



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 00806029.0

[45] 授权公告日 2005 年 5 月 11 日

[11] 授权公告号 CN 1200742C

[22] 申请日 2000.1.24 [21] 申请号 00806029.0

[30] 优先权

[32] 1999. 2. 3 [33] US [31] 09/243,921

[86] 国际申请 PCT/US2000/001703 2000.1.24

[87] 国际公布 WO2000/045873 英 2000.8.10

[85] 进入国家阶段日期 2001.10.8

[71] 专利权人 生物时代股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 P·E·泽加尔 H·D·巍茨

H·斯滕伯格

审查员 汤利容

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 徐 迅

权利要求书 1 页 说明书 17 页

[54] 发明名称 用于输注用途的系统 and 组合物

[57] 摘要

本发明涉及不含常规生物学缓冲剂的非天然存在的血浆样溶液和液体血液组合物在制备用于治疗对象血容量减少的药剂中的用途，其中所述不含常规生物学缓冲剂的非天然存在的血浆样溶液包含：

(i) 电解质；(ii) 膨胀剂；(iii) 动态缓冲系统。本发明还涉及用于输注方法的试剂盒和输注系统。本发明的试剂盒和输注系统可用于各种输注用途，包括治疗低于体温的外科手术、低温程序等。

1. 不含常规生物学缓冲剂的非天然存在的血浆样溶液和液体血液组合物在制备用于治疗对象血容量减少的药剂中的用途, 其中所述不含常规生物学缓冲剂的非天然存在的血浆样溶液包含: (i)电解质; (ii)膨胀剂; (iii)动态缓冲系统。
- 5 2. 根据权利要求 1 所述的用途, 其中所述电解质包括: Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} 和 Cl^- 。
3. 根据权利要求 2 所述的用途, 其中所述非天然存在的血浆样溶液还包含 K^+ 。
4. 根据权利要求 1-3 所述的用途, 其中所述溶液还包括凝血因子。
5. 根据权利要求 1-4 所述的用途, 其中所述动态缓冲系统包含有机羧酸、其盐或酯。
- 10 6. 根据权利要求 1-5 所述的用途, 其中所述非天然存在的血浆样溶液进一步包含选自单糖和二糖的糖。
7. 根据权利要求 1-6 所述的用途, 其中液体血液组合物是全血或其衍生物。
8. 根据权利要求 7 所述的用途, 其中所述液体血液组合物不能最终热消毒。
9. 不含常规生物学缓冲剂的非天然存在的血浆样溶液、液体血液组合物和至少
- 15 一种额外的液体组合物在制备用于治疗对象血容量减少的药剂中的用途, 其中所述不含常规生物学缓冲剂的非天然存在的血浆样溶液包含: (i)电解质; (ii)膨胀剂; (iii)动态缓冲系统。
10. 一种用于输注方法的试剂盒, 所述试剂盒包含:
- (a)一种不含常规生物缓冲剂的合成的血浆样溶液, 它包含: (i)电解质; (ii)膨胀
- 20 剂; (iii)动态缓冲系统;
- (b) 液体血液组合物; 和
- (c) 用所述不含常规生物缓冲剂的合成的血浆样溶液和所述液体血液组合物给对象进行输注 的说明书。
11. 一种输注系统, 它包含:
- 25 (a) 在对象循环系统中导入和取出液体的装置;
- (b) 一种不含常规生物缓冲剂的合成的血浆样溶液, 它包含: (i)电解质; (ii)膨胀剂; (iii)动态缓冲系统; 和
- (c) 一种液体血液组合物, 它包含至少一种天然存在的血液组分。
12. 根据权利要求 11 所述的系统, 其中所述系统进一步包含调节所述对象温度
- 30 的装置。
13. 根据权利要求 11 或 12 所述的系统, 其中所述系统进一步包含调节所述对象的环境压力的装置。

用于输注用途的系统和组合物

5

引言

技术领域

本发明的技术领域是血浆替代溶液及其在输注中的应用。

10 发明背景

输注是将液体导入并使其通过组织或器官(例如靠循环系统)流动,它在许多医学应用中起重要的作用。这些应用包括外科手术或外伤期间失血的处理,或当组织、器官、器官群或整个机体需要维持在低温或冷冻状态下时的失血的处理。这些应用还包括,使患者的血液流经体外装置(如体外循环机(心肺分流器, cardiopulmonary bypass machine), 15 此时患者循环系统与该装置连接产生的体外循环容量空间必需装填相容的血液替换物,即,血容量增容剂。

用于大多数输注应用的液体是生理学上可接受的。用于输注用途的第一种生理学上可接受的溶液从哺乳动物血液获得。尽管该溶液已经成功使用,但是由于这些溶液从天然血液获得,因此它们可能含有各种病原性物质(如病毒病原体如 HIV、乙型肝炎, 20 炎,和其它病原体如与 Cruetzfeldt-Jakob 疾病相关的朊病毒等)。与使用这些溶液有关的缺点是,需要供体,而且需要昂贵的筛选试验以鉴定病原性因子。因此,从天然血液获得的血液替代物和血浆替代物的使用没有免除并发症。

因此,现已开发出了许多从非血液衍生组分制得的合成的血液和血浆替代溶液。尽管合成的血浆样溶液在各种应用中的使用有所增加,但是没有一种溶液能适用于所有潜在的用途。 25

因此,仍需要继续开发出新的输注方法以及用于该输注方法的溶液。

相关文献

各种生理上可接受的溶液,尤其是血液替代溶液,及其使用方法在下列美国专利 30 中有所描述: RE 34,077; 3,677,024; 3,937,821; 4,001,401; 4,061,736; 4,216,205; 4,663,166; 4,812,310; 4,908,350; 4,923,442; 4,927,806; 5,082,831; 5,084,377; 5,130,230; 5,171,526; 5,210,083; 5,274,001; 5,374,624 和 5,407,428。

描述生理上可接受的溶液(包括血液替代溶液)的其它文献包括: Bishop 等人, Transplantation (1987) 25:235-239; Messmer 等人, 《血浆替代物的特性、效果和副作用》51-70 页; Rosenberg, Proc. 12th Congr. Int. Soc. Blood Transf. (1969); Spahn, Anesth. Analg(1994) 78:1000-1021; 《衰老中的生物医学进展》(1990)(Plenum Press)第 19 章;

5 Wagner 等人, Clin. Pharm. (1993) 12:335; ATCC 细菌和噬菌体目录(1992)486 页; 以及 06-3874-R8-Rev. 1987 年 5 月 Abbott Laboratories, North Chicago, IL-60064, USA。

描述这些溶液的各种应用(包括低于体温的应用)的其它参考文献包括: Bailes 等人, Cryobiology (1990) 27:615-696(622-623 页); Belzer 等人, Transplantation (1985) 39:118-121; Collins, Transplantations Proceedings(1977)9:1529; Fischer 等人 ,

10 Transplantation (1985) 39:122; Kallerhoff 等人, Transplantation (1985) 39:485; Leavitt 等人, FASB J. (1990) 4:A963; Ross 等人, Transplantation (1976) 21:498; Segall 等人, FASB J. (1991) 5:A396; Smith, Proc. Royal Soc.(1965) 145:395; Waitz 等人, FASB J. (1991)5。

Lehninger 《生物化学》(第二版, 1975 年)829ff 页提供了关于血液及其组成的综述。

15

发明概述

本发明提供了用于输注用途的方法和组合物。在本发明方法中, 受治疗对象(例如机体或其衍生物, 如器官或组织)依次输注至少一种一定量的血浆样溶液和至少一种一定量的液体血液组合物。在一个较佳的实施方案中, 然后该受治疗对象用至少一种

20 额外量的血浆样溶液进行输注。血浆样溶液是非天然存在的溶液, 它至少包括电解质、膨胀剂(oncotic agent)和动态缓冲系统。液体血液组合物是从全血衍生得到的液体组合物, 它通常包含: 红血细胞、全血浆或其部分、全血等。本发明还提供了用于进行所述方法的试剂盒和系统。所述方法和组合物可用于各种不同的用途, 包括治疗血容量减少的病人, 用于区域性化疗, 用于低温保存等。

25 具体而言, 本发明一方面涉及不含常规生物学缓冲剂的非天然存在的血浆样溶液和液体血液组合物在制备用于治疗对象血容量减少的药剂中的用途, 其中所述不含常规生物学缓冲剂的非天然存在的血浆样溶液包含: (i)电解质; (ii)膨胀剂; (iii)动态缓冲系统。

本发明另一方面涉及不含常规生物学缓冲剂的非天然存在的血浆样溶液、液体血

30 液组合物和至少一种额外的液体组合物在制备用于治疗对象血容量减少的药剂中的用途, 其中所述不含常规生物学缓冲剂的非天然存在的血浆样溶液包含: (i)电解质; (ii)膨胀剂; (iii)动态缓冲系统。

本发明还有一个方面涉及一种用于输注方法的试剂盒，所述试剂盒包含：

(a)一种不含常规生物缓冲剂的合成的血浆样溶液，它包含：(i)电解质；(ii)膨胀剂；(iii)动态缓冲系统；

(b) 液体血液组合物；和

5 (c) 用所述不含常规生物缓冲剂的合成的血浆样溶液和所述液体血液组合物给对象进行输注的说明书。

本发明另一方面涉及一种输注系统，它包含：

(a) 在对象循环系统中导入和取出液体的装置；

10 (b) 一种不含常规生物缓冲剂的合成的血浆样溶液，它包含：(i)电解质；(ii)膨胀剂；(iii)动态缓冲系统；和

(c) 一种液体血液组合物，它包含至少一种天然存在的血液组分。

具体实施方案描述

15 本发明提供了用于受治疗者输注的方法和组合物。在本发明方法中，依次至少一种血浆样溶液和液体血液组合物导入受治疗者的循环系统中。在一个较佳的实施方案中，然后该受治疗者用额外量的血浆样溶液进行输注。血浆样溶液是非天然存在的溶液，它至少包括电解质、膨胀剂和动态缓冲系统。液体血液组合物是全血或从全血衍生得到的液体组合物，如纯化的红血细胞、全血浆或其部分。本发明还提供了用于进行所述方法的试剂盒和系统。所述方法和组合物可用于各种不同的用途，包括治疗血

容量减少的对象，用于区域性化疗，用于组织和器官保存等。在本发明的下文描述中，首先详细描述了本发明的溶液，然后讨论了使用该溶液的本发明方法。

在进一步描述本发明之前，应理解本发明不局限于下述的本发明具体实施方案，对这些特定的实施方案可作改变，这些仍在所附权利要求的范围内。还应理解，所用的术语用来描述特定的实施方案而没有限制性。相反，本发明的范围将由所附权利要求来确定。

必需注意的是，在说明书和所附权利要求中的单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数形式，除非其内容清楚地表明了相反的含义。除非另有定义，本文所用的所有科技术语具有本发明所属技术领域普通技术人员通常知道的相同含义。

10

液体组合物

如上所述，本发明的一个关键方面是依次给予至少两种不同类型的液体组合物：(a)非天然存在的血浆样溶液；和(b)液体血液组合物。本发明的方法还可包括给予一种或多种额外类型的溶液，该溶液通常是非天然存在的血浆样溶液的衍生物。可用于本发明的每种溶液在下文均有更详细的描述。

非天然存在的血浆样溶液

本发明的非天然存在的血浆样溶液是自然界中没有的溶液，例如它们不由动物或植物或其它生物产生。因此，本发明的溶液是合成的，它们通过一些人为的相互作用或加工(例如纯化、分离、基因工程、实验室组合等)而产生的。

本发明的血浆样溶液是生理上可接受的，这意味着该溶液可导入宿主血管系统而本质上不引起毒性反应。该溶液的 pH 在大约 4-10 之间，通常在大约 4.5-9 之间，更通常在大约 5-8.5 之间。

该溶液包含多种电解质，包括：钠离子、氯离子、钾离子和钙离子，以及可任选包括镁离子。溶液中钠离子的浓度约为 70-160，通常约为 110-150，在一些实施方案中为 130-150mM(毫摩尔浓度)。溶液中氯离子的浓度在大约 70-170 范围内，通常在大约 80-160 之间，更通常在大约 100-135 之间，在一些实施方案中在大约 110-125mM 之间。钾离子的浓度在生理性至亚生理性(subphysiological)浓度之间，“生理性浓度”指大约 3.5-5，通常约为 4-5mM，“亚生理性浓度”指约为 0-3.5，通常约为 2-3mM，在本发明的许多实施方案中，钾离子的量在大约 1-5 范围内，通常在大约 2-3mM 之间，而在某些实施方案中，钾离子的量可高于 5mM，其范围可高达约 5.5mM 或更高，但通常不超过约 5.5mM。溶液中还可包含钙离子，其量在大约 0.5-6.0mM 之间，在许多实施方案中约为 0.5-4.0，通常约为 2.0-2.5mM，但是在某些实施方案中，约为 4.0-6.0，

通常约为 4.5-6.0mM。溶液中还可任选地含有镁。当镁存在时，镁离子的范围约为 0.01-10mM，通常约为 0.3-3.0，更通常的约为 0.3-0.45mM。

该溶液还包含动态缓冲系统，该术语“动态缓冲系统”用于指在体内环境中一起作用时可使溶液 pH 保持在某一范围内的一种或多种试剂。较佳的是，动态缓冲系统的试剂成员是维持体内生物学 pH 的正常的生物学组分。动态缓冲系统的概念是基于本发明者的以下发现，即，在生物学范围内没有内在缓冲能力的化合物(如能在体内被代谢的乳酸盐、乙酸盐或葡糖酸盐)和其它溶液组分一起，可在动物体内起维持生物学上合适的 pH 的作用，即使在低温下和基本上无血的条件下。本发明的动态缓冲系统部分依靠二氧化碳(CO₂)的除去和氧化。本发明的动态缓冲剂在生物系统外不能或基本上不能起缓冲液作用，即，该动态缓冲液在体内而不是在无细胞的环境中维持 pH 在生物学范围内。

本发明的动态缓冲系统的关键组分是羧酸、其盐或酯。“羧酸、其盐或酯”指具有结构通式 RCOOX 的化合物，其中 R 是直链或支链的含有 1-30 个碳的烷基、烯基或芳基，其中碳可被取代，较佳的是一个碳链构成了乳酸、乙酸、葡糖酸、柠檬酸、丙酮酸或其它生物学代谢物的碳链；X 是氢或钠或能与氧位相连的其它生物学相容的离子取代物。

本发明的溶液不包括常规的生物缓冲剂。“常规的缓冲剂”指在体外在溶液中维持 pH 在特定范围内的化合物。“常规生物缓冲剂”指在无细胞系统中维持 pH 在 7-8 的生物学范围内的化合物。常规的生物缓冲剂包括 N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-羟基丙磺酸(HEPES)、3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)、2-([2-羟基-1,1-双(羟甲基)乙基]氨基)乙磺酸(TES)、3-[N-三(羟甲基)乙基氨基]-2-羟乙基-1-哌嗪丙磺酸(EPPS)、三[羟基甲基]-氨基甲烷(THAM)和三[羟甲基]甲基氨基甲烷(TRIS)。常规的生物缓冲剂具有在生理范围内的 pK，且在该范围内的作用最有效。因此，这些缓冲剂独立于正常的生物学过程而起作用，且在无细胞系统中最有效。

本发明溶液中不存在常规生物缓冲剂提供了几个重要的医学上的好处。例如，与常规生物缓冲剂相比，为维持体内 pH，只需要较低浓度的由正常生物学组分组成的缓冲剂。常规的生物缓冲剂还可能会引起毒性问题。另外，生物缓冲剂的缺乏使溶液可被最终热消毒。通常，医用溶液在用于患者前宜进行最终热消毒。本文所用的术语“最终热消毒”或“热消毒”指在加压、约 120℃下对溶液加热 15 分钟的过程，即维持加热和加压的条件足够长的时间，以杀死溶液中所有或几乎所有的细菌，并使溶液中所有或几乎所有的病毒灭活。该步骤通常在高压灭菌器中进行，也称为“高压灭菌”。热消毒的目的是杀死溶液中存在的可能的感染性因子。已知感染性因子能

耐受最高为 100℃ 的温度。现有技术中通常人为在加压下使溶液在 120℃ 下加热大约 15 分钟就足以确保无菌。

该溶液还包括膨胀剂。膨胀剂由大小足以防止其通过横穿毛细血管床的孔进入身体组织间隙空间的而造成其从循环中流失的分子组成。作为一类，典型的膨胀剂是血浆扩张剂(expander)。可在本发明中用作膨胀剂的化合物可以是天然的或合成的，通常是平均分子量至少约为 40000、通常至少约为 100000、更通常的至少约为 200000 的聚合物组合物，也可用分子量为 300000 或更高的膨胀剂。适用于本发明溶液中的膨胀剂例如包括蛋白质化合物，如白蛋白(如人血清白蛋白)，以及交联的或高分子量血红蛋白，多糖如聚糖聚合物等；有机聚合物，如 PVP, PEG 等；其中无抗原性的多糖是较佳的。

在本发明中用作膨胀剂的多糖包括羟乙基淀粉、羟甲基 $\alpha(1\rightarrow4)$ 或 $(1\rightarrow6)$ 聚合物，D-葡萄糖聚合物，例如具有 $\alpha(1\rightarrow6)$ 键的葡聚糖、环糊精、羟丙基淀粉、羟基乙酰基淀粉等。

对于本发明的某些实施方案来说，羟乙基淀粉是特别感兴趣的。用于本发明的羟乙基淀粉的平均分子量可在 10000-1000000d(道尔顿)或更高，其中分子量典型范围在大约 40000-1000000 d 之间，通常在大约 100000-900000 d 之间，更通常的在大约 200000-800000 之间。较佳的是，组合物中羟乙基淀粉膨胀剂的平均分子量范围在大约 50000-1000000 d 之间，通常在大约 100000-900000 之间，更通常的在大约 200000-800000 之间。取代度在大约 4-10 之间，在某些实施方案中，取代度在 6-10 或 7-10 范围内，在另一实施方案中，在 4-6 或 4-5 范围内，在其它实施方案中，在 6-8 或 6-7 范围内。因此，一类较佳的溶液将包括每 10 个葡萄糖单元有大约 6 和 7 个羟乙基的羟乙基淀粉。另一类较佳的溶液中将包括每 10 个葡萄糖单元有大约 4-6 或 4-5 个羟乙基的羟乙基淀粉。还有一类较佳的溶液将包含每 10 个葡萄糖单元有大约 7-8 个羟乙基的羟乙基淀粉。

一种特别佳的膨胀剂是 Hetastarch(McGaw, Inc.)，它是一种从蜡质淀粉衍生获得的人工胶体，它几乎全部由支链淀粉组成，在 $\alpha(1\rightarrow4)$ 连接的葡萄糖单元中导入了羟乙基醚基团，且每个葡萄糖单元有大约 0.7 个羟乙基摩尔取代。Hetastarch 的 6% 溶液(重量/重量)的胶体性质接近人血清白蛋白。

另一种特别佳的膨胀剂是 Pentastarch，它的摩尔取代约为 0.5 羟乙基/葡萄糖单元，在大约 0.4-0.5 范围内，平均分子量(用 PDR 1996 中报道的 HPSEC 方法测定)在大约 150000-350000d 之间，有 80% 在 10000 和 200000d 之间。

另一种特别佳的膨胀剂是“Hexastarch”，它的摩尔取代约为 0.6-0.7(例如 0.64)羟

乙基/葡萄糖单元, 平均分子量约为 220000。

在某些实施方案中, 羟乙基淀粉是初始的羟乙基淀粉来源的选择级分, 尤其是大小经过选择的级分, 其中组分通常是基本上没有聚合物分子的分子量大于约 1000000 道尔顿或小于约 50000 道尔顿, 其中“基本上没有一个”指小于的 10%, 通常小于 5 % 的聚合物分子在上限以上或在下限之下。因此, 经分级的膨胀剂的多分散性降低。常规的分级装置均可用来制备这些级分。

膨胀剂在溶液中的浓度应足以实现接近正常人血清的胶体渗透压, 通常约为 15-40 毫米汞柱, 在某些实施方案中约为 28 毫米汞柱。膨胀剂在溶液中的量在约为 0.5-30% 的范围内, 通常在大约 1-25% 范围内, 更通常在大约 2-8% 范围内。当膨胀剂是羟乙基淀粉时, 溶液中的量在大约 1-30% 范围内, 通常在大约 2-15% 范围内, 更通常在大约 4-8% 范围内。

在本发明的一个方面, 溶液含有两种或多种具有不同的清除率的膨胀剂。具有两种或多种清除率不同的膨胀剂的本发明溶液为在长时间内低血容量机体内的血膨胀压恢复提供了额外的好处, 通常刺激机体自身产生血浆蛋白。清除率较慢的人工膨胀剂包括高分子量的 Hetastarch(分子量为 300000-1000000)和葡聚糖 70, 经测定其血管内的持续率为 6 小时 (Messmer(1989)Bodensee Symposium on Microcirculation(Hammersen & Messmer 编辑), Karger, N.Y.,59 页)。清除率较快的人工膨胀剂包括低分子量和中等分子量的具有较低取代度(例如约 0.40-0.65)的羟乙基淀粉, 以及血管内持续率为 2-3 小时的葡聚糖 40(Messmer (1989)同上)。

溶液还可包含一种或多种不同的任意的可加入该溶液使其适用于特定用途的试剂。可加入且通常加入的一种任意的试剂是糖。糖通常是己糖, 如葡萄糖、果糖和半乳糖, 其中葡萄糖是较佳的。在本发明的较佳实施方案中, 采用了营养性己糖, 可用糖的混合物。糖通常(但不是必需)以生理学量存在于溶液中。术语“生理学量”或“生理学水平”指糖浓度在 2mM 和 50mM 范围内, 葡萄糖浓度宜为 5mM。有时, 为了在机体组织中有较低的流动保持性(fluid retention), 希望增加己糖的浓度。因此, 己糖的范围可扩大至高于 50mM 或甚至更高, 但是如果需要预防或限制受处理对象中的水肿, 通常不高于 60、更通常的不高于 55mM, 除非试剂作为防冻剂存在(这在下文有更详细的描述)。

在某些实施方案中, 本发明的溶液可包括能加速或促进形成血块的凝血因子。用于本发明溶液的较佳的凝血因子包括维生素 K、因子 I、II、V、VII、VIII、VIIIc、IX、X、XI、XII、XIII、C 蛋白、von Willebrand 因子、Fitzgerald 因子、Fletcher 因子和蛋白酶抑制剂。凝血因子的浓度可由本领域技术人员根据具体的治疗环境来确定。例如,

通常当给予维生素 K 时, 给予患者 5-10 毫克的浓度就足够了。

液体血液组合物

用于本发明方法的第二种必需的液体组合物是液体血液组合物。“液体血液组合物”指这样一种液体介质, 它是全血或从全血衍生获得, 例如红血细胞、血小板、血浆蛋白、从全血纯化得到的白蛋白、全血浆或其级分(如无纤维蛋白的血浆)等的一种或多种的水性悬浮液。重要的是, 由于组成液体血液组合物的组分, 液体血液组合物并不是热稳定的, 因此, 热消毒不可逆地破坏了液体血液组合物的一种或多种组分。在许多实施方案中, 液体血液组合物包含一种或多种衍生自血液的细胞组分, 其中细胞组分包括全细胞及其片段、部分或衍生物, 例如红血细胞、血小板等。从全血制备这些组分是本领域技术人员所熟知的, 可采用任何常规的方法来进行该制备。天然存在的血液组分是以生理上可接受的溶液方式存在的, 例如上述血浆样溶液中。可用于本发明的液体血液组合物还包括全血。液体血液组合物的血液组分可包含供体组分或从以前经受了使用过该组合物的程序的对象获得的组分。例如, 当液体血液组合物是全血时, 整个组合物可以是患者的血液(以前已从患者获得)或供体血液。在许多实施方案中, 特别感兴趣的是用 Cell Saver®(Haemonetics, Braintree MA)或类似的装置来收获和加工患者自身的血液或其组分, 并在以后作为血液或血液衍生的产物以本发明方法使用。这些装置在美国专利 No. 5,971,948; 5,954,971; 5,769,811; 5,643,193; 5,607,579; 5,311,908; 4,482,342 和 4,303,193 中有描述, 这些公开内容均纳入本文作为参考。当用这些装置和方法来制备血液或血液衍生产品时, 血液或其组分(如血浆)通常从患者收集得到, 经过加工(如洗涤), 然后保存以便以后用本发明方法来进行输注。另外, 这些组分可用合成手段来制得, 例如重组白蛋白。

任选的液体组合物

除了上述两种液体组合物外, 本发明方法还可进一步采用一种或多种下列任选的溶液, 其中下列任选的溶液是上述碱性非天然存在的血浆样溶液的衍生物。

25 碳酸氢盐血浆样溶液

本发明的碳酸氢盐血浆样溶液是上述合成的且还包含碳酸氢根离子的血浆样溶液。在合成的血浆样溶液中可加入任何合适来源的碳酸氢根离子, 以便获得所述碳酸氢盐血浆样溶液, 其中碳酸氢盐溶液通常包括碳酸氢钠(NaHCO_3)。碳酸氢钠的浓度在大约 0.1-40mM 范围内, 通常在大约 0.5-30mM 范围内, 更通常的在大约 1-10mM 之间。

30 生物能或超载荷(Supercharger)溶液

其它感兴趣的是对本发明血浆样溶液加以改变, 使其包括升高水平的钾和镁电解

质(称为“生物能”或“超载荷溶液”)。“升高的水平”指钾离子浓度在大约 50mM-3.0M 之间,通常在大约 200mM-2.5M 之间,更通常在大约 1.0-2.5M 之间;镁离子浓度在大约 40mM-1.0M 之间,通常在大约 0.1-0.9M 之间,更通常在大约 0.3-0.7M 之间。在某些实施方案中,这些溶液还可进一步包含碳酸氢盐,这些碳酸氢盐的量在
5 大约 0.1-40mM 之间,通常在大约 0.5-30mM 之间,更通常在大约 1-10mM 之间。

载氧溶液

另外感兴趣的是本发明的合成的血浆样溶液经过修饰包含载氧化合物。通常,载氧化合物或组分以浓度低得足以对对象没有毒性而存在。载氧组分通常存在的量足以将增加的氧输送给机体组织而不对该机体产生毒性。携氧组分的“足够量”是使循环
10 和生理学未受损害的休养的机体从外伤、疾病或伤害中幸存和恢复的量。在正常体温的正常人中,这至少为 5-6 毫升 O_2 /100 毫升血管内体液。携氧组分包括从人和非人源抽提出的血红蛋白、重组的血红蛋白、血蓝蛋白、血绿蛋白和蚯蚓血红蛋白,以及从天然来源提取出的或用重组 DNA 或体外方法制得的其它天然存在的呼吸色素。这些化合物可用本领域知道的许多方法来修饰,这些方法包括化学交联或共价结合到聚乙
15 二醇基团上。当携氧组分是血红蛋白时,其浓度宜在大约 20-200 克/升范围内。

除了存在携氧组分外,血浆样溶液可用使溶液溶氧含量增加至所需水平的方式来处理,其中所需的水平通常在大约 3-60 毫升/分升之间,通常在大约 3-40 毫升/分升之间,更通常在大约 4-25 毫升/分升之间。可用各种不同的技术来给溶液充氧,这些技术包括:用高压氧加压;鼓泡充氧(bubble oxygenation);使溶液通过充氧膜
20 (oxygenating membrane)(如 Terumo Corporation(Japan)出售的那些)等。

低温溶液

本发明还提供了低温溶液。上述任一合成的血浆样溶液均可经过改进加入一种或多种低温保护剂来制得本发明的低温溶液,其中“低温保护剂”指在低于体温(如零下)条件下保持组织结构完整的试剂,在某些实施方案中,低温保护剂可以是调节或影响
25 (至少部分程度)水分子有序晶体排列的试剂。感兴趣的低温保护剂包括:醇,尤其是低分子量的脂族醇,通常是 C_1 - C_6 醇,更通常的是 C_1 - C_4 醇,如甲醇、乙醇等;多元醇,包括直链、支链和环状多元醇,通常是低分子量脂族多元醇,包括二元醇、三元醇和其它多元醇,如糖(在下文有更详细的描述),其中特别感兴趣的多元醇包括二元醇(如乙二醇、丙二醇、丁二醇),三元醇(如甘油等);糖,包括赤藓糖、苏糖、核糖、
30 阿拉伯糖、木糖、来苏糖、阿洛糖、atrose、葡萄糖、甘露糖、古罗糖、艾杜糖、半乳糖、塔罗糖、赤藓酮糖、核酮糖、木酮糖、阿洛酮糖、果糖、山梨糖、塔格糖和二糖,如蔗糖、乳糖和麦芽糖,其中葡萄糖是特别佳的;其它试剂,如三甲胺,氧化三

甲胺(TMAO)、DMSO、尿素、甲酰胺、二甲基甲酰胺等；包合物，含硅试剂，如硅烷等，氟碳化合物及其衍生物；等；其中低温保护剂可通过加压，和/或可采用合适的表面活性剂加入溶液中，其中这些表面活性剂是本领域技术人员已知的。这些试剂通常存在的量足以提供所需的低温保护效果，其中试剂的具体量将取决于所用的具体试剂。当试剂是多元醇(如二醇)时，其含量通常在大约 0.2-1M 或 0-30% 之间。对于丙二醇，0.2M-0.6M 的范围是特别佳的，丙二醇浓度约为 0.4M 是最佳的。1,2-丙二醇宜作为用于本发明低温器官和供体保存的加合物，但也可用 1,3-丙二醇。对于 TMAO，TMAO 在溶液中的最终浓度在 0.2M-7M 之间。当采用甘油时，其浓度在大约 0-40% 范围内，通常在大约 5-30% 范围内，更通常在的在 5-20% 范围内。当采用 DMSO 时，其量在大约 0-40% 范围内，通常在大约 5-30% 之间，更通常在的在大约 5-20% 之间。当采用糖(尤其是葡萄糖)时，糖在大约 0.6M-1.4M 之间，对于某些实施方案，1.0M 是较佳的。

制备液体组合物的方法

在制备本发明的溶液和液体组合物时，各种组分可以几乎同时加入，或依次加入，这可能较方便。在大多数场合下，非天然存在的血浆样溶液可以如上所述作最终热消毒。另外，如上所述，溶液还可进一步包含不应进行最终热消毒的试剂，如碳酸氢盐原料(当该碳酸氢盐加入动态缓冲系统时)。在这些情况下，碳酸氢钠可以无菌的溶液方式加入预先已经高压蒸气处理的“基础溶液”中。同样，当需要加入凝血因子或携氧组分时，凝血因子或携氧组分可以无菌溶液方式加入经高压蒸汽处理后的基础溶液中。

为了描述本发明，已经讨论了本发明的混合物，下面将根据水溶液继续讨论。预计本领域普通技术人员能根据下面的发明描述提供干混物形式的混合物，该混合物可在以后水化。

使用方法

上述溶液可以给机体输注的方式使用。术语“对象(机体)”用来广泛地指任何具有循环系统的生物实体，因此该术语包括整个生物体，如哺乳动物(包括狗、猫、啮齿类动物、牛、马和人)；以及这些生物的衍生物，如组织或器官(如心脏、肝、肾等)。

在实施本发明方法时，将至少两种液体组合物依次给予对象或其衍生物。第一种液体组合物是上述血浆样溶液。第二种液体组合物是液体血液组合物。“依次给予”指在给予第二种液体组合物前，将第一种液体组合物给予对象。本发明还包括给予两份或多份量的第一种液体组合物和/或给予两份或多份量的第二种液体组合物的方法。因此，在最广的含义中，本发明的方法指给予第一种液体组合物至少一次，然后给予

第二种液体组合物至少一次。

在许多实施方案中，将一种或多种额外的液体组合物，如碳酸氢盐血浆样溶液、低温溶液、超载荷溶液等给予宿主。这些额外的液体组合物可在第一和第二种液体组合物之前、之间或之后的任何时间给予，这取决于所进行的特定方法。在某些实施方案中，按照下列次序将液体组合物给予对象：(1)血浆样溶液；(2)碳酸氢盐血浆样溶液；(3)生物能溶液；(4)碳酸氢盐血浆样溶液；和(5)液体血液组合物。在另一个实施方案中，按照下列次序将液体组合物给予对象：(1)血浆样溶液；(2)碳酸氢盐血浆样溶液；(3)生物能溶液；(4)低温溶液；(5)碳酸氢盐血浆样溶液；和(6)液体血液组合物。

在一类较佳的实施方案中，在给予液体血液组合物后再给予额外量的非天然存在的血浆样溶液或其衍生物，如血浆样溶液；碳酸氢盐血浆样溶液；生物能溶液；低温溶液；等。

本发明的液体组合物通常用静脉径路(用重力供应径路)或泵压循环装置(如离心泵、滚轴泵(roller bump)、蠕动泵或其它已知的和可获得的循环泵来给予。在使用时，将循环装置与通过外科手术插入适于静脉和动脉的插管相连。例如，当将溶液给予冷藏的对象时，通常通过动脉插管给予对象，通过静脉插管流出，并弃去、保存或循环。

根据进行的具体方法和处理状态，本发明方法还包括调节对象体温的步骤，例如从室温升高或降低。在许多实施方案中，在至少一部分处理过程中，即将至少两种液体组合物给予对象的过程中，降低对象的温度。在降低对象的温度时，温度通常降低至至少约为 32℃，通常至少约为 20℃，更通常的至少约 5℃，温度可降低至-80℃或更低，但是通常不降低至低于-196℃。对象的温度可用任何合适的方法来调节，例如采用温度控制室，温热或冷却覆盖物、用冷却的或温热的溶液输注，浸泡在冷却的或温热的液体中等。

另外，对象的压力也可调节。因此，对于至少一部分本发明方法，可对该对象进行加压，例如置于高压环境中。在高压环境中，压力典型的至少约为 1.5 大气压，通常至少约为 2.0 大气压，压力可高达 200 大气压或更高，但是一般不超过约 10000 大气压，通常不超过约 5000 大气压，更常不超过大约 2500 大气压。高压环境可用任何合适的技术来提供。例如参见美国专利 5,738,093; 5,678,722; 5,678,543; 5,398,678; 5,109,837; 5,060,644; 4,974,829; 4,837,390; 4,727,870; 4,655,048; 4,633,859; 这些内容均纳入本文作为参考。例如，可用经气体介质(如氦气、氩气、氮气、氟气)加压的厚壁室来提供高压环境。

本发明用至少一种合成血浆样溶液和液体血液组合物依次输注给对象的方法可用于各种不同的应用，这些应用包括：低于体温的外科手术应用、高压外科手术应用、

器官或生物保存等。下列应用是本发明方法适用的典型用途。

本发明适用的一类用途是低于体温的外科手术应用，例如，采用心肺分流器的低(于体)温的心脏外科手术。在这些方法中，按标准的程序准备对象以进行外科手术。按照所用特定机器来确定所采用的方法，使对象与心肺分流器相连。各种不同的心肺分流器及其使用方法是本领域技术人员已知的，它们包括在下列专利中描述的那些：5,827,220; 5,820,579; 5,800,375; 5,785,686; 5,688,245; 5,643,921; 5,478,309; 5,437,601; 5,383,854; 5,383,839; 5,334,136; 5,308,320; 5,300,015; 5,254,097; 5,158,539; 5,011,469; 4,808,163; 4,804,365; 4,690,002; 4,553,532; 4,398,872; 4,293,961，这些专利的内容均纳入本文作为参考。在准备进行手术时，将一定量本发明的合成的血浆样溶液给予需要预防和/或治疗准备过程期间血容量减少的对象，例如对对象使用仪器和插管，以及使对象与心肺分流装置等相连。通常，血浆样溶液的给予量在大约 0.25-10 升之间，通常在大约 0.50-5.0 升之间，更通常在大约 1.0-3.0 升之间。

在患者准备好、用心肺分流器完成循环后，将碳酸氢钠溶液(如上所述)导入循环中，使其足以代替患者循环系统中几乎所有的患者血液。当患者的血细胞比容低于约 15%(通常低于 7%，更通常的低于约 3%)时，认为已经从患者体内取出了基本上所有的患者血液

一旦基本上所有的患者血液被碳酸氢盐灌注溶液代替，就冷却患者体温，将一定量的足以使心动停止的浓 KCl 溶液导入循环中。将对象或患者冷却至约 28-1℃ 的温度，通常约为 8℃-2℃。浓 KCl 溶液的浓度足以使对象循环系统中的液体中的钾离子浓度升高到大约 5-300mM、通常约 6-50mM 的范围内。因此，KCl 溶液的浓度在大约 0.3-3M 之间，通常在大约 0.5-2.8M 之间，更通常在大约 1.5-2.5M 之间。KCl 溶液可由单独的 KCl 和纯水组成，或可包含一种或多种额外的组分，如镁、碳酸氢盐、乳酸盐等。导入循环的浓 KCl 溶液的量一般至少约 2 毫升，通常至少约 10 毫升，更通常至少约 50 毫升，其量可高达 400 毫升或更高，但是典型地不超过 1 升，通常不超过 500 毫升。

在导入浓 KCl 溶液后，将宿主或对象的温度降低至手术所需温度，例如约 30-0℃ 之间的温度，通常为 25-1℃ 之间的温度，更通常为大约 10-2℃ 之间的温度，通常是加入 1 升或几升碳酸氢盐溶液。在紧接循环停止手术前(即，当心动停止搏动时)，导入生物能溶液。生物能溶液的导入量至少约为 1 毫升，通常至少约为 100 毫升，更通常的至少约 500 毫升，其量可高达 4 升或更高，但是典型地不超过约 3 升，通常不超过约 2 升。

上述步骤导致对象处于心动停止且深低温，此时对象的温度在大约 30-2℃ 之间，

通常在大约 10-2℃之间。在特定的低温外科手术进行期间，维持这些条件。

手术完成后，在循环中冲入新鲜的碳酸氢盐血浆样溶液，使对象逐步升温至 0-20℃之间、通常约 2-12℃之间的温度。可用碳酸氢盐溶液再冲一次或多次。一旦对象的温度达到 4-28℃，就将液体血液组合物(如全血)导入循环中，其量应足以使血细胞比容升高至恢复心脏功能，其中心脏功能可通过机械方式、电方式、药物方式、自发除颤等方式来恢复，这些方法均是本领域所知的。例如，输注全血直至对象有可接受的血细胞比容，通常该血细胞比容超过约 28%。当达到可接受的血细胞比容后，停止输注，在手术伤口闭合后用常规方法使对象复苏。

本发明方法还可用于低温保存用途，在该用途中，生物体或其衍生物(无论是活的还是不存活的)被长时间保存。在这些方法中，首先用常规方法，如冷却覆盖层、输注冷却液体等方法，将对象或其衍生物冷却至大约 35-0℃之间(通常约 30-5℃，更通常约 10-0℃)的低于体温的温度，在某些实施方案中，低于体温的温度在大约 20-0℃之间，通常在 12-0℃之间。在该最初的冷却过程中，用上述的合成的血浆样溶液输注对象，从而除去基本上所有的对象血液，并用合成的血浆样溶液代替。

在使对象冷却并用合成的血浆样溶液(可以是或不是碳酸氢盐血浆样溶液)代替对象血液后，将低温对象移至高压环境下，例如强度足以抵抗室内产生的压力的有壁的室。例如，可采用经合适牢固的材料(例如低温用钢等)制得的具有合适结构的厚壁室。该室可装有加热和冷却装置，以及监测对象的装置和从位于室内的对象的循环系统中将液体导入和取出的装置。将足量的合适气体导入室内，对对象进行加压。可采用各种气体，包括氩气，以及其它惰性气体，如氙气、氦气或氟气。然后将对象加压至所需的高压，其通常在大约 2-10000 大气压之间，通常在大约 100-5000 大气压之间，更通常在大约 300-3000 大气压之间。

特别感兴趣的是使患者在足以形成 ICE3 的条件下。在这样的条件下，将对象的温度降低至约-1 至-200℃之间、通常约-5 至-40℃之间、更通常在约-15 至-25℃之间的值的范围内。对象的压力通常在大约 10-5000 大气压之间，通常在大约 500-3000 大气压之间。

在上述保存步骤的某些实施方案中，希望将低温溶液(如上所述)导入对象中。当采用低温溶液时，对象降低至用于保存的温度可在大约-2 至-270℃之间，通常在大约-40 至-250℃之间，更通常在大约-60 至-200℃之间。

利用上述方法，对象可无限期保存。一般来说，在保存期间可在加压和低于体温的状况下保存该对象。然而，在某些实施方案中，也可对对象减压，在亚稳定(metastable)状况下保存该对象。

在保存对象后,可以使组织受损最小的方式使对象逐步升温和减压。在该过程期间的某些点,通常当温度在大约 8-28℃之间压力在大约 1-5 大气压之间,将液体血液组合物(如全血)输注给对象。该对象可能会或也可能不会复苏。

试剂盒

- 5 本发明还提供了用于进行本发明方法的试剂盒。本发明的试剂盒至少包括合成的血浆样溶液以及与实施本发明方法的说明书。包括在该试剂盒中的合成的血浆样溶液的量可以不同,但是一般在大约 0.5-1000 升之间,通常在约 1-300 升之间,更通常的在大约 1-100 升之间。溶液可盛放在任何合适的容器或包装内,例如柔软的聚合物袋等中。实施本发明方法的说明书可在一种或多种的装置的包装插页、包含物或包装物
- 10 上。本发明的试剂盒还可包含一种或多种额外的液体组合物,这取决于待进行的特定方法。这些额外的液体组合物包括:浓 KCl 溶液、碳酸氢盐溶液、生物能溶液、冷冻(heta freeze)溶液等,其中试剂盒可包括一种或多种这些不同的预先制得的溶液,或可包括可在使用时与所提供的合成的血浆样溶液合并以便配制感兴趣的溶液的组分。另外,本发明的试剂盒还可进一步包括用于该方法的液体血液组合物,尤其当患者自身的血液被弃去和用供体血液或血液组分来代替的时候。
- 15

系统

- 本发明还提供了用来进行本发明方法的系统。本发明的系统经过特殊设计能在控制的温度和压力条件下最优地依次将血浆样溶液和液体血液组合物输送给对象。因此,本发明的系统可包括:与宿主的循环系统建立液体交流的径路;氧合器;使本发
- 20 明的液体组合物通过宿主循环系统流动的泵;热交换器,透析回路;收集、储存、处理和显示数据(如压力和温度)的计算机和监测器;建立高压环境的装置,如用于输送高压氧气给对象的氧幕或室;控制对象温度的装置,如温热和冷却毯;等。

提供下列实施例是为了描述而不是为了限制。

25

实验

I. 液体组合物

A. 血浆样溶液

	高分子量 Hetastarch	
	(平均分子量为 350000-900000)	1-10%
30	Ca ⁺⁺	1-6mM
	K ⁺	1-5mM
	Mg ⁺⁺	0-10mM

	乳酸根	1-40mM
	葡萄糖	0-50mM
	B. 碳酸氢盐血浆样溶液	
	高分子量 Hetastarch	
5	(平均分子量为 350000-900000)	1-10%
	Ca ⁺⁺	1-6mM
	K ⁺	1-5mM
	Mg ⁺⁺	0-10mM
	乳酸根	1-40mM
10	葡萄糖	0-50mM
	碳酸氢根	5-10mM
	C. 生物能溶液(请提供组成)	
	K ⁺	100-3000mM
	Mg ⁺⁺	30-1000mM
15	D. 低温保护溶液	
	1. 高分子量 Hetastarch	
	(平均分子量为 350000-900000)	1-10%
	Ca ⁺⁺	1-6mM
	K ⁺	1-5mM
20	Mg ⁺⁺	0-10mM
	乳酸根	1-40mM
	葡萄糖	0-50mM
	碳酸氢根	5-10mM
	甘油	10-20%
25	2. 高分子量 Hetastarch	
	(平均分子量为 350000-900000)	1-10%
	Ca ⁺⁺	1-6mM
	K ⁺	1-5mM
	Mg ⁺⁺	0-10mM
30	乳酸根	1-40mM
	碳酸氢根	5-10mM
	甘油	10-20%

3. 高分子量 Hetastarch

	(平均分子量为 350000-900000)	1-10%
	Ca ⁺⁺	1-6mM
	K ⁺	1-5mM
5	Mg ⁺⁺	0-10mM
	乳酸根	1-40mM
	葡萄糖	0-50mM
	碳酸氢根	5-10mM
	甘油	5-15%
10	DMSO	5-15%

II. 低温心血管手术

将患者麻醉，装上仪器，插入导管。收集患者的血容量一部分(1 升)，用 1 升血浆样溶液代替。然后，打开患者的胸腔。这些过程中失去的血容量首先用收集的血液代替，然后用血浆样溶液代替。给主动脉和腔静脉插入导管以便进行心肺分流术。将患者的循环与含有血液泵、氧合器和热交换器的分流回路(充填了碳酸氢盐血浆样溶液)相连。然后将患者体温降至 14℃，用碳酸氢盐血浆样溶液代替循环血液。持续该步骤直至血细胞比容接近 1%。在该血容量替换期间，收集其余的患者血液待复温时使用，然后在动脉内注射 100 毫升 2mEq/毫升 KCl 溶液，使心脏纤维性颤动停止。在事实上所有患者血液被碳酸氢盐血浆样溶液代替后，将体温降至约 4℃，在动脉内导入 500 毫升生物能溶液(375 毫升的 2mEq/毫升 KCl 溶液和 125 毫升 50%的 MgSO₄·7H₂O 溶液)，循环 4 分钟。

手术完成后，清除回路中的加入了生物能溶液的碳酸氢盐血浆样溶液。然后使患者复温，继续用足量的碳酸氢盐血浆样溶液继续冲洗，使血浆 K⁺浓度降低至低于 6mEq/升。在 14℃下，将最初从患者收集的稀释的血液输回，随着患者变得越来温暖，更多的血液被输入。在将患者脱离分流术时，将回路中的其余血细胞以及在手术开始时收集的患者的其余的全血回输给患者。然后使患者复温至正常体温，闭合所有切口，使患者置于麻醉和呼吸器上直至次日苏醒。

III. 低温保存

给 50 克仓鼠注射氯胺酮并置于碎冰上。当其体温降至 12℃时，将仓鼠置于立体显微镜下，装上仪器，插入导管，通入 100%O₂，冷却至 1℃。其血液用 4 毫升碳酸氢盐血浆样溶液、然后 4 毫升生物能溶液、然后 10 毫升低温保护溶液 1 代替。将仓鼠置于厚壁室内，加压至 1500 大气压的氦气，同时将其温度逐步降至-20℃。然后将

温度降至-196℃，给仓鼠缓慢减压。在该温度下保存1周后，用氮气将仓鼠重新加压至1500大气压。然后温至-20℃，然后缓慢减压并温至1℃。再次用碳酸氢盐血浆样溶液对仓鼠进行输注，然后温热，同时用全血输注。给动物通入100%O₂，回至正常温度。

- 5 IV. 59 位经历过的肠胃、泌尿、妇科和整形外科疾病较大择期手术的患者在手术期间用静脉内血浆样溶液输注来对付血压丧失。在这些患者中，31 位患者丧失了足量的血液，需要用压积红血细胞输入，然后用血浆样溶液输注。输注给这些患者的血浆样溶液的平均量约为2.1升。输入的压积红血细胞的平均量约为1升。在许多患者中，然后输注额外的血浆样溶液，然后用额外量的压积红血细胞输入。所有患者在手术中
- 10 成功恢复，没有与使用血浆样溶液有关的严重的不利影响。

从上述结果和讨论明显得知，本发明提供了给对象输注的方法，该方法可用于各种不同的应用。利用本发明的方法可在各种不同的用途(包括低温手术、低温保存等)中获得更好的结果。

- 15 本说明书中引述的所有出版物和专利申请均纳入本文作为参考，正如每篇单独的出版物或专利申请个别具体地纳入本文作为参考一样。引用出版物是因为其公开在申请日之前，这不应被理解为承认本发明无权利用先前的发明而先于这些出版物。

- 20 尽管前述发明为了便于清楚了解的目的参照说明和实施例作了某些详细的描述，但是本领域技术人员显然能根据本发明的说明在不脱离所附权利要求的精神或范围内对其作某些变化和改动。