

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200610068296.6

[51] Int. Cl.

A61J 1/00 (2006.01)

A01N 1/02 (2006.01)

B65D 65/40 (2006.01)

B65D 81/24 (2006.01)

C07K 14/805 (2006.01)

C08L 23/08 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 11 月 15 日

[11] 公开号 CN 1861036A

[51] Int. Cl. (续)

C08L 23/14 (2006.01)

[22] 申请日 2000.7.7

[21] 申请号 200610068296.6

分案原申请号 00809685.6

[30] 优先权

[32] 1999.7.7 [33] US [31] 09/349,290

[71] 申请人 柏尔纯公司

地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 玛丽亚·S·盖瑞尔

罗伯特·A·胡特陈斯

威廉·R·赖特

[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 4 页 说明书 42 页

[54] 发明名称

用氧屏障膜外包装保存血红蛋白血液代用品
的方法及其产品

[57] 摘要

本发明涉及保存血红蛋白血液代用品的稳定性的方法，包括将血红蛋白血液代用品保持在基本上不含氧的氛围中。保存脱氧血红蛋白血液代用品的方法包括将脱氧血红蛋白血液代用品保持在氧屏障膜外包装中，其中外包装的至少一面包括透明层压物物料，其中外包装的至少另一面包括箔层压物物料。保存的脱氧血红蛋白血液代用品包括脱氧血红蛋白血液代用品和氧屏障膜外包装，其中外包装的至少一面包括透明层压物物料，其中外包装的至少另一面包括箔层压物物料。

1. 一种保存包装的脱氧血红蛋白血液代用品的方法，包括将包含在初级包装中的脱氧血红蛋白血液代用品保存在包括透明层压物物料和箔层压物物料的成仓的氧屏障膜外包装中，其中透明层压物物料包括柔性氧化硅层，其中初级包装和血液代用品密封在氧屏障膜外包装箔层压物物料和透明层压物物料之间的仓内。
2. 依据权利要求 1 的方法，其中透明层压物物料进一步包括聚酯层。
3. 依据权利要求 2 的方法，其中透明层压物物料进一步包括线性低密度聚合物层。
4. 依据权利要求 3 的方法，其中线性低密度聚合物层是从下列组中选取的，包括聚乙烯，聚丙烯，和它们的共聚物。
5. 依据权利要求 4 的方法，其中线性低密度聚合物层是线性低密度聚乙烯。
6. 依据权利要求 5 的方法，其中透明层压物物料和箔层压物物料在氧屏障膜外包装的外周连续地结合。
7. 依据权利要求 6 的方法，其中氧屏障膜外包装在约 23℃ 一个大气压下每 24 小时每 645 平方厘米氧渗透量少于约 0.01 立方厘米。

8. 依据权利要求 7 的方法, 其中氧屏障膜外包装在约 25℃ 一个大气压下每 24 小时每 645 平方厘米氧渗透量少于约 0.0005 立方厘米。
9. 依据权利要求 8 的方法, 其中氧化硅层的厚度在约 100Å 到约 2000Å 之间的范围。
10. 依据权利要求 9 的方法, 其中聚乙烯层的厚度在约 0.013 毫米到约 0.254 毫米之间。
11. 依据权利要求 10 的方法, 其中聚乙烯层的厚度约为 0.0508 毫米。
12. 依据权利要求 10 的方法, 其中氧屏障膜外包装在约 25℃ 100%/50%内/外相对湿度及一个大气压下每 24 小时每 645 平方厘米氧渗透量少于约 0.0005 立方厘米。
13. 依据权利要求 12 的方法, 其中透明层压物物料在约 25℃ 100%/50%内/外相对湿度及一个大气压下每 24 小时每 645 平方厘米氧渗透量少于约 0.0005 立方厘米。
14. 依据权利要求 13 的方法, 其中血红蛋白血液代用品是保持在氮, 氩或氦氛围中的。
15. 一种保存的脱氧血红蛋白血液代用品, 包括:
 - a)包含在初级包装中的脱氧血红蛋白血液代用品; 以及
 - b)包括透明层压物物料和箔层压物物料的共同形成仓的氧屏障膜外包装, 其中透明层压物物料包括熔化的氧化硅层, 其中初级包装和血液代用品密封在箔层压物物料和透明层压物物料之间的仓内, 从而将脱氧血红蛋白血液代用品保存在基本上不含氧的环境中。

16. 依据权利要求 15 的保存的脱氧血红蛋白血液代用品，其中透明层压物物料进一步包括聚酯层。
17. 依据权利要求 16 的保存的脱氧血红蛋白血液代用品，其中透明层压物物料进一步包括线性低密度聚合物层。
18. 依据权利要求 17 的保存的脱氧血红蛋白血液代用品，其中线性低密度聚合物层是从下列组中选取的，包括聚乙烯，聚丙烯，和它们的共聚物。
19. 依据权利要求 18 的保存的脱氧血红蛋白血液代用品，其中线性低密度聚合物层是线性低密度聚乙烯。
20. 依据权利要求 19 的保存的脱氧血红蛋白血液代用品，其中透明层压物物料和箔层压物物料在氧屏障膜外包装的外周连续地结合。
21. 依据权利要求 20 的保存的脱氧血红蛋白血液代用品，其中氧屏障膜外包装在约 23℃ 一个大气压下每 24 小时每 645 平方厘米氧渗透量少于约 0.01 立方厘米。
22. 依据权利要求 21 的保存的脱氧血红蛋白血液代用品，其中氧屏障膜外包装在约 25℃ 一个大气压下每 24 小时每 645 平方厘米氧渗透量少于约 0.0005 立方厘米。
23. 依据权利要求 22 的保存的脱氧血红蛋白血液代用品，其中氧化硅层的厚度在约 100Å 到约 2000Å 之间的范围。
24. 依据权利要求 22 的保存的脱氧血红蛋白血液代用品，其中聚乙烯层的厚度在约 0.013 毫米到约 0.254 毫米之间。

-
- 25.** 依据权利要求 24 的保存的脱氧血红蛋白血液代用品，其中聚乙烯层的厚度约为 0.0508 毫米。
- 26.** 依据权利要求 24 的保存的脱氧血红蛋白血液代用品，其中氧屏障膜外包装在约 25℃ 100%/50%内/外相对湿度及一个大气压下每 24 小时每 645 平方厘米氧渗透量少于约 0.0005 立方厘米。
- 27.** 依据权利要求 26 的保存的脱氧血红蛋白血液代用品，其中透明层压物物料在约 25℃ 100%/50%内/外相对湿度及一个大气压下每 24 小时每 645 平方厘米氧渗透量少于约 0.0005 立方厘米。
- 28.** 依据权利要求 27 的保存的脱氧血红蛋白血液代用品，其中血红蛋白血液代用品是保持在氮，氩或氦氛围中的。

用氧屏障膜外包装保存血红蛋白血液代用品的方法及其产品

本申请是 2000 年 7 月 7 日递交的申请号为 00809685.6, 发明名称为“用氧屏障膜外包装保存血红蛋白血液代用品的方法及其产品”的分案申请。

相关申请

本申请是 1999 年 7 月 7 日提交的共同待审的美国专利申请序列 No.09/348,881 的继续申请, No.09/348,881 申请是 1998 年 10 月 14 日提交的美国专利申请序列 No.09/173,189 的部分继续申请, No.09/173,189 申请是目前放弃的 1997 年 11 月 19 日提交的美国专利申请序列 No.08/974,658 的部分继续申请, No.08/974,658 申请是目前已授权的专利 5,691,452 的 1995 年 6 月 7 日提交的美国专利申请序列 No.08/471,583 的继续申请, No.08/471,583 申请是目前已授权的专利 5,840,582 的 1995 年 6 月 2 日提交的美国专利申请序列 No.08/458,916 的部分继续申请, No.08/458,916 申请是目前已授权的专利 5,854,209 的 1995 年 3 月 23 日提交的美国专利申请序列 No.08/409,337 的部分继续申请。

本发明的背景

存在一种治疗或预防由血液损失(如急性出血或在外科手术期间)引起的, 由贫血症(如恶性贫血症或镰状细胞性贫血症)引起的, 由休克(如容量缺损休克, 过敏性休克, 脓毒性休克或

变态反应休克)引起的组织缺氧的需要。使用血液和血液组成作为血液代用品作这些用途充满着风险。如使用全血常常伴随着传播能使患者恢复复杂化的或导致患者致命的造成肝炎的病毒和造成 AIDS 的病毒的风险。此外,使用全血需要进行血液选型和交叉配血以避免免疫血液学上的麻烦和供体间的不相容性。

人类血红蛋白,作为血液代用品,具有渗透活性及运输和传递氧的能力,但它也具有通过肾途径及通过血管壁快速从循环系统排除的不利之处,致使半衰期非常短,因此通常具有不满意的半衰期。并且,人类血红蛋白还常常被中毒量的内毒素,细菌和/或病毒污染。

非人类血红蛋白具有与人类血红蛋白相同的不足。此外,非人类源的血红蛋白还常常被蛋白质,如抗体的污染,这样会在受体内产生免疫系统反应。

以前,已经使用了至少四种其他种类的血液代用品,包括全氟化合物,合成血红蛋白类似物,脂质体-包裹的血红蛋白,和化学修饰的血红蛋白。然而,许多这些血液代用品一般具有短血管内停留时间,被循环系统作为外源物质排除,或滞留在肝脏,脾脏和其他组织中。并且,许多这些血液代用品与生命系统没有生物相容性。

因此,尽管制备血红蛋白-基血液代用品目前已很先进,但仍存在需要含有足够低量的污染物如内毒素,细菌,病毒,磷脂和非血红蛋白蛋白质以预防免疫系统反应及任何由于血液代用品输入引起的毒性作用的血液代用品。此外,血液代用品必须还能在环境条件下给组织运输和传递充分量的氧,并必须具有良好的血管内停留时间。

并且,较好地,血液代用品 1) 具有通常与全血的肿胀活性等同的肿胀活性, 2) 在没有交叉配血或敏感性测试的情况下, 能被输入到大多数受体中, 3) 可使用最小的冷藏量长时间保存。

血液代用品通常包装在具有高氧屏障和湿度屏障属性的金属箔层压物包装中。金属箔层压物通常是不透明的, 因此不能视觉检查产品, 也不能视觉检查初级包装的完整性。并且, 不透明的包装需要在包装外使用二级标签。

过去, 具有高氧屏障和湿汽屏障属性的含层压物的透明硅还没有使用在自动包装装置中, 因为重压这种物质会导致其破裂或损失其屏障属性。

本发明的简述

本发明涉及保存脱氧血红蛋白血液代用品的方法。方法包括将包装的脱氧血红蛋白血液代用品保持在氧屏障膜外包装中, 其中包装包括箔层压物物料和透明层压物料。在一个实施方案中, 氧屏障膜外包装在室温单位大气压下每 24 小时的氧渗透量小于约 0.01 立方厘米每 100 平方英寸(或约 0.01cc 每 645 平方厘米)。室温本文限定在约 23℃。在一个实施方案中, 外包装的至少一面包括透明层压物物料, 外包装的至少另一面包括箔层压物物料。在本发明的一个实施方案中, 外包装通过用所述的箔层压物料形成至少一个仓来制备。包装的脱氧血红蛋白血液代用品置于所述的箔的仓中。然后, 将透明层压物物料热密封到包括含有的包装的血红蛋白血液代用品的仓的箔层压物物料上, 从而将包装的血液代用品包含在外包装内。

本发明还涉及保存的脱氧血红蛋白血液代用品。本发明的保存的血液代用品包括包装的脱氧血红蛋白血液代用品和氧屏障

膜外包装的包装。在一个实施方案中，保存的脱氧血红蛋白血液代用品的氧屏障膜外包装包括透明的层压物，透明的层压物的在室温下单位大气压每 24 小时氧渗透量小于约 0.01 立方厘米每 100 平方英寸（或约 0.01cc 每 645 平方厘米）。包装的脱氧血红蛋白血液代用品是密封在外包装内，从而将脱氧血红蛋白血液代用品保存在基本上不含氧的环境中。在一个实施方案中，外包装的至少一个面或片包括透明的层压物物料，外包装的另一面包括箔层压物物料。外包装通过用所述的箔层压物料形成至少一个仓来制备。包装的脱氧血红蛋白血液代用品置于所述的箔的仓中。然后，将透明层压物物料热密封到包含所述血红蛋白血液代用品的箔层压物物料上，形成本发明的保存的脱氧血红蛋白血液代用品。

在本发明的一个实施方案中，透明层压物料在自动包装中与箔层压物料结合使用。在一个实施方案中，使用的是由 Tiromat（Avon, MA）生产的自动包装机器。

本发明的优点有很多。一个优点是依据本发明的方法储存的血红蛋白具有较高纯度及较长存放期。即使仅使用高屏障初级包装时，高屏障外包装就能提供增加量的产品质量。此外，本发明透明高屏障外包装提供了特别高的氧和水屏障属性，但却没有莎纶（saran）（聚偏氯乙烯，PVDC）层。因为在焚烧期间产生氯化产物如多环芳香烃和盐酸，PVDC 产生医疗废料问题。透明外包装使得初级包装的标签可以看见。因此，一般不需要在外包装上的二级标签。此外，也可以评估产品质量和初级包装的完整性。并且，如在本文中第一次演示的，自动装置可以透明氧屏障层压物一起使用，在非常少的人力及不损失屏障属性的情况下，可在短时间内生产大量包装。血液代用品在室温下保持两年或更长的时间，比以前的方法有显著的改进。

本发明的详细描述

本发明方法的性质和其他细节现在进行更具体的描述并在权利要求书中列出。可以理解认为本发明的具体实施方案通过实施例方式演示，并且不作为对本发明的限制。本发明的主要性质可在不背离本发明范围的不同实施方案中使用。

本发明涉及一种保存脱氧血红蛋白血液代用品稳定性的方法，包括将脱氧血红蛋白血液代用品保持在基本上不含氧的环境中。这种方法通过将血液代用品保持在不渗透氧的容器中来实施，如氧屏障膜初级包装，氧屏障膜外包装（如，袋），玻璃容器（如，瓶）或钢容器中。在初级包装是氧屏障膜的情况中，容器可从多种物料制备，包括聚合物膜，（如本质上不渗透氧的聚酯，乙烯乙烯基醇（EVOH），或尼龙），和其层压物。在容器包括氧屏障外包装的情况中，外包装可从多种物料制备，包括聚合物膜，（如，本质上不渗透氧的聚酯，乙烯乙烯基醇（EVOH），或尼龙）和层压物，如透明层压物（如含有氧化硅或 EVOH 的层压物）或金属箔层压物（如银或铝层压物）。

在外包装是膜的情况中，如聚酯膜，膜可通过多种适当的方法表现本质上不渗透氧的性质。在一个实施方案中，膜制备为本质上不渗透氧的。可替换地，在聚合物物料不具备充分的不渗透氧性质以满足所需规格的情况中，膜可以层压，或者经处理以降低或消除氧渗透性。

在一个优选的实施方案中，至少外包装的一个面使用透明层压物。在一个实施方案中，至少一层透明层压物是二氧化硅。氧屏障层厚度选地在约 100Å 和约 2000Å 之间。对于初级包装和外包装，层压物一般包括一或更多聚合物层。聚合物可以是多种

物质，包括如聚酯层（如 48 规格聚酯），尼龙或聚烯烃层，如聚乙烯，乙烯乙酸乙烯酯，聚丙烯或它们的共聚物。

本发明的外包装可以是多种结构的，包括瓶，圆筒，盒等。在一个较好的实施方案中，容器是袋状的。制备适当的袋可通过如以薄片的周界粘结一个或多个（如两个）薄片以形成牢固封闭的，不渗透氧的，具有可填充中心的结构。袋的形状可以是此领域中常规用到的。在包括聚烯烃（如线性低密度，低密度，中密度或高密度聚乙烯或聚丙烯和它们的共聚物）的层压物情况中，袋的周界是用热粘结的或密封的。对此领域中的技术人员可充分确定制备牢固封闭的，不渗透氧和/或湿汽的结构适当温度。

本发明涉及保存脱氧血红蛋白血液代用品的方法，还涉及保存的脱氧血红蛋白血液代用品。本发明的方法包括将脱氧血红蛋白血液代用品保持在氧屏障膜外包装中，其中外包装的至少一面包括透明层压物物料，外包装的至少另一面包括箔层压物物料。在本发明的一个实施方案中，外包装通过在箔层压物物料中形成至少一个仓并将脱氧血红蛋白血液代用品置于所述的仓内来制备，其中血红蛋白包含在初级包装中。然后，将透明层压物物料热密封到包括仓和所述的血红蛋白血液代用品的箔层压物物料上。在本发明的一个实施方案中，透明层压物物料包括二氧化硅包膜的聚酯膜。在本发明的另一个实施方案中，血红蛋白血液代用品保持在氮，氩或氦氛围下。

本发明的保存的血液代用品包括脱氧血红蛋白血液代用品和氧屏障膜外包装的包装，其中外包装的至少一面包括透明层压物物料，外包装的至少另一面包括箔层压物物料。在本发明的一个实施方案中，保存的脱氧血红蛋白血液代用品包括透明层压物物料，透明层压物物料包括二氧化硅包膜的聚酯膜。在另一个实施方案中，保存的血红蛋白血液代用品保持在氮，氩或氦氛围下。

在本发明的另一个实施方案中，保存的脱氧血红蛋白血液代用品的外包装通过在箔层压物物料中形成至少一个仓来制备。脱氧血红蛋白血液代用品置于所述的箔的仓中，其中脱氧血红蛋白血液代用品包含在初级包装中。然后，将透明层压物物料热密封到带有仓的并包含所述血红蛋白血液代用品的箔层压物物料上。

容器优选地在室温下，单位大气压每 24 小时氧渗透量小于约 0.01 立方厘米每 100 平方英寸(或约 0.01cc 每 645 平方厘米)，优选地在这些条件下氧渗透量小于约 0.001 立方厘米每平方英寸(或约 0.001cc 每 6.45 平方厘米)。在一个实施方案中，容器包括包括如带有外包装的塑料容器，如由聚酯(PET)/二氧化硅(SiO_x)/聚乙烯层压物构造的高屏蔽层压物物料。在一个实施方案中，二氧化硅层的厚度约为 100-2000Å。聚乙烯层厚度约为 0.0005 到约 0.01 英寸(或约 0.013 到约 0.254 毫米)，优选地为约 0.002 英寸(或约 0.0508 毫米)。在一个实施方案中，在 25℃及内/外相对湿度(RH)为 100%/50%(条件下，单位大气压每天氧渗透量少于约 0.005cc 每 100 平方英寸或少于约 0.005 立方厘米每 645 平方厘米)，水蒸汽传递量约为每天单位大气压(25℃, 100%/50% RH) 0.18 毫克每 100 平方英寸(或约 0.18 毫克每 645 平方厘米)。

使用 Tiromat 密封装置(Avon, Massachusetts)密封这些组合物膜外包装塑料袋。在一个实施方案中，外包装的底片是箔并且成形使得在箔层压物中形成至少一个盘形或仓。然后将初级包装中的血红蛋白血液代用品置于箔的仓中，将标签面向上。然后将箔和初级包装中的血红蛋白血液代用品用氮气吹扫并真空抽吸。然后将透明层压物热密封到箔层压物底层上。

在一个较好的实施方案中，血液代用品在基本上不含氧的氛围中包装。适当的氛围包括氮，氩和氦氛围。

如本文中所描述的，血液代用品是使用在人类，哺乳动物和其他脊椎动物中的血红蛋白基携氧组合物，其能运输并传递氧到重要的器官和组织，至少能保持足够的血管内肿胀压。脊椎动物是传统定义的脊椎动物，包括人类，或在循环系统中使用血液传递氧到组织中的任何其他脊椎动物。此外，循环系统的定义是传统上的定义，包括心脏，动脉，静脉和包括较小脉管结构如毛细血管的微循环。

本发明的血液代用品较好地含有内毒素，磷脂，外源蛋白质和其他污染物的量不会产生显著的免疫系统反应，并且对受体是非-毒性的。较好地，血液代用品是超纯的。如本文所定义的超纯的，意指含有少于 0.5EU/毫升的内毒素，少于 3.3 毫微摩尔/毫升的磷脂，和少到不可检测量的非-血红蛋白蛋白质，如血清清蛋白或抗体。

“内毒素”是指细胞结合脂多糖，产生作为革兰氏阴性细菌细胞壁外层的一部分，其在许多条件下是有毒的。当注射到动物中时，内毒素可引起发热，腹泻，出血性休克和其他组织损伤。内毒素单位（EU）已由 1983 年的美国药典协定（3014 页）定义为包含在 0.1 毫微克美国参考标准批 EC-5 中的活性。一管形瓶 EC-5 含有 10,000EU。适合在血液代用品中确定内毒素浓度的方法实施例包括由 Associates of Cape Cod, Woods Hole, Massachusetts 研制的“动力学/比浊鲎裂解物（Limulus amoebocytic Lysate）（LAL）5000 法”。

稳定的聚合血红蛋白，如本文所定义的，是血红蛋白基携氧组合物，其在适当的储存温度下在两年或更长时间的储存期间，基本上不增加或减少分子量分布和/或高铁血红蛋白的量，当储存在低氧环境中时，较好地是两年或更长的时间。适于储存一年或

更长时间的储存温度在约 0℃ 到约 40℃ 之间。较好的储存温度范围在约 0℃ 到约 25℃ 之间。

适当的低氧环境，或基本上不含氧的环境，定义为在至少约两个月的储存期间，较好地、在至少约 1 年的储存期间，或更好地在至少约两年的储存期间，产生高铁血红蛋白浓度少于约 15% 重量百分比血液代用品的与血液代用品接触的氧累积量。氧累积量包括渗入到血液代用品包装中的氧和血液代用品和包装的原始氧量。

贯穿这种方法，从红血细胞（RBC）收集到血红蛋白聚合，血液溶液，RBC 和血红蛋白都保持在足以最小化微生物生长，或生物负担的情况下，如保持温度为低于约 20℃ 并高于 0℃。较好地，温度保持在约 15℃ 或更低。更好地，温度保持在 $10 \pm 2^\circ\text{C}$ 。

在这种方法中，用于制备稳定聚合血红蛋白血液代用品过程中的部分组成是基本上清洁的以产生无菌的产品。无菌如此领域中所定义的，具体地，溶液满足在 USPXXII 第 71 部分，1483 - 1488 页中提供的美国药典对无菌的要求。并且，暴露在过程物流中的部分组成通常用不与过程物流反应或污染过程物流的材料制备或覆盖。这样的物料包括不锈钢和其他钢合金，如因科镍合金。

适当的 RBC 源包括人类血液，牛血液，绵羊血液，猪血液，从其他脊椎动物获取的血液和转基因制备血红蛋白，如在生物技术，12: 55 - 59（1994）中描述的转基因 Hb。

血液可从肝脏或新鲜宰杀的供体获取。一种收集牛全血的方法在颁布给 Rausch 等人的美国专利 No.5,084,558 和 5,296,465 中描述，其参考收入本篇。较好的是以清洁方式收集血液。

在收集后或不久，将血液与至少一种抗凝血剂混合以预防血液的显著凝结。血液适当的抗凝血剂是此领域中传统上已知的，包括如柠檬酸钠，乙二胺四乙酸和肝磷脂。当与血液混合时，抗凝血剂可以是固态的，如粉末，或是水溶液。

可以理解认为，血液溶液源可来自新鲜收集的样品或来自老样品，如从血库获取的期满人类血液。并且，血液溶液可以预先已被保持在冷冻状态和/或液体状态。较好地，使用在这种方法中的血液溶液不是冷冻的。

在另一个实施方案中，在将血液溶液引入到抗凝血剂中以前，测定血液溶液中的抗生素量，如青霉素的量。通过检验血液样品的供体没有进行抗生素治疗，确定抗生素的量以提供血液样品没有负担感染性生物体的确信程度。适当的测定抗生素的方法包括青霉素测定试剂盒（Difco, Detroit, MI），使用名为“快速检测奶中青霉素”的方法。较好地，血液溶液含有青霉素的量少于或等于约 0.008 单位/毫升。或者，可使用牧群管理程序来监测牲畜中的疾病或抗生素治疗。

较好地，在抗凝血剂步骤期间或之前，将血液溶液粗滤，如通过粗滤除去大聚集体和颗粒。600 目筛是适当的粗滤器实例。

然后用适当的方式冲洗血液溶液中的 RBC，如通过透滤法或使用至少一种溶液，如等张溶液通过间断稀释和浓缩步骤的组合来从胞外血浆蛋白质，如血清清蛋白或抗体（免疫球蛋白（IgG））中分离 RBC。可以理解认为，RBC 可以间歇或连续进料方式冲洗。

可接受的等张溶液是此领域中已知的，包括溶液，如柠檬酸/盐溶液，具有不会裂解 RBC 细胞膜的及取代全血血浆部分的

PH 和等渗容摩。较好的等张溶液具有中性 PH 及等渗容摩在约 285 - 315mOsm 之间。在一个较好的实施方案中，等张溶液由柠檬酸钠二水合物（6.0 克/升）和氯化钠（8.0 克/升）的水溶液组成。

可使用在本发明中的水包括蒸馏水，去离子水，注射用水（WFI）和/或低热原水（LPW）。WFI 是较好的，其是去离子蒸馏水，满足注射用水的美国药典规格。WFI 进一步在药学工程，11,15 - 23(1991)中描述。LPW 是较好的，其是含有少于 0.002EU/毫升的去离子水。

较好地，在加入到血液溶液中以前，将等张溶液过滤。适当的过滤器实例包括 Millipore 10,000 道尔顿超过滤膜，如 Millipore Cat #CDUF 050 G1 过滤器或 A/G 技术空心过滤器，10,000 道尔顿（Cat #UFP - 10 - C - 85）。

在一个较好的实施方案中，通过透析过滤法冲洗血液溶液中的 RBC。适当的透析过滤器包括孔大小能将 RBC 从显著小的血液溶液组成中分离出的微孔膜，如 0.1 微米到 0.5 微米的过滤器（如 0.2 微米空心纤维过滤器，Microgon Krosflo II 微过滤药液筒）。同时，过滤的等张溶液以与滤出液流出透析过滤器的速度（或体积）相同的速度连续地（或间歇地）作为补充加入。在 RBC 冲洗期间，直径显著小于 RBC 的血液溶液组成，或流体如血浆，在滤出液中穿过透析过滤器的壁。RBC，血小板和稀释血液溶液的较大组成，如白细胞，保留在并与等张溶液混合，其连续地或间歇地进入以形成透析血液溶液。

在一个更好的实施方案中，在透析过滤容器中血液溶液的体积初始通过在透析过滤容器中加入一定体积的过滤的等张溶液

来稀释。较好地，加入等张溶液的体积约等于初始血液溶液的体积。

在可替换的实施方案中，RBC 通过一系列连续（或逆向连续）稀释和浓缩步骤冲洗，其中血液溶液通过加入至少一种等张溶液稀释，通过流过过滤器，从而形成透析血液溶液来浓缩。

当污染 RBC 血浆蛋白质的量已被显著地减少（通常至少约 90%），RBC 冲洗就完成了。一般，当从透析过滤器 34 排出的滤出液的体积等于约 300% 的，或更多的，在用过滤的等张溶液稀释前包含在透析过滤容器中的血液溶液的体积时，RBC 冲洗就完成了。另外的 RBC 冲洗可进一步从 RBC 中分离细胞外血浆蛋白质。如，用 6 倍体积的等张溶液透析过滤可从血液溶液中除去至少约 99% 的 IgG。

然后将透析的血液溶液用将透析血液溶液中的 RBC 从白细胞和血小板中分离的装置处理，如通过离心作用。

可以理解认为，也可使用此领域中通常已知的其他方法将 RBC 从其他血液组成中分离出来。如，沉降法，其中在将 RBC 从其他血液组成中分离之前，分离方法不裂解显著量的 RBC 的细胞膜，如少于约 30% 的 RBC。

接着分离 RBC，通过用来将 RBC 裂解从 RBC 中释放血红蛋白以形成含血红蛋白溶液的装置将 RBC 裂解。裂解装置可使用不同的裂解方法，如机械裂解，化学裂解，低渗裂解或其他已知的释放血红蛋白但不显著损伤 Hb 运输和释放氧能力的裂解方法。

在另一个实施方案中，重组制备的血红蛋白，如在自然，356:258-260 (1992) 中描述的重组制备的血红蛋白，可使用在本发明的方法中替换 RBC。如上所述冲洗含有血红蛋白的细菌细胞，并从污染物中分离。然后使用此领域中已知的方法，将这些细菌细胞机械裂解，如球磨，以从细胞中释放血红蛋白并形成裂解细胞相。然后将这个裂解细胞相进行如裂解 RBC 相一样的处理。

裂解后，超过滤裂解 RBC 相以除去较大的细胞碎片，如分子量超过约 100,000 道尔顿的蛋白质。通常，细胞碎片包括所有全过部分细胞组成，除了 Hb，较小细胞蛋白质，电解质，辅酶和有机代谢中间产物。可接受的超过滤器包括，如由 Millipore (Cat#CDUF 050 H1) 制备的 100,000 道尔顿的过滤器和由 A/G 技术 (Needham, MA; 型号 No. UFP100E55) 制备的过滤器。

较好地，连续超过滤，直到裂解 RBC 相中的 Hb 浓度小于 8 克/升 (g/l) 以最大化可用来聚合的血红蛋白的产量。可以使用从裂解 RBC 相中分离 Hb 的其他方法，包括沉降法，离心分离或微过滤。

Hb 超滤出液可进行超过滤以从 Hb 超滤出液中除去较小细胞碎片，如电解质，辅酶，新陈代谢中间产物和分子量小于约 30,000 道尔顿的蛋白质，和水。适当的超过滤器包括 30,000 道尔顿超过滤器 (Millipore Cat # CDUF 050 T1 和/或 Armicon, # 540 430)。

然后，浓缩的 Hb 溶液可直接倒入一个或多个并联的层析柱中以通过高效液相层析进一步从其他组成中如抗体，内毒素，磷脂和酶和病毒中分离血红蛋白。适当的介质实例包括阴离子交换介质，阳离子交换介质，疏水作用介质和亲和介质。在一个较好的实施方案中，层析柱包括适于从非-血红蛋白蛋白质中分离血红蛋白的阴离子交换介质。适当的阴离子交换介质包括，如硅胶，

氧化铝凝胶，二氧化钛凝胶，交联右旋糖苷，琼脂糖或衍生组成，如聚丙烯酰胺，聚甲基丙烯酸羟乙酯和苯乙烯二乙烯基苯，已被阳离子化学官能团，如二乙基氨基乙基或季氨基乙基基团。适当的阴离子交换介质和与可能存在于裂解 RBC 相中的其他蛋白质和污染物相比选择性吸附和解吸附 Hb 的相应洗脱液，可方便地由此领域中的合理技术确定。

在一个更好的实施方案中，一种方法用来从硅胶制备阴离子交换介质，其进行热液处理以增加孔大小，用 γ -glycidoxy 丙基硅烷处理以形成活性环氧化物基团，然后用 $C_3H_7(CH_3)NCl$ 处理以形成季铵阴离子交换介质。这种方法在层析法期刊，120: 321 - 333 (1976) 中作了描述。

首先层析柱用促进 Hb 结合的第一洗脱液冲洗进行预处理。然后将浓缩的 Hb 溶液注入到柱中介质中。注入浓缩 Hb 溶液后，然后用不同的洗脱液连续地冲洗层析柱以产生分离的，提纯的 Hb 洗脱物。

在一个较好的实施方案中，在层析柱中使用 PH 梯度以从 Hb 中分离蛋白质污染物，如酶碳酸酐酶，磷脂，抗体和内毒素。具有不同 PH 值的系列缓冲液中的每一种，顺序地倒入以在层析柱中的介质内产生 PH 梯度。较好地，缓冲液进行了过滤，如用 10,000 道尔顿除热原膜。用来分离 Hb 的缓冲液应具有小的离子强度，这样 Hb 和非 - 血红蛋白污染物的洗脱通常取决于 PH 并不显著地取决于离子强度。一般，离子浓度约为 50mM，或更低的缓冲液具有适当的小离子强度。

第一缓冲液将浓缩的 Hb 运输到层析柱的介质中并促进 Hb 与介质的结合。然后用第二缓冲液调节柱内的 PH 以洗脱污染的非 - 血红蛋白组成而保持 Hb 与介质结合。然后用第三缓冲液洗

脱 Hb。收集 Hb 洗脱物。较好地，Hb 洗脱物流过灭菌过滤器。适当的灭菌过滤器包括 0.22 毫微米过滤器，如 Sartorius Sartobran Cat #5232507 G1PH 过滤器。

在一个较好的实施方案中，Hb 洗脱物开始的 3% - 4% 和 Hb 洗脱物最后的 3% - 4% 倒入废料中以保证 Hb 洗脱物的纯度。

其中层析柱可重新使用，保留在柱中的污染的非 - 血红蛋白蛋白质和内毒素，可通过第四缓冲液洗脱。

使用 PH 梯度从非 - 血红蛋白污染物中分离 Hb 进一步在 1995 年 6 月 7 日的美国专利 5,691,452 中描述，其参考收入本篇。

在一个较好的实施方案中，第一缓冲液是三羟甲基甲胺 (Tris) 溶液 (浓度约为 20mM; PH 约为 8.4 到约 9.4)。第二缓冲液是第一缓冲液和第三缓冲液的混合物，第二缓冲液的 PH 约为 8.2 到 8.6。第三缓冲液是 Tris 溶液 (浓度约为 50mM; PH 约为 6.5 到约 7.5)。第四缓冲液是氯化钠/Tris 溶液 (浓度约为 1.0M 氯化钠和约 20mM Tris; PH 约为 8.4 到约 9.4，较好的约为 8.9 - 9.1)。特别推荐的是第二缓冲液的 PH 在约 8.2 到约 8.4 之间。

一般，使用的缓冲液温度在约 0°C 到约 50°C 之间。较好的，使用期间缓冲液的温度在约 $12.4 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 。此外，缓冲液一般保存在温度约 9°C 到约 11°C 之间。

在聚合形成脱氧 Hb 溶液 (本文后称脱氧 - Hb) 之前，较好地 Hb 洗脱物进行脱氧，通过基本上对 Hb 脱氧但不显著降低 Hb 在 Hb 洗脱物中运输和释放氧能力的方式，如会由于形成氧化血红蛋白 (metHb) 变性而产生。

在一个实施方案中，Hb 洗脱物通过惰性气体流过相膜的气体输送来脱氧。这样的惰性气体包括，如氮气，氩和氦。可以理解认为，其他此领域中已知的脱氧血红蛋白溶液的方式，也可用来脱氧 Hb 洗脱物。这样的其他方式可包括，如氮气喷射 Hb 洗脱物，用还原试剂如 N-乙酰基-L-半胱氨酸 (NAC)，半胱氨酸，连二亚硫酸钠或抗坏血酸钠化学吹扫，或通过光来光解。

从层析柱洗脱后，较好地浓缩 Hb 洗脱物以改善过程的效率。Hb 洗脱物重新循环流过超过滤器以浓缩 Hb 洗脱物形成浓缩的 Hb 溶液。适当的超过滤器包括，如，30,000 或更小道尔顿超过滤器（如 Millipore Helicon, Cat # CDUF 050 G1 或 Amicon Cat # 540430）。一般，当 Hb 的浓度在约 100 到约 120 克/升之间时，Hb 洗脱物的浓缩完成。当浓缩 Hb 洗脱物时，Hb 洗脱物温度较好地保持在约 8 - 12℃。

然后将缓冲液倒入 Hb 溶液，Hb 溶液较好地是浓缩的，调节 Hb 溶液的离子强度以增强 Hb 的脱氧作用。较好地，将离子强度调节到约 150 毫克当量 (meq) /升到约 200 毫克当量 (meq) /升之间以减小 Hb 溶液总 Hb 的氧的亲和力。适当的缓冲液包括具有不会对 Hb 蛋白质产生显著的变性但有足够高的离子强度以促进 Hb 脱氧的 PH 值的缓冲液。适当的缓冲液实例包括 PH 值范围在约 6.5 到约 8.9 之间的盐溶液。较好的缓冲液是水溶 1.0M 氯化钠，20mM Tris 溶液，PH 约为 8.9。

较好地，产生的缓冲 Hb 溶液重新循环流过超过滤器，再次浓缩 Hb 溶液以改善过程效率。在一个较好的实施方案中，当 Hb 的浓度约为 100 克/升到约 120 克/升之间时，浓缩完成。

在脱氧作用期间，Hb 溶液循环流过适当的相转移膜。适当的相转移膜包括，如，0.05 毫微米聚丙烯中空纤维微过滤器（如

Hoechst - Celanese Cat # 5 PCM - 107)。同时，惰性气体逆向流过相转移膜。适当的惰性气体包括，如，氮气，氩和氦。穿过相转移膜的气体交换，从而将氧从 Hb 溶液中剥离。

脱氧作用持续直到 Hb 溶液的 pO_2 减少到其中在 Hb 溶液中氧化 Hb (氧基血红蛋白或 HbO_2) 的量约为 20% 或更少的量。在一个较好的实施方案中，在 Hb 溶液中 HbO_2 的量约为 10% 或更少。

在脱氧作用期间，Hb 溶液的温度通常保持在平衡脱氧速度和形成高铁血红蛋白速度的量上。保持温度以抑制高铁血红蛋白的量少于约 20%。当仍然在脱氧 Hb 溶液时，最优的温度会产生高体血红蛋白量少于约 5%，较好的高铁血红蛋白量少于约 2.5%。通常，在脱氧期间，Hb 溶液的温度保持在约 19℃ 到约 31℃ 之间。

在脱氧期间，和随后的本发明的方法的剩余步骤中，Hb 保持在低氧环境中以最少化 Hb 吸附氧并保持 HbO_2 的量少于约 20%，较好地少于约 10%。

然后较好地用含有巯基化合物的低氧含量储存缓冲液平衡脱氧 - Hb，以形成氧化作用稳定性脱氧 - Hb。适当的巯基化合物包括无 - 毒性还原试剂，如 N - 乙酰基 - L - 半胱氨酸 (NAC) D,L - 半胱氨酸， γ - 谷氨酰基 - 半胱氨酸，谷胱甘肽，2,3 - 二巯基 - 1 - 丙醇，1,4 - 丁二硫醇，硫代乙醇酸酯，和其他生物学上相容的巯基化合物。低氧含量储存缓冲液的氧含量必须足够低以不显著地降低巯基化合物在缓冲液中的浓度，抑制在氧化作用稳定性脱氧 - Hb 中氧基血红蛋白的含量到约 20% 或更少，较好地少于约 10%。一般，储存缓冲液含有 pO_2 少于约 50 托。

在一个较好的实施方案中，储存缓冲液应具有适于平衡 Hb 聚合和高铁血红蛋白形成的 PH 值，一般在约 7.6 到约 7.9 之间。

与脱氧 - Hb 混合的巯基化合物的量是足够高以在聚合期间增加 Hb 分子间交联并足够低以不显著降低 Hb 分子的分子间交联的量，由于高离子强度会降低分子间交连。一般，需要约 1 摩尔巯基官能基团 (- SH) 氧化稳定约 0.25 摩尔到约 5 摩尔的脱氧 - Hb。

在一个较好的实施方案中，储存缓冲液含有约 25 - 35mM 磷酸钠缓冲液 (PH7.7 - 7.8) 并含有在氧化作用稳定性脱氧 Hb 中 NAC 浓度在约 0.003 % 到约 0.3 % 重量比之间的一定量的 NAC。更好地，在氧化作用稳定性脱氧 Hb 中 NAC 浓度在约 0.05 % 到约 0.2 % 重量比之间。

较好地，在与脱氧 - Hb 混合之前，过滤储存缓冲液，如通过 10,000 道尔顿超过滤膜 (Millipore Helicon Cat # CDUF 050 G1 或 A/G 技术 Maxcell Cat # UFP-10-C-75)。

在一个实施方案中，氧化作用稳定性脱氧 - Hb 流过任选过滤器。适当的过滤器包括 0.2 毫微米聚丙烯预过滤器和 0.5 毫微米灭菌微过滤器 (Pall Profile II, Cat # ABIY005Z7 或 Gelman Supor)。脱氧 - Hb 保持在基本上不含氧的环境中。这可以通过在用氧化作用稳定性脱氧 - Hb 填充前或后，用惰性气体如氮气吹扫和覆盖过程装置来实施。

任意地，在将氧化作用稳定性脱氧 - Hb 转移到聚合过程前，可在聚合反应器中加入适当量的水。在一个实施方案中，适当量的水是当氧化作用稳定性脱氧 - Hb 加入到聚合反应器中时产生的溶液浓度约为 10 到约 100 克/升的水量。较好地，水是贫氧的。

在聚合步骤中水的 pO_2 减少到足以抑制 Hb O_2 含量到约 20 % 后, 通常少于约 50 托, 聚合反应器用惰性气体覆盖, 如氮气。然后将氧化作用稳定性脱氧-Hb 转移到聚合反应器中, 同时用适当流量的惰性气体覆盖。

当与交联试剂接触时, 将在聚合反应器中的氧化作用稳定性脱氧-Hb 溶液的温度升高到最优化氧化作用稳定性脱氧-Hb 聚合的温度。通常, 在聚合作用中, 氧化作用稳定性脱氧-Hb 的温度在约 25℃ 到约 45℃, 较好地约 41℃ 到约 43℃。可接受的加热聚合反应器的热传递装置实例夹套加热系统, 其通过在夹套中直接加入热 1,2-亚乙基二醇加热。

然后, 在足以聚合氧化作用稳定性脱氧-Hb 形成聚合血红蛋白(聚(Hb))的温度下, 将氧化作用稳定性脱氧-Hb 用适当的交联试剂处理约 2 小时到约 6 小时的一段时间。

适当的交联试剂的实例包括可交联 Hb 蛋白质的多官能试剂, 如戊二醛, 琥珀醛, 激活形式的聚氧化乙烯和右旋糖苷, α -羟基醛, 如羟乙醛, N-马来酰亚胺基-6-氨基己酰基-(2'-硝基, 4'-磺基)-苯基酯, m-马来酰亚胺安息香酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯, 琥珀酰亚胺基 4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯, 磺基琥珀酰亚胺基 4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯, m-马来酰亚胺苯甲酰-N-羟基琥珀酰亚胺酯, m-马来酰亚胺苯甲酰-N-羟基磺基琥珀酰亚胺酯, N-琥珀酰亚胺基(4-碘代乙酰基)氨基安息香酸酯, 磺基琥珀酰亚胺基 4-碘代乙酰基)氨基安息香酸酯, 琥珀酰亚胺基 4(p-马来酰亚胺苯基)丁酸酯, 磺基琥珀酰亚胺基 4(p-马来酰亚胺苯基)丁酸酯, 盐酸 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺, N,N'-亚苯基二马来酰亚胺, 和属于(双)bis-imidate 类, 酰基二嗪农类或酰基二卤化物的化合物, 亦在其中。

适当量的交联试剂是允许分子间交联以稳定 Hb 并允许分子间交联以形成 Hb 聚合物,从而增加血管内停留时间的量。通常,适当量的交联试剂是其中交联试剂与 Hb 的摩尔比率超过 2:1 的量。较好地,交联试剂与 Hb 的摩尔比率在约 20:1 到约 40:1 之间。

较好地,聚合作用在 PH 在约 7.6 到约 7.9 之间,氯浓度少于或等于约 35 毫摩尔的缓冲液中实施。

在一个较好的实施方案中,适当量的交联试剂加入到氧化作用稳定性脱氧-Hb 中并通过低剪切混合装置来混合。适当的低剪切装置包括静态混合器。适当的静态混合器是如,Chemineer 有限公司的“Kenics”静态混合器。

在一个实施方案中,将氧化作用稳定性脱氧-Hb 和交联试剂重新循环流过静态混合器产生湍流状况,均匀混合交联试剂和氧化作用稳定性脱氧-Hb,从而减少形成含高浓度交联试剂的脱氧-Hb 窝的可能性。均匀混合交联试剂和氧化作用稳定性脱氧-Hb 可减少形成大分子量 Hb 聚合物,即聚合物重超过 500,000 道尔顿,并可允许聚合期间交联试剂和脱氧-Hb 的快速混合。并且,在 Hb 聚合期间由于存在巯基化合物,较好地是 NAC,会产生显著的 Hb 分子间交联。虽然巯基化合物与戊二醛和/或 Hb 间相互作用的确切机理尚不了解,但可以推定,巯基化合物以至部分抑制高分子量 Hb 聚合物形成并择优地形成稳定四聚体 Hb 的方式影响 Hb/交联试剂的化学键合。

聚(Hb)定义为具有显著的分子间交联的,如果 Hb 分子的主要部分(如至少约 50%)化学键合在聚(Hb)中,并只有小部分 Hb 分子,如少于约 15%保留在分子量聚合血红蛋白链中。高分子量聚(Hb)分子是,如分子量超过约 500,000 道尔顿的分子。

在一个较好的实施方案中，戊二醛用作交联试剂。通常每公斤氧化作用稳定性脱氧-Hb 使用约 10 到约 70 克戊二醛。更好地，戊二醛经 5 小时加入直到每公斤氧化作用稳定性脱氧-Hb 有约 29-31 克戊二醛加入。

聚合作用后，聚合反应器中的聚(Hb)溶液的温度一般降低到约 15℃到约 25℃。

使用的交联试剂不是醛的情况下，形成的聚(Hb)通常是稳定的聚(Hb)。使用的交联试剂是醛的情况下，形成的聚(Hb)通常是不稳定的，直到与适当的还原试剂混合以减少聚(Hb)中稳定性差的键形成更稳定的键。适当的还原试剂实例包括硼氢化钠，氰基硼氢化钠，连二亚硫酸钠，三甲基胺，t-丁基胺，吗啉硼烷，嘧啶硼烷。在加入还原试剂之前，聚(Hb)溶液任意地通过超过滤作用浓缩，直到聚(Hb)溶液的浓度增加到约 75 到约 85 克/升之间。适当的超过滤器的一个实例是 30,000 道尔顿过滤器(如 Millipore Helicon, Car # CDUF 050 LT 和 Amicon, Cat # 540430)。

然后将聚(Hb)溶液的 PH 到碱性 PH 范围以保存还原试剂并预防氢气形成。其在随后的还原反应中能使 Hb 变性。在一个实施方案中，PH 调节到大于 10。PH 可以通过在聚合期间或之后在聚(Hb)溶液中加入缓冲溶液调节。通常除去非-聚合血红蛋白提纯聚(Hb)。这个过程可通过透析过滤或羧磷灰石层析来实施(参看如，美国专利 5,691,453)。

调节 PH 之后，至少一种还原试剂，较好的是硼氢化钠溶液，一般通过脱氧作用循环加入到聚合步骤中。一般，每摩尔 Hb 四聚体(每 64,000 道尔顿 Hb)加入约 5 到约 8 摩尔的还原试剂。在一个较好的实施方案中，对于在聚合系统 98 中的每九升聚

(Hb) 溶液, 以 0.1 到 0.12 lpm 的速度加入 1 升 0.25mM 硼氢化钠溶液。

然后可将稳定聚 (Hb) 的 PH 和电解质恢复到生理量, 通过使用具有适当 PH 和生理量的电解质的透析过滤溶液透析过滤稳定聚 (Hb), 以形成稳定的聚合血红蛋白血液溶液。较好地, 透析过滤溶液是缓冲溶液。

在聚 (Hb) 被还原试剂还原的情况中, 透析过滤溶液具有酸性 PH, 较好地在约 4 到约 6 之间。

无毒性巯基化合物也可加入到稳定聚 (Hb) 溶液中作为氧清除剂, 以增强最终聚合血红蛋白血液溶液的稳定性。巯基化合物可作为部分透析过滤溶液加入, 和/或独立加入。加入一定量的巯基化合物, 确立一个清除氧在储存期间保持高铁血红蛋白含量少于约 15% 的巯基浓度。较好地, 巯基化合物是 NAC。一般, 加入巯基化合物的量是足以确立巯基浓度在约 0.05% 到约 0.2% 重量比之间的量。

在一个较好的实施方案中, 当用惰性气体维持压力, 在基本上不含氧的环境中, 在聚合反应器和保持运输装置中时, 血液溶液在无菌操作状况下包装。

通过本发明的方法制备的适当的稳定聚合血红蛋白血液代用品的规格在表 I 中提供。

表 I

参数	结果
PH (18 - 22℃)	生理可接受的
内毒素	生理可接受的
无菌测试	满足测试
磷脂 a	生理可接受的
总血红蛋白	10 - 250 克/升
高铁血红蛋白	<15 %
氧基血红蛋白	<10 %
钠 Na ⁺ 钾 K ⁺ 氯 Cl ⁻ 钙 Ca ⁺⁺ 硼	生理可接受的
戊二醛	生理可接受的
N - 乙酰基 - L - 半胱氨酸	生理可接受的
M.W.>500,000	≤ 15 %
M.W. ≤ 65,000	<10 %
M.W.<32,000	<5 %
微粒含量>10 μ	<12/毫升
微粒含量>25 μ	<2/毫升

a - 聚合前在 Hb 中测定的

然后将血液代用品储存在短期储存容器中或储存在无菌容器中，如上面详细描述，每种容器具有低氧环境。储存容器还

应充分地不可渗透水汽以预防通过储存期间的蒸发显著浓缩血液代用品。显著浓缩血液代用品是导致血液代用品的一种或多种参数高于规格的浓缩。

依据本发明的方法制备的，稳定聚合血红蛋白血液代用品的合成在美国专利 5,296,465 中进一步描述。

能接受依据本发明的方法制备的血液代用品的脊椎动物包括，哺乳动物，如人类，非人类灵长类，狗，猫，田鼠，马或绵羊。并且，能接受所说的血液代用品的脊椎动物，包括胎儿（出生前脊椎动物），出生后脊椎动物，或出生时的脊椎动物。

本发明的血液代用品可通过直接和/或非直接注射血液代用品到脊椎动物的循环系统中给循环系统服用，通过一种或导致注射方法。直接注射方法实例包括血管内注射，如静脉内注射和动脉内注射，和心脏内注射。非直接注射方法实例包括腹腔内注射，皮下注射，这样血液代用品通过淋巴系统运输到循环系统中，或通过套管针或导管注射到骨髓中。较好地，血液代用品静脉内服用。

在注入血液代用品前，期间，和/或后，要治疗的脊椎动物可以是正常血量，血量过高或血量过低的。通过如局部装载法或通过交换法，血液代用品可直接进入到循环系统中。

血液代用品可治疗服用，治疗由于多种不同病因导致的脊椎动物体内组织低氧，不同病因包括部分，或整个循环系统中 RBC 流动的减少，贫血症和休克。并且，血液代用品可预防服用，以预防脊椎动物体内组织氧-耗竭，其可能是由于脊椎动物整个循环系统或组织的 RBC 流动可能的或预期的减少。进一步讨论服用血红蛋白治疗上或预防上治疗低氧症，特别是由于局部动脉阻

塞和由于局部微循环阻塞引起的，以及其服用剂量，在1995年3月23日提交的共同待审的美国专利申请系列 No. 08/409,337，现在美国专利 5,854,209 中提供，其全文参考收入本篇。

通常，血液代用品的适当剂量或剂量组合是，当包含在血液血浆中时，会在脊椎动物血液产生血红蛋白浓度在约 0.1 到约 10 克 Hb/dl 之间，或更高浓度的血红蛋白浓度的量，如果需要补充大量的血液损失。

本发明通过下列实施例进行进一步具体地描述。

实施例 1 合成稳定聚合 Hb 血液代用品

如在美国专利 No.5,296,465 中所描述的，收集牛全血样品，与柠檬酸钠抗凝血剂混合形成血液溶液。

收集后每种血液溶液样品保持在温度约 2℃ 下，然后用 600 目筛粗滤除去大聚集体和颗粒。

集中前，使用名为“快速检测奶中的青霉素”的方法，使用从 Difco, Detroit, Michigan 购得的测试试剂盒测定每种血液溶液样品中青霉素的量，以确保在血液溶液样品中的青霉素的量 <0.008 单位/毫升。

然后将血液溶液样品集中并与除热原的水溶柠檬酸钠溶液混合形成牛全血的 0.2% 重量比的柠檬酸钠溶液（本文后称“0.25 柠檬酸钠血液溶液”）。

然后将 0.2% 柠檬酸钠血液溶液顺序流过 800 毫微米和 50 毫微米的聚变性过滤器，除去直径约为 50 毫微米或更大的大型血液溶液碎片。

然后冲洗 RBC 以从 RBC 中分离细胞外血浆蛋白质，如 BSA 或 IgG。为了冲洗血液溶液中的 RBC，透析过滤容器中的血液溶液体积初始通过在透析过滤容器中加入等体积的过滤的等张溶液来稀释。等张溶液用 Millipore (Cat # CDUF 050 G1) 10,000 道尔顿超过滤膜来过滤。等张溶液由 6.0 克/升柠檬酸钠二水化物和 8.0 克/升的氯化钠的注射用水 (WFI) 溶液组成。

然后通过 0.2 毫微米中空纤维 (Microgon Krosflo II 微过滤药液筒) 透析过滤器的透析过滤，将稀释的血液溶液浓缩到其原来体积。同时，过滤的等张溶液以与滤出液流出 0.2 毫微米透析过滤器的速度相同的速度连续地作为补充加入。在透析过滤期间，直径显著小于 RBC 的稀释血液溶液组成，或流体如血浆，随滤出液穿过 0.2 毫微米透析过滤器的壁。RBC，血小板和稀释血液溶液的较大组成，如白细胞，与连续加入的等张溶液一起保留，形成透析血液溶液。

在 RBC 冲洗期间，稀释的血液溶液保持在温度在约 10 到 25 °C 之间，透析过滤器的入口处的液体压力在约 25psi 到约 30psi 之间以改善过程效率。

当从透析过滤器排出的滤出液的体积等于约 600% 用过滤的等张溶液稀释前血液溶液体积时，RBC 冲洗完成。

然后将透析的血液溶液连续地以约 4lpm 的速度泵送到型号 # AS-16，装有 # 28 ringdam 的 Sharples Super 离心分离器中。离心分离器操作同时加料透析血液溶液，以从白细胞和血小板中分离 RBC。操作期间，离心分离器以足够将 RBC 分离到重 RBC 相中，并将相当大部分的白细胞 (WBC) 和血小板分离到轻 WBC 相中的速度旋转，具体约为 15,000rpm。在操作期间，RBC 相部分和 WBC 相部分分别地并连续地从离心分离器中流出。

分离 RBC 后，裂解 RBC 形成含血红蛋白溶液。当从离心分离器中流出时相当大部分的 RBC 被机械裂解。由于流出离心分离器的 RBC 相流体以一定角度撞击 RBC 相流出管壁，RBC 的细胞膜破裂，从而将血红蛋白（Hb）从 RBC 中释放到 RBC 相中。

裂解的 RBC 相流经 RBC 相流出管进入到静态混合器（Kenics 1/2 英寸带有 6 个部件，Chemineer 有限公司）中。与转移 RBC 相到静态混合器中同时，等量 WFI 也注入到静态混合器中，其中 WFI 与 RBC 相混合。RBC 相和 WFI 流入到静态混合器中的流速每种在约 0.25 lpm。

在静态混合器中混合 RBC 相和 WFI 产生裂解 RBC 胶体。将裂解 RBC 胶体从静态混合器中转移到 Sharples Super 离心分离器（型号 # AS-16, Sharples Division of Alfa-Laval Separation 有限公司）中，其适于从非-血红蛋白 RBC 组成中分离 Hb。离心分离器以足以将裂解 RBC 胶体分离成轻 Hb 相和重相的速度旋转。轻相含有 Hb 并含有密度约等于或小于 Hb 密度的非-血红蛋白组成。

Hb 相连续地从连续分离器中排出，通过 0.45 毫微米 Millipore Pellicon Cassette, Cat # HVLP 000 C5 微过滤器，进入到储存容器中以备 Hb 提纯。然后细胞基质和滞留物从微过滤器返回到储存容器中。在微过滤期间，储存容器内的温度保持在约 10℃或更低。为了改善效率，当微过滤器入口出液体压力从初始压力约 10psi 增加到约 25psi 时，微过滤完成。Hb 微滤出液从微过滤器转移微滤出液容器中。

随后，Hb 微滤出液泵送流过 100,000 Millipore Cat#CDUF 050 H1 超过滤器。包含在 Hb 微滤出液中的相当大部分 Hb 和水，渗透过 100,000 道尔顿超过滤器形成 Hb 超滤出液，而大型细胞碎

片，如分子量超过约 100,000 道尔顿的蛋白质被保留并重新循环返回到微滤出液容器中。同时，WFI 连续地加入到为滤出液容器中补充留在超滤出液中的水。通常，细胞碎片包括所有完整的和片段的细胞组成，除了 Hb，较小的细胞蛋白质，电解质，辅酶和有机代谢中间产物。持续超过滤直到在微滤出液中的 Hb 浓度少于 8 克/升 (g/l)。当超过滤 Hb 时，微滤出液容器内的温度保持在约 10℃。

将超滤出液转移到超滤出液容器中，其中 Hb 超滤出液重新循环流过 30,000 道尔顿 Millipore Cat # CDUF 050 T1 超过滤器，以从 Hb 超滤出液中除去较小的分子蛋白质，如电解质，辅酶，代谢中间产物和分子量小于约 30,000 道尔顿的蛋白质，和水，从而形成含量约 100 克 Hb/升的浓缩 Hb 溶液。

然后将浓缩的 Hb 溶液直接从超滤出液容器中倒入到并联层析柱（2 英尺长 8 英寸内径）中的介质中，通过高效液相层析法分离 Hb。层析柱含有适于从非血红蛋白蛋白质中分离 Hb 的阴离子交换介质。阴离子交换介质从硅胶制备。将硅胶用 γ -glycidoxy 丙基硅烷处理以形成活性环氧化物基团，然后用 $C_3H_7(CH_3)NCl$ 处理以形成季铵阴离子交换介质。这种方法在层析法期刊，120: 321 - 333 (1976) 中作了描述。

用促进 Hb 结合的第一洗脱液冲洗层析柱对每个柱进行预处理。然后将 4.52 升浓缩的 Hb 溶液注入到每个层析柱中。注入浓缩 Hb 溶液后，通过在柱内制备 PH 梯度，然后用三种不同的洗脱液连续地冲洗流经层析柱以产生 Hb 洗脱物。在使用期间每种缓冲液的温度约为 12.4℃。在注入到层析柱前，将缓冲液流过 10,000 道尔顿超过滤膜预过滤。

第一缓冲液, 20mM Tris - 羟甲基甲胺 (Tris) (PH 约 8.4 到约 9.4), 将浓缩的 Hb 运输到层析柱的介质中并结合 Hb。用第二缓冲液, 第一缓冲液和第三缓冲液的混合物, 第二缓冲液 PH 约为 8.3, 调节层析柱内的 PH 以从层析柱上洗脱污染的非 - 血红蛋白组成, 而保留 Hb。用第二缓冲液以约 3.56 lpm 每个柱的流速平衡持续约 30 分钟。将第二缓冲液的洗脱液排到废料中。然后用第三缓冲液, 50mM Tris (PH 约为 6.5 到约 7.5), 从层析柱上洗脱 Hb。

Hb 洗脱物流经灭菌 Sartobran Cat # 5232507 G1PH 过滤器流到收集 Hb 洗脱物的容器中。Hb 洗脱物开始的 3% - 4% 和 Hb 洗脱物最后的 3% - 4% 倒入废料中。

如果洗脱物含有少于 0.05EU/毫升的内毒素并含有少于 3.3 毫微摩尔/毫升磷脂, Hb 可作进一步使用。在六升超纯洗脱物中, 其具有 100 克 Hb/升浓度, 加入 9 升 1.0M 氯化钠, 20mM Tris (PH8.9), 从而形成离子强度为 160mM 的 Hb 溶液, 以降低 Hb 溶液中 Hb 对氧的亲合力。然后将 Hb 溶液在 10℃ 浓缩, 通过重新循环流过超过滤器, 具体地是 10,000 道尔顿 Millipore Helicon, Cat # CDUF 050 G1 过滤器, 直到 Hb 的浓度为 110 克/升。

然后, 通过以 12 lpm 重新循环 Hb 溶液流过 0.05 毫微米 Hoechst-Celanese 公司 Cat # G - 240/40 聚丙烯微过滤器相转移膜, 以形成脱氧 Hb 溶液 (本文后面称“脱氧 - Hb”), 将 Hb 溶液脱氧, 直到 Hb 溶液的 pO_2 减少到其中在 Hb 溶液中 HbO_2 的量约为 10%。同时, 用 60 lpm 氮气流过相转移膜的反面。在脱氧期间, Hb 溶液的温度保持在约 19℃ 到约 31℃ 之间。

同样在脱氧期间，和随后的整个过程中，Hb 保持在低氧环境中以最少化 Hb 对氧的吸附并保持在脱氧-Hb 中氧化 Hb（氧基血红蛋白或 Hb O₂）的量少于约 10%。

然后，将 60 升脱氧-Hb 和 180 升储存缓冲液透析过滤流过超过滤器，储存缓冲液是含有 0.2% 重量比的 N-乙酰基半胱氨酸的 33mM 磷酸钠缓冲液（PH7.8），含有 pO₂ 少于约 50 托，以制备氧化作用稳定性脱氧-Hb。在与脱氧-Hb 混合之前，储存缓冲液用 10,000 道尔顿 Millipore Helicon, Cat # CDUF 050 G1 除热原过滤器除热原。

储存缓冲液以与从超过滤器流出液体的速度近似相同的速度连续加入。透析过滤持续直到流出超过滤器的透析过滤液体的体积约为三倍的脱氧-Hb 初始体积。

在将氧化作用稳定性脱氧-Hb 转移到聚合装置中前，将贫氧 WFI 加入到聚合反应器中以吹扫聚合装置中的氧，预防氧化作用稳定性脱氧-Hb 氧化。加入到聚合反应器中 WFI 的量是，当氧化作用稳定性脱氧-Hb 加入到聚合反应器中时能形成浓度为约 40 克 Hb/升的 Hb 溶液的量。然后将 WFI 重新循环流过聚合装置，通过流过有逆流加压氮气的 0.05 毫微米聚丙烯微过滤器相转移膜（Hoechst-Celanese 公司 Cat # 5PCM-108, 80 平方英尺）来脱氧。流过相转移膜的 WFI 和氮气的流速分别为约 18 到 20 lpm 和 40 到 60 lpm。

在聚合反应器中的 WFI 的 pO₂ 降低到少于约 2 脱 pO₂ 后，通过流速约为 20 lpm 的氮气加入到聚合反应器的顶部空间，用氮气覆盖聚合反应器。然后将氧化作用稳定性脱氧-Hb 转移到聚合反应器中。

聚合反应在 12mM 磷酸缓冲液中实施, 缓冲液 PH 为 8.7, 氯浓度少于或等于约 35 毫摩尔。

当在 40℃ 加热并将 Hb 溶液重新循环流过有六个部件的 Kenics1 - 1/英寸静态混合器 (Chemineer 有限公司) 时, 氧化作用稳定性脱氧 - Hb 和 N - 乙酰基半胱氨酸随后缓慢地与交联试剂戊二醛混合, 具体地每公斤 Hb 用 29.4 克戊二醛, 混合 5 个小时, 形成聚合 Hb (聚 (Hb)) 溶液。

将氧化作用稳定性脱氧 - Hb 和戊二醛重新循环流过静态混合器产生湍流状况, 均匀混合戊二醛和氧化作用稳定性脱氧 - Hb, 从而减少形成含高浓度戊二醛的脱氧 - Hb 凹陷的可能性。均匀混合戊二醛和氧化作用稳定性脱氧 - Hb 可减少形成大分子量聚 (Hb) (即聚合物重超过 500,000 道尔顿), 并可允许聚合期间戊二醛和脱氧 - Hb 的快速混合。

此外, 在聚合期间, 产生显著的 Hb 分子间交联, 这是作为存在 N - 乙酰基半胱氨酸对 Hb 聚合的影响。

聚合后, 在聚合反应器中聚合 (Hb) 溶液的温度降低到约 15℃ 到约 25℃ 中间的温度。

然后, 浓缩聚 (Hb) 溶液, 通过重新循环聚 (Hb) 溶液流过超过滤器直到聚 (Hb) 增加到约 85 克/升。适当的超过滤器是 30,000 道尔顿过滤器 (如 Millipore Helicon, Cat # CDUF 050 LT)。

随后, 将聚 (Hb) 溶液与 66.75 克硼氢化钠混合并重新循环流过静态混合器。具体地, 对于每 9 升聚 (Hb) 溶液, 以 0.1 到 0.12 lpm 速度加入 1 升 0.25M 硼氢化钠。

在将硼氢化钠加入到聚(Hb)溶液中前,碱性化聚(Hb)溶液的PH,通过调节PH到约10来保存硼氢化钠和预防氢气形成。通过用约215升的除热原,脱氧12mM的PH约为10.4到约10.6的硼酸钠缓冲液透析过滤聚(Hb)溶液来调节聚(Hb)溶液的PH。通过重新循环聚(Hb)溶液从聚合反应器流过30,000道尔顿超过滤器进行透析过滤聚(Hb)溶液。硼酸钠缓冲液以与从超过滤器透析过滤中流出的液体的速度相同的速度加入到聚(Hb)溶液中。透析过滤持续直到从超过滤器透析过滤中流出的液体体积是约三倍的聚合反应器中聚(Hb)溶液的初始体积。

在PH调节后,将硼氢化钠加入到聚合反应器中以还原聚(Hb)溶液中的键并在溶液中键合和形成稳定的聚(Hb)。在硼氢化钠加料期间,在聚合反应器中的聚(Hb)溶液连续地重新循环流过静态混合器和0.05毫米的聚丙烯微过滤器相转移膜,以除去溶解的氧和氢。流过静态混合器还提供湍流硼氢化钠流动状态,快速并有效地混合硼氢化钠和聚(Hb)溶液。流过0.05毫米相转移膜的聚(Hb)溶液和氮气的速度分别约为2.0到4.0 lpm和约12到18 lpm。完成硼氢化钠加料后,当聚合反应器中的搅拌器以约75转每分钟的速度旋转时,聚合反应器中还原反应在继续。

在硼氢化钠加料后约1小时,稳定聚(Hb)溶液从聚合反应器流过30,000道尔顿超过滤器,直到稳定聚(Hb)溶液浓度为110克/升。浓缩后,通过流过30,000道尔顿超过滤器使用含有27mM乳酸钠,12mM NAC,115mM氯化钠,4mM氯化钾和1.36mM氯化钙和WFI(PH5.0)的过滤脱氧的低PH缓冲液透析过滤稳定聚(Hb)溶液,稳定聚(Hb)溶液的PH和电解质恢复到生理水平以形成稳定聚合Hb血液代用品。透析过滤持续直到

从超过滤器透析过滤流出的液体的体积约为 6 倍的浓度 Hb 产品的透析过滤前体积。

在 PH 和电解质恢复到生理水平后，通过在聚合反应器中加入过滤脱氧的低 PH 缓冲液，将聚合 Hb 血液代用品稀释到浓度为 5.0 克/升。通过从聚合反应器重新循环流过静态混合器和 100,000 道尔顿提纯过滤器，逆向流过含有 27mM 乳酸钠，12mM NAC，115mM 氯化钠，4mM 氯化钾和 1.36mM 氯化钙和 WFI (PH7.8) 的过滤脱氧的缓冲液透析过滤稀释的血液代用品。透析过滤持续，直到通过凝胶渗透层析在解离条件下操作时，血液代用品含有少于或等于约 10% 修饰的四聚体和未修饰的四聚体种类。

提纯过滤器在低跨膜压条件下使用限制性渗透管操作。除去大量修饰四聚体 Hb 和未修饰四聚体 Hb 后，持续流过 30,000 道尔顿超过滤器重新循环血液代用品，直到血液代用品的浓度为约 130 克/升。

然后将稳定血液代用品储存在适当的具有低氧环境及低氧渗入的容器中。

实施例 2 血红蛋白血液代用品的储存：箔外包装

如实施例 1 制备的包装在 600 毫升 Stericon 包装中的血红蛋白血液代用品，包装在箔层压物外包装 (KAPAK50303，下面称为“箔”)，Cryovac BYV200 或 Cryovac P640B 包装中。KAPAK50303 是箔层压物容器，其中箔层是铝箔。Cryovac BYV200 是包括 0.0006 英寸 (或 0.015 毫米) 两边 Saran (莎纶) - 包膜的聚乙烯基醇层的层压物。这两种层压物的氧渗透量在 72 华氏度 (或 22℃) 及 0% 湿度下单位大气压每 24 小时都小于 0.02cc

每 100 平方英寸 (或 0.02cc 每 645 平方厘米)。Cryovac P640B 是层压物物料, 包括 0.0006 英寸 (或 0.015 毫米) Saran-包膜的, 双轴向尼龙层, 粘合剂和线性低密度聚乙烯密封剂层。物料的氧渗透量在 72 华氏度 (或 22℃) 及 0% 湿度下单位大气压每 24 小时约为 8 到 15cc 每 100 平方英寸 (或 8 到 15cc 每 645 平方厘米)。将包装的血液代用品在室温保持 418 天, 定期取样分析 N-乙酰基-L-半胱氨酸 (NAC), 双-N-乙酰基-L-半胱氨酸 (NAC₂), 总量 Hb (THb), 氧化血红蛋白 (HbO₂) 和高铁血红蛋白 (metHb) 的浓度和/或量。结果在表 II 中列出。

表 II 外包装的稳定性数据

天数	外包装	NAC	NAC ₂	THb	HbO ₂	metHb
0	箔	0.1515	0.008	10.7	4.1	-0.2
0	BYV200	0.1586	0.0139	10.7	8.8	-0.3
0	P640B	0.1274	0.0829	11.7	5.7	1.1
43	箔	0.1688	0.0155	11.7	3.3	-0.3
43	BYV200	0.1509	0.0365	11.3	2.7	0.3
43	P640B	0.0507	0.1927	11.1	5.6	6.2
117	箔	0.1721	0.0136	11.2	2.6	0.0
117	BYV200	0.1433	0.0238	11.7	3.0	0.1
117	P640B	0.0022	0.2355	11.9	12.7	30.7
180	箔	0.1818	0.0108	12.5	2.9	-0.1
180	BYV200	0.1674	0.0327	12.5	2.5	0.2
180	P640B	N. D.	0.2259	12.8	18.2	49.6
418	箔	0.15	0.05	11.6	4.5	1.2
418	BYV200	0.17	0.04	11.8	3.7	0.5
418	P640B	N. D.	0.19	12.0	-1.3	92.3

上述试验本质上是重复的, 其中血红蛋白血液代用品包装在箔层压物包装中 (KAPAK50303)。将包装的血液代用品在室温保持约 24 个月, 定期取样分析 N-乙酰基-L-半胱氨酸 (NAC), 双-N-乙酰基-L-半胱氨酸 (NAC_2), 总量 Hb (THb), 氧化血红蛋白 (HbO_2) 和高铁血红蛋白 (metHb) 的浓度和/或量。结果在表 III 中列出。

表 III 箔外包装的稳定性数据

月数	NAC	NAC_2 (%)	THb (g/dl)	HbO_2 (%)	metHb (%)
0	0.16	0.04	13.1	4	3
3	0.13	0.04	13.4	3	2
6	0.14	0.03	13.3	3	2
9	0.15	0.03	13.2	4	2
12	0.13	0.06	13.3	5	2
18	0.14	0.05	13.2	3	2
24	0.14	0.02	13.3	3	2

实施例 3 血红蛋白血液代用品的储存: 初级包装

血红蛋白血液代用品, 如实施例 1 中所制备的包装在氧屏障初级包装 (E-13135 和 E-13242, 美国国家罐装) 中。初级包装的结构已在上面详细描述。初级包装是厚度为约 0.005 英寸 (或约 127 毫微米) 的层压物质, 包括中密度聚乙烯/乙烯乙烯基醇层, 尼龙层, 和线性低密度聚乙烯密封剂层。

实施例 4 血红蛋白血液代用品的储存：透明外包装

将包装在适当的初级包装中的如实施例 1 制备的血红蛋白血液代用品，包装在由聚酯（PET）/二氧化硅（ SiO_x ）/聚乙烯层压物（由 Rollprint, Addison, IL 制造）构造的透明层压物和金属箔层压物包装中，使用自动包装机器（Triomat）制备外包装。容器的构造如上面所描述的。物料的氧渗透量在 25°C 及 100 % / 50 % 相对湿度下单位大气压每天约为 0.0005cc 每 100 平方英寸（或 0.0005cc 每 645 平方厘米）。将包装的血液代用品在 40°C 及 100 % / 60 % 相对湿度下保持约 12 个月，测定 N-乙酰基-L-半胱氨酸（NAC），双-N-乙酰基-L-半胱氨酸（ NAC_2 ），总量 Hb（THb），氧化血红蛋白（ HbO_2 ）和高铁血红蛋白（metHb）的浓度和/或量。结果在表 IV 中列出。在升高的温度 40°C 将样品保持 12 个月具有在 23°C 储存 24 个月的效果。

表 IV 透明（EVOH）外包装加速稳定性数据

月数	NAC (%)	NAC_2 (%)	THb (%)	HbO_2 (%)	metHb (%)
0	0.15	0.12	13.4	2.4	0.8
3	0.12	0.06	13.2	1.9	0.7
6	0.11	0.03	13.4	2.1	0.9
9	0.13	0.03	13.5	2.3	0.8
12	0.11	0.04	13.5	1.9	0.8

使用不同的透明层压物物料重复上面的储存实验，包括在聚酯上包膜二氧化硅，由 Perfecseal（费城，PA）制造。物料的氧渗透量在 25°C 及 100 % / 50 % 相对湿度下单位大气压每天约为 0.01375cc 每 100 平方英寸（或 0.01375cc 每 645 平方厘米）。

表 V SiO_x 透明外包装 II 加速稳定性数据

月数	NAC (%)	NAC ₂ (%)	THb (%)	HbO ₂ (%)	metHb (%)
0	0.15	0.02	13.35	2.4	0.8
3	0.11	0.06	13.3	3.0	1.8
6	0.07	0.09	13.2	3.0	2.4
9	0.1	0.13	13.4	3.3	3.8
12	0.07	0.12	13.5	5.2	4.8

实施例 5 分析聚合血红蛋白

血红蛋白产品中的内毒素浓度可通过由 Associations of Cape Cod, Woods Hole, Massachusetts, J. Levin 等人, 实验室临床医学期刊, 75: 903 - 911(1970) 研究的方法“动力学/比浊 LAL 5000 法”确定。对于此领域中的技术人员已知的具体细胞膜蛋白质或糖酯类, 多种方法可用来检测基质的任何微量, 如沉淀测定法, 免疫印迹法, 酶 - 结合免疫吸附测定法 (ELISA)。

微粒计数可通过美国药典 22: 1596, 1990 年“注射物中的微粒物质: 单一剂量注入用的大体积注射物”法来确定。

为了确定戊二醛的浓度, 将 400 毫微升代表性血红蛋白产品样品用二硝基苯肼衍生, 然后, 在 27℃, 以 1 毫升/分钟与梯度缓冲液一起将 100 毫微升等分衍生溶液注射到 YMC AQ-303 ODS 柱中。梯度缓冲液包括两个移动相, 0.1% 三氟乙酸 (TFA) 水溶液和 0.08% TFA 甲基氰溶液。梯度缓冲液流动包括均匀的 60% 0.08% TFA 甲基氰溶液流动 60 分钟, 85% 0.08% TFA 甲基氰溶液线性梯度 12 分钟, 100% 0.08% TFA 甲基氰溶液线性梯度 4

分钟，保持在 100 % 0.08 % TFA 甲基氰中 2 分钟，并在 45 % 0.01 % TFA 水溶液中重新平衡。在 360 纳米测定紫外线探测。

为了确定 NAC 浓度，将血红蛋白产品的等分份用除气的磷酸钠水溶液稀释，并将 50 毫微升与梯度缓冲液一起注射到 YMC AQ - 303 ODS 柱中。梯度缓冲液包括磷酸钠水溶液和 80 % 甲基氰水溶液和 0.05 % TFA 的混合物。梯度缓冲液流动包括 100 % 磷酸钠水溶液流动 15 分钟，100 % 80 % 甲基氰和 0.05 % TFA 混合物线性梯度 5 分钟，保持 5 分钟。然后系统在 100 % 磷酸钠中重新平衡 20 分钟。

通过以在下列两篇论文中的方法为依据的方法，实施对磷脂的分析：Kolarovic 等人的“从生物源分离磷脂的提取方法比较”，Anal. Biochem. 156: 244 - 250, 1986 和 Duck - Chong, C. G. 的“使用硝酸镁确定涉及消化作用的磷脂磷的快速灵敏方法”，脂质，14: 492 - 497, 1979。

通过在 Advanced Cryomatic 渗压计上分析确定等渗容摩，渗压计型号 # 3C2，先进仪器有限公司，Needham, Massachusetts。

总量血红蛋白，高铁血红蛋白和氧基血红蛋白浓度在 Co - 血氧定量计上确定，血氧定量计型号 # 484，来自 Massachusetts Lexington, 仪器实验室。

Na^+ ， K^+ ， Cl^- ， Ca^{++} ， pO_2 浓度可通过 Novastat Profile 4 确定，来自 Massachusetts Waltham, Nova 生物医学公司。

氧结合系数， P_{500} 通过 Hemox - 分析仪确定，来自 Pennsylvania Southampton, TCS 公司。

温度和 PH 可通过此领域中技术人员已知的方法确定。

分子量 (M.W.) 可通过在解离条件下对血红蛋白产品实施凝胶渗透层析 (GPC) 来确定。对血红蛋白产品的代表性样品分析分子量分布。在 50mM Bis - Tris (PH6.5), 750mM 氯化镁, 和 0.1mM EDTA 的移动相中将血红蛋白产品稀释到 4 毫克/毫升。这种缓冲液用作将 Hb 四聚体从聚 (Hb) 解离成二聚体, Hb 二聚体没有通过分子内或分子间交联与其他 Hb 二聚体交量。将稀释的样品注射到 TosoHaas G3000SW 柱中。流速为 0.5 毫升/分钟。在 280 纳米记录紫外线探测。

对依据本发明的方法制备的脊椎动物 (OXYGLOBIN™) 和人类 Hb 血液代用品进行上述测定, 结果分别在表 III, IV 中列出。

表 VI

参数	结果
PH (18 - 22℃)	生理可接受的
内毒素	<0.5EU/毫升
无菌测试	满足测试
磷脂 a	<0.3nm/毫升
总血红蛋白	12.0 - 14.0 克/dl
高铁血红蛋白	<15 %
氧基血红蛋白	<10 %
钠 Na ⁺	146 - 160mM
钾 K ⁺	3.5 - 5.5 mM
氯 Cl ⁻	105 - 120 mM
钙 Ca ⁺⁺	0.5 - 1.5 mM
硼	<10ppm
等渗容摩	290 - 310mOsm
戊二醛	<3.5 毫微克/毫升
N - 乙酰基 - L - 半胱氨酸	<0.2%
M.W.>500,000	<15 %
未修饰四聚体	<5 %
微粒含量>10 μ	<12/毫升
微粒含量>25 μ	<2/毫升

a - 聚合前在 Hb 中测定的

表 VII

参数	结果
PH (18 - 22℃)	生理可接受的
内毒素	<0.5EU/毫升
无菌测试	满足测试
磷脂 a	<0.3nm/毫升
总血红蛋白	12.0 - 14.0 克/dl
高铁血红蛋白	<15 %
氧基血红蛋白	<10 %
钠 Na ⁺	146 - 160mM
钾 K ⁺	3.5 - 5.5 mM
氯 Cl ⁻	105 - 120 mM
钙 Ca ⁺⁺	0.5 - 1.5 mM
硼	<10ppm
等渗容摩	290 - 310mOsm
戊二醛	<3.5 毫微克/毫升
N - 乙酰基 - L - 半胱氨酸	≤ 0.2%
M.W.>500,000	≤ 15 %
M.W. ≤ 65,000	<10%
M.W.>32,000	<5 %
微粒含量>10 μ	<12/毫升
微粒含量>25 μ	<2/毫升

a - 聚合前在 Hb 中测定的

此领域中的技术人员仅使用常规试验会认识到，或能确定本文所描述发明的具体实施方案的许多等同物。这些和所有其他这样的等同物包括在下列权利要求书的范围内。