(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 103781488 A
(43)申请公布日 2014.05.07

(21)申请号 201280036457.7
(22)申请日 2012.07.23
(30)优先权数据
11006057.1 2011.07.23 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.01.22
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2012/003086 2012.07.23
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2013/013799 EN 2013.01.31
(71)申请人 萨斯托米德股份有限公司
地址 德国乔治马琳
(72)发明人 迈克尔·桑德尔
哈拉尔德·波茨史克
(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002
代理人 张晶 刘成春
(51)Int.Cl.
A61K 38/42(2006.01)
A61K 33/00(2006.01)
A61P 17/02(2006.01)

权利要求书2页 说明书14页 附图1页

(54)发明名称

伤口喷剂

(57)摘要

本发明涉及一种组合物，其含有：血红蛋白或肌红蛋白和至少一种其他成分，其中在至少40%的所述血红蛋白或肌红蛋白中，氧结合位点带有非$-O_2$配体；本发明还涉及制备所述组合物的方法以及带有非氧配体的血红蛋白或肌红蛋白用于伤口的外部治疗的用途。

CN 103781488 A

1. 一种组合物，包括：

(a) 氧载体，优选血红蛋白或肌红蛋白，其中在至少 40% 的所述氧载体中，氧结合位点带有非 $-O_2$ 配体，以及

(b) 至少一种其他成分，选自电解质防腐剂、稳定剂、抗絮凝剂、抗凝剂、pH 缓冲剂、溶剂、抗氧化剂、成膜剂或交联剂。

2. 根据权利要求 1 所述的组合物，其特征在于，所述组合物是水性或有机溶液。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的组合物，其特征在于，至少 50%、优选至少 60%、更优选至少 70%、还更优选至少 80%、特别优选至少 90% 的所述氧载体以带有配体的形式提供。

4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的组合物，其特征在于，所述配体选自一氧化碳和一氧化氮。

5. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的组合物，其特征在于，所述氧载体是血红蛋白或肌红蛋白，优选天然存在的人或动物来源的血红蛋白或肌红蛋白，或者是人工处理的、交联或修饰的人或动物来源的血红蛋白或肌红蛋白。

6. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的组合物，其以灭菌的形式提供。

7. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的组合物，其提供于喷罐，优选压力包装喷罐中。

8. 权利要求 1-7 中任一项所述的组合物，用于伤口的外部治疗。

9. 用于制备权利要求 1-8 中任一项所述的组合物的方法，其中 (i) 所述氧载体在从其天然环境分离的过程中或分离后携带有保护配体，(ii) 加入至少一种其他成分 (b)，(iii) 任选地，对所述组合物灭菌，以及 (iv) 包装所述组合物，优选包装于喷罐中。

10. 根据权利要求 9 的所述方法，其中在步骤 (iii) 中通过加热、过滤、离心、加入防腐剂、蒸汽应用、气体应用或 UV 应用、或它们之中的至少两种的组合对所述组合物灭菌。

11. 在其氧结合位点上带有非 O_2 配体的血红蛋白或肌红蛋白在制备用于伤口的外部治疗的药物或组合物中的用途。

12. 在其氧结合位点上带有非 O_2 配体的血红蛋白或肌红蛋白用于伤口的外部治疗的方法。

13. 根据权利要求 8 所述的组合物，或者权利要求 11 或 12 所述的应用，其特征在于，待治疗的伤口是慢性伤口、手术伤口、损伤伤口、外伤后的伤口、开放性伤口、慢性伤口、愈合不良的伤口或低氧伤口、由动脉血管的退化或狭窄引起的伤口、由糖尿病引起的伤口、由慢性静脉功能不全引起的伤口或褥疮伤口或热灼伤、化学灼伤或冰冻灼伤的灼伤伤口或烫伤。

14. 用于从全血纯化氧载体的方法，所述氧载体是血红蛋白或肌红蛋白，所述方法包括以下步骤：

a. 分离全血的血浆；

b. 裂解红细胞；

c. 使所述氧载体携带配体；

d. 将样品加热至 40℃ -85℃的温度；

e. 将所述氧载体与任何不需要的血成分分开，

其中步骤 (e) 包括至少一个过滤步骤。

15. 根据权利要求 14 所述的方法，其特征在于，所述配体是一氧化碳或一氧化氮。

16. 根据权利要求 14 或 15 所述的方法，其中，步骤 (e) 中的所述过滤包括使用无菌过滤器和 / 或病毒过滤器。

伤口喷剂

[0001] 本发明涉及一种组合物，包含血红蛋白或肌红蛋白和至少一种其他成分，其中在至少40%的所述血红蛋白或肌红蛋白中，氧结合位点带有非-O_2配体；还涉及制备所述组合物的方法以及带有非氧气配体的血红蛋白或肌红蛋白在伤口外部治疗中的用途。

[0002] 根据伤口的状况，使用不同的方法来治疗伤口。首先，应优选地对仍然开放的伤口消毒，由此使其免受外部的不良影响。这可通过合适的消毒溶液或喷涂绷带，或施用碘溶液来完成。然后必须从内部进行伤口的实际愈合。这意味着仍处于合适位置的血管必须为破坏的组织提供足够量的基质，以使得组织修复机制能够启动。

[0003] 伤口可由各种因素引起，例如损伤或术后或创伤事件。

[0004] 另一方面，已知疾病也会引发伤口，尤其是慢性创面的形成，其中会发生大血管和/或小血管的退化和/或收缩。这可能是例如高龄患者长期卧床的结果（褥疮），或者是糖尿病的结果，糖尿病会导致大血管和小血管的退化和动脉硬化（动脉的大血管病变或小血管病变）(P.Carpenter,A.Franco,Atlas der Kapillaroskopie[Atlas of Capillaroscopy],1983,Abbott,Max-Planck-Inst.2,D-Wiesbaden)。也表现为创伤区域内存在缺氧（低氧）现象。40mmHg被认为是临界值(C.D.Müller et al.,Hartmann Wund[Wound]Forum1(1999),17-25)。

[0005] 血液通过动脉流向包括皮肤的组织，并为细胞供应生命所需的基质。任何的血管退化都会导致细胞基质供应不足，从而导致其死亡。基质通过扩散从最小的血管（毛细管）到达细胞必须经过最后的看起来微不足道的约20μm的间隙；在这一点上，由于机体难以操纵该基质，因此氧气起到了特殊的作用。

[0006] 存在以下三个主要问题：

[0007] (1)确实，氧气是生命必不可少的（人类在他/她的脑不接受氧气仅约5分钟后便会脑死亡），但同时氧气也是高毒性的（接受纯氧呼吸治疗的新生儿将在仅几天后死亡）。

[0008] (2)氧气在水介质中的溶解性非常小。根据菲克第一定律，这会导致氧气的扩散率较低。另外，扩散的基本定律，即斯莫鲁霍夫斯基与爱因斯坦定律(SMOLUCHOWSKI's and EINSTEIN'S law)，表明（氧气的）扩散速度随着扩散距离的增大而减小。由于氧气的扩散常数很低，使得扩散距离仅为20μm时，扩散速度仅为初始值的5%。例如50μm的水层对于细胞而言代表着几乎完全隔绝氧气。氧气在机体中随血流并以与血红蛋白结合的方式沿很长的路径从肺运输到趾尖，并且只有通过这种方式才能够以适合机体的方式克服长距离运输的缺陷。

[0009] (3)与葡萄糖相反，例如体内并没有用于氧气的存储区，因此细胞必须随时且快速地获得足够量的这种基质；氧气是所谓的生命必需的直接的基质。

[0010] 完整的机体已利用数个机制解决了这些问题。氧气在运输期间与血红蛋白结合的方式可以避免氧气的毒性作用，并因此保持无害。同时，稀释游离氧，并因此进一步丧失有害的氧化潜力。然而，由于与血红蛋白的结合是可逆的，可以即刻获得足量的氧气。低扩散范围的问题的解决是由于机体已经进化出非常精细的支血管网(毛细血管网)，其确保每个细胞与毛细血管的平均距离为至多25μm；以这种方式，氧气在机体内的扩散路径会保持

小于50μm的临界长度。此外，氧气可以从数个方面以扩散的方式供应给细胞；这表现为安全机制。可通过血管流的血管调节，根据需求（过量的可用氧气是不允许的，否则将有不良影响）实现机体内的即时获取，这控制了灌流并由此优化氧气的供应。

[0011] 如果创面是开放性的，将会中断细胞的氧气供应。来自外部空气的氧气供应是贫乏的，因为（组织）细胞层上铺有水液膜，如前所述，该层膜形成了氧气扩散的屏障。如果来自下面的氧气，换言之来自体内的氧气的供应是充足的，那么正常组织的新伤口会在几天后愈合。然而，动物实验显示，若增加周围空气中氧气浓度，新伤口的愈合甚至会更好。已知较久的伤口特别是慢性伤口，由于缺少氧气，它们的愈合是非常缓慢的。

[0012] 为了更好地治愈慢性伤口，已经使用所谓的高压氧疗法 (HBO)。在这种治疗中，将患者放置于加压室内，使他们经受一段时间的约 3bar 的纯氧的超压 (C.D.Müller et al.,Hartmann Wund Forum1(1999),17-25)。实际上，通过该方法可以加快伤口的愈合。然而，效果会随着治疗次数而降低。

[0013] 美国专利 No.2,527,210 描述了一种血红蛋白溶液，据称其可以通过静脉注射和外用如喷雾的方式用于治疗伤口。在其说明书中，血红蛋白是通过使新鲜的红细胞在经过离心分离和脱去血清部分后对其进行冷冻休克 (freezing shock) 来获得。这会导致细胞溶解，并释放出血红蛋白。破碎的细胞壁也会存在于产品中。该制剂是浓缩的细胞碎屑（细胞碎片）。以这种方法，应在已加入 5% 的硫化钠后例如用碘溶液来实现抗菌的覆盖效果。换言之，伤口几乎是闭合的。这里并未提及氧气的运输。

[0014] WO97/15313 描述了血红蛋白用于改善伤口愈合的治疗用途。为此目的，将不含间质 (stroma) 和热原质的血红蛋白通过静脉注射施用于患者，特别是在手术和创伤事件后施用，以升高血压。为此目的，特别使用了与联阿司匹灵 (diaspirin) 交联的血红蛋白。

[0015] WO2003/077941 教导了用含分离的和可选的交联的血红蛋白的血红蛋白溶液来治疗开放性伤口。用来自猪血的血红蛋白来配制新鲜的所述溶液，并将其施用于慢性伤口。

[0016] 在制备和储存基于血红蛋白和肌红蛋白的氧载体期间，它们可能会部分或完全地丧失其功能。为防止这种情况发生，需要稳定氧载体，以使它们保持可用性且能够运输氧气。

[0017] 通常，有不同的方法来制备人工氧载体；其中一种方法是制备合适的天然或化学修饰的血红蛋白溶液（参见“Issues from Vth International Symposium on Blood Substitutes,San Diego,Calif.,USA,March1993”,Artificial Cells,Blood Substitutes,and Immobilization Biotechnology22(1994),vol.2-vol.4)。将这些药物制剂作为人工氧载体使用时的一个问题是，它们通过自氧化 (spontaneous oxidation) 逐渐失活而形成高铁血红蛋白，其不再能运输氧气。这通常发生在生产者制备期间以及后续的储存期间。

[0018] 已描述了用于解决该问题的几种方法。尝试使血红蛋白的氧化程度最小，或使氧化的血红蛋白还原回去。

[0019] 防止自氧化的一种可能是使血红蛋白脱氧（即从制剂中完全去除氧），因为相比氧合血红蛋白，脱氧血红蛋白氧化为高铁血红蛋白会慢得多。

[0020] 此外，通过在可能的最低温度（对于水溶液在约 4℃下）下储存和/或制备有可能使氧化量最小。

[0021] 另外，血红蛋白的氧化率取决于氢离子浓度，即 pH。例如，对于天然的人类血红蛋白，处于 pH7.5-9.5 的区间时达到最低。

[0022] 而且，加入某些醇可降低血红蛋白的氧化。它们中的一些甚至在低浓度下起作用。这些醇类的毒性是一个问题。

[0023] 某些金属离子 (Cu_2^+, Fe_3^+ 等）会催化血红蛋白的自氧化。尽管 EDTA 本身会促进血红蛋白的自氧化，但可通过将所述金属离子与 EDTA 络合而使其失效。

[0024] 可进一步通过加入还原性物质来实现使人工氧载体免受氧化。在某些情况下，它们甚至会引发氧合血红蛋白的再活化。

[0025] EP0857733 描述了可通过将配体、特别是一氧化碳结合至氧结合位点来稳定血红蛋白。据发现，这种羰基血红蛋白可用于机体而不必脱去配体，且其作为血流内的氧载体是合适的。

[0026] 本发明的目的是，提供一种用于伤口外部治疗的产品，其加快伤口愈合，使用方便且可以储存。

[0027] 根据本发明，通过一种组合物，所述组合物包含：

[0028] (a) 氧载体，优选血红蛋白或肌红蛋白，其中在至少 40% 的所述氧载体中，氧结合位点带有非 $-O_2$ 配体，以及

[0029] (b) 至少一种其他成分，其选自电解质防腐剂、稳定剂、抗絮凝剂、抗凝剂、pH 缓冲剂、溶剂、抗氧化剂、成膜剂和交联剂，

[0030] 和氧载体、优选在其氧结合位点上带有非 O_2 配体的血红蛋白或肌红蛋白在制备用于伤口外部治疗的药剂或组合物中的用途，而实现了该目的。

[0031] 根据本发明，优选使用自然（天然）的氧载体，优选血红蛋白或肌红蛋白或其修饰衍生物或其混合物。人类或动物来源、特别是马、牛或优选猪来源的血红蛋白或肌红蛋白，特别适用于本发明。如下所述，天然或修饰的人类或猪的血红蛋白特别优选作为氧载体。氧载体可以从人类或动物的血液新鲜分离，或者可以人工制备。

[0032] 也可以使用天然和修饰的氧载体的混合物，例如重量比为 20:1-1:20。进一步，可以以前述的 20:1-1:20 的比例使用血红蛋白和肌红蛋白或它们的修饰衍生物。

[0033] 在另一实施方案中，可以修饰所述氧载体。所述修饰可以是分子内交联、聚合反应（分子间交联）、聚乙二醇化（与聚环氧烷共价连接）、用化学反应性效应子如吡哆醛 -5'- 磷酸酯或 2- 去甲 -2- 甲酰基 - 吡哆醛 -5'- 磷酸酯进行的修饰，或用氧键合的化学非反应性效应子如 2,3- 二磷酸甘油酸酯、肌醇六磷酸酯、肌醇六硫酸酯或苯六甲酸进行的修饰或它们的组合。这类修饰是公知的，并描述于例如 DE-A10031744、DE-A10031742 和 DE-A10031740。氧载体的交联也描述于 DE1970137、EP971000790、DE4418937、DE3841105、DE3714351、DE3576651。

[0034] 修饰的氧载体的实例有分子量为 65000 至 15000000 的血红蛋白，例如根据 WO97/15313 的分子内交联的分子，特别是聚合物产物，以及平均分子量为 80000g/mol 至 10000000g/mol，特别是 100000g/mol 至 5000000g/mol 的分子间交联的产物，或者类似产生的分子量为 16000 至 5000000，特别是 100000 至 3000000，优选 1000000g/mol 的肌红蛋白。可以使用聚合的这些氧载体，例如通过使用对于分子间修饰公知的交联剂来聚合，例如双功能交联剂，如双环氧丁二烯 (butadiene diepoxy)、二乙烯砜、二异氰酸酯、特别是六亚甲

基二异氰酸酯、环已基二异氰酸酯和 2,5- 二异氰酰苯基磺酸 (2,5-bisisocyanatobenzol sulfonic acid)、二 -N- 羟基琥珀酰亚胺酯、二酰亚胺酯 (diimidoester) 或二醛，特别是起类似作用的乙二醛、乙二醇醛，或戊二醛。

[0035] 此外，可以使用以这种方法聚合的且用聚乙二醇或其合适的衍生物聚乙二醇化的产物。这包括例如聚环氧乙烷、聚环氧丙烷或环氧乙烷与环氧丙烷的共聚物，或其酯、醚或酯酰胺。摩尔质量为 200-5000g/mol 的共价连接的聚环氧烷会是适合的。

[0036] 对于聚环氧烷的共价连接，包含已与官能团共价结合的连接剂，从而允许与血红蛋白的氨基、醇基、或巯基直接发生化学反应，形成聚环氧烷共价键的聚环氧烷的那些衍生物会是合适的，例如具有反应性 N- 羟基琥珀酰亚胺酯、环氧（缩水甘油醚）、醛、异氰酸酯、乙烯砜、碘乙酰胺、咪唑甲酸酯、三氟乙磺酸酯基 (tresylate groups) 和其他基团的聚环氧烷。许多这样的单官能活化的聚乙二醇是市售的。

[0037] 若使用修饰的氧载体，应优选修饰的交联（分子内或分子间）或交联的且聚乙二醇化的平均分子量为 250000g/mol 至 750000g/mol 的血红蛋白产物，或平均分子量为 50000g/mol 至 750000g/mol 的肌红蛋白产物。

[0038] 根据特别优选的实施方案，使用新鲜分离的人或动物来源、特别是猪来源的血红蛋白或肌红蛋白来制备本发明的组合物。

[0039] 根据本发明，氧载体的至少 40% 的氧结合位点带有非 O_2 配体。优选至少 50%，优选至少 60%，更优选至少 70%，甚至更优选至少 80%，特别优选至少 90% 或 95% 的血红蛋白或肌红蛋白以携带有配体的形式提供。在载体的分离过程中或其进一步纯化后，可能已使用了这种携带，然而，特别优选的是，以受保护的形式进行氧载体的分离，这意味着在分离或纯化过程中，配体被提供到 / 接触氧载体。

[0040] 非 O_2 配体优选一氧化碳 (CO) 或一氧化氮 (NO) 或其混合物。这两种配体对血红蛋白 / 肌红蛋白的 O_2 结合位点都具有高亲和力，并用作防止血红素的中心 Fe^{3+} 离子氧化的保护剂。

[0041] 优选将带有配体的氧载体溶解在水性或有机介质中，其中优选水溶液，以 0.1-35 重量 %、优选 0.1-20 重量 %、更优选 0.1-15 重量 % 以备应用。

[0042] 本发明的组合物进一步包含至少一种其他添加剂，优选选自电解质、稳定剂、抗絮凝剂、防腐剂、pH 缓冲剂、溶剂、抗氧化剂和成膜剂，更优选选自电解质、稳定剂、抗絮凝剂、防腐剂和 pH 缓冲剂。最优选的组合物是溶液的形式，并至少包含电解质和任选地包含稳定剂。

[0043] 该溶液可包含适当或期望量的生理相容电解质如盐。电解质可以以 0.1-30wt%，优选 0.1-10wt% 的量存在，但优选各自以生理浓度存在。优选地，所述组合物包含前述量的盐，如 NaCl、KCl、NH_4Cl、$CaCO_3$、Na_2CO_3、K_2CO_3、$MgSO_4$、Na_2SO_4、$CaCl_2$、$MgCl_2$、柠檬酸钠、乳酸钠或前述的混合物或类似物，但不限于此。最优选的盐是 NaCl，特别是浓度为 0.9%（等渗溶液）的 NaCl。

[0044] 根据本发明，特别优选的是，所述组合物包含充当蛋白质、特别是血红蛋白 / 肌红蛋白的稳定剂和 / 或抗絮凝剂的化合物，如 N- 乙酰半胱氨酸、半胱氨酸、N- 乙酰甲硫氨酸、甲硫氨酸、非离液盐 (non-chaotropic salts)、多元醇、类糖物质，优选二糖，以及氨基酸，优选各自的量为 0.001wt%-20wt%。

[0045] 其中可使用的多元醇优选为低分子量多元醇，但是也可使用聚合的衍生物。这样的多元醇包括乙二醇、丙三醇、赤藓糖醇及甘露糖醇。可使用的环状多元醇包括一个或多个脂环族环，并可具有至少一个侧链。优选的多元醇包括二糖和糖醇，例如乳糖醇、山梨糖醇和肌醇。优选含 2 至 10 个羟基基团的化合物。多元醇的量优选可以在 0.001-20%w/v 的范围内，更优选 1-15%w/v，最优选 2-10%w/v。

[0046] 进一步地，蛋白质稳定剂的添加剂可以选自式 1 的三（羟甲基）甲基化合物；

[0047] $(HOCH_2)_3C-R$ (1)，

[0048] 其中 R 是：C_1-C_4 烷基、取代的 C_1-C_4 烷基、NH_2、$NHC(CH_2OH)_3$、C_1-C_4 羟烷基；C_1-C_4 烷基羧酸酯、NR^1R^2（式中 R^1 和 R^2 可独立地是：H、C_1-C_4 烷基、C_1-C_4 烷基磺酸酯、C_1-C_4 羟烷基磺酸酯）。式 (1) 化合物的优选实例包括：三（羟甲基）乙烷；1,1',1"- 三（羟甲基）丙烷；三（羟甲基）氨基甲烷或其盐，如氯化物、马来酸盐、磷酸盐、琥珀酸盐；1,3- 双［三（羟甲基）甲氨基］丙烷；双 (2- 羟乙基）氨基 - 三（羟甲基）甲烷；N［三（羟甲基）甲基］-2- 氨基乙烷磺酸酯；N［三（羟甲基）甲基］-3- 氨基丙烷磺酸酯；N［三（羟甲基）甲基］-3- 氨基 -2- 羟基丙烷磺酸酯；N［三（羟甲基）甲基］甘氨酸。该化合物也可优选以 0.001-20%w/v 的范围加入，更优选 1-15%w/v，最优选 2-10%w/v。

[0049] 进一步，蛋白质稳定剂的添加剂可以选自聚合电解质。聚合电解质可以是阳离子或阴离子聚合电解质。也可使用两性聚合电解质。阳离子聚合电解质优选具有沿分子链分布的阳离子基团的聚合物。

[0050] 阳离子基团，优选季铵衍生的官能团，可以排列在从链垂下的侧基上，或者与其结合。阳离子聚合电解质的实例包括：乙烯基吡咯烷酮和季甲基丙烯酸甲酯 (quaternary methylmethacrylate) 的共聚物，例如由 ISP 获得的 Gafquat 系列 (755N, 734, HS-100)；取代的聚丙烯酰胺；聚乙烯亚胺，聚丙烯亚胺及取代的衍生物；多胺均聚物 (Golchem CL118)；多胺共聚物（例如表氯醇和单甲胺或二甲胺的缩合物）；聚二甲基二烯丙基氯化铵 (polyDADMAC)；取代的葡聚糖；修饰的瓜尔胶（用羟丙基三甲基氯化铵 (hydroxypropytrimonium chloride) 取代）；取代的蛋白质（例如在大豆蛋白和水解胶原质上取代的四价基团）；聚氨基酸（例如聚赖氨酸）；低分子量聚氨基化合物（例如精胺和亚精胺）。可以使用天然或人工聚合物。

[0051] 可以使用 MW 为 150 到 5000000、优选 5000 到 500000、更优选 5000 到 100000 的阳离子聚合电解质。优选 0.01-10%w/v 的量，更优选 0.1-2%w/v，特别是 0.05-5%w/v。

[0052] 阴离子聚合电解质优选为具有沿分子链分布的阴离子基团的聚合物。包含羧酸盐、磺酸盐、硫酸盐或其它带负电荷的可电离类阴离子基团，可以排列在从链垂下的基团上，或者直接结合在聚合物主链上。可以使用天然或人工的聚合物。

[0053] 阴离子聚合电解质的实例包括：Gantrez(Sseries, AN-series)；褐藻酸及盐；羧甲基纤维素及盐；取代的聚丙烯酰胺（例如用羧酸基取代的聚丙烯酰胺）；聚丙烯酸及盐；聚苯乙烯磺酸及盐；葡聚糖硫酸盐；取代的糖类，如蔗糖辛硫酸盐 (octosulphate)；肝磷脂。可以使用 MW 为 150-5000000、优选 5000-500000、更优选 5000-100000 的阴离子聚合电解质。优选 0.01%-10%w/v 的量，特别是 0.05%-5%w/v，更特别是 0.1%-2%w/v。

[0054] 特别优选的稳定剂是 N- 乙酰半胱氨酸，以 0-10% 优选 0.01-5% 的量使用。

[0055] 进一步地，组合物可包含任何防腐剂，如苯氧基乙醇、异噻唑啉、山梨酸或本领域

技术人员已知的任何其它合适的防腐剂。

[0056] 组合物可进一步优选地包含任何缓冲剂。可使用所有公知的缓冲剂，如Tris/HCl、K_2HPO_4/KH_2PO_4、Na_2HPO_4/NaH_2PO_4、MOPS(3-(N-吗啉)丙磺酸)、HEPES(4-2-羟基乙基-1-哌嗪乙磺酸)，TAPS(3-{[三(羟甲基)甲基]氨基}丙磺酸)、N-二甘氨酸N,N-双(2-羟乙基)甘氨酸)、三甲基甘氨酸N-三(羟甲基)甲基甘氨酸)、TES(2-{[三(羟甲基)甲基]氨基}乙磺酸)、PIPES(哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸))、SSC(柠檬酸钠盐)、MES(2-(N-吗啉)乙磺酸)，但不限于此。

[0057] 本发明组合物中的合适溶剂优选为水或水溶液、有机溶剂如醇，优选乙醇或聚乙二醇(PEG)。也可使用所述溶剂的混合物。进一步地，天然油可用作一些成分的溶剂，组合物可作为乳液提供。特别优选的溶剂是水或水溶液。

[0058] 用于本发明的组合物的抗氧化剂可以是例如维生素C、维生素E、类黄酮，类胡萝卜素，或其盐或其衍生物。

[0059] 优选的成膜剂是常用于美容用途的这类试剂，例如丙烯酰胺/钠(Acrylamide/Sodium)、丙烯酸共聚物(Acrylate Copolymer)、丙烯酸酯/丙烯酰胺共聚物、PVM/MA共聚物的丁酯、羧甲基几丁质、壳聚糖、羟丙基纤维素、聚季铵盐-36、PVP、PVP/VA共聚物、VA/巴豆酸酯共聚物或乙烯基己内酰胺/PCP/二甲基氨基辛基(dimethylaminoctyl)丙烯酸甲酯共聚物。

[0060] 除非另有说明，上述所有添加剂可以以0-20%(w/v)的量存在，优选0.001、0.01、0.05或0.1到10%(w/v)，更优选0.5-5%(w/v)。

[0061] 必要时，可存在其他添加剂，特别是以0-20wt%、优选0.1-20wt%、优选0.2-15wt%、特别是0.5-10wt%的量存在。优选的添加剂是细胞的营养物质。它们可选自例如0.1-5wt%的葡萄糖、至多25IU/ml的量的胰岛素、0.1-5wt%的天然氨基酸特别是半胱氨酸，或生理量或高达它的10倍量的组织因子，如白介素。

[0062] 所述组合物优选为水溶液，其包含：

[0063] (a)氧载体，优选血红蛋白或肌红蛋白，其中在至少40%的所述氧载体中，氧结合位点带有非$-O_2$配体，以及

[0064] (b)至少一种其他成分，选自电解质、防腐剂、稳定剂、抗絮凝剂、抗凝剂、pH缓冲剂、抗氧化剂、有机溶剂、成膜剂和交联剂。

[0065] 在本发明的优选实施方案中，组合物包含从人或动物、优选猪的全血中分离的氧载体。

[0066] 因此，本发明的另一方面是提供用于从全血纯化可用于本发明的组合物的氧载体的方法。

[0067] 为了制备优选实施方案的组合物，从人或动物的血液中分离氧载体，并进一步纯化到基本上不含血浆和细胞膜成分。

[0068] “基本上不含”是指所指的化合物或组合物不含20%以上、优选不超过10%、甚至更优选不超过5%、特别优选不超过2%、或者小于1%的提及的不需要的化合物。

[0069] 纯化可包括任何适合的方式或方法步骤，例如像选择性裂解或沉淀、离心、超离心、分级离心、层析方法如离子交换层析、尺寸排阻层析，亲和或吸附层析、凝胶过滤或分子筛层析，或透析，但不限于这些实例，只要通过应用方法，使尽可能少的氧载体变性即可。在

分离和纯化过程中，氧载体优选基本上保持在溶液中。

[0070] 当从全血中分离氧载体时，优选的是，从其它血液成分分离含有氧载体的细胞或者选择性裂解所述细胞，以将（可溶性）氧载体递送到溶液中，然后分离不溶性成分。这两种方法的组合也是合适的。可通过任何合适的裂解方法对含氧载体的细胞进行裂解，例如化学裂解、渗透裂解、机械裂解、热裂解或类似方法。

[0071] 可通过任何合适的方式或方法来分离细胞碎片。包括例如离心、过滤、沉降和倾析、透析或任何类似的方法。

[0072] 为了将非裂解细胞或细胞碎片与溶解的氧载体分离，常用的方法是粒化(pelletation)固体材料。例如，可进行离心步骤。2-5000×g的离心通常足以粒化细胞和细胞碎片。

[0073] 为了进一步粒化未溶解的成分，例如在纯化过程中生成的任何沉淀物，可以在纯化过程的任何时间进行另外的离心步骤，特别是使用较大的力的离心步骤，可直至高达10^6x g的超离心。

[0074] 含氧载体的溶液的纯化另外地或作为任何离心步骤的替换方案可包括至少一次过滤步骤、优选至少两次、三次或更多次的过滤步骤。过滤既可以通过使用至少一个、优选至少两个、更优选至少三个过滤器（如果本申请中使用多于一个过滤器时，我们使用术语“过滤器级联”进行，也可通过一个、两个、三个或更多个单独的过滤步骤进行。

[0075] 所述过滤器级联或不同的过滤步骤可包括两个、三个、四个、五个或更多的不同类型、不同材料和/或不同孔径的过滤器。进一步地，可使用深床过滤器如玻璃棉或类似物，优选作为第一过滤材料以保留粗细胞碎片。若使用超过一个的过滤器，优选使用孔径逐级递减的过滤器。例如，如果使用三个不同的过滤器，第一过滤器（深床过滤器之后）的平均孔径可以是1至0.5μm，第二过滤器的孔径可以是0.7至0.3μm，第三过滤器的孔径为0.4至0.1μm，其中不依赖上述的重叠范围，无论何种情况，后一个过滤器的孔径小于它前面的过滤器的孔径。通过所述过滤步骤，基本上除去了尺寸大于所使用的过滤器的孔径的固体材料和沉淀材料。

[0076] 进一步地，纯化过程可包括超滤步骤，以用于纯化氧载体。通过这样的超滤步骤，可将不需要的未溶解的大分子分离。优选地，选择尺寸排阻极限，以分离比需要的氧载体更大（更庞大、更高分子量）的大分子，因此通过过滤器保留所述大分子。由于血红蛋白的分子量为约64000道尔顿，因此超滤过滤器的尺寸排阻极限应更高。为确保超滤步骤不会降低血红蛋白的收率，优选将过滤器的尺寸排阻选择为约100000道尔顿，优选约200000道尔顿，更优选约300000道尔顿，但并不限于此。

[0077] 可另外地或作为替代地进行任何合适的层析步骤。特别优选的层析类型是离子交换层析或尺寸排阻层析。

[0078] 通过透析步骤可以获得同样的结果，透析步骤是使用具有上述尺寸排阻极限的透析膜，使氧载体通过，但保留具有较高分子尺寸的大分子。

[0079] 为降低小分子量化合物在溶液中的量，可使用尺寸排阻极限为约50000道尔顿的透析膜进行另外的透析步骤，使更小的分子通过，但保留氧载体。

[0080] 为减少组合物中的病毒和/或微生物的污染，在纯化过程中特别优选包括使病毒含量降级的步骤。通过这一步可减少病毒含量，优选减少至每毫升承载少于10个、优选

少于 5 个、更优选少于 2 个病毒颗粒，并且甚至更优选为每毫升 0 个。在该步骤中，优选的是，使含有氧载体的所述溶液通过病毒含量降级过滤器（“病毒过滤器”）。这种过滤器是公知的，并可在市场中获得。实例是 Sartorius Virosart® CPV、Planova® 15N, 20N、Millipore Viresolve® NFP 或 PALL Pegasus® Grade LV6，但并不限于这些。可替代地或额外地，在通过过滤器后，优选应用 UV 光处理，特别是 245nm 波长的紫外光，以消灭任何残留的病毒。

[0081] 任选地，在分离氧载体的过程中的任何阶段，可进行至少一次加热步骤。该步骤包括在分离过程中，将含氧载体的悬浮液或溶液加热至 40℃ -85℃，优选 60℃ -80℃，更优选 65℃ -75℃的温度范围。该加热步骤优选进行 10min（分钟）至 6h（小时），优选 20min 到 4h，最优选 30min 至 3h，并可包括上述范围内的多个不同温度。

[0082] 根据本发明的方法，优选的是，在整个纯化过程中将氧载体保持在溶液中。进一步优选的是，在本发明的组合物的整个纯化过程和制备过程中，将氧载体保持在溶液中。这意味着，优选在本发明的方法中，氧载体不是沉淀的，因此它保持着处于其天然环境时其的天然三维结构。

[0083] 在本发明的特别优选的方法中，从全血纯化氧载体的方法至少包括以下步骤：

[0084] (a) 分离全血的血浆；

[0085] (b) 裂解红细胞；

[0086] (c) 使氧载体携带配体；

[0087] (d) 将样品加热至 40℃ -85℃的温度；

[0088] (e) 将氧载体与任何不需要的血成分分开。

[0089] 通过这些步骤，可获得用于制备本发明的组合物的含氧载体的溶液。特别是，可以将通过这些步骤获得的含氧载体的溶液浓缩至氧载体的所需量，并向该溶液中加入至少一种其他成分，以获得本发明的组合物。

[0090] 通过从全血中分离血浆的任何常用方法可进行本发明方法的步骤 (a)，优选通过离心或过滤。通过在约 2000-5000rpm，例如 4000rpm 下离心约 30min，使红细胞粒化，而可溶性化合物和白血细胞主要留在上清液中。通过对红细胞反复再悬浮和粒化，例如 2-5 次，可以提高红细胞与血液中不需要的化合物的分离程度。

[0091] 优选通过向步骤 (a) 的稠化血中加入水、优选蒸馏水或适当的次级等渗缓冲液 (sub-isotonic buffer)、优选磷酸缓冲液，来进行步骤 (b)。在用水或次级等渗缓冲液裂解红细胞后，优选将盐加入该溶液 / 悬浮液，以在溶液中获得所述盐的生理浓度。优选按溶液中 0.9% 的量加入 NaCl。

[0092] 步骤 (c) 可以在步骤 (a)、步骤 (b)、步骤 (d) 或步骤 (e) 之后进行，但优选至少在步骤 (b) 之后进行。需要特别指出的是，步骤 (c) 并不一定作为步骤 (b) 之后的下一步骤立即进行，也可以在步骤 (d)、步骤 (e) 或任何以下处理步骤之后进行或重复进行。使溶液 / 悬浮液中的氧载体携带配体可通过在溶液 / 悬浮液中导入气体来实现，优选 CO 或 NO 气体或它们的混合。在优选的实施方案中，将 CO 气体在足够长的时间段内导入溶液 / 悬浮液，以获得在溶液 / 或悬浮液中的饱和度大于 90%，优选饱和度大于 >95%。

[0093] 步骤 (d) 可以在步骤 (a)、步骤 (b)、步骤 (c) 或步骤 (e) 之后进行，但优选在步骤

(c) 之后进行。进一步地，在分离过程期间可以反复加热。该步骤包括在分离过程中，将含氧载体的悬浮液或溶液加热到 40℃ -85℃、优选 60℃ -80℃、更优选 65℃ -75℃的温度范围。该加热步骤优选进行 10min 至 6h，优选 20min 到 4h，最优选 30min 至 3h，并可包括上述范围内的多个不同温度。

[0094] 在步骤 (e) 中，从溶液中仍然含有的不需要的成分，如非裂解的细胞、细胞碎片、任何沉淀物或其它不溶解的成分中，进一步纯化氧载体。进一步地，通过分离至少部分不需要的可溶化合物，例如像可溶大分子或具有低分子量的可溶化合物，可进一步纯化氧载体。

[0095] 因此所述步骤 (e) 可包括几个单独步骤，如过滤、超滤、离心、超离心、层析、使用不同类型的具有不同尺寸排阻极限的透析膜的透析、洗涤步骤、氧载体含量的浓缩等。上述任何方法可包括在该纯化步骤内。

[0096] 步骤 (e) 优选包括至少一次离心和 / 或至少一次过滤步骤。例如在离心机中旋转裂解物，以分离剩余细胞和细胞碎片，或通过例如上述的过滤器级联来过滤裂解物。也可以首先将裂解物离心，随后进行过滤，或者可以在第一步中通过深床过滤器过滤，随后通过至少一个过滤器或过滤器级联进行过滤。通过离心或深床过滤器，由于留在过滤器上并阻塞它的材料较少，简化了任何随后的过滤步骤中的操作。如果没有使用过滤器级联，优选使用至少一个过滤器，使得保留悬浮液中所含的基本上所有的固体材料并使所有溶解的成分通过。在更优选的实施方案中，所用的至少一个过滤器能够充当无菌滤器，将微生物保留。可进一步优选进行超滤步骤和 / 或用于减少溶液中的病毒和 / 或微生物的含量的步骤。因此，优选的是，在步骤 (e) 后，含氧载体的溶液基本不含任何未溶解颗粒、絮凝物、沉淀物。

[0097] 在步骤 (e) 中，除了上述任意步骤 / 方法外，可以清洗和 / 或浓缩含有所需的氧载体的溶液。“清洗”意为分离小于所需氧载体的分子（具有较低分子量），可优选通过向含氧载体的溶液中加入相同量或多倍（例如 5-10 倍）量的等渗溶液，随后用过滤器过滤所得（稀释的）溶液，保留氧载体并使较小分子通过。优选使用 0.9%NaCl 溶液，以清洗溶液。清洗步骤可以重复 2 或 3 或 4 或 5 或至多达 10 次。在优选的示例性实施方案中，使用尺寸排阻极限为 5000 道尔顿、10000 道尔顿或 20000 道尔顿的过滤器，以使较小分子通过。在该步骤中，（优选在清洗后）可以将含氧载体的溶液浓缩至氧载体的所需浓度，例如 50g/l、100g/l 或 200g/l 的浓度，但并不限于这些量。通过过滤进行浓缩或者通过加入 0.9%NaCl 溶液或类似的等渗溶液，可获得任何需要的浓度。

[0098] 然后，可使用如此获得的含氧载体的溶液，通过向溶液中加入所需量的上述的至少一种其他成分来制备本发明的组合物。

[0099] 在优选实施方案中，通过向含氧载体的溶液中至少加入防腐剂，优选药学上可接受的防腐剂，例如苯氧乙醇、对羟基苯甲酸酯类、苯甲酸钠、苯甲醇、六氯酚，以及抗氧化剂和 / 或稳定剂，例如 N- 乙酰半胱氨酸、辛酸钠、N- 乙酰 -L- 色氨酸酯、N- 乙酰基 - 甲硫氨酸酯、维生素 E、维生素 C、甲基脱氢皮质醇或甘露糖醇，来制备本发明的组合物。此外，可另外加入上述的任意其他成分。

[0100] 如需要，可以通过例如加热、过滤、离心、加入防腐剂、蒸汽应用、气体应用或 UV 应用或它们中的至少两种的组合，优选通过进一步的无菌过滤步骤，对所得的组合物再次灭菌，并优选将其装在用于储存的无菌容器或无菌袋中。

[0101] 根据优选的实施方案，将无菌袋放置于喷罐中供以后使用。一个实施例可以是阀

上袋系统(Bag-on-Valve system),其包括袋,例如层压铝袋,以及铝板或锡板喷罐。由于产物与推进剂的分离,阀上袋可以在2-9巴的压力下与压缩空气或氮气一起使用。

[0102] 根据本发明,该组合物优选用于治疗开放性伤口,优选治疗人和动物的慢性伤口,其中优选用于人的治疗。优选用途是用所述的带有配体的氧载体来外部治疗伤口。

[0103] 令人惊讶地发现,用所述带有配体的氧载体可以有效地治疗开放性伤口。如上所述,由于氧气供应的减少,往往会减慢慢性伤口的愈合。因此在逻辑上,伤口的治疗似乎需要携带氧的氧载体以用于治疗。然而,本发明发现,通过应用携带CO或NO的氧载体,可以获得伤口外部治疗的积极效果。不受束缚地,我们的推测是,当应用于伤口时,由于空气中的氧分压,配体可以被氧替换,由此帮助伤口愈合。

[0104] 本发明的组合物的明显优势在于,由于基于携带CO或NO配体的氧载体处于其非氧化状态,氧载体的稳定性得到增强,从而获得良好的制备稳定性和储存稳定性。此外,组合物易于施用且容易操作,并且通过氧载体/试剂的调节而促进扩散,从而提供了安全有效的改善伤口愈合的途径。

[0105] 本发明的组合物是外用的。根据伤口的状态,将其施用于、优选以细雾的方式喷洒于伤口区域。

[0106] 已证明,根据本发明可有效治疗开放性伤口,特别是具有非常不同病因的慢性伤口。还可以是术后、外伤、损伤后的伤口、愈合不良的伤口或低氧伤口,或由组织中的退行性病变引起的伤口。在这一点上,它们可以是由动脉血管的退行性病变引起的伤口以及慢性静脉功能不全引发的伤口。这些具体包括褥疮以及慢性伤口,具体为糖尿病引发的那些。可有效地治疗由灼伤(高温灼伤、化学灼伤或冰冻灼伤)或烫伤造成的其他伤口。

附图说明

[0107] 图1示出了依赖于O_2环境分压的血红蛋白的O_2饱和曲线。

实施例

[0108] 实施例1:

[0109] 通过以下方式从猪的全血中分离出血红蛋白:从血清中分离红细胞,裂解收集的红细胞,粒化细胞碎片,通过导入CO气体直到液体样品达到饱和以获得携带CO的血红蛋白,将溶液加热,进行几个过滤步骤,包括病毒过滤步骤和通过两次加入2倍体积的0.9%盐水以清洗所得的血红蛋白溶液,并过滤该溶液。

[0110] 制备用于伤口治疗的即用型组合物,其包含溶于0.9%NaCl的10%的纯化且稳定的血红蛋白、0.05%N-乙酰半胱氨酸和0.7%苯氧乙醇。向该组合物中再次充入CO气体,将其分成10份,并分别装入喷灌中。

[0111] 实施例2:

[0112] 在制备后立即使用实施例1的第一份组合物来治疗在右脚处具有慢性伤口(7x2cm)的女性患者(诊断为:糖尿病、高血压)。通过将组合物喷洒在伤口上来治疗伤口,每日一次。三天后,可见第一个愈合迹象。接下来的几周愈合过程显著,并且在18周后,伤口获得完全闭合。

[0113] 实施例3:

[0114] 将实施例 1 中的第二份组合物在制备后在 4℃下储存 2 年，之后，使用它治疗患有 II 型糖尿病的男性患者的慢性伤口。将组合物施用于患者左胫骨处的慢性浅表溃疡 (4x3cm)。对伤口进行治疗，每日一次。两周后出现愈合，4 周后伤口愈合了超过基线的 50%。接下来的几周观察到迅速的愈合，8 周后伤口获得完全闭合。

[0115] 实施例 4:

[0116] 将实施例 1 的第三份组合物在 10℃下储存 2 年。之后，使用它治疗患有 II 型糖尿病的男性患者的右腿处的慢性浅表溃疡 (4x2cm)。对伤口进行治疗，每日一次。2.5 周后可见愈合。接下来的几周观察到迅速的愈合，12 周后伤口获得完全闭合。

[0117] 实施例 5:

[0118] 使用实施例 1 的一份组合物治疗与热开水和蒸汽接触后的男性患者。诊断结果为他的脸为一级和二级烧伤。

[0119] 用冷凝胶和新斯波林 (Neosporin) 初始治疗一周，未显示出任何改善，主治医师建议，在鼻子和面部其他部位如眼睑上，应用皮肤移植。

[0120] 作为替代方案，用实施例 1 的组合物对患者治疗 7 周。将组合物施用于皮肤，每日喷洒 3-4 次。观察到皮肤的迅速改善和愈合，且患者在 7 周后出院。并不需要皮肤移植。

[0121] 实施例 6 :带有配体 / 不带配体的血红蛋白的比较

[0122] A) 根据实施例 1 制备带有配体的血红蛋白喷剂

[0123] 制备用于伤口治疗的即用型组合物，其包含溶于 0.9%NaCl 的 10% 纯化且稳定的血红蛋白、0.05%N- 乙酰半胱氨酸和 0.07% 苯氧乙醇。向该组合物中再次充入 CO 气体，将其分成 20 份，并分别装入喷灌中。

[0124] 可将组合物在 4℃至室温下储存数月至数年。

[0125] B) 除了不进行 CO 的充入，按照实施例 1 处理猪的全血的第二份。在加热步骤期间，沉淀了相当数量的血红蛋白。以下的过滤步骤难以进行。每升全血中纯化的血红蛋白的量减少至低于加热前进行 CO 充入时的量的 30%。这表明，在制备期间向样品中充入 CO，通过在加热步骤期间有相当少的血红蛋白发生沉淀的方式，稳定了血红蛋白。

[0126] 制备用于伤口治疗的即用型组合物，其包含溶于 0.9%NaCl 的 10% 纯化的血红蛋白、0.05%N- 乙酰半胱氨酸和 0.7% 苯氧乙醇。将组合物分成份，并分别装入喷罐中。

[0127] C) 按照 WO2003/077941 的实施例 1 中描述的方法从猪的全血中分离出血红蛋白的其他部分，在制备期间没有使血红蛋白携带配体 :在不加热的情况下，通过离心和超滤使血红蛋白从不含血浆和细胞膜组成部分中释放出来，并进行纯化。

[0128] 制备用于伤口治疗的即用型组合物，其包含溶于 0.9%NaCl 的 10% 纯化的血红蛋白、0.05%N- 乙酰半胱氨酸和 0.7% 苯氧乙醇。将该组合物分成 10 份，并分别装入喷灌中。

[0129] 在治疗期间按需要尽量频繁地 (每三天) 新鲜制备如此制备的不带配体的血红蛋白喷剂，并在使用前将其在 4℃下贮存最多一天。

[0130] 患者的治疗 :

[0131] 用 A) 的血红蛋白喷剂 (10℃下贮存至多 6 个月) 或 C) 的新鲜制备的血红蛋白喷剂 (4℃下贮存至多 3 天，即新鲜的组合物都使用三天) 对几位小腿处患有糖尿病足部溃疡的男性患者 (65-75 岁) 治疗三个月，直到所有患者的伤口获得完全愈合。根据主治皮肤科医生，相比用 C) 的血红蛋白喷剂治疗的伤口，特别是相比于常规治疗的伤口，使用 A) 的组

合物而获得的伤口愈合在所有病例中都表现出分泌物较少，结痂较少和 / 或化脓较少。由于小问题，用 A) 的带有配体的血红蛋白组合物治疗的伤口表现为每 cm^2 的愈合比不带配体的血红蛋白喷剂 C) 快，且比常规治疗的伤口愈合要快得多。另外，用组合物 A) 治疗的患者报告的不适较少。

[0132] 实施例 7:

[0133] 鉴于样品的携带 O_2 的情况以及不能结合 O_2 的高铁血红蛋白的产生，测量实施例 6A)、实施例 6B) 或实施例 6C) 制备的组合物样品。此外，高铁血红蛋白会影响紧邻的血红蛋白分子，使这些血红蛋白分子仍然可以结合 O_2，但不能再释放 O_2。

[0134] 用 0.9%NaCl 溶液将表 1 中的所有样品按 1:1 稀释，以模拟伤口治疗的条件。在稀释后（稀释前将样品 7.5-7.8 贮存在室温下）立即对样品 7.1-7.8 进行测量。按以下方式进行气体处理 :将每 6ml 所述稀释的溶液转移至 30ml 的玻璃烧瓶中。通过向玻璃烧瓶中充满相应的气体，封闭烧瓶，并转动样品 30 秒来进行气体处理。在 30℃下将所有样品贮存上述时间段。根据表 1 所述条件处理样品，并且测量血红蛋白总量（血红蛋白 + 高铁血红蛋白）、氧含量、高铁血红蛋白含量以及任选地 CO 含量。

[0135] 表 1

[0136]

实例	样品	处理	总 Hb g/dL	O_2 %	CO %	MetHb %
7.1	根据实施例 6A)新鲜制备的组合物	无	5.5	1.7	96.3	3.9
7.2	根据实施例 6B)新鲜制备的组合物	无	5.7	26.8		5.1
7.3	根据实施例 6C)新鲜制备的组合物	无	5.6	27.0		4.7
7.4	贮存 3 个月(10℃)的实施例 6A)的组合物	无	5.9	1.8	96.5	3.8
7.5	实施例 7.2 的组合物	贮存 24 h	5.6	26.9		11.2

[0137]

7.6	实施例 7.2 的组合物	贮存 48 h	5.5	27.0		17.0
7.7	实施例 7.3 的组合物	贮存 24 h	5.7	26.5		10.5
7.8	实施例 7.3 的组合物	贮存 48 h	5.6	26.7		16.2
7.9	实施例 7.4 的组合物	0.5 h O_2	5.8	13.7	84.7	4.4
7.10	实施例 7.4 的组合物	1 h O_2	5.7	19.6	79.1	4.2
7.11	实施例 7.4 的组合物	2 h O_2	5.8	25.7	73.1	4.3
7.12	实施例 7.4 的组合物	3 h O_2	5.9	30.7	68.1	4.2
7.13	实施例 7.4 的组合物	24 h O_2	5.7	33.5	59.6	9.8
7.14	实施例 7.4 的组合物	48 h O_2	5.8	32.5	55.9	15.5
7.15	实施例 7.4 的组合物	72 h O_2	5.7	31.7	55.8	16.0
7.16	实施例 7.4 的组合物	0.5 h CO_2	5.8	4.0	91.8	5.7
7,17	实施例 7.4 的组合物	1 h CO_2	5.7	6.0	90.0	5.7
7,18	实施例 7.4 的组合物	2 h CO_2	5.9	9.2	86.7	5.8
7.19	实施例 7.4 的组合物	3 h CO_2	5.7	9.6	85.1	6.9
7.20	实施例 7.4 的组合物	24 h CO_2	5.6	4.9	77.5	19.7
7.21	实施例 7.4 的组合物	48 h CO_2	5.8	8.2	68.2	27.4
7.22	实施例 7.4 的组合物	72 h CO_2	5.7	9.4	65.9	28.3
7.23	实施例 7.4 的组合物	0.5 h 空气	5.8	9.2	89.0	4.5
7.24	实施例 7.4 的组合物	1 h 空气	5.7	12.4	85.9	4.4
7.25	实施例 7.4 的组合物	2 h 空气	5.9	18.0	80.5	4.3
7.26	实施例 7.4 的组合物	3 h 空气	5.6	20.7	77.9	4.3
7.27	实施例 7.4 的组合物	24 h 空气	5.8	24.3	69.3	9.1
7.28	实施例 7.4 的组合物	48 h 空气	5.7	25.4	64.3	13.9
7.29	实施例 7.4 的组合物	72h 空气	5.7	26.8	62.2	14.3

[0138] 从表 1 的结果可以看出，本发明的其中氧载体携带有 CO 的组合物，不仅可以长时间贮存而不形成高铁血红蛋白，而且当为它提供带有配体的氧载体时，能够进一步用 O_2 来代替结合的 CO。若暴露于 100%O_2 时（实施例 7.9-7.15），血红蛋白的 O_2 饱和度会非常快速地升高。

[0139] 若将组合物暴露于 CO_2，这表示哺乳动物通路 - 活性组织内部的情况，形成的高铁血红蛋白的量增多（实施例 7.16-7.22）。

[0140] 空气中的 O_2 分压仅为约 21%，因此根据图 1 所示的血红蛋白 O_2 饱和曲线，空气下

带有氧气的血红蛋白的最可能的 O_2 饱和度为约 29%。考虑到实施例 7.23-7.29，惊人的结果是，在 3 小时内，暴露于空气的组合物携带 20.7% 的氧气，但高铁血红蛋白的含量仍然非常低。当治疗外部伤口时，将组合物喷洒于（清洁的）创面，并保持与空气接触。

[0141] 这些结果表明，本发明的组合物含有稳定的氧载体，在贮存数月后，当其与空气接触时，所述氧载体提供了高氧运输。

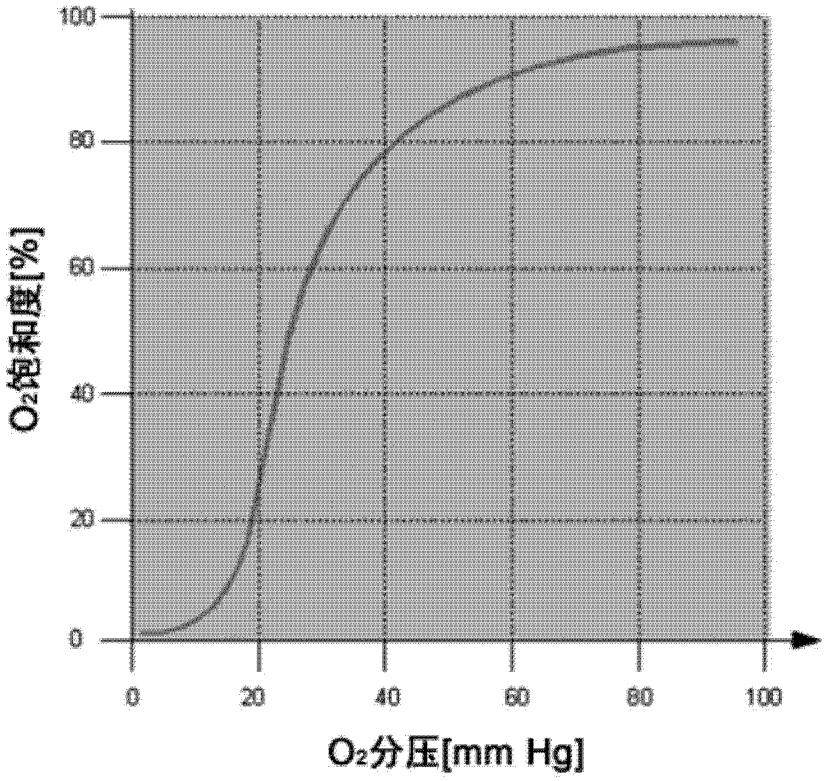


图 1