

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99813429.5

[43] 公开日 2002 年 1 月 23 日

[11] 公开号 CN 1332646A

[22] 申请日 1999.10.15 [21] 申请号 99813429.5

[30] 优先权

[32] 1998.10.15 [33] US [31] 60/104,319

[32] 1999.3.1 [33] US [31] 60/122,180

[86] 国际申请 PCT/US99/24149 1999.10.15

[87] 国际公布 WO00/21591 英 2000.4.20

[85] 进入国家阶段日期 2001.5.18

[71] 申请人 桑伽特股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 R·M·温斯洛 K·D·范德格里夫

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

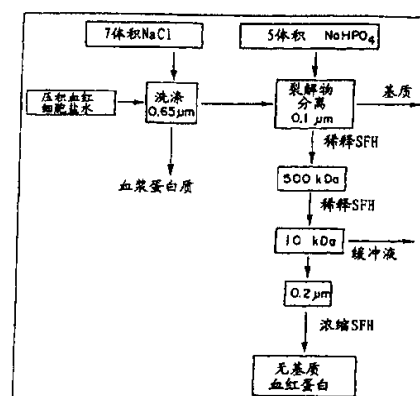
代理人 徐 迅

权利要求书 3 页 说明书 13 页 附图页数 2 页

[54] 发明名称 生产无基质血红蛋白的方法

[57] 摘要

本方法使用一台可商品购得的血细胞分离器,它包括一计算机控制的离心机(2),其具有一转头,在其中放置了含有供血者血液的血液处理袋(6)。一旦收集了血液,加工完全在密封的离心转头中进行,优选在供血者收集位点原位进行。在第一步中,离心血液,从细胞成分中分离血浆。从其它血液成分中分离出红血细胞后,用生理盐水或其它溶液洗涤红细胞。然后通过低渗休克裂解该红血细胞,来分离该红细胞膜(基质),并将裂解物收集在无菌容器(44)中,仅将基质留在该离心转头中。可将最终产物用作任何现在开发用作红细胞替代物的以血红蛋白为基础的氧载体的原料。在加工容器或离心转头中血袋(6)中进行所有步骤,来使操作最少化,并保持无菌。一种制备修饰的血红蛋白溶液的方法包括将产生无-基质血红蛋白,然后加入预先定量的试剂和该溶液反应并过滤该溶液的步骤结合使用。



权 利 要 求 书

1.一种在包括离心机的自动化血液分离器中从含有红血细胞的溶液生产血红蛋白溶液的方法，其特征在于，该方法包括步骤：

- 5 (a)分离溶液中的红血细胞；
 (b)取出分离步骤中产生的上清液；用洗涤溶液洗涤红血细胞；
 (c)裂解红血细胞，产生溶血产物；和
 (d)从溶血产物中分离红血细胞的基质。
- 2.如权利要求1所述的方法，其特征在于，所述洗涤溶液是生理盐水溶液。
- 10 3.如权利要求1所述的方法，其特征在于，所述洗涤溶液是杀菌剂。
- 4.如权利要求1所述的方法，其特征在于，所述洗涤溶液是病毒灭活剂。
- 5.如权利要求1所述的方法，其特征在于，步骤(a)到(d)在放置于离心机中的一处理容器内进行。

- 6.如权利要求1所述的方法，其特征在于，该方法还包括步骤：测量溶血产物的离子浓度，并重复步骤(c)到(d)，直到离子浓度下降到预定水平。
- 15 7.一种在细胞处理仪器中进行的方法，用于从含有红血细胞和血浆的溶液中产生血红蛋白，其特征在于，该方法包括步骤：

在含有处理袋和管式导线系列的无菌处理装置中收集所述溶液，将该处理袋置于所述细胞处理仪器中的离心机中；

- 20 通过在离心机中旋转所述处理袋，从血浆中分离红血细胞；
 从所述处理袋中挤出血浆；
 将洗涤溶液引入处理袋，以洗涤红血细胞；
 洗涤后，挤出上清液；
 将蒸馏水引入处理袋以裂解红血细胞，以将血红蛋白释放入溶液；
- 25 通过旋转在所述离心机中的所述处理袋，从所述血红蛋白溶液中分离红血细胞膜；和
 通过所述处理袋的无菌口取出所述血红蛋白溶液。

8.如权利要求7所述的方法，其特征在于，从血红蛋白分离红血细胞膜的步骤包括步骤：

当蒸馏水首次和所述红血细胞接触时，取出首次产生的血红蛋白；和
连续取出随着溶液离子强度下降，额外产生的血红蛋白。

9.如权利要求 8 所述的方法，其特征在于，还包括步骤：

测量由从溶液取出血红蛋白的步骤产生的血红蛋白溶液的离子强度；

5 加入额外的蒸馏水；和

重复取出额外的血红蛋白，并加入额外的蒸馏水的步骤，直到离子强度达到
预定阈值。

10.一种从细胞处理仪器中处理容器内的压积红血细胞分离血红蛋白的方法，
该方法包括在仪器内进行的步骤：

10 在所述处理容器中用盐水溶液洗涤所述红血细胞；

在所述处理容器中裂解所述红血细胞；

在所述处理容器中从血红蛋白分离红血细胞膜和未裂解的红血细胞；和

从所述处理容器抽提溶液中的所述血红蛋白。

11.如权利要求 10 所述的方法，其特征在于，所述分离步骤包括离心所述仪器
15 内的所述处理容器，来压积红血细胞膜和未裂解的红血细胞。

12.如权利要求 10 所述的方法，其特征在于，所述洗涤步骤包括在盐水溶液中
加入去垢剂、抗菌剂或抗病毒剂。

13.如权利要求 10 所述的方法，其特征在于，该方法进一步包括测量所述血红
蛋白溶液的离子强度的步骤，其中重复进行裂解、分离和抽提的步骤，直到离子强
20 度降到预定水平。

14.一种制备修饰的血红蛋白溶液的方法，其特征在于，该方法包括：

将压积红血细胞混入生理盐水溶液；

用盐水溶液洗涤所述红血细胞；

裂解所述红血细胞；

25 透析过滤所述红血细胞，以除去基质；

透析过滤所述已过滤的红血细胞；

将得到的血红蛋白溶液收集在容器中，所述容器中含有预定的试剂，所述试
剂适用于化学修饰所述血红蛋白溶液；

使所述血红蛋白溶液和所述试剂反应；和

将所述反应的溶液储藏在储藏容器中。

15.如权利要求 14 所述的方法，其特征在于，所述预定的试剂含有缓冲盐。

16.如权利要求 15 所述的方法，其特征在于，所述缓冲盐是亚氨基硫醇和活性聚乙二醇。

5 17.如权利要求 14 所述的方法，其特征在于，该方法还包括过滤所述反应的溶液。

18.如权利要求 14 所述的方法，其特征在于，该方法还包括对所述反应的溶液进行灭菌，以除去或灭活生物体。

生产无基质血红蛋白的方法

5

相关申请

本申请要求 1998 年 10 月 15 日提交的临时申请号 60/104,319 和 1999 年 3 月 1 日提交的系列号 60/122,180 的优先权。提到的临时申请的公开内容在此引入以供参考。

发明领域

10

本发明涉及系统和方法，使用自动血细胞分离器来制备高质量的血红蛋白溶液，作为制造基于血红蛋白的治疗性氧载体（“血液替代品”）的原料。

发明背景

15

输储藏的人血液是医学实践的一种古老备用方法。然而严格的说其功效从未显示，而且该方法具有明显缺陷。例如，甚至在最好的医学中心内，当确定需要输血时，由于需要确定病人的血型并进行交叉配型，然后将血液送到病人床边或手术室或急救室，而延迟了治疗。另外，一些证据提示，输血可能是免疫抑制的，供血者自身的淋巴细胞可在受体体内建立嵌合体。众所周知，输血有传播病毒性疾病的危险。

20

尽管有这些问题，随着医学实践变得更复杂和人口老龄化，对于输血存在持续增长的全局范围的需要。如果将美国的输血率扩大到 60 亿的世界人口，可预计总年度需求约为 300 百万单位血红细胞。不可能严格估计实际输血的单位数，但该数字可能低至 90 百万单位。假定该估计是准确的，全世界范围每年有超过 200 百万单位的潜在短缺。看来，发展中国家不可能支持在发达世界中所适用的复杂血库程序，而大部分发展中国家也不能生产足够的供血者血液来满足需要，因为公共卫生状况一般很差。

25

为了尝试克服血液供给中潜在的短缺，从八十年代中期开始，商业和高等院校的实验室，甚至更早，在一些研究实验室中已在紧张开发治疗性氧载体，即“血液替代品”。一些重要的问题已经解决，包括纯化血红蛋白作为原料，确定溶液特征和血红蛋白修饰化学。

血液替代品在市场上是否成功基于几个关键因素。第一，它必须有效。然而，尚未建立对效力的明确试验。一个可能的试验是是否该产品可有效降低病人和同种异体血液的接触。第二，产品必须是安全的。迄今产生的安全焦点是围绕着已知的血红蛋白的血管收缩性能。至少该性能的一部分是一氧化氮(NO)作为血红素配体和血红蛋白在巯基位点非常强的结合。第三，红细胞替代品必须成功的和血液竞争临床用途。现在正在开发的血液替代产物具有范围为 12-58 小时(半衰期)的血浆滞留时间。因此，它们将仅用于临时情况或在可重复施用剂量的背景下使用。

在发现 HIV 可通过输血制品传播后，人血在对血库行业认真详细检查后，变为极端安全。为了成为可用的产品，红细胞替代品必须是安全而相对价廉的。仅当在安全性、效力、使用方便性或病人可接受性上有明显优势时，才会支持比血液昂贵的费用。因此，随着这些血液替代品临近临床使用，原料的来源、成分和供应变得更加重要。对于临床试验中的制品，未加工的血红蛋白从过期的人库存血液、牛或重组(大肠杆菌)源获得。据估计储藏的血液中约有 1%或以下过期，每年仅对血液替代品的制造提供约 120,000 单位的血液。因此，这种过期血液的竞争和成本是高的。牛血的优点是，它能大量获得。然而，饲养用于该目的的牛要求严格的健康标准和对动物进行兽医学看护，经常检测和用大量的土地和食物来饲养它们。另外，必须用为该目的设计的特殊仪器来收集牛血。重组来源将是理想解决之道，因为降低了被人类病原体污染的危险。然而，重组血红蛋白需要大规模纯化，来从发酵的其它成分中分离出蛋白质，要使用大量水，并在处理废产物中面临严重的问题。这些处理要求导致用重组血红蛋白制备的血液替代品产物比用常规库存血液制备的成本要贵数倍。

目前从人血制备血红蛋白溶液的过程涉及广泛用盐水处理洗涤备用储存的红细胞，沉淀或透析过滤，用低渗缓冲液温和裂解，并严格除去红细胞膜。这些过程需要大型无菌容器和昂贵的滤器，并需要极长的时间来完成。在该过程中使用的许多成分和溶液必须保存在冷藏和/或清洁室内。有人报道，每周能生产 5 升无基质红血细胞溶液的试验性加工厂需要 4 个独立分隔但相互连接的房间，占约 1000 平方英尺的实验室空间。产品价格大约是\$1000/升。(见 Winslow 和 Chapman, “血红蛋白溶液的试验性批量制备”，酶学方法，231:3-16, 1994, 公开内容在此引入以供参考)除了产品高成本的显著缺点外，该试验性机构的大批量和复杂性需要几

个支持性人员，并造成了许多污染机会。

为了制备大量的血液替代品，以充分克服全球血液供给中突出缺陷，必须改进处理制备血液替代品的原料的现有方法。仍需要一种用于制备无基质的血红蛋白的方法，以使降低该产品的成本、复杂性和污染危险。

5

发明简述

本发明的一个优点是提供了一种在自容式、自动化仪器中制备无基质血红蛋白的方法。

10 本发明的另一个优点是提供了一种制备高质量的血红蛋白溶液，作为制造血液替代品的原料的方法，该方法使用直接来自供血者的收集点的血液，从而消除了血液定型和储藏的需要，并减少了污染的危险。

15 在一个示范性实施例中，本方法使用一台可商品购得的血细胞分离器，它包括一计算机控制的离心机，其具有一转头，在其中放置了含有供血者血液的血液处理袋。一旦收集了血液，处理完全在密封的离心转头中进行，优选在供血者收集点原地进行。该离心机转头包括一个或多个处理室，来接受处理袋。在第一步中，离心血液，从细胞成分中分离血浆。用液压力通过血处理袋中的可弯曲隔膜和螺线管控制的弹簧夹除去上清液，即淋巴细胞、血小板和血浆，剩下压积的细胞。弹簧夹通过夹紧含有溶液的管道起作用，避免直接接触，从而保持液体通道无菌。一旋转密封装置使液体在离心机转动时能进出血处理袋。从其它血液成分中分离出红细胞后，用生理盐水或其它溶液洗涤红细胞。通过液压力除去洗涤溶液，并通过管道转
20 移到上清液收集容器中。放置一台光电传感器，来监测通向上清液收集容器的管道，检测红血细胞的存在。如果检测到红血细胞，由系统控制器引发停止和保持功能。然后用低渗休克裂解红血细胞，使用离心力从裂解物中分离红细胞膜(基质)，将其收集入无菌容器，仅将基质留在离心机转头中。可将最终产物用作任何现在开发用作红细胞替代品的以血红蛋白为基础的氧载体的原料。在细胞分离器或储存器的转头中进行所有步骤，来维持无菌。
25

在供血点处理血液的能力提供了更快速和更低廉的红血细胞收集，以用于制备血液替代品。特别是，该过程消除了被收集的血液单位的定型和储藏的需要，而且用于该用途的被收集的血单位可被合并储存，以减少测试传染性因子，如 HIV 或丙型肝炎病毒的费用成本。

附图简述

考虑下文对本发明结合附图的优选例的详述，将促进对本发明的理解，其中相应数字指相应部件，而且其中：

图 1 是用于制备无基质血红蛋白的红血细胞处理器的图解视图；

5 图 2 是从压积的红血细胞产生无基质的血红蛋白的流程图；

图 3 是根据本发明的加工流程的框图；和

图 4 显示了本发明生产“血液替代品”的一种可能的离心法的示意图。

发明详述

产生无基质血红蛋白(“SFH”)的方法使用了一种常规商品血细胞处理仪器，它在图 1 中概略说明。用该系统处理将病人或供血者的全血分离为成分。收集红血细胞，然后将剩余成分输回供血者或丢弃。仪器含有离心机 2，以容盛血袋 6，多个含有处理溶液的储液器 8 和 10，一个接受上清液 14 的储液器，多个阀门和无菌管式导线，将许多储液器和血袋 6 连接，以及控制器 20，控制离心机和阀门。在管式导线中含有一次性使用的旋转密封装置 34，使液体在离心机转头转动时进出血处理袋。密封装置防止液体从液体通道中漏出，和空气进入液体。从供血者(显示了手臂 22)通过导管 30 和阀门 32 收集血液，直接进入血袋 6，优选直接处理。在优选例中，血袋 6 和管式导线是预先灭菌的一次性使用的处理装置的一部分。阀门通过夹紧导管，从而不直接接触导管中的液体来起作用。

启动离心转头 24，从血浆中分离红血细胞。离心力提供了将血浆挤出泵到上清液储液器 14(或如需要，回到病人或供血者)的抽吸作用。具体说，在离心转头 24 中包括移位室，它包括一个液压操作的隔膜 4。系统控制器 20 通过控制离心机驱动装置 36 的转动和指导可逆液压泵 38，控制液压液流入和流出可弯曲隔膜 4 下的区域。控制器 20 导致阀门 16 打开，允许血浆通过导管 18 流出血袋，然后在血浆排出后关闭阀门 16。使用光学探头 28(其检测红血细胞在透明导管中的存在)可确定血浆的完全除去。打开阀门 12，使盐水溶液从储液器 8 通过导管 26 释放到血袋 6 中。另外，可用抗菌剂、去垢剂或其它合适的清洁溶液作为洗涤溶液，或加到盐水溶液中，来除去任何可能存在于血液中的细菌污染。离心转头在相对低速转动，来提供搅动，洗涤红血细胞。洗涤后，提高转速，控制器 20 打开阀门 16，使离心力和可弯曲隔膜将洗涤溶液挤到上清液储液器 14 中。

一旦从血袋 6 中除去了洗涤溶液，通过引入蒸馏水来诱导低渗休克裂解红细胞，从血红蛋白中分离基质。打开阀门 13，通过导管 11 转移储藏在储液器 10 中的蒸馏水。当红细胞开始进入与蒸馏水接触时，它们中的一些裂解，将血红蛋白释放到溶液中。可在此时收集无细胞成分，并继续灌注蒸馏水，随着悬浮介质的离子强度下降，释放越来越多的血红蛋白。伴随离心转头低速转动，使对血红蛋白的损害最小化，无基质血红蛋白将分布在转头中，而红细胞和膜将在转头外沿被堆积。由于可能需要大量蒸馏水，将需要几次重复来释放大部分血红蛋白。通过血袋 6 中的无菌端口 40，通过导管 42 进入无菌容器 44，来除去血红蛋白。在转移通道（导管）中包括一个滤器 46，来除去最后痕量的膜颗粒将是理想的。如果给予足够的水和时间，应取出所有血红蛋白，然而随后可能需要浓缩血红蛋白溶液，视它的用途而定。可通过测量血红蛋白溶液中的离子浓度确定血红蛋白抽提物的完全性。通过将导电表和系统控制器 20 连接，当离子浓度下降到预定水平时，可终止该过程。预定水平的选择基于时间和血红蛋白抽提物效率的平衡，即成本-效益分析。

其它引入低渗休克来裂解红细胞的方法是已知的，而且可以代替或联合蒸馏水漂洗使用。下文更详细的描述了裂解方法。

转移血红蛋白溶液的无菌容器可含有预先定量的试剂，以制备血液替代品，包括例如缓冲盐、Traut's 试剂和活化的聚乙二醇(PEG)。在专利号 5,814,601 和专利号 5,296,465 中详述了制备血液替代品的示范性方法，其公开内容在此引入以供参考。

该处理方法完全在一次性使用的预灭菌的处理装置中进行，它优选含有所有管线、储液器、离心转头和管线内的滤器。该密封系统排除了污染的危险。

提供了下列实施例，仅供说明，而不是为了限制本发明的范围。

实施例 1

构建了一台从血液产生无基质血红蛋白的实验性仪器，它包括过期血液的排空袋集合；用于洗涤、裂解和纯化的交叉过滤装置；交联血红蛋白的生物反应器；制备级的高效液相层析(HPLC)仪器；和最后将产品填充入无菌袋的通风橱。流动回路，包括 PFW 分散回路是密封的。所有接头是卫生三钳(通)型，在层流环境中制造。除去办公室，完整过程需要大约 1000ft² 实验室空间。该实验性厂的能力是每周约 5 升，产品成本是约 \$ 1000/升。

交叉过滤系统由三个泵、四个罐和 4 个不同的滤器部件构成。所有构建材料用 316L 不锈钢制造，用 180 磨光粉进行内部磨光。导管是可弯曲的，用硬化聚硅酮制造。中空纤维滤膜柱空心纤维滤器夹是不溶血、无致热原的聚砜膜。

在装有护套的不锈钢 500 升罐中制备后，冷冻所有溶液。用甘油套起红细胞
5 洗涤和裂解罐，用于温度控制。500 和 10-kDa 超滤回路使用双管热交换器。在透析过滤浓缩的血红蛋白前，冷冻 PFW。旋转叶泵确保低剪切力状态。在整个系统中监测压力分布，并控制在每平方英寸 20 磅力以下。将所有溶液的 pH 维持在生理学范围内。

在整个过程中保持无菌。将交叉过滤系统放置在 100 级环境中。用纯蒸汽对
10 所有处理罐、管道和滤器蒸汽灭菌，或用 0.1N NaOH 化学消毒。从系统中用 PFW 漂洗出消毒溶液。在处理前和处理中通过用鲎阿米巴样细胞裂解物 (LAL) 试验采样致热原来检测系统的无菌性。

在图 2 中显示了生产 SFH 的典型运行的流程图。在过期 4 周后使用过期的人压积红血细胞 (PRBC' s)。所有单位对于 HIV 和乙型肝炎抗原测试为阴性。在一个典型的批料中，使用血收集装置，在 100 升套层不锈钢罐中用 80 升生理盐水合并约
15 20 升压积红血细胞。用 7 体积的冷冻生理盐水通过在恒定体积 (80 升) 经三个 0.65 微米中空纤维膜柱 (总表面积 69ft²) 的透析渗滤，来洗涤红血细胞。为了证实血浆已被除去，测试滤液的血清白蛋白，作为血浆蛋白指标。在典型的洗涤过程中，血清白蛋白浓度从 2mg/ml 以上稳定下降到不可检测的水平 (<2 微克/毫升)。缓慢裂
20 解红血细胞，用 5 体积冷冻 10mM NaHPO₄，pH7.6，以恒定体积 (80 升) 通过 0.1 微米中空纤维膜柱，来透析过滤除去基质。将 0.1 微米柱的滤液引入 100 升不锈钢罐中。然后以恒定体积 (80 升) 透析滤过 500-kDa 膜柱，来除去任何基质颗粒。然后将来自 500-kDa 柱的滤液 (SFH) 通过三个 10-kDa 中空纤维膜柱循环浓缩到 10g/dl。

用 6 体积 Ringer' s 乙酸盐，pH7.4 透析过滤得到最终的 SFH 溶液，然后从不
25 锈钢浓缩罐中通过 0.2 微米，10 英寸滤器转移到 40 升不锈钢收集槽中。最后，将 SFH 产物在无菌条件下转移到塑料袋内，并冰冻在 -80℃。或者将 SFH 转移到 70-升生物反应器中交联。

用上述仪器和程序生产的无基质血红蛋白溶液用水或磷酸缓冲液配制。高铁血红蛋白浓度通常小于 1%，而溶液可以无限期的储藏在 -80℃。兔致热原测试是阴

性的，而且溶液不被细菌污染。用 HPLC 分析评估纯度，并显示溶液本质上无非血红蛋白蛋白质。其它质量控制试验包括氧结合 (P50, Hill's 参数, n), pH, 内毒素 (LAL 试验) 和 SDS 凝胶电泳。在表 1 中显示了将一批代表性 SFH 作为产品在这些试验中的结果。

5

表 1. SFH 溶液的示范性特征

血红蛋白 (g/dl)	7.5
高铁血红蛋白 (%)	<1
P50 (Torr, pH7.4, 37°C)	12.0
n (Hill's 参数)	3.0
P _i (微米)	42
pH	7.45
无菌性	通过
致热原	阴性
内毒素 (EU/ml)	0.02-0.10
游离铁 (μg/μl)	2.8

可能在生产无基质血红蛋白中，除了污染外最大的关注是严格除去膜磷脂成分。磷脂是在常规基础上极端难测量的，因此使用了较简单的总磷酸盐试验。虽然十分灵敏，它并不识别磷酸盐的来源。胞内酶组成了第二组红细胞污染，而且不清楚从最终产物中除去所有红细胞酶是否理想，考虑它们的抗氧化作用。

10

用该方法收集的 SFH “单位”可无限期的冰冻储藏，并运到中央处理厂（因为在某些地方进行血浆处理）或部分合并，用于质量控制测试。该被推荐的系统的另一个优点是，它能大大降低成本。现在，对所有收集的血液进行昂贵的病毒测试，是血液收集最大的单项成本。使用该新系统，可在测试前合并所有血单位，它大大降低了全部成本。血液学家估计收集一单位血液的成本是\$18，其中\$15 是用于病毒测试。例如，对于 10 单位合并物进行的测试，该项成本将减少到十分之一。

15

用该方法收集的血液用于重新制造“血液替代品”可能是可接受的，如专利号 5,814,601 中公开的。然而，它可能不符合目前美国食品和药物管理局 (FDA) 对供血者血液的标准。例如，现在 FDA 禁止患血色素沉着的病人捐献输血用血液。这促使这些病人寻找私人医生来进行静脉放血，对病人来说费用可观。铁超负荷病协

会估计仅在美国有 1,500,000 人患有严重的铁超负荷。该协会记录有约 5,000 个在规律静脉放血程序中每年除去约 6 单位的病人,约 30,000 单位。红细胞替代品已建立了剂量等效性,即 1g/dl 血浆血红蛋白在出血模型中和 7g/dl 红细胞血红蛋白一样有效。因此,单该群病人每年就可提供多达 150,000 单位人工血液的原料。

5 实施例 2

在本发明的实施例中,使用了设计成在床边收集供血者/病人血液的独立的便携式装置。用于该用途的合适系统包括 Haemonetics MCS+ 8150 血液收集系统 (Haemonetics Corporation, Braintree, MA) 和 COBE 2991 细胞处理器 (COBE Laboratories, Inc., Lakewood, CO)。血液收集在 CP2D/AS-3 抗凝剂/添加剂系统, 10 抗凝剂和抗凝血的比例是 1:16。机器配置成能从一供血者在约 25 分钟内收集一或二单位的红血细胞。收集的每单位得到约 180ml 压积的红血细胞 (“RBC”) 和 400ml 血浆。可用下列关系确定分离的效率:

$$\frac{\text{处理后 RBC 计数} \times \text{处理后重量}}{\text{处理前 RBC 计数} \times \text{处理前重量}} \times 100 = \% \text{RBC 回收}$$

$$\frac{\text{处理后 WBC 计数} \times \text{处理后重量}}{\text{处理前 WBC 计数} \times \text{处理前重量}} \times 100 = \% \text{WBC 回收}$$

15 留在压积红血细胞中的淋巴细胞数应少于 5×10^8 。白血细胞 (“WBC”) 绝对计数是:

$$\frac{\text{转换成毫升数的白细胞数} \times \text{产品的毫升数}}{\text{处理前 WBC 计数} \times \text{处理前重量}} \times 100 = \% \text{WBC 回收}$$

而百分数是:

$$\frac{\text{处理后 WBC 计数} \times \text{处理后重量}}{\text{处理前 WBC 计数} \times \text{处理前重量}} \times 100 = \% \text{WBC 回收}$$

20 处理前 WBC 计数 x 处理前重量

Latham, Jr., 的专利号 4,303,193 和 Toavs 等, 专利号 5,921,950 提供了基本的商品化血细胞处理系统的例子。这些专利的公开内容在此引入以供参考。总的说,商品化血细胞处理系统使用自平衡的离心机,将供血人的血液分离成两种成分,一种富含血浆,另一种富含细胞成分。该仪器要直接在供血者 25 /病人旁立即使用。血液流动的通道是完整的一次性使用的处理装置,包括一静脉放血针和将静脉放血针和柔韧可弯曲的血液处理袋(容积为约 630ml)连接的血液相容的管式接头。在该处理装置中还包括管式导线,旋转密封装置和上清液收集容器。旋转密封装置使液体在离心机转头正在旋转时能流入和流出血处理袋。密封装置防止液体从液体管道中漏出,空气进入液体。管式导线系列

提供了无菌的液体通道，将洗涤溶液引到红细胞。三个阀门控制血液或洗涤溶液流入血处理袋。每个阀门是螺线管控制的弹簧夹，在系统计算机的控制下，和管道中的液体不直接接触。处理袋外沿上的无菌输出口使处理过的细胞可直接从袋中转移到无菌容器中。

- 5 将该血处理袋定形以被支承在离心转头轮廓样的处理室内，从而第二血液成分可沿袋内短轴运动，从而实现分离。一具有液压操作的隔膜的移位室也被安装在离心转头的血处理室中。液压液流入和流出柔韧可弯曲的隔膜下的区域是由离心驱动装置的旋转和弹簧夹螺线管控制的。液压系统包括正压移位活塞型泵装置，流速控制和开关，以及管线和储液器(塑料袋)的液体流动网络。泵由变速可逆马达驱动。
- 10 泵的容量被调节成约 600ml。泵马达控制以设定的速率驱动，在血处理袋上施加压力，挤压上清液，迫使上清液通过打开的阀门之一从该袋流到上清液收集容器中。这持续至通过光电传感器检测出红细胞，达到上清液输出体积，或引发了终止或停顿功能。反向驱动泵，从离心机液压液室和储液器中抽取液体。然后可停止离心机转头，使第二血液成分回输到该供血者。因为所有这些功能是计算机控制的，操作
- 15 人的干预很小，因此操作人为错误的误差机会很小。

离心机转头的体积是大约 250ml，而离心机的转速是约 4,000rpm。用无菌盐水稀释进入离心场中的血液，连续除去非红细胞成分和血浆浓缩红细胞。目的是将血清白蛋白的量降到尽可能低的水平，最好变得检测不到。非血细胞成分可丢弃或用于其它目的。

- 20 RBC 洗涤步骤后血清蛋白除去的评估是用血细胞处理器制造商规定的程序进行的。例如，在 COBE2991 细胞处理器中，洗涤红血细胞后，从血袋的无菌口抽取 1 毫升样品，在实验室离心机中离心，收集上清液。可用可商品购得的蛋白质化学量尺湿润板测试上清液，其颜色的改变指示了蛋白质水平。蛋白质水平应是痕量(15-30mg/dl)或更少，代表血浆减少大于或等于 96%。

- 25 首次洗涤期后，用蒸馏水替换盐水。根据图 3，可见当红细胞首次和蒸馏水接触时，它们中的一些裂解，将血红蛋白释放到溶液中。下文讨论了裂解的条件。可在此时收集无细胞成分，继续灌注蒸馏水，随着悬浮介质的离子强度下降，释放越来越多的血红蛋白。如果给以充足的时间，可能取出所有血红蛋白，仅在离心转头中留下血细胞影。

血液裂解物的体积视实现所要的裂解水平所需的蒸馏水量而定。然而，视它将来的用途而定，血红蛋白溶液可能需要进一步浓缩。因为 NaCl 可能和血红蛋白溶液共存，可能需要进一步纯化。通过电导率测量可获得对最终溶液离子强度的迅速、灵敏的测量。

5 人红血细胞裂解的条件

尽管在循环红细胞内生存期很长，血红蛋白是一种脆弱的蛋白质。它由 4 个多肽亚基， 2α 和 2β 构成。一条 α 和一条 β 链紧紧连接成 $\alpha\beta$ 亚基，两个 $\alpha\beta$ 亚基形成较不稳定的四聚体，即完整成形的血红蛋白分子。每个 4 亚基含有铁-辅基，血红素。铁原子维持在还原的 Fe^{++} 状态，以便结合氧。该还原态是由红
10 血细胞内许多酶系统的存在维持的。当血红蛋白被从该细胞释放时，该保护不再存在，发生一系列事件，最终导致该分子降解。这些事件是铁的氧化，血红素-珠蛋白连接的松开，血红素的释放，四聚体分离成二聚体，珠蛋白变性和最终沉淀。在红细胞替代品的生产中，因此最重要的是非常温和的处理蛋白，以防止一或多个这些降解步骤。不这样做将导致原料损失，并形成必须滤出的
15 沉淀。另外，即使部分变性或降解的血红蛋白分子也不能与氧可逆结合，因此不能作为氧载体。

一般有三种方法来裂解人红细胞。第一，可反复冷冻和融化它们。在细胞内和周围形成的冰破碎该膜，释放血红蛋白。然而，使用该方法裂解是以不完全而著称的，而且可发生血红蛋白变性。在第二种方法中，可用有机溶剂，如
20 CCl_4 。或甲苯也可使用。该方法更有效，然而溶剂也对蛋白质的稳定性有有害作用。

第三种方法是渗透裂解，如上所述。红细胞对渗透裂解的敏感性是众所周知的。

估计的处理效率

25 根据 COBE 2991 细胞处理器的方案，产率报道为平均 RBC 回收率是 82%，除去达 99% 的血浆和 93.4% 的白血细胞。使用离心洗涤和裂解红细胞的该发明方法，从起始质量 50 克得到约 40 克无基质的血红蛋白（“SFH”），得到估计的 80% 产率。因此，估计从起始材料到处理好的 SFH 的最终产率是大约 66% 质量。

血红蛋白生产中的一个问题是蛋白质变性。血红蛋白对稀释、压力、剪切

力、温度和 pH 改变的作用是敏感的，这些因素可导致和氧化、沉淀、血红素丧失和亚基解离有关的问题。因此，重要的是所有处理步骤在同一温度和低温下进行。例如，可冷藏 COBE 2991 细胞处理器，维持在 4℃。另外，搅动不能太剧烈，pH 变化不能太急躁，压力不能达到高水平。

5 特征确定和质量控制

可用总磷酸盐试验进行基质污染的测量。从血红蛋白溶液抽提磷脂可能是困难的，因此总磷酸盐试验是较简单而低成本的程序。虽然十分灵敏，该试验不能分辨磷酸盐的来源。

胞内酶组成了第二组红血细胞的潜在的污染，然而该类污染中的某些在血液替代品中可能是可被接受的。可用分析级快速蛋白质液相层析 (FPLC)，使用 280nm 滤器从非血红蛋白的蛋白质中分辨 SFH 来评估无基质血红蛋白产品的均一性。

用动态浊度测定法，基于鲎阿米巴样细胞裂解物 (LAL) 凝集级连的引发进行内毒素测量。这些试验是本领域熟知的。(见例如，Cohen 等，鲎 (*Limulidae*) 的生物学应用，1979, Alan R. Liss, Inc., New York.)

可用常规 pH 和电导计测量无基质血红蛋白溶液的 pH 和电导率，例如来自 Fisher Scientific Co., Pittsburgh, PA 的 Accumet Line 中的那些。光谱分析可提供对血红蛋白浓度和溶液中高铁血红蛋白量的分析。这些分析可用快速扫描二极管阵列分光光度计，如 Milton Roy 3000 在索雷 (Soret) 和可见区内进行，根据 Vandegriff 和 Shrager 描述的多成分分析技术进行 (“用快速扫描分光光度计和奇值 (singular value) 分解评估与血红蛋白结合的氧平衡”，酶学方法，232:460-485, 1994)，在此引入以供参考。

确定血红蛋白溶液的功能状态的最敏感试验是测量其氧结合曲线。一种该方法需要用新颖酶系统在密封比色杯中线性消耗氧。随着氧被耗尽，拍摄重复的可见光谱，而同时用 Clark 型电极测量 PO_2 。用 0.1M bis-Tris 丙烷或磷酸缓冲液将血红蛋白稀释到约 60 μ M 浓度 (在亚铁血红素中)。反应需要大约 15 分钟。该反应使用原儿茶酸 (PCA, Sigma Chemical Co., St. Louis) 作为底物，并对于每摩尔 PCA 被原儿茶酸 3,4-脱氧酶 (PCD, Sigma Chemical Co., St. Louis) 转化成产物消耗 1 摩尔 O_2 。实验后， PO_2 值和光谱匹配。对光谱进行多成分分析和曲线拟合程序，来

确定氧结合曲线的参数(P50, Hill's 参数, n)。在分析这些光谱的过程中, 计算脱氧每一步中的高铁血红蛋白相对比例。另外, 该方法和分析揭示了任何额外血红蛋白成分, 如变性和降解产物的存在。

还用等电聚焦(IEF)在 pH 范围 8.5-5.5 内, 在琼脂糖和聚丙烯酰胺上确定了本发明产生的血红蛋白溶液的特征。用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳评估了亚基结构。光谱分析提供了对血红蛋白浓度和溶液中高铁血红蛋白和碳氧血红蛋白量的估计。在快速扫描二极管阵列分光光度计上, 于索雷和可见区收集光谱。用多成分分析评估光谱。其它质量控制测量包括测量血红蛋白浓度、pH 和电导率。如需要, 可制定其它质量控制测量。

10. 实施例 3: 用描述发明制备修饰的血红蛋白

本发明还可被用来在图 4 所示的该所述改进的细胞分离器装置中制备的无基质血红蛋白(SFH)溶液制备修饰的血红蛋白溶液(“产物”)。

可从任何来源, 包括动物或人, 储藏或新鲜的, 或甚至从血库获得的过期人(血)单位获得红血细胞。改进程序还可用以任何方法(包括本发明或其它方法)制备的血红蛋白溶液(包括重组血红蛋白)。如果使用供血者血液, 首先将其和抗凝集剂 50 混合, 在离心转头 52 中用生理盐水 54 洗涤, 并用蒸馏水 56 裂解。除去血浆、血小板和白血细胞部分, 并储藏在独立分隔的容器 58 中。将血红蛋白溶液(SFH) 60 置于独立分隔的储液器 62 或离心转头 52 中, 在其中进行化学修饰。过滤后, 将最终产物收集在无菌容器 64 中, 储藏以供进一步使用。

20 就用上述仪器制备的 SFH 要进一步加工成产物的情况而言, 将该 SFH 收集在储液器中, 它含有预测量的试剂以用于化学修饰。在优选方法中, 试剂是缓冲盐, 亚氨基硫醇(iminothiolane)和活性聚乙二醇。在反应期末将修饰的血红蛋白(PEG-Hb)收集在塑料袋中或其它储藏容器中, 并储藏。

25 虽然和 PEG 的反应是优选的血红蛋白修饰, 可通过本发明所述仪器进行所述修饰, 而且这些产物在血液替代品制剂领域中是熟知的。这些修饰包括例如: 内部交联、聚合反应、或用葡聚糖、淀粉或其它合成或天然聚合物对血红蛋白进行表面修饰。

可将产物通过图 4 中的滤器 66 和 68 进一步纯化。这些滤器和超离心装置, 可以是例如尺寸排阻滤器、离子交换滤器、混床离子交换器、活性碳滤器或其它用

于蛋白质纯化和透析程序的管线内滤器。可用任何盐溶液或其它材料配制产物。

可用相同的仪器，用任何数量的程序，包括溶剂-清洁剂处理、 γ 辐射、超微过滤、亚甲基蓝或类似衍生物，或任何其它方法灭活或除去细菌和病毒等生物体，以对产物进行消毒。

- 5 本发明的方法提供了更快速和低成本的收集红血细胞(需要它用于生产血液替代品，能解决全球对于输血用的适用可得血液的显著短缺)的方法。本发明方法可用于处理过期血液，但最有利的是用于在供血者/病人床边原地使用。因为该过程在计算机控制的、完全自容的仪器中进行，处理被最小化，消除了污染的危险。该过程还消除了对收集的血液单位进行定型和储藏的需要，为该目的收集的血单位
- 10 可被合并以减少测试传染性因子的成本。

明显的是，还有其它未具体包括在本详述中，但在本发明的范围和精神内的实施例和用途。本说明书不是为了限制，而本发明的范围仅受权利要求的限制。

说明书附图

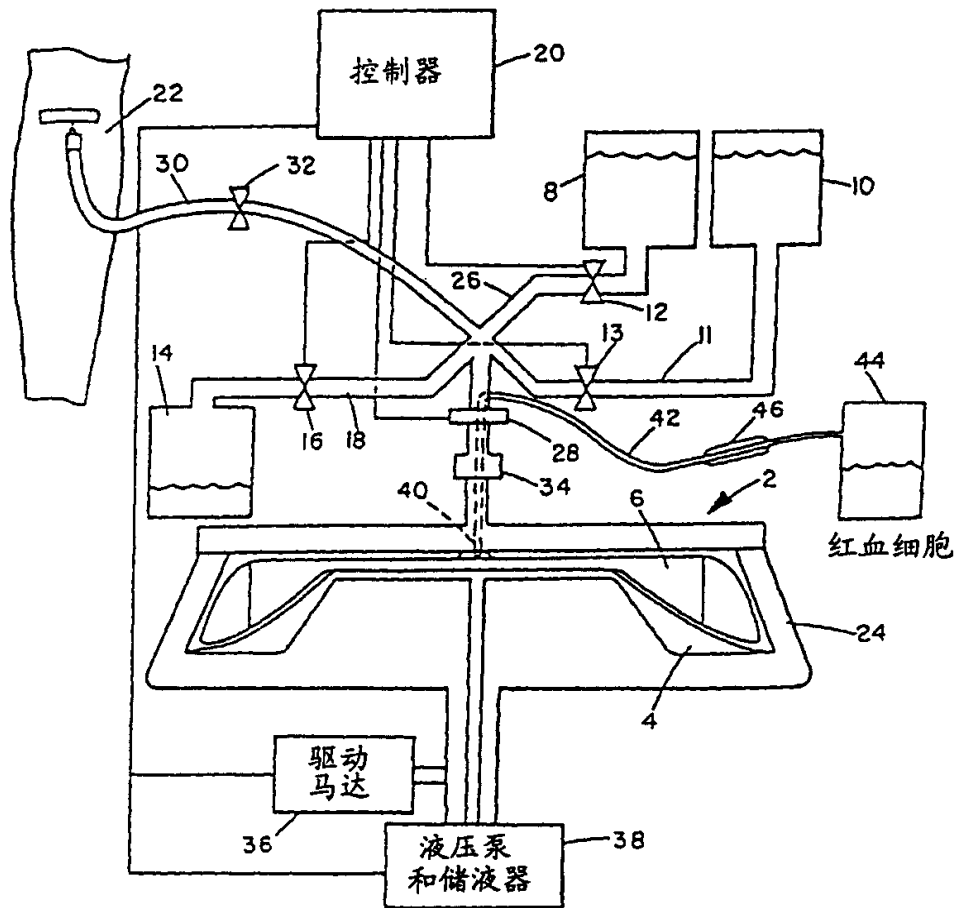


图 1

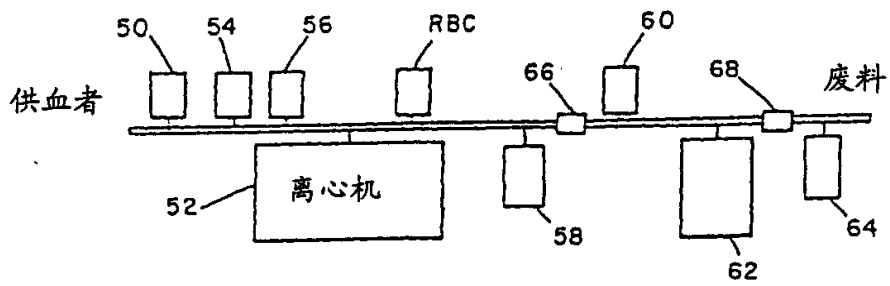


图 4

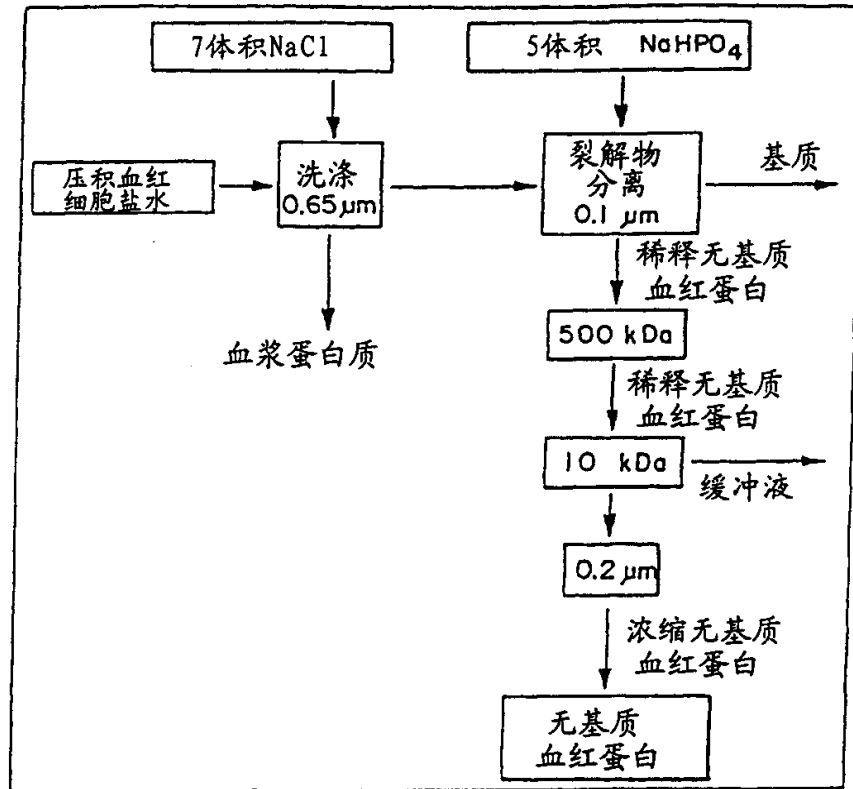


图 2

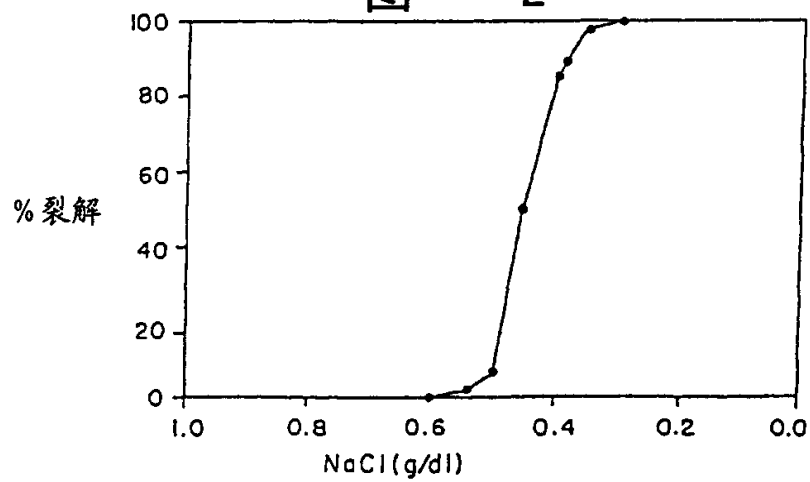


图 3