定义的，包括人类，或任何其它的在循环系统中采用血液传递氧原子至组织的脊椎动物。此外，循环系统的定义是如经典定义的，由心脏、动脉、静脉和包括如毛细血管的小血管结构的微循环组成。

通过本发明的方法制备的血液代用品优选按照本发明的一—项实施方案制备，它含有的内毒素、磷酸、外源性蛋白质和其它的杂质含量不会引起严重的免疫系统反应，并且它对受体是无毒的。优选地，血液代用品是超纯的。“超纯，”如这里定义的，意指含用少于 0.5 EU/ml 的内毒素、少于 3.3 nmoles/ml 的磷酸和少量以致不能检测到的非血红蛋白蛋白质，例如血清清蛋白和抗体。

术语“内毒素”指细胞结合的脂多糖，作为部分革兰氏阴性细菌细胞壁的外层产生，它在许多情况下是毒性的。注射入动物时，内毒素会导致发烧、腹泻、出血性休克，以及其它的组织损伤。1983年美国药典3014页定义了内毒素单位(EU)，如含有0.1毫微克美国参考标准份额EC-5的活性。一小瓶的EC-5含有10,000 EU。检测血液代用品中内毒素浓度的合适的方法的实例包括“Kinetic/Turbidimetric Limulus Amebocytic Lystate(LAL) 5000 Methodology”，它由马塞诸塞 Associates of Cape Cod, Woods Hole 发现。

“稳定的聚合血红蛋白，”如这里定义的，是血红蛋白基氧原子运载成分，适合的贮存温度下两年或更多的贮存期间，它的分子量分布和/或高铁血红蛋白成分并不能充分的增加或减少，低氧环境下时优选两年或更多的期间。适于贮存一年或更多年的适合的贮存温度在大约0℃和大约40℃之间。优选的贮存温度范围是大约0℃和大约25℃之间。

适合的低氧环境，或者基本无氧的环境，定义为在至少大约二个月的贮存期，与血液代用品接触的蓄积的氧原子量，优选至少大约一年，或者更优选至少大约二年，它会引起在血液代用品内高铁血红蛋白浓度小于大约15重量%。氧原子的蓄积量包括渗入血液代用品包装的氧原子和血液代用品及包装的原始氧原子含量。

通过这种方法，从红细胞(RBC)收集直至血红蛋白聚合，将细菌生长充分地减到最少或抑制生物的条件下，保持血液、红细胞和血红蛋白，例如温度保持在20℃之下0℃之上。优选地，温度保持在大约15℃甚至更低。更优选地，温度保持在 10 ± 2 ℃。

在这种方法中，用于制备稳定聚合血红蛋白的血液代用品的方法的成分部分，充分消毒以制备无菌产品。无菌如本领域的定义，

特别地，溶液符合 USP XXII 美国药典，第 71 章，1483-1488 页对无菌的要求。进一步，加入工艺物料流的成分部分，通常制造或包上一层不会与工艺物料流反应或污染的材料。这些材料包括不锈钢和其它的钢合金，例如因钢。

适合的 RBC 来源包括人血、牛血、绵羊血、猪血、其它脊椎动物血和转基因制造的血红蛋白，例如 BIO/TECHNOLOGY, 12:55-59(1994)描述的转基因 Hb。

血液可以从肝脏或新鲜的屠杀的供体收集。Rausch 等人在美国专利第 5,084,558 和 5,296,465 号中描述了一种收集牛全血的方法。以卫生方式收集血液是优选的。

收集或收集后不久，血液与至少一种抗凝剂混合以抑制血液明显的凝固。适合于血液的抗凝剂本领域公知，包括，例如，枸橼酸钠、乙烯基二元胺四醋酸和肝素。混合血液时，抗凝剂可以是固体形式，例如粉末，或者是水溶液。

可以理解血液溶液可以源自新鲜收集的样品或陈样品，例如血库期满的人血。进一步地，血液溶液可以预先保持在冻结和或液态。血液用于该方法之前并没有冻结是优选的。

在另一项实施方案中，向血液溶液加入抗凝剂之前，分析血液中的抗生素含量。通过检验供体的血液样品没有受抗生素处理，检测血液溶液中的抗生素含量以提供血液样品没有感染微生物的确信程度。分析抗生素适合的实例包括采用名为“牛奶中青霉素的快速检测”方法的青霉素分析试剂盒 (Difco, Detroit, MI)。血液溶液青霉素含量小于或等于大约 0.008 单位/ml 是优选的。可以选择地，可以采用监控无疾病或抗生素处理的家畜的群体管理程序。

优选地，血液溶液先于或者在抗凝步骤作用期间滤过，例如通过过滤，以清除大的聚集物和颗粒。适合的滤器的实例是 600 目筛。

血液溶液中的红细胞然后通过适合的方法洗涤，例如通过渗滤法或通过以至少一种溶液，例如等张溶液，合用分散稀释和浓缩步骤，以使红细胞从细胞外血浆蛋白，例如血清清蛋白或抗体（即，免疫球蛋白（IgG））离析。以分批或连续流入模式洗涤红细胞是可理解的。

可接受的等张溶液在本领域是公知的，包括溶液，例如枸橼酸/盐溶液，该溶液的 pH 和渗透克分子量不会破裂红细胞膜并可以替代全血的血浆部分。优选的等张溶液具有中性 pH 和大约 285-315 mOsm 的渗透克分子量。在一项优选的实施方案中，等张溶液由枸橼酸钠二水合物（6.0 g/l）和氯化钠（8.0 g/l）的水溶液组成。

可用于本发明的方法的水包括蒸馏水、去离子水、注射用水（WFI）和/或低热原水（LPW）。WFI，它是优选的，是符合美国药典注射用水规定去离子的蒸馏水。Pharmaceutical Engineering, 11, 15-23(1991)进一步描述了 WFI。LPW，它是优选的，是含有少于 0.002 EU/ml 的去离子水。

等张溶液在加入到血液溶液之前过滤是优选的。合适的滤器的实例包括 10,000 道尔顿微孔的超滤膜，例如 Millipore Cat # CDUF 050 G1 过滤器或 A/G Technology 中空纤维，10,000 道尔顿（Cat # UFP-10-C-85）。

在一项优选的实施方案中，通过渗滤法洗涤血液溶液中的红细胞。合适的渗滤法包括多微孔膜，其孔径能从充分细小的血液溶液成分中分离出红细胞，例如 0.1 μm 至 0.5 μm 过滤器（例如，0.2 μm 中空纤维过滤器，Microgon Krosflo II 微滤筒）。同时，以一种等于经渗滤

法滤过的速率（或体积）的速率，附加地连续（或者分批）过滤等张溶液作为补充。在洗涤红细胞期间，直径明显小于红细胞的血液溶液的成分，或者液体如血浆，透过透滤器的透析过滤壁。保留红细胞、血小板和稀释的血液中的较大的物质，例如白细胞，并与等张溶液混合，它们持续或者分批添加以制备透析过的血液溶液。

在一项更优选的实施方案中，渗滤槽中该体积血液溶液开始通过添加体积的滤过的等张溶液至渗滤槽中稀释。优选地，加入的等张溶液大约等于血液溶液开始的体积。

在一项可以选择的实施方案中，通过一系列连续的（或反相连续的）稀释液和浓缩步骤洗涤红细胞，其中通过添加至少一种等张溶液稀释血液溶液，并通过流经滤器浓缩，因此制备透析过的血液溶液。

当染有红细胞的血浆蛋白质的含量基本上减少时（通常至少大约 90%），红细胞洗涤结束。通常地，由渗滤器 34 流出的滤出液的体积，等于大约以滤过的等张溶液稀释的血液溶液之前的渗滤槽中的血液溶液的体积的 300%，或者更多时，红细胞洗涤结束。额外的红细胞洗涤可进一步地将细胞外血浆蛋白质与红细胞离析。例如，以 6 体积的等张溶液膜过滤可以从血液溶液中清除至少大约 99% 的 IgG。

透析过的血液溶液接着实施在透析过的血液溶液中将红细胞与白细胞和血小板离析的方法，例如通过离心。

可以理解，也可以采用其它的在本领域公知的使红细胞与其它血液成分离析的方法。例如，沉降，其中该分离方法不会损伤显著数量的红细胞的细胞膜，如少于大约 30% 的红细胞，在红细胞与其它血液成分离析之前。

红细胞的分离之后，红细胞通过溶解红细胞的方法溶解，以从红细胞中释放出血红蛋白以制备含有血红蛋白的溶液。溶解指采用各种溶解方法，例如机械溶解、化学溶解、低张溶解或其它公知的溶解方法，这些方法能释放血红蛋白，无需明显地损坏 Hb 的运输和释放氧原子的能力。

在另一项实施方案中，重组制备血红蛋白，例如 Nature, 356:258-260(1992)描述的重组制备血红蛋白，它可以在本发明的方法中取代红细胞。从染有上述物的物中洗涤和分离含有血红蛋白的细菌细胞。然后这些细菌通过本领域公知的方法细胞机械破裂，例如球磨机，以从细胞中释放血红蛋白并制备溶解的红细胞相。

在溶解之后，溶解的红细胞相接着超滤以清除大的细胞碎片，例如分子量超过大约 100,000 道尔顿的蛋白质。通常地，细胞碎片包括一切完整和片段的细胞成分，除了 Hb、较小的细胞蛋白质、电解质、辅酶和有机代谢中间体。可接受的超滤包括，例如，Millipore (Cat # CDUF 050 H1) 和 A/G Technology (Needham, MA.; No. UFP100E55 型) 的 100,000 道尔顿滤器。

持续超滤直至溶解红细胞相中的 Hb 浓度小于 8 克/升 (g/l)，以增加用于聚合的血红蛋白的收率，这是优选的。也可以采用其它的从溶解的红细胞中分离出 Hb 的方法，包括沉降、离心或微孔过滤。

接着超滤 Hb 超滤液，以从 Hb 超滤液中清除较小的细胞碎片，例如电解质、辅酶、代谢中间体和分子量小于 30,000 道尔顿的蛋白质，以及水。合适的超滤器包括 30,000 道尔顿的超滤器 (Millipore Cat # CDUF 050 T1 和/或 Armicon, # 540 430)。

然后如上面详细描述的那样，将浓缩的 Hb 溶液直接上一个或多个并联的色谱柱。

由色谱步骤得到的 Hb 洗脱物优选脱氧，即在聚合制备脱氧的 Hb 溶液（下文中为脱氧-Hb）之前，通过不明显减小 Hb 洗脱物中 Hb 运输和释放氧原子能力而又基本上除去 Hb 氧的方法来进行，也就是避免例如由变性或形成氧化血红蛋白（met Hb）发生的运输和释放氧原子能力的降低。

在一项实施方案中，Hb 洗脱物通过经过相膜的惰性气体的气体转移进行脱氧的。这些惰性气体包括，例如，氮气、氦气和氩。可以理解，可采用其它的、本领域公知的脱氧血红蛋白溶液的方法，以除去 Hb 洗脱物的氧。这些其它的方法，包括，例如，氮气喷射 Hb 洗脱物，脱氧剂化学清扫，例如 N-乙酰基-L-半胱氨酸（NAC）、半胱氨酸、连二亚硫酸或抗坏血酸的钠盐，或者光分解作用。

在得到色谱柱洗脱之后，优选浓缩 Hb 洗脱物以提高该方法的效率。通过超滤器再循环 Hb 洗脱物，浓缩 Hb 洗脱物，制备浓缩的 Hb 洗脱物。合适的超滤器包括，例如，30,000 道尔顿或更小的超滤器（Millipore Helicon, Cat # CDUF050G1 和/或 Armicon Cat # 540 430）。通常，Hb 浓度在大约 100 至大约 120 g/l 之间时，Hb 洗脱物的浓缩结束。浓缩 Hb 洗脱物时，Hb 洗脱物温度优选保持在近似 8-12 °C。

然后将缓冲剂加入 Hb 溶液，该溶液优选浓缩的，以调整 Hb 溶液的离子强度，增强 Hb 的脱氧作用。离子强度优选调节至大约 150 meq/l 至大约 200 meq/l 之间，以减小 Hb 溶液中 Hb 的氧亲和力。适合的缓冲剂包括这样的缓冲剂，它的 pH 不会引起明显的 Hb 蛋白质变性，但具有充分高的离子强度以促进 Hb 脱氧作用。适合的缓

冲液的实例包括 pH 范围为大约 6.5 至大约 8.9 的盐溶液。优选的缓冲液是 1.0 M NaCl 水溶液, pH 大约 8.9 的 20 mM 三-醋酸盐溶液。

优选地, 所得的缓冲 Hb 溶液然后通过超滤器再循环, 再浓缩 Hb 溶液以提交该方法的效率。在一项优选的实施方案中, Hb 浓度在大约 100 g/l 至大约 120 g/l 之间时, Hb 洗脱物的浓缩结束。

脱氧作用期间, Hb 溶液通过适合的相转移膜循环。适当的相转移膜包括, 例如, 0.05 μm 的聚丙烯中空纤维微孔滤器 (例如, Hoechst-Celanese Cat # 5PCM-107)。同时, 惰性气体的逆流经过该相转移膜。适合的惰性气体包括, 例如, 氮气、氩气和氦气。经过相转移膜的气体交换因此从 Hb 溶液中汽提出氧气。

脱氧作用持续, 直至 Hb 溶液的 $p\text{O}_2$ 减少至 Hb 溶液中氧化 Hb (氧合血红蛋白或 HbO_2) 成分含量为大约 20% 或更少。在一项优选的实施方案中, Hb 溶液中 HbO_2 成分大约是 10% 或更少。

在脱氧作用期间, Hb 溶液的温度通常保持在可平衡脱氧作用速率与高铁血红蛋白形成速率的水平。保持温度以限制高铁血红蛋白含量小于 20%。最优化的温度应导致高铁血红蛋白成分含量小于大约 5%, 优选高铁血红蛋白成分含量小于大约 2.5%, 同时 Hb 溶液仍然进行脱氧作用。通常, 脱氧作用期间, Hb 溶液温度维持在大约 19°C 和大约 31°C 之间。

脱氧作用期间, 和随后的遍及本发明方法的剩余步骤, Hb 保持在低氧的环境中以最小化 Hb 的氧逸出, 并保持 HbO_2 含量小于大约 20%, 优选小于大约 10%。

然后优选以低氧含量的、含有巯基化合物的贮存缓冲液, 饱和脱氧的 Hb, 以制备一种氧化作用稳定的脱氧 Hb。合适的巯基化合

物包括无毒的还原剂，例如 N-乙酰基-L-半胱氨酸 (NAC) D,L-半胱氨酸、 γ -谷氨酰-半胱氨酸、谷胱甘肽、2,3-二巯基-1-丙醇、1,4-二巯基丁烷、巯基乙酸盐，和其它的生物学上相容的巯基化合物。低氧含量贮存缓冲液的氧含量必需足够低，以便不能明显减少缓冲液中巯基化合物的浓度，并限制氧化作用稳定的脱氧-Hb 的氧合血红蛋白含量在大约 20%或更少，优选小于于大约 10%。通常，贮存缓冲液的 pO_2 小于大约 50 托。

在一项优选的实施方案中，贮存缓冲液应具有适于平衡 Hb 聚合和高铁血红蛋白形成的 pH，通常在大约 7.6 和 7.9 之间。

与脱氧-Hb 混合的巯基化合物的量足够大，以便于提高聚合期间 Hb 分子内的交联，同时它的量也充分低，以便不能明显的减小 Hb 分子的分子内交联，由于高离子强度。通常地，大约 1 摩尔的巯基官能团 (-SH)，对稳定氧化大约 0.25 摩尔至大约 5 摩尔之间的脱氧-Hb 必需。

在一项优选的实施方案中，贮存缓冲液含有大约 25-35 mM 磷酸钠缓冲液盐 (pH 7.7-7.8)，并且 NAC 含量如此，即氧化作用稳定的脱氧-Hb 中 NAC 的浓度按重量计，为大约 0.003%至大约 0.3%之间。更优选地，氧化作用稳定的脱氧-Hb 中 NAC 浓度按重量计为大约 0.05%至大约 0.2%。

优选地，在与脱氧-Hb 混合之前过滤贮存缓冲液，例如通过 10,000 道尔顿的超滤膜 (Millipore Helicon Cat # CDUF050G1 或 A/G Technology Maxcell Cat # UFP-10-c-75)。

在一项实施方案中，氧化作用稳定的脱氧-Hb 接着流经可选的滤器。合适的滤器包括 0.2 μm 聚丙烯预滤器和 0.5 μm 无菌的微过滤器 (Pall Profile II, Cat # ABIY00527 或 Gelman Supor)。脱氧-Hb

保持在基本上无氧的气体中。该步骤可以这样完成，例如，在填充氧化作用稳定的脱氧-Hb 之前和之后，通过以一种惰性气体，如氮气，吹扫和覆盖操作仪器。

任选地，氧化作用稳定的脱氧-Hb 转移至聚合之前，适合量的水加入聚合反应器中。在一项实施方案中，水的适合量是指氧化作用稳定的脱氧-Hb 加入聚合反应器时，会导致溶液 Hb 浓度为大约 10 至大约 100 g/l 的量。优选地，该水贫氧。

聚合步骤中，在水的 pO_2 含量减少至充分限制 HbO_2 含量至大约 20%，通常小于大约 50 托之后，聚合反应器以一种惰性气体，例如氮气覆盖。氧化作用稳定的脱氧-Hb 接着转入聚合反应器中，同时覆盖有适合的流动惰性气体。

聚合反应器中，氧化作用稳定的脱氧-Hb 与交联剂接触时，氧化作用稳定的脱氧-Hb 溶液的温度升至优化聚合反应的温度。通常地，氧化作用稳定的脱氧-Hb 的温度大约是 25°C 至大约 45°C，整个聚合反应中优选大约 41°C 至大约 43°C。适用于加热聚合反应器的可接受的热传递方法的实施是加套的加热系统，该系统通过引导热乙二醇流经该套加热。

接着氧化作用稳定的脱氧-Hb 在充分聚合氧化作用稳定的脱氧-Hb 的温度下，与合适的交联剂反应，在大约 2 小时至大约 6 小时的期间内制备聚合的血红蛋白[聚(Hb)]溶液。

合适的交联剂的实例包括能交联 Hb 蛋白质的多官能剂，例如戊二醛、丁二醛、活性形态的聚氧环乙烷和葡聚糖， α -羟基醛，例如羟乙醛、N-马来酰亚胺-6-氨基己酰(2'-硝基，4'-磺酸)-苯基酯、m-马来酰亚胺苯甲酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯、琥珀酰亚胺 4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸盐、硫代琥珀酰亚胺 4-(N-马来酰亚

胺甲基)环己烷-1-羧酸盐、m-马来酰亚胺苯甲酰-N-羟基琥珀酰亚胺酯、m-马来酰亚胺苯甲酰-N-羟基硫代琥珀酰亚胺酯、N-琥珀酰亚胺(4-碘代乙酰)氨基苯甲酸酯、硫代琥珀酰亚胺(4-碘代乙酰)氨基苯甲酸酯、琥珀酰亚胺 4-(p-马来酰亚胺苯基)丁酸盐、硫代琥珀酰亚胺 4-(p-马来酰亚胺苯基)丁酸盐、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)盐酸碳二亚胺、N,N'-亚苯基二马来酰亚胺,和其它类化合物中,属于双亚胺类、酰二嗪农类或芳基二卤化物类。

交联剂适合的含量可允许稳定 Hb 的分子间交联和形成 Hb 聚合物的分子间交联,由此提高血管滞留。通常地,交联剂适合的含量如下,其中交联剂对 Hb 的摩尔比例超过大约 2:1。优选地,交联剂对 Hb 的摩尔比例是在大约 20:1 至 40:1 之间。

优选地,该聚合反应在 pH 在大约 7.6 至大约 7.9 之间、氯离子浓度小于或等于大约 35 毫摩尔的缓冲液中进行。

在一项优选的实施方案中,适合量的交联剂加入至氧化作用稳定的脱氧-Hb,接着通过以低速剪切机搅拌的方式混合。适合的低速剪切搅拌方法包括静态混合器。适合的静态混合器是,例如,购自 Chemineer, Inc. 的“Kenicx”静态混合器。

在一项实施方案中,通过静态混合器的氧化作用稳定的脱氧-Hb 和交联剂的再循环导致紊流情况,与交联剂和氧化作用稳定的脱氧-Hb 的通常均匀混合一起,由此减少了制备含有高浓度交联剂的脱氧-Hb 料袋(pockets)的潜力。交联剂和氧化作用稳定的脱氧-Hb 的通常均匀混合减少了高分子量 Hb 聚合物的形成,即聚合物分子量超过 500,000 道尔顿,并且亦许可聚合期间快速混合交联剂和氧化作用稳定的脱氧-Hb。此外,Hb 聚合期间,由于巯基化合物,优选 NAC 的存在,会导致显著的 Hb 分子间交联。巯基化合物与戊二醛和/或 Hb 相互作用的准确机理并不清楚,人们假定,巯基化合物

以一种方式影响 Hb/交联剂化学键，这种方式至少部分抑制高分子量 Hb 聚合物的形成，并且优选地形成稳定的 Hb 四聚物。

聚(Hb)定义为具有显著的分子内交联，如果聚(Hb)中大部分(即，至少大约 50%)的 Hb 分子化学键合，并且高分子量聚合血红蛋白链内含有仅仅少量 Hb 分子，例如小于大约 15%。高分子量聚(Hb)分子是这样的分子，例如，分子量在大约 500,00 道尔顿之上。

在一项优选的实施方案中，戊二醛用作交联剂。通常地，每公斤氧化作用稳定的 Hb 采用大约 10 至大约 70 克的戊二醛。更优选的，在超过 5 小时的期间加入戊二醛，直至每公斤氧化作用稳定脱氧-Hb 加入近似 29-31 克的戊二醛。

聚合之后，聚合反应器中聚(Hb)溶液的温度通常减少至大约 15°C 至大约 25°C。

当采用的交联剂并不是醛时，制成的聚(Hb)一般是稳定的聚(Hb)。当采用的交联剂是醛时，制成的聚(Hb)一般是不稳定的，直至与合适的还原剂混合，以减少还原聚(Hb)中不稳定键，形成更稳定键。适合的还原剂实例包括硼氢化钠、氰基硼氢钠、连二亚硫酸钠、三甲基胺、t-丁基胺、吗啉硼烷和吡啶硼烷。加入还原剂之前，聚(Hb)溶液可通过超滤任意地浓缩，直至聚(Hb)溶液浓度升高至大约 75 和大约 85 g/l 之间。适合的超滤器的实例是 30,000 道尔顿滤器(例如，MiLLipore Helicon, Cat # CDUF050LT 和 Amicon, Cat # 540430)。

聚(Hb)溶液的 pH 接着调节至碱性 pH 范围，以保护还原剂并抑制氢气生成，它在随后的反应期间可使 Hb 变性。

在一项实施方案中，调节 pH 大于 10。聚合期间或之后，通过加缓冲溶液至聚 (Hb) 溶液调节 pH。通常纯化聚 (Hb) 以清除非聚合血红蛋白。它可通过渗滤法或羟基磷灰石色谱法完成 (参见，例如共悬未决的美国 5,691,453，1997 年 11 月 25 日出版，其教导通过在此引述而合并于本文)。

调节 pH 之后，至少一种还原剂，优选硼氢化钠溶液，一般通过脱氧循环加入聚合步骤中。一般地，聚 (Hb) 内每摩尔 Hb 四聚物 (每 64,000 道尔顿 Hb) 加入大约 5 至大约 18 摩尔的还原剂。在一项优选的实施方案中，聚合子系统 98 中每九升的聚 (Hb) 溶液，以 0.1 至 0.12 lpm 的速率加入 1 升 0.25 M 的硼氢化钠溶液。

然后恢复稳定聚 (Hb) 的 pH 和电解质至生理学水平，以制备稳定的聚合血红蛋白血液代用品，通过以具有适合的 pH 和生理学电解质水平的渗滤溶液渗滤该稳定的聚 (Hb)。优选地，该渗滤溶液是缓冲溶液。

对通过还原剂还原的聚 (Hb)，渗滤溶液具有酸性 pH，优选在大约 4 至大约 6 之间。

无毒的巯基化合物也可作为氧清除剂加入稳定的聚 (Hb) 溶液，以增强最终的聚合血红蛋白血液代用品的稳定性。巯基化合物可作为渗滤溶液的部分加入和/或单独加入。加入一定量的巯基化合物，以产生巯基溶液，它会清除氧以保持贮存期内高铁血红蛋白含量小于大约 15%。优选地，巯基化合物是 NAC。通常地，按重量计，加入的巯基化合物量能充分形成大约 0.05% 至大约 0.2% 之间的巯基浓度。

在一项优选的实施方案中，在无菌操作条件下包装血液代用品，该条件下，聚合反应器和残留物运输器内，保持惰性的、基本上不含氧的气体的压力。

通过本发明的方法制备适合的稳定的聚合血红蛋白血液代用品的说明如表 I 所示。

表 I

参数	结果
pH (18-22°C)	生理学上可接受
内毒素	生理学上可接受
无菌试验	符合检测
磷脂 ^a	生理学上可接受
血红蛋白总量	10-250g/l
高铁血红蛋白	<15%
氧合血红蛋白	≤10%
钠, Na ⁺	生理学上可接受
钾, K ⁺	
氯, Cl ⁻	
钙, Ca ⁺⁺	
硼	
戊二醛	生理学上可接受
N-乙酰-L-半胱氨酸	生理学上可接受
M.W. >500,000	≤15%
M.W. ≤65,000	<10%
M.W. <32,000	≤5%
>10μ颗粒含量	<12/ml
>25μ颗粒含量	<2/ml

a-Hb 聚合前测量

接着在短期的贮藏容器或无菌贮藏容器贮存稳定的血液代用品，每个都具有如上描述的低氧环境。贮藏容器也应对水汽通道充分不能渗透，以抑制贮存期内通过蒸发血液代用品显著浓缩。血液代用品显著浓缩导致该血液代用品的一种或多种参数高于规定。

稳定聚合血红蛋白血液代用品的合成、按照本发明的制备，在美国专利 No. 5,296,465 进一步描述。

通过本发明的方法可制备、得到血液代用品的脊椎动物包括哺乳动物，例如人、非人的灵长类、狗、猫、大鼠、马或绵羊。进一步地，可得到所述的血液代用品的脊椎动物，包括胎儿（出生以前的脊椎动物）、出生后的脊椎动物，或者出生时的脊椎动物。

通过一种或多种注射方法，本发明的血液代用品经直接注射该血液代用品给药入循环系统和/或间接给药入脊椎动物循环系统。直接注射方法的实例包括血管注射，例如静脉和动脉内注射，和心内注射。间接注射方法的实例包括腹膜内注射、皮下注射，这样通过淋巴系统血液代用品会运输循环系统，通过套管针或导管注射入骨髓。血液代用品优选静脉给药。

血液代用品注入之前、期间和/或之后，待处置的脊椎动物血量正常、血容量过多或血容量减少。通过如自顶装入和交换方法，血液代用品可直接进入循环系统。

血液代用品治疗学上给药，以治疗许多不同的病因引起的脊椎动物内组织缺氧，包括部分或全部循环系统流动的 RBC 减少，贫血和休克。进一步地，该血液代用品可预防地给药，以预防脊椎动物内组织缺氧，该病可能或预计由流向组织或遍及脊椎动物循环系统的 RBC 减少引起。治疗或预防治疗低氧症的血红蛋白给药的进一步讨论，特别由部分动脉障或部分微循环阻滞引起的，以及其中使用

的剂量，都由 1995 年 3 月 23 日提交的、序列号 No. 08/409,337 的共悬未决的美国专利申请提供，它通过参考完整地附在这里。

一般地，血液代用品适合的剂量，或者合用的剂量，当血浆内含有它时，该剂量会引起脊椎动物血液的血红蛋白总浓度在大约 0.1 至大约 10 克 Hb/dl 之间，如果需要弥补大量的失血，或者更多。

现在通过下列的实施例进一步和详细地描述本发明。

实施例 1

稳定的聚合 Hb 血液代用品的合成

如美国专利 No. 5,296,465 描述的，收集牛全血样品，与抗凝剂枸橼酸钠混合以制备血液溶液，然后分析内毒素含量。

收集后每个血液溶液样品保持在大约 2°C 的温度，接着以 600 目筛过滤以清除大的聚集体和颗粒。

合并之前，采用名为“牛奶中青霉素的快速检测”的方法，以购自 Difco, 底特律，密歇根的分析试剂盒测定每个血液溶液样品中青霉素的含量，确保该血液溶液中的青霉素含量 ≤ 0.008 单位/ml。

血液溶液样品然后合并，并与去热源的 (depyrogenated) 枸橼酸钠水溶液混合，在牛全血中制备按重量计 0.2% 枸橼酸钠溶液 (此后的“0.2% 枸橼酸钠血液溶液”)。

该 0.2% 枸橼酸钠血液溶液接着串联地通过 800 μm 和 50 μm 聚丙烯，以清除大的、直径大约 50 μm 或者更大的血液溶液碎片。

然后洗涤红细胞以将细胞外血浆蛋白质与红细胞分离，例如 BSA 或者 IgG，为了洗涤血液溶液中含有的红细胞，开始通过加入相等体积的滤过的等张溶液至渗滤槽，稀释渗滤槽内血液溶液的体积。以 Millipore (Cat # CDUF 050 G1) 10,000 道尔顿超滤膜过滤该等张溶液。这种等张溶液由注射用水 (WFI) 中 6.0 g/l 脱水枸橼酸钠和 8.0 g/l 氯化钠组成。

稀释的血液溶液接着通过 0.2 μm 中空纤维 (Microgon Krosflo II 微孔过滤筒) 透滤器，浓缩至其开始的体积。同时，以等于通过该 0.2 μm 透滤器滤失量速率的速率，连续加入滤过的等张溶液，作为补充。渗滤期间，稀释的血液溶液内直径比红细胞明显小的成分，或者液体，例如血浆，与滤出液一起透过 0.2 μm 透滤器壁。保留红细胞、血小板和稀释的血液中较大的物质，例如白细胞，并连续加入等张溶液，以制备透析过的血液溶液。

红细胞洗涤期间，稀释过的血液溶液保持在大约 10 至 25 $^{\circ}\text{C}$ 的温度之间，透滤器入口的流体压力保持在大约 25 psi 至大约 30 psi 之间，以提高方法的效率。

透滤器流出的滤出液的体积等于以滤过的等张溶液稀释之前的血液溶液体积的大约 600% 时，红细胞洗涤结束。

透析过的血液溶液接着以近似 4 lpm 的速率，连续泵吸至 # AS-16 型、装配有 # 28 ringdam 的厦普勒斯超速离心机。流入透析过的血液溶液同时，运行该离心机，以将红细胞与白细胞和血小板分离。操作期间，离心机以能将红细胞充分分离至重的红细胞相的速率旋转，同时也将足够部分的白细胞 (WBCs) 和血小板分至轻的白细胞相，尤其是大约 15,000 rpm 的速率。操作期间，红细胞相和白细胞相成分分别并连续从离心机中排出。

红细胞分离之后，溶解红细胞以制备含有血红蛋白的溶液。红细胞从离心机中排出时，机械地溶解大部分的红细胞。红细胞的细胞膜以一种对离心出的红细胞相流出方向成的角度，冲击在红细胞相排出管线壁上破裂，因此由红细胞释放血红蛋白（Hb）至红细胞相。

溶解的红细胞相然后经红细胞相排出管线，流入静态混合器（Chemineer, Inc.的 1/2 英寸 6 元件 Kenics）。同时转移红细胞相至静态混合器，等量的 WFI 也注入该静态混合器，其中 WFI 与红细胞相混合。红细胞相和 WFI 注入静态混合器的流速每个大约为 0.25 lpm。

静态混合器内混合红细胞相和 WFI，制备溶解的红细胞胶体。溶解的红细胞胶体接着从静态混合器转移至厦普勒斯超速离心机（# AS-16 型，Sharples Eivision of Alfa-Laval Separation, Inc.），该离心机适合于将 Hb 与非血红蛋白红细胞成分分离。离心机以能将溶解的红细胞胶体充分离心成轻 Hb 相和重相的速率旋转。轻相由 Hb 组成，并且也含有浓度近似等于或小于 Hb 浓度的非血红蛋白成分。

Hb 相经 0.45 μm Millipore Pellicon Cassette, Cat # HVLP 000 C5 微孔滤器从离心机中连续排出，并排入预备 Hb 纯化的接受罐。接着细胞基质与渗余物从微孔滤器返回至接受罐。微孔过滤期间，接受罐内的温度保持在 10°C 或更低。为了提高效率，当微孔滤器入口的流体压力从开始的大约 10 psi 升高至大约 25 psi 时，微孔过滤结束。Hb 微孔滤出液然后从微孔滤器转移至微孔滤出液罐。

随后，经 100,000 Millipore Cat # CDUF 050 H1 超滤器泵吸 Hb 微孔滤出液。将包含在该 Hb 微孔滤出液内的大部分的 Hb 和水，渗透 100,000 道尔顿超滤器以形成 Hb 超滤液，较大的细胞碎片，例如蛋白质和分子量在大约 100,000 道尔顿以上的，留存并再循环至微

孔滤出液罐。同时，WFI连续加入微孔滤出液罐作为超滤时损失的水的补充。一般地，细胞碎片包括一切完整和分段的细胞外成分，除了Hb、较小的细胞蛋白质、电解质、辅酶和有机代谢中间体之外。持续超滤直到微孔滤出液罐内Hb的浓度小于8克/升(g/l)。超滤Hb时，微孔滤出液罐的内部温度保持在大约10℃。

Hb超滤液转移至超滤罐，其中Hb超滤液接着经过30,000道尔顿Millipore Cat # CDUF 050 T1超滤器再循环，以从Hb超滤液中清除较小的细胞碎片，例如电解质、辅酶、代谢中间体和分子量小于30,000道尔顿的蛋白质，以及水，由此形成浓缩的含有大约100 g Hb/l的Hb溶液。

然后浓缩的Hb溶液直接从超滤罐装上含有介质的并联的色谱柱(2尺长，内径8英寸)，以通过高性能液体色谱法分离Hb。色谱柱含有适于将Hb与非血红蛋白蛋白质分离的离子交换介质。该离子交换介质由硅胶制成。硅胶与 γ -氧化环氧丙酸丙基硅烷接触以形成活性环氧基团，接着与 $C_3H_7(CH_3)_2NCl$ 接触以形成季铵离子交换介质。色谱法周刊，120:321-333(1976)描述了这种处理硅胶的方法。

通过能促进Hb结合的第一缓冲液(三-醋酸盐)冲洗色谱柱，预处理每根柱子。缓冲液的pH大约是 9.0 ± 0.1 。接着4.52升的浓缩Hb溶液注入每根色谱柱。注入浓缩的Hb溶液后，通过引入缓冲溶液经过色谱柱接着洗脱该色谱柱，以从柱上制备梯级pH梯度洗脱物。每个缓冲液使用时的温度大约是12.4℃。缓冲液在上色谱柱之前，经过10,000道尔顿超滤膜预过滤。

尤其是，第一缓冲溶液，20 mM 三-羟基甲基氨基甲烷醋酸盐(三-醋酸盐)(pH大约8.4至大约9.4)，运输纯水(U.S.P.)内浓缩的Hb溶液至色谱柱内的介质以键合Hb。第二缓冲溶液，pH大

约 8.3, 接着调节色谱柱内 pH 以从该色谱柱洗脱非血红蛋白成分杂质, 同时留下 Hb。采用第二缓冲溶液以近似每柱 3.56 lpm 的流速, 或大约 6.1 柱体积 (11.7 空隙体积) 连续饱和大约 30 分钟。弃去第二缓冲液的洗脱物。第三缓冲液, 50 mM 三-醋酸盐 (pH 大约 6.5 至大约 7.5), 然后从色谱柱洗脱作为纯化血红蛋白产物的 Hb。

Hb 洗脱物接着经 0.22 μ Sartobran Cat # 5232507 G1PH 滤器直接流入收集 Hb 洗脱物的罐。直接废弃最开始的 3% 至 4% Hb 洗脱物和最末尾的 3% 至 4% Hb 洗脱物。

如果该洗脱物含有小于 0.05 EU/ml 的内毒素和含有小于 3.3 nmoles/ml 的磷脂, 它可以进一步使用。向六十升、100 g Hb/l 浓度的超纯洗脱物中加入 9 l 的 1.0 M NaCl、20 mM 三 (pH 8.9) 缓冲液, 由此形成离子强度 160 mM 的 Hb 溶液, 以减小 Hb 溶液内 Hb 的氧亲和力。接着通过经超滤器再循环, 尤其是 10,000 道尔顿 Millipore Helicon, Cat # CDUF050G1 滤器, 在 10°C 浓缩 Hb 溶液, 直至 Hb 浓度为 110 g/l。

然后该 Hb 溶液脱氧化, 直至 Hb 溶液的 pO_2 减少至 HbO_2 含量大约为 10% 的水平, 通过以 12 lpm, 经 0.05 μ m Hoechst-Celanese Corporation Cat # G-240/40) 聚丙烯微孔过滤相转移膜, 再循环 Hb 溶液, 以形成脱氧的 Hb 溶液 (在这里为“脱氧-Hb”)。同时, 60 lpm 流速的氮气直接流经该相转移膜的相反侧。脱氧作用期间, Hb 溶液的温度保持在大约 19°C 和大约 31°C 之间。

脱氧作用期间, 以及随后的整个过程, Hb 保持在低氧环境, 以最小化 Hb 的氧逸出, 并保持脱氧 Hb 内氧化的 Hb (氧合血红蛋白或 HbO_2) 含量小于大约 10%。

60 l 脱氧 Hb, 与含有 0.2 wt% N-乙酰基-L-半胱氨酸、33 mM 磷酸盐缓冲液 (pH7.8)、 pO_2 小于 50 托的 180 l 贮存缓冲液, 接着经超滤器渗滤, 以制备氧化作用稳定的脱氧-Hb。与脱氧-Hb 混合之前, 贮存缓冲液以 10,000 道尔顿 Millipore Helicon, Cat # CDUF050G1 去热源 (depyrogenating) 超滤器去热源。

贮存缓冲液以近似等于超滤器滤失量的速率连续加入。持续渗滤直至经超滤器渗滤滤失的体积大约三倍于脱氧-Hb 开始的体积。此时贮存该物。

转移氧化作用稳定的脱氧-Hb 至聚合反应设备之前, 加入贫氧的 WFI 至聚合反应器清除聚合反应设备的氧, 以防止氧化作用稳定的脱氧-Hb 氧化。当氧化作用稳定的脱氧-Hb 加入聚合反应器时, 加入至聚合反应器的 WFI 量能导致 Hb 溶液浓度为大约 40 g Hb/l。然后经整个聚合反应设备的 WFI 再循环, 通过 0.05 μm 的聚丙烯微孔相转移膜 (Hoechst-Celanese Corporation Cat # 5PCM-108, 80 sq. ft.) 对着加压的氮气逆流, 进行 WFI 脱氧。经过相转移膜的 WFI 和氮气的流速, 分别是大约 18 至 20 lpm 和 40 至 60 lpm。

聚合反应设备内的 WFI 的 pO_2 减少至小于大约 2 托 pO_2 之后, 聚合反应器覆盖氮气, 氮气以大约 20 lpm 的流速进入聚合反应器液面上空间。然后氧化作用稳定的脱氧-Hb 转入该聚合反应器中。

在通过混合 Hb 溶液和水制备的, pH7.8、氯化物浓度小于或等于大约 35 mmolar 的 12 mM 磷酸盐缓冲液中实施该聚合反应。

氧化作用稳定的脱氧-Hb 和 N-乙酰基半胱氨酸随后与交联剂戊二醛缓慢混合, 5 小时内每公斤 Hb 特别采用 29.4 克戊二醛, 同时加热至 42°C, 通过 6 元件的 Kenics 1-1/2 英寸静态混合器 (Chemineer, Inc.) 再循环 Hb 溶液, 以形成聚合的 Hb (聚 (Hb)) 溶液。

经静态混合器对氧化作用稳定的脱氧-Hb 和戊二醛进行再循环引起了涡流情况，使戊二醛和氧化作用稳定的脱氧-Hb 大体均匀地混合一起，由此减少了形成含有高浓度戊二醛的脱氧-Hb 料袋的潜力。戊二醛和脱氧-Hb 的大体均匀混合减少了高分子量聚(Hb)(分子量超过 500,000 道尔顿)的形成，并且亦允许快速混合戊二醛和脱氧-Hb。

此外，明显的 Hb 分子内交联导致 Hb 聚合期间，N-乙酰基半胱氨酸含量在 Hb 聚合之上。

聚合反应之后，聚合反应器内聚(Hb)溶液的温度低至大约 15 °C 和大约 25 °C 的温度之间。

接着通过超滤器再循环聚(Hb)溶液浓缩这种聚(Hb)溶液，直至聚(Hb)溶液浓度升高至大约 85 g/l。适合的超滤器的实例是 30,000 道尔顿滤器(例如，MiLLipore Helicon, Cat # CDUF050LT)。

随后，该聚(Hb)溶液接着与 66.75 g 硼氢化钠溶液混合，通过静态混合器又再循环该聚(Hb)溶液。特别地每九升的聚(Hb)溶液，以 0.1 至 0.12 lpm 的速率加入 1 升 0.25 M 的硼氢化钠溶液。

向聚(Hb)溶液加入硼氢化钠之前，通过调节 pH 至大约 pH 10，碱化聚(Hb)溶液 pH，以保护硼氢化钠和防止氢气生成。聚(Hb)溶液通过与 12 mM 近 215 l 分离加热的、脱氧硼酸钠缓冲液一起渗滤，该缓冲液 pH 为大约 10.4 至大约 10.6，调节聚(Hb)溶液的 pH。聚(Hb)溶液通过从聚合反应器中经 30 KD 超滤器再循环聚(Hb)溶液渗滤。加入聚(Hb)溶液的硼酸钠的速率近似等于渗滤经超滤器滤失的速率。持续渗滤直至经超滤器渗滤滤失的体积大约三倍于聚合反应器内聚(Hb)溶液开始的体积。

调节 pH 之后，向聚合反应器内加入硼氢化钠溶液，以将聚(Hb)溶液内的亚胺键还原成酮亚胺键并在溶液中形成稳定的聚(Hb)。硼氢化钠加入期间，聚合反应器内的聚(Hb)溶液经静态混合器和 0.05 μm 聚丙烯微孔过滤器相转移膜连续再循环，以清除溶液的氧原子和氢原子。迅速和有效地混合硼氢化钠和聚(Hb)溶液条件下，流经静态混合器也导致硼氢化钠紊流。聚(Hb)溶液和氮气经过 0.05 μm 相转移膜的流速分别在大约 2.0 至 4.0 lpm 和大约 12 至 18 lpm 之间。硼氢化钠加入完成之后，聚合反应器内连续还原，同时那里包含的搅拌器以大约每分钟 75 转的速度旋转。

硼氢化钠加入大约 1 小时后，聚合反应器内稳定的聚(Hb)溶液经 30,000 道尔顿超滤器再循环，直至该稳定的聚(Hb)溶液浓度为 110 g/l。浓缩之后，为形成稳定的聚合 Hb 血液代用品，通过经 30,000 道尔顿超滤器，渗滤聚(Hb)溶液和滤过的、脱氧的低 pH 缓冲液，该缓冲液含有 27 mM 乳酸钠、12 mM NAC、115 mM NaCl、4 mM KCl 和 1.36 mM CaCl_2 (pH 5.0)，稳定聚(Hb)溶液的 pH 和电解质恢复至生理学水平。连续渗滤，直至通过渗滤经超滤器滤失的体积大约 6 倍于浓缩的 Hb 产物的渗滤前体积。

pH 和电解质恢复至生理学水平之后，通过向聚合反应器加入滤过的、脱氧的低 pH 缓冲液，稳定的聚合 Hb 血液代用品然后稀释至 5.0 g/dl 的浓度。稀释的血液代用品接着再循环渗滤，通过从聚合反应器经静态混合器和 100,000 道尔顿纯化过滤器，逆着滤过的脱氧缓冲液，该缓冲液 WFI 内含有 27 mM 乳酸钠、12 mM NAC、115 mM NaCl、4 mM KCl 和 1.36 mM CaCl_2 (pH 7.8)。持续渗滤，直至分离条件下，血液代用品含有小于或等于大约 10% 的由 GPC 得到的改性 Hb 四聚物和未改性的四聚物。

纯化过滤器在具有限制渗透线的低贯穿细胞膜压力条件下运行。充分量的改性 Hb 四聚物或未改性 Hb 四聚物清除之后,经 30,000 道尔顿超滤器连续再循环血液代用品,直至血液代用品的浓度大约为 130 g/l。

稳定的血液代用品然后在低氧环境和低氧无渗漏的适合的容器内贮存。

实施例 2

聚合的血红蛋白的分析

通过“Kinetic/ Turbidimetric LAL 5000 Methodology”方法检测血红蛋白产品的内毒素浓度,该方法由 Cape Cod, Woods Hole, 马塞诸塞, J. Levin 等人, J. Lab. Clin. Med.,75:903-911(1970)发展。为测试痕量基质采用了各种方法,例如,为本领域熟练技术人员公知的适于特定细胞膜蛋白质或糖脂的沉淀分析法、免疫印迹法、酶联免疫吸附测定(ELISA)。

颗粒的计数通过美国药典, 22:1596,1990 “注射剂中的微粒物质: 适于单次剂量注入的大体积注射剂”确定。

为检测戊二醛的浓度, 400 μ l 血红蛋白产品的标准样品与二硝基苯胍衍生, 然后 100 μ l 等分试样的衍生溶液 27 $^{\circ}$ C 下以 1 ml/min 的速率梯度注入 YMC AQ-303 ODS 柱。梯度由两个移动相, 0.1% 三氟醋酸(TFA)水溶液和 0.08% TFA 乙腈溶液组成。梯度流由连续 6 分钟的 60% 0.08% TFA 乙腈溶液、12 分钟内线性梯度增至 85% 0.08% TFA 乙腈溶液、4 分钟内线性梯度增至 100% 0.08% TFA 乙腈溶液和 100% 0.08% TFA 乙腈溶液保持两分钟以及再饱和两分钟的 45% 0.1% TFA 水溶液组成。紫外检测在 @360nm 检测。

为测定 NAC 浓度，一等分试样的血红蛋白产品以脱氯的磷酸钠水溶液稀释至 1:100，并取 50 μ l 梯度注入 YMC AQ-303 ODS 柱。该梯度缓冲液由磷酸钠水溶液和 0.05%TFA 和 80%乙腈水溶液混合物组成。该梯度流由 15 分钟 100%磷酸钠水溶液、然后 5 分钟内线性梯度增至 100%并保持 5 分钟的 80%乙腈水溶液和 0.05%TFA 组成的混合物。该系统接着以 100%磷酸钠水溶液饱和 20 分钟。

磷脂分析通过基于包含在下列两个文件中的方法完成：Kolarovic 等人，“适于生物来源的磷脂的分离的提取方法比较”，*Anal. Biochem.*, 156:244-250, 1986 和 Duck-Chong, C. G., “适于检测包含有消化硝酸镁的磷脂磷的快速灵敏方法”，*Lipids*, 14:492-497, 1979。

渗透克分子量可通过先进的低温（Cryomatic）渗压计分析检测，该渗压计为#3C2 型，Advanced Instruments Inc., Needham, 马塞诸塞。

总的血红蛋白、高铁血红蛋白和氧合血红蛋白浓度可通过共同血氧计检测，型号为#482，马塞诸塞，来克星顿，仪器实验室。

Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 、 Ca^{++} 、 pO_2 浓度可通过 Nova 生物医学公司，Waltham，马塞诸塞 Novastat 方案（profile）4 检测。

通过宾西法尼亚，Southampton, TCS 公司的 Hemox-分析器检测氧原子结合常数 P_{50} 。

温度和 pH 通过本领域熟练技术人员公知的方法测定。

分子量 (M.W.) 通过在分离条件下对血红蛋白产品实施凝胶渗透色谱法 (GPC) 检测。为了分子量分布，分析血红蛋白产品的标准样品。血红蛋白产品以 50 mM 双—三 (pH6.5)，750 mM MgCl_2 ，和 0.1 mM EDTA 的移动相稀释至 4 mg/ml。此缓冲服务从聚 (Hb)

中将 Hb 四聚物分解成二聚物，这样不能通过分子内或分子间的交联与其它的 Hb 二聚物交联，稀释过的样品注入 TosoHaas G3000SW 柱。流速为 0.5 ml/min，紫外检测 280 nm 记录。

表 II 和表 III 分别总结了上述畜用 (OXYGLOBIN™) 和人 (HEMOPURE™2) 的按照本发明的方法制备的 Hb 血液代用品试验的结果。

表 II

参数	结果
pH(18-22°C)	生理学上可接受的 pH
内毒素	<0.5 EU/ml
无菌试验	符合检测
磷脂 ^a	<3.3 nm/ml
血红蛋白总量	12.0-14.0 g/dl
高铁血红蛋白	<15%
氧合血红蛋白	<10%
钠, Na ⁺	145-160 mM
钾, K ⁺	3.5-5.5 mM
氯, Cl ⁻	105-120 mM
钙, Ca ⁺⁺	0.5-1.5 mM
硼	<10 ppm
渗透克分子量	290-310 mOsm
戊二醛	<3.5 µg/ml
N-乙酰基-L-半胱氨酸	<0.2%
M.W. >500,000	<15%
未改性四聚物	<5%
>10µ颗粒含量	<12/ml
>25µ颗粒含量	<2/ml

^a 聚合前检测 Hb

表 III

参数	结果
pH(18-22°C)	生理学上可接受的 pH
内毒素	<0.5 EU/ml
无菌试验	符合检测
磷脂 ^a	<3.3 nm/ml
血红蛋白总量	12.0-14.0 g/dl
高铁血红蛋白	<15%
氧合血红蛋白	<10%
钠, Na ⁺	145-160 mM
钾, K ⁺	3.5-5.5mM
氯, Cl ⁻	105-120 mM
钙, Ca ⁺⁺	0.5-1.5 mM
硼	<10 ppm
渗透克分子量	290-310 mOsm
戊二醛	<3.5 µg/ml
N-乙酰基-L-半胱氨酸	≤0.2%
M.W. >500,000	≤15%
M.W. ≤65,000	<10%
M.W. <32,000	<5%
>10µ颗粒含量	<12/ml
>25µ颗粒含量	<2/ml

^a 聚合前检测 Hb

实施例 3

犬活体内肿胀效应的检测

此项研究的目的是通过最大负荷剂量之后测量血浆的膨胀体积，检测用于脾切除的小猎犬的畜用（OXYGLOBIN™）的血红蛋白血液代用品的活体内肿胀效应，特别是服用每克血红蛋白进入血管内空间的水的体积。此外，亦检测对比剂量的（RHEOMACRODEX™-Saline），Pharmacia 制造，它是 10%葡聚糖 40 和 0.9%盐水。

两只狗在常规健康筛选和至少四周的驯化期之后参加了本研究中。该狗治疗之前脾切除了至少 3 天。它们以阿托品和 HCl 杜冷丁预先麻醉，并通过吸入异氟烷麻醉。外科手术期间以 10-20 ml/kg/hr 的速率注入乳酸林格氏溶液。

这些狗经任意的头侧导管以 20 ml/kg/hr 速率吸收 Hb 血液代用品（40 ml/kg）。给药之前和给药后 1/4、1/2、1、2、3、4 小时或者更长时间测量血细胞比容，直至确立血细胞比容的最低点。

狗的脾被切除，以确保恒定的血浆容量和红细胞量，以准确测量给药后血浆容量的变化。

采用下列公式可计算血浆容量的变化：

$$\Delta \%PV = \left\{ \frac{Hct_1(1-Hct_2)}{Hct_2(1-Hct_1)} - 1 \right\} 100$$

这里 PV 是血浆容量，Hct₁ 是开始的血细胞比容，Hct₂ 是最终的血细胞比容。假定循环血容量内的红细胞数目和平均红细胞体积保持不变，该计算的结果基于血细胞比容的变化。

如表 IV 所示，两只狗血细胞比容的最低点产生在给药后两小时。整个研究平均红细胞体积 (MCV) 保持稳定。

表 IV

时间 (小时)	血细胞比容(%)		MCV (fL)	
	狗 3505C	雄狗 14	狗 3505C	雄狗 14
0	46	55	67.6	67.2
1/4	41	50	68.1	67.7
1/2	37	48	67.5	67.2
1	35	41	68.6	67.9
2	31	37	68.1	67.1
3	33	39	66.8	66.1
4	32	40	66.3	65.4

给药后 3503C 狗和雄狗 14 血管内流入的该体积液体分别是 6 ml/g 血红蛋白和 9 ml/g 血红蛋白。合成的胶体溶液 (Rheomacrodex@-盐水) 的剂量，根据产生类似肿胀效应剂量计算。每克静脉内给药从间质组织得到大约 22 ml Rheomacrodex 液体。

相对于 30 ml/kg 和 15 ml/kg Hb 血液代用品，Rheomacrodex 计算出的对照剂量分别是 14 ml/kg 和 7 ml/kg。

以 (Oxyglobin™) Hb 血液代用品方式流入血管内的该体积液体是 8 ml H₂O/克血红蛋白。由于该体积的剂量是 30 ml/kg，该剂里中血红蛋白的浓度是 13 g/dl，每剂量血红蛋白的总量是 3.9 g/kg，并且以 Hb 血液代用品方式流入血管内空间/剂量液体的总体积是 31.2 ml。

合成胶体溶液流出大约 22 ml 水/克葡聚糖。每对照剂量的 Hb 血液代用品，胶体溶液内葡聚糖的总量是 1.4 g。因而，流入血管内空间的液体/对照剂量胶体溶液的总体积是 14 ml。

实施例 4

犬用药效果研究

实施该研究，以检测本发明的兽用（OXYGLOBIN™）Hb 血液代用品的药效和用药效果，合成的胶体溶液作为对照，该胶体溶液（RHEOMACRODEX™-盐水）是 10%的葡聚糖 40 和 0.9%的盐水，考虑到脾切除的小猎犬急剧的血量正常的血液稀释之后 60 分钟和 24 小时，动脉氧的含量与犬红细胞血红蛋白和氧的运输有关。

急剧的血量正常的血液稀释是一种模仿外科失血引起的临床贫血症状的实验模型。通过这种方法产生大贫血（Hct-9%，Hb-3 g/dl），导致彻底需要氧原子载体。氧的运输和氧的含量与大量出血一起急剧下降。

在进展的血量正常的血液稀释模型内，人们发现或者通过单独的体积膨胀，如对照组的狗实施的，或者通过与动脉内氧含量的增加相关的体积膨胀，如以血红蛋白溶液治疗的狗发生的，恢复氧运输的治疗必须在大约 10 分钟内到达 9%的血细胞比容，以避免这些然后都会导致死亡的血液压力和心输出量不可逆下降。

给药期间或之后，本研究里 12 只对照狗的 2 只死去，即使它们以葡聚糖 40 溶液扩张的动脉容量，在 5 分钟内到目标的血细胞比容。这些狗的死亡是该实施模型的严重反映，它依次描绘了急性失血苛刻的临床症状。

三十只狗在常规健康筛选和至少四周的驯化期之后参加了本研究中。采用三组狗平行测定（A、B 和 C）的治疗是阶段性的，每个平行测定包含一种狗/性别/组。在治疗日的 32 天前狗随机分为 5 组（6 只狗/组，3 雌 3 雄）。采用保证组间平均分布的方法，根据体

重通过随机确定，狗指定到各个组中。雄狗和雌狗分别随机确定。任何一只具有不可接受的参数的狗，例如异常的临床征象或临床病毒学数据，由同样环境条件下饲养的备用狗取代。

通过单独的静脉输入，给予试验/对照物。输入速率通过输入泵控制。每小时实际输入体积依赖于每只狗最近的体重。

血红蛋白溶液的最高剂量基于由血量正常的狗体积膨胀引起的急性心血管效应的安全上限。选择中等范围的剂量以确定用药效果曲线的形状。最低剂量基于由狗的体积和血液动力效应决定的临床相关剂量的下限。

每只狗在治疗的至少七天前切除脾，以避免由脾萎缩引起的增加的循环的红细胞量对实验模型的影响。以血红蛋白溶液处理时，每只狗通过吸入异氟烷麻醉，并采用 20-25 ml/Kg 潮气流量的室内空气机械通风。操作期间调节通风速率以将动脉的 $p\text{CO}_2$ 保持在大约 40 mmHg。测量和控制最终预计浓度的异氟烷，以提供一种狗对狗麻醉水平的有效对照。为了检验血液动力功能和氧运输参数，将这些狗安上仪器。由压力和压力记录分析，确认了肺动脉内装置流向 (flow-directed) 导管。双腔的导管，具有热稀释法心输出量性能，置于股动脉，以提供一种适于血压监控和血液的动脉管道。为了补充体积和服用试验/对照物，一只导管置于头侧静脉，或者其它的静脉，如果需要。

手术之前一天，手术当天和脾切除后 3 天，每只狗每天一次预防性地接受抗生素的肌肉注射 (普鲁卡因青霉素 G)。V-Sporin，一种局部抗生素 (多粘菌素 B、杆菌肽、新霉素)，需要时每天涂至外科手术处。

仪器安装之后，血液动力稳定至 $p\text{CO}_2$ 达到大约 40 mm Hg，并且完成基准测量的采集。为保持等张状态，通过使狗出血并同时以大约 1.6 至 2.3 倍抽出体积的乳酸林格氏溶液取代，然后造成了急剧的血量正常的血液稀释模型。通过保持肺动脉嵌入压在大约基准值，达到了等张状态。血液抽出/体积取代花费大约 45 至 90 分钟，直至血红蛋白浓度大约为 30 g/l (3.0 g/dl)。采用静脉内重力装置和输入袋周围的压力套，将乳酸林格氏溶液迅速输入。如果在急性贫血发生之后和开始给药之前，收缩压 ≤ 50 mmHg 并超过 5 分钟，淘汰这只狗并由保持同样环境状态的备用狗代替。

服用的胶体对照和血红蛋白溶液剂量如表 V 规定的。放血、给药之前、给药后立即、给药 60 分钟和 24 小时后进行血液动力测量。60 分钟时测量之后，狗由麻醉状态恢复知觉，为了血液动力测量，给药 24 小时后实施重新安装仪器。

表 V

组	试验物	给药体积 ml/Kg	给药速率 ml/Kg/h	动物/组	
				雄	雌
1	胶体对照 (中剂量)	14	20	3	3
2	胶体对照 (低剂量)	7	20	3	3
3	Hb 血液代用品 (低剂量)	15	20	3	3
4	Hb 血液代用品 (中剂量)	30	20	3	3
5	Hb 血液代用品 (高剂量)	45	20	3	3

以放血前或给药前的任一数值作为协方差，通过方差分析（ANOVA）或者协方差分析（ANCOVA）对所有血液动力参数进行统计学意义上的分析。建立特别的线性对照，以试验给药溶液的体积效应、Hb 血液代用品的效应（药效），以及 Hb 血液代用品的用药效果应（用药效果）。实施这些试验，仅仅为了实验组之间的参数，实验组间的差异是统计上显著水平为 0.05。在选择时间点的指定的变动的对照通过每组成对的 t-检验进行。

动脉氧含量是本研究中的一项效力标准。动脉氧含量是细胞和血浆血红蛋白的氧运输能力以及血浆中溶解的氧的量度标准。缺少血浆血红蛋白，由通过饱和的细胞血红蛋白运输的氧含量和吸入氧分压，计算出动脉内氧含量。由于预计血浆血红蛋白明显有助于本研究的氧含量，采用 Lex02Con-K 仪器（Chestnut Hill, MA）直接测量氧含量。实验期间不能给予富含氧的空气，因为它是不必要的，并且为了避免增加的吸入氧浓度对动脉内氧含量测量的混淆效应。

诱发贫血之后各组平均动脉和静脉氧含量分别下降大约 4 至 8 倍。与一切 Hb 血液代用品治疗组给药之前的值对比，给药 60 分钟之后动脉氧含量显著增加，并且中和高剂量组给药 24 小时之后仍然显著增加。任一对照组给药之后动脉或静脉氧含量并不变化。

如图 2 所示，与对照组相比，给药 60 分钟和 24 小时之后，血液代用品治疗组的动脉氧含量明显增加。在给药 60 分钟和 24 小时之后，观察到了线性的用药效果。给药 60 分钟后检测到了动脉氧含量的显著的体积效应。

与对照组相对，给药 60 分钟和 24 小时之后，血液代用品治疗组的静脉氧含量也显著增加。该增加显示给药之后 60 分钟为线性用药效果，但在 24 小时并非线性。

对于 Hb 血液代用品治疗组给药 60 分钟之后动脉—静脉 (A—V) 氧含量差, 观测到的用药效果归因于显著的体积效应, 该体积效应基于缺乏药效和对照组给药 60 分钟之后体积效应的类似观察。与胶体对照组比较, Hb 血液代用品治疗组显示在 24 小时 A—V 氧差显著的增长, 并具有显著的线性用药效果。A—V 差必须从心输出量的角度解释。给药 24 小时之后, 对照组的 A—V 差明显低于 Hb 血液代用品治疗组的。这种区别的一种解释是对照组的狗必须依赖较高的心输出量以满足外周组织的氧消耗。Hb 血液代用品治疗组在给药之后 24 小时保持足够大的 A—V 差, 以满足外周组织的需要, 且不会导致心输出量增加。

除了动脉氧含量之外, 在本研究中检测了与犬红细胞血红蛋白贡献 (CaO_2/g 红细胞血红蛋白) 相关的正常的动脉氧的总含量。由于所有组中红细胞血红蛋白是稳定的, 为了证明给药组间动脉氧含量的差异, 进行了此比较。血浆或血红蛋白总浓度和动脉氧含量潜在的相关性会提供一种有效的临床疗效检测。如图 3 所示, 给药之 60 分钟和 24 小时后, 所有 Hb 血液代用品治疗组 (除了 24 小时的低剂量组之外) 相对于给药前值, 显示在 CaO_2/g 红细胞血红蛋白上显著增加。给药之前和给药 60 分钟或 24 小时之后, 胶体对照组的与红细胞血红蛋白贡献相关的动脉氧含量并没有显著差异。

与胶体对照组相比, 给药 60 分钟之后, Hb 血液代用品治疗组的与红细胞血红蛋白相关的动脉氧总含量显著增长, 并具有显著的线性用药效果。给药之后 24 小时也发生具有明显线性用药效果的显著的用药效果, 但该药效并不十分显著 ($P < 0.06$)。

疗效的另一个标准是氧运输。基于动脉氧含量和心输入量计算氧的运输。因此, 氧运输受一切对心输出量有影响的生理因素影响。本研究的选择的对照是合成胶体 (RHEOMACRODEX™-盐水,

Pharmacia), 它是 10%的葡聚糖 40 和 0.9%的盐水, 由于它可扩张血管内体积而且公知不能运输氧。对照组对 Hb 血液代用品内血红蛋白的胶体性能可提供一种等价的体积膨胀对照。

由于每个剂量的 Hb 血液代用品预计产生直接的体积效应, 为了该体积效应采用两倍剂量的葡聚糖溶液作为对照, 这样数据才能反应不同剂量的药效。进行低和中剂量的对照。胶体对照的剂量基于葡聚糖 40 的剂量选择, 该剂量提供体内低和中剂量试验物肿胀效应等价的对照, 如由实施例 2 的结果决定的。

采用胶体中剂量 (14 ml/kg) 和胶体低剂量 (7 ml/kg) 之间平均值的差异, 统计学上确定体积效应。通过将每个 Hb 血液代用品治疗组与其相对应的胶体对照组比较, 确定药效。当低和高剂量 Hb 血液代用品治疗组之间可见统计学上显著性差异时, 线性用药效果确立。

按照该公式: $DO_2 = CO \times CaO_2 \times 10/kg$ 计算氧运输, CO 是心输出量, CaO_2 为动脉氧含量。如预期的, 所有治疗组贫血诱发之后, 所有组的 DO_2 平均下降二至三倍。氧含量的充分降低, 不得不由增加心输出量和提高氧的逸出以维持基准氧消耗, 导致较低的静脉氧含量。如图 4 所示, 与给药前的值相比, 给药 60 分钟后, 低剂量 Hb 血液代用品治疗组氧运输增加了大约 30%, 中剂量和高剂量血液代用品治疗组超过了 100%。该差异对所有三组给药组是显著的 ($P < 0.05$)。此时间, 对照组并没有显示明显差异。给药后 60 分钟时, 具有显著药效和线性剂量反应的 DO_2 在所有组间明显不同。24 小时, 所有组之间氧运输上无差异。所有 Hb 血液代用品治疗组, 与它们相对应的胶体对照组相比, 给药 60 分钟之后氧运输的提高, 除了心输出量的适度增加之外, 主要归功于与动脉氧含量提高有关的剂量。

按照该公式： $VO_2 = CO \times CaO_2 \times 10 \text{ kg}$ 计算氧的消耗。所有治疗组贫血诱发之后，所有组的 DO_2 平均下降二至三倍。Hb 血液代用品治疗组或对照组间或者同一组内给药前与给药后的值比较，未记录统计学上的显著性差异。

贫血诱导之后，所有组的氧逸出速率 (VO_2/DO_2) 显示大约增长三倍。与对照组相比，给药 60 分钟之后，所有 Hb 血液代用品治疗组的氧逸出速率以依赖于剂量的方式明显减少。给药 24 小时后，Hb 血液代用品治疗和对照组之间未见显著差异。

诱发贫血之后所有组的平均心输出量增加至 10%和 39%之间。给药 24 小时之后，与放血前的值相比，胶体对照组的心输出量显著增加，并非 Hb 血液代用品治疗组。归因于低胶体组和中等剂量组之间心输出量显著差异的明显的体积效应，在给药 60 分钟后很明显。心输出量的增长可能与给药后血管内体积膨胀引起的心搏量增长，或者由严重贫血的应激反应引起的交感神经音增强有关。给药 60 分钟之后，Hb 血液代用品低剂量和高剂量组之间的剂量反应明显，但给药 24 小时之后并不明显。在给药 60 分钟或 24 小时之后，Hb 血液代用品治疗和胶体对照组之间心输出量上未见差异。

贫血诱发期间，肺动脉嵌入压 (PAWP) 并没有显著变化。与给药之前的数值相比，给药 60 分钟后，低剂量胶体组内 PAWP 显著减少，中剂量组内保持不变。与给药之前的数值相比，给药 60 分钟后，中和高剂量的 Hb 血液代用品治疗组的 PAWP 以线性剂量反应显著增加。增加的 PAWP 反应剂量依赖于给药 60 分钟后血管内体积的增长。给药 60 分钟或 24 小时之后，Hb 血液代用品治疗组和对照组之间未发现显著的药效。给药 60 分钟之后，在胶体对照组中发现了显著的体积效应。

贫血诱发之后，所有组的心收缩、心舒张和平均动脉血压明显下降，然后给药之后显著升高。贫血诱发后动脉心收缩压的下降可能与由血液粘度下降——贫血的后果引起的外周血管阻力下降有关。给药 60 分钟之后，两个胶体对照组的心收缩、心舒张和平均动脉血压与给药前的值并无显著不同。与给药前的值相比，低剂量胶体对照组给药 24 小时之后的心收缩、心舒张和平均动脉血压显著增加。相反，与给药前的值相比，所有 Hb 血液代用品治疗组给药 60 分钟和 24 小时之后的心收缩、心舒张和平均血压的增长具有统计学上的显著性。给药之 60 分钟后，Hb 血液代用品治疗组的心收缩、心舒张和平均血压的显著高于相对应的胶体对照组，但并不是在给药 24 小时之后。

与给药前的值相比，给药 60 分钟之后，观测到中等和高剂量 Hb 血液代用品治疗组的心收缩、心舒张和平均动脉压的增长。中等剂量 Hb 血液代用品治疗组的肺动脉心舒压给药之后 24 小时持续增长。此外，与给药前肺动脉压平均值相比，低剂量胶体组给药 24 小时后显示统计学上显著性的增长。此增长可认为具有临床显著性。与给药前的值相比，Hb 血液代用品给药 60 分钟之后，系统动脉心收缩压和舒张压的增长是该 Hb 血液代用品的直接的药效。胶体对照组的心舒压保持不变，这可能是的外周血管阻力的结果。

给药 60 分钟或 24 小时之后，Hb 血液代用品治疗和对照组之间，未发现肺动脉心收缩压有显著差异。相反，给药 60 分钟之后，而不是 24 小时，与体积、药物、用药效果有关的肺收缩压和平均动脉压显著不同。

由于放血，血红蛋白总量减少了大约四倍或更多。与相对应的胶体对照组相比，给药 60 分钟和 24 小时后，Hb 血液代用品治疗组血红蛋白总量显示一种依赖于剂量的增长。

与相对应的胶体对照组相比，给药 60 分钟和 24 小时后，Hb 血液代用品治疗组的血浆血红蛋白浓度以一种依赖于剂量的方式显著增长。给药后所有 Hb 血液代用品治疗组的血浆和总的血红蛋白浓度的增长，与它们相应的胶体对照组相比，归功于 Hb 血液代用品的血红蛋白浓度。依赖剂量的显著增长持续 24 小时，伴随着动脉氧含量的持续增长。

总之，以 Hb 血液代用品治疗的该反应是线性的，即，给药 60 分钟之后，Hb 血液代用品的剂量越高，与相应的胶体对照组相比，氧运输和血液动力学的提高越大。保持的动脉氧含量和正常的临床征象，呼吸室内空气时，维持 30 ml/kg 和 45 ml/kg 剂量 Hb 血液代用品治疗组内持续 24 小时的 Hb 血液代用品的有益的生物效应。Hb 血液代用品的清除能解释给药 24 小时之后氧运输和血液动力学效应里观察到的变化。最后，本研究的结果支持 30 至 45 ml/kg 剂量范围的选择。这些给药组中的两个显示疗效的参数统计学上显著不同于相应的胶体对照组，并且剂量反应是线性的。

此剂量范围的临床原理基于这个事实，严重贫血的狗（例如，标有临床征象的血细胞比容 < 15%）会受益于较高的剂量，如通过提高的动脉氧含量和氧运输量的线性剂量反应描述的。然而，更多保守的适于狗的剂量会显示，这些狗可能预先处置至血管内体积负荷过多。Hb 血液代用品治疗组内，给药 60 分钟之后，观察到的肺动脉嵌入压和肺动脉压依赖剂量的瞬间增加，会限制更高剂量在此群体狗中使用。因此 30-45 ml/kg 的剂量对广群体的规定贫血程度和血管内体积情况的狗有效。

实施例 5

人体剂量反应研究

实施此研究，以评价 Hb 血液代用品（这里为 HBOL）静脉给药渐增的速率，在人体血液动力学、神经内分泌和血液学参数上的安全性和耐受性。试验者是正常健康的成年男性（70—90kg），18-45 岁之间。研究期间，控制试验者等热量饮食，每天碳水化合物 55%、脂肪 30%（多不饱和与饱和脂肪比例为 2:1）、15%的蛋白蛋和 150 mEq 钠盐。液体摄取量每天至少 3000 ml，并避免饮料中含有咖啡因。也要避免采用相伴的药物治疗。进一步地，研究期间受试者不能饮酒吸烟。

研究的 12 个受试者，分成三个试验组。每个试验组内，三个受试者接受 HBOL，一个作为对照，接受乳酸林格氏溶液。每个试验组具有不同的 HBOL 输入速率。单盲法实施该研究，三十天间隔后速率增加研究。

研究的第 1 天，住院阶段期间，每个受试者具有一个植入非支配的手的桡动脉的小规格的动脉导管。植入的位置以抗菌溶液（乙醇和/或碘）清洗，然后少量 1%至 2%的利多卡因抗菌溶液随后注入桡动脉位置之上。植入动脉导管以监控血压和促进血液气体评估。一至二小时后，大孔径静脉导管（肘窝需要 16 规格）放置在所有受试者一臂的静脉上。接着每个受试者在小于 15 分钟的时间内以静脉切开术放出 750 ml（1.5 单位）的全血，然后通过 2 小时内输入 2250 ml 乳酸林格氏溶液，进行等张（isovolemic）血液稀释。

采用无菌技术，接着静脉输入 45 克（346 ml）的 HBOL，按顺序经过标准 80 微米血液滤器、5 微米滤器，和臂静脉上大孔径的静

脉导管，分别以 0.5 gm/分钟、0.75 gm/分钟和 1.0 gm/分钟的速率输入试验组 1、2 和 3 的每个受试者。

同时，通过桡动脉导管、连续的肺功能试验、心脏功能评价和多种血液学、化学以及尿分析实验室试验入侵性监测每个受试者，它们开始 HBOL 注入之后在第一个 28 小时之内常规地和通常地实施。

随后，门诊阶段（2-29 天），放血后头四天每天进行实验室研究、生命特征、ECGs 和医疗结果，然后一个月内每周进行。

第 1 天期间，HBOL 治疗组（输入之后）血液动力学显著，心收缩、舒张和平均动脉压高于对照组。尽管血压数据伴随患者行动（例如，进餐或使用浴室期间）和每日的节奏，具有明显的可变性，仅第 1 天期间，HBOL—治疗的受试者通常具有高于对照组的心收缩（大约 5-15 mm Hg）、舒张（大约 5-10 mm Hg）和平均动脉压（大约 10 mm Hg）数值。8-12 小时之间血压值趋于达到峰值效应，睡眠和紧接着除去动脉导管期间返还至基准。第 1 天期间，与对照组相比，所有 HBOL—治疗组脉搏搏通常低于 10 次。在输入的开始 15 分钟之内，可见脉搏曲线的最低点。24 小时之后所有试验组的值相同。

输入的第 1 小时期间，心脏指数降至大约 $1-2 \text{ l/min/m}^2$ 并保持相当于 1 l/min/m^2 ，经 4 小时低于对照组，接着通过 4 小时恢复至基准。在患者活动期间，心脏指数也升高（如上）。

总的外周阻力平行于血液压力变化，然而，2 小时内阻力值返回至基准。系统血压瞬间增加伴随着总的外周阻力的增加以及心脏指数的下降，这并不是不希望的。声明在服药速率和血液动力反应大小上无差异以及指出没有干预是重要的。

肺功能试验（包括呼吸量测定法和肺容量的多次测定）和动脉血液气体测量是不显著的。值得注意的是 HBOL—治疗组观察到的增强的扩散容量。到 24 小时，扩散容量 10-15% 的增长与对照组 10% 的减少相比，具有统计学上显著性。由于所有经受放血和血液稀释的组的数量，这些发现特别重要。

在血液学研究中，其它超出预料的，伴随放血和血液稀释过程的血红蛋白、血细胞比容、红细胞数和血清蛋白质瞬间下降，血液学和血清化学实验室试验不显著的。例外的是血清铁和铁蛋白，它们通过 HBOL 给药后 6 和 48 小时分别显示出峰值。

血清化学检测是不明显的，除了一个受试者（#10）之外，它在血清转氨酶和脂酶上有瞬间升高。声明这些酶升高时，该受试者没有任何伴发的临床显著的医疗事件（例如，咽下困惑难或腹部疼痛），这很重要。这些实验室异常的准确的病因学不清楚，但以前的研究表明 Oddi 氏括约肌或其它的肝胆管和胰腺管系统的部分瞬间亚临床的痉挛或许会包括。声明这些变化是瞬间的（并不伴随异常的不适）和不带有明显的后遗症，这很重要。受试者#10 给药后胆囊超声显示没有明显的变化。

整个研究中尿的分析不显著。研究期间未检测到受试者的尿血红蛋白。此外，如预料到的，肌酸酐的清除率略高，在血液稀释期间，与蛋白质结合的尿的腺苷脱氨酶、电解质（钠、钾、氯）、铁、微铝、NAG（N—乙酰基— β —葡萄糖基转移酶）和尿的尿素氮不明显。

作为给药速率的函数，观察到主要的药动学参数没有明显变化。为了尺寸排阻（凝胶过滤）色谱法（SEC）分析总的血红蛋白和血红蛋白片段明显的分子量，HBOL 开始输入之前和之后，收集连续的血标本和蓄积的尿标本。仅观察到离散的血浆二倍体部分浓度，排除了任何药动学分析。在四聚物体积分布（随着速率的增高

而下降)、四聚物达到的最大浓度(随着速率的增高而上升)和四聚物最大浓度产生时(随速率的增高而下降),观测到唯一的统计学上显著性差异($p < 0.05$)

观察到的医疗事件与预料到的发现一致,这些发现与静脉切开术(例如,血管迷走神经发作)、众多肺功能试验(吞气症、嗝气或腹部“气体”)、动脉管道植入(例如,植入部分疼痛和麻刺感),或者腹部不适(例如,与铁补充剂的摄取相关的)相关。尽管似乎具有不确定的背景,瞬间腹部“气体”没有明显的腹部疼痛或咽下困难的情况。此外这些症状与血清转氨酶或脂酶的任何选择无关。

总之,HBOL能很好的耐受。血液动力学是不显著的,尽管输入的第二个二小时期间,伴随着心脏指数的等量下降,血压和总的外周阻力上有小量瞬间升高。首个24小时期间,HBOL—治疗组扩散容量的提高明显高于对照组。

实施例 6

分级自行车运动试验内 HBOL 对人体的作用

实施该研究以评价服用自体输血 HBOL 的受试者的运动能力。特定的目标包括肺功能(例如,扩散容量和乳酸水平以及 pO_2)、血液动力学(例如,心律、心脏指数和血压)以及运动耐力(例如,持续时间、运动量和厌氧阈)。受试者是六个普通的健康男性,18-45岁。由于在小于15分钟内不能获得放血的体积,一个受试者被代替。本研究作为随机的、单盲法、双向交叉的研究实施。

所有放血 750 ml 的受试者接着输入林格氏乳酸盐(3:1)和自体输血(ATX)或45克 HBOL。ATX 或 HBOL 以 0.5 gm/min 速率给药 90 分钟。放血之前和 ATX 或 HBOL 输入之后大约 45 分钟进

行自行车运动应力试验。一周后重复同样的方法，并且受试者交换至相对的治疗。

给药的一天(第1天和第8天)，所有受试者在一个桡动脉具有植入的动脉管道，与心窝自动测量记录传导和阻抗心动描记器联接，接着以静脉切开术放750 ml的全血(<15分钟)。接着在两小时内输入2250 ml的林格氏乳酸盐(RL)(等张(isovolemic)血液稀释相)。然后受试者接受HBL(90分钟内45克[大约346-360 ml]，速率为0.5 gm/min)或者ATX(同样速率和持续时间的110-120克血红蛋白[大约750 ml])。在任何一项输入结束后大约45分钟，实施BEST。在第1天和第8天的24小时周期，集中地进行动脉血液气体、血液学、化学和尿试验的系列测量。在门诊患者的基础上在给药和所有给药结束之后一个月之间，重复系列试验。

HBOL和ATX期间受试者能够运动至相同水平。厌氧阈耗氧量(VO_2)和二氧化碳生成量(VCO_2)基本相同。实际运动量在METS、功率、脉搏(作最大脉搏的%)、到达厌氧阈的时间、潮气量(VT)和每分通气量(VE)方面也相同。HBOL和ATX期间动脉血液气体值相同。乳酸升高时，pH和碳酸氢盐的少量下降，这与厌氧阈预料的发现一致。这些自行车试验的结果显示运动能力(定义为达到厌氧阈的时间和工作量)在基准和输入自体输血或HBOL之后相同。特别地，在HBOL期间血液动力学显著，心收缩、舒张和平均动脉血压值轻微升高。通常在第一个4小时之内，总外周阻力升高，与血压升高相称。HBOL期心脏指数下降(-0.5 l/min/M²)。HBOL时期脉搏搏动低于ATX时期大约5-10次。在HBOL研究中可观察到这些发现，并且不用临床关注。

肺功能试验不明显，除了ATX和HBOL输入之后扩散容量在基准上增长14%之外。ATX和HBOL期间，受试者能够达到相同的

运动能力。最大运动（厌氧阈）期间，两个时期的动脉血液气体测量相同，但是 HBOL 期的动脉 pO_2 趋于较高。HBOL 期血浆乳酸含量低于 ATX 期。静止代谢人工测量表明，HBOL 期耗氧量、二氧化碳生成和代谢能量支出大于 ATX 期。如上述的对照，约略是一克 HBOL 对 3 克 ATX。与关于 VO_2 和 VCO_2 的观测结合的扩散容量表明，每克 HBOL 比 ATXE 有更多的氧运输到组织水平。通常认为扩散容量的变动直接与血红蛋白含量相关，然而，这里显示，1 克的血浆血红蛋白可提高扩散容量，与 3 克的红细胞血红蛋白差不多。

对于 HBOL 期 ALT、AST、5'-核苷酸酶、脂酶和肌酸激酶小的、但是瞬间升高的实验室研究值得注意。尿中无异常地发现。

血液学研究与实施例 5 的一致。

观测到的医疗事件与预料的发现一致，这些发现与放血（例如，血管迷走神经发作）、多个肺功能试验（叹气或腹部“气体”）、动脉管道植入（例如，植入部分疼痛和麻刺感），或者一个月期间内在普通受度者上可能观察到的众多日常疾病（例如，头痛、上呼吸道感染或感冒）相关。具有腹部“气体”和中—上腹部压力，但没有咽下困难的受试者（受试者#105），是暗示有其它的在先前的 HBOL 研究中观察到的胃肠疾病。基于血红蛋白可干扰内源性的一氧化氮功能（一氧化氮是松弛胃肠平滑肌固有的，特别是在食管和肠），L-精氨酸用作治疗措施。L-精氨酸是一氧化氮合酶制备一氧化氮的反应物。理论上，如果人来自血红蛋白（血红素大概与一氧化氮结合）的一氧化氮减少，L-精氨酸的给药会是有效的。显然，通过以 L-精氨酸暂时减轻其症状大约两小时，标记该受试者。这是未预料的发现，因为血浆 L-精氨酸的半衰期是大约 1 小时。不幸地，一些副作用（恶心和呕吐）发生，停止输液。我们选择给予他

两倍剂量的抗胆碱能的、镇痉药，莨菪碱。给药显然持续至消除腹部“气体”和压力症状。该受试者没有进一步的疾病或后遗症。

总之，HBOL 有助于运动和休息期间氧运输和利用的提高。HBOL 产生相同的血液动力学光谱、安全的实验室结果、药动学和预先观察到的医疗事件。L-精氨酸的参予可产生反转的胃肠症状，但是它的使用限于反胃和呕吐。然而，遇到胃肠道症状时，抗胆碱能的治疗是有价值的。

等同的方案

仅仅采用常规试验，本领域技术人员会意识到或者能确定这里描述的本发明的特定实施方案的许多的等同方案。这些和所有其它的等同方案都被包括在下列的权利要求范围内。