(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101795558 B
(45)授权公告日 2014.07.16

(21)申请号 200880105723.0
(22)申请日 2008.07.03
(30)优先权数据
0712833.3 2007.07.03 GB
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2010.03.02
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/GB2008/002268 2008.07.03
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2009/004331 EN 2009.01.08
(73)专利权人 埃奇斯有限公司
地址 英国伦敦
(72)发明人 道格拉斯·里斯
(74)专利代理机构 上海金盛协力知识产权代理有限公司 31242
代理人 段迎春
(51)Int.Cl.
A61K 47/16(2006.01)
(56)对比文件
US 5574019 A,1996.11.12, 摘要,说明书第3啦第14-16行,第5栏第11-24、54-67行,第6栏第6-10行,.
US 5574019 A,1996.11.12, 摘要,说明书第3啦第14-16行,第5栏第11-24、54-67行,第6栏
(续)
审查员 孙瑞峰

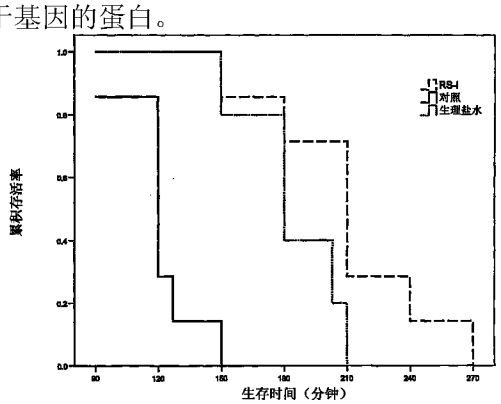
权利要求书4页 说明书22页 附图37页

(54)发明名称

含有N-取代的氨基磺酸缓冲剂的体液增容剂

(57)摘要

一种缓冲体液增容剂溶液,其中缓冲剂是生理可接受的非无机磷酸盐缓冲剂,其包含浓度比为5∶1～1∶1的钙离子和镁离子。所述非磷酸盐缓冲剂可以是生理可接受的N-取代的氨基磺酸缓冲剂,特别是那些在20℃下在水溶液中pKa值为7.1～7.5的,最优选为N-三(羟甲基)甲基-2-氨基乙磺酸(TES)、3-(N-吗啉基)丙磺酸(MOPS)、N,N-双(2-羟乙基)-2-氨基乙磺酸(BES)及其组合。优选的组分包含:100～150(优选约135)毫摩尔/升钠离子、2.5～6.2(优选约5)毫摩尔/升钾离子、0.1～2.5(优选约1.25)毫摩尔/升钙离子、0.4～25.0(优选约0.45)毫摩尔/升镁离子、96～126(优选约118)毫摩尔/升氯离子、2～11(优选约10)毫摩尔/升葡萄糖(优选为D-葡萄糖)、50～150(优选约110)微摩尔/升甘油、7～15(优选约10)微摩尔/升胆碱、5～400(优选约300)微摩尔/升谷氨酸盐(优选为L-谷氨酸盐)、5～200(优选约20)微摩尔/升天冬氨酸盐(优选为L-天冬氨酸盐)、100～2000(优选约400)微摩尔/升谷氨酰胺(优选为L-谷氨酰胺)、15～215(优选约60)微摩尔/升焦谷氨酸盐、20～200(优选约100)微摩尔/升精氨酸(优选为L-精氨酸)、1～120(优选约40)纳摩尔/升硫胺素焦磷酸盐(TPP)、40～70(优选约50)微摩尔/升D-或DL或L-肉碱(优选为L-肉碱)、及5～200(优选约28)mI.U./L猪或人胰岛素(优选为人胰岛素)。所述溶液用于制备药物和血容量增容剂,以治疗血容量不足或治疗烧伤对象的细胞外液和组织液的丢失,治疗对象的呼吸性和/或代谢性酸中毒,用于在患有急性肾衰竭或急性毒性症状的对象在腹膜透析期间灌注腹腔,用于防止和/或改善再灌注损伤,以及用于向对象输送治疗剂、测试剂和/或增效剂,这些试剂包括生物试剂,例如至少一种干细胞、多肽或源于基因的蛋白。



以分钟计的大鼠累积存活时间

[转续页]

CN 101795558 B

[接上页]

(56) 对比文件

第 6-10 行, .

US 2003/0077655 A1, 2003.04.24, 说明书摘要, 第 7-33 段 .

US 5130230 A, 1992.07.14, 第 6 栏第 25-43 行, 第 7 栏第 15-16 行, 第 9 栏第 30-36 行 .

US 2001/0010827 A1, 2001.08.02, 全文 .

1. 一种缓冲体液增容剂溶液，包含：

i)BES，其中所述 BES 的浓度为 1 ～ 12 毫摩尔 / 升；

ii) 摩尔浓度比为 5 :1 ～ 1 :1 的钙离子和镁离子，其中钙离子浓度 0.1 ～ 2.5 毫摩尔 / 升；

iii)21 ～ 35 毫摩尔 / 升的碳酸氢根离子；

iv)100 ～ 150 毫摩尔 / 升的钠离子；

v)2.5 ～ 6.2 毫摩尔 / 升的钾离子；和

vi)96 ～ 126 毫摩尔 / 升的氯离子；

其用作药物。

2. 如权利要求 1 所述的缓冲体液增容剂溶液，其用于治疗血容量不足。

3. 如权利要求 2 所述的缓冲体液增容剂溶液，其中所述血容量不足由脱水和 / 或烧伤和 / 或出血引起。

4. 如权利要求 2 所述的溶液，其中所述血容量不足由药物所引起。

5. 如权利要求 1 所述的缓冲体液增容剂溶液，其用于治疗烧伤。

6. 一种缓冲体液增容剂溶液，包含：

i)BES，其中所述 BES 的浓度为 1 ～ 12 毫摩尔 / 升；

ii) 摩尔浓度比为 5 :1 ～ 1 :1 的钙离子和镁离子，其中钙离子浓度 0.1 ～ 2.5 毫摩尔 / 升；

iii)21 ～ 35 毫摩尔 / 升的碳酸氢根离子；

iv)100 ～ 150 毫摩尔 / 升的钠离子；

v)2.5 ～ 6.2 毫摩尔 / 升的钾离子；和

vi)96 ～ 126 毫摩尔 / 升的氯离子；

其用于防止和 / 或改善缺血再灌注损伤。

7. 一种缓冲体液增容剂溶液，包含：

i)BES，其中所述 BES 的浓度为 1 ～ 12 毫摩尔 / 升；

ii) 摩尔浓度比为 5 :1 ～ 1 :1 的钙离子和镁离子，其中钙离子浓度 0.1 ～ 2.5 毫摩尔 / 升；

iii)21 ～ 35 毫摩尔 / 升的碳酸氢根离子；

iv)100 ～ 150 毫摩尔 / 升的钠离子；

v)2.5 ～ 6.2 毫摩尔 / 升的钾离子；和

vi)96 ～ 126 毫摩尔 / 升的氯离子；

其用于增容血容量，或用于补液，或用于灌注正在接受外科手术的对象的腹腔，或用于通过血管内或血管外输送向对象输送治疗剂、测试剂和 / 或增效剂，或用于向对象淋巴系统输送治疗剂、测试剂和 / 或增效剂。

8. 如权利要求 7 所述的缓冲体液增容剂溶液，其中所述试剂是至少一种干细胞、多肽或源于基因的蛋白。

9. 如权利要求 7 或 8 所述的缓冲体液增容剂溶液，其中所述输送通过血管内、腹膜内、真皮内、口服、肌肉内或局部途径给药实现。

10. 一种缓冲体液增容剂溶液，包含：

i)BES,其中所述 BES 的浓度为 1 ～ 12 毫摩尔 / 升 ;

ii) 摩尔浓度比为 5 :1 ～ 1 :1 的钙离子和镁离子,其中钙离子浓度 0.1 ～ 2.5 毫摩尔 / 升 ;

iii)21 ～ 35 毫摩尔 / 升的碳酸氢根离子 ;

iv)100 ～ 150 毫摩尔 / 升的钠离子 ;

v)2.5 ～ 6.2 毫摩尔 / 升的钾离子 ;和

vi)96 ～ 126 毫摩尔 / 升的氯离子 ;

其用于 :

(a) 治疗烧伤对象细胞外液和组织液的丢失 ;

(b) 正在接受外科手术的对象的腹部或胸部器官或组织的原位灌注 ;或

(c) 患有急性肾衰竭或急性毒性症状的对象在腹膜透析期间的腹腔灌注。

11. 如权利要求 1 至 8 和 10 中任一项所述的缓冲体液增容剂溶液,其中含有 :

iv)135 毫摩尔 / 升的钠离子 ;

v)5 毫摩尔 / 升的钾离子 ;及

vi)118 毫摩尔 / 升的氯离子。

12. 如权利要求 1 至 8 和 10 中任一项所述的缓冲体液增容剂溶液,其中所述 BES 的浓度为 5 毫摩尔 / 升。

13. 如权利要求 1 至 8 和 10 中任一项所述的缓冲体液增容剂溶液,其不含有柠檬酸盐和乳酸盐缓冲剂。

14. 如权利要求 1 至 8 和 10 中任一项所述的缓冲体液增容剂溶液,其中钙离子和镁离子的浓度比为 4 :1 ～ 2 :1。

15. 如权利要求 14 所述的缓冲体液增容剂溶液,其中钙离子和镁离子的浓度比为 3 :1。

16. 如权利要求 1 至 8 和 10 中任一项所述的缓冲体液增容剂溶液,其包含 1.0 ～ 2.5 毫摩尔 / 升的钙离子。

17. 如权利要求 16 所述的缓冲体液增容剂溶液,其包含 1.1 ～ 1.4 毫摩尔 / 升的钙离子。

18. 如权利要求 17 所述的缓冲体液增容剂溶液,其包含 1.2 ～ 1.3 毫摩尔 / 升的钙离子。

19. 如权利要求 18 所述的缓冲体液增容剂溶液,其包含 1.25 毫摩尔 / 升的钙离子。

20. 如权利要求 1 至 8 和 10 中任一项所述的缓冲体液增容剂溶液,其包含 0.2 ～ 0.6 毫摩尔 / 升的镁离子。

21. 如权利要求 20 所述的缓冲体液增容剂溶液,其包含 0.3 ～ 0.5 毫摩尔 / 升的镁离子。

22. 如权利要求 21 所述的缓冲体液增容剂溶液,其包含 0.45 毫摩尔 / 升的镁离子。

23. 如权利要求 22 所述的缓冲体液增容剂溶液,其包含 1.25 毫摩尔 / 升的钙离子和 0.45 毫摩尔 / 升的镁离子。

24. 如权利要求 1 至 8 和 10 中任一项所述的体液增容剂溶液,其中不含有血清和 / 或血清提取物。

25. 如权利要求 1 至 8 和 10 中任一项所述的缓冲体液增容剂溶液,其包含 25 毫摩尔 /

升的碳酸氢根离子。

26. 如权利要求 1 至 8 和 10 中任一项所述的缓冲体液增容剂溶液，其还包含下列物质中一种或多种：

(a)2 ～ 11 毫摩尔 / 升的葡萄糖；

(b)50 ～ 150 微摩尔 / 升的甘油；

(c)7 ～ 15 微摩尔 / 升的胆碱；

(d)5 ～ 400 微摩尔 / 升的谷氨酸盐；

(e)5 ～ 200 微摩尔 / 升的天冬氨酸盐；

(f)100 ～ 2000 微摩尔 / 升的谷氨酰胺；

(g)15 ～ 215 微摩尔 / 升的焦谷氨酸盐；

(h)20 ～ 200 微摩尔 / 升的精氨酸；

(i)1 ～ 120 纳摩尔 / 升的硫胺素焦磷酸；

(j)40 ～ 70 微摩尔 / 升的 D- 或 DL 或 L- 肉碱；及

(k)5 ～ 200m I.U./L 的猪或人胰岛素。

27. 如权利要求 26 所述的缓冲体液增容剂溶液，其包含下列物质中的一种或多种：

(a)10 毫摩尔 / 升的 D- 葡萄糖；

(b)110 微摩尔 / 升的甘油；

(c)10 微摩尔 / 升的胆碱；

(d)300 微摩尔 / 升的 L- 谷氨酸盐；

(e)20 微摩尔 / 升的 L- 天冬氨酸盐；

(f)400 微摩尔 / 升的 L- 谷氨酰胺；

(g)60 微摩尔 / 升的焦谷氨酸盐；

(h)100 微摩尔 / 升的 L- 精氨酸；

(i)40 纳摩尔 / 升的硫胺素焦磷酸；

(j)50 微摩尔 / 升的 L- 肉碱；及

(k)28m I.U./L 的重组人胰岛素。

28. 如权利要求 1 至 8 和 10 中任一项所述的缓冲体液增容剂溶液，其还包含抗生素组分。

29. 如权利要求 28 所述的缓冲体液增容剂溶液，其中所述抗生素组分是氯霉素。

30. 如权利要求 29 所述的缓冲体液增容剂溶液，其包含 10 ～ 150 毫克 / 升的氯霉素。

31. 如权利要求 30 所述的缓冲体液增容剂溶液，其包含 100 毫克 / 升的氯霉素。

32. 如权利要求 1 至 8 和 10 中任一项所述的缓冲体液增容剂溶液，其中在 4 ～ 38℃的温度范围下 pH 值为 7.05 ～ 7.5。

33. 如权利要求 1 至 8 和 10 中任一项所述的缓冲体液增容剂溶液，其中所述溶液是血液替代物。

34. 如权利要求 1 至 8 和 10 中任一项所述的缓冲体液增容剂溶液，其中所述溶液是血管外体液替代物。

35. 如权利要求 34 所述的缓冲体液增容剂溶液，其中所述溶液是腹膜液替代物。

36. 如权利要求 1 至 8 和 10 中任一项所述的缓冲体液增容剂溶液的浓缩原液。

37. 如权利要求 36 所述的缓冲体液增容剂溶液的浓缩原液，其中将所述原液浓缩 1 ～ 50 倍。

38. 如权利要求 37 所述的缓冲体液增容剂溶液的浓缩原液，其中将所述原液浓缩 5 ～ 20 倍。

含有 N- 取代的氨基磺酸缓冲剂的体液增容剂

发明领域

[0001] 总的来说，本发明涉及体液增容剂 (body fluid expander)。具体而言，本发明涉及用于增容、维持或代替血液或血管外体液容量的生理液体介质。预计本发明将用于各种医疗应用中，包括静脉内和血管外（例如腹膜）灌注过程。

[0002] 发明背景

[0003] 血容量丢失也被称为血容量不足，其可由许多原因引起，例如包括物理损伤、手术、内出血或烧伤。摄入例如利尿剂和血管扩张剂的药物也可引起血容量不足。

[0004] 血容量不足所导致的明显的血容量丢失，如不及时治疗可能致命。这样的血液丢失会导致血压下降，以及对重要器官和组织必要供血（以及伴随的氧）的减少。随后的血容量不足可导致缺血、多器官衰竭、肾损害、脑损害，最终导致死亡。

[0005] 在发生失血后，通过向对象灌注晶体液或胶态液治疗血容量不足，这些晶体液或胶态液用作丢失血液的替代。这些液体替代物用于增加血容量，引起再水合和使血压恢复正常。

[0006] 目前已知的血液替代物或血容量增容剂的实例包括乳酸盐林格溶液、哈特曼溶液、HES（羟乙基淀粉）和等渗盐水（氯化钠）(Chiara 等，CritCare Med. 2003,31(7)：1915-22 ;Rhee 等，J. Trauma. 1998,44(2) :313-319 ;Jernigan 等，Am Surg. 2004,70(12)：1094-8 ;Via 等，J. Trauma. 2001,50 :1076-82)。

[0007] 尽管目前的血容量增容剂有恢复血容量的能力，但是他们不能有效地防止严重的且经常是致命的症状，即已知的再灌注损伤。这种现象可在患有严重血容量不足的对象中观察到，并且表现为对重要器官（例如肺、肾、肝等）的损害。通常在以血容量增容剂灌注后的 1 ～ 3 天可以观察到再灌注损伤的不利作用。

[0008] 发明概述

[0009] 申请人发现了开发另外的溶液的需要，该溶液能补偿由于血容量不足和重度烧伤导致的失血以及组织液和细胞外液损失。还需要开发有效防止和降低血容量不足对象再灌注损伤几率的治疗方法。

[0010] 除上述需要之外，还需要维持足够的血管外、组织液容量。此液体浸泡和围绕着细胞，其对于维持组织和器官的平衡和功能是重要的，尤其重要的是用于向细胞传递物质、移除代谢废物及促进细胞间通讯。

[0011] 本发明也解决了补液治疗的显著的和重要的问题，即导致身体器官内的水肿症状从而简单地增加了再灌注损伤发生率的问题。本发明也关注于提供一种生理平衡液，该生理平衡液在各方面（但是最重要的是在张度和渗透压方面）与组织液组合物符合，并将促进在血管外区域和与淋巴系统相连的组织相之间的更加自然的液体交换，从而防止在周围组织中出现水肿。

[0012] 在一方面，本发明提供了含有浓度比为 5 ： 1 ～ 1 ： 1 的钙离子和镁离子的非无机磷酸盐缓冲体液增容剂溶液，即提供了一种含缓冲剂的体液增容剂溶液，其中所述的缓冲剂是非无机磷酸盐缓冲剂的生理可接受的缓冲剂。

[0013] 在另一方面，本发明提供了包含非磷酸盐缓冲剂的体液增容剂溶液，所述非磷酸盐缓冲剂选自生理可接受的 N- 取代的氨基磺酸缓冲剂，特别是那些在 20℃下在水溶液中 pKa 值为 7.1 ～ 7.5 的 N- 取代的氨基磺酸缓冲剂，最优选的选自 N- 三（羟甲基）甲基 -2- 氨基乙磺酸 (TES)、3-(N- 吗啉基）丙磺酸 (MOPS)、N,N- 双 (2- 羟乙基）-2- 氨基乙磺酸 (BES) 及其组合。

[0014] 在又一方面，本发明提供了一种体液增容剂溶液，其包含浓度比为 5 ： 1 ～ 1 ： 1 的钙离子和镁离子，且还包含非磷酸盐缓冲剂，所述非磷酸盐缓冲剂选自生理可接受的 N- 取代的氨基磺酸缓冲剂，特别是那些在 20℃下在水溶液中 pKa 值为 7.1 ～ 7.5 的 N- 取代的氨基磺酸缓冲剂，最优选的选自 TES、MOPS、BES 及其组合。

[0015] 在一个实施方案中，非磷酸盐缓冲剂的浓度为 1 ～ 12 毫摩尔 / 升，优选为约 5 毫摩尔 / 升。

[0016] 本发明体液增容剂溶液优选包含钙离子和镁离子，且两者浓度比为 4 ： 1 ～ 2 ： 1，更优选为约 3 ： 1。

[0017] 本发明体液增容剂溶液优选包含 0.1 ～ 2.5 毫摩尔 / 升的钙离子和 / 或 0.4 ～ 25 毫摩尔 / 升的镁离子。镁离子浓度越高，接近 25 毫摩尔 / 升，则可用于改性用于心脏麻痹的溶液，但是对于用作体液增容剂溶液的常规用途，推荐如下所述的浓度。

[0018] 在一个实施方案中，体液增容剂溶液中钙离子的浓度为 1.0 ～ 2.5 毫摩尔 / 升，优选为从 1.1 ～ 1.4 毫摩尔 / 升，更优选为 1.2 ～ 1.3 毫摩尔 / 升，再更优选为约 1.25 毫摩尔 / 升。

[0019] 在本发明的体液增容剂溶液中，镁离子浓度优选为 0.2 ～ 0.6 毫摩尔 / 升，更优选为 0.3 ～ 0.5 毫摩尔 / 升，再更优选为约 0.45 毫摩尔 / 升。

[0020] 在一个实施方案中，钙离子和镁离子的浓度分别约为 1.25 毫摩尔 / 升和 0.45 毫摩尔 / 升。

[0021] 在一个实施方案中，本发明的体液增容剂是用于增容和 / 或代替血容量的血液替代物。在又一另外的实施方案中，本发明体液增容剂是血管外液替代物，例如组织液替代物。

[0022] 除上述之外，本发明也包括在本文中定义的溶液的浓缩的形式。例如，包括 1 ～ 50 倍浓缩物，优选包括 5 ～ 20 倍浓缩物。为制备 1 倍（即工作浓度）的溶液，5 倍、10 倍、20 倍和 50 倍浓缩物分别需要将 4、9、19、49 体积的水加入 1 体积的浓缩物中，每升稀释的 1 倍溶液还需加入 2.1 克碳酸氢钠。

[0023] 在另一方面，本发明提供本文所定义的溶液，以用作药物和血容量增容剂。

[0024] 在另一方面，本发明提供本文所定义的溶液，以用于治疗血容量不足和 / 或烧伤的，以及用于防止和 / 或改善再灌注损伤的本文所定义的溶液。

[0025] 在又一另外的方面，本发明提供的本文所定义的溶液用于 :(a) 补液治疗，(b) 正在接受外科手术的对象的体腔（例如腹腔或胸腔）灌注，和 / 或 (c) 将治疗剂、测试剂和 / 或增效剂血管内或血管外输送至对象。

[0026] 本发明也包括本文所定义的溶液用于制备药物和血容量增容剂的用途，所述药物和血容量增容剂例如用于治疗血容量不足或用于治疗烧伤对象的细胞外液和组织液的丢失。

[0027] 本发明也提供了本文所定义的溶液用于制备用于以下的医药的用途：(a) 治疗烧伤对象组织液的丢失，(b) 治疗对象中的呼吸性和 / 或代谢性酸中毒，(c) 急性肾衰竭或急性毒性症状对象在腹膜透析期间的腹腔再灌注，或 (d) 防止和 / 或改善再灌注损伤。

[0028] 在又一另外的方面，本发明包括将本发明溶液用于向对象输送治疗剂、测试剂和 / 或增效剂的用途，所述治疗剂、测试剂和 / 或增效剂例如生物试剂，例如至少一种肝细胞、多肽或源自基因的蛋白。

[0029] 在优选的实施方案中，所述输送通过血管内、腹膜内、真皮内、口服、肌肉内、局部途径给药而实现。供选地，所述输送通过给药至对象的淋巴系统而实现。

[0030] 在又一另外的方面，本发明包括治疗血容量不足和 / 或烧伤的方法以及防止和 / 或改善再灌注损伤的方法，这些方法包括给予需要此方法治疗的对象以有效量的本文所定义的溶液。

[0031] 在优选的实施方案中，血容量不足起因于脱水和 / 或烧伤和 / 或出血。在另一实施方案中，血容量不足是药物所引起的。

[0032] 在另一方面，本发明提供了在对象进行外科手术期间原位维持组织和 / 或器官生理自体调节的方法，该方法包括以本文所定义的溶液灌注所述组织和 / 或器官。

[0033] 在上述方法的一个实施方案中，将溶液的温度保持在 4 ～ 20℃之间，从而在以所述溶液灌注时将所述组织和 / 器官维持在低体温状态。

[0034] 在上述方法的又一另外的实施方案中，实施外科手术从供体对象中取出所述组织和 / 器官以随后将其移植至受体对象。

[0035] 在又一另外的方面，本发明包括使用本发明溶液将治疗剂、测试剂和 / 或增效剂输送至对象的方法。在优选的实施方案中，所述试剂是生物试剂，例如至少一种干细胞、多肽或源于基因的蛋白。

[0036] 在优选的实施方案中，所述输送通过血管内、腹膜内、真皮内、口服、肌肉内、局部途径给药而实现。供选地，所述输送通过给药至对象的淋巴系统而实现。

[0037] 在另一方面，本发明提供了本文所定义的溶液用于以下的用途：(a) 急性肾衰竭或急性毒性症状对象的腹腔透析；和 / 或 (b) 正在进行外科手术对象的腹部和 / 或胸部器官的冲洗。

[0038] 在又一另外的方面，本发明包括用作药物的基本不含无机磷酸盐的缓冲溶液，特别是也基本不含柠檬酸盐和乳酸盐缓冲剂中至少一种的缓冲溶液。

[0039] 附图简述

[0040] 图 1：评价大鼠随时间变化的生存率，且该生存率作为所用复苏溶液的函数。对大鼠进行一系列取血。将大鼠按如下分成三个实验处理组：(1) 以生理盐水代替血液；(2) 以本发明的优选溶液代替血液，所述溶液在本文中被称为 RS-I 溶液或 RS-I；及 (3) 失血未代替。监测各组中大鼠的生存率并将数据列于图 1 中。

[0041] 图 2：上述图 1 所定义的研究组中每组的采血总量的比较。在下述实施例 4 中说明了从大鼠上的采血方法。

[0042] 图 3：在图 1 中所定义的各研究组中大鼠呼吸率随时间变化的评价。

[0043] 图 4：以 RS-I 灌注时，不同时期的猪血液性质的评价。对猪每天灌注 1.0 升 RS-I 溶液，进行 3 天，并在各个时间点采取血样。测试血样，尤其是完全血细胞计数、血清化学测

定、电解质、葡萄糖、乳酸盐、渗透压、血清酶（血清谷氨酸草酰乙酸转氨酶 / 天冬氨酸氨基转移酶 [SGOT/AST]、血清谷丙转氨酶 / 丙氨酸氨基转移酶 [SGPT/ALT]、肌酸激酶 [CK] 及乳酸脱氢酶 [LDH])、凝血因子和纤维蛋白原水平。也测量白介素 -6(IL-6) 和肿瘤坏死因子 -α (TNF-α)。

[0044] 图 5(a-g) :在血量正常的猪模型中血清电解质水平的分析。

[0045] 图 6(a-d) :在血量正常的猪模型中血清代谢物水平的分析。

[0046] 图 7(a-d) :在血量正常的猪模型中血清酶水平的分析。

[0047] 图 8(a-e) :在血量正常的猪模型中血细胞性质的分析。

[0048] 图 9(a-d) :在血量正常的猪模型中凝血参数的分析。

[0049] 图 10 :在正常体温下灌注前和灌注后 6 小时，比较在冷冻环境 (CS) 组中和温暖环境 (WS) 组中的猪肾的 ADP ： ATP（腺苷二磷酸：腺苷三磷酸）比。

[0050] 图 11 :在以自体血、RS-I 液体和乳酸盐林格生理盐水复苏后，平均动脉压的改变。

[0051] 图 12 :在以自体血、RS-I 液体和乳酸盐林格生理盐水复苏后的活化部分凝血激酶时间 (aPTT)。

[0052] 发明详述

[0053] 本文所使用的术语“体液增容剂”或“体液增容剂溶液”或“体液替代物”表示一种生理液体溶液，其意图用于代替或扩展体液、和 / 或维持足够的体液容量。本发明溶液意图用于扩展、代替或维持的体液包括血管内液（例如血液组分，例如血浆）、或供选的血管外液（例如组织液）。

[0054] 术语“体液增容剂”和“体液增容剂溶液”也包括生理液体介质，该生理液体介质意图用作一种媒介，以将治疗剂、测试剂和 / 或增效剂输送至需要所述试剂的对象的体内，或输送至测试试剂的环境中，例如非人类对象。

[0055] 在适当时，术语“对象”包括人类对象和非人类对象，所述非人类动物对象例如哺乳动物对象，例如在实验研究中的合适的啮齿类动物、猪、猴和狗等，及在兽医业务中出现的牛、马等。

[0056] 例如“非磷酸盐缓冲剂”和“基本不含磷酸盐”的术语意图包括基本不含无机磷酸盐离子的液体实施方案。

[0057] 本文所使用的术语“血容量增容剂”或“血容量增容剂溶液”或“血液替代物”表示一种生理液体溶液，其意图用于代替、扩展或维持血容量。因此这些溶液可用于代替血容量不足所致的血容量的丢失。

[0058] 本文所使用的术语“血容量不足”表示血容量减少的状态，或更具体地表示血浆容量减少的状态。引起血容量不足的常见原因包括脱水、烧伤、出血（例如大出血）或摄入了例如利尿药和血管扩张剂的某些药物。

[0059] 本文所使用的术语“再灌注损伤”表示在血容量不足后以常规的血容量增容剂灌注所引起的身体重要器官的损伤。

[0060] 本发明源于发明人这样的认识 :常规的血容量增容剂对维持细胞、组织和器官存活和活力是不利的，并因此能导致发生再灌注损伤。

[0061] 部分来说，本发明源于这样的认识 :血容量增容剂（以及一般的生理介质）组合物应该基于对围绕着每个细胞的间质凝胶相中离子种类的活度系数的具体的认知。这些活度

系数可通过计算得出，并可根据这些计算设计本发明的溶液。

[0062] 过量的磷酸根离子对被灌注的细胞、组织和器官的活力和功能完整性是不利的，基于这样的认识，本发明溶液使用了非磷酸盐缓冲剂。磷酸根离子抑制糖酵解、氧化磷酸化 (Berman&Sanders ;Circul. Res. ,1955 ;3,559-563)、肌酸激酶 (Hall&DeLuca ;Adv. Exp. Med. Biol. 1986 ;194,71-82) 以及涉及清除氧自由基的酶 (De Frietas&Valentine ; Biochemistry 1984 ;23 :2079)。这些酶对诱导在细胞水平上的凋亡变化、最终导致受损或异常细胞、组织和器官系统的坏死（即死亡）是重要的。

[0063] 本质上，常规的磷酸缓冲溶液在 pH 高于 7.2 时不稳定，使用非磷酸盐缓冲液避免了常规的磷酸盐缓冲液的低效率。特别地，在常规溶液中的无机磷酸根离子随着时间会以不可溶的磷酸钙形式沉淀 (Pedersen, MD Thesis, University of Arhus, Denmark. Publ. S A Moller Christensen A/S. 1973 ;41-51)。这个问题在使用溶液的温度范围变化时更加突出，因此这些常规的缓冲溶液在临床应用上受到了限制。另外，许多其他的非磷酸盐缓冲剂，例如柠檬酸盐、某些氨基酸组合和乳酸盐溶液不同于作用于哺乳类动物的天然的或生理 pH 缓冲剂，并且已发现这些非磷酸盐缓冲剂在离体（见实施例 6）和体内（见实施例 8）正常体温条件下不能有效地保存器官功能。相反地，当本发明溶液用作体液增容剂时，其具有改善的性能，这是因为其能利用在所有的哺乳动物中发现的被称为 pCO_2/ 碳酸氢盐系统的天然缓冲剂系统。

[0064] 在本文中说明了这样的体液增容剂溶液，该溶液由于其组分能补偿血容量不足对象的血液损失或与严重烧伤有关的组织液和细胞外液的损失。本发明的体液增容剂溶液提供了能模拟组织液的离子、底物和生物物理环境的生理液体介质（见例如下述表 II）。因此，预计这些溶液将用作通用的灌注和保存介质。离子的浓度取决于在围绕着哺乳动物细胞的间质凝胶相中的每种离子的活度系数。这与许多基于其总血清浓度的常规的介质相反。

[0065] 在美国专利 6,946,241（将该专利内容引入本文作为参考）中，本发明发明人说明了非磷酸盐液细胞培养基。已认识到有效的血容量增容剂溶液和体液增容剂溶液一般可基于这些培养基的组分。预计本发明溶液将不仅可补偿与血容量不足有关的失血，而且也将减少或防止再灌注损伤的发生。也预计到本文所定义的溶液将可应用于原位维持在各种外科手术期间暴露的器官和组织。

[0066] 本发明体液增容剂溶液优选不含有血清和 / 或血清组分。因此该溶液不含有源于动物的血清蛋白和其他污染物，这样就不存在不明确的外来的血清蛋白。不含有血清的溶液与常规的基于血清的溶液相比，其优势在于“化学”上更容易定义。另外，感染性疾病和克雅氏病 (CJD) 的传播与在体内使用了血清和源于血清的组分有关，不含有这些物质避免了对此可能的传播的忧虑。

[0067] 由于上述原因，本发明体液增容剂（特别是那些准备作为人用的溶液）也优选不含有外来的或源于动物的抗原、热原、蛋白等。然而，在某些情况下，例如在透析的情况下，易感的对象可能需要存在特定的肽或源自蛋白的组分以作为在肾透析或腹膜透析期间发现的蛋白丢失的补偿方法。本发明溶液可提供用于向对象输送所述组分的有效的载体。

[0068] 在离体组织和器官灌注试验中使用与本发明溶液相似的溶液期间获得的重大发现是 :本发明溶液也可利用存在于所有哺乳动物中的天然的 pH 缓冲机理，即在血液中二

氧化碳分压 [pCO_2] 和碳酸氢根离子浓度的自我调节，甚至在不存在红血细胞时也是如此。相关的解离常数 [pK_a] 由血红蛋白的咪唑 / 组氨酸成分提供，其可用本发明所用的合适的缓冲剂模拟，所用的最优选的缓冲剂是 BES 缓冲剂，由于在 20℃下具有适用的 pK_a(7.15) 和 $-\Delta pK/℃$ (0.016)，其在 10 ～ 37℃的温度范围内自动地将 RS-I 溶液的 pH 维持在 7.18-7.45 之间，因此其特别适合用作本发明的溶液的缓冲剂，从而用于在低体温和正常体温生理条件下的哺乳动物。

[0069] 如上所述，本发明体液增容剂采用并利用了天然生理缓冲系统的优势。优选的是，此缓冲系统采用了 $NaHCO_3/pCO_2$（碳酸氢钠 / 溶解的 CO_2）与两性离子古德缓冲剂 (Good′ s buffer)——BES(N,N- 双 [2- 羟乙基]-2- 氨基 - 乙磺酸 (Good 等，Biochemistry 1966 ;5 : 467-477)，将其引入本文作为参考）的组合的形式，该缓冲系统借助于其在 10 ～ 37℃的温度范围下的理想的 pK_a 发挥作用而提供稳定的 pH，所述稳定的 pH 对于细胞的保护是必要的要素。在长期研究中 BES 对培养的哺乳动物细胞显示为非毒性，并且其表现出与钙离子或镁离子的可以忽略的结合，从而避免了二价离子沉淀的潜在危害，而该沉淀在使用常规的碳酸氢盐 / 磷酸盐或二价磷酸盐缓冲剂溶液时出现。确实的是，试验显示，本发明溶液的 10 倍浓缩物的保存期（存储于 3 ～ 8℃）超过 14 个月。作为 BES 的替代物，也可使用吗啉基丙磺酸 (MOPS) 或 N- 三 -（羟甲基）甲基 -2- 氨基乙磺酸 (TES)。另外，也可使用一种或多种 TES、BES 和 MOPS 的组合。

[0070] 也可根据具体的需要选择其他的生理可接受的 N- 取代的氨基磺酸缓冲剂，下表列出了可能的候选缓冲剂以及其在 20℃下在水溶液中的 pK_a。

[0071]

N- 取代的氨基磺酸缓冲剂	pK_a(20℃时）	$-\Delta pK_a/℃$
MES :2-(N- 吗啉基）乙磺酸	6.15	0.011
ADA :N-(2- 乙酰胺基）亚氨基二乙酸	6.62	0.011
ACES :N-2-（乙酰胺基）-2- 氨基乙磺酸	6.88	0.02
BICINE :N,N- 双 (2- 羟乙基）甘氨酸	8.35	0.018
BES :N,N- 双 (2- 羟乙基）-2- 氨基乙磺酸	7.15	0.016
HEPES :N-(2- 羟乙基）哌嗪 -N’-(2- 乙磺酸）	7.55	0.014
MOPS :3-(N- 吗啉基）丙磺酸	7.20	0.011
PIPES :哌嗪 -N,N’- 双 (2- 乙磺酸）	6.80	0.009
TES :N- 三（羟甲基）甲基 -2- 氨基乙磺酸	7.50	0.020
TRIS :三（羟甲基）氨基甲烷	8.3	0.031
TRICINE :N- 三（羟甲基）甲基甘氨酸	8.15	0.021

[0072] 供选地，非磷酸盐缓冲剂（优选为 TES、MOPS 或 BES 或其组合）的浓度为 1 ～ 12 毫摩尔 / 升，优选为 3 ～ 7 毫摩尔 / 升，更优选为 4 ～ 6 毫摩尔 / 升，再更优选为约 5 毫摩尔 / 升。供选地，碳酸氢根离子的浓度为 21 ～ 35 毫摩尔 / 升，优选为 23 ～ 26 毫摩尔 / 升，更优选为约 25 毫摩尔 / 升。

[0073] 在本发明优选的实施方案中，所用的非磷酸盐缓冲系统由于其独特的 pK_a 范围，使得其能在 4 ～ 38℃的温度范围内在 7.05 ～ 7.5 的 pH 之间自动调节本发明溶液的 pH。本发明的这个特征不同于已有的常规的缓冲系统，其 pH 调节过程不需要任何另外的干预，在 10 ～ 38℃的温度范围内得到 7.13 ～ 7.5±5 的 pH 值。优选的，本发明溶液在约 37.4℃下的 pH 约为 7.46。优选的是，在将溶液施用至需要该溶液的对象后，上述 pH 值在体内会得以维持。

[0074] 如本文所述，本发明溶液可用于血管内灌注和血管外灌注。该溶液也可用于在正常体温条件下灌注离体的动物和人类器官。当将此溶液用于灌注离体器官时，优选将此溶液以碳氧 (carbogen) 气体 (95％的氧和 5％的二氧化碳）充气。

[0075] 本发明体液增容剂溶液也可包含一种或更多、两种或更多、三种或更多、四种或更多、五种或更多、六种或更多、七种或更多、八种或更多、九种或更多、十种或更多、十一种或更多、十二种或更多、十三种或更多、十四种或更多、或全部的下列组分的任何组合 :100 ～ 150（优选约 135）毫摩尔 / 升钠离子、2.5 ～ 6.2（优选约 5）毫摩尔 / 升钾离子、0.1 ～ 2.5（优选约 1.25）毫摩尔 / 升钙离子、0.4 ～ 25.0（优选约 0.45）毫摩尔 / 升镁离子、96 ～ 126（优选约 118）毫摩尔 / 升氯离子、2 ～ 11（优选约 10）毫摩尔 / 升葡萄糖（优选为 D- 葡萄糖）、50 ～ 150（优选约 110）微摩尔 / 升甘油、7 ～ 15（优选约 10）微摩尔 / 升胆碱、5 ～ 400（优选约 300）微摩尔 / 升谷氨酸盐（优选为 L- 谷氨酸盐）、5 ～ 200（优选约 20）微摩尔 / 升天冬氨酸盐（优选为 L- 天冬氨酸盐）、100 ～ 2000（优选约 400）微摩尔 / 升谷氨酰胺（优选为 L- 谷氨酰胺）、15 ～ 215（优选约 60）微摩尔 / 升焦谷氨酸盐、20 ～ 200（优选约 100）微摩尔 / 升精氨酸（优选为 L- 精氨酸）、1 ～ 120（优选约 40）纳摩尔 / 升硫胺素焦磷酸盐 (TPP)、40 ～ 70（优选约 50）微摩尔 / 升 D- 或 DL 或 L- 肉碱（优选为 L- 肉碱）、及 5 ～ 200（优选约 28）mI.U./L 猪或人胰岛素（优选为人胰岛素）。

[0076] 当存在氯离子时，其以钠盐、钾盐、钙盐和镁盐提供。优选地，当存在胆碱时，其以盐酸盐形式提供胆碱。

[0077] 本发明溶液包含许多维持组织和器官代谢平衡的底物。已表明，通过包含生理水平的胰岛素，葡萄糖和甘油能够满足离体组织和器官对能量的需要，即使在它们不是所考虑器官的优选的底物时也是如此。除了代谢能力外，甘油和葡萄糖也具有自由基清除性质和膜稳定性质，已表明这对于维持组织和器官的生理活力非常重要。

[0078] 如上所述，本发明溶液也可包含天冬氨酸盐和谷氨酸盐，以通过补充三羧酸 (TCA) 循环中间体而增强氧化性代谢，从而维持高能磷酸的水平，即使在缺血性损伤期间也能维持高能磷酸的水平。相似地，谷氨酸盐也涉及维持细胞内氧化 - 还原电位。预计通过优化天冬氨酸盐 - 苹果酸盐和甘油磷酸穿梭，细胞将维持最佳的 NAD/NADH（烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 / 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸）平衡，从而维持腺苷酸水平。另外，谷氨酸盐和谷氨酰胺可用作中间代谢产物以形成焦谷氨酸盐，随后参与 γ - 谷氨酰循环以合成谷胱甘肽，谷胱甘肽是一种防止产生毒性氧自由基的有益的物质，而氧自由基的产生与哺乳动物组织

和器官在移植之前的供体器官保存期间和随后的血容量替换治疗期间的再灌注损伤有关。

[0079] 硫胺素在 α－酮酸的氧化中（通过硫胺素辅羧酶的作用）发挥着重要的作用，并且其防止了丙酮酸盐和毒性丙酮醛 (pyruvate aldehyde) 的积累，从而将细胞凋亡和伴随的组织和有关器官的坏死降至最低。

[0080] 在 TCA 循环中，本发明优选的溶液所包含的硫胺素焦磷酸盐 (TPP) 是 α－酮戊二酸代谢的辅助因子，该代谢通过氧化脱羧形成琥珀酰辅酶 A 或通过还原氨化形成谷氨酸盐。大体上，TPP 涉及许多相关的生化途径，特别是那些磷酸戊糖途径和糖酵解途径。硫胺素可以以硫胺素焦磷酸盐、硫胺素二磷酸盐或硫胺素二酰胺形式使用。本发明优选的溶液包含氯化硫胺素焦磷酸盐形式的硫胺素。

[0081] 另外，由于磷酸根离子容易透析过血液透析膜 (MW-175Dalton)，所以为了防止磷酸根离子的耗尽和钙化，本发明溶液的配方中包含硫胺素焦磷酸盐对于腹膜透析对象将是必须的，并且预先通过静脉内或经血液透析溶液或腹膜透析溶液给予硫胺素焦磷酸盐以补充血浆磷酸盐水平和 / 或焦磷酸盐水平。

[0082] 已报道类维生素类肉碱在提高心脏功能方面具有多重功效，其不是通过简单的优化氧化代谢而提高心脏功能，而是通过例如促进错配底物的利用和另外提高冠状动脉血流量提高心脏功能。与 D 或 DL 异构体相比 L- 肉碱是优选的，这是因为其对乙酰辅酶 A/ 游离脂肪酸代谢没有抑制作用。优选的类维生素组分包含 50 微摩尔 / 升的 [-]- β - 羟基 - γ - 三甲基氨基 - 丁酸盐酸盐 (L- 肉碱）。在本发明中，优选包含肉碱的 L- 异构体，意图优化将长链脂肪酸从细胞液转运入线粒体基质至 β - 氧化位点，从而通过刺激从肉碱乙酰基转移酶合成乙酰肉碱，而缓冲线粒体内乙酰基 CoA/CoA（其中 CoA 是辅酶 A）比例。此乙酰基 CoA/CoA 比例的降低将导致乙酰肉碱从线粒体中流出，并伴随着对丙酮酸盐脱氢酶的刺激及脂肪酸对葡萄糖氧化抑制作用的逆转。最终，用作能量源的游离脂肪酸利用的最优化对于所有类型的细胞而言是重要的，但是该最优化必须通过最优化涉及糖酵解的酶的功能以保护碳水化合物（葡萄糖）的利用而完成，所述酶为例如己糖激酶、葡糖激酶、磷酸果糖激酶。

[0083] 如上所述，本发明溶液也可包含胰岛素。使用人重组胰岛素（例如在大肠杆菌或酿酒酵母中表达的胰岛素）不仅避免了在受试细胞 / 组织 / 器官中的抗原或病毒污染（使用源自其他哺乳动物或动物园的胰岛素则可能会导致污染），而且导致了胰岛素分子与人胰岛素受体结构更好地结合，即，将使受体特异性最佳，以维持胰岛素在细胞过程中的许多相关的功能。

[0084] 大体上，胰岛素的生物作用不仅简单地与其调节碳水化合物代谢和促进循环血糖运送至细胞中的能力有关，而且与其引起以下现象的能力有关：(i) 增强细胞内葡糖激酶的活性和促进氨基酸并入蛋白中，(ii) 促进 DAN（脱氧核糖核酸）翻译蛋白，(iii) 增加脂质合成及 (iv) 促进钠、钾和无机磷酸盐的跨细胞膜转运。

[0085] 在本发明优选的实施方案中，使用了正常的人血清水平的胰岛素。相反地，常规的已知的含有胰岛素的灌注液配制剂已利用了非天然水平的这种激素（例如 10 ～ 50×10^{6}mIU/L；比本发明溶液中的胰岛素浓度高约 100 万倍）。其原因与这样的事实有关，即在这样的浓度下仅有少量胰岛素以单个分子的形式存在。剩下的胰岛素以大的团聚物形式存在，这不能刺激胰岛素受体，因此是生物无效的。本发明溶液通过在配制期间酸化胰岛素以防止团聚的形成，因此使得胰岛素的单个活性的分子可存在于 pH 为 7.3±0.2 的溶液

中，从而获得正常的人血清水平的胰岛素。

[0086] 本发明溶液中的离子浓度取决于（考虑到）各种离子的活度系数，而不是其简单的总血清浓度。例如，应该将与血清结合的钙离子和镁离子和实际上是游离的离子化水平的这些离子区别开来。镁离子在许多关键的细胞反应中是重要的，并且据报道细胞外的镁离子会刺激线粒体呼吸活性并具有调节钙离子快速内流和钾离子快速外流的作用。同样地，足够浓度的钙离子对维持循环中存在的游离的钙离子水平是重要的。

[0087] 本发明的溶液的离子电导率优选与人血清的离子电导率相当，即皆为 $12.0\pm0.3mS\ cm^{-1}$，如此则维持细胞膜的离子化状态以及酶部分的活性。

[0088] 因此依上所述，本发明溶液与人血清等渗（约 290mOsmole/L）并且不需要包含血浆增容剂，这可通过这样的事实证明：在离体大鼠心脏和内脏神经肌肉制备物的长期低温灌注期间，水合作用中仅出现轻微（约 8％）的变化。而这种现象又可通过这样的事实解释：细胞膜连续地处于 99％的凝胶间质相，如此提供了天然的胶质缓冲以超出跨细胞膜 Donnan 离子平衡交换。渗透压主要由钠离子及其伴随的阴离子提供，仅有小部分（约 0.5％）是由血浆蛋白提供。包含在此溶液中的血清水平的代谢物——甘油也有助于在围绕着每个细胞的组织液的界面处的渗透压缓冲，特别是涉及跨毛细管网络。

[0089] 由于溶胀试剂与钙离子和镁离子的亲和性，包含溶胀试剂的会影响实用性，使得需先在新鲜溶液中透析以便于不会干扰阳离子组分。由于易于机械变性，多肽增容剂易变的性质使得其不能使用。不幸的是，虽然这些胶态增容剂基本无毒性，就以下方面而言，其使用属于治疗不当，例如 (1) 增加的粘度升高了围绕着细胞的“未搅动”层的稠度，从而阻止的代谢物的扩散，(2) 改变了表面膜的生物电位，从而干扰了细胞代谢和受体活性，(3) 蛋白质增容剂的抗原性，(4) 红血细胞 (RBC) 的凝集和溶血及 (5) 阻断了微脉管系统以及缺血。

[0090] 预计本发明溶液可普遍用作基础组合物，取决于具体的医疗应用，可向该组合物中加入另外的组分。例如，预计可向本发明溶液中补充例如红细胞 (RBC)、血浆和 / 或血小板以制备人工血液。所述的血液组分可以是天然的或人造的。因此，可以按照需要向该基础组合物中加入另外的化学品。因此预计本发明溶液将以基础组合物形式广泛应用于需要体液增容、替换、维持和 / 或补充等的医疗应用，所述体液含有缓冲剂，该缓冲剂的 pK_a 与血红蛋白 (pK_a:7.0) 的咪唑 / 组氨酸成分的 pK_a 非常相近，并且表现也非常相似，如此避免了使用柠檬酸盐 (pK_a:3.09)、乳酸盐 (pK_a:3.85) 或类似地任何 pK_a 不合适的缓冲剂，也避免了使用无机磷酸根离子从而避免了已报道过的其对生化过程和生理过程的不利作用。

[0091] 本发明溶液可将应用于治疗血容量不足的方法中和治疗严重烧伤对象组织液和细胞外液丢失的方法中。另外，本发明溶液可用于防止和 / 或改善再灌注损伤的方法。因此本发明溶液可用作药物。为治疗血容量不足及防止 / 改善再灌注损伤，优选通过静脉途径系统地给予本发明溶液。在这种情况下，采用常规的临床过程将对象安全地置于斜卧位，并临床上准备经静脉给予具体的药物。在控制、监测的条件下将所述药物输送至对象，直至治疗完成。

[0092] 但是，除了替换、维持或增容血容量外，预计本发明溶液也可有其他的用途，包括：在外科手术期间原位维持、保存和冲洗组织和器官、急性肾衰竭和急性毒性症状对象的腹腔灌注以及在从供体对象中取出组织或器官的外科手术期间原位保存供体组织和器官。因

此，除通过血管内途径给药外，本发明溶液也可通过其他途径给药，例如使用腹膜内、真皮内、肌肉内、局部或口服途径。对于患有急性肾衰竭或急性中毒的对象，需将病人麻醉以进行外科手术，其中会将插管插入腹腔并固定，从而保证在正常温度下以溶液连续冲洗。一旦对象的血液化学分析达到正常状态，则在外科手术条件下除去腹腔插管。

[0093] 为治疗烧伤，优选通过局部施用将溶液局部地给至烧伤处。但除此之外，严重烧伤带来的脱水可通过系统地给予该溶液来处理。在这种情况下，采用常规的临床过程将对象安全地置于侧卧体位，并临床上准备经静脉给予具体的药物。根据烧伤的位置和等级确定给予该溶液的位置，并基于其他的感染风险确定所需要的另外的治疗剂。此治疗处理方法将导致溶液在外部、在血管外流动，从而除去任何毒性或感染性的动物分泌物的累积，因此需要连续监测外科敷料。在优选的实施方案中，本发明的方法、溶液和药物用于治疗人类和非人类哺乳动物对象，例如人。

[0094] 如上所述，预计在本文中说明的溶液的一个应用是，在将器官从供体对象中取出之前、期间和之后用于保存该供体器官。在这一点上本发明溶液的使用涉及例如全身灌注（体外膜肺氧合 (Extra Corporeal MembraneOxygenation[ECMO]) 方法）从供体尸体中取出的供体肾、心、肝等，然后通过在正常温度下再灌注离体器官。初步研究（本文未显示）已经表明本文所述的 RS-I（见实施例）具有复苏低温保存的人尸体器官的能力，这使得这些器官能用于前临床药物生物评价试验，从而解决了药物不良反应的问题，据报道使用体外药物评价和在动物模型中的体内药物评价会出现药物不良反应。

[0095] 也预计到本发明溶液可用作介质以将试剂输送至需要该药剂的对象或测试该试剂的环境中，例如非人类对象。例如，本发明溶液可用作稀释剂以将药物、测试剂或增效剂输送至需要这些试剂的对象，或供选地将干细胞、多肽或源于基因的蛋白输送至需要这些试剂的对象。例如可通过将干细胞分散在本文定义的介质中，并当需要时将所得的混悬液直接输送至组织或器官，从而实现干细胞的输送。在此治疗方案下，对对象进行外科手术而取出衍生的干细胞类型，例如心肌细胞、肝细胞，然后将这些细胞分散在本发明的溶液中并预孵育 12 ～ 18 小时。使用当前的培养基技术进行干细胞进一步的增殖，随后在实施治疗之前将细胞再分散于溶液中并转运至处于低体温或亚低温状态的对象的床边。取决于源于干细胞的治疗的给药途径对对象进行局部或全身麻醉，例如对心肌细胞进行心肌内给药而进行局部麻醉，并且所述治疗的给药在正常体温下在良好的临床规范下进行。供选地，可通过将混悬剂给予至淋巴系统而实现输送。

[0096] 应该理解的是，当使用本发明溶液时可以应用本领域已知的给予血容量增容剂的一般方法。特别地，使用本领域技术人员可得的信息，可应用在特定的情况下（例如参照维持足够的血压和心血管功能）所需的调节给药水平的方法。

[0097] 还应该理解的是，在使用本发明溶液时，可以应用在外科手术期间用于原位浸泡和冲洗组织和器官以及体腔透析的本领域已知的标准灌注技术。

[0098] 本发明预计本发明溶液的特定的次级组分 (sub-component) 可以单独使用或组合使用。

实施例

[0099] 通过以下实施例说明了本发明具体的实施方案。提供这些实施例是用来说明本发

明，而在任何方面不应将其视为限制。

[0100] 实施例 1 ：RS-I 溶液的制备

[0101] 配制

[0102] 在以下的整个制备过程中，包括起始的搅拌过程和最终的稀释过程，均使用了不含内毒素的 Milli-Q 纯净水 (Millipore Corp，Milford，MA) 或同等的 ASTM 的 I 型水 (在 25℃下，电阻率不高于 18.0MΩ-cm)。本文使用的术语“纯净水”表示这种质量的水。

[0103] 制备 0.4 毫克 / 毫升的硫胺素焦磷酸盐 (辅羧酶)、Sigma C4655 在纯净水中的原液，并置于深色玻璃瓶中冷冻保存。制备 17.5 毫克 / 毫升的氯化胆碱在纯净水中的原液，并置于玻璃瓶中冷冻保存。制备 0.5I.U./ 毫升的人重组胰岛素 (Sigma I0259/I2643) 在纯净水中的原液，并以 0.12N 的盐酸酸化至 pH 2.4，置于玻璃瓶中冷冻保存。

[0104] 为制备 RS-I 溶液的 10 倍浓缩的溶液，向不锈钢容器装入 8 升纯净水，称量下列组分并按以下顺序在持续搅拌下加入 ：642.96 克氯化钠 (CFK0484)，37.28 克氯化钾 (BDH10198)、18.38 克二水合氯化钙 (BDS10117)、9.14 克六水合氯化镁 (BDH101494) 和 106.61 克 BES 游离酸 (Sigma B6266)、1.84 毫克硫胺素焦磷酸盐 (Sigma C9655)(使用 4.6 毫升原液)、0.9899 克 L- 肉碱 (Sigma C0238)、以 8 毫升原液形式的 0.1397 克氯化胆碱 (Sigma 7527)、1.013 克甘油 (Sigma G2025)、2.8I.U. 人重组胰岛素 (5 毫升原液)、0.310 克 L- 天冬氨酸钠盐 (Sigma A6683)、180.2 克无水葡萄糖 (Sigma G7021)、5.07 克 L- 谷氨酸钠盐 (Sigma G5889) 和 5.84 克 L- 谷氨酰胺 (Sigma G5763)。搅拌直至所有物质完全溶解，然后通过加入另外的纯净水至最终体积为 10 升。

[0105] 将 10 倍浓缩的 RS-I 溶液通过 Sartobran PH20 滤芯 /0.2 微米过滤器 (Sartorius Corp.USA) 无菌过滤，并装入 100 毫升的无菌的密封玻璃瓶中。

[0106] 此 RS-I 溶液浓度是所用溶液浓度的 10 倍，但是碳酸氢钠浓度维持不变。当需要时，可以以合适量的纯净水稀释 10 倍浓缩的 RS-I 溶液，并加入碳酸氢钠。

[0107] 为制备 1 倍浓缩的 RS-I 溶液，将 100 毫升上述 10 倍浓缩的 RS-I 溶液以 900 毫升纯净水稀释至 1 升，并加入 2.1 克不含有内毒素的碳酸氢钠 (Sigma S4019)，在使用前置于 8 ～ 10℃下保存。优选在保存该浓缩的溶液之前，不向其中加入碳酸氢钠，因为长期存储含有碳酸氢根离子的浓缩物会产生碳酸钙沉淀。短期存储的 1 倍的原液也可含有碳酸氢钠。

[0108] 为用作体液增容剂溶液，每升溶液可含有 100 毫克 / 升的氯霉素 (SigmaC3175) 或其他常规的抗生素或抗真菌剂以防止细菌感染的风险。

[0109] 当制备溶液时，应考虑以下因素 ：

[0110] 1). 溶液的制备方法，具体地，

[0111] 2). 使用上述纯净水制备所有原液以及本发明溶液的 10 倍浓缩液 ；

[0112] 3). 本发明无菌原液和浓缩液的制备方法不应该使用高压灭菌法和伽马辐射。例如辐射溶液以达到灭菌效果，如此将导致谷氨酰胺、葡萄糖、胰岛素和硫胺素焦磷酸盐组分的降解 ；

[0113] 4). 使用玻璃瓶保存所有的 10 倍浓缩的原液 ；

[0114] 5). 通过酸化至 pH2.4 以制备溶解的胰岛素，并在 -20℃下保存胰岛素组分和原液 ；

[0115] 6). 制备硫胺素焦磷酸盐，并在避光条件下在 -20℃下保存 TPP 原液 (原因见下

文）；

[0116] 7). 制备氯化胆碱溶液并在 -20℃下保存；

[0117] 8). 使用六水合（即 $6H_2O$）氯化镁。这是因为若使用了无水盐，则该无水盐会吸收水分，从而用于计算精确的镁离子含量的重量发生错误——就正确的镁离子和钙离子水平方面，这是克雷布斯液 (Krebs solution) 配制错误的常见原因。

[0118] 在此实施例中所说明的所有优选的组分使得这些组分能协同作用，从而产生了总体平衡的生理效果。

[0119] 制备说明

[0120] 1. 原液：制备长期存储的本发明溶液的各种浓度的原液，也就是 1 倍、10 倍和 20 倍的原液，但是优选的原液是使用纯净水的、无菌过滤入密封的 100 毫升的瓶中、并在 3 ～ 8℃下避光保存的 10 倍浓缩的原液。通过将 100 毫升 10 倍浓缩的原液加入 900 毫升纯净水中，再加入 2.1 克碳酸氢钠而复原，在 20℃下最终 pH 为 7.22±0.04，得到 1 倍的溶液。本发明 10 倍浓缩的无菌的原液的 pH 为 4.6±0.2，在存储长达 10 年后，仍然显示出是无菌的，并且没有沉淀。当在 3 ～ 8℃下避光保存时，本发明溶液的 10 倍的浓缩液的推荐的生产保质期为 14 个月。

[0121] 2. 辅羧酶：硫胺素焦磷酸盐酸盐（辅羧酶）的原液按如下制备：使用无内毒素的纯净水、无菌过滤入深色密封瓶中以防止硫胺素焦磷酸盐的光降解、并在配制本发明溶液的 10 倍的浓缩液之前冷冻保存，所得原液浓度为 18.4 克 / 毫升。

[0122] 3. 胰岛素：酸性 (pH 2.4) 的人重组胰岛素浓缩液按如下制备：使用无内毒素纯净水、无菌过滤入密封的瓶中、并在配制本发明溶液的浓缩液之前冷冻保存。

[0123] 4. 胆碱：氯化胆碱的原液按如下制备：使用无内毒素纯净水配制成浓度为 17.45 毫克 / 毫升，并在配制本发明溶液的浓缩液之前冷冻保存。

[0124] 5. 氯霉素不是本发明溶液的必须的组分，但是在存储期间或在存储瓶开启之后优选加入氯霉素，以确保溶液长期暴露于空气中是无菌的，并降低以本发明体液增容剂溶液治疗的对象的感染风险。

[0125] 实施例 2：RS-I 溶液的最终组成

[0126] 下表概括了用作体液增容剂的 RS-I 溶液的组成。

[0127] 表 1

[0128]

组分	浓度
NaCl	110.00 毫摩尔 / 升
KCl	5.00 毫摩尔 / 升
$CaCl_2$	1.25 毫摩尔 / 升
$MgCl_2$	0.45 毫摩尔 / 升
$NaHCO_3$	25.0 毫摩尔 / 升

BES	5.00 毫摩尔 / 升
D- 葡萄糖	10.00 毫摩尔 / 升
甘油	0.11 毫摩尔 / 升
L- 谷氨酸盐	0.30 毫摩尔 / 升
L- 谷氨酰胺	0.40 毫摩尔 / 升
L- 天冬氨酸盐	0.02 毫摩尔 / 升
L- 肉碱	0.05 毫摩尔 / 升
氯化胆碱	0.01 毫摩尔 / 升
TPP(辅羧酶)	40.00 毫摩尔 / 升
人重组胰岛素	28mIU/L

[0129] 本文实施例 1 和 2 记载的在本文中被称为 RS-I 的溶液为本发明体液增容剂溶液的优选形式。

[0130] 实施例 3 :RS-I、人血清和人组织液的化学成分的比较

[0131] 目前以及根据本领域流行的观点，保护、灌注和血容量代替溶液的配制强烈倾向于采用细胞内或血管外环境的组合物。但是，如本文已指出的，这样仍然有大量的问题没有解决。考虑到细胞膜的超微结构，发明人抛弃了流行的观点，并采取了不同的方法，即生理溶液应该如此配制，以以实用的人工方法模拟与细胞膜直接相邻的环境，即组织液相，从而尽可能维持体内稳态和细胞膜及相关的受体和酶的动态功能。如在本文实施例 6 和 7 中所证明的，来自动物和人的离体细胞、组织和器官的细胞功能得以成功保留，这说明了此方法的可行性。

[0132] 如下表 II 所示，此实施例说明了在人血清、人组织液和 RS-I 溶液中存在的不同的组分水平的比较。

[0133] 表 II

[0134]

组分	血清	RS-I	组织液 [分析或估计]
钠离子	131-148 毫摩尔 / 升	135 毫摩尔 / 升	136 毫摩尔 / 升
钾离子	3.4-5.2 毫摩尔 / 升	5.0 毫摩尔 / 升	4.4 毫摩尔 / 升
钙离子	1.12-1.46 毫摩尔 / 升	1.25 毫摩尔 / 升	1.18 毫摩尔 / 升
镁离子	0.38-0.72 毫摩尔 / 升	0.45 毫摩尔 / 升	0.51 毫摩尔 / 升

氯离子	101-111 毫摩尔 / 升	119 毫摩尔 / 升	117 毫摩尔 / 升
碳酸氢根离子	21-29 毫摩尔 / 升	25 毫摩尔 / 升	23.9 毫摩尔 / 升
有机酸	6.4 毫摩尔 / 升	5 毫摩尔 / 升 (BES)	7 毫摩尔 / 升
葡萄糖	3.6-6.1 毫摩尔 / 升	10 毫摩尔 / 升	3.3-3.6 毫摩尔 / 升
甘油	31-131 微摩尔 / 升	110 微摩尔 / 升	87 微摩尔 / 升
谷氨酸盐	310-475 微摩尔 / 升	300 微摩尔 / 升	≡血清值
谷氨酰胺	188-320 微摩尔 / 升	400 微摩尔 / 升	≡血清值
天冬氨酸盐	1-11 微摩尔 / 升	20 微摩尔 / 升	≡血清值
肉碱（重组）	35-85 微摩尔 / 升	50 微摩尔 / 升	≡血清值
胆碱	18-70 微摩尔 / 升	10 微摩尔 / 升	≡血清值
硫胺素焦磷酸盐	6-135 纳摩尔 / 升	40 纳摩尔 / 升	≡血清值
人胰岛素（重组）	6-35mIU/L	28mIU/L	24mIU/L
pH(37.4℃时）	7.32-7.45	7.30-7.46	7.35-7.38
白蛋白	0.65 毫摩尔 / 升	无	0.19 毫摩尔 / 升
渗透压 (mOsm/kg 水）	264-290	265-286	264-282
电导率 (mS cm^{-1})	11.7-12.3	11.9-12.6	11.8-12.2

[0135] 实施例 4：使用大鼠出血模型研究静脉输注 RS-I 溶液的作用的研究

[0136] 实验动物的外科手术过程

[0137] 该过程由以下组成：每 100 克体重通过肌肉 (IM) 注射 0.1cc 利多卡因 +0.2cc 氯胺酮使得全身麻醉，之后在无菌条件下进行低位中线剖腹手术。此后，切开大鼠主动脉，并在直视下使用 24 号针插管。如此使得可直接取出大量的血液以及给予溶液。作为一个维持剂量，每 25 分钟对所有的大鼠肌肉注射 0.2cc 的氯胺酮。在整个实验中使得动物自发地呼吸，并持续监控其呼吸率。在实验期间，使用一个保温器以维持大鼠的正常体温。由于低

位中线剖腹手术，肠变得暴露而使腹部血管露出。以湿纱布（在盐水中浸泡过）包裹着肠以最小化水损失。实验完成后，可以在麻醉情况下处死大鼠，或者使用 6-0Prolene 8 字缝合修复在插管处的主动脉穿孔以及使用 2 层 2-0Vicryl 缝线缝合剖腹切口。

[0138] 对在研究中选择为存活的大鼠，经肌肉注射抗生素，并在术后使之任意进食。对于每只大鼠此过程需 25 ～ 30 分钟才能完成。

[0139] 动物和实验组

[0140] 在实验中使用了 19 只年龄（10 ～ 12 周）和体重（280 ～ 320 克）相似的 Sprague-Dawley 大鼠。将这些大鼠通过随机数字随机分配分成 3 组：(1) 以同等体积的生理盐水代替血容量 (5 只大鼠）；(2) 以同等体积的以上定义的 RS-I 溶液代替血容量 (7 只大鼠）；或 (3) 没有代替血液损失 (7 只大鼠）。此处研究的主要终点是通过心跳呼吸停止证明的动物的死亡。

[0141] 出血和复苏方案

[0142] 对大鼠进行一系列的取血，每 30 分钟一次，每次有 2cc 的增量（模拟控制的出血）。在每次取血结束时，向肝素栓中注入 0.1 毫升肝素化溶液 (1000 单位于 20 毫升生理盐水中）以避免凝血。按上述方法将大鼠随机分成 3 组。

[0143] 观察及收集到的数据如下：

[0144] a. 取血的次数（由此可得出血量）

[0145] b. 呼吸率（每 10 分钟测量）

[0146] c. 至死亡时的时间跨度（从出血开始的以分钟计的生存时间）

[0147] d. 可见的物理变化

[0148] e. 病理学

[0149] 统计

[0150] 存活时间被定义为从首次取血的时间至记录呼吸心跳停止的时间。当 p 值小于 0.05($p < 0.05$) 时，认为差异有统计学显著性。所有的值以平均值 ± 标准偏差 (SD) 表示。使用 SPSS 软件（版本号：13.0，SPSS，Inc.，Chicago，Illinois) 进行分析。

[0151] 研究结果

[0152] 摘要：在未进行复苏的组中的大鼠的存活时间最短，并且取血量最少。加入生理盐水或 RS-I 后可显著提高存活时间和平均取血量。与生理盐水相比，RS-I 提供了统计学上更好的存活时间 ($p < 0.01$) 并使得可取出更大的血量。

[0153] 存活时间：在图 1 中说明了作为所用复苏溶液的函数的大鼠存活时间。在未进行复苏的组中的大鼠的存活时间最短。通过加入生理盐水代替失血或加入 RS-I 代替失血均明显提高了存活时间。当两溶液组与未进行复苏的大鼠组相比时，两溶液均表现出显著的差异；RS-I 与未进行复苏的组之间的平均差异为 89±13.13 分钟 ($p < 0.01$)，生理盐水与未进行复苏的组之间的平均差异为 57±15.87 分钟 ($p < 0.05$)。RS-I 优于生理盐水，并且导致存活时间在统计学上明显提高。以 RS-I 治疗的大鼠与以生理盐水治疗的大鼠在存活时间上的平均差异显著，为 43.40±6.90($p < 0.01$)。

[0154] 取血量：每个实验组的取血总量列于图 2 中。进行了液体复苏的两组大鼠与未进行复苏的对照组相比，均表现出明显的差异 (RS-I 组与未进行复苏的组的差异为 5.73±0.62 毫升，生理盐水组与未进行复苏的组的差异为 3.64±0.70，两者均 $p < 0.01$)。

以 RS-I 进行复苏的大鼠与以生理盐水进行复苏的大鼠相比，在取血量上的平均差异具有统计学显著性 ($p < 0.01$)，为 2.82±0.45 毫升。

[0155] 呼吸率：图 3 说明了在各实验组中大鼠的呼吸率随时间的变化。以 RS-I 进行复苏的大鼠的存活时间最长，并且表现出较低的总体呼吸率的下降，虽然在开始时（前 100 分钟）观察到更加快速的呼吸率的下降。以生理盐水进行复苏的大鼠的呼吸率较以 RS-I 灌注的大鼠下降得更快，但是未进行液体灌注的大鼠的呼吸率下降得比这个还要快。

[0156] 结论

[0157] 在大鼠控制性出血性休克模型中，就存活时间和血量丢失而言，RS-I 与生理盐水相比为更有效的血浆替代物。

[0158] 实施例 5：以静脉注射液形式 (IV) 给予 RS-I 的安全性研究

[0159] 研究目的

[0160] 此研究被设计成一个先导试验以在大型动物（猪）模型中评价当以静脉注射 (IV) 试剂形式给予 RS-I 时的安全性。

[0161] 方法

[0162] 在此研究中使用了 6 头猪，两种性别均有，体重为 27 ～ 35 公斤。将这些猪圈养于动物养殖所中，并在实验前夜禁食（不能进食）过夜。将每头猪分开的栏中饲养。

[0163] 在第 0 天，首先肌肉内注射氯胺酮 (15 ～ 20 毫克 / 千克）使每头猪镇静，然后进行麻醉和子宫内膜插管。以氟烷维持麻醉状态从而使其对手术刺激没有反应，并且不会导致心律降低。每头猪都通过肌肉注射 10％的 (1cc/10 公斤）庆大霉素来接受术前抗生素预防。

[0164] 在严格的无菌条件下，通过直接倒计时 (via direct countdown) 经手术将中心静脉导管装入每头猪的左侧颈内静脉。将中心静脉导管深深插入猪的皮下组织至猪颈部的侧向背面上的排出位置，并固定于此。这样做有两个目的：防止导管意外的移动和将导管相关的感染的风险降至最低。然后将动物送回栏中以使其从麻醉状态恢复。

[0165] 在第 1 天，肌肉内注射氯胺酮 (35 毫克 / 千克）和赛拉嗪 (7 毫克 / 千克）使每头猪镇静。在无菌操作下从中心静脉导管中取出基线血样并立即送往实验室进行分析。测试取出血样的全部血细胞计数、血清化学测量：电解质、渗透压、pH、葡萄糖、乳酸盐、肌酸酐、血尿素氮 (BUN)、血清酶（天冬氨酸氨基转移酶 [SGOT/AST]、丙氨酸氨基转移酶 [SGPT/ALT]、总肌酸激酶 [CK] 和乳酸脱氢酶 [LDH])、凝血因子和纤维蛋白原。另外，采血以进行促炎症反应活性测试，例如嗜中性粒细胞活化、白细胞介素 -6(IL-6) 和肿瘤坏死因子 -α (TNF-α)，将样品离心并在 -80℃下保存以进行下一步的测试。

[0166] 在取血后，在 1 ～ 2 小时内经中心静脉管给每头猪缓慢灌注 1.0 升 RS-I（在室温下）。在灌注期间直接观察猪是否有任何的疾病症状或不正常的行为 / 表现。然后将这些猪送回其正常的居所内，并通过动物房兽医监测猪是否有任何的疾病症状或不正常的行为 / 表现。

[0167] 在第 2 天和第 3 天重复第 0 天所进行的过程。在每次灌注 RS-I 之前，取相同的血样以评估是否有与给予 RS-I 相关的任何不良效果。然后监测这些猪 7 天，在第 7 天以氯胺酮使其镇静，并通过静脉注射氯化钾将其人道地安乐死。在安乐死之前，收集最后的血样（第 7 天）。也要取血样测量 TNF-α 和 IL-6。将这些样品以 2000r.p.m. 的转速在 20℃下

离心 5 分钟，然后在 -80℃保存以在以后对其使用市售的猪 ELISA 测试法进行测试。对每头猪进行解剖，取出器官（脑、肺、肝和肾），并存储于甲醛中或在 -80℃下冷冻保存，以进行以后的组织学检查和细胞凋亡测试。

[0168] 结果

[0169] 观察所有的 6 头猪 1 周，所有的猪都显示出在正常范围内的行为和进食习惯。

[0170] 在图 4 中列出了血检结果，图 5 ～ 9 图示了这些结果。这些血检结果均在此重量级别的猪的正常范围内。

[0171] 血样分析

[0172] 1. 电解质和生物物理参数：

[0173] 在 7 天的实验期间，与基线值（对照）相比，在血清电解质或渗透压方面没有观察到显著的差异 ($p < 0.05$)（图 4G，表 1；图 5a-g）。在第 2 号猪和第 5 号猪中观察到，在 48 小时后钠离子水平升高，但在已公布的范围值之内，并且在第 7 天之后钠离子水平又恢复到基线值（图 5a）。在实验期间，仅有第 6 号猪的钠离子水平逐渐上升，但是也与总体趋势水平一样维持在最大值为 150 毫摩尔 / 升的范围内（图 4G，表 1；图 5a）。

[0174] 在相同的实验期间，在酸碱平衡（即碳酸氢根水平；图 5f）或氯水平上（图 4G，表 1；图 5e、f）都没有观察到显著的变化。

[0175] 2. 血清代谢物：

[0176] 在第 1 天时，在手术操作过程造成外伤之后，所有的血清代谢物基线水平均自然地升高，但是在第 7 天均（乳酸盐除外）表现出回到正常血清水平的趋势（图 6）。乳酸盐水平有显著的变化，没有统计学上的明显的趋势，在第 2 天和第 3 天乳酸盐水平在对照值之下（图 6）。

[0177] 3. 血清酶：

[0178] 普遍认为在手术操作过程造成外伤之后，检测的血清酶水平会升高（图 7），但是在第 7 天所有的血清酶 (SGPT[ALT] 除外；图 7b) 水平均表现为下降至可接受的血清值，该值表示心、肝、肺和肾的功能完整性的恢复。所观察到的 SGPT[ALT] 水平的升高值在正常血清值的 50％之内，并且组中或组间的数据无统计学差异 ($P < 0.26$)，这再次表明在第 7 天时心和肺功能的完整性。

[0179] 4. 血液组分：

[0180] 每头血量正常的猪其估算的总血量为 1.8 ～ 2.3 升 (67 毫升 / 千克)，在 72 小时内，每头猪都接受了总体积为 3 升的 RS-I。至第 7 天，没有观察到 RBC 计数的血液稀释，并且血细胞比容 (Hct) 值和血红蛋白 (Hg) 水平仍在正常范围内（图 8a、b、c）。相同地，在进行研究的 7 天内淋巴细胞计数回到基线水平（图 8d），在第 7 天仅有白血球 (WBC) 计数表现出轻微地、不明显地升高（图 8e）。

[0181] 在所研究的凝血参数方面，仅第 2 号猪的血小板表现出不正常的基线值，在第 7 天，其又恢复到正常水平。凝血参数，即凝血酶原凝血指数 (INR) 和活化部分凝血激酶时间 (aPTT)（见图 9b、c) 保持不变，并在所知的范围之内。在 7 天的研究期间内，纤维蛋白原水平表现出下降的趋势（图 9d），但是仍在猪可接受的范围之内。

[0182] 在 RS-I 灌注 48 小时之后，WBC 基线水平总体有恢复的趋势（图 8e），在第 7 天淋巴细胞水平也降低（图 8d），这表示没有任何促炎症反应。

[0183] 推论

[0184] 普遍认为的是许多涉及猪的探索性研究均注意到在其血液和血清值方面有很大不同。在本研究中，这些值与所检测的猪一致，具有良好的统计学相关性。

[0185] 在实验期间，在以 RS-I 溶液灌注的血量正常的猪中，没有出现血液稀释（图 4G，表 1）。

[0186] 特有地，容量替换治疗易于受到炎症、过敏反应、高凝性的影响，而这些因素看起来与用于配制所用血液替换液体的各种辅料的抗原性和 / 或毒性有关。从对所得的血细胞性质数据的分析，静脉给予 RS-I 溶液不会出现这些情况。

[0187] 在此先导研究中重要的是评价静脉内给予 RS-I 溶液的安全性，并且确定没有发生高氯血症（代谢性）酸中毒，这常见于补液的临床实践中。在 7 天中，没有在所检测的猪中观察到对酸 - 碱平衡的干扰，这可通过维持不变的碳酸氢根离子和氯离子水平来证明。

[0188] 在灌注 RS-I 溶液期间的第 1 天和第 2 天，在所有所研究的猪中均发现基线血清乳酸盐水平受到了抑制（图 6b），此试验性的观察意味着在以 RS-I 灌注血量正常的猪时，需要优化以下条件：

[0189] a) 丙酮酸盐的代谢（糖酵解）以维持血清乳酸盐水平；

[0190] b) 组织乳酸盐分解代谢以产生 ATP 及

[0191] c) 通过肝再合成（柯里循环）以形成葡萄糖或糖原。

[0192] 所有所研究的猪在实验期间，其血清乳酸脱氢酶 (LDH) 均逐渐降低，乳酸脱氢酶与乳酸盐 / 丙酮酸盐代谢密切相关并在在灌注损伤期间特有地从组织和器官中释放。

[0193] 此研究特别感兴趣的是观察在静脉溶液的再灌注期间与器官（例如心、肺、肝、肾）损害有关的那些酶（例如 CPK（肌酸磷酸激酶）、SGOT、SGPT）的释放，在进行了为监测身体机能的外科手术后（见“方法”）的第 1 天，这些酶水平升高，再逐渐降低至正常的已知的水平（图 4G，表 1）。

[0194] 结论

[0195] 成功地完成了上述全面的研究，该研究涉及在 3 天内每天给猪静脉灌注 1.0 升 RS-I 溶液。基于所得的结果得出结论：当在临床可接受的条件下对圈养猪静脉给予 RS-I 时，没有明显的安全问题。

[0196] 实施例 6：使用 RS-I 保存的离体肾功能的研究

[0197] 方法

[0198] 在“冷藏”(0 ～ 4℃）、静止 (CS) 条件下，将非心跳供体 (NHBD) 的猪肾保存于 RS-I 或市售的低温保存溶液 Soltran 或 UW（威斯康星大学）2 小时，或在“温暖”(31℃）静止条件下保存 2 小时。随后在正常体温条件下以 50：50 的自体血 / 乳酸盐林格溶液灌注混合物再灌注该肾 6 ～ 8 小时。

[0199] 结果

[0200] 以自体血正常体温灌注 6 小时后，测量离体猪肾的功能参数，并列于下表 III 中，其中“n”代表所测肾的数量：

[0201] 表 III

[0202]

灌注 6 小时后的功能 参数	RS-I，在 4℃下保存 (n = 6)	RS-I，在 30℃下保存 (n = 6)	Soltran 冲洗，在 4℃下保存 (n = 6)	UW 冲洗，在 4℃下保存 (n = 6)	“p”值
pH	7.37±0.15	7.30±0.09	7.21±0.1	7.23±0.12	0.1468
碳酸氢根	21.8±6.83	17.6±4.24	14.6±3.08	15.3±4.26	0.154
过量碱	-4.7±9.16	-10±5.9	-9.7±5.90	-13.5±6.4	0.248
血清 K^+ 水平	5.83±0.34	8.01±1.22	7.73±1.21	8.23±1.27	0.003
O_2 消耗，毫升 / 分钟 / 克	47.3±12.11	28.7±6.53	31±6.26	33.7±15.1	0.059
%获得的重量	12.7±9	30.3±9.3	21.2±7.7	29.7±3.44	0.0109
总尿排出量（毫升）	692±230	257±118	536±221	410±153	0.0103
RBF 毫升 / 分钟 /100 克	79.3±17.89	48±11.28	50±10.16	55.5±21.9	0.0214
RVR mmHg/ 毫升 / 分钟	0.4±0.09	0.73±0.26	0.52±0.09	0.8±0.43	0.0173

[0203] 本研究显示在以自体血复苏肾后维持肾功能方面，RS-I 明显优于其他的保存溶液。对在灌注期间所获得的数据进行分析发现在 4℃下保存肾表现出：(1) 氧消耗增多，(2) 肌酸清除率提高，(3) 肾血流增加 [RBF]，(4) 尿排出量增加，(5) 肾血管阻力降低 [RVR]，(6) 体重降低（即水肿减少），(7) 稳定的血液 pH 和酸 - 碱（碳酸氢根离子水平）平衡的保留，及 (8) 细胞内 K+ 的丢失可忽略。

[0204] 特别重要的是观察到血液 pH 的稳定性和中性酸 - 碱平衡 (H^+/HCO_3^-) 的维持。该观察到的稳定性表明在 RS-I 保存的肾中，主要的 pH 缓冲系统、谷氨酰胺 - 氨穿梭比在其他两种市售的保存溶液所观察到的为好。另外重要的是观察到在“温暖”(WS) 缺血的条件下

在AQIX® RS-I 中保存 2 小时的那些肾中，随后将其再灌注 6 ～ 8 小时，这会导致 ADP:ATP 平衡的恢复（见图 10）。

[0205] 在灌注前活组织检查中 ADP:ATP 比水平最高，并且这表示在 CS/WS 保存期间持续的缺血性损害。但是在灌注 6 小时后，CS 组的肾和 WS 组的肾的细胞功能改善，但是两者之间没有观察到明显的差异 (p = 0.71)(MD Kay 等，2006，Transplant International 20(1)，88-92)。

[0206] 实施例 7：评价 RS-I 在各种保存时间期间内维持离体哺乳动物器官和组织标本存活的能力。

[0207] 方法

[0208] 将组织 / 器官在 RS-I 溶液中保存 / 灌注不同时间后，评价哺乳动物组织和器官标本的功能存活。存活可使用许多功能指示来评价，例如细胞膜电位的维持、神经递质输出、肌形成、膜受体敏感度、酶功能、组织学变化等。

[0209] 结果

[0210] 下表 IV 显示了 RS-I 溶液在不同长度的 (0.3 ～ 10 天）保存期间内维持各种哺乳动物和人的组织和器官标本的功能存活的能力。

[0211] 表 IV

[0212]	种类	组织 / 器官标本	最大保存天数	保存条件	
[0213]				保存温度℃	试验温度℃
[0214]	大鼠	空肠	9.0	8-12	35
[0215]		空肠	1.5	-	35
[0216]		回肠	8.0	8-12	35
[0217]		回肠	1.3	-	20-35
[0218]		结肠	5.0	-	20-35
[0219]		子宫	3.0	-	35
[0220]		子宫	10.0	8-12	35
[0221]		逼尿肌	2.0	-	20-35
[0222]		隔膜肌	0.6	-	35-37
[0223]		隔膜肌	2.0	-	20-35
[0224]		比目鱼肌	1.1	-	20-35
[0225]		心	0.8	-	35-37
[0226]		心	2.1	-	20-25
[0227]		心 - 肺	1.2	-	20-35
[0228]		红血球	4.0	4℃下未发现溶血	
[0229]		肾	1.0	-	20-35
[0230]		肝	0.3	-	35
[0231]	兔	肠（空肠）	5.0	8-12	37
[0232]		肠（空肠）	2.0	-	20-37
[0233]		子宫	7.0	8-12	37
[0234]		颈上	2.0	8-12	37

[0235]		神经节	0.8	-	37
[0236]		红血球	3.0	4℃下未发现溶血	
[0237]	荷兰猪	回肠	7.0	8-12	37
[0238]		逼尿肌	4.0	8-12	37
[0239]		逼尿肌	1.0	-	20-37
[0240]		心	0.4	-	20-37
[0241]	小鼠	比目鱼肌	0.9	-	20-35
[0242]		隔膜肌	1.5	-	20-35
[0243]		肋间肌	0.9	-	20-35
[0244]	猪	肾	0.8	0-4	37
[0245]		肾	0.8	30	37
[0246]	人	肋间肌	1.3	-	37
[0247]		肾（器官）	1.5	0-4	37
[0248]		肠（器官）	0.3	-	37
[0249]		结肠（生检）	1.3	0-4	-
[0250]		肺（器官）	0.3	-	37
[0251]		肺支气管（生检）	0.8	-	37
[0252]		心房小梁（生检）	0.6	-	37
[0253]		肝（器官）	0.3	-	37
[0254]		红血球	1.3	0-4	-
[0255]		红血球	0.3	-	37
[0256]		白血球	0.8	-	37

[0257] 实施例 8：在出血猪模型中，比较当静脉内给药时 RS-I 液体与自体血和生理盐水溶液效率的前临床研究

[0258] 研究目的

[0259] 与以自体血或乳酸盐林格溶液 (LR)（临床应用中常用作血容量增容溶液）相比，研究 RS-I 在猪中用作复苏溶液（增容）的效率，及其在出血性创伤后降低组织再灌注损伤的效率。

[0260] 方法

[0261] 在此研究中，随机选取 23 头非同源农场猪 (non-syngeneic farm pig) 用于四个实验组中，即 3 头“假手术”（对照）组、6 头自体血组、6 头 RS-I 溶液组和 6 头 LR 溶液组。在标准的全身麻醉条件下，使用仪器全面检测动物所有的血液动力学性质。然后将猪在股动脉处快速放血，直至 MAP 达到 30mmHg。根据需要持续放血以将 MAP 维持在 30+/-2mm Hg 45 分钟。以 ACD 处理的袋子收集流出的血液，并使用净重来估计出血量。

[0262] 在 45 分钟的休克期结束时，给予动物失血量 3 ～ 4 倍的乳酸盐林格溶液 (LR) 或 RS-I 溶液、失血量总量的自体血或不给于复苏（“假手术”对照组）。

[0263] 在 2 小时内复苏液体以动力学方式、递增地给予，以将 MAP 维持在 60+/-2mm Hg。在基线、45 分钟的休克期的开始时、休克 30 分钟后、休克 45 分钟后（完成）、及在复苏 30、60、90、和 120 分钟时的所有的血液动力学参数。在相同的时间间隔时取血样以进行血气

分析、乳酸盐测试、完全血细胞计数、血清化学测定：电解质、葡萄糖、渗透压、血清酶（天冬氨酸转氨酶 [SGOT/AST]、丙氨酸氨基转移酶 [SGPT/ALT]、总的肌酸激酶 [CK]、乳酸脱氢酶 [LDH]）和凝血性质。

[0264] 通过骨髓过氧化物酶 (myloperoxidase) 方法测量嗜中性白细胞激活水平，以及测量作为细胞凋亡（细胞死亡）的指标的 TNF-α、IL-6 水平。

[0265] 复苏后，移除动物的插管，留下颈静脉插管以供每日取血用。在手术后的 7 天期间，观察动物是否有任何行为变化，并在手术后的第 1、2、和 7 天取血。接着在手术后的第 7 天人道地使动物安乐死以检查在脑、肾、肺和肝中是否有任何再灌注损伤的病理学证据。

[0266] 结果

[0267] 综述：

[0268] 观察在三个复苏实验组中所有的 18 头猪 1 周，所有的猪都显示出在正常范围内的行为和进食习惯。

[0269] 血液动力学：

[0270] 在复苏的前 60 分钟，RS-I 组猪的平均动脉压（见图 11）、中心静脉压、肺动脉闭塞压恢复时间最快，且与自体血组相似，LR 组猪的恢复最慢。与自体血组合 LR 组猪相比，RS-I 组猪的心排出量的恢复明显更快且更高（见图 12）。

[0271] 血液性质：

[0272] 在术后的第 7 天，所有的实验组的血清电解质浓度均恢复到正常水平，除了 LR 组猪的钠离子浓度有所升高。在术后第 7 天，在所有的组中阴离子间隙和强离子均在正常范围内。

[0273] 在术后第 1 天和第 2 天，酶水平升高，但是在术后第 7 天恢复到基线水平。在 7 天的实验期间，没有观察到明显的凝血参数的改变（见图 13）。

[0274] 病理学：

[0275] 在术后第 7 天，对于 RS-I 和自体血组的猪的肺和肝中没有出现再灌注损伤的证据，且在肾中的不明显，但是对于 LR 组的猪的这些器官中再灌注损伤的证据具有明显的和共同的特征（见图 13）。

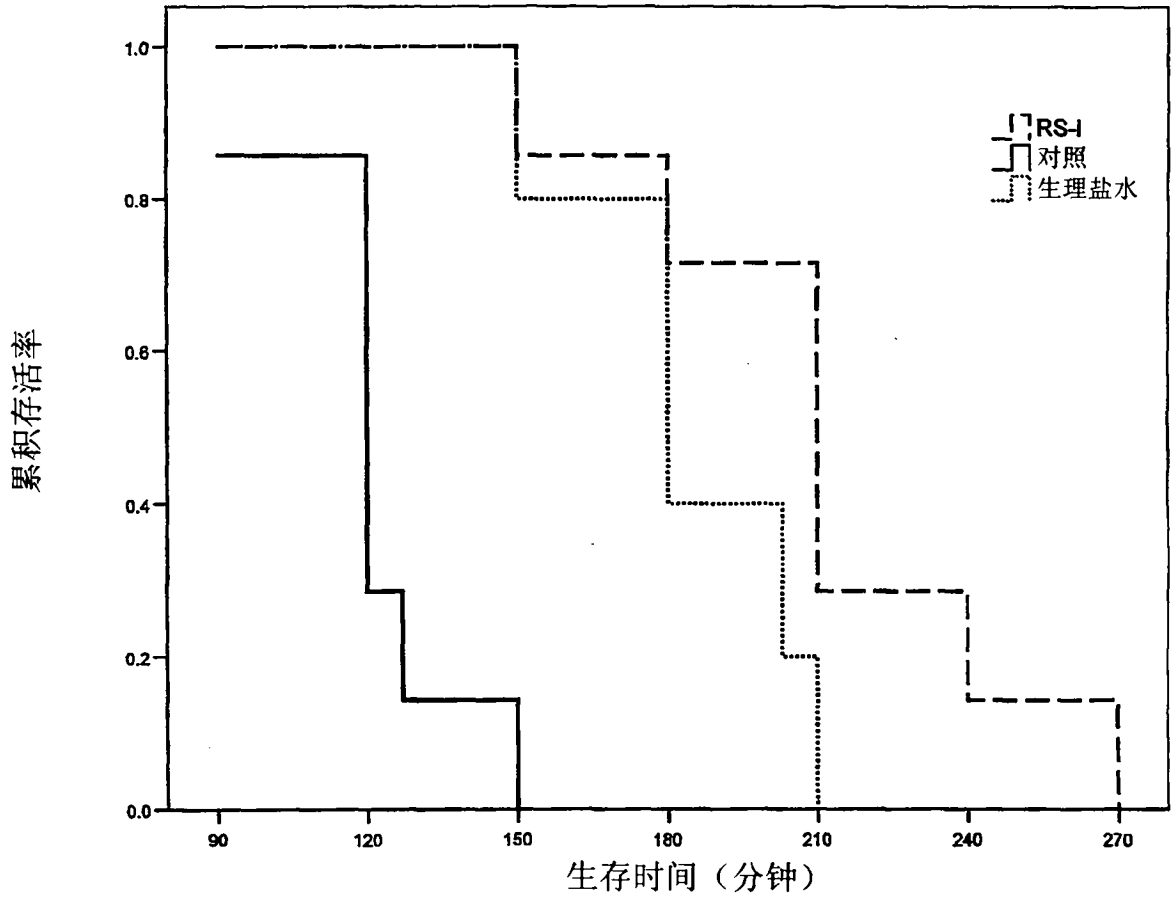


图 1 以分钟计的大鼠累积存活时间

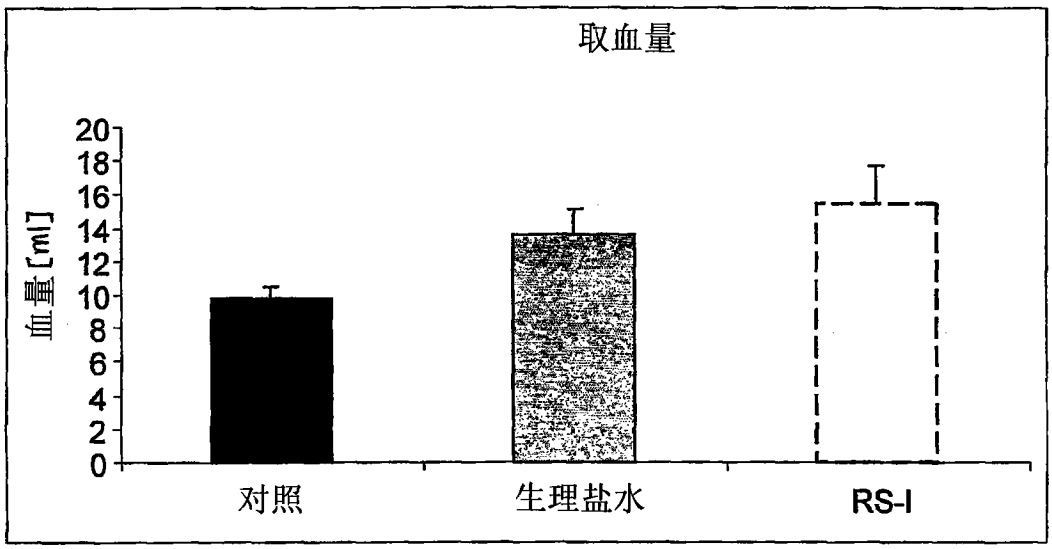


图 2 在每个研究组中的取血总量

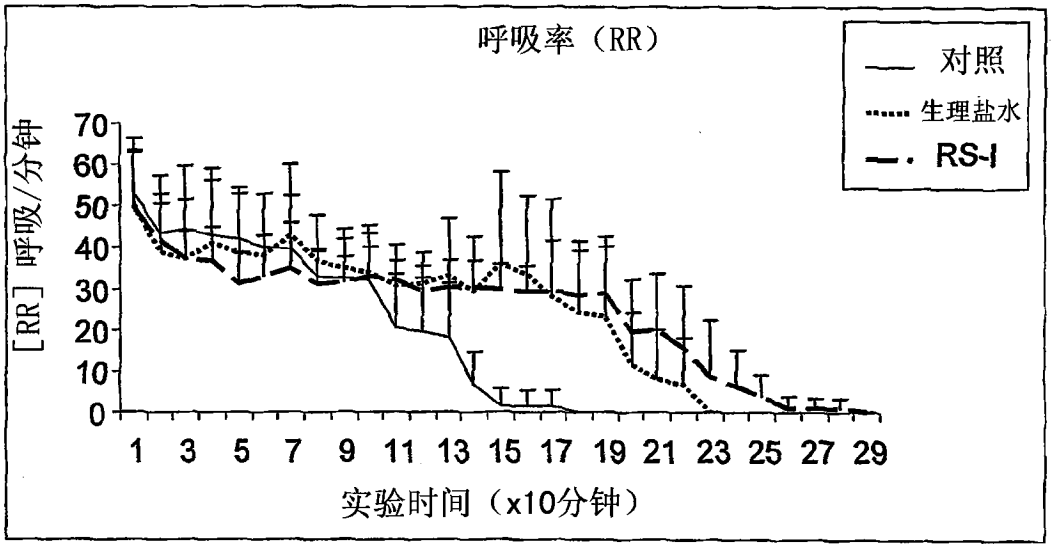


图 3 在各个实验组中大鼠随实验时间的呼吸率

实验数据分析	参考（单位）值		猪#1 (8/31/2006) 第 1 天	猪 #1 (9/1/2006) 第 2 天	猪# 1 (9/2/2006) 第 3 天
全血细胞计数					
WBC	百万/mm^3	7 - 20	20400	23900	18600
RBC	百万/mm^3	5 - 8	6.67	6.56	6.46
Hg	克/分升	6.9 - 12.7	12.1	12	12
Hct	%	15 - 37	36	35	35
MCV	Fl	50 - 68	54	54	54
MCH	Pg	17 - 23	18	18	19
MCHC	克/分升	30 - 36	34	34	35
RDW	%		18	19	19
白细胞分类					
多晶型物	%	28 - 50	47	61	59
淋巴细胞	%	40 - 60	51	33	38
单核细胞	%	2 - 10	1	6	3
嗜酸细胞	%	0 -10	1	0	0
血小板	mm^3	120k - 720k	526000	522000	458000
葡萄糖	毫克/分升	65 - 150	77	59	97
乳酸	毫摩尔/升	1.91- 2.47	5.76	1.49	1.66
BUN	毫克/分升	6 - 30	11	14	16
肌酸酐	毫克/分升	0.8 - 3.6	0.8	0.9	1
钠	毫摩尔/升	135 - 150	139	139	142
钾	毫摩尔/升	4.1 - 6.9	3.9	3.8	3.8
氯	毫摩尔/升	94 - 113	101	103	102
碳酸氢根	毫摩尔/升	22 - 46	22	26	30
钙	毫摩尔/升	2.07 - 3.32	2.40	2.30	2.35
镁	毫摩尔/升	0.70 - 1.00	0.90	0.82	0.78
磷酸根	毫克/分升	7.0 - 10.9	8.6	8.2	7.9
渗透压	mOsm/kg	280 - 306	286	295	295
SGOT (AST)	IU/L	29 - 1140	73	64	60
SGPT(ALT)	IU/L	7 - 161	66	69	70
LDH	IU/L	286 - 12000	778	771	731
CPK	IU/L	311 - 16700	N/A	2760	1887
凝血酶原					
Pt	秒		10.6	10.8	10.7
对照	秒		12	12	13
INR (ISI)	（比值）	0.8 - 1.2	0.9	0.9	0.9
aPTT	秒	17.8 - 23.3	20	19	19.5
对照	秒		29.5	30	30.5
aPTT （比值）			0.7	0.6	0.6
纤维蛋白原	克/升	2.06 - 6.13	2.8	3.6	3.1

图 4A

实验数据分析	参考（单位）值		猪 #2 (9/7/2006) 第 1 天	猪 #2 (9/8/2006) 第 2 天	猪 #2 (9/9/2006) 第 3 天	猪 #2 (13/09/06) 第 7 天
全血细胞计数						
WBC	百万/mm^3	7 - 20	24700	19200	20000	29400
RBC	百万/mm^3	5 - 8	6.46	6.39	6.29	6.26
Hg	克/分升	6.9 - 12.7	11.2	11.1	10.9	10.7
Hct	%	15 - 37	32	32	32	32
MCV	Fl	50 - 68	50	50	51	52
MCH	Pg	17 - 23	17	17	17	17
MCHC	克/分升	30 - 36	35	35	34	33
RDW	%		20	21	22	28
白细胞分类						
多晶型物	%	28 - 50	32	19	36	50
淋巴细胞	%	40 - 60	67	77	58	43
单核细胞	%	2 - 10	0	4	5	6
嗜酸细胞	%	0 -10	1	0	0	1
血小板	mm^3	120k -720k	121000	586000	575000	563000
葡萄糖	毫克/分升	65 - 150	87	96	92	96
乳酸	毫摩尔/升	1.91 - 2.47	0.61	0.83	1.63	5.13
BUN	毫克/分升	6-30	14	14	18	16
肌酸酐	毫克/分升	0.8 - 3.6	0.6	0.7	0.8	0.7
钠	毫摩尔/升	135 -150	139	144	149	140
钾	毫摩尔/升	4.1 - 6.9	4.1	4.3	4.3	4
氯	毫摩尔/升	94 -113	99	107	110	99
碳酸氢根	毫摩尔/升	22 - 46	32	27	30	28
钙	毫摩尔/升	2.07 - 3.32	2.47	2.52	2.62	2.62
镁	毫摩尔/升	0.70 - 1.00	0.9	1.03	0.99	0.90
磷酸根	毫克/分升	7 - 10.9	9.4	8.7	8.4	8.8
渗透压	mOsm/kg	280 - 306	287	300	312	291
SGOT (AST)	IU/L	29 - 1140	88	70	46	38
SGPT (ALT)	IU/L	7 -161	40	59	54	66
LDH	IU/L	286 -12000	767	795	748	623
CPK	IU/L	311- 16700	5234	4595	3542	743
凝血酶原						
Pt	秒		11.4	12.1	11.5	11.5
对照	秒		12	12	12	12
Pt 比			1	1	1	1
INR (ISI)	（比值）	0.8 - 1.2	1	1	1	1
aPTT	秒	17.8 - 23.3	17	22.5	20	19.5
对照	秒		29.5	30	30	29
aPTT （比值）			0.6	0.8	0.7	0.7
纤维蛋白原	克/升	2.06 - 6.13	3.2	3.3	2.9	2.1

图 4B

实验数据分析	参考（单位）值		猪#3 (9/14/2006) 第 1 天	猪#3 (9/15/2006) 第 2 天	猪#3 (16/09/06) 第 3 天	猪#3 (20/09/06) DAY7
全血细胞计数						
WBC	百万/mm^3	7 - 20	23100	11900	18200	26000
RBC	百万/mm^3	5 - 8	6.46	6.29	6.1	6.24
Hg	克/分升	6.9 - 12.7	11.2	10.9	10.5	11.1
Hct	%	15-37	32	31	31	31
MCV	Fl	50-68	49	50	50	50
MCH	Pg	17-23	17	17	17	18
MCHC	克/分升	30-36	35	35	35	35
RDW	%		34	32	34	22
白细胞分类						
多晶型物	%	28 - 50	54	28	29	59
淋巴细胞	%	40 - 60	45	66	67	28
单核细胞	%	2 - 10	1	1	4	13
嗜酸细胞	%	0 -10	0	1	0	0
血小板	mm^3	120k - 720k	455000	389000	390000	337000
葡萄糖	毫克/分升	65 -150	81	96	95	78
乳酸	毫摩尔/升	1.91 - 2.47	0.68	0.46	1.14	0.31
BUN	毫克/分升	6-30	11	13	11	10
肌酸酐	毫克/分升	0.8 - 3.6	0.8	0.9	0.9	0.7
钠	毫摩尔/升	135 -150	142	138	139	138
钾	毫摩尔/升	4.1 - 6.9	4.1	4.1	4.5	4.5
氯	毫摩尔/升	94 - 113	103	101	102	101
碳酸氢根	毫摩尔/升	22 - 46	28	29	29	29
钙	毫摩尔/升	2.07 - 3.32	2.42	2.42	2.42	2.40
镁	毫摩尔/升	1.7 - 2.44	0.82	0.74	0.86	0.86
磷酸根	毫克/分升	7.0 - 10.9	7.7	7.7	8.1	7.8
渗透压	mOsm/kg	280 - 306	290	290	295	289
SGOT (AST)	IU/L	29 - 1140	33	36	26	22
SGPT (ALT)	IU/L	7 -161	26	32	35	65
LDH	IU/L	286 -12000	551	605	561	576
CPK	IU/L	311- 16700	1609	2494	1407	252
凝血酶原						
Pt	秒		11.2	11.3	11.1	10.9
对照	秒		12	12	12	12
INR (ISI)	（比值）		0.9	0.9	0.9	0.9
aPTT	秒	0.8 - 1.2	17	17	19.5	19
对照	秒	17.8 - 23.3	29.5	29.5	30	30
aPTT（比值）			0.6	0.6	0.7	0.6
纤维蛋白原	克/升	2.06 - 6.13	3.2	3	2.4	2.5

图 4C

实验数据分析	参考（单位）值		猪 #4 (20/09/06) 第 1 天	猪 #4 (21/09/06) 第 2 天	猪 #4 (22/09/06) 第 3 天	猪 #4 (26/09/06) 第 7 天
全血细胞计数						
WBC	百万/mm^3	7 - 20	26700	15800	21300	29700
RBC	百万/mm^3	5 - 8	6.11	5.67	6.28	4.89
Hg	克/分升	6.9 - 12.7	11.1	10.4	11.6	9.3
Hct	%	15-37	33	30	34	27
MCV	Fl	50-68	54	54	54	56
MCH	Pg	17-23	18	18	19	19
MCHC	克/分升	30-36	34	34	35	34
RDW	%		20	20	20	25
白细胞分类						
多晶型物	%	28 - 50	69	60	48	67
淋巴细胞	%	40 - 60	25	32	46	24
单核细胞	%	2 - 10	6	7	2	9
嗜酸细胞	%	0 -10	0	0	4	0
血小板	mm^3	120k - 720k	645000	564000	586000	676000
葡萄糖	毫克/分升	65 -150	100	65	75	70
乳酸	毫摩尔/升	1.91 - 2.47	3.14	1.13	0.95	1.58
BUN	毫克/分升	6-30	26	10	10	15
肌酸酐	毫克/分升	0.8 - 3.6	1	0.8	0.8	0.6
钠	毫摩尔/升	135 -150	141	139	138	142
钾	毫摩尔/升	4.1 - 6.9	4.3	4.1	4.9	4.5
氯	毫摩尔/升	94 - 113	99	100	99	98
二氧化碳	毫摩尔/升	22 - 46	28	34	30	34
钙	毫摩尔/升	2.07 - 3.32	2.25	2.27	2.42	2.59
镁 '	毫摩尔/升	0.7 - 1.00	0.95	0.82	0.86	0.90
磷酸根	毫克/分升	7.0 - 10.9	8.6	6.4	7.5	9.3
渗透压	mOsm/kg	280 - 306	295	284	287	292
SGOT (AST)	IU/L	29 - 1140	98	58	34	24
SGPT (ALT)	IU/L	7 -161	53	55	56	54
LDH	IU/L	286 -12000	1083	977	933	586
CPK	IU/L	311- 16700	3687	2677	1346	326
凝血酶原						
Pt	秒		9.9	10.9	10.7	10.5
对照	秒		12	12	12	12
INR (ISI)	（比值）	0.8 - 1.2	0.8	0.9	0.9	0.9
aPTT	秒	17.8 - 23.3	22.5	20.5	18.5	17
对照	秒		30.5	29	30	30
aPTT （比值）			0.7	0.7	0.6	0.6
纤维蛋白原	克/升	2.06 - 6.13	3	3.2	2.7	2.8

图 4D

实验数据分析

		参考（单位）值	猪 #5 (28/09/06) 第 1 天	猪 #5 (29/09/06) 第 2 天	猪 #5 (30/09/06) 第 3 天	猪 #5 (4/10/06) 第 7 天
全血细胞计数						
WBC	白万/mm^3	7 - 20	21700	19700	20300	22700
RBC	百万/mm^3	5 - 8	6.35	5.7	5.58	6.23
Hg	克/分升	6.9 - 12.7	11.1	9.9	9.8	11
Hct	%	15 - 37	33	29	29	33
MCV	Fl	50 - 68	51	51	51	52
MCH	Pg	17 - 23	18	17	18	18
MCHC	克/分升	30 - 36	34	35	34	34
RDW	%		21	20	21	21
白细胞分类						
多晶型物	%	28 - 50	53	45	42	52
淋巴细胞	%	40 - 60	43	49	52	41
单核细胞	%	2 - 10	3	3	3	5
嗜酸细胞	%	0 -10	1	1	2	1
血小板	mm^3	120k - 720k	531000	456000	479000	513000
葡萄糖	毫克/分升	65 - 150	171	97	84	79
乳酸	毫摩尔/升	1.91 - 2.47	4.96	0.7	1.3	3.21
BUN	毫克/分升	6 - 30	29	23	21	17
肌酸酐	毫克/分升	0.8 - 3.6	1	0.8	0.7	0.9
钠	毫摩尔/升	135 - 150	142	144	150	142
钾	毫摩尔/升	4.1 - 6.9	4.6	4.7	4.6	4.6
氯	毫摩尔/升	94 - 113	99	104	107	98
二氧化碳	毫摩尔/升	22 - 46	35	30	31	35
钙	毫摩尔/升	2.07 - 3.32	2.45	2.52	2.54	2.59
镁	毫摩尔/升	0.7 - 1.00	1.07	1.07	1.03	1.15
磷酸根	毫克/分升	7 - 10.9	7.9	8.2	7.7	9.4
渗透压	mOsm/kg	280 - 306	305	304	310	297
SGOT (AST)	IU/L	29 - 1140	45	34	38	23
SGPT (ALT)	IU/L	7 -161	57	56	58	45
LDH	IU/L	286 -12000	702	641	601	498
CPK	IU/L	311- 16700	2719	1916	1606	505
凝血酶原						
Pt	秒		11.2	10.9	11	11.4
对照	秒		12	12	12	12
INR (ISI)	（比值）	0.8 - 1.2	0.9	0.9	0.9	1
aPTT	秒	17.8 - 23.3	15.5	16.5	18	17.5
对照	秒		30.5	29.5	30	30.5
aPTT （比值）			0.5	0.6	0.6	0.6
纤维蛋白原	克/升	2.06 - 6.13	2.9	2.6	2.4	2.3

图 4E

实验数据分析	参考（单位）值		猪 #6 (19/10/06) 第 1 天	猪 #6 (20/10/06) 第 2 天	猪 #6 (21/10/06) 第 3 天	猪 #6 (25/10/06) 第 7 天
全血细胞计数						
WBC	百万/mm^3	7 - 20	21400	21100	20800	17000
RBC	百万/mm^3	5 - 8	6.05	5.49	5.77	5.36
Hg	克/分升	6.9 - 12.7	11.7	10.6	11.1	10.2
Hct	%	15-37	34	31	32	30
MCV	Fl	50-68	57	57	56	56
MCH	Pg	17-23	19	19	19	19
MCHC	克/分升	30-36	34	34	35	34
RDW	%		16	16	16	16
白细胞分类						
多晶型物	%	28-60	51	66	68	54
淋巴细胞	%	40-60	47	31	32	36
单核细胞	%	2 - 10	2	3	0	6
嗜酸细胞	%	0-10	0	0	0	1
血小板	Mm^3	120k-720k	601000	595000	616000	711000
葡萄糖	毫克/分升	65-150	74	91	105	108
乳酸	毫摩尔/升	1.91-2.47	1.06	0.89	1.17	1.3
BUN	毫克/分升	6-30	10	14	9	16
肌酸酐	毫克/分升	0.8-3.6	0.7	0.7	0.8	0.5
钠	毫摩尔/升	135-150	138	139	143	145
钾	毫摩尔/升	4.1-6.9	3.8	4.4	4	4.5
氯	毫摩尔/升	94 -113	98	99	103	100
二氧化碳	毫摩尔/升	22 - 46	31	32	31	40
钙	毫摩尔/升	2.07 - 3.32	2.40	2.40	2.37	2.89
镁	毫摩尔/升	0.7 - 1.00	0.90	0.86	0.70	0.90
磷酸根	毫克/分升	7.0 - 10.9	8.4	7.3	7.4	8.8
渗透压	mOsm/kg	280 - 306	300	301	296	309
SGOT (AST)	IU/L	29 - 1140	103	111	50	29
SGPT (ALT)	IU/L	7 -161	43	54	56	49
LDH	IU/L	286 -12000	867	939	738	618
CPK	IU/L	311- 16700	11870	11528	4305	346
凝血酶原						
Pt	秒		15.5	16.2	13	11.6
对照	秒		12	12	12	12
JNR (JSJ)	（比值）	0.8 - 1.2	1.3	1.4	1.1	1
aPTT	秒	17.8 - 23.3	21	23.5	23	23.5
对照	秒		30.5	29	29.5	29
aPTT （比值）			0.7	0.8	0.8	0.8
纤维蛋白原	克/升	2.06 - 6.13	3.2	2.7	2.2	1.6

图 4F

数据总结表 – 在血量正常的猪模型中血液数据分析的参考值和平均值

分析	参考值	实验期间的平均值			
		第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 7 天
血液和细胞性质					
RBC	5 - 8 百万/mm^3	6.286	5.908	6.004	5.796
Hg	6.9 - 12.7 g/DI	11.26	10.58	10.78	10.46
Hct	15 - 37 %	32.8	30.6	31.6	30.6
WBC	7 - 20 百万/mm^3	23000	17540	20120	24960
淋巴细胞	40 - 60 %	45.4	51.0	51.0	34.4
血小板	120000 - 720000 mm^3	470600	518000	529200	560000
Pt [INR]	0.8 - 1.2	0.98	1.02	0.96	0.96
aPTT	17.8 - 23.3 秒	18.6	20.0	19.8	19.3
纤维蛋白原	2.06 - 6.13 克/升	3.10	2.96	2.52	2.26
电解质					
钠	135 -150 毫摩尔/升	140.4	140.8	143.8	141.4
钾	4.1 - 6.9 毫摩尔/升	4.18	4.32	4.46	4.42
钙	2.07 - 3.32 毫摩尔/升	2.4	2.43	2.48	2.62
镁	0.70 - 1.00 毫摩尔/升	0.93	0.90	0.89	0.95
碳酸氢根	22 - 46 毫摩尔/升	30.8	30.4	30.2	33.2
渗透压	280 - 306 mOsm/kg	295.4	295.8	300.0	295.6
代谢物					
葡萄糖	65-150 mg/DI	102.6	89	90.2	86.2
乳酸	1.91 - 2.47 毫摩尔/升	2.09	0.80	1.24	2.31
BUN	6 - 30 毫克/分升	18.0	14.8	13.8	14.8
肌酸酐	0.8 - 3.6 毫克/分升	0.82	0.78	0.8	0.68
酶					
LDH	286 -12000 IU/L	794	791.4	716.2	580.2
SGOT (AST)	29 - 1140 IU/L	73.4	61.8	38.8	27.2
SGPT (ALT)	7 - 161 IU/L	43.8	51.2	51.8	55.8
CPK	311- 16700 IU/L	5023.8	4642	2441.2	434.4

图 4G

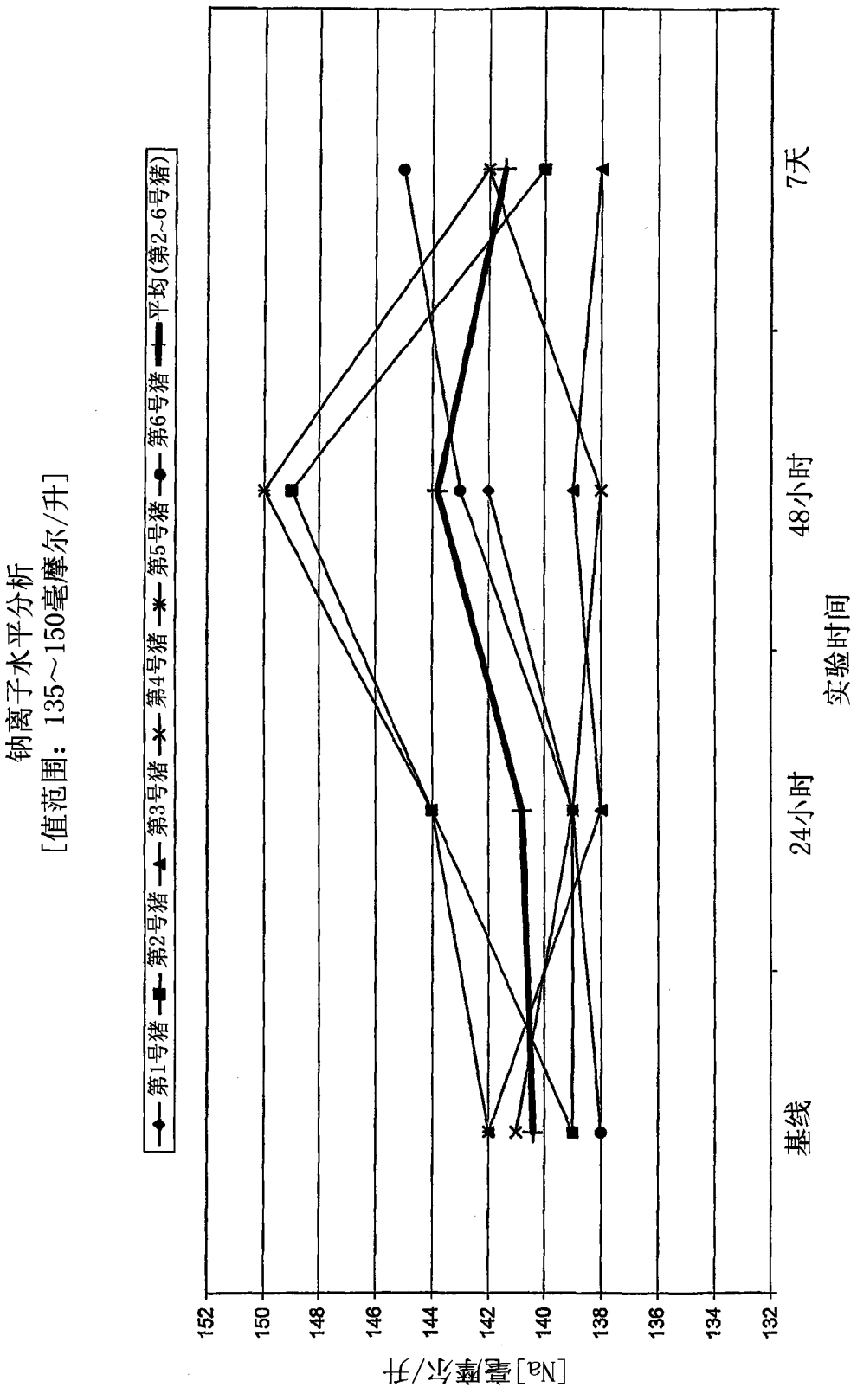

钠离子水平分析
[值范围：135～150毫摩尔/升]
第1号猪
第2号猪
第3号猪
第4号猪
第5号猪
第6号猪
平均(第2~6号猪)
[Na]毫摩尔/升
152
150
148
146
144
142
140
138
136
134
132
基线
24小时
48小时
7天
实验时间

图 5(a)

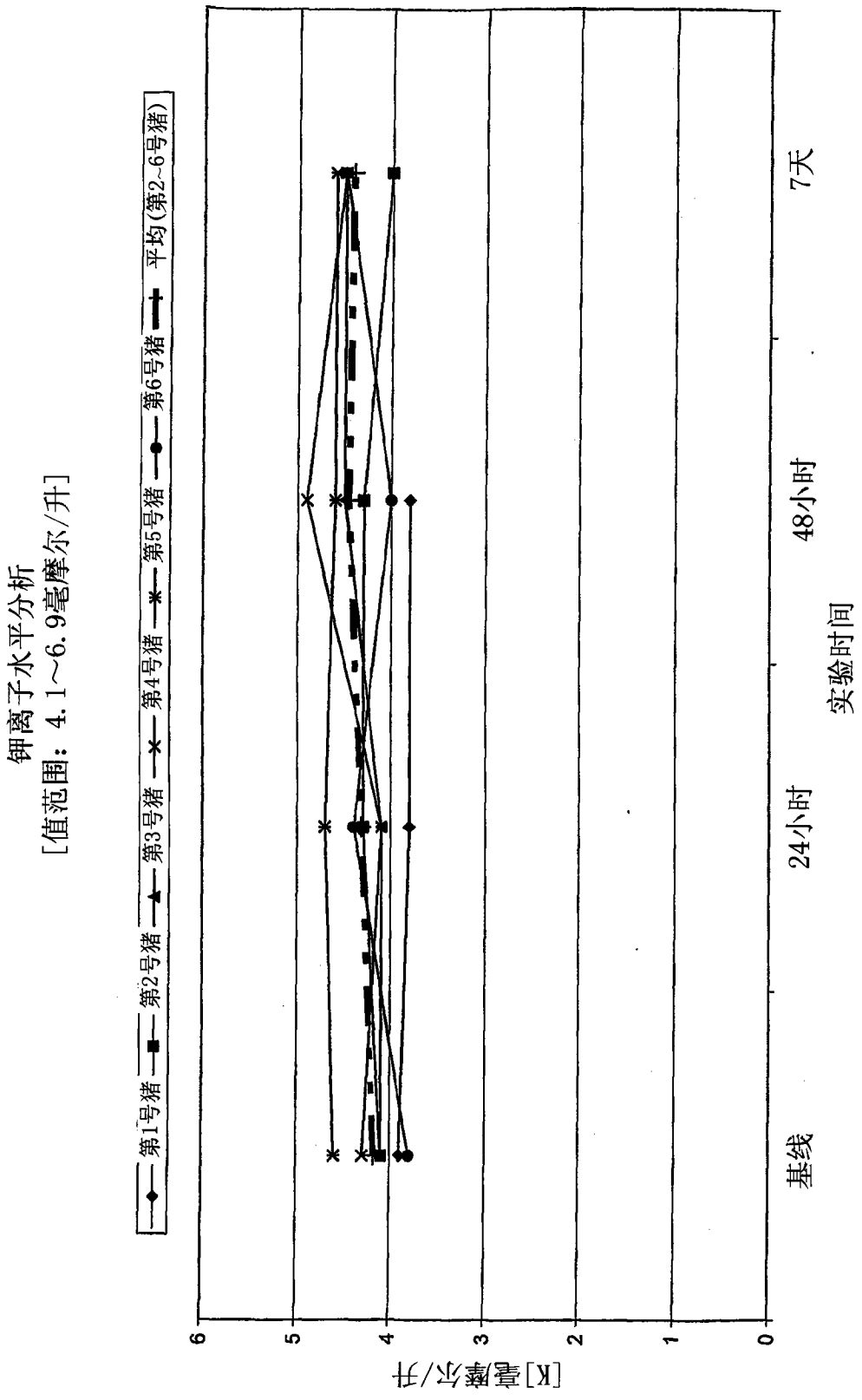

钾离子水平分析
[值范围：4.1～6.9毫摩尔/升]
第1号猪
第2号猪
第3号猪
第4号猪
第5号猪
第6号猪
平均(第2~6号猪)
[K]毫摩尔/升
0
1
2
3
4
5
6
基线
24小时
48小时
7天
实验时间

图 5(b)

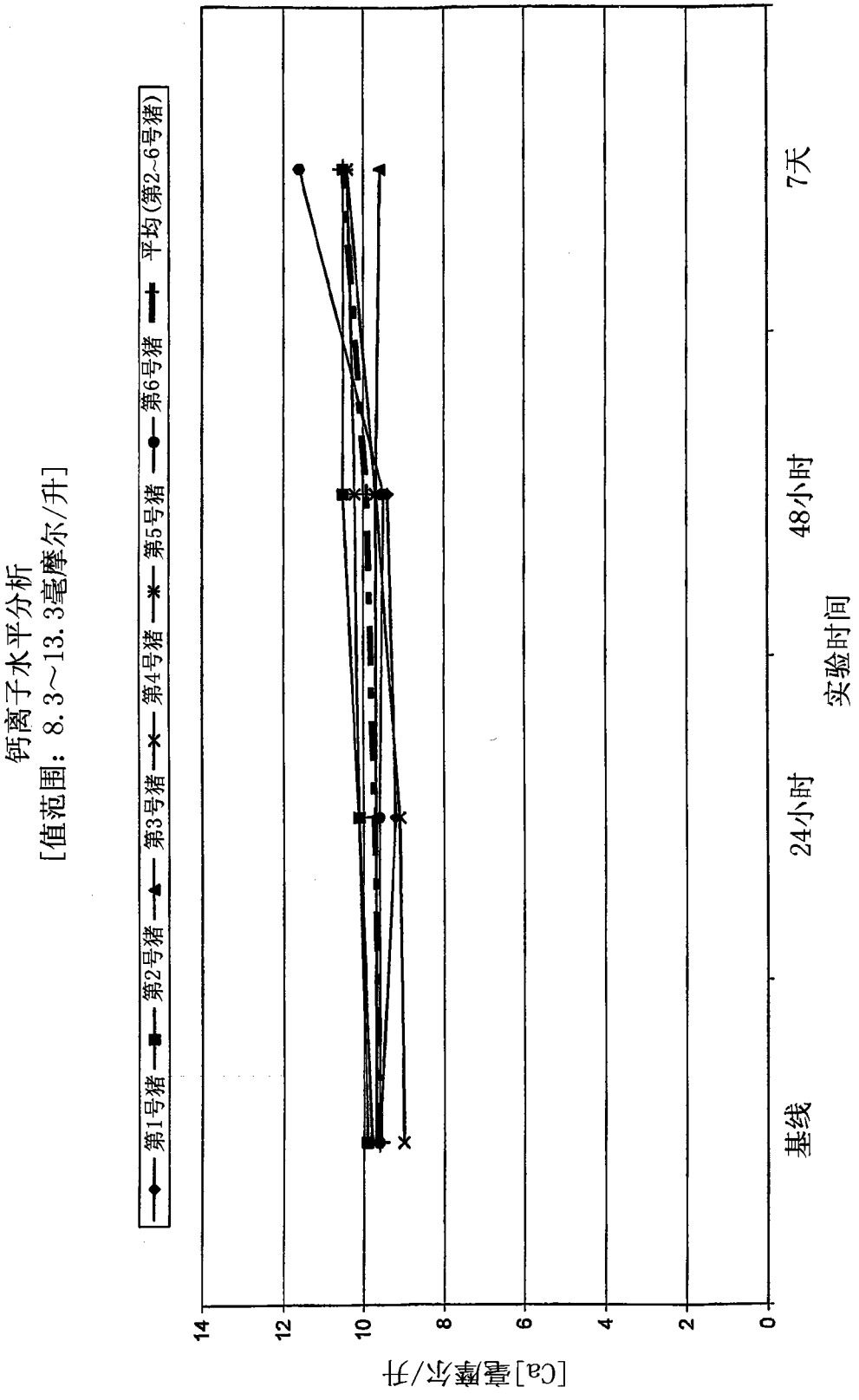

钙离子水平分析
[值范围：8.3～13.3毫摩尔/升]
第1号猪
第2号猪
第3号猪
第4号猪
第5号猪
第6号猪
平均(第2~6号猪)
[Ca]毫摩尔/升
14
12
10
8
6
4
2
0
基线
24小时
48小时
7天
实验时间

图 5(c)

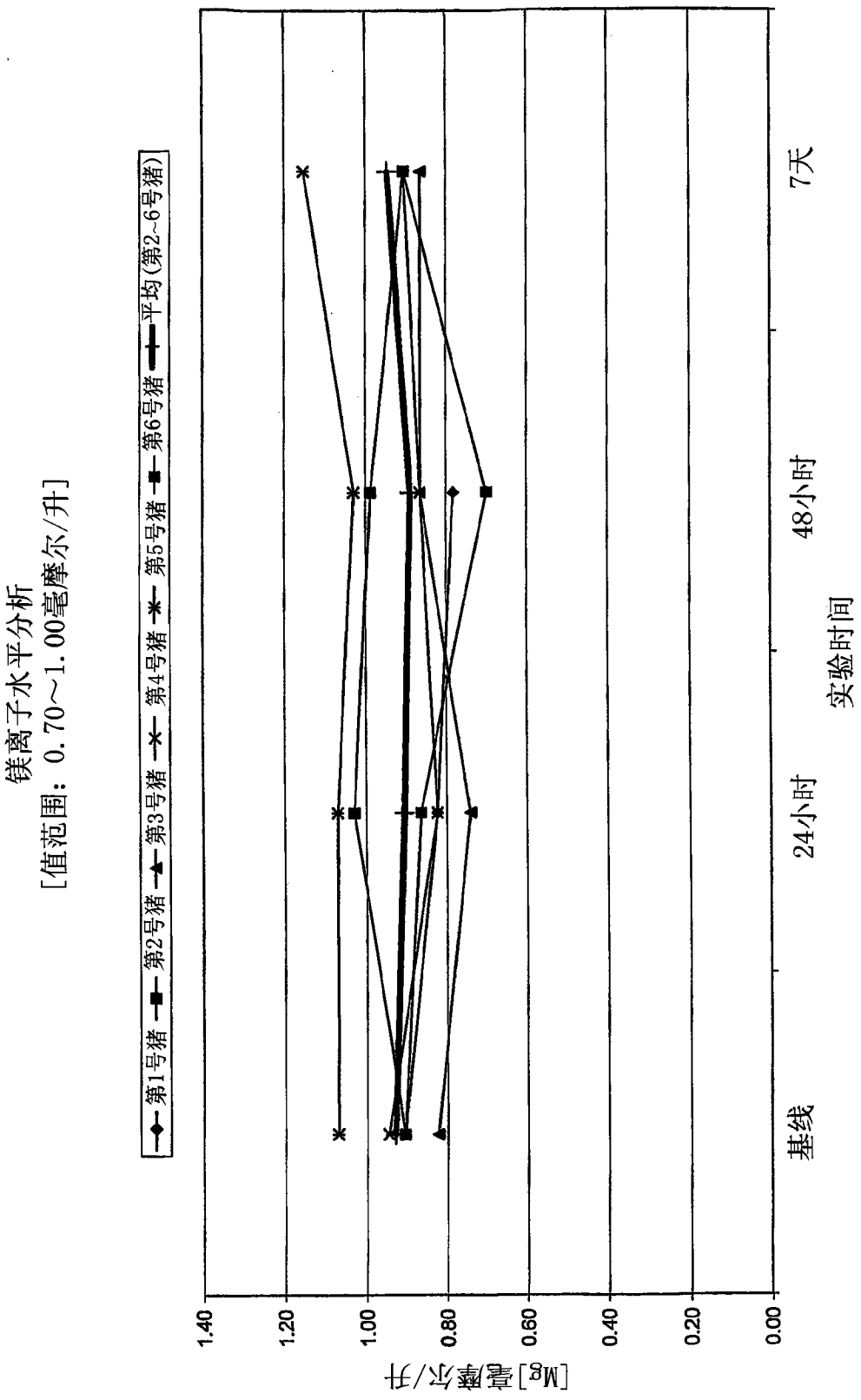

镁离子水平分析
[值范围：0.70～1.00毫摩尔/升]
第1号猪
第2号猪
第3号猪
第4号猪
第5号猪
第6号猪
平均(第2~6号猪)
1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
[Mg]毫摩尔/升
基线
24小时
48小时
7天
实验时间

图 5(d)

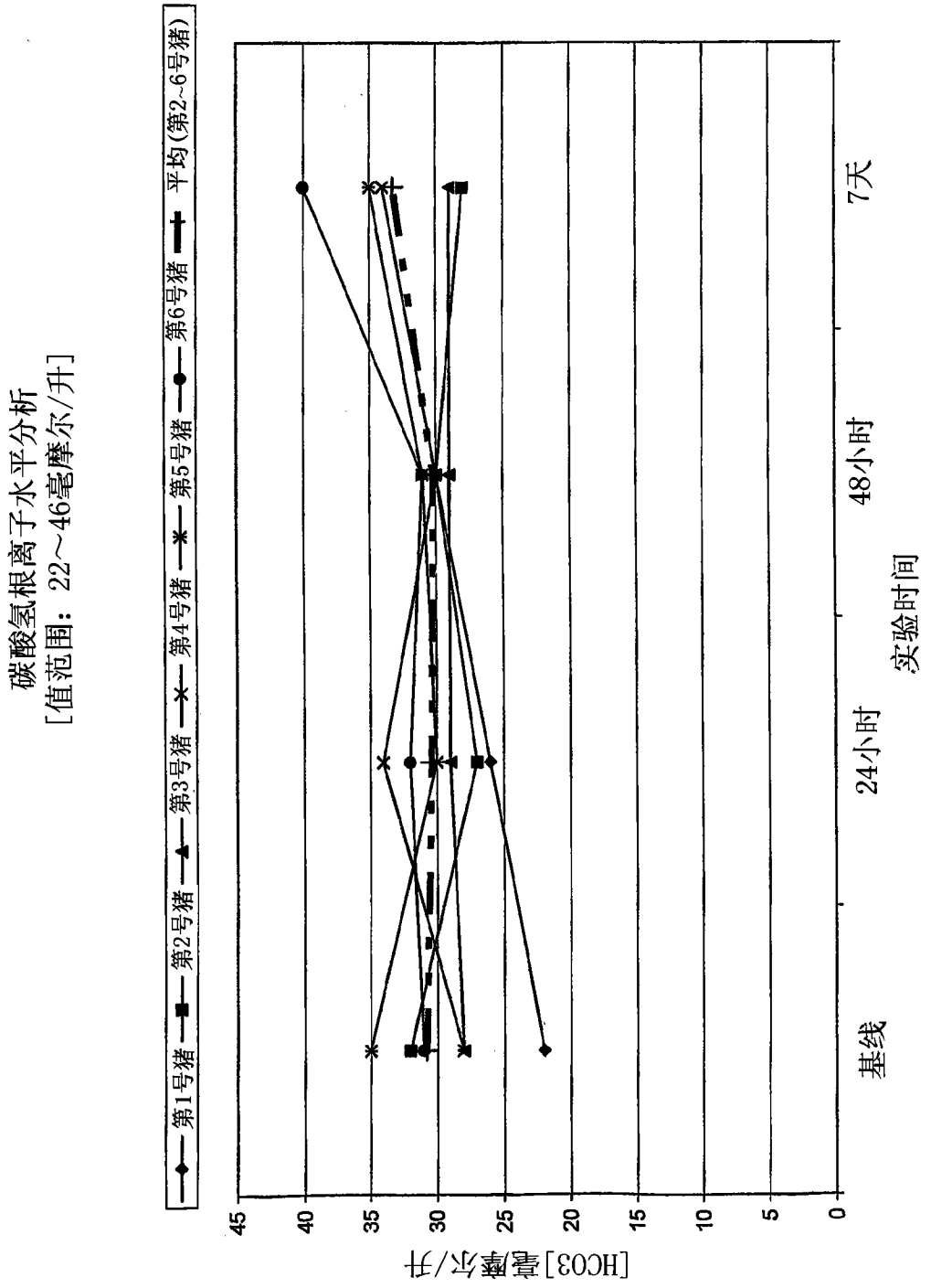

碳酸氢根离子水平分析
[值范围：22～46毫摩尔/升]
第1号猪
第2号猪
第3号猪
第4号猪
第5号猪
第6号猪
平均(第2~6号猪)
[HCO3]毫摩尔/升
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
基线
24小时
48小时
7天
实验时间

图 5(e)

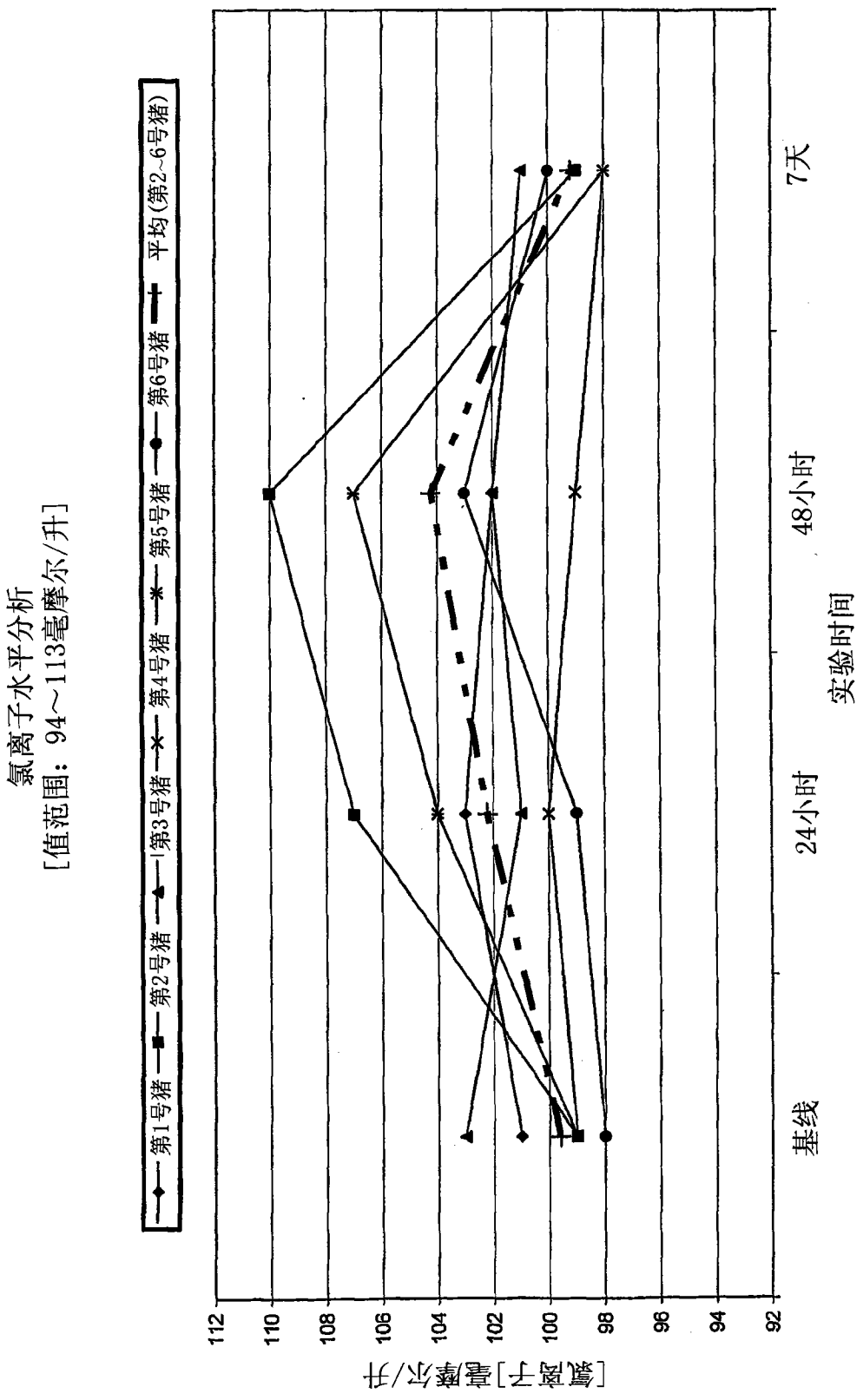

氯离子水平分析
[值范围：94～113毫摩尔/升]
第1号猪
第2号猪
第3号猪
第4号猪
第5号猪
第6号猪
平均(第2~6号猪)
[氯离子]毫摩尔/升
112
110
108
106
104
102
100
98
96
94
92
基线
24小时
48小时
7天
实验时间

图 5(f)

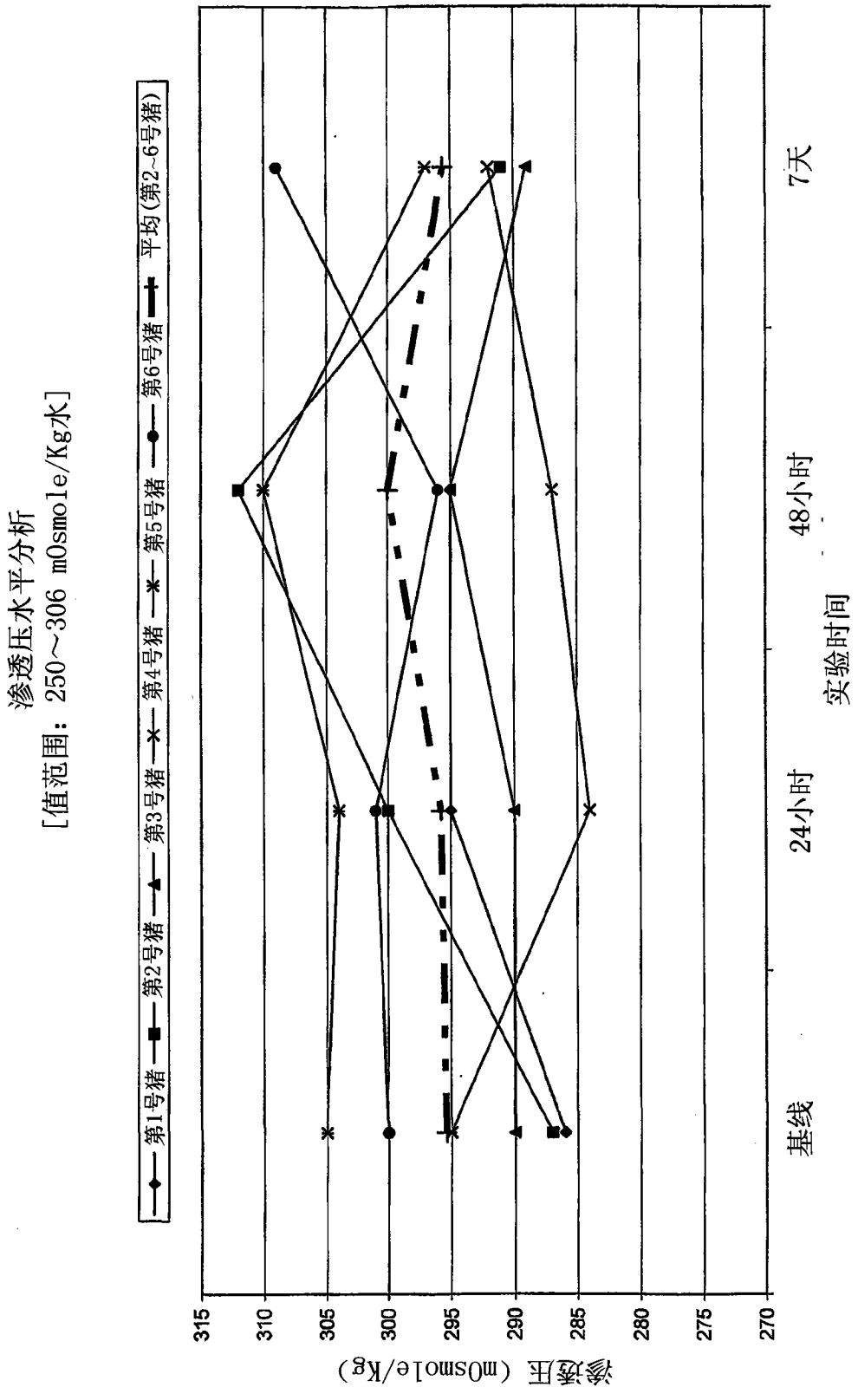

渗透压水平分析
[值范围：250～306 mOsmole/Kg水]
第1号猪
第2号猪
第3号猪
第4号猪
第5号猪
第6号猪
平均(第2~6号猪)
渗透压 (mOsmole/Kg)
315
310
305
300
295
290
285
280
275
270
基线
24小时
48小时
7天
实验时间

图 5(g)

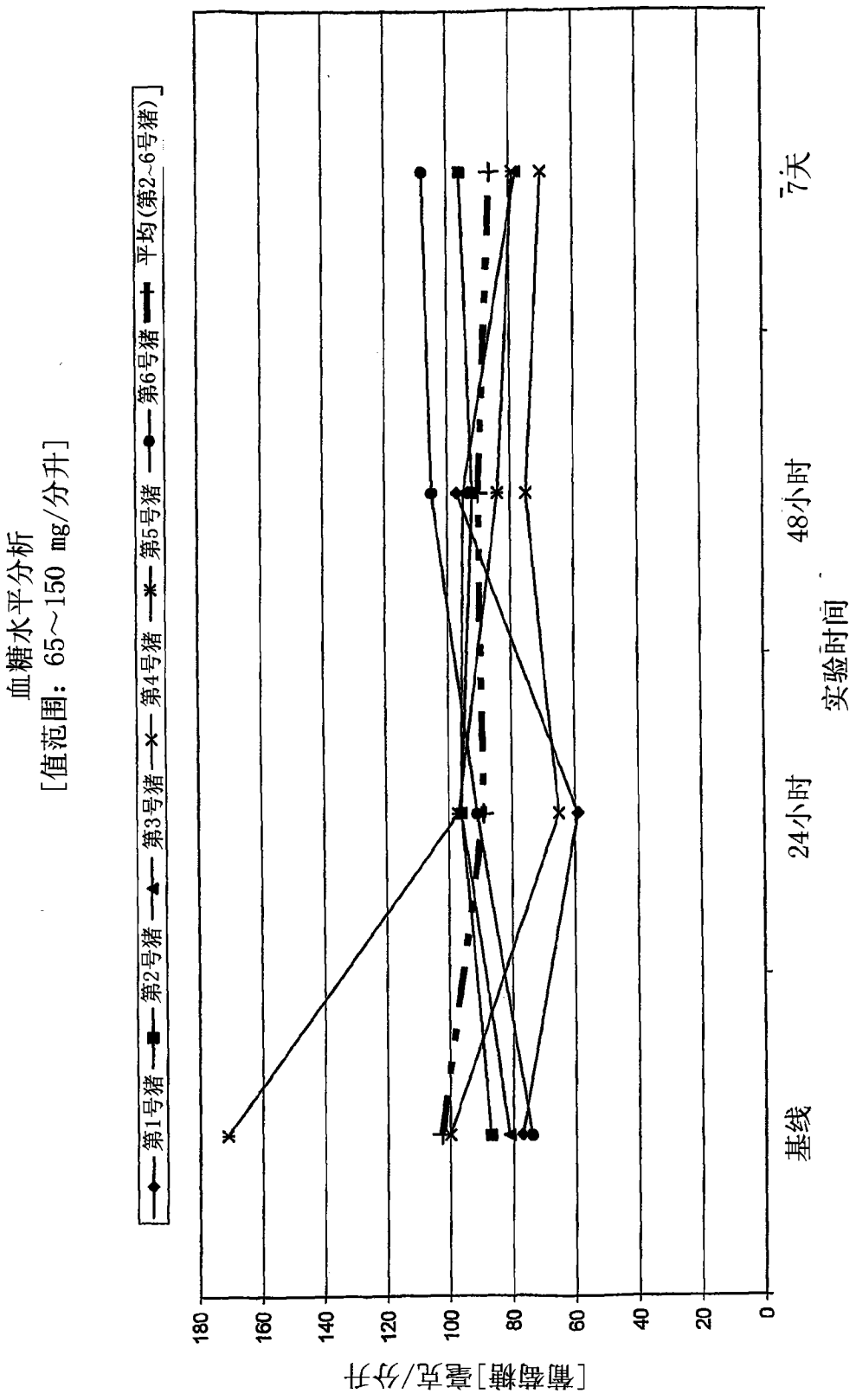

血糖水平分析
[值范围：65～150 mg/分升]
第1号猪
第2号猪
第3号猪
第4号猪
第5号猪
第6号猪
平均(第2~6号猪)
[葡萄糖]毫克/分升
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
基线
24小时
48小时
7天
实验时间

图 6(a)

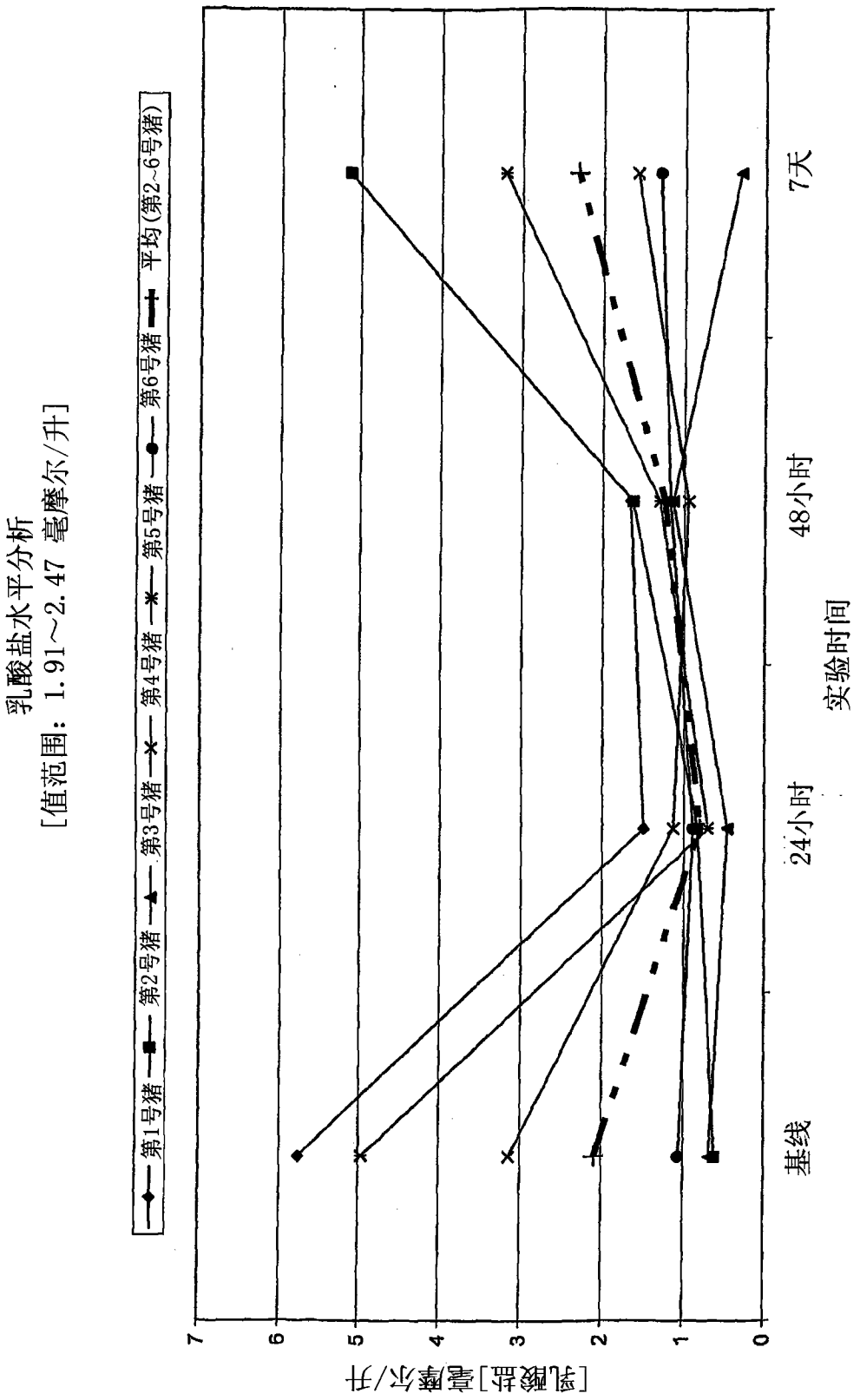

乳酸盐水平分析
[值范围：1.91～2.47 毫摩尔/升]
第1号猪
第2号猪
第3号猪
第4号猪
第5号猪
第6号猪
平均(第2~6号猪)
[乳酸盐]毫摩尔/升
0
1
2
3
4
5
6
7
基线
24小时
48小时
7天
实验时间

图 6(b)

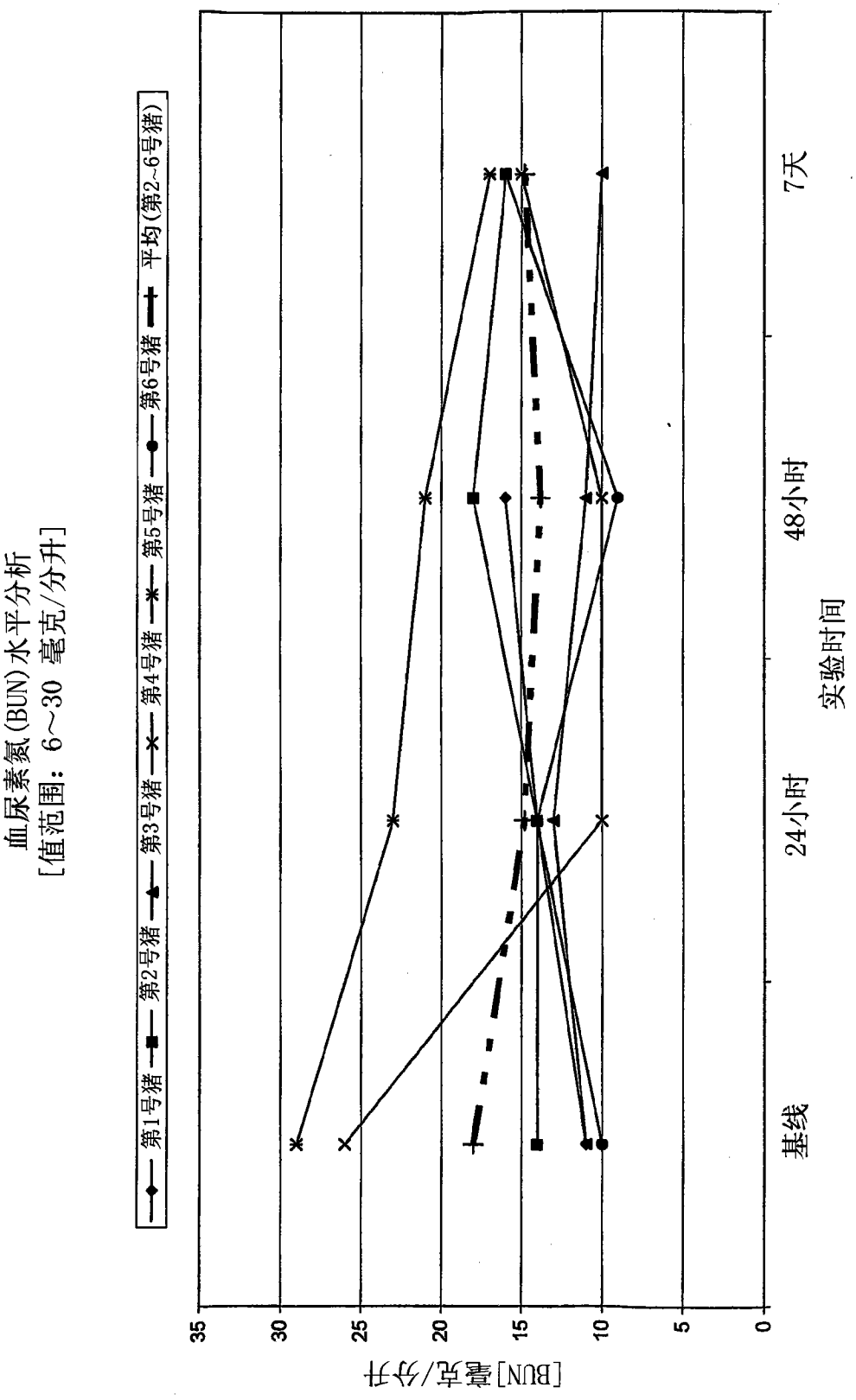

血尿素氮(BUN)水平分析
[值范围：6～30 毫克/分升]
第1号猪
第2号猪
第3号猪
第4号猪
第5号猪
第6号猪
平均(第2~6号猪)
[BUN]毫克/分升
35
30
25
20
15
10
5
0
基线
24小时
48小时
7天
实验时间

图 6(c)

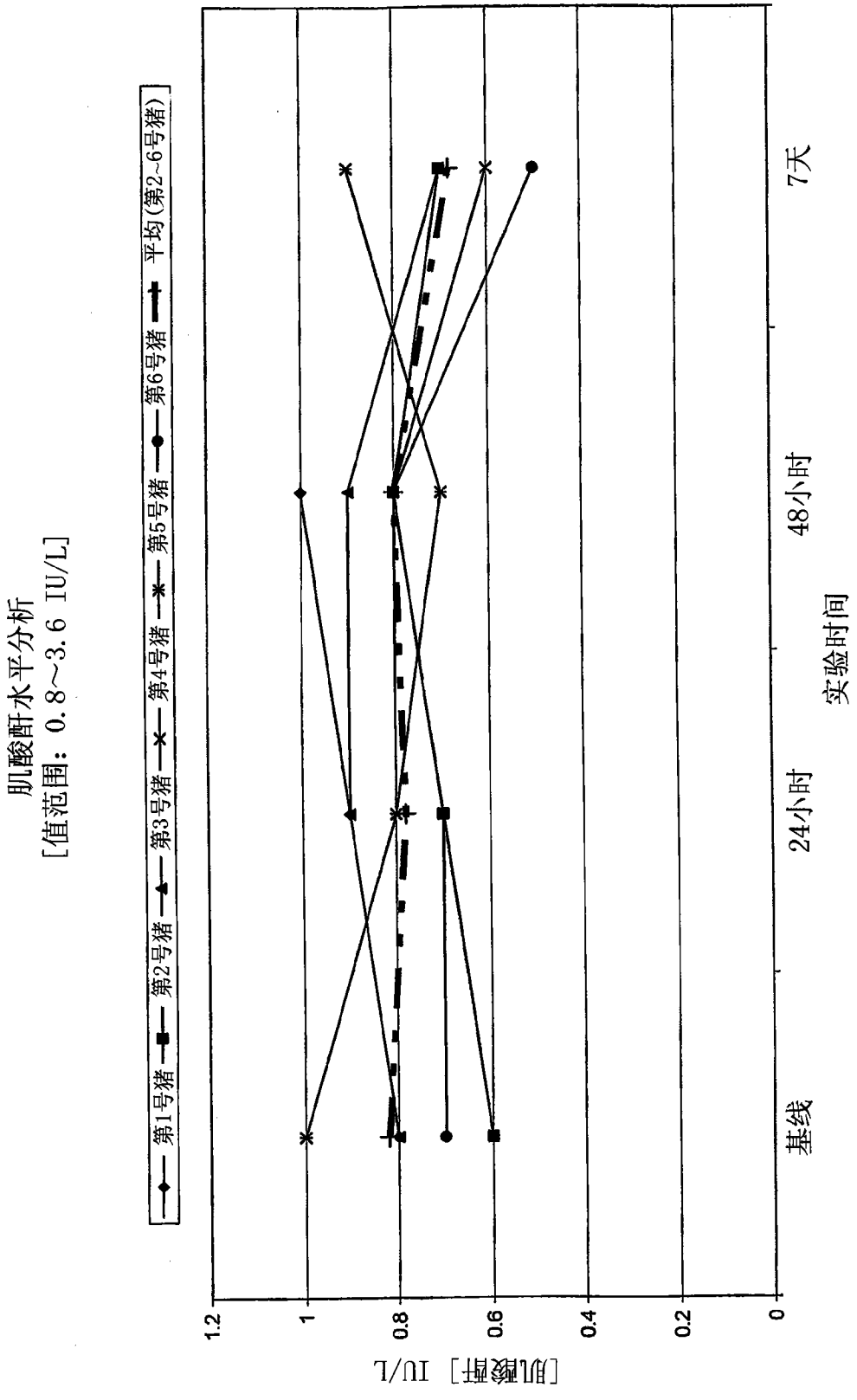

肌酸酐水平分析
[值范围：0.8～3.6 IU/L]
第1号猪
第2号猪
第3号猪
第4号猪
第5号猪
第6号猪
平均(第2~6号猪)
[肌酸酐] IU/L
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
基线
24小时
48小时
7天
实验时间

图 6(d)

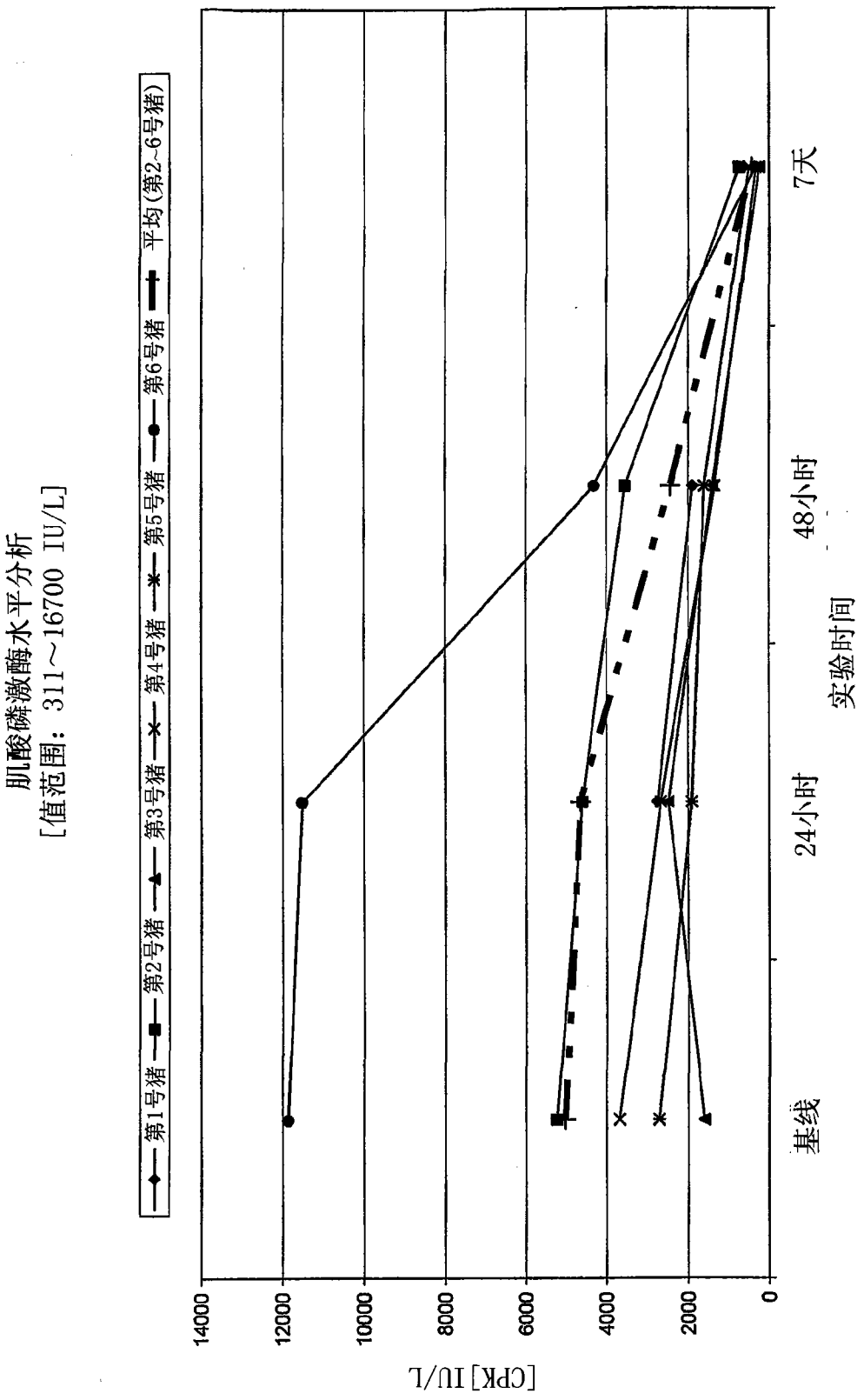

肌酸磷酸激酶水平分析
[值范围：311～16700 IU/L]
第1号猪
第2号猪
第3号猪
第4号猪
第5号猪
第6号猪
平均(第2~6号猪)
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
[CPK] IU/L
基线
24小时
48小时
7天
实验时间

图 7(a)

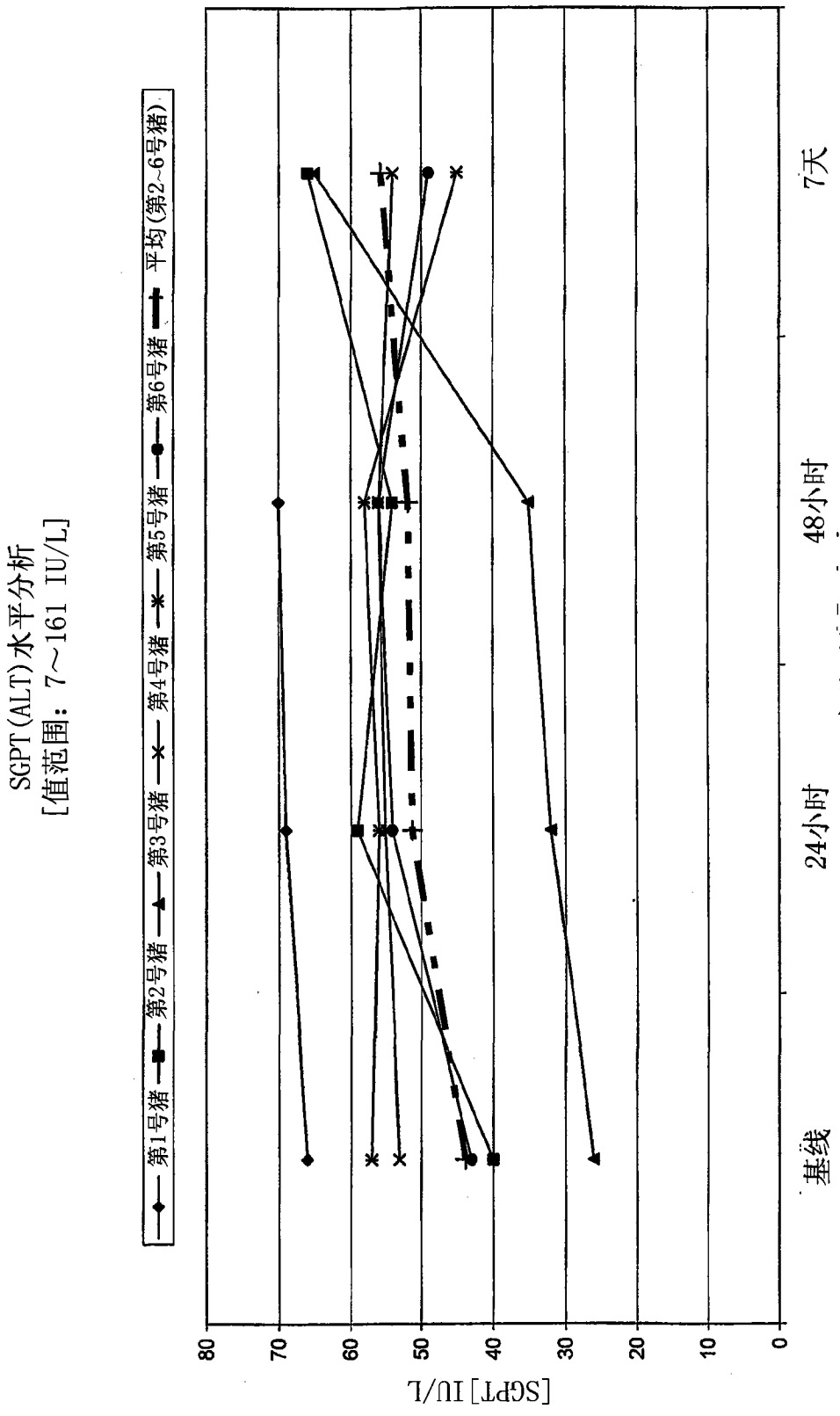

SGPT(ALT)水平分析
[值范围：7～161 IU/L]
第1号猪
第2号猪
第3号猪
第4号猪
第5号猪
第6号猪
平均(第2~6号猪)
[SGPT] IU/L
80
70
60
50
40
30
20
10
0
基线
24小时
48小时
7天
实验时间

图 7(b)

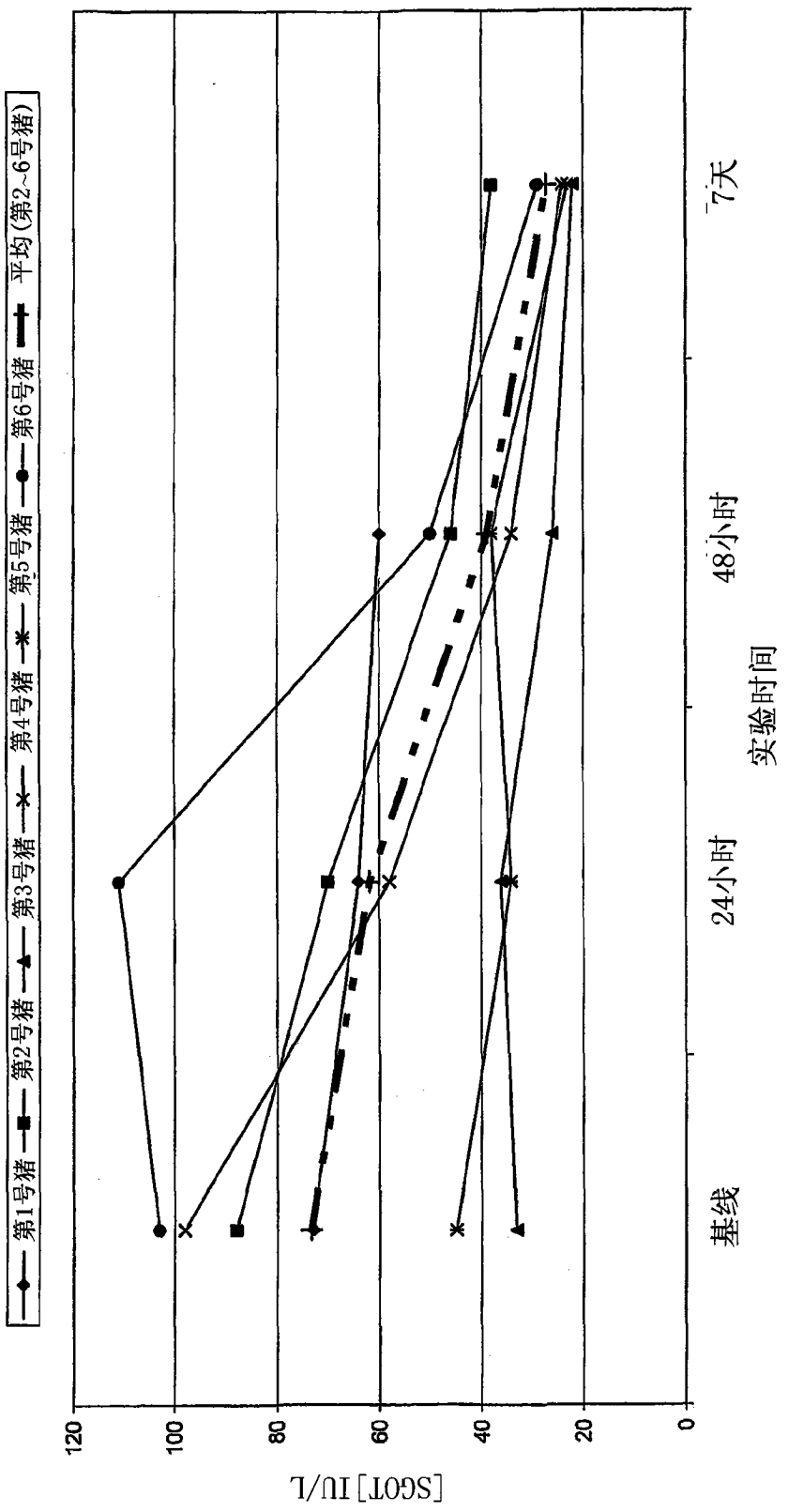

SGOT(AST)水平分析
[值范围：29～1140 IU/L]
第1号猪
第2号猪
第3号猪
第4号猪
第5号猪
第6号猪
平均(第2~6号猪)
[SGOT] IU/L
120
100
80
60
40
20
0
基线
24小时
48小时
7天
实验时间

图 7(c)

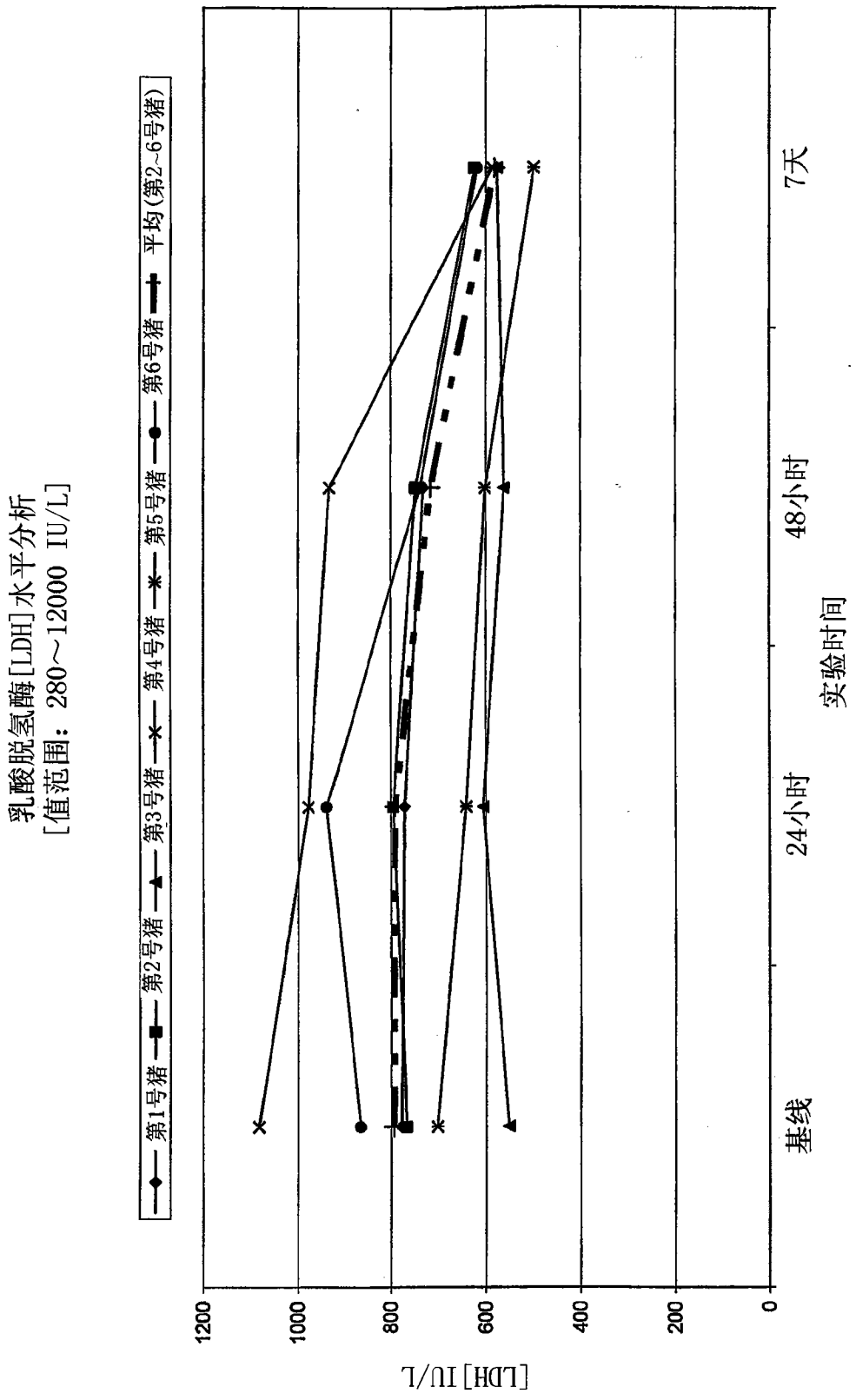

乳酸脱氢酶[LDH]水平分析
[值范围：280～12000 IU/L]
第1号猪
第2号猪
第3号猪
第4号猪
第5号猪
第6号猪
平均(第2~6号猪)
[LDH] IU/L
1200
1000
800
600
400
200
0
基线
24小时
48小时
7天
实验时间

图 7(d)

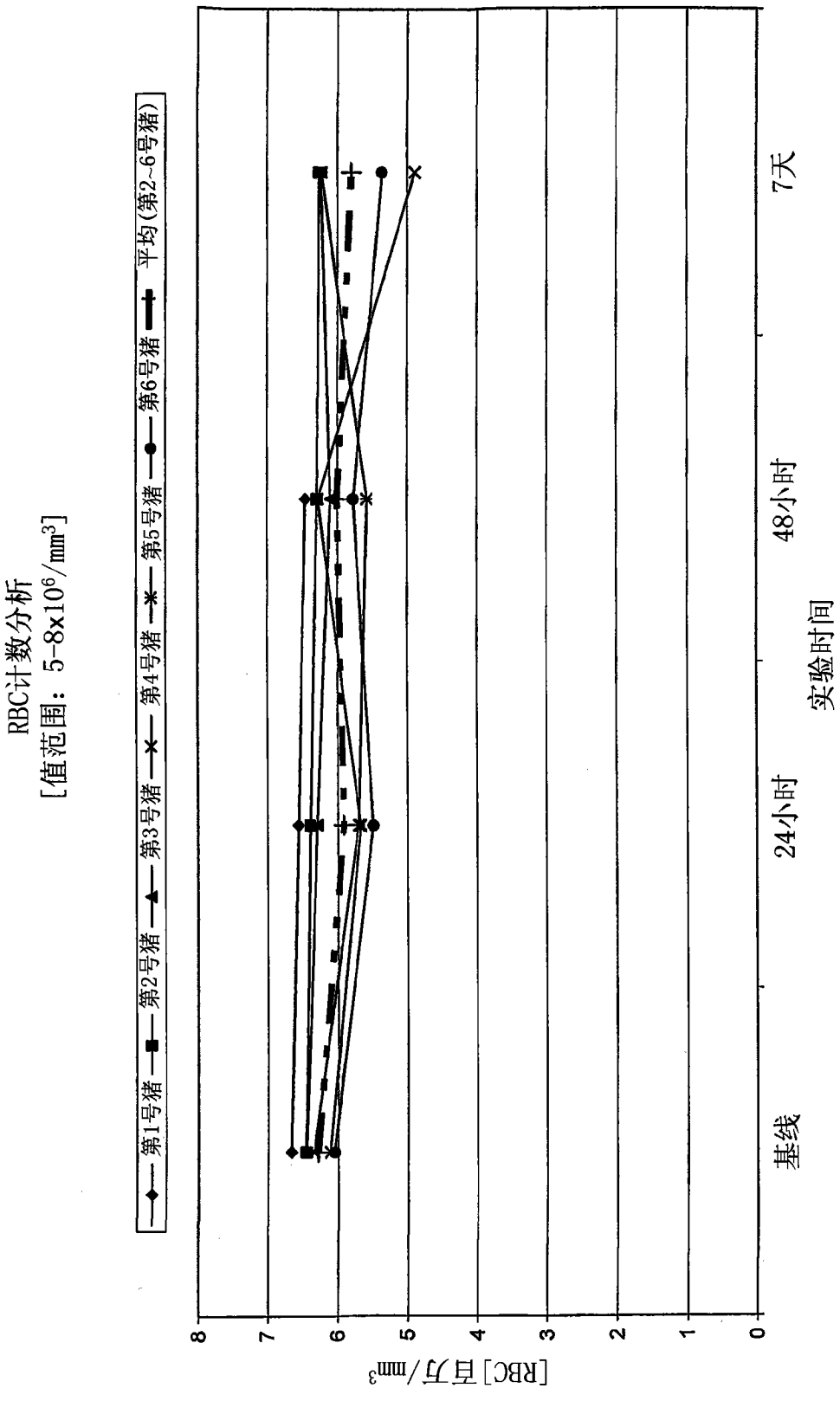

RBC计数分析
[值范围：5-8x10⁶/mm³]
第1号猪
第2号猪
第3号猪
第4号猪
第5号猪
第6号猪
平均(第2-6号猪)
[RBC]百万/mm³
0
1
2
3
4
5
6
7
8
基线
24小时
48小时
7天
实验时间

图 8(a)

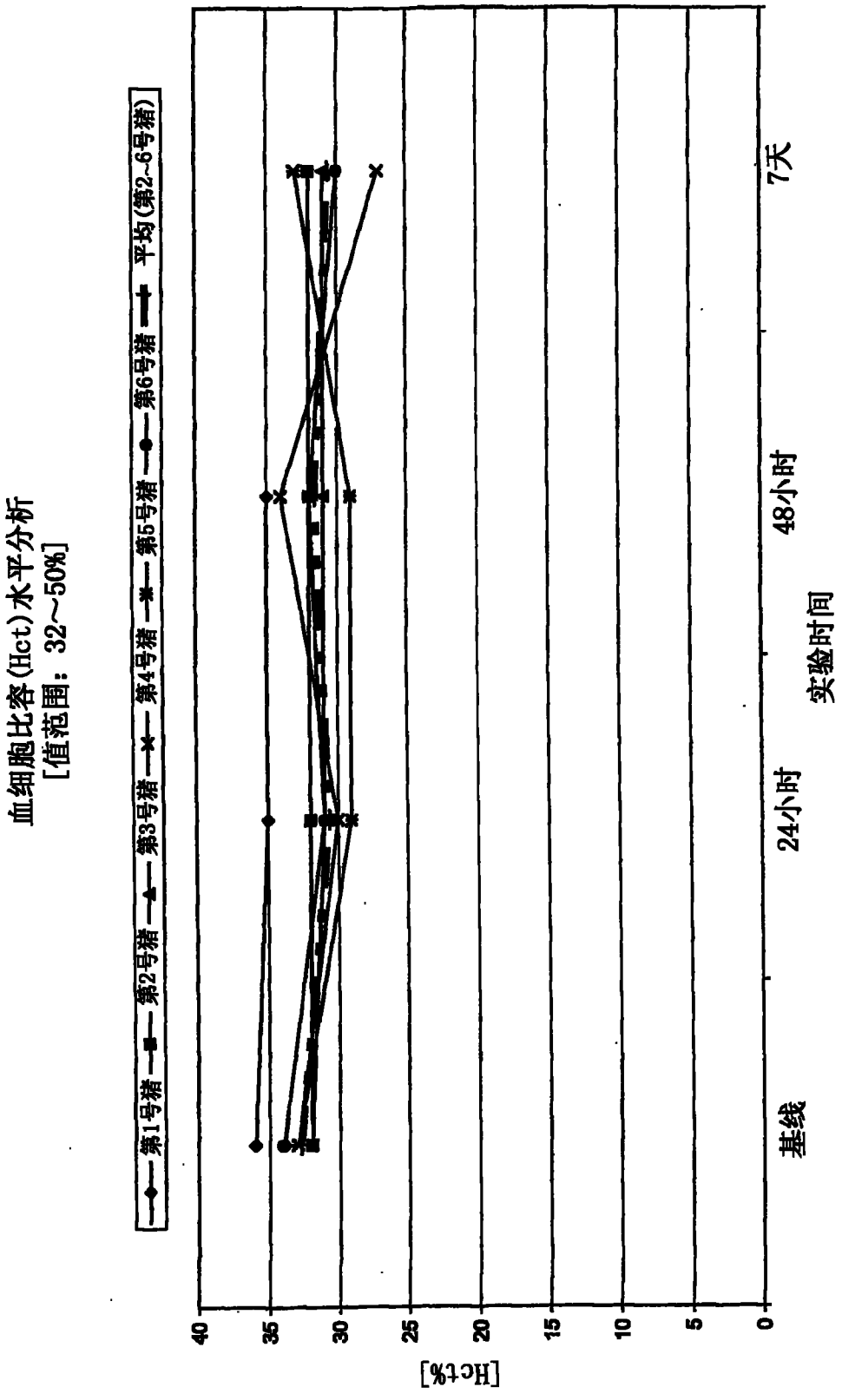

血细胞比容(Hct)水平分析
[值范围：32~50%]
第1号猪
第2号猪
第3号猪
第4号猪
第5号猪
第6号猪
平均(第2-6号猪)
[Hct%]
40
35
30
25
20
15
10
5
0
基线
24小时
48小时
7天
实验时间

图 8(b)

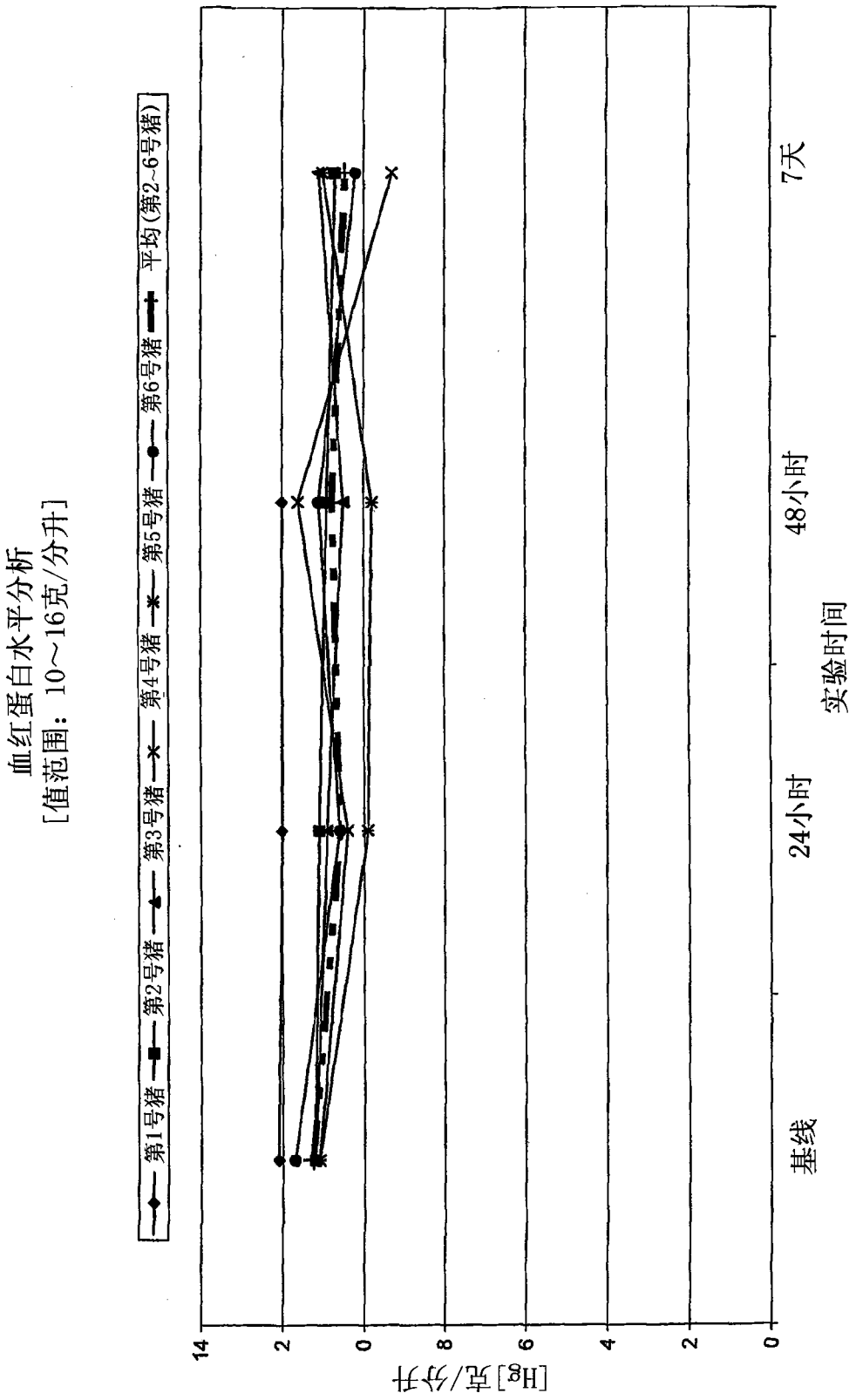

血红蛋白水平分析
[值范围：10～16克/分升]
第1号猪
第2号猪
第3号猪
第4号猪
第5号猪
第6号猪
平均(第2~6号猪)
14
2
0
8
6
4
2
0
[Hg]克/分升
基线
24小时
48小时
7天
实验时间

图 8(c)

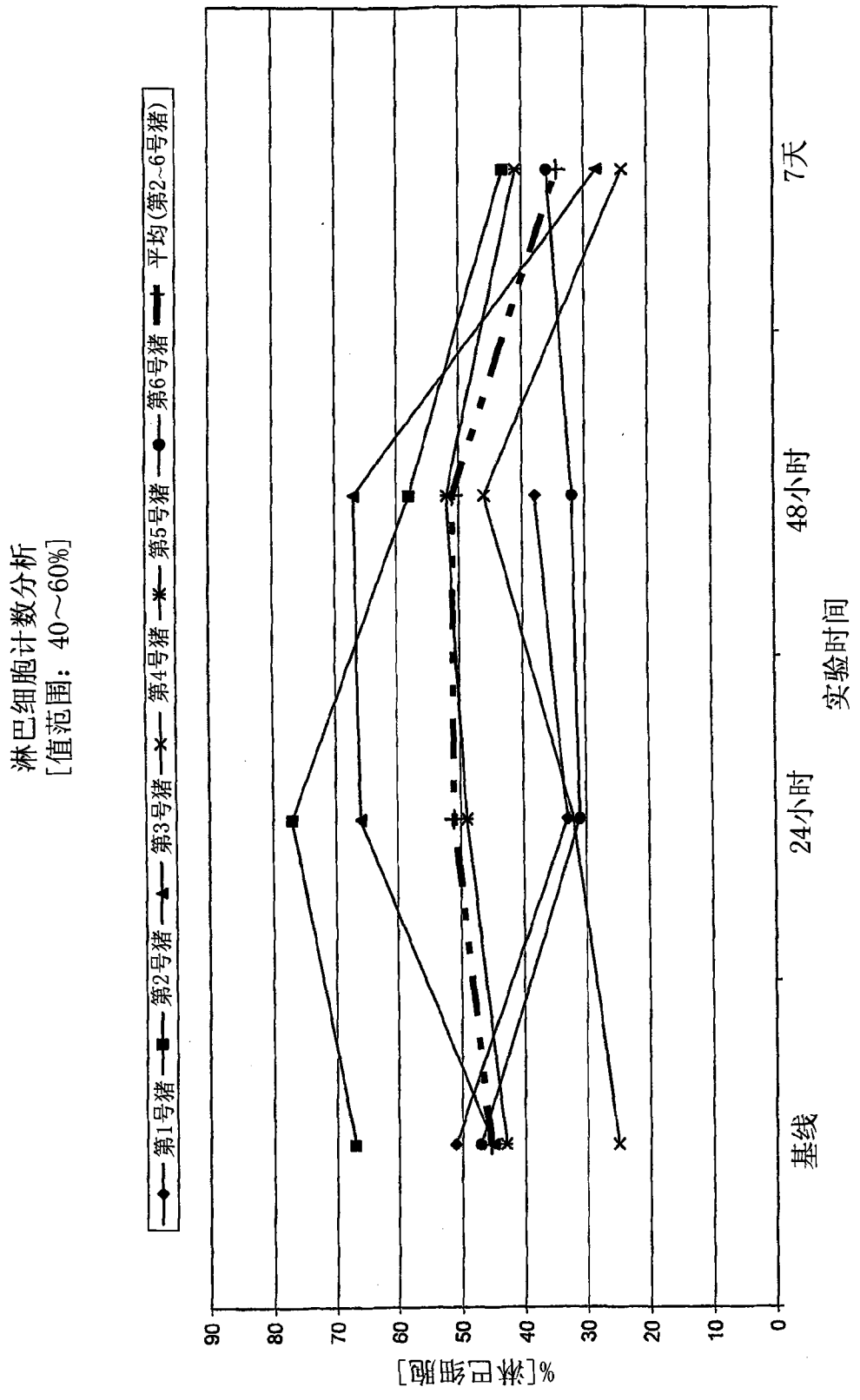

淋巴细胞计数分析
[值范围：40～60%]
第1号猪
第2号猪
第3号猪
第4号猪
第5号猪
第6号猪
平均(第2~6号猪)
%[淋巴细胞]
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
基线
24小时
48小时
7天
实验时间

图 8(d)

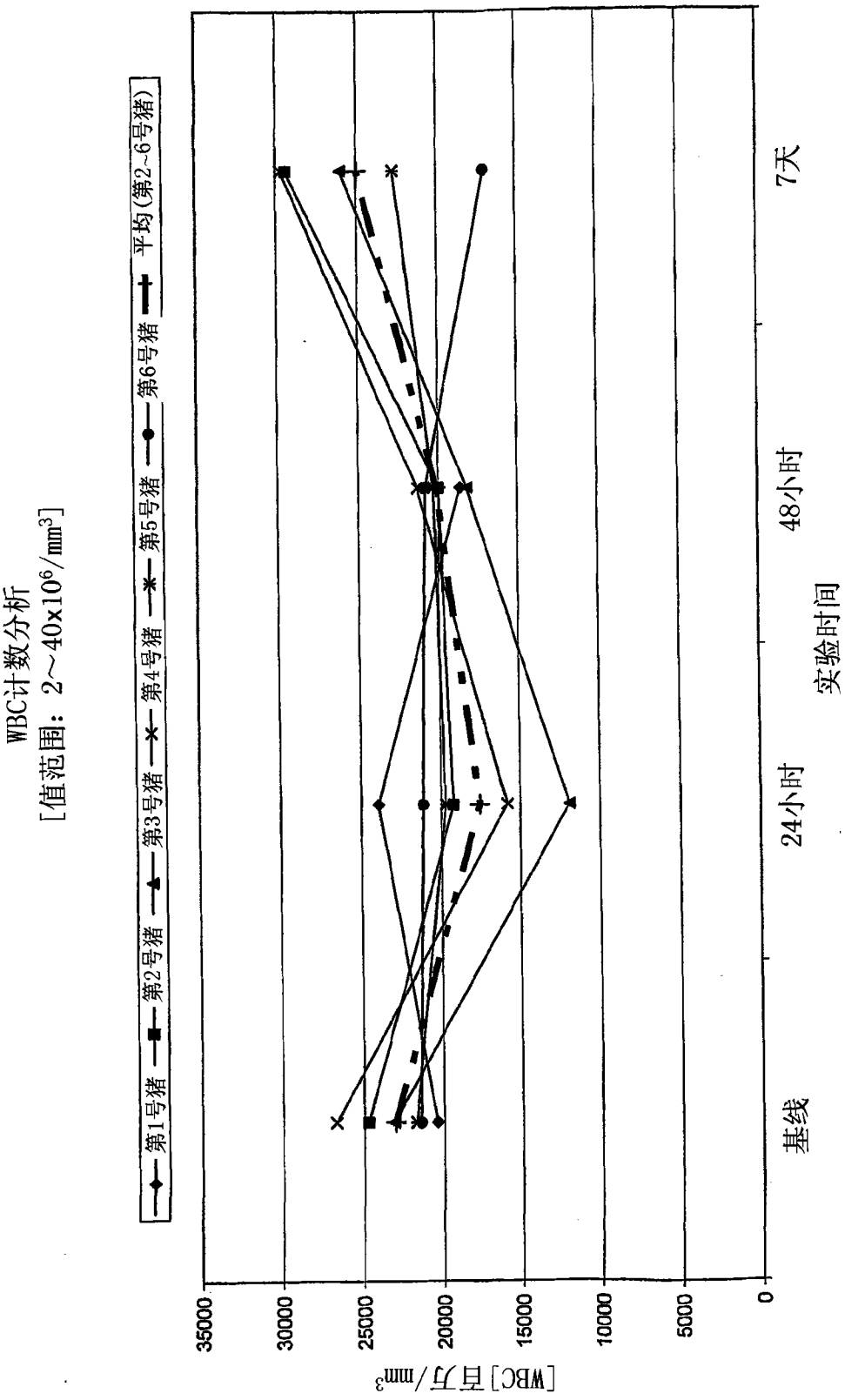

WBC计数分析
[值范围：2～40x10⁶/mm³]
第1号猪
第2号猪
第3号猪
第4号猪
第5号猪
第6号猪
平均(第2~6号猪)
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
[WBC]百万/mm³
基线
24小时
48小时
7天
实验时间

图 8(e)

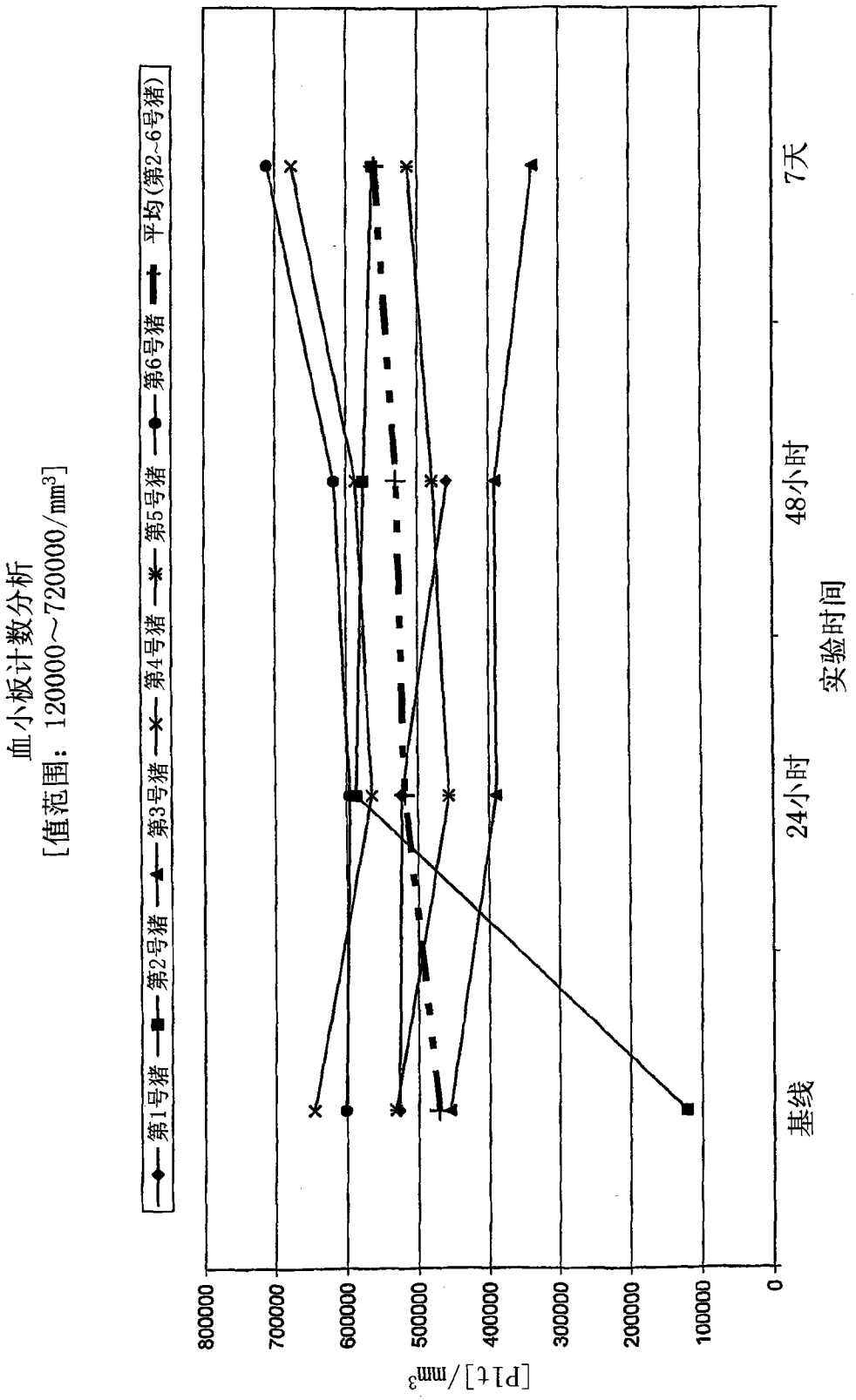

血小板计数分析
[值范围：120000～720000/mm3]
第1号猪
第2号猪
第3号猪
第4号猪
第5号猪
第6号猪
平均(第2~6号猪)
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
[Plt]/mm3
基线
24小时
48小时
7天
实验时间

图 9(a)

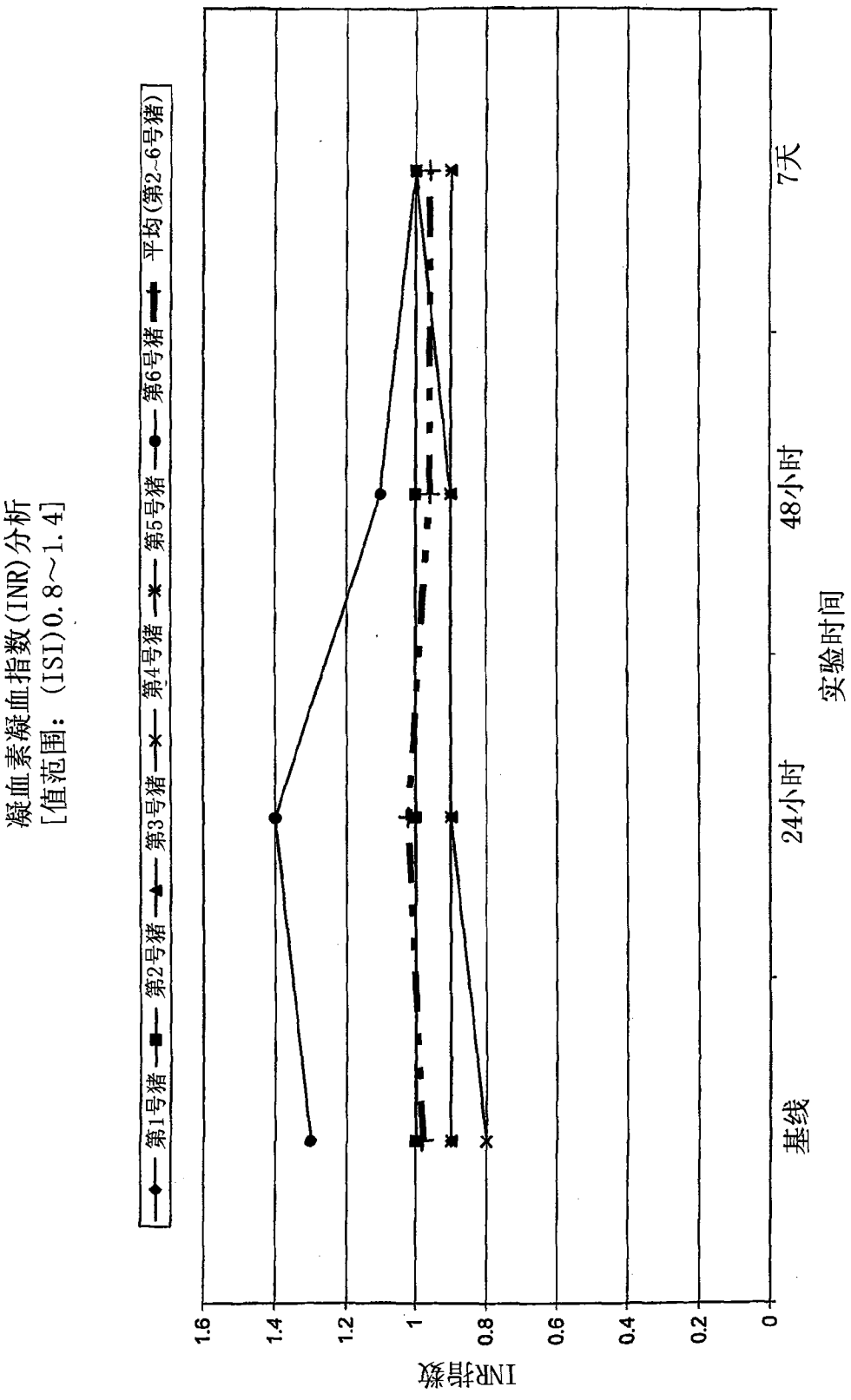

凝血素凝血指数(INR)分析
[值范围：(ISI)0.8～1.4]
第1号猪
第2号猪
第3号猪
第4号猪
第5号猪
第6号猪
平均(第2~6号猪)
INR指数
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
基线
24小时
48小时
7天
实验时间

图 9(b)

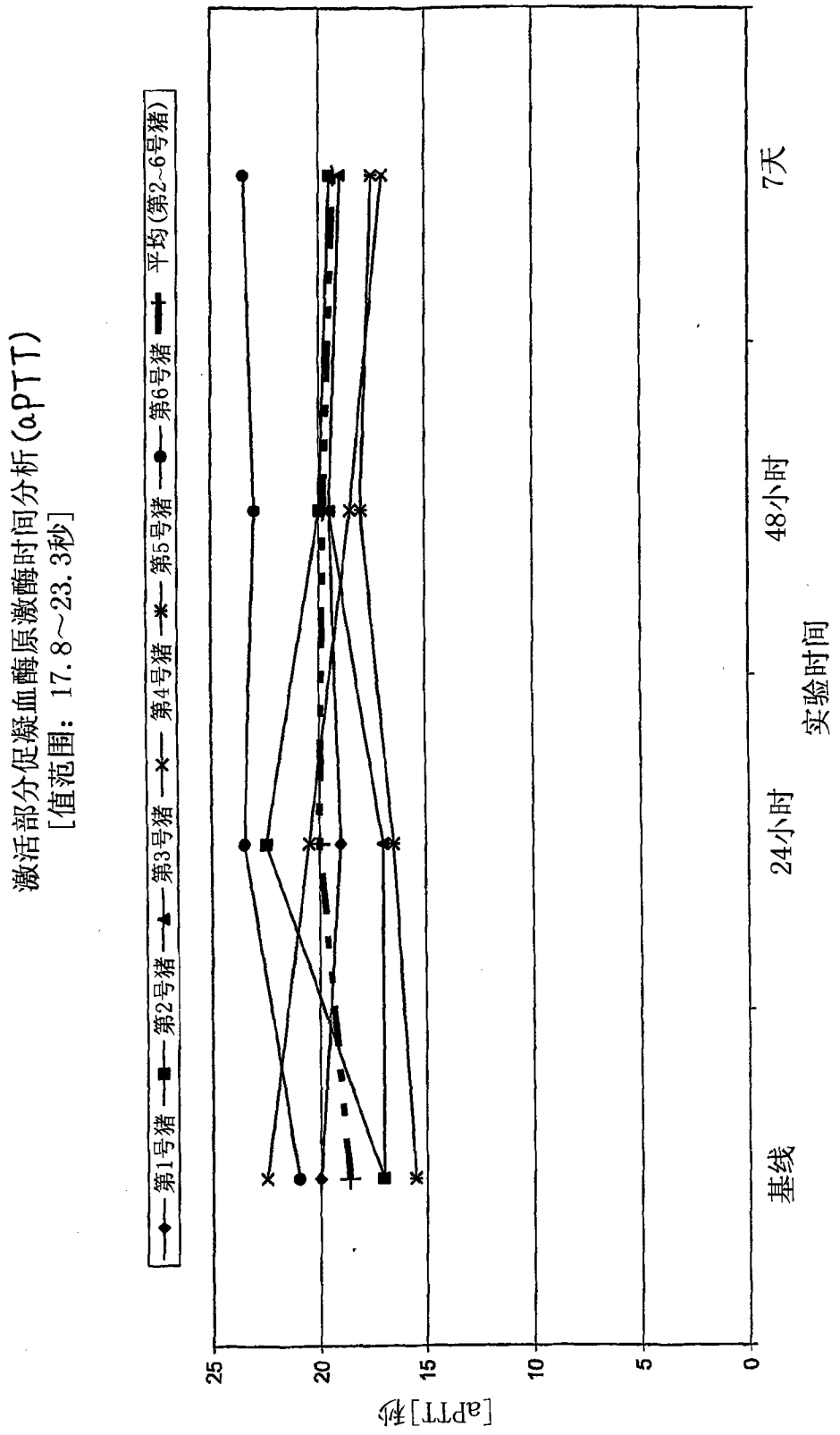

激活部分促凝血酶原激酶时间分析(aPTT)
[值范围：17.8～23.3秒]
第1号猪
第2号猪
第3号猪
第4号猪
第5号猪
第6号猪
平均(第2~6号猪)
[aPTT]秒
25
20
15
10
5
0
基线
24小时
48小时
7天
实验时间

图 9(c)

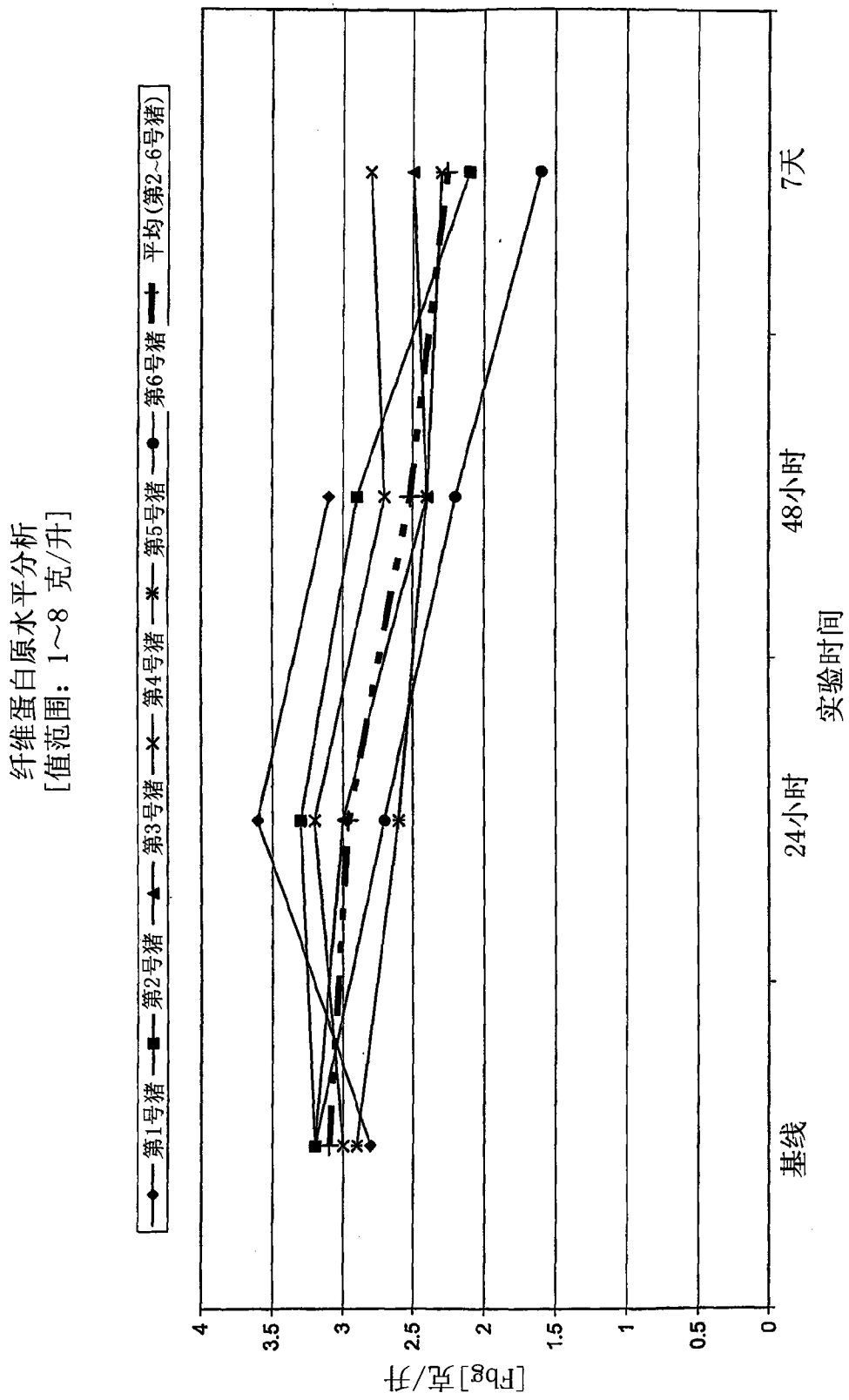

纤维蛋白原水平分析
[值范围：1~8 克/升]
第1号猪
第2号猪
第3号猪
第4号猪
第5号猪
第6号猪
平均(第2~6号猪)
[Fbg]克/升
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
基线
24小时
48小时
7天
实验时间

图 9(d)

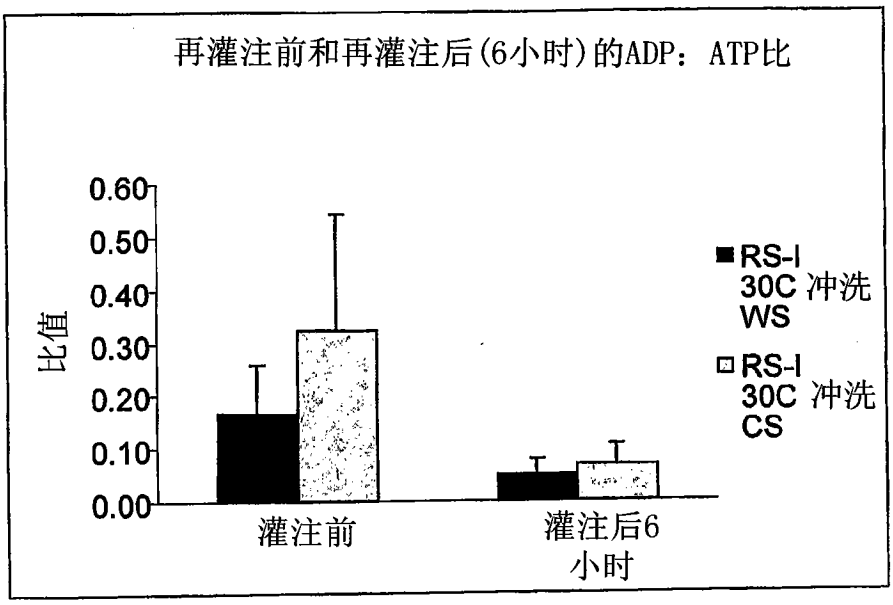

再灌注前和再灌注后(6小时)的ADP：ATP比
比值
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
灌注前
灌注后6小时
RS-I 30C 冲洗 WS
RS-I 30C 冲洗 CS

图 10

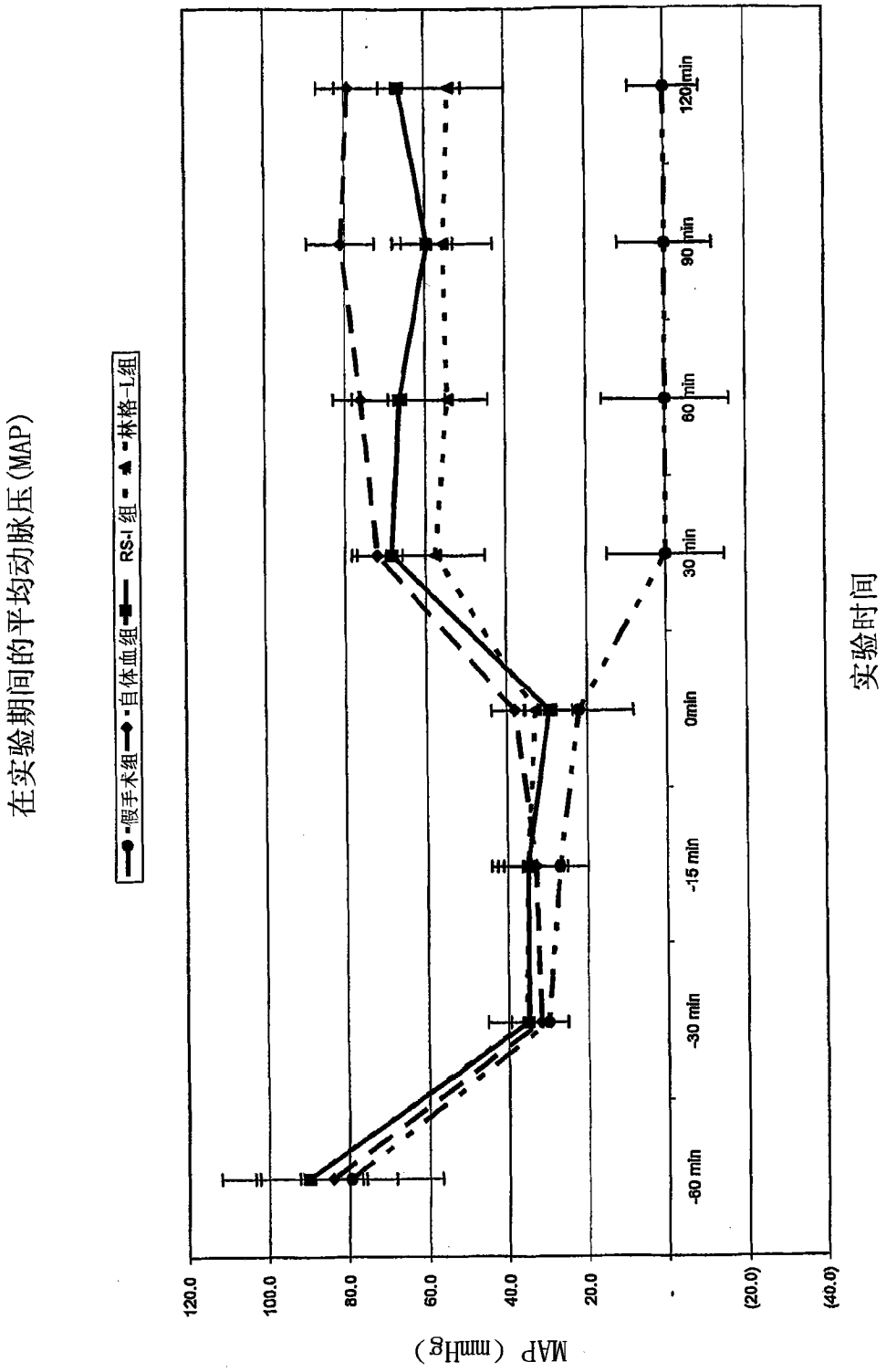

在实验期间的平均动脉压(MAP)
假手术组
自体血组
RS-I 组
林格-L组
MAP (mmHg)
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
(20.0)
(40.0)
-60 min
-30 min
-15 min
0min
30 min
60 min
90 min
120min
实验时间

图 11

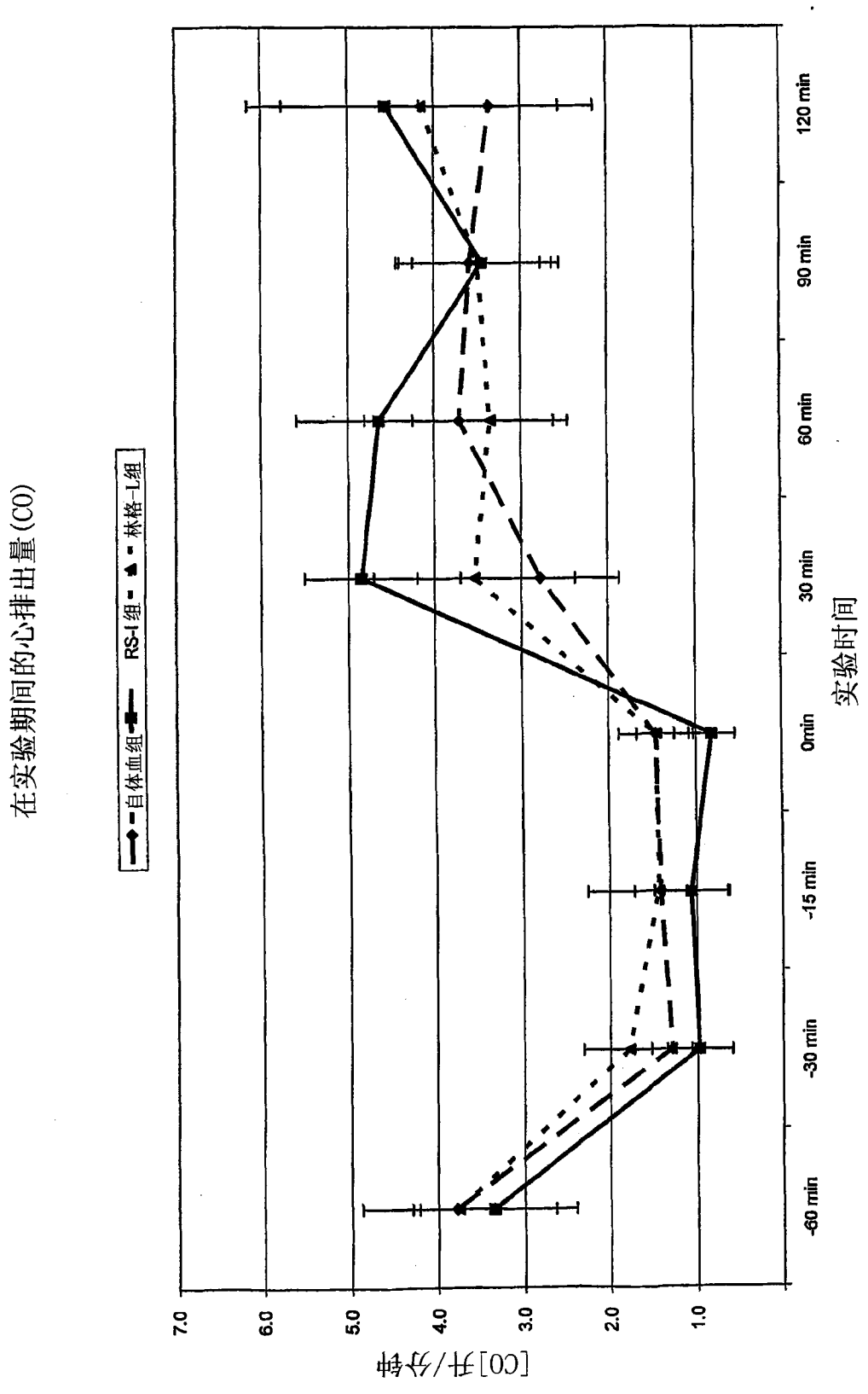

在实验期间的心排出量(CO)
自体血组
RS-I组
林格-L组
[CO]升/分钟
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
-60 min
-30 min
-15 min
0min
30 min
60 min
90 min
120 min
实验时间

图 12

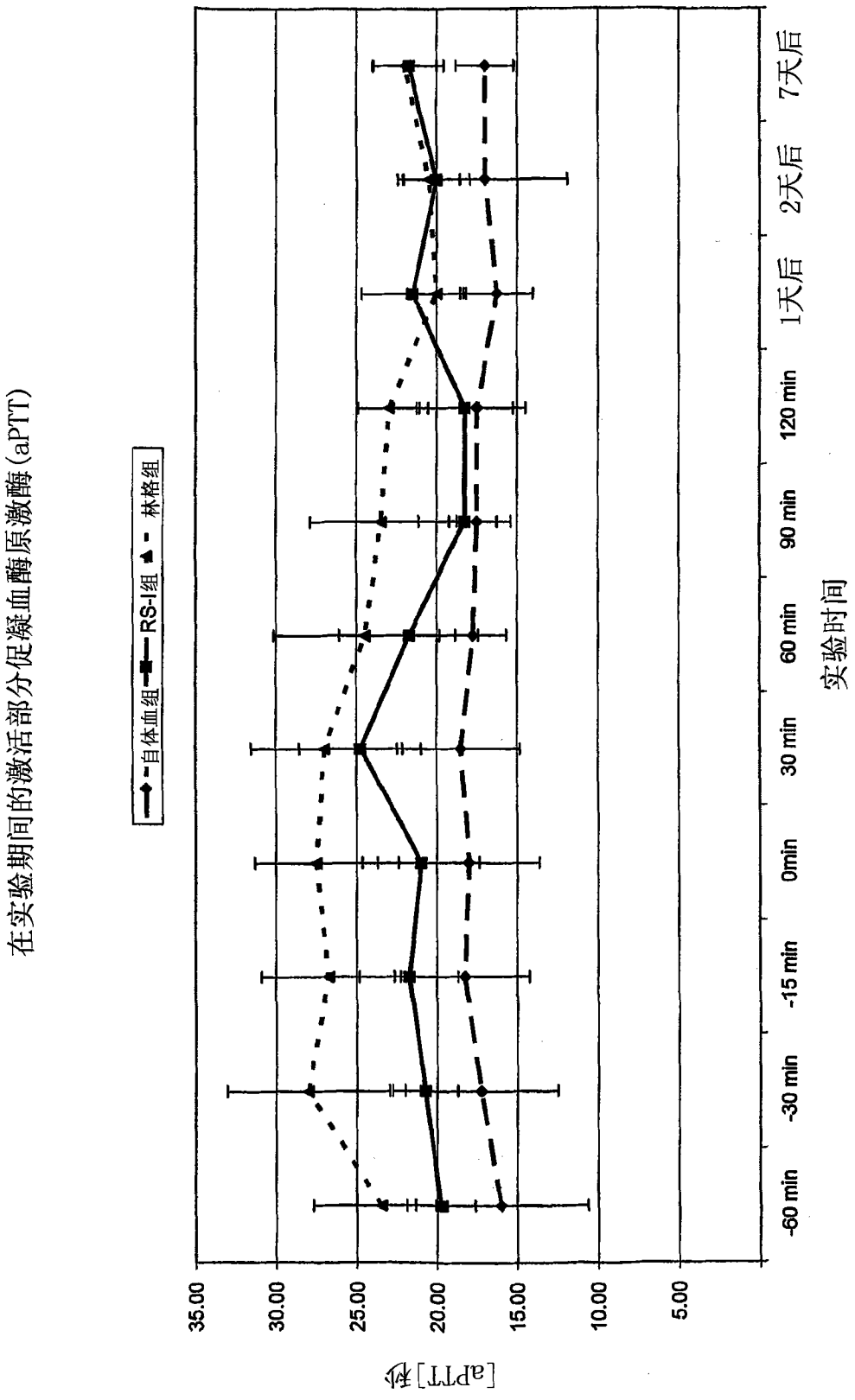

在实验期间的激活部分促凝血酶原激酶(aPTT)
自体血组
RS-I组
林格组
35.00
30.00
25.00
20.00
15.00
10.00
5.00
[aPTT]秒
-60 min
-30 min
-15 min
0min
30 min
60 min
90 min
120 min
1天后
2天后
7天后
实验时间

图 13