

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 49/00 (2006.01)

A01N 1/02 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02817734.7

[45] 授权公告日 2009 年 9 月 2 日

[11] 授权公告号 CN 100534534C

[22] 申请日 2002.9.10 [21] 申请号 02817734.7

[30] 优先权

[32] 2001.9.10 [33] US [31] 09/950,270

[86] 国际申请 PCT/US2002/028903 2002.9.10

[87] 国际公布 WO2003/022312 英 2003.3.20

[85] 进入国家阶段日期 2004.3.10

[73] 专利权人 柏尔纯公司

地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 托马斯·C·佩奇 威廉·R·赖特

小爱德华·E·雅各布斯

审查员 刘启明

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 过晓东

权利要求书 2 页 说明书 14 页 附图 5 页

[54] 发明名称

用储存的红血球改善氧传送的方法

[57] 摘要

给病人进行治疗的方法包括给病人使用储存的红血球和血红蛋白溶液。储存的红血球和血红蛋白溶液可以同时给病人使用。作为替代，可以在给病人使用储存的红血球之前使用血红蛋白溶液，或者可以在给病人使用血红蛋白溶液之前使用储存的红血球。这项发明的组合物包括储存的红血球和血红蛋白溶液。

1. 一种改进储存红血球释放氧的方法，包括将储存的红血球与血红蛋白溶液组合，其中血红蛋白溶液包括聚合的血红蛋白，储存的红血球至少储存约 7 天。
2. 根据权利要求 1 的方法，其中来自血红蛋白溶液的血红蛋白占结合溶液中的总血红蛋白的约 50%。
3. 根据权利要求 1 的方法，其中来自血红蛋白溶液的血红蛋白占结合溶液中的总血红蛋白的约 10%。
4. 根据权利要求 1 的方法，其中储存的红血球已储存约 35 天以上。
5. 根据权利要求 1 的方法，其中储存的红血球已储存约 42 天以上。
6. 根据权利要求 1 的方法，其中储存的红血球中的血红蛋白具有小于大约 15mm Hg 的 P_{50} 。
7. 根据权利要求 1 的方法，其中储存的红血球中的血红蛋白具有小于大约 20mm Hg 的 P_{50} 。
8. 根据权利要求 1 的方法，其中储存的红血球中的血红蛋白具有小于大约 25mm Hg 的 P_{50} 。
9. 根据权利要求 1 的方法，其中血红蛋白是与戊二醛聚合的。

10. 根据权利要求 9 的方法，其中聚合的血红蛋白溶液具有：

(a) 按重量计含量不足大约百分之十五的高铁血红蛋白；

(b) 浓度不足大约每毫升 0.5 内毒素单位的内毒素；

(c) 按重量计少于或等于百分之十五的聚合血红蛋白，其分子量大于大约 500,000 个道尔顿；和

(d) 按重量计少于或等于大约的百分之十的聚合血红蛋白，其分子量少于或等于大约 65,000 道尔顿。

11. 一种组合物，包括血红蛋白溶液和储存红血球，其中血红蛋白溶液包含聚合的血红蛋白，而储存的红血球已被储存至少大约 7 天。

12. 根据权利要求 11 的组合物，其中血红蛋白已与戊二醛聚合。

13. 根据权利要求 11 的组合物，其中储存的红血球已被储存大约 35 天以上。

14. 根据权利要求 11 的组合物，其中储存的红血球已被储存大约 42 天以上。

用储存的红血球改善氧传送的方法

相关的专利申请

这份申请是 2001 年 9 月 10 日申请的美国专利申请第 09/950,270 号的继续申请并且要求赋予该申请的优先权。在此通过引证将上述申请的教导全部并入本文。

本发明的现有技术

储存的血随着时间的流逝遭受许多有害的生物化学变化，被统称为“储藏损害”。这些变化能包括细胞的微聚集作用、溶血作用、泡囊形成、降低细胞膜柔性、降低稳定性和增加血红蛋白-氧亲和力。这些变化降低给病人使用包含储存的血或红血球的血液产品的全部利益，而且在给病人输血的时候甚至可能引起有害的作用。例如，增加微聚集体形成和丧失红血球细胞膜柔性可能引起造成局部缺血和肺部功能失调的微循环脉管堵塞。

此外，在红血球中丧失 2,3-二磷酸甘油酯 (2,3-DPG) 实质上将导致增大的血红蛋白- O_2 亲和力。储存一星期以上的血液呈现在 2,3-DPG 水平方面的显著减少。在两个星期之后，只有大约 40% 的 2,3-DPG 保留，经过三个星期只有大约 10% 残留。

【S.P.Masouredis, “Preservation and Clinical Use of Erythrocytes and Whole Blood(红血球和全血的保存和临床使用)”，第 164 章，在 Williams、Beutler、Erslev 和 Lichtman 编辑的“Hemology”第三版中，McGraw-Hill, NY, pp1529-1549 (1983)】。2,3-DPG 的

丧失造成 P_{50} 相伴的下降。例如，在保护性的柠檬酸盐磷酸盐葡萄糖（CPD）中储藏四个星期之后，其中的红血球的 P_{50} 下降到大约 15mm Hg【Wells 等人，“Transfusion（输血）”，21:709-714（1981）】。由于来自红血球的氧的释放通常与 P_{50} 成正比，所以储存的红血球递送氧的能力也随着时间流逝逐渐降低。

储藏损害能通过减少对流和扩散递送氧两者在输送氧方面引起有害的改变。微聚集体和僵硬的细胞可能滞留在微脉管中，从而阻断向下游组织的流动。此外，包含氧亲和力比较高的血红蛋白的红血球具有降低的对组织释放氧的能力。对氧有高亲和力的储存的红血球能在经输血进入人体之后随着时间流逝“返老还童”。2,3-DPG 的水平经过 4 小时恢复到正常值的 30%到 50%，用大约 24 小时回到正常水平，虽然这个比率可能是可变的。

【Valeri 和 Hirsch, J. Lab. Clin. Med., 73:722-733（1969）; Beutler 和 Wood, J. Lab. Clin. Med., 74:300-304（1969）】。2,3-DPG 的恢复比率可能取决于病人的代谢状态。【O'Brien 和 Watkins, J. Thor. & Cardiovas. Surg., 40:611（1960）】。令人啼笑皆非的是输储存的红血球是为了满足治疗急性病的需要，但却蒙受急性病的损害。

尽管这些细胞在循环中“返老还童”，在数小时的时间周期内恢复柔性并且降低氧亲和力，但是仍然存在可能对病人（尤其是对那些危急病人）造成不利影响的减少氧输送的窗口。此外，尽管年轻的无症病人可能弥补储藏损害；但是弥补能力降低或缺乏的病人将面临进一步受伤害或降低治疗效果的危险。自相矛盾的是，有对氧的高亲和力的红血球的这种输血补偿反应在某些情况下可能引起减少局部的充氧作用。【Marik 和 Sibbald, JAMA 269:3024-30（1993）】。微栓塞的产生也是储藏损害的一部份。已知微栓塞是在储藏期间和在注入时在板结红血球中形成的，阻塞

微循环,造成对肺部毛细管内皮和肺泡上皮的伤害【Liu 等人, Ann. Thorac. Surg., 54:1196-1202 (1992); Gay 等人, Trauma 19:80-84 (1979)】。

新鲜的红血球已被推荐用于大量输血、给婴儿、老年病人和有心血管病和肺病的病人输血【Masouredis, S. P., “Preservation and Clinical Use of Blood and Blood Components(血液和血液成份的保存和临床使用”, 在 Willams, W. J., Beutler, E., Erslev, A. J. 和 Lichtman, M.A.编辑的 “Hemology” 中, McGraw-Hill, NY, pp.1529-1549; Sugarman, H.J.等人, Surg. Gynecol. Obstet., 131:733-741(1970); Valeri, G. R., 等人, Transfusion, 20:263-276 (1980); Hess, W., Anaesthetist., 36:455-467 (1987)】。然而,新鲜血球的可用性往往是有限的。

所以,存在对提高储存的红血球的氧输送和递送效率的产品和方法的需求。

本发明的概述

本发明涉及通过给病人使用储存的红血球和血红蛋白溶液对病人进行治疗的方法。

在一个实施方案中,先给病人使用血红蛋白溶液,然后给病人使用储存的红血球,其中血红蛋白溶液包含聚合的血红蛋白,而储存的红血球已被储存大约 48 小时以上。

在另一个实施方案中,所述方法包括先给病人使用储存的红血球,然后在储存的红血球给药的大约 8 小时之内给病人使用血红蛋白溶液,其中血红蛋白溶液包含聚合的血红蛋白,而储存的红血球已被储存大约 48 小时以上。

本发明被进一步涉及包括血红蛋白溶液和储存的红血球的组合物，其中储存的红血球已被储存大约 48 小时以上。

如同在本文中论证的那样，虽然红血球的储藏随着时间的推移减少从红血球释放氧的比率，但是除了储存的红血球之外血红蛋白溶液的给药逆转这种效果而且恢复氧递送给储存的红血球的潜力。由此产生的混合物在氧释放方面的行为更像新鲜的红血球。令人惊讶的是，这种效果即使在以总血红蛋白的大约百分之十（10%）那样少的血红蛋白溶液的形式给病人使用的时候也被获得。作为在本文中描述的研究结果，我们认为血红蛋白溶液连同储存的红血球一起添加将在氧释放方面导致超过同样总量的血红蛋白以新分离的红血球形式给药的实质性增加。

本发明方法和组合物与可能以别的方式可能达到的相比能更迅速地恢复储存的红血球的氧递送能力。本发明在急性病、婴儿和老年病人的治疗方面可能是特别有用的。此外，依照本发明的方法添加血红蛋白和储存的红血球不管微栓塞是否出现都将引起增大的组织充氧作用，因为比较小的血红蛋白分子能够穿过障碍而且递送氧。本发明的方法和组合物提高储存的红血球的氧输送和递送效率并且能延长储存的红血球的有用的储藏期。

附图简要说明

图 1 是随着时间流逝氧释放的曲线，它将来自储存的人类红血球的实际的和预测的氧释放与新分离的人类红血球的氧释放进行比较，其中各个点代表实验数据，而曲线代表来自理论模型的输出。

图 2 是把基于血红蛋白的氧传递体（HBOC）添加到储存的红血球中和添加到新鲜红血球中对氧释放的影响的剂量响应曲线。

图 3 是新鲜红血球和储存的红血球的样品独自地和在与两种不同数量的基于血红蛋白的氧传递体组合中的氧释放随着时间流逝的概要描述。

图 4 是储存的和新分离的红血球悬浮液的氧摄取数据的曲线，其中点代表实验数据，而曲线代表理论模拟。

图 5 是储存的红血球独自的和在与基于血红蛋白的氧传递体组合中的和新鲜红血球独自的氧摄取曲线。

本发明的详细描述

本发明的方法包括通过给病人使用储存的红血球和血红蛋白溶液对病人进行治疗。术语“储存的红血球”包括与野生型血红蛋白或红血球相比较具有大幅度被减少的 P_{50} ，其中野生型血红蛋白具有至少大约为 25 mm Hg 的 P_{50} 。“ P_{50} ”如同在本文中定义的那样意味着大约 50% 的血红蛋白与氧结合时氧的分压。在一个实施方案中，储存的红血球可能是由于遗传基因变化或疾病自然地具有远远少于大约 25 mm Hg 的 P_{50} 的天然的或新鲜的血液。具有减少的 P_{50} 的储存的红血球的例子是 P_{50} 等于或少于大约 25 mm Hg、等于或少于大约 15 mm Hg 的血液。储存的红血球能具有与来自健康个体的新分离的血液相比较被减少的 2,3-DPG 水平，从而造成减少的 P_{50} 。

在本发明的一个实施方案中，储存的红血球在给病人使用之前已与供体分离至少大约 48 小时。在另一个实施方案中，储存的红血球在给病人使用之前已与供体分离至少大约 7 天。在又一个实施方案中，储存的红血球已与供体分离至少大约 35 天。在另外一个实施方案中，储存的红血球在用本发明的方法给病人使用之前已与供体分离至少 42 天。

储存的红血球可以是被保护的血液。术语“被保护的血液”如同在本文中定义的那样意味着为了储藏和后来供输血使用已被处理的血液。适合保存血液的方法是众所周知的。适合保存血液的物理方法的例子是冷藏和冷冻。适合保存血液的化学方法的例子包括添加诸如酸式柠檬酸盐葡萄糖（ACD）或柠檬酸盐磷酸盐葡萄糖（CPD）之类的化合物。进而，血溶液可以添加诸如腺嘌呤、葡萄糖、甘露醇或它们的组合之类的增强成份。保存血液的方法的附加实例可以在 Holme 等人的美国专利第 5,487,971 号中找到，在此通过引证将其教导全部并入本文。

在另一个实施方案中，储存的红血球可以来源于冷冻的红血球。冷冻红血球的方法在技术上是众所周知的。这样的方法通常包括在低温下迅速凝固和保存，例如在液氮中，或者在有甘油之类低温保护剂存在的情况下凝固。通常，低温保护剂在输血之前被从红血球中除去。

在另一个实施方案中，储存的红血球已被处理，以便除去至少大约 80% 的白血球。适当的储存的红血球来源的其它例子包括板结红血球和洗过的红血球。

在本文中也被称为“基于血红蛋白的氧传递体”或“HBOC”的“血红蛋白溶液”意味着血红蛋白（无细胞的血红蛋白）的液体悬浮液。适合在本发明中使用的血红蛋白可以得自来自人和/或其它哺乳动物来源（例如，牛、猪、羊或犬）的新鲜的、陈旧的或过时的血液。除此之外，诸如在 Bio/Technology, 12:55-59 (1994) 中描述的用转基因法生产的血红蛋白和在 Nature, 356:258-260 (1992) 中描述的用重组法生产的血红蛋白之类用转基因法生产的血红蛋白也适合在本文描述的血红蛋白溶液中使用。

优选的是，血红蛋白是在分子间和/或分子内交联的。非必选的或作为替代的是，血红蛋白能被结合到诸如聚乙二醇或戊二醛之类的另一个分子上。优选的血红蛋白溶液的例子是在 Rausch 等人的美国专利第 5,618,919 号、Rausch 等人的美国专利第 5,905,141 号、Rausch 等人的美国专利第 5,084,558 号、Rausch 等人的美国专利第 5,296,465 号、Rausch 等人的美国专利第 5,840,852 号、Rausch 等人的美国专利第 5,753,616 号、Light 等人的美国专利第 5,895,810 号、Gawryl 等人的美国专利第 5,691,452 号、Wertz 等人的美国专利第 5,691,453 号和 Gawryl 等人的美国专利第 5,808,011 号中描述的，在此通过引证将它们的教导全部并入本文。血红蛋白可以具有大约 25mm Hg 的 P_{50} ，或大于 25mm Hg 的 P_{50} 。在特定的实施方案中，血红蛋白具有至少大约 38mm Hg 的 P_{50} 。

在一个实施方案中，血红蛋白溶液与戊二醛聚合，而且具有按重量计不足大约 15% 的高铁血红蛋白含量，少于大约每毫升 0.5 个内毒素单位的内毒素浓度，而且具有按重量计少于或者等于大约 15% 的分子量超过大约 500,000 道尔顿的聚合血红蛋白、按重量计少于或等于大约 10% 的分子量少于或等于大约 65,000 道尔顿的聚合血红蛋白。非必选的是，血红蛋白溶液可以有不足每毫升大约 0.5 内毒素单位的内毒素含量。

在一个实施方案中，来自血红蛋白溶液的血红蛋白与来自储存的红血球的血红蛋白的比例按重量计介于大约 1:9 和大约 1:1 之间。在其它的实施方案中，游离血红蛋白与细胞缔合血红蛋白的比例按血红蛋白浓度计是大约 1:4 或大约 2:3。

储存的红血球和血红蛋白溶液可以按任何次序给病人使用。血红蛋白溶液和储存的红血球也可以以交替的方式给药，其中某个数量的血红蛋白溶液在一轮或多轮中先于某个数量的储存的

红血球给药。在替代方案中，储存的红血球可以被首先给药。在一个实施方案中，本发明的方法包括在血红蛋白溶液给药的大约 36 小时之内完成储存的红血球的给药。作为替代，储存的红血球可以是在血红蛋白溶液给药的大约 24 小时之内或 8 小时之内给药的。在又一个实施方案，储存的红血球和血红蛋白溶液是同时给药的。优选的是，在给病人使用储存的红血球之前完成血红蛋白溶液的给药。

血红蛋白溶液和储存的红血球可以对病人按任何适当的血红蛋白浓度或血球比容给药。例如，血红蛋白溶液可以处在大约 10g/dL 的浓度下。在另一个实施方案中，血红蛋白溶液处在 14g/dL 的浓度下。储存的红血球可以是这样提供的，例如，按大约 30 到大约 80 的血球比容。

血红蛋白溶液、储存的红血球或它们的组合的适当的给药速率实例是介于每分钟大约 0.5 毫升和每分钟大约 100 毫升之间。在一个实施方案中，血红蛋白溶液、储存的红血球或它们的组合能以低速率（例如，大约每分钟 2.5 毫升）给药。适合血红蛋白溶液给药的时间周期的例子是每大约九（9）小时大约 2.5 分钟。

在另一个实施方案中，本发明包括血红蛋白和储存的红血球的组合物。该组合物可以被装在任何适合储存或保存血红蛋白或红血球的容器中。优选的是，血红蛋白是聚合的。在特别优选的实施方案中，血红蛋白与戊二醛聚合。

形成组合物的方法包括将适当的血红蛋白溶液与适当的储存的红血球合并。适当的血红蛋白溶液和适当的储存的红血球是前面描述过的。血红蛋白和储存的红血球可以被合并，然后立刻被本发明的方法用来对病人进行治疗，或者被合并的血红蛋白和红血球可以被储存起来供以后使用。

例证

样品的准备

新鲜的红血球 (Frbc) 悬浮液是这样制备的, 即把血从健康的供体抽到肝素中 (0.1 毫升/10 毫升), 冷却到 4℃, 离心分离, 并且将血浆和淡黄色的涂层除去。这些细胞是用两个体积的等渗磷酸盐缓冲盐水 (PBS) [pH 值为 7.4] 再次悬浮的。离心分离和用 PBS 再次悬浮被完成三次, 以便除去残留水平的血浆和淡黄色的涂层材料。然后, 新鲜的红血球被稀释到 30% 的血球比容 (hct) 并且在使用前在 4℃ 下储存。如果超过 48 小时 (2 天) 不被使用, 那么这些细胞被丢弃。

储存的红血球 (Srbc) 本质上是从 Gulf Coast Blood Center, Houston, TX 购买的板结红血球单位。标准的可临床使用的单位是在四、五个星期的储藏时间之后从血库取出的。储存的细胞借助先前就新鲜红血球描述的重复的离心分离和再次悬浮的方法用 PBS (pH7.4) 洗涤。不同于新鲜的红血球, 在第一次离心分离之后就有溶血的证据。洗涤被重复 (高达六次), 直到没有可见的溶血作用或细胞碎片为止。经过洗涤的储存的红血球被稀释到 30% 的 hct 并且在使用前在 4℃ 下保存。

在人造毛细管中使用之前 (图 1), 样品被抽到微毛细管血球比容计的管之中, 以便搜寻溶血作用和再次检验血球比容。红血球血红蛋白的 P_{50} 是用 Hemox 分析仪 (TCS Medical Products Co., New Hope, PA) 测量的。

在这项研究中使用的 HBOC 是由 Biopure Corp., Cambridge, MA 提供的。HBOC 由在生理溶液中的与戊二醛聚合的超纯牛血

红蛋白组成。HBOC 具有 38 的 P_{50} 和大约 1.4 的 Hill 系数。HBOC 的样品是用真空瓶提供的并且在使用前在室温下保存。

在即将使用之前，经过洗涤的储存的红血球与 HBOC 混合，以便制成储存的红血球/HBOC 混合物。这些混合物被命名为“储存的红血球/HBOC1-1”和“储存的红血球/HBOC9-1”。储存的红血球/HBOC1-1 由等量（克）的红血球血红蛋白（作为细胞）和无细胞血红蛋白（HBOC）组成，对应于 15%血球比容和 5g/dl 血红蛋白溶液的最终组合物。储存的红血球/HBOC9-1 由 90%红血球血红蛋白（作为细胞）和 10%无细胞血红蛋白（HBOC）组成，对应于 27%血球比容和 1g/dl 血红蛋白溶液的最终组合物。两个样品都具有 10g/dl 的总血红蛋白浓度。

实验系统

实验装置先前已被描述过，例如，在 Page, T.C.等人的“Oxygen Transport by Erythrocyte/Hemoglobin Solution Mixtures in an in Vitro Capillary as a Model of Hemoglobin-Based Oxygen Carrier Performance(作为基于血红蛋白的氧传递体性能的模式用红血球/血红蛋白溶液混合物在体外毛细管中输送氧)”，Microvasc.Res., 55:54-64 (1998); Page,T.C.等人的“Prediction of Microcirculatory Oxygen Transport by Erythrocyte /Hemoglobin Solution Mixtures (用红血球/血红蛋白溶液混合物预测微循环氧输送)” Microvasc.Res., 56:113-126 (1998) 和 Page, T.C.等人的“Experimental and Mathematical Simulation of Oxygen Transport by Hemoglobin-Based Blood Substitute(用基于血红蛋白的血液代用品输送氧的实验和数学模拟)”，Blood Substitutes-Present and Future Perspectives, E. Tsuchida (编辑) 第 11 章, pp. 135-145 (1998) 中，在此通过引证将它们的教导全部并入本文。

实验系统

该系统包括定义直径大约为 25 微米的毛细管的有机硅橡胶毛细管薄膜。有机硅橡胶是因为它具有对氧的高浸透性又具有允许借助反光镜确定血红蛋白氧饱和状态的充分的光学透明性而被选定的。毛细管薄膜被装在显微镜的载物台上。毛细管薄膜在每个末端都被插入导管并且被灌注红血球悬浮液、血红蛋白溶液或和它们的混合物。双波长的微量分光光度法被用来沿着毛细管测定样品在各种不同的轴线位置的氧饱和状态。测量是沿着毛细管在每个位置按已知的 0% 和 100% 氧饱和状态进行的。这些标度被用来就实验测量结果计算沿着毛细管部分氧饱和随位置的变化。

测量

就氧摄取实验而言，样品先在血压计中脱氧，然后通过 8 微米核孔过滤器被送入原料容器（the feed reservoir）。当样品被拉过毛细管内腔的时候，充氧气体在毛细管薄膜上吹过。在氧释放实验中，空气平衡的样品被拉过毛细管，同时用潮湿的氮布满有机硅橡胶薄膜表面。包含 HBOC-301 的样品是用 50% 氧平衡的，以便实现完全饱和（部分饱和计算所需要的）。在饲养容器中的时候，样品被不断地搅拌，以避免沉淀。数据是沿着毛细管在五个不同的位置对四种流速获取的。数据被转换成部分氧饱和并且被表示成部分饱和对视在驻留时间。进行这些计算的方法是在前面识别的关于使用的实验系统的参考文献中详细讨论的。

结果

储存的细胞需要大量洗涤而且是易碎的。在用 Hemox 分析仪（TCS Medical Products, New Hope, PA）测量时观测到的 P_{50} 是 $15 \pm 1 \text{ mmHg}$ 。经过洗涤的储存的红血球样品在储存 24 小时之后有值得注意的溶血而且不得不再次洗涤。

氧释放

用储存的和新鲜的红血球（通常分别用 Srbc 和 Frbc 表示，或用 rbc 表示）进行氧输送研究的结果呈现在图 1 中。数据被表示成平均值 $\pm$ 标准差。将这些观察结果与用对于新鲜的和储存的红血球将 P_{50} 分别设定在 26mmHg 和 15mmHg 的数学模型预测的曲线相比较。这些样品的血球比容是 30%。来自 Srbc 的氧释放与人类的新鲜红血球相比较被大大减少。模型结果对于新鲜的红血球与释放数据一致，但是略微低于从储存的红血球预测的释放。

把数量逐渐增加的 HBOC 添加到储存的细胞中的剂量响应实验的释放数据的概要描述呈现在图 2 中。所有的样品都已用潮湿的空气平衡。为了清楚将图 1 中的 Srbc 和 Frbc 的数据系列表示成拟合曲线。Srbc/HBOC9-1 样品的平衡饱和被计算出来是 0.98，而 Srbc/HBOC1-1 的平衡氧饱和被计算出来是 0.92。在氧释放方面实质性的增加甚至对 Srbc/HBOC9-1 样品也被注意到，而且氧释放效率在较高的 HBOC 分数浓度下增加。起因于储藏的氧输送效率丧失在添加少量的 HBOC 的情况下被逆转。

所有样品（点）的氧释放的概要描述呈现在图 3 中，与对于红血球和 rbc/HBOC 混合物被证实的氧输送数学模型（曲线）相比较。如同在图 3 中能看到的，由于添加 HBOC 被增大的氧释放对于所有的 Srbc 和 Frbc 混合物都被观察到。包含 Frbc 的样品与相应的包含 Srbc 的样品相比卸下更多的氧。模型是对 Frbc 和 Frbc 与 HBOC 的混合物预测的，但是对于 Srbc/HBOC1-1 和 Srbc/HBOC9-1，模型对所有的驻留时间的氧释放都估计不足。所以，不管令人瞩目的更大的对氧的亲合力，在与基于血红蛋白的氧传递体结合的时候，储存的红血球呈现比预测结果大得多的释放率。进而，与预测的行为相反，在与相同数量的基于血红蛋白的氧传递体混合的时候，储存的红血球的氧释放率与新鲜红血球的相当。

氧摄取

Srbc 和 Frbc 的氧摄取结果被展示在图 4 中。数据点与理论模拟(曲线)进行比较。曲线是用理论的红血球悬浮液模型产生的。对于新鲜细胞, P_{50} 被设定在 15mmHg, 对于储存的细胞, P_{50} 被设定在 26mmHg。储存的细胞(圆形)的氧摄取比新鲜细胞(三角形)快。相同的趋势可以在数据的数学模拟中看到。对于新鲜红血球, 实验数据与理论曲线一致, 但是对于储存的红血球, 实验数据展现在短驻留时间下比预测的高得多的氧摄取率。这种“猝发”效应通常与血红蛋白溶液相关。

“猝发”效应在图 5 中能看到。用 Srbc/HBOC 混合物的剂量响应实验的结果是在用于氧摄取的图 5 中予以概要描述的。提出四个数据系列, 包括 Srbc、Srbc/HBOC1-1、Srbc/HBOC9-1 和 Frbc。Frbc 的数据系列是为了进行比较而展示的。Srbc 和 Srbc/HBOC 混合物的氧摄取比 Frbc 样品的快。纯红血球样品饱和得比包含 HBOC 的样品更完全。这部份地归因于 HBOC 被减少的氧亲和力(在室内空气中不完全饱和)。包含 HBOC 的样品也比单独的红血球慢得多地接近平衡饱和值。这种行为先前已讨论过【Page 等人(1998), 见上文】。用于 rbc/HBOC1-1 和 rbc/HBOC9-1 的平衡值分别是 92%和 98%。用 1.3 秒的保留时间, 实验数据系列没有达到这些饱和水平。

讨论

如同在本文中论证的那样, 血红蛋白溶液在添加到储存的红血球中的时候即使储存的红血球的血红蛋白有高的氧亲和力也将恢复氧输送。如同前面展示的那样, 按九份重量的血红蛋白来自储存的红血球对一份重量的血红蛋白来自血红蛋白溶液的比例把血红蛋白溶液添加到储存的红血球中将导致增大的氧释放超过储存的红血球独自の氧释放。氧释放被这样恢复, 以致与新

分离的血液释放的氧（图 2 和图 3）相比较至少有一样多的氧被储存的红血球/血红蛋白溶液的混合物释放。按一份重量的血红蛋白来自储存的红血球对一份重量的血红蛋白来自 HBOC 的比例把 HBOC 添加到储存的红血球中将在氧释放方面导致与 9:1 的混合物相当的并且与新鲜红血球（图 2 和 3）相当的大幅度增加。这种恢复显然是在储存的血球中的 2,3-DPG 水平没有恢复的情况下发生的。

储存的红血球样品和储存的红血球/HBOC9-1 混合物的氧释放比用数学模型预测的高（图 3）。红血球悬浮液对存在甚至更小量的高亲和力的胞外血红蛋白非常敏感。在实验期间任何溶血现象都造成增加细胞外的高亲和力的血红蛋白和相伴地增加氧释放。红血球和储存的红血球/HBOC9-1 混合物对这种现象特别敏感，而储存的红血球/HBOC1-1 混合物对小幅度增加胞外的血红蛋白浓度较不敏感。

与在使用储存的红血球的实验期间对回收容器中的游离血红蛋白的观察结合，模型模拟和实验数据之间的差异表明由于溶血作用细胞外的血红蛋白水平有所增加。虽然由于溶血现象游离的血红蛋白出现在储存的临床单位中，但是在临床背景中，游离的血红蛋白将被身体快速地除去。为此，在实验测试之前通过细胞洗涤将溶血水平降低。一些溶血现象仍然在实验期间发生，如同被游离的血红蛋白出现在回收容器中证实的那样。

等同物

本发明的方法的特征和其它细节现在将被更具体地描述并且将在权利要求书中指出。人们将理解本发明的特定的实施方案是作为例证而不是作为本发明的限制被展示的。本发明的原则特征可以在不脱离本发明的范围的情况下被用在各种不同的实施方案中。除非另有说明，所有的份数和百分比都按重量计。

储存的和新鲜的红血球的氧释放

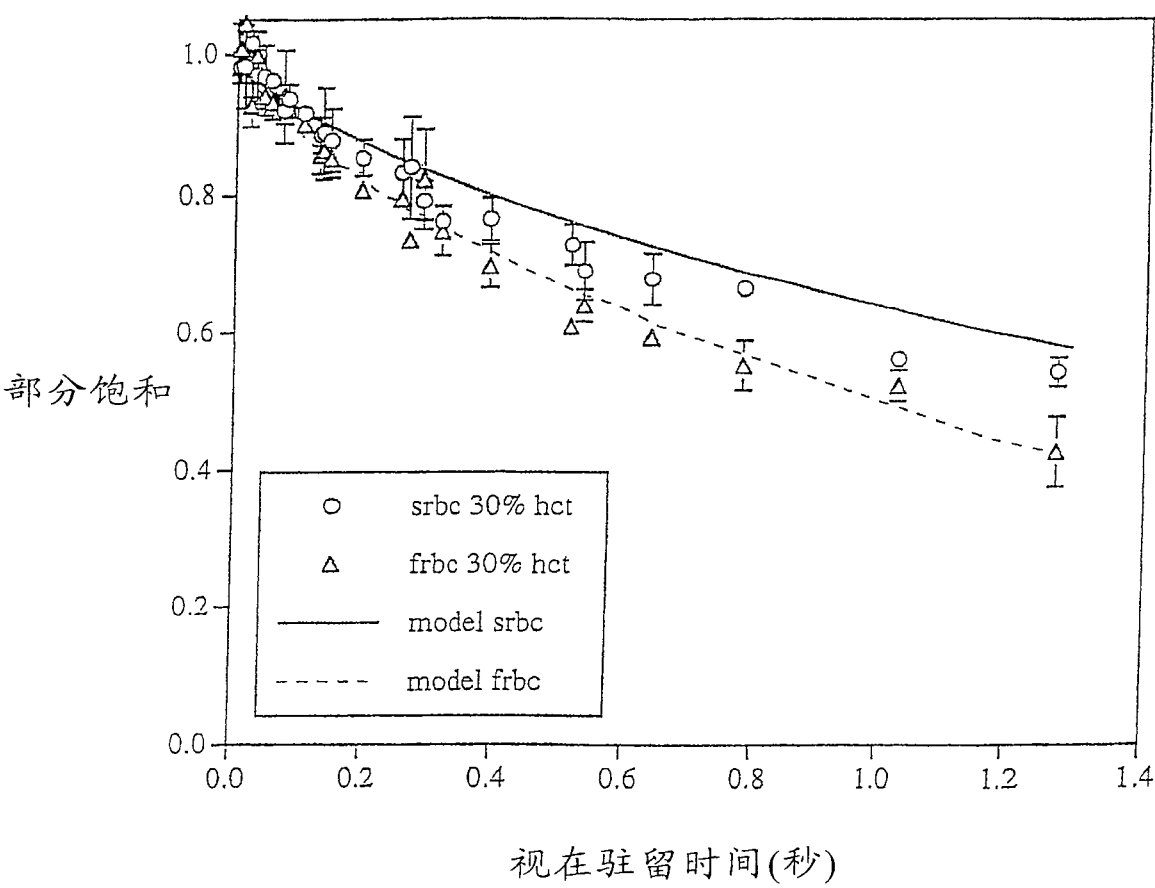


图 1

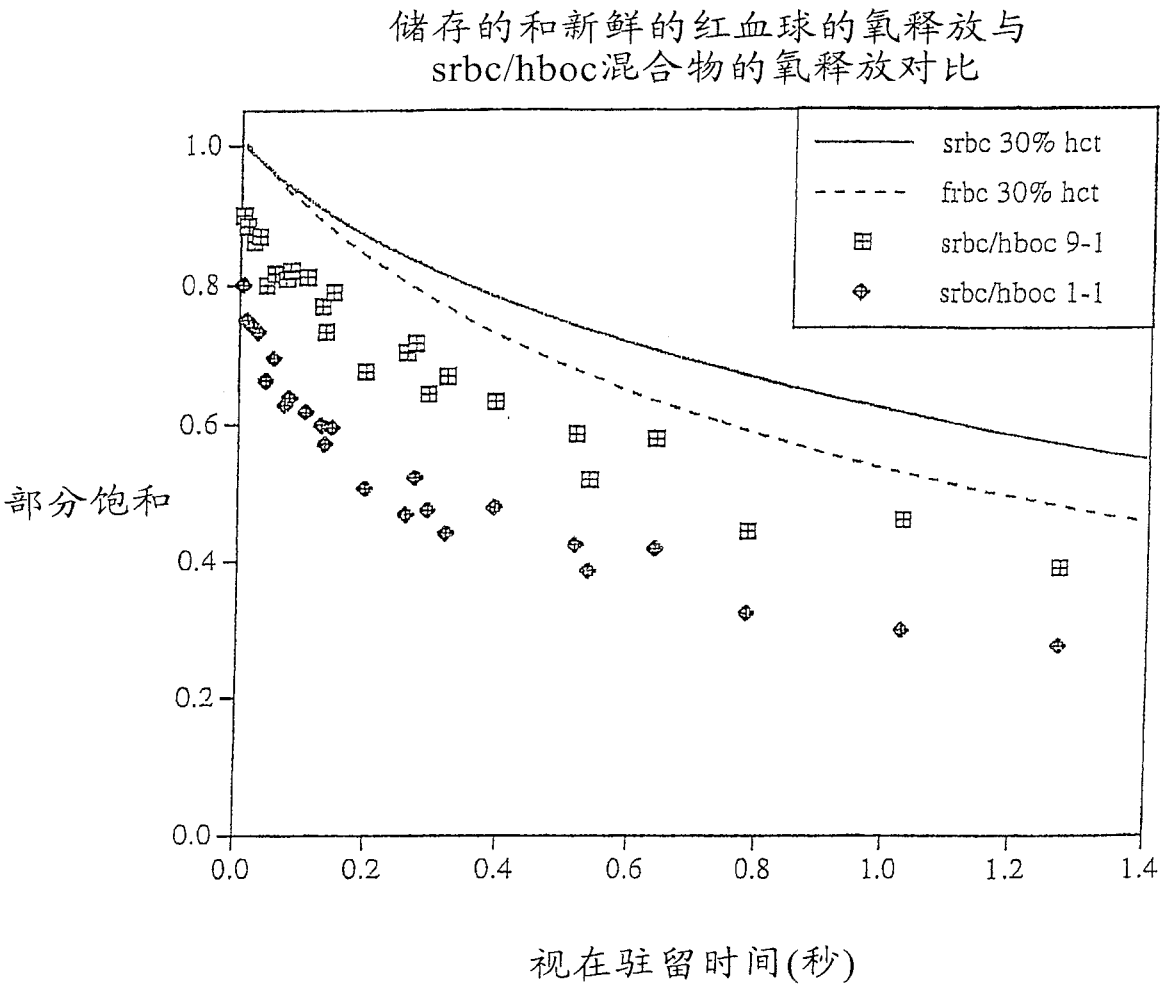
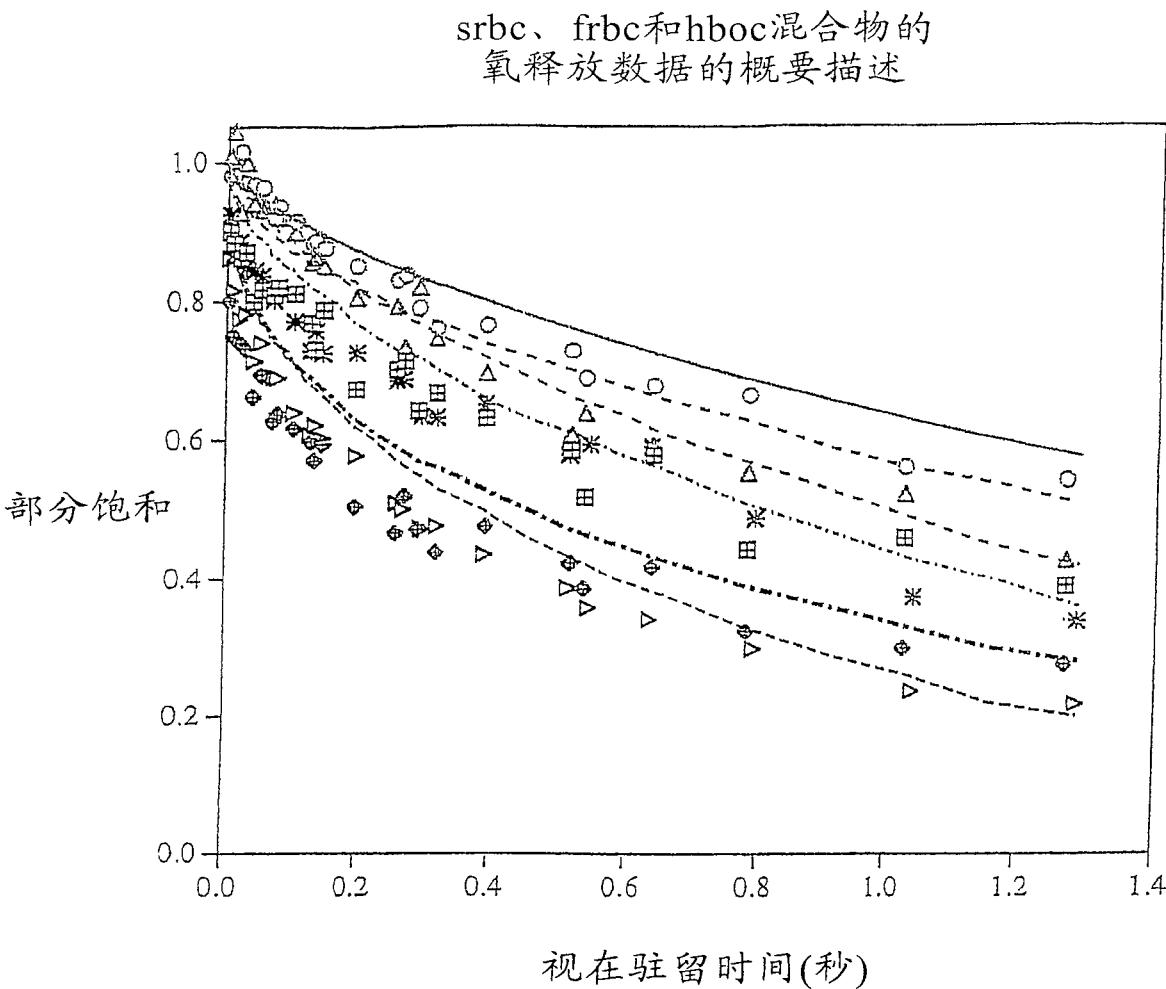


图 2



○	srbc	■	srbc/hboc 9-1	◆	srbc/hboc 1-1
——	model srbc	-----	model srbc/hboc 9-1	- · - · -	model srbc/hboc 1-1
△	frbc	*	frbc/hboc 9-1	▷	frbc/hboc 1-1
- - - - -	model frbc	- · - · -	model frbc/hboc 9-1	-----	model frbc/hboc 1-1

图 3

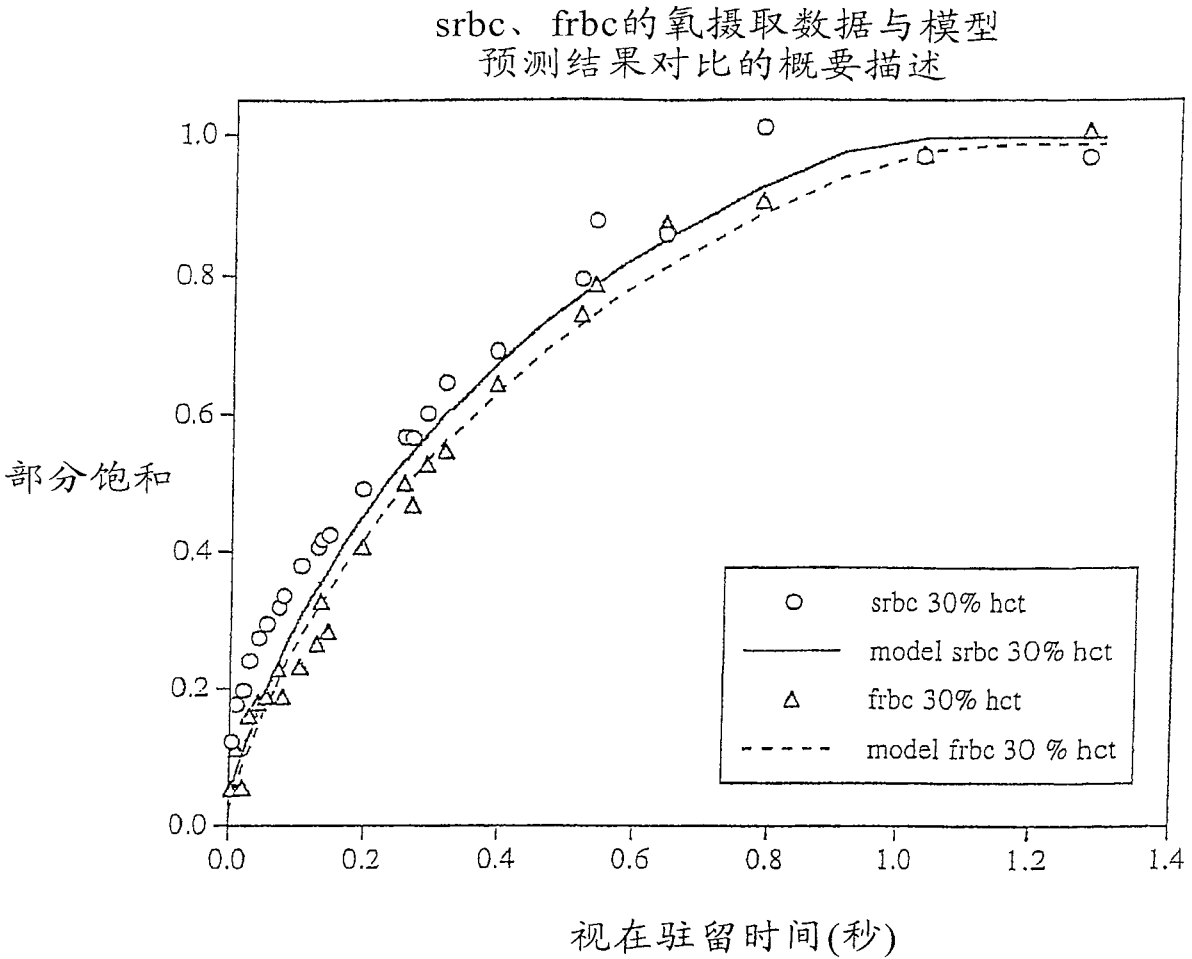


图 4

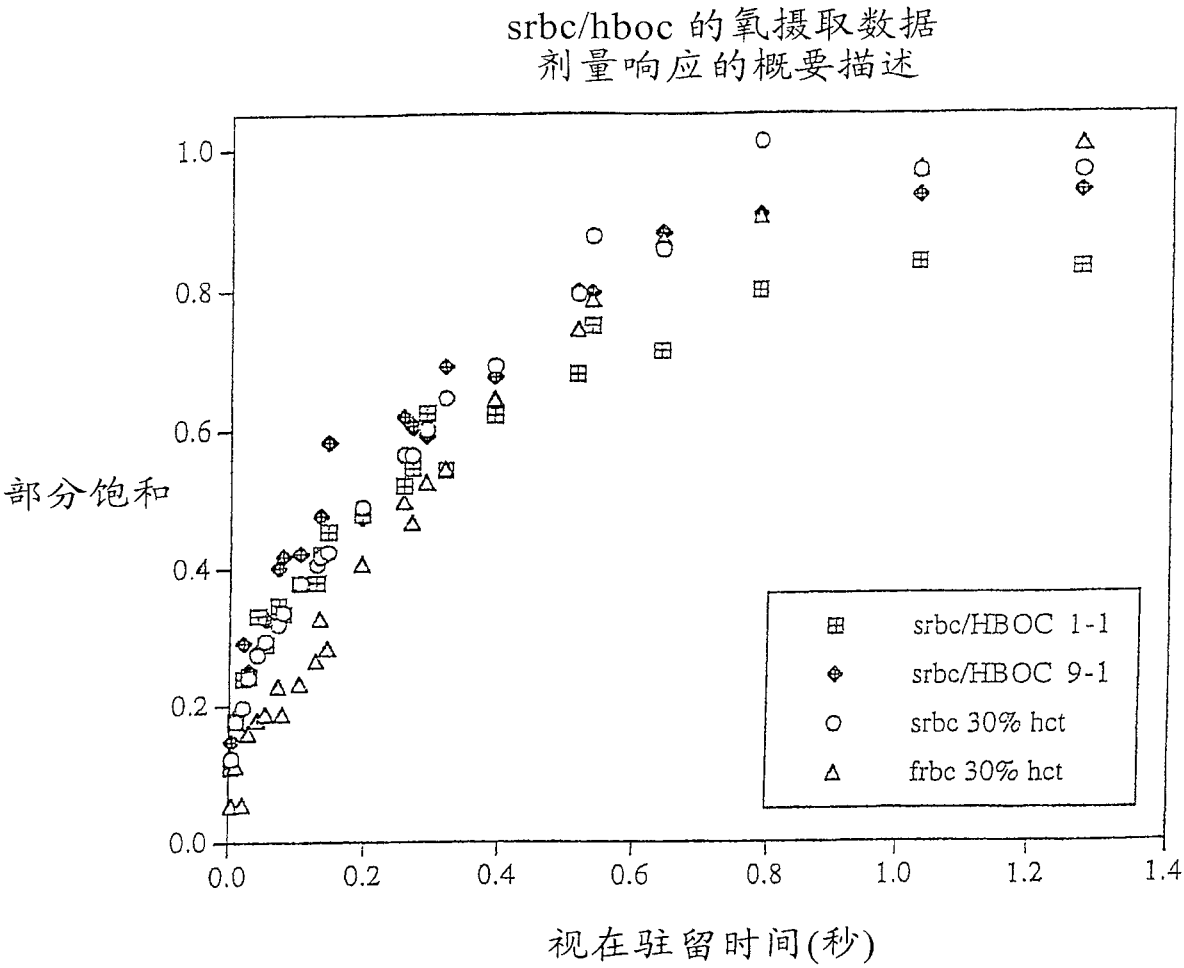


图 5