



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 23 700 T2 2006.08.17**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 196 128 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 23 700.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/18750**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 945 285.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/001921**

(86) PCT-Anmeldetag: **07.07.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **11.01.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **17.04.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **02.11.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **17.08.2006**

(51) Int Cl.⁸: **A61J 1/00 (2006.01)**
A01N 1/02 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
349290 07.07.1999 US

(73) Patentinhaber:
Biopure Corp., Cambridge, Mass., US

(74) Vertreter:
T. Wilcken und Kollegen, 23554 Lübeck

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:
**GAWRYL, S., Maria, Charlestown, US;
HOUTCHENS, A., Robert, Milford, US; LIGHT, R.,
William, Natick, US**

(54) Bezeichnung: **KONSERVIEREN EINES HÄMOGLOBIN-BLUTERSATZMITTELS DURCH EINE DURCHSICHTIGE UMVERPACKUNG**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0001] Es besteht ein Bedarf für ein Blutersatzmittel für die Behandlung oder Verhinderung von Sauerstoffmangel, der von Blutverlust (z. B. von akuter Hämorrhagie oder während chirurgischer Eingriffe), von Blutarmut (z. B. perniziöser Anämie oder Sichelzellanämie) oder von einer Schockreaktion (z. B. Volumendefizienzschock, anaphylaktischem Schock, septischem Schock oder allergischem Schock) herrührt.

[0002] Die Anwendung von Blut und Blutfraktionen, wie in dieser Eigenschaft als Blutersatzmittel, ist stark mit Nachteilen behaftet. Beispielsweise ist die Verwendung von Vollblut oft vom Risiko der Übertragung von Hepatitis hervorrufenden Viren und AIDS hervorrufenden Viren begleitet, was die Genesung des Patienten komplizierter machen oder zu Patiententodesfällen führen kann. Außerdem erfordert die Verwendung von Vollblut das Bestimmen der Blutgruppe und die Durchführung einer Kreuzprobe, um immunhämatologische Probleme und eine Unverträglichkeit zwischen Donatoren zu vermeiden.

[0003] Das menschliche Hämoglobin besitzt als Blutersatzmittel eine osmotische Aktivität und die Fähigkeit, Sauerstoff zu transportieren und zu überfragen, es hat jedoch den Nachteil der schnellen Eliminierung aus dem Blutkreislauf durch den Weg über die Nieren und durch Gefäßwände, was zu einer sehr kurzen und deshalb typischerweise unbefriedigenden Halbwertszeit führt. Des Weiteren ist das menschliche Hämoglobin auch oft mit toxischen Niveaus an Endotoxinen, Bakterien und/oder Viren kontaminiert.

[0004] Nichtmenschliches Hämoglobin ist mit den gleichen Mängeln behaftet wie menschliches Hämoglobin. Außerdem ist Hämoglobin aus nichtmenschlichen Quellen auch typischerweise durch Proteine, wie beispielsweise Antikörper, kontaminiert, die in dem Empfänger eine Immunsystemantwort hervorrufen könnten.

[0005] Bisher sind mindestens vier andere Typen von Blutersatzmitteln verwendet worden, einschließlich Perfluorchemikalien, synthetisierte Hämoglobinanaloge, in Liposom eingekapseltes Hämoglobin und chemisch modifiziertes Hämoglobin. Jedoch weisen viele dieser Blutersatzmittel typischerweise kurze intravaskuläre Retentionszeiten auf, da sie durch das Kreislaufsystem als Fremdstoffen entfernt werden oder sich in der Leber, der Milz oder anderen Geweben festsetzen. Auch sind viele der Blutersatzmittel mit lebenden Systemen biologisch unverträglich gewesen.

[0006] So hat trotz der kürzlichen Fortschritte bei der Herstellung von Blutersatzmitteln auf Hämoglobinbasis der Bedarf nach einem Blutersatzmittel weiterhin bestanden, das Niveaus an Verunreinigungen wie Endotoxinen, Bakterien, Viren, Phospholipiden und Nichthämoglobinproteinen aufweist, die ausreichend niedrig sind, um im Allgemeinen eine Immunsystemantwort und irgendwelche toxikologischen Wirkungen zu verhindern, die von einer Infusion des Blutersatzmittels herrühren. Außerdem muss das Blutersatzmittel auch in der Lage sein, ausreichende Mengen Sauerstoff an Gewebe unter Umgebungsbedingungen zu transportieren und übertragen und es muss eine gute intravaskuläre Retentionszeit aufweisen.

[0007] Des Weiteren wird vorgezogen, dass das Blutersatzmittel 1) eine onkotische Aktivität aufweist, die im Allgemeinen derjenigen von Vollblut entspricht, 2) in die meisten Empfänger ohne Durchführung einer Kreuzprobe oder einer Untersuchung auf Empfindlichkeit übertragen werden und 3) mit äußerst geringer Kühlung über lange Zeitspannen gelagert werden kann.

[0008] Typischerweise wird das Blutersatzmittel in einer Metallfolienlaminatummwicklung mit hohen O₂- und Feuchtigkeitsbarriereigenschaften verpackt. Typischerweise sind die Metallfolienlaminatummwicklungen opak und erlauben daher weder die visuelle Untersuchung des Produkts noch die Untersuchung der Integrität der primären Verpackung. Des Weiteren erfordert eine opake Umwicklung die Verwendung eines zweiten Etiketts auf der Außenseite der Umwicklung.

[0009] US-A-5,691,452 offenbart ein Verfahren für das Konservieren eines deoxygenierten Hämoglobin-Blutersatzmittels und ein konserviertes deoxygeniertes Hämoglobin-Blutersatzmittel, wie jeweils im Oberbegriff der Ansprüche 1 und 2 beansprucht. Die vorliegende Erfindung ist durch die charakteristischen Merkmale der kennzeichnenden Teile dieser Ansprüche gekennzeichnet.

[0010] In der Vergangenheit sind klare Silicium enthaltende Laminatummwicklungen mit hohen Sauerstoff- und Feuchtigkeitsbarriereigenschaften in automatisierten Verpackungsvorrichtungen nicht nützlich gewesen, weil die Beanspruchung des Materials zur Rissbildung und sonstigem Verlust an Barriereigenschaften geführt hat.

[0011] Die vorliegende Erfindung ist auf ein Verfahren für das Konservieren eines deoxygenierten Hämoglobin-Blutersatzmittels gerichtet. Das Verfahren umfasst das Halten eines verpackten deoxygenierten Hämoglobin-Blutersatzmittels in einer Sauerstoffbarriere-Folienumwicklungspackung, wobei die Packung ein Folienlaminatmaterial und ein transparentes Laminatmaterial umfasst. Bei einer Ausführungsform weist die Sauerstoffbarriere-Folienumwicklung eine Sauerstoffdurchlässigkeit von weniger als ca. 0,01 Kubikzentimeter pro 100 Quadratzoll (oder ca. 0,01 cm³ pro 645 Quadratzentimeter) über 24 Stunden bei einer Atmosphäre und Raumtemperatur auf. Raumtemperatur wird hier als ca. 23°C definiert. Mindestens eine Seite der Umwicklung umfasst ein transparentes Laminatmaterial und mindestens eine andere Seite der Umwicklung umfasst ein Folienlaminatmaterial. Die Umwicklung definiert mindestens eine Kammer. Das verpackte deoxygenierte Hämoglobin-Blutersatzmittel wird in die Kammern der Folie eingegeben. Das transparente Laminatmaterial kann daraufhin auf das Folienlaminat, das die Kammern umfasst, die das verpackte Hämoglobin-Blutersatzmittel enthalten, heiß aufgesiegelt werden, wobei das verpackte Blutersatzmittel innerhalb der Umwicklung enthalten ist.

[0012] Die vorliegende Erfindung ist auch allgemein auf ein konserviertes deoxygeniertes Hämoglobin-Blutersatzmittel gerichtet. Das konservierte Blutersatzmittel der vorliegenden Erfindung umfasst ein verpacktes deoxygeniertes Hämoglobin-Blutersatzmittel und eine Sauerstoffbarriere-Folienumwicklungspackung. Bei einer Ausführungsform umfasst die Sauerstoffbarriere-Folienumwicklung des konservierten deoxygenierten Hämoglobin-Blutersatzmittels ein transparentes Laminatmaterial mit einer Sauerstoffdurchlässigkeit von weniger als ca. 0,01 Kubikzentimetern pro 100 Quadratzoll (oder ca. 0,01 cm³ pro 645 Quadratzentimetern) über 24 Stunden bei einer Atmosphäre und bei Raumtemperatur. Das verpackte deoxygenierte Hämoglobin-Blutersatzmittel wird in der Sauerstoffbarriere-Folienumwicklung versiegelt verpackt, wobei das deoxygenierte Hämoglobin-Blutersatzmittel in einem Umfeld konserviert wird, das im Wesentlichen von Sauerstoff frei ist. Mindestens eine Seite oder mindestens ein Blatt der Umwicklung umfasst ein transparentes Laminatmaterial und mindestens eine andere Seite der Umwicklung umfasst ein Folienlaminatmaterial. Die Umwicklung wird durch Verformen des Folienlaminatmaterials zum Definieren mindestens einer Kammer hergestellt. Das verpackte deoxygenierte Hämoglobin-Blutersatzmittel wird dann in die Kammern der Folie eingegeben. Das transparente Laminatmaterial wird dann auf das Folienlaminat, das das deoxygenierte Hämoglobin-Blutersatzmittel enthält, unter Bildung des konservierten deoxygenierten Hämoglobin-Blutersatzmittels der deoxygenierten Hämoglobin-Blutersatzmittels der vorliegenden Erfindung, heiß aufgesiegelt.

[0013] Bei einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird das transparente Laminatmaterial in Kombination mit Folienlaminatmaterial beim automatisierten Verpacken verwendet. Bei einer Ausführungsform ist eine automatisierte Verpackungsmaschine, die von Tiromat (Avon, MA) hergestellt wird, verwendet worden.

[0014] Die Vorteile dieser Erfindung sind zahlreicher Natur. Ein Vorteil besteht darin, dass das den Verfahren dieser Erfindung gemäß gelagerte Hämoglobin einen höheren Grad an Reinheit und eine längere Lagerbeständigkeit aufweist. Hochbarriereumwicklungen bieten ein zusätzliches Niveau an Produktqualität selbst dort, wo eine primäre Hochbarriereverpackung verwendet wird. Außerdem bieten die transparenten Hochbarriereumwicklungen der vorliegenden Erfindung äußerst hohe Sauerstoff- und Wasserdampfbarriereeigenschaften, jedoch weisen sie keine Saran- (Polyvinylidenchlorid, PVDC) Schicht auf. PVDC verursacht ein medizinisches Abfallstoffproblem, da chlorierte Produkte wie polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe und Chlorkohlenwasserstoffsäure während der Verbrennung gebildet werden. Umwicklungen, die mindestens eine klare Seite oder Region oder eine der vorliegenden Erfindung entsprechende Seite umfassen, ermöglichen es, das Etikett der primären Packung zu sehen. Aus diesem Grund ist ein zweites Etikett typischerweise auf der Umwicklung nicht erforderlich. Außerdem kann die Produktqualitätsuntersuchung und primäre Verpackungsintegrität ebenfalls beurteilt werden. Des Weiteren kann, wie zum ersten Mal hier aufgezeigt wird, eine automatisierte Einrichtung zusammen mit klaren Sauerstoffbarrierelaminaten verwendet werden, was die Herstellung sehr großer Anzahlen von Packungen mit hohen Sauerstoffbarriereeigenschaften in einer kurzen Zeitspanne mit sehr geringem menschlichen Arbeitsaufwand und ohne Verlust von Barriereeigenschaften erlaubt. Das Blutersatzmittel bleibt bei Raumtemperatur für Zeitspannen von zwei Jahren oder mehr beständig, was eine signifikante Verbesserung im Vergleich mit vorherigen Methoden darstellt.

GENAUE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0015] Die charakteristischen Merkmale und anderen Einzelheiten des erfindungsgemäßen Verfahrens werden nun noch spezifischer beschrieben und in den Ansprüchen ausgeführt. Man sollte sich im Klaren darüber sein, dass die spezifischen Ausführungsformen der Erfindung als Veranschaulichung und nicht als Einschränkungen der Erfindung aufgezeigt sind. Die Hauptmerkmale dieser Erfindung können in verschiedenen Ausführungsformen ohne vom Umfang der vorliegenden Erfindung abzuweichen, angewendet werden.

[0016] Die Erfindung betrifft in einer Ausgestaltung ein Verfahren für das Aufrechterhalten der Beständigkeit eines Hämoglobin-Blutersatzmittels umfassend das Halten des Hämoglobin-Blutersatzmittels in einer Atmosphäre, die im Wesentlichen von Sauerstoff frei ist. Dieses Verfahren lässt sich durch Halten des Blutersatzmittels in einem für Sauerstoff undurchlässigen Behälter, wie beispielsweise einer primären Sauerstoffbarrierepackung, einer Sauerstoffbarriere-Folienumwicklung (z. B. einem Beutel), einem Glasbehälter (z. B. einer Phiolen) oder einem Stahlbehälter erreichen. Ist die primäre Packung eine Sauerstoffbarrierefolie, so kann der Behälter aus einer Reihe verschiedener Materialien, einschließlich Polymerfolien (z. B. einem im Wesentlichen sauerstoffundurchlässigen Polyester, Ethylvinylalkohol (EVOH) oder Nylon) und Laminaten derselben hergestellt werden. Ist der Behälter eine Sauerstoffbarriereumwicklung, so kann der Behälter aus einer Reihe verschiedener Materialien, einschließlich Polymerfolien (z. B. einem im Wesentlichen sauerstoffundurchlässigen Polyester, Ethylvinylalkohol (EVOH) oder Nylon) und Laminaten, wie beispielsweise transparentem Laminat (z. B. einem Siliciumoxid oder EVOH-enthaltenden Laminat) oder einem Metallfolienlaminat (z. B. einem Silber- oder Aluminiumfolienlaminat) oder einer Kombination von transparentem Laminat und Metallfolienlaminat hergestellt werden.

[0017] Ist die Umwicklung eine Folie, wie beispielsweise eine Polyesterfolie, so kann die Folie durch eine Reihe geeigneter Methoden im Wesentlichen sauerstoffundurchlässig gemacht werden. Bei einer Ausführungsform ist die Folie im Herstellungszustand im Wesentlichen sauerstoffundurchlässig. Als Alternative kann die Folie, wo das polymere Material nicht ausreichend sauerstoffundurchlässig ist, um den erwünschten Spezifikationen zu entsprechen, laminiert oder auf andere Weise behandelt werden, um die Sauerstoffdurchlässigkeit zu reduzieren oder zu eliminieren.

[0018] Ein transparentes Laminat wird für mindestens eine Seite der Umwicklung verwendet. Mindestens eine Schicht des transparenten Laminats umfasst Siliciumdioxid. Die Sauerstoffbarriereschicht besitzt bevorzugt eine Dicke zwischen ca. 100 und ca. 2000 Å. Für sowohl die primäre Packung als auch die Umwicklung enthält das Laminat typischerweise eine oder mehrere polymere Schichten. Das Polymer kann aus einer Reihe verschiedener polymerer Materialien, einschließlich beispielsweise einer Polyesterschicht (z. B. einem Polyester von 48 Gauge), einer Nylon- oder einer Polyolefinschicht, wie beispielsweise Polyethylen, Ethylvinylacetat oder Polypropylen oder Copolymeren derselben, bestehen.

[0019] Die Umwicklungen der vorliegenden Erfindung können aus einer Reihe verschiedener Konstruktionen, einschließlich Phiolen, Zylindern, Schachteln usw. bestehen. Bei einer bevorzugten Ausführungsform liegt der Behälter in Form eines Beutels vor. Ein geeigneter Beutel kann durch kontinuierliches Verkleben von einem oder mehreren (z. B. zwei) Blättern als Perimeter(n) derselben unter Bildung einer dicht geschlossenen, sauerstoffundurchlässigen Konstruktion mit einer füllbaren Mitte gebildet werden. Die Gestalt des Beutels kann diejenige sein, auf die man routinemäßig im Stand der Technik trifft. Im Falle von Laminaten, die Polyolefine wie lineares Polyethylen oder Polypropylen niedriger Dichte, Polyethylen oder Polypropylen mittlerer Dichte oder Polyethylen oder Polypropylen hoher Dichte und Copolymere derselben umfassen, wird der Umfang des Beutels unter Anwendung von Wärme verklebt oder versiegelt. Es liegt ohne weiteres innerhalb der Fähigkeit des Standes der Technik, die geeignete Temperatur für die Bildung einer dicht geschlossenen, sauerstoff- und/oder feuchteundurchlässigen Konstruktion zu bestimmen.

[0020] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren für das Konservieren eines deoxygenierten Hämoglobin-Blutersatzmittels und konservierte deoxygenierte Hämoglobin-Blutersatzmittel. Das Verfahren der vorliegenden Erfindung umfasst das Halten des deoxygenierten Hämoglobin-Blutersatzmittels in einer Sauerstoffbarriere-Folienumwicklung, wobei mindestens eine Seite der Umwicklung ein transparentes Laminatmaterial umfasst und wobei mindestens eine andere Seite der Umwicklung ein Folienlaminatmaterial umfasst. Bei einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die Umwicklung durch Bilden mindestens einer Kammer in dem Folienlaminatmaterial und Eingeben des deoxygenierten Hämoglobin-Blutersatzmittels in die Kammer gebildet, wobei das Hämoglobin innerhalb einer primären Packung enthalten ist. Das transparente Laminatmaterial wird dann auf das Folienlaminatmaterial, das die Kammern und das Hämoglobin-Blutersatzmittel enthält, heiß aufgesiegelt. Bei einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst das transparente Laminatmaterial eine mit Siliciumoxid beschichtete Polyesterfolie. Bei einer anderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird das Hämoglobin-Blutersatzmittel unter einer Stickstoff-, Argon- oder Heliumatmosphäre gehalten.

[0021] Das konservierte deoxygenierte Hämoglobin-Blutersatzmittel der vorliegenden Erfindung umfasst ein deoxygeniertes Hämoglobin-Blutersatzmittel und eine Sauerstoffbarriere-Folienumwicklungspackung, wobei mindestens eine Seite der Umwicklung ein transparentes Laminatmaterial umfasst und wobei mindestens eine andere Seite der Umwicklung ein Folienlaminatmaterial umfasst. Bei einer Ausführungsform der vorliegenden

Erfindung umfasst das konservierte deoxygenierte Hämoglobin-Blutersatzmittel ein transparentes Laminatmaterial, das eine mit Siliciumoxid beschichtete Polyesterfolie umfasst. Bei einer anderen Ausführungsform wird das konservierte Blutersatzmittel unter einer Stickstoff-, Argon- oder Heliumatmosphäre gehalten. Bei noch einer anderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die Umwicklung des konservierten deoxygenierten Hämoglobin-Blutersatzmittels durch Bilden mindestens einer Kammer in dem Folienlaminatmaterial hergestellt. Das deoxygenierte Hämoglobin-Blutersatzmittel wird in die Kammern der Folie eingegeben, in der das deoxygenierte Hämoglobin-Blutersatzmittel in einer primären Packung enthalten ist. Das transparente Laminatmaterial wird dann auf das Folienlaminatmaterial, das Kammern aufweist und das deoxygenierte Hämoglobin-Blutersatzmittel enthält, heiß aufgesiegelt.

[0022] Die Behälter weisen bevorzugt eine Sauerstoffdurchlässigkeit von weniger als ca. 0,01 cm³ pro 100 Quadratzoll (oder ca. 0,01 cm³ pro 645 Quadratzentimeter) pro 24 Stunden pro Atmosphäre bei Raumtemperatur, bevorzugt weniger als ca. 0,001 cm³ pro 100 Quadratzoll (oder ca. 0,001 cm³ pro 645 Quadratzentimeter) unter diesen Bedingungen auf. Bei einer Ausführungsform enthalten die Behälter beispielsweise Kunststoffbehälter mit einer Umwicklung, wie beispielsweise einem Hochbarrierematerial, das aus Polyester-(PET)/Siliciumoxid-(SiO_x)/Polyethylenlaminat konstruiert ist. Bei einer Ausführungsform weist die Siliciumoxidschicht eine Dicke von ca. 100–2000 Å auf. Die Polyethylenschicht weist eine Dicke von ca. 0,0005 bis ca. 0,01 Zoll (oder ca. 0,013 bis ca. 0,254 Millimetern), bevorzugt ca. 0,002 Zoll (oder ca. 0,0508 Millimeter) auf. Bei einer Ausführungsform beträgt die Sauerstoffdurchlässigkeit weniger als 0,005 cm³ pro 100 Quadratzoll pro Atmosphäre pro Tag (relative Innen-/Außenfeuchte (RF) von 100%/50% bei 25°C) (oder weniger als ca. 0,005 cm³ pro 645 Quadratzentimeter) und die Wasserdampfdurchlässigkeit beträgt ca. 0,18 mg pro 100 Quadratzoll pro Atmosphärentag (25°C, 100%/50% RF) (oder ca. 0,18 mg pro 645 Quadratzentimeter).

[0023] Diese Folienumwicklungskunststoffbeutel aus polymerem Verbundstoff werden dann unter Anwendung eines Tiromat-Versiegelungsapparates (Avon, Massachusetts) versiegelt. Bei einer Ausführungsform ist das unterste Blatt der Umwicklungspackung eine Folie und derart gebildet, dass mindestens eine Schalenform oder Kammer in dem Folienlaminat gebildet wird. Das Hämoglobin-Blutersatzmittel wird dann in einer primären Packung auf die Folie in den Kammern gegeben, wobei das Etikett nach oben weist. Die Folie und das Hämoglobin-Blutersatzmittel in einer primären Packung werden dann mit Stickstoff gespült und es wird ein Vakuum angelegt. Das klare Laminat wird dann auf die untere Schicht des Folienlaminats aufgesiegelt.

[0024] Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird das Blutersatzmittel in einer Atmosphäre verpackt, die im Wesentlichen von Sauerstoff frei ist. Beispiele geeigneter Atmosphären umfassen Stickstoff, Argon und Helium.

[0025] Ein Blutersatzmittel, wie es hier definiert wird, ist eine Sauerstoffträgerzusammensetzung auf Hämoglobinbasis zur Verwendung bei Menschen, Säugetieren und anderen Vertebraten, die in der Lage ist, Sauerstoff zumindest an lebenswichtige Organe und Gewebe zu transportieren und zu übertragen und einen ausreichenden intravaskulären onkotischen Druck aufrechterhalten kann. Ein Vertebrat entspricht der klassischen Definition, die menschliche Wesen und andere vertebrierte Tiere umfasst, die Blut in einem Kreislaufsystem zum Übertragen von Sauerstoff an Gewebe benutzen. Außerdem entspricht die Definition von Kreislaufsystem der klassischen Definition, die aus dem Herzen, den Arterien, Venen und dem Mikrokreislauf, einschließlich kleineren vaskulären Strukturen, wie Kapillaren, besteht.

[0026] Ein erfindungsgemäßes Blutersatzmittel weist bevorzugt Niveaus an Endotoxinen, Phospholipiden, Fremdproteinen und anderen Verunreinigungen auf, die nicht zu einer signifikanten Immunsystemantwort führen und für den Empfänger nicht toxisch sind. Bevorzugt ist ein Blutersatzmittel ultrarein. Ultrarein, wie es hier definiert wird, bedeutet, dass es weniger als 0,5 EI/ml Endotoxin, weniger als 3,3 nMol/ml Phospholipide und kaum welche oder keine erfassbaren Niveaus an Nichthämoglobinproteinen, wie Serumalbumin oder Antikörpern, enthält.

[0027] Der Begriff „Endotoxin“ betrifft zellgebundene Lipopolysaccharide, die als Teil der Außenschicht von gramnegativen Bakterienzellwänden gebildet werden, die unter vielen Bedingungen toxisch sind. Werden sie in Tiere injiziert, so können Endotoxine Fieber, Diarrhö, hämorrhagischen Schock und andere Gewebeschäden hervorrufen. Endotoxineinheit (EI) ist von der United States Pharmacopeial Convention von 1983, Seite 3014, als Aktivität definiert worden, die in einer US-Bezugsstandardcharge EC-5 von 0,1 Nanogramm enthalten ist. Eine Phirole von EC-5 enthält 10.000 EI. Beispiele geeigneter Mittel zum Bestimmen von Endotoxinkonzentrationen in einem Blutersatzmittel umfassen das Verfahren der „Methodologie des kinetisch/turbidimetrischen Limulus-amebocytischen Lysats (LAL) 5000“, das von Associates of Cape Cod, Woods Hole, Massachusetts, entwickelt worden ist.

[0028] Beständiges polymerisiertes Hämoglobin, wie es hier definiert ist, ist eine Sauerstoffträgerzusammensetzung auf Hämoglobinbasis, deren Molekulargewichtsverteilung und/oder Methämoglobingehalt während Lagerzeiten bei geeigneten Lagertemperaturen über Zeitspannen von zwei Jahren oder mehr und bevorzugt über Zeitspannen von zwei Jahren oder mehr bei der Lagerung in einem Umfeld von geringem Sauerstoffgehalt, nicht wesentlich steigt oder abfällt. Geeignete Lagertemperaturen für die Lagerung für ein Jahr oder mehr liegen zwischen ca. 0°C und ca. 40°C. Die bevorzugte Lagertemperatur liegt im Bereich zwischen ca. 0°C und ca. 25°C.

[0029] Ein geeignetes Umfeld mit niedrigem Sauerstoffgehalt oder ein Umfeld, das im Wesentlichen von Sauerstoff frei ist, wird als die kumulative Menge Sauerstoff definiert, die in Kontakt mit dem Blutersatzmittel über eine Lagerzeit von mindestens ca. zwei Monaten, bevorzugt mindestens ca. einem Jahr und noch bevorzugter mindestens ca. zwei Jahren zu einer Methämoglobinkonzentration im Blutersatzmittel von weniger als ca. 15 Gew.-% führt. Die kumulative Menge an Sauerstoff umfasst das Eindringen von Sauerstoff in die Blutersatzmittelpackung und den ursprünglichen Sauerstoffgehalt des Blutersatzmittels und der Packung.

[0030] Im Laufe der gesamten Durchführung dieses Verfahrens, vom Auffangen von roten Blutzellen (RBZ) bis zur Hämoglobinpolymerisation, werden die Blutlösung, RBZ und das Hämoglobin unter Bedingungen gehalten, die ausreichen, um das Mikrowachstum oder die biologische Belastung zu minimieren, wie beispielsweise durch Halten der Temperatur bei weniger als ca. 20°C und über ca. 0°C. Bevorzugt wird die Temperatur bei einer Temperatur von ca. 15°C oder weniger gehalten. Noch bevorzugter wird die Temperatur bei $10 \pm 2^\circ\text{C}$ gehalten.

[0031] Bei diesem Verfahren werden Portionen der Komponenten für den Vorgang des Zubereitens eines beständigen polymerisierten Hämoglobin-Blutersatzmittels ausreichend keimfrei gemacht, um ein steriles Produkt zu bilden. Steril ist, wie im Stand der Technik definiert, spezifisch, dass die Lösung den Erfordernissen des Arzneibuchs der Vereinigten Staaten für Sterilität, die in der USP XXII, Abschnitt 71, Seite 1483–1488 aufgeführt sind, entspricht. Des Weiteren werden Anteile von Komponenten, die dem Prozessstrom ausgesetzt sind, gewöhnlich mit einem Material hergestellt oder verkleidet, das mit dem Prozessstrom nicht reagiert oder diesen nicht verunreinigt. Derartige Materialien können Edelstahl oder andere Stahllegierungen wie Inconel umfassen.

[0032] Geeignete RBZ-Quellen umfassen menschliches Blut, Rinderblut, Schafsblut, Schweinsblut, Blut von anderen Vertebraten und transgen hergestelltes Hämoglobin, wie beispielsweise in BIO/TECHNOLOGY, 12: 55–59 (1994) beschriebenes transgenes Hb.

[0033] Das Blut kann von lebenden oder frisch geschlachteten Donatoren abgenommen werden. Ein Verfahren für das Abnehmen von Rindervollblut ist in den an Rausch et al. vergebenen US-Patenten Nr. 5,084,558 und 5,296,465 beschrieben. Es wird vorgezogen, dass das Blut auf hygienische Weise abgenommen wird.

[0034] Bei oder kurz nach der Abnahme wird das Blut mit mindestens einem Antikoagulationsmittel gemischt, um eine signifikante Gerinnelbildung des Bluts zu verhindern. Geeignete Antikoagulationsmittel für Blut sind klassisch im Stand der Technik bekannt und umfassen beispielsweise Natriumcitrat, Ethylendiamintetraessigsäure und Heparin. Beim Mischen mit Blut kann das Antikoagulationsmittel in fester Form, wie beispielsweise als Pulver, oder in wässriger Lösung vorliegen.

[0035] Man sollte sich im Klaren darüber sein, dass die Quelle der Blutlösung aus einer frisch abgenommenen Probe oder aus einer alten Probe, wie beispielsweise nicht mehr gültigem menschlichen Blut aus einer Blutbank, stammen kann. Des Weiteren könnte die Blutlösung vorher im gefrorenen und/oder flüssigen Zustand gehalten worden sein. Es wird vorgezogen, dass die Blutlösung vor der Verwendung bei diesem Verfahren nicht gefroren worden ist.

[0036] Bei einer anderen Ausführungsform werden vor dem Aussetzen der Blutlösung Antikoagulationsmittel gegenüber die Antibiotikaspiegel in der Blutlösung, wie beispielsweise Penicillin, durch Assays bestimmt. Antibiotikaspiegel werden bestimmt, um einen Grad der Sicherstellung zu bieten, dass die Blutprobe nicht mit einem infizierenden Organismus behaftet ist, indem nachgeprüft wird, dass der Donator der Blutprobe nicht mit einem Antibiotikum behandelt worden ist. Beispiele geeigneter Assays auf Antibiotika umfassen ein Penicillinnassaykit (Difco, Detroit, MI) bei dem ein Verfahren angewendet wird, das als „Schnelle Erfassung von Penicillin in Milch“ bezeichnet wird. Es wird vorgezogen, dass Blutlösungen, einen Penicillinspiegel von weniger als oder gleich ca. 0,008 Einheiten/ml enthalten. Als Alternative kann ein Herdenpflegeprogramm angewendet werden, um das Fehlen von Krankheit oder der Antibiotikabehandlung des Viehs zu überwachen.

[0037] Bevorzugt wird die Blutlösung vor oder während des Antikoagulationsschritts gesiebt, beispielsweise durch Sieben zum Entfernen großer Ansammlungen und Teilchen. Ein Sieb von 600 Maschen ist ein Beispiel eines geeigneten Siebs.

[0038] Die RBZ in der Blutlösung werden dann durch geeignete Mittel, wie beispielsweise Diafiltrierung, oder durch eine Kombination einzelner Verdünnungs- und Konzentrierungsschritte mit mindestens einer Lösung, wie beispielsweise einer isotonischen Lösung, gewaschen, um die RBZ von extrazellulären Plasmaproteinen, wie beispielsweise Serumalbuminen oder Antikörpern (z. B. Immunglobulinen (IgG)) zu trennen. Man sollte sich im Klaren darüber sein, dass die RBZ chargenweise oder im kontinuierlichen Einspeisemodus gewaschen werden können.

[0039] Akzeptable isotonische Lösungen sind im Stand der Technik bekannt und umfassen Lösungen, wie beispielsweise eine Zitrat/physiologische Kochsalzlösung, die einen pH-Wert und eine Osmolarität aufweist, die die Zellmembranen von RBZ nicht sprengen und die den Plasmaanteil des Vollbluts verdrängt. Eine bevorzugte isotonische Lösung weist einen neutralen pH-Wert und eine Osmolarität zwischen ca. 285–315 mOsm auf. Bei einer bevorzugten Ausführungsform besteht die isotonische Lösung aus einer wässrigen Lösung von Natriumcitratdihydrat (6,0 g/l) und Natriumchlorid (8,0 g/l).

[0040] Wasser, das bei dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden kann, umfasst destilliertes Wasser, entionisiertes Wasser, Wasser für das Injizieren (WFI) und/oder niederpyrogenes Wasser (NPW). WFI, das bevorzugt wird, ist entionisiertes, destilliertes Wasser, das den amerikanischen pharmakologischen Spezifikationen für Wasser für das Injizieren entspricht. WFI ist in weiteren Einzelheiten in *Pharmaceutical Engineering*, 11, 15–23 (1991) beschrieben. NPW, das bevorzugt wird, ist entionisiertes Wasser, das weniger als 0,002 EI/ml enthält.

[0041] Es wird bevorzugt, dass die isotonische Lösung vor dem Zusetzen zur Blutlösung filtriert wird. Beispiele geeigneter Filter umfassen eine Millipore-Ultrafiltrierungsmembran von 10.000 Dalton, wie beispielsweise ein Millipore-Filter, Kat. # CDUF 050 G1, oder ein A/G Technology-Hohlfaserfilter, 10.000 Dalton (Kat. # UFP-10-C-85).

[0042] Bei einer bevorzugten Ausführungsform werden RBZ in der Blutlösung durch Diafiltrierung gewaschen. Geeignete Diafilter umfassen mikroporöse Membranen mit Porengrößen, die RBZ von wesentlich kleineren Blutlösungskomponenten trennen, wie beispielsweise Filter von 0,1 µm bis 0,5 µm (z. B. ein Hohlfaserfilter von 0,2 µm, eine Microgon Krosflo II Mikrofiltrierungskartusche). Gleichzeitig wird eine filtrierte isotonische Lösung kontinuierlich (oder chargenweise) als Auffülllösung mit einer Geschwindigkeit zugegeben, die der Geschwindigkeit (oder dem Volumen) des Filtratverlustes durch das Diafiltrieren entspricht. Während des RBZ-Waschens gehen Bestandteile der Blutlösung, die bezüglich ihres Durchmessers signifikant kleiner als RBZ oder Fluide, wie Plasma, sind, durch die Wände des Diafilters hindurch in das Filtrat hinein. RBZ, Plättchen und größere Körper der verdünnten Blutlösung, wie beispielsweise weiße Blutzellen, werden zurückgehalten und mit isotonischer Lösung gemischt, die kontinuierlich oder chargenweise zur Bildung einer dialysierten Blutlösung zugegeben wird.

[0043] Bei einer noch bevorzugteren Ausführungsform wird das Volumen an Blutlösung im Diafiltrierungstank zu Beginn durch Zugabe eines Volumens einer filtrierten isotonischen Lösung zum Diafiltrierungstank verdünnt. Bevorzugt ist das Volumen an zugegebener isotonischer Lösung ungefähr dem ursprünglichen Volumen der Blutlösung gleich.

[0044] Bei einer alternativen Ausführungsform werden die RBZ durch eine Reihe sequentieller (oder revers-sequentieller) Verdünnungs- und Konzentrationsschritte gewaschen, wobei die Blutlösung durch Zugabe von mindestens einer isotonischen Lösung verdünnt und durch Fließen über ein Filter unter Bildung einer dialysierten Blutlösung konzentriert wird.

[0045] Das RBZ-Waschen ist abgeschlossen, wenn das Niveau an Plasmaproteinen, die die RBZ kontaminieren, wesentlich reduziert worden ist (typischerweise um mindestens 90%). Typischerweise ist das RBZ-Waschen abgeschlossen, wenn das Volumen an von dem Diafilter 34 abgelassenem Filtrat ca. 300% oder mehr des Volumens der Blutlösung entspricht, das in dem Diafiltrierungstank vor dem Verdünnen der Blutlösung mit filtrierter isotonischer Lösung enthalten war.

[0046] Zusätzliches RBZ-Waschen kann extrazelluläre Plasmaproteine noch weiter von den RBZ trennen. Beispielsweise kann eine Diafiltrierung mit 6 Volumen isotonischer Lösung mindestens ca. 99% IgG von der

Blutlösung entfernen.

[0047] Die dialysierte Blutlösung wird dann Mitteln zum Trennen der RBZ in der dialysierten Blutlösung von den weißen Blutzellen und -plättchen, wie beispielsweise durch Zentrifugieren, ausgesetzt.

[0048] Man sollte sich im Klaren darüber sein, dass andere allgemein im Stand der Technik bekannte Verfahren zum Trennen von RBZ von anderen Blutbestandteilen verwendet werden können. Ein Beispiel ist die Sedimentation, wobei das Trennverfahren die Zellmembranen einer signifikanten Menge RBZ, wie beispielsweise weniger als ca. 30% der RBZ, vor dem Trennen der RBZ von den anderen Blutbestandteilen nicht sprengt.

[0049] Auf die Trennung der RBZ hin, werden die RBZ durch Mittel zum Lysieren von RBZ zum Freisetzen von Hämoglobin aus den RBZ unter Bildung einer Hämoglobin enthaltenden Lösung lysiert. Bei Lysemitteln können verschiedene Lyseverfahren, wie beispielsweise mechanische Lyse, chemische Lyse, hypotonische Lyse oder andere bekannte Lyseverfahren, verwendet werden, die Hämoglobin freisetzen, ohne die Fähigkeit des Hb, Sauerstoff zu transportieren und freizusetzen, wesentlich zu beeinträchtigen.

[0050] Bei noch einer anderen Ausführungsform kann rekombinant hergestelltes Hämoglobin, wie beispielsweise das rekombinant hergestellte Hämoglobin, das in Nature, 356: 258–260 (1992) beschrieben ist, durch das erfindungsgemäße Verfahren anstatt RBZ verarbeitet werden. Die Bakterienzellen, die das Hämoglobin enthalten, werden gewaschen und von Verschmutzungen, wie oben beschrieben, getrennt. Diese Bakterienzellen werden dann mechanisch durch im Stand der Technik bekannte Mittel, wie beispielsweise eine Kugelmühle gesprengt, um Hämoglobin aus den Zellen freizusetzen und eine lysierte Zellphase zu bilden. Diese lysierte Zellphase wird dann auf die gleiche Weise wie lysierte RBZ-Phase verarbeitet.

[0051] Auf die Lyse hin wird die lysierte RBZ-Phase dann ultrafiltriert, um größere Zelltrümmer, wie beispielsweise Proteine mit einem Molekulargewicht über ca. 100.000 Dalton, zu entfernen. Im Allgemeinen umfassen Zelltrümmer alle ganzen und fragmentierten Zellbestandteile, mit Ausnahme von Hb, kleineren Zellproteinen, Elektrolyten, Coenzymen und organischen Stoffwechselzwischenprodukten. Akzeptable Ultrafilter umfassen beispielsweise Filter von 100.000 Dalton, die von Millipore (Kat. # CDUF 050 H1) und von A/G Technology (Needham, MA; Modell Nr. UFP 100E55) hergestellt werden.

[0052] Es wird bevorzugt, dass die Ultrafiltrierung fortgeführt wird, bis die Hb-Konzentration in der lysierten RBZ-Phase weniger als 8 Gramm/Liter (g/l) beträgt, um die Ausbeute an Hämoglobin zu maximieren, das für die Polymerisation zur Verfügung steht. Andere Verfahren zum Trennen von Hb von der lysierten RBZ-Phase können angewendet werden, einschließlich der Sedimentation, des Zentrifugierens oder der Mikrofiltrierung. Das Hb-Ultrafiltrat kann dann ultrafiltriert werden, um kleinere Zelltrümmer, wie beispielsweise Elektrolyte, Coenzyme, Stoffwechselzwischenprodukte und Proteine von weniger als ca. 30.000 Dalton, als Molekulargewicht ausgedrückt, und Wasser aus dem Hb-Ultrafiltrat zu entfernen. Geeignete Ultrafilter umfassen ein Ultrafilter von 30.000 Dalton (Millipore Kat. # CDUF 050 T1 und/oder Armicon, # 540 430).

[0053] Die konzentrierte Hb-Lösung kann dann in eine oder mehrere parallele chromatographische Säulen eingeleitet werden, um das Hämoglobin durch Hochleistungsflüssigkeitchromatographie von anderen Verunreinigungen wie Antikörpern, Endotoxinen, Phospholipiden und Enzymen und Viren zu trennen. Beispiele geeigneter Medien umfassen Anionenaustauschmedien, Kationenaustauschmedien, hydrophobe Wechselwirkungsmedien und Affinitätsmedien. Bei einer bevorzugten Ausführungsform enthält die chromatographische Säule ein Anionenaustauschmedium, das zum Trennen von Hb von Nichthämoglobinproteinen geeignet ist. Geeignete Anionenaustauschmedien umfassen beispielsweise Siliciumdioxid, Aluminiumoxid, Titandioxid-gel, vernetztes Dextran, Agarose oder einen derivierten Anteil, wie beispielsweise ein Polyacrylamid, ein Polyhydroxyethylmethacrylat oder ein Styroldivinylbenzol, das mit einer kationischen chemischen Funktionalität wie beispielsweise einer Diethylaminoethyl- oder quarternären Aminoethylgruppe deriviert worden ist. Ein geeignetes Anionenaustauschmedium und entsprechende Elutionsmittel für die selektive Absorption und Desorption von Hb im Vergleich mit anderen Proteinen und Verunreinigungen, die wahrscheinlicherweise in einer lysierten RBZ-Phase vorliegen, können von einem mit dem Stand der Technik vertrauten Fachmann ohne weiteres bestimmt werden.

[0054] Bei einer bevorzugteren Ausführungsform wird ein Verfahren zum Bilden eines Anionenaustauschmediums aus Kieselgel verwendet, das hydrothermisch zum Erhöhen der Porengröße behandelt, γ -Glycidoxypropylsilan zur Bildung aktiver Epoxygruppen ausgesetzt und dann $C_3H_7(CH_3)NCl$ ausgesetzt wird, um ein quarternäres Ammoniumanionenaustauschmedium zu bilden. Dieses Verfahren ist im Journal of Chromatography,

120: 321–333 (1976) beschrieben, das hier als Ganzes summarisch eingefügt wird.

[0055] Chromatographische Säulen werden zuerst durch Ausspülen mit einem ersten Elutionsmittel vorbehandelt, was die Hb-Bindung erleichtert. Konzentrierte Hb-Lösung wird dann auf das Medium in den Säulen injiziert. Nach dem Injizieren der konzentrierten Hb-Lösung, werden die chromatographischen Säulen daraufhin nacheinander mit verschiedenen Elutionsmitteln gewaschen, um ein getrenntes, gereinigtes Hb-Eluat herzustellen.

[0056] Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird ein pH-Gradient in chromatographischen Säulen zum Trennen von Proteinverunreinigungen, wie beispielsweise der Enzymcarbonsäureanhydrase, Phospholipiden, Antikörpern und Endotoxinen vom Hb verwendet. Jeder einer Reihe von Puffern, die verschiedene pH-Werte aufweisen, wird sequentiell geführt, um einen pH-Gradienten innerhalb des Mediums in der chromatographischen Säule zu bilden. Es wird vorgezogen, dass die Puffer beispielsweise mit einer Depyrogenationsmembran von 10.000 Dalton filtriert werden. Die Puffer, die zum Trennen von Hb verwendet werden, sollten eine niedrige Ionenstärke aufweisen, derart, dass die Elution von Hb und von Nichthämoglobinverunreinigungen im Allgemeinen vom pH-Wert und nicht signifikant von der Ionenstärke abhängt. Typischerweise besitzen Puffer mit einer Ionenstärke von ca. 50 mM oder weniger geeignete Ionenstärken.

[0057] Der erste Puffer transportiert die konzentrierte Hb-Lösung in das Medium in den chromatographischen Säulen und erleichtert das Binden des Hb an das Medium. Der zweite Puffer stellt daraufhin den pH-Wert innerhalb der Säulen zum Eluieren verunreinigender Nichthämoglobinbestandteile ein, während das an das Medium gebundene Hb zurückgehalten wird. Der dritte Puffer eluiert daraufhin das Hb. Das Hb-Eluat wird daraufhin aufgefangen. Es wird bevorzugt, dass das Hb-Eluat durch ein steriles Filter geführt wird. Geeignete sterile Filter umfassen Filter von 0,22 µm, wie beispielsweise Sartorius Sartobran-Filter, Kat. # 5232507 G1PH.

[0058] Bei einer bevorzugten Ausführungsform werden die ersten 3% bis 4% des Hb-Eluats und die letzten 3% bis 4% des Hb-Eluats als Abgänge abgeführt, um eine Garantie der Reinheit des Hb-Eluats zu bieten.

[0059] Wenn die chromatographischen Säulen wiederverwendet werden sollen, werden verschmutzende Nichthämoglobinproteine und Endotoxin, die in den Säulen verbleiben, durch einen vierten Puffer eluiert.

[0060] Die Verwendung von pH-Gradienten zum Trennen von Nichthämoglobinverschmutzungen der Hb-Form ist noch weiter in dem am 7. Juni 1995 eingereichten US-Patent 5,691,452 beschrieben, die hier summarisch eingefügt wird.

[0061] Bei einer bevorzugten Ausführungsform ist der erste Puffer eine Trishydroxymethylaminomethan-(Tris-)Lösung (Konzentration ca. 20 mM; pH-Wert ca. 8,4 bis ca. 9,4). Der zweite Puffer ist eine Mischung des ersten Puffers und eines dritten Puffers, wobei der zweite Puffer einen pH-Wert von ca. 8,2 bis ca. 8,6 aufweist. Der dritte Puffer ist eine Tris-Lösung (Konzentration ca. 50 mM; pH-Wert ca. 6,5 bis ca. 7,5). Der vierte Puffer ist eine NaCl/Tris-Lösung (Konzentrationen ca. 1,0 M NaCl und ca. 20 mM Tris; pH-Wert ca. 8,4 bis ca. 9,4, bevorzugt ca. 8,9–9,1). Es ist besonders bevorzugt, dass der pH-Wert des zweiten Puffers zwischen ca. 8,2 und ca. 8,4 liegt.

[0062] Typischerweise werden die Puffer bei einer Temperatur zwischen ca. 0°C und ca. 50°C angewendet. Bevorzugt liegt die Puffertemperatur während der Anwendung bei ca. $12,4 \pm 1,0^\circ\text{C}$. Außerdem werden die Puffer typischerweise bei einer Temperatur von ca. 9°C bis ca. 11°C gelagert.

[0063] Das Hb-Eluat wird daraufhin bevorzugt vor der Polymerisation unter Bildung einer deoxygenierten Hb-Lösung (im folgenden Deoxy-Hb genannt) durch Mittel deoxygeniert, durch die das Hb erheblich deoxygeniert wird, ohne die Fähigkeit des Hb im Hb-Eluat, Sauerstoff zu transportieren und freizusetzen, zu reduzieren, wie das beim Denaturieren bei der Bildung von oxydiertem Hämoglobin (metHb) vorkommen würde.

[0064] Bei einer Ausführungsform wird das Hb-Eluat durch Gasübertragung eines inerten Gases über eine Phasenmembran deoxygeniert. Derartige inerte Gase umfassen beispielsweise Stickstoff, Argon und Helium. Man sollte sich im Klaren darüber sein, dass andere Mittel für das Deoxygenieren einer Lösung von Hämoglobin, die im Stand der Technik bekannt sind, zum Deoxygenieren des Hb-Eluats verwendet werden können. Derartige andere Mittel können beispielsweise das Durchperlen von Stickstoff durch das Hb-Eluat, das chemische Reinigen mit Reduziermitteln, wie beispielsweise N-Acetyl-L-cystein (NAC), Cystein, Natriumdithionit oder -ascorbat oder die Photolyse durch Licht, umfassen.

[0065] Auf die Elution aus der chromatographischen Säule hin, wird das Hb-Eluat bevorzugt konzentriert, um die Effizienz des Vorgangs zu verbessern. Das Hb-Eluat wird durch ein Ultrafilter rezirkuliert, um das Hb-Eluat unter Bildung einer konzentrierten Hb-Lösung zu konzentrieren. Geeignete Ultrafilter umfassen beispielsweise Ultrafilter von 30.000 Dalton oder weniger (z. B. Millipore Helicon, Kat. # CDUF050G1 oder Amicon, Kat. # 540430). Typischerweise ist die Konzentrierung des Hb-Eluats abgeschlossen, wenn die Konzentration an Hb zwischen ca. 100 und ca. 120 g/l liegt. Während des Konzentrierens des Hb-Eluats wird die Temperatur des Hb-Eluats bevorzugt bei ca. 8–12°C gehalten.

[0066] Dann wird Puffer direkt in die Hb-Lösung eingeführt, die bevorzugt konzentriert ist, um die Ionenstärke der Hb-Lösung einzustellen, um die Hb-Deoxygenierung zu verbessern. Es wird vorgezogen, dass die Ionenstärke auf zwischen ca. 150 mäs/l und ca. 200 mäs/l eingestellt wird, um die Sauerstoffaffinität des Hb in der Hb-Lösung zu reduzieren. Geeignete Puffer umfassen Puffer mit einem pH-Wert, der nicht zu einem signifikanten Denaturieren des Hb-Proteins führt, jedoch eine Ionenstärke aufweist, die hoch genug ist, um die Hb-Deoxygenierung zu fördern. Beispiele geeigneter Puffer umfassen physiologische Kochsalzlösungen mit einem pH-Bereich von ca. 6,5 bis ca. 8,9. Wässriges 1,0 M NaCl, 20 mM Tris-Lösung mit einem pH-Wert von ca. 8,9 ist ein bevorzugter Puffer.

[0067] Bevorzugt wird die dabei entstehende gepufferte Hb-Lösung daraufhin durch das Ultrafilter rezirkuliert, um die Hb-Lösung nochmals zu konzentrieren, um die Effizienz des Vorgangs zu verbessern. Bei einer bevorzugten Ausführungsform ist das Konzentrieren abgeschlossen, wenn die Konzentration von Hb ca. 100 g/l bis ca. 120 g/l beträgt.

[0068] Während der Deoxygenierung wird die Hb-Lösung durch eine geeignete Phasenübertragungsmembran zirkuliert. Geeignete Phasenübertragungsmembranen umfassen beispielsweise ein Polypropylenhohlfasermikrofilter von 0,05 µm (z. B. Höchst-Celanese, Kat. # 5PCM-107). Gleichzeitig wird ein Gegenstrom eines inerten Gases über die Phasenübertragungsmembran geführt. Geeignete inerte Gase umfassen beispielsweise Stickstoff, Argon und Helium. Durch den Gasaustausch über die Phasenübertragungsmembran wird dabei Sauerstoff aus der Hb-Lösung ausgetrieben.

[0069] Die Deoxygenierung wird fortgesetzt, bis der pO_2 der Hb-Lösung auf ein Niveau reduziert ist, bei dem der Gehalt an oxygeniertem Hb (Oxyhämoglobin oder HbO_2) in der Hb-Lösung ca. 20% oder weniger beträgt. Bei einer bevorzugten Ausführungsform beträgt der HbO_2 -Gehalt der Hb-Lösung ca. 10% oder weniger.

[0070] Während der Deoxygenierung wird die Temperatur der Hb-Lösung typischerweise bei einem Niveau gehalten, bei dem die Deoxygenierungsrate mit der Methämoglobinbildungsrate im Gleichgewicht steht. Die Temperatur wird so gehalten, dass der Methämoglobingehalt bei weniger als 20% gehalten wird. Eine optimale Temperatur führt zu einem Methämoglobingehalt von weniger als ca. 5% und bevorzugt zu einem Methämoglobingehalt von weniger als ca. 2,5%, während die Hb-Lösung immer noch deoxygeniert wird. Typischerweise wird die Temperatur der Hb-Lösung während der Deoxygenierung zwischen ca. 19°C und ca. 31°C gehalten. Während der Deoxygenierung und daraufhin während der gesamten verbleibenden Schritte des erfindungsgemäßen Verfahrens wird das Hb in einem Umfeld mit geringem Sauerstoffgehalt gehalten, um die Sauerstoffabsorption durch das Hb zu minimieren und einen HbO_2 -Gehalt von weniger als ca. 20%, bevorzugt weniger als ca. 10% beizubehalten.

[0071] Das deoxygenierte Hb wird daraufhin bevorzugt mit einem Lagerpuffer mit geringem Sauerstoffgehalt, der eine Sulfhydrylverbindung enthält, unter Bildung eines gegen Oxidation stabilisierten Deoxy-Hb äquilibriert. Geeignete Sulfhydrylverbindungen umfassen nichttoxische Reduziermittel wie N-Acetyl-L-cystein (NAC) D,L-Cystein, γ -Glutamylcystein, Glutathion, 2,3-Dimercapto-1-propanol, 1,4-Butandithiol, Thioglykolat und andere biologisch verträgliche Sulfhydrylverbindungen. Der Sauerstoffgehalt eines Lagerpuffers von geringem Sauerstoffgehalt muss niedrig genug sein, um die Konzentration an Sulfhydrylverbindung in dem Puffer nicht signifikant zu reduzieren und den Oxyhämoglobingehalt im gegen Oxidation stabilisierten Deoxy-Hb auf ca. 20% oder weniger, bevorzugt weniger als ca. 10% zu beschränken. Typischerweise besitzt der Lagerpuffer einen pO_2 von weniger als ca. 50 Torr.

[0072] Bei einer bevorzugten Ausführungsform sollte der Lagerpuffer einen pH-Wert aufweisen, der geeignet ist, um die Hb-Polymerisation und die Methämoglobinbildung typischerweise bei zwischen ca. 7,6 und ca. 7,9 zu halten.

[0073] Die Menge an Sulfhydrylverbindung, die mit dem Deoxy-Hb gemischt wird, ist eine Menge, die hoch genug liegt, um die intramolekulare Vernetzung von Hb während der Polymerisation zu erhöhen und niedrig

genug, um die intermolekulare Vernetzung von Hb-Molekülen aufgrund einer hohen Ionenstärke nicht signifikant zu reduzieren. Typischerweise wird etwa ein Mol sulfhydrylfunktioneller Gruppen (-SH) zum Oxidationsstabilisieren von ca. 0,25 Mol bis ca. 5 Mol Deoxy-Hb benötigt.

[0074] Bei einer bevorzugten Ausführungsform enthält der Lagerpuffer ca. 25–35 mM Natriumphosphatpuffer (pH-Wert 7,7–7,8) und eine derartige Menge an NAC, dass die Konzentration an NAC im gegen Oxidation stabilisierten Deoxy-Hb zwischen ca. 0,003% und ca. 0,3 Gew.-% liegt. Noch bevorzugter liegt die NAC-Konzentration in dem gegen Oxidation stabilisierten Deoxy-Hb zwischen ca. 0,05 und ca. 0,2 Gew.-%.

[0075] Bevorzugt wird der Lagerpuffer vor dem Mischen mit dem Deoxy-Hb beispielsweise durch eine Ultrafiltrationsmembran von 10.000 Dalton (Millipore Helicon, Kat. # CDUF050G1 oder A/G Technology Maxcell, Kat. # UFP-10-C-75) filtriert.

[0076] Bei einer Ausführungsform fließt das gegen Oxidation stabilisierte Deoxy-Hb daraufhin durch ein wahlweises Filter. Geeignete Filter umfassen ein Polypropylenvorfilter von 0,2 µm und ein steriles Mikrofilter von 0,5 µm (Pall Profile II, Kat. # ABIY005Z7 oder Gelman Supor). Das Deoxy-Hb wird in einer im Wesentlichen sauerstofffreien Atmosphäre gehalten. Das lässt sich beispielsweise durch Ausspülen und Abschirmen des Prozessapparats mit einem inerten Gas, wie beispielsweise Stickstoff vor und nach dem Befüllen mit gegen Oxidation stabilisiertem Deoxy-Hb, erreichen.

[0077] Wahlweise wird vor dem Übertragen des gegen Oxidation stabilisierten Deoxy-Hb zur Polymerisation eine geeignete Menge Wasser in den Polymerisationsreaktor eingegeben. Bei einer Ausführungsform ist eine geeignete Menge Wasser diejenige Menge, die zu einer Lösung mit einer Konzentration von ca. 10 bis ca. 100 g/l Hb führen würde, wenn das gegen Oxidation stabilisierte Deoxy-Hb dem Polymerisationsreaktor zugegeben wird. Bevorzugt ist der Sauerstoffgehalt des Wassers erschöpft.

[0078] Nachdem der pO_2 des Wassers im Polymerisationsschritt auf ein Niveau reduziert ist, das ausreicht, um den HbO_2 -Gehalt auf ca. 20%, typischerweise weniger als ca. 50 Torr zu beschränken, wird der Polymerisationsreaktor mit einem inerten Gas wie Stickstoff abgeschirmt. Das gegen Oxidation stabilisierte Deoxy-Hb wird dann in den Polymerisationsreaktor übertragen, der gleichzeitig mit einem geeigneten Strom eines inerten Gases abgeschirmt wird.

[0079] Die Temperatur der gegen Oxidation stabilisierten Deoxy-Hb-Lösung im Polymerisationsreaktor wird daraufhin auf eine Temperatur erhöht, um die Polymerisation des gegen Oxidation stabilisierten Deoxy-Hbs zu optimieren, wenn es mit einem Vernetzungsmittel in Kontakt gebracht wird. Typischerweise liegt die Temperatur des gegen Oxidation stabilisierten Deoxy-Hb während der gesamten Polymerisation bei ca. 25°C bis ca. 45°C, bevorzugt ca. 41°C bis ca. 43°C. Ein Beispiel einer akzeptablen Wärmeübertragungsvorrichtung zum Erwärmen des Polymerisationsreaktors ist ein Mantelheizsystem, das durch Hindurchführen von heißem Ethylenglykol durch den Mantel erhitzt wird.

[0080] Das gegen Oxidation stabilisierte Deoxy-Hb wird dann einem geeigneten Vernetzungsmittel bei einer Temperatur ausgesetzt, die ausreicht, um das gegen Oxidation stabilisierte Deoxy-Hb unter Bildung einer Lösung von polymerisiertem Hämoglobin (Poly(Hb)) über eine Zeitspanne von ca. 2 Stunden bis ca. 6 Stunden zu polymerisieren.

[0081] Beispiele geeigneter Vernetzungsmittel umfassen polyfunktionelle Mittel, die Hb-Proteine vernetzen, wie beispielsweise Glutaraldehyd, Succindialdehyd, aktivierte Formen von Polyoxyethylen und Dextran, a-Hydroxyaldehyde wie Glykolaldehyd, N-Maleimido-6-aminocaproyl-(2'-nitro,4'-sulfonsäure)phenylester, m-Maleimidobenzoesäure-N-hydroxysuccinimidester, Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat, Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat, m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester, m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinimidester, N-Succinimidyl(4-iodoacetyl)aminobenzoat, Sulfosuccinimidyl(4-iodoacetyl)aminobenzoat, Succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)butyrat, Sulfosuccinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)butyrat, 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid, N,N'-Phenylen-dimaleimid und Verbindungen, die zur Bisimidatklasse, der Acyldiazidklasse oder der Aryldihalogenidklasse, unter anderen, gehören.

[0082] Eine geeignete Menge eines Vernetzungsmittels ist diejenige Menge, die es erlaubt, dass intramolekulares Vernetzen zum Stabilisieren des Hb und auch intermolekulares Vernetzen zum Bilden von Polymeren von Hb stattfindet, um dadurch die intravaskuläre Retention zu erhöhen. Typischerweise ist eine geeignete Menge Vernetzungsmittel diejenige Menge, bei der das Molverhältnis von Vernetzungsmittel zu Hb über ca.

2:1 liegt. Bevorzugt liegt das Molverhältnis von Vernetzungsmittel zu Hb zwischen ca. 20:1 bis 40:1.

[0083] Bevorzugt wird die Polymerisation in einem Puffer mit einem pH-Wert zwischen ca. 7,6 und ca. 7,9 durchgeführt, der eine Chloridkonzentration von weniger als oder gleich ca. 35 mMolar aufweist.

[0084] Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird eine geeignete Menge Vernetzungsmittel dem gegen Oxidation stabilisierten Deoxy-Hb zugegeben und dann durch eine Vorrichtung für das Mischen unter niedriger Schubspannung gemischt. Ein geeignetes Mittel für das Mischen unter niedriger Schubspannung umfasst einen Statikmischapparat. Ein geeigneter Statikmischapparat ist beispielsweise ein „Kenics“-Statikmischapparat, der von Chemineer, Inc., erhältlich ist.

[0085] Bei einer Ausführungsform verursacht das Rezirkulieren des gegen Oxidation stabilisierten Deoxy-Hb und des Vernetzungsmittels durch die Statikmischvorrichtung turbulente Strömungsbedingungen bei einem allgemein gleichförmigen Mischen des Vernetzungsmittels mit dem gegen Oxidation stabilisierten Deoxy-Hb unter Reduzierung des Potentials für das Bilden von Ansammlungen von Deoxy-Hb, die hohe Konzentrationen des Vernetzungsmittels enthalten. Im Allgemeinen reduziert ein gleichmäßiges Mischen des Vernetzungsmittels und des Deoxy-Hb die Bildung von Hb-Polymeren von hohem Molekulargewicht, z. B. Polymeren, die mehr als 500.000 Dalton wiegen, und erlaubt auch ein schnelleres Mischen des Vernetzungsmittels und des Deoxy-Hb während der Polymerisation. Des Weiteren erfolgt ein signifikantes intramolekulares Hb-Vernetzen während der Hb-Polymerisation aufgrund des Vorliegens einer Sulfhydrylverbindung, bevorzugt NAC. Während der genaue Mechanismus der Wechselwirkung der Sulfhydrylverbindung mit Glutaraldehyd und/oder Hb nicht bekannt ist, wird angenommen, dass die Sulfhydrylverbindung die chemische Bindung zwischen Hb und Vernetzungsmittel auf eine Art und Weise beeinflusst, die die Bildung von Hb-Polymeren von hohem Molekulargewicht zumindest teilweise hemmt und bevorzugt stabilisiertes tetrameres Hb bildet.

[0086] Poly(Hb) wird als dahingehend definiert, dass es ein signifikantes intramolekulares Vernetzen aufweist, wenn ein wesentlicher Anteil (z. B. mindestens ca. 50%) der Hb-Moleküle in dem Poly(Hb) chemisch gebunden sind und nur eine kleine Menge, wie beispielsweise weniger als ca. 15%, innerhalb polymerisierter Hämoglobinketten von hohem Molekulargewicht enthalten sind. Poly(Hb)-Moleküle von hohem Molekulargewicht sind beispielsweise Moleküle mit einem Molekulargewicht von mehr als ca. 500.000 Dalton.

[0087] Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird Glutaraldehyd als Vernetzungsmittel verwendet. Typischerweise werden ca. 10 bis ca. 70 Gramm Glutaraldehyd pro Kilogramm des gegen Oxidation stabilisierten Deoxy-Hb verwendet. Noch bevorzugter wird Glutaraldehyd über eine Zeitspanne von fünf Stunden zugegeben, bis ca. 29–31 Gramm Glutaraldehyd je Kilogramm stabilisiertes Deoxy-Hb zugegeben worden sind.

[0088] Nach der Polymerisation wird die Temperatur der Poly(Hb)-Lösung im Polymerisationsreaktor typischerweise auf ca. 15°C bis ca. 25°C reduziert.

[0089] Wenn das verwendete Vernetzungsmittel kein Aldehyd ist, ist das gebildete Poly(Hb) im Allgemeinen ein beständiges Poly(Hb). Wenn das verwendete Vernetzungsmittel ein Aldehyd ist, ist das gebildete Poly(Hb) im Allgemeinen nicht beständig, bis es mit einem geeigneten Reduziermittel zum Reduzieren weniger beständiger Bindungen in dem Poly(Hb) gemischt wird, um beständigere Bindungen zu bilden. Beispiele geeigneter Reduziermittel umfassen Natriumborhydrid, Natriumcyanborhydrid, Natriumdithionit, Trimethylamin, tert. Butylamin, Morpholinboran und Pyridinboran. Vor Zusetzen des Reduzierungsmittels wird die Poly(Hb)-Lösung wahlweise durch Ultrafiltrieren konzentriert, bis die Konzentration der Poly(Hb)-Lösung auf zwischen ca. 75 bis ca. 85 g/l erhöht ist. Ein Beispiel eines geeigneten Ultrafilters ist ein Filter von 30.000 Dalton (z. B. Millipore Helicon, Kat. # CDUF050LT und Amicon, Kat. # 540430).

[0090] Der pH-Wert der Poly(Hb)-Lösung wird dann auf den alkalischen pH-Bereich eingestellt, um das Reduziermittel zu konservieren und die Wasserstoffgasbildung zu verhindern, durch die das Hb während der darauffolgenden Reduktion denaturiert werden kann. Bei einer Ausführungsform wird der pH-Wert auf mehr als 10 eingestellt. Der pH-Wert kann durch Zugabe einer Pufferlösung zur Poly(Hb)-Lösung während oder nach der Polymerisation eingestellt werden. Das Poly(Hb) wird typischerweise gereinigt, um nichtpolymerisiertes Hämoglobin zu entfernen. Dies kann durch die Diafiltrierung oder Hydroxyapatitchromatographie (vergleiche z. B. US-Patent 5,691,453, das hier summarisch eingefügt wird) erreicht werden.

[0091] Auf das Einstellen des pH-Werts hin, wird mindestens ein Reduziermittel, bevorzugt eine Natriumborhydridlösung, dem Polymerisationsschritt typischerweise durch die Deoxygenationsschleife zugegeben. Typischerweise werden ca. 5 bis ca. 18 Mol Reduziermittel pro Mol Hb-Tetramer (pro 64.000 Dalton Hb) innerhalb

des Poly(Hb) zugegeben. Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird je neun Liter Poly(Hb)-Lösung im Polymerisationsuntersystem 98 ein Liter 0,25 M Natriumborhydridlösung mit einer Geschwindigkeit von 0,1 bis 0,12 lpm zugegeben.

[0092] Der pH-Wert und die Elektrolyte des beständigen Poly(Hb) können auf physiologische Niveaus zurückgebracht werden unter Bildung eines beständigen polymerisierten Hämoglobin-Blutersatzmittels durch Diafiltrieren des beständigen Poly(Hb) mit einer Diafiltrierungslösung mit einem geeigneten pH-Wert und physiologischen Elektrolytniveaus. Bevorzugt ist die Diafiltrierungslösung eine Pufferlösung.

[0093] Wenn das Poly(Hb) durch ein Reduziermittel reduziert wurde, wies die Diafiltrierungslösung einen sauren pH-Wert, bevorzugt zwischen ca. 4 und ca. 6, auf.

[0094] Eine nichttoxische Sulfhydrylverbindung kann der beständigen Poly(Hb)-Lösung auch als Sauerstofffänger zum Verbessern der Beständigkeit des endgültigen polymerisierten Hämoglobin-Blutersatzmittels zugegeben werden. Die Sulfhydrylverbindung kann als Teil der Diafiltrierungslösung und/oder getrennt zugegeben werden. Eine Menge an Sulfhydrylverbindung wird zum Festsetzen einer Sulfhydrylkonzentration zugegeben, durch die Sauerstoff aufgefangen wird, um den Methämoglobingehalt bei weniger als ca. 15% über die Lagerzeit hinweg zu halten. Bevorzugt ist die Sulfhydrylverbindung NAC. Typischerweise ist die Menge an Sulfhydrylverbindung, die zugesetzt wird, eine Menge, die ausreicht, um eine Sulfhydrylkonzentration zwischen ca. 0,05% und ca. 0,2%, auf das Gewicht bezogen, herzustellen.

[0095] Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird das Blutersatzmittel unter aseptischen Handhabungsbedingungen verpackt, während in dem Polymerisationsreaktor und dem übrigen Transportapparat Druck mit einer Inerten, im Wesentlichen sauerstofffreien Atmosphäre aufrechterhalten wird.

[0096] Die Spezifikationen für ein geeignetes beständiges polymerisiertes Hämoglobin-Blutersatzmittel, das durch das erfindungsgemäße Verfahren gebildet wird, sind in Tabelle I angegeben.

Tabelle I

PARAMETER	ERGEBNISSE
pH (18-22°C)	Physiologisch akzeptabel
Endotoxin	Physiologisch akzeptabel
Sterilitätstest	Entspricht dem Test
Phospholipide ^a	Physiologisch akzeptabel
Gesamtes Hämoglobin	10 – 250 g/l
Methämoglobin	<15 %
Oxyhämoglobin	<10 %
Natrium, Na ⁺	Physiologisch akzeptabel
Kalium, K ⁺	
Chlorid, Cl ⁻	
Calcium, Ca ⁺⁺	
Bor	

Glutaraldehyd	Physiologisch akzeptabel
N-Acetyl-L-cystein	Physiologisch akzeptabel
M.W. >500.000	≤15 %
M.W. ≤65.000	<10 %
M.W. <32.000	<5 %
Gehalt an teilchenförmiger Substanz >10 µ	<12/ml
Gehalt an teilchenförmiger Substanz >25 µ	<2/ml

a – im Hb vor der Polymerisation gemessen.

[0097] Das beständige Blutersatzmittel wird dann in einem Behälter für die Kurzzeitlagerung oder sterilen Lagerbehältern gelagert, wobei jeder ein Umfeld mit geringem Sauerstoffgehalt, wie oben im Einzelnen beschrieben, aufweist. Der Lagerbehälter sollte auch für den Durchgang von Wasserdampf ausreichend undurchlässig sein, um ein signifikantes Konzentrieren des Blutersatzmittels durch Verdampfen im Laufe der Lagerzeit zu verhindern. Signifikantes Konzentrieren des Blutersatzmittels ist das Konzentrieren, das dazu führt, dass ein oder mehrere Parameter des Blutersatzmittels stark außerhalb der Spezifikation liegen.

[0098] Die Synthese eines beständigen polymerisierten Hämoglobin-Blutersatzmittels, das dem erfindungsgemäßen Verfahren entsprechend gebildet worden ist, ist noch weiter in dem US-Patent Nr. 5,296,465 beschrieben.

[0099] Vertebrate, denen das Blutersatzmittel verabreicht werden kann, das durch die erfindungsgemäße Verfahren gebildet worden ist, umfassen Säuger, wie Menschen, nichtmenschliche Primate, einen Hund, eine Katze, ein Pferd oder ein Schaf. Des Weiteren umfassen Vertebrate, denen das Blutersatzmittel verabreicht werden kann, Fötuse (präinatale Vertebrate), postnatale Vertebrate oder Vertebrate zum Zeitpunkt der Geburt.

[0100] Ein Blutersatzmittel der vorliegenden Erfindung kann durch Injektion des Blutersatzmittels direkt bzw. indirekt in das Kreislaufsystem des Vertebraten durch ein oder mehrere Injektionsverfahren in das Kreislaufsystem verabreicht werden. Beispiele direkter Injektionsverfahren umfassen intravaskuläre Injektionen, wie beispielsweise intravenöse und intraarterielle Injektionen, und intrakardiale Injektionen. Beispiele indirekter Injektionsverfahren umfassen intraperitoneale Injektionen, subkutane Injektionen, derart, dass das Blutersatzmittel durch das Lymphsystem in das Kreislaufsystem transportiert wird, oder Injektionen in das Knochenmark durch einen Trokar oder Katheter. Bevorzugt wird das Blutersatzmittel intravenös verabreicht.

[0101] Der Vertebrat, der behandelt wird, kann vor, während und/oder nach der Infusion des Blutersatzmittels normovolämisch, hypervolämisch oder hypovolämisch sein. Das Blutersatzmittel kann durch Verfahren wie das Beladen von oben und durch Austauschverfahren in das Kreislaufsystem gebracht werden.

[0102] Ein Blutersatzmittel kann therapeutisch zum Behandeln von hypoxischem Gewebe innerhalb eines Vertebraten, das von vielen verschiedenen Ursachen, einschließlich reduziertem RBZ-Fluss in einem Teil oder innerhalb des ganzen Kreislaufsystems, Anämie und Schock herrührt, verabreicht werden. Des Weiteren kann das Blutersatzmittel vorbeugend zum Verhindern der Sauerstoffzehrung von Gewebe innerhalb eines Vertebraten verabreicht werden, die von einer möglichen oder zu erwartenden Reduktion des RBZ-Flusses zu einem Gewebe oder durch das gesamte Kreislaufsystem des Vertebraten herrühren könnte. Eine weitere Erörterung der Verabreichung von Hämoglobin zum therapeutischen oder vorbeugenden Behandeln von Hypoxie, die insbesondere durch eine teilweise Arterienblockierung oder durch teilweise Blockierung der Mikrozirkulation hervorgerufen wird, und der dabei angewandten Dosierungen ist in der gleichzeitig anhängigen US-Patentanmeldung Seriennr. 08/409,337, die am 23. März 1995 eingereicht worden ist und hier als Ganzes summarisch eingefügt wird, zur Verfügung gestellt.

[0103] Typischerweise ist eine geeignete Dosis oder Kombination von Dosen von Blutersatzmittel eine Menge, die, ist sie im Blutplasma enthalten, zu einer Gesamthämoglobinkonzentration im Blut des Vertebraten von

ca. 0,1 bis ca. 10 Gramm Hb/dl oder mehr, falls es zum Ersetzen eines großen Blutverlustvolumens erforderlich ist, enthalten.

[0104] Die Erfindung wird nun durch die folgenden Beispiele noch weiter und spezifisch beschreiben.

Beispiel 1

Synthese von beständigem polymerisiertem Hb-Blutersatzmittel

[0105] Wie in dem US-Patent Nr. 5,296,465 beschrieben wurden Proben von Rindervollblut aufgefangen, mit einem Natriumcitrat-Antikoagulationsmittel unter Bildung einer Blutlösung gemischt.

[0106] Jede Blutlösungsprobe wurde nach dem Auffangen bei einer Temperatur von ca. 2°C gehalten und dann zum Entfernen großer Agglomerate und Teilchen mit einem Sieb von 600 Maschen gesiebt.

[0107] Vor dem Zusammenmischen wurde der Penicillinspiegel in jeder Blutlösungsprobe mit einem von Difco, Detroit, Michigan erworbenen Assaykit unter Anwendung des Verfahrens mit dem Titel 'Schnelle Erfassung von Penicillin in Milch' bestimmt, um sicherzustellen, dass die Penicillinspiegel in der Blutlösung unter < 0,008 Einheiten/ml lagen.

[0108] Die Blutlösungsproben wurden dann vereinigt und mit depyrogenierter wässriger Natriumcitratlösung unter Bildung einer Natriumcitratlösung von 0,2% Gew.-% in Rindervollblut (im Folgenden "0,2%ige Natriumcitratlösung" genannt) gemischt.

[0109] Die 0,2%ige Natriumcitratlösung wurde dann nacheinander durch Polypropylenfilter von 800 µm und 50 µm zum Entfernen großer Blutlösungsstrümmen eines Durchmessers von ca. 50 µm und mehr hindurchgeführt.

[0110] Die RBZ wurden dann gewaschen, um extrazelluläre Plasmaproteine, wie beispielsweise BSA oder IgG, von den RBZ abzutrennen. Um die in der Blutlösung enthaltenen RBZ zu waschen, wurde das Volumen an Blutlösung in dem Diafiltrierungstank zuerst durch Zugeben eines gleichen Volumens einer filtrierten isotonischen Lösung zum Diafiltrierungstank verdünnt. Die isotonische Lösung wurde mit einer Millipore-Ultrafiltrierungsmembran von 10.000 Dalton (Kat # CDUF 050 G1) filtriert. Die isotonische Lösung bestand aus 6,0 g/l Natriumcitratdihydrat und 8,0 g/l Natriumchlorid in Wasser für das Injizieren (WFI).

[0111] Die verdünnte Blutlösung wurde dann durch Diafiltrieren durch ein Hohlfaserdiafilter von 0,2 µm (Microgonon Krosflo II-Mikrofiltrierungskartusche) auf ihr ursprüngliches Volumen zurückkonzentriert. Gleichzeitig wurde filtrierte isotonische Lösung kontinuierlich als Auffülllösung mit einer der Filtratverlustrate durch das Diafilter von 0,2 µm entsprechenden Geschwindigkeit zugegeben. Während der Diafiltrierung gingen Bestandteile der verdünnten Blutlösung, die einen beträchtlich kleineren Durchmesser aufwiesen als RBZ oder Flüssigkeiten wie Plasma, durch die Wände des Diafilters von 0,2 µm mit dem Filtrat hindurch. Die RBZ, Plättchen und größeren Körper der verdünnten Blutlösung, wie weiße Blutzellen, wurden mit kontinuierlich zugegebener isotonischer Lösung unter Bildung einer dialysierten Blutlösung zurückgehalten.

[0112] Während des RBZ-Waschens wurde die verdünnte Blutlösung bei einer Temperatur zwischen ca. 10 und 25°C bei ein Fluidruck am Einlass des Diafilters zwischen ca. 25 psi und ca. 30 psi gehalten, um die Leistungsfähigkeit des Verfahrens zu verbessern.

[0113] Das RBZ-Waschen war abgeschlossen, als das Volumen des aus dem Diafilter abgelassenen Filtrats ca. 600% des Volumens der Blutlösung vor dem Verdünnen mit filtrierter isotonischer Lösung entsprach.

[0114] Die dialysierte Blutlösung wurde dann kontinuierlich mit einer Geschwindigkeit von ca. 4 lpm zu einer Sharples-Superzentrifuge, Modell # AS-16, die mit einem #28-Ringdamm ausgestattet war, gepumpt. Die Zentrifuge wurde betrieben, während ihr gleichzeitig dialysierte Blutlösung zugespeist wurde, um die RBZ von den weißen Blutzellen und -plättchen zu trennen. Während sie in Betrieb war, drehte sich die Zentrifuge mit einer Geschwindigkeit, die ausreichte, um die RBZ in eine schwere RBZ-Phase zu trennen, während ein wesentlicher Anteil der weißen Blutzellen (WBZ) und der -plättchen in eine leichte WBZ-Phase abgetrennt wurde, spezifisch mit ca. 15.000 UpM. Eine Fraktion der RBZ-Phase und der WBZ-Phase wurde abgetrennt und kontinuierlich aus der Zentrifuge abgelassen, während sie in Betrieb war.

[0115] Auf das Trennen der RBZ hin, wurden die RBZ unter Bildung einer hämoglobinhaltigen Lösung lysiert. Ein wesentlicher Anteil der RBZ wurde mechanisch lysiert, während die RBZ aus der Zentrifuge abgelassen wurden. Die Zellmembranen der RBZ zerbrachen auf das Auftreffen auf die Wand der RBZ-Phasenablasslinie in einem Winkel zur Strömung der RBZ-Phase aus der Zentrifuge, wobei Hämoglobin (Hb) aus den RBZ in die RBZ-Phase freigesetzt wurde.

[0116] Die lysierte RBZ-Phase strömte dann durch die RBZ-Phasenablasslinie in eine Statikmischvorrichtung (Kenics ½-Zoll mit 6 Elementen, Chemineer, Inc.). Gleichzeitig mit der Übertragung der RBZ-Phase zur Statikmischvorrichtung wurde auch eine entsprechende Menge WFI ebenfalls in die Statikmischvorrichtung injiziert, in der das WFI mit der RBZ-Phase gemischt wurde. Die Strömungsgeschwindigkeiten der RBZ-Phase und des WFI in die Statikmischvorrichtung betragen jeweils ca. 0,25 lpm.

[0117] Das Mischen der RBZ-Phase mit dem WFI in der Statikmischvorrichtung führte zur Bildung eines lysierten RBZ-Kolloids. Das lysierte RBZ-Kolloid wurde dann aus der Statikmischvorrichtung in eine Sharples-Superzentrifuge (Modell # AS-16, Sharples-Sparte von Alfa-Laval, Separation, Inc.) überführt, die geeignet war, das Hb von den Nichthämoglobin-RBZ-Bestandteilen zu trennen. Die Zentrifuge wurde mit einer Geschwindigkeit gedreht, die ausreichte, um das lysierte RBZ-Kolloid in eine leichte Hb-Phase und eine schwere HB-Phase zu trennen. Die leichte Phase bestand aus Hb und enthielt auch Nichthämoglobinbestandteile mit einer Dicht, die ungefähr der Dichte von Hb entsprach oder geringer war.

[0118] Die Hb-Phase wurde kontinuierlich durch ein Millipore-Pellicon Kassetten-Mikrofilter von 0,45 µm, Kat. # HVLP 000 C5 aus der Zentrifuge und zur Vorbereitung für die Hb-Reinigung in einen Zwischentank abgelassen. Zellstroma wurde dann mit dem Retentat aus dem Mikrofilter in den Zwischentank zurückgeführt. Während der Mikrofiltrierung wurde die Temperatur im Zwischentank bei 10°C oder weniger gehalten. Um die Effizienz zu erhöhen, war die Mikrofiltrierung abgeschlossen, wenn der Fluidruck am Mikrofiltereinlass von einem Anfangsdruck von ca. 10 psi auf ca. 25 psi gestiegen war. Das Hb-Mikrofiltrat wurde dann von dem Mikrofilter in den Mikrofilterfank überführt.

[0119] Daraufhin wurde das Hb-Mikrofiltrat durch ein Millipore-Ultrafilter von 100.000 Dalton, Kat. # CDUF 050 H1 gepumpt. Ein wesentlicher Anteil des Hb und Wassers, das in dem Hb-Mikrofiltrat enthalten war, permeierte durch das Ultrafilter von 100.000 Dalton hindurch unter Bildung eines Hb-Ultrafiltrats, während größere Zelltrümmer, wie beispielsweise Proteine mit einem Molekulargewicht von mehr als 100.000 Dalton, zurückgehalten und in den Mikrofiltrattank zurückgeführt wurden. Gleichzeitig wurde WFI kontinuierlich als Ersatz für Wasserverlust aus dem Ultrafiltrat dem Mikrofiltrat zugegeben. Im Allgemeinen umfassen Zelltrümmer alle ganzen und fragmentierten Zellbestandteile, mit Ausnahme von Hb, kleineren Zellproteinen, Elektrolyten, Coenzymen und organischen Stoffwechselzwischenprodukten.

[0120] Die Ultrafiltrierung wurde fortgesetzt, bis die Hb-Konzentration im Mikrofiltrattank weniger als 8 Gramm/Liter (g/l) betrug. Während des Ultrafiltrierens des Hb wurde die Innentemperatur des Mikrofiltrattanks bei ca. 10°C gehalten.

[0121] Das Hb-Ultrafiltrat wurde in einen Ultrafiltrattank überführt, in dem das Hb-Ultrafiltrat daraufhin durch ein Millipore-Ultrafilter von 30.000 Dalton, Kat. # CDUF 051 T1, rezirkuliert wurde, um kleinere Zellbestandteile wie Elektrolyte, Coenzyme, Stoffwechselzwischenprodukte und Proteine eines Molekulargewichts von weniger als ca. 30.000 Dalton und Wasser aus dem Hb-Ultrafiltrat unter Bildung einer konzentrierten, ca. 100 g Hb/l enthaltenden Hb-Lösung zu entfernen.

[0122] Die konzentrierte Hb-Lösung wurde dann aus dem Ultrafiltrattank auf das in den parallelen chromatographischen Säulen (2 Fuß lang mit einem Innendurchmesser von 8 Zoll) enthaltene Medium zugeführt, um das Hb durch Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie abzutrennen. Die chromatographischen Säulen enthielten ein Anionenaustauschmedium, das zum Trennen von Hb von Nichthämoglobinproteinen geeignet ist. Das Anionenaustauschmedium war aus Kieselgel gebildet. Das Kieselgel wurde γ -Glycidoxypropylsilan ausgesetzt, um aktive Epoxidgruppen zu bilden, und dann $C_3H_7(CH_3)NCl$ ausgesetzt, um ein quartäres Ammoniumanionen-Austauschmedium zu bilden. Diese Verfahren des Behandelns von Kieselgel sind in Journal of Chromatography, 120: 321–333 (1976) beschrieben.

[0123] Jede Säule wurde durch Ausspülen der chromatographischen Säulen mit einem ersten Puffer vorbehandelt, der das Hb-Binden erleichtert. Dann wurden 4,52 Liter konzentrierte Hb-Lösung in jede chromatographische Säule injiziert. Nach der Injektion der konzentrierten Hb-Lösung wurden die chromatographischen Säulen durch aufeinanderfolgendes Durchleiten von drei verschiedenen Puffern durch die chromatographi-

schen Säulen gewaschen, um ein Hb-Eluat herzustellen, indem ein pH-Gradient innerhalb der Säulen hergestellt wird. Die Temperatur jedes Puffers betrug während der Anwendung ca. 12,4°C. Die Puffer wurden vor der Injektion in die chromatographischen Säulen durch eine Ultrafiltrationsmembran von 10.000 Dalton vorfiltriert.

[0124] Der erste Puffer, nämlich 20 mM Trishydroxymethylaminomethan (Tris)) pH-Wert ca. 8,4 bis ca. 9,4) transportierte die konzentrierte Hb-Lösung in das Medium in den chromatographischen Säulen, um das Hb zu binden. Der zweite Puffer, eine Mischung des ersten Puffers und eines dritten Puffers, wobei der zweite Puffer einen pH-Wert von ca. 8,3 aufwies, stellte dann den pH-Wert innerhalb der chromatographischen Säulen ein, um kontaminierende Nichthämoglobinbestandteile aus den chromatographischen Säulen zu eluieren, während das Hb zurückgehalten wurde. Die Äquilibrierung mit dem zweiten Puffer wurde ca. 30 Minuten lang bei einer Strömungsgeschwindigkeit von ca. 3,56 lpm pro Säule fortgesetzt. Das Eluat aus dem zweiten Puffer wurde als Abfallstoff abgelassen. Der dritte Puffer, 50 mM Tris (pH-Wert ca. 6,5 bis 7,5) eluierte dann das Hb aus der chromatographischen Säule.

[0125] Das Hb-Eluat wurde dann durch ein steriles Sartobran-Filter von 0,22 µm, Kat. # 5232507 G1 PH, geleitet, in dem das Hb-Eluat aufgefangen wurde. Die ersten 3 bis 4% des Hb-Eluats und die letzten 3 bis 4% des Hb-Eluats wurden als Abfallstoffe abgelassen.

[0126] Das Hb-Eluat wurde weiter verwendet, wenn das Eluat weniger als 0,05 EI/ml Endotoxin und weniger als 3,3 mMol/ml Phospholipide enthielt. Sechzig Litern ultrareinem Eluat, das eine Konzentration von 100 g Hb/l aufwies, wurden 9 l von 1,0 M NaCl, 20 mM Tris-Puffer (pH-Wert 8,9) unter Bildung einer Hb-Lösung mit einer Ionenstärke von 160 mM zum Reduzieren der Sauerstoffaffinität des Hb in der Hb-Lösung zugegeben. Die Hb-Lösung wurde dann bei 10°C durch Rezirkulieren durch das Ultrafilter, spezifisch ein Millipore-Heliconfilter von 10.000 Dalton, Kat. # CDUF050G1 konzentriert, bis die Hb-Konzentration 110 g/l betrug.

[0127] Die Hb-Lösung wurde dann deoxygeniert, bis der pO_2 der Hb-Lösung auf das Niveau reduziert war, bei dem der HbO_2 -Gehalt ca. 10% betrug, indem die Hb-Lösung mit 12 lpm durch eine Polypropylenmikrofilter-Phasenübertragungsmembran von Hoechst-Celanese Corporation von 0,05 µm, Kat. # G-240/40, rezirkuliert wurde, um eine deoxygenierte Hb-Lösung (im Folgenden ‚Deoxy-Hb‘ genannt) zu bilden. Gleichzeitig wurde ein Strom Stickstoffgas von 60 lpm durch die Gegenseite der Phasenübertragungsmembran geleitet. Während der Deoxygenierung wurde die Temperatur der Hb-Lösung zwischen ca. 19°C und ca. 31°C gehalten.

[0128] Auch wurde das Hb während der Deoxygenierung und daraufhin während des gesamten Vorgangs in einem Umfeld von geringem Sauerstoffgehalt gehalten, um die Sauerstoffabsorption durch das Hb zu minimieren und einen oxygenierten Hb-Gehalt (Oxyhämoglobin- oder HbO_2 -Gehalt) von weniger als ca. 10% in dem Deoxy-Hb beizubehalten.

[0129] Das Deoxy-Hb, (60 Liter) wurde dann durch ein Ultrafilter mit 180 l eines Lagerpuffers, der 0,2 Gew.-% N-Acetylcystein, 33 mM Natriumphosphatpuffer (pH-Wert 7,8) mit einem pO_2 von weniger als 50 Torr enthielt, unter Bildung eines gegen Oxidation stabilisierten Deoxy-Hb diafiltriert. Vor dem Mischen mit dem Deoxy-Hb wurde der Lagerpuffer mit einem Millipore Helicon-Depyrogenationsfilter von 10.000 Dalton, Kat. # CDUF050G1 depyrogeniert.

[0130] Der Lagerpuffer wurde kontinuierlich mit einer Geschwindigkeit zugegeben, die dem Fluidverlust durch das Ultrafilter ungefähr entsprach. Die Diafiltrierung wurde fortgesetzt, bis das Volumen an Fluidverlusts durch Diafiltrierung durch das Ultrafiltrat ungefähr dreimal dem ursprünglichen Volumen des Deoxy-Hb entsprach.

[0131] Vor dem Überfragen des gegen Oxidation stabilisierten Deoxy-Hb in einen Polymerisationsapparat wurde an Sauerstoff erschöpftes WFI dem Polymerisationsreaktor zugegeben, um den Polymerisationsapparat von Sauerstoff zu reinigen, um die Oxygenierung von gegen Oxidation stabilisiertem Deoxy-Hb zu verhindern. Die Menge an WFI, die dem Polymerisationsapparat zugegeben wurde, war die Menge, die zu einer Hb-Lösung mit einer Konzentration von ca. 40 g Hb/l führen würde, wenn das gegen Oxidation stabilisierte Deoxy-Hb dem Polymerisationsreaktor zugegeben würde. Das WFI wurde dann durch den gesamten Polymerisationsapparat rezirkuliert, um das WFI durch Strömen durch eine Polypropylenmikrofilter-Phasenübertragungsmembran von 0,05 µm (Hoechst-Celanese Corporation, Kat. # 5PCM-108, 80 Quadratfuß) gegen einen Gegenstrom von unter Druck stehendem Stickstoff zu deoxygenieren. Die Strömungsgeschwindigkeiten von WFI und Stickstoffgas durch die Phasenübertragungsmembran betragen jeweils ca. 18 bis 20 lpm bzw. 40 bis 60 lpm.

[0132] Nachdem der pO_2 des WFI im Polymerisationsapparat auf weniger als ca. 2 Torr pO_2 reduziert worden war, wurde der Polymerisationsreaktor durch eine Strömung von ca. 20 lpm Stickstoff in den Kopfraum des Po-

lymerisationsreaktors mit Stickstoff abgedeckt. Das gegen Oxidation stabilisierte Deoxy-Hb wurde dann in den Polymerisationsreaktor überführt.

[0133] Die Polymerisation wurde in einem 12 mM Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,8, der eine Chloridkonzentration von weniger als ca. 35 mMol aufwies, durchgeführt.

[0134] Das gegen Oxidation stabilisierte Deoxy-Hb und N-Acetylcystein wurden daraufhin langsam mit dem Vernetzungsmittel Glutaraldehyd, spezifisch 29,4 Gramm Glutaraldehyd pro Kilogramm Hb, über eine Fünf-stundenperiode gemischt, während des Erhitzens bei 40°C und Rezirkulierens der Hb-Lösung durch eine Ken-nics-Statikmischvorrichtung von 11/Zoll mit 6 Elementen (Chemineer, Inc.) unter Bildung einer polymerisierten Hb(poly(Hb))-Lösung.

[0135] Das Rezirkulieren des gegen Oxidation stabilisiertes Deoxy-Hb und des Glutaraldehyds durch die Sta-tikmischvorrichtung verursachte turbulente Strömungsbedingungen bei einem im Allgemeinen gleichförmigen Mischen des Glutaraldehyds mit dem gegen Oxidation stabilisierten Deoxy-Hb, wobei das Potential für die Bil-dung von Ansammlungen von Deoxy-Hb, die hohe Konzentrationen an Glutaraldehyd enthalten, reduziert wurde. Im Allgemeinen reduzierte das gleichförmige Mischen von Glutaraldehyd und Deoxy-Hb die Bildung von hochmolekularem Poly(Hb) (das ein Molekulargewicht von mehr als 500.000 Dalton aufweist) und erlaubte ein schnelleres Mischen des Glutaraldehyds und Deoxy-Hb während der Polymerisation.

[0136] Außerdem erfolgte ein signifikantes intramolekulares Vernetzen von Hb während der Hb-Polymerisa-tion als Auswirkung des Vorliegens von N-Acetylcystein auf die Polymerisation von Hb.

[0137] Nach der Polymerisation wurde die Temperatur der Poly(Hb)-Lösung im Polymerisationsreaktor auf eine Temperatur zwischen ca. 15°C und ca. 25°C reduziert.

[0138] Die Poly(Hb)-Lösung wurde dann durch Rezirkulieren der Poly(Hb)-Lösung durch das Ultrafilter kon-zentriert, bis die Konzentration des Poly(Hb) auf ca. 85 g/l gestiegen war. Ein geeignetes Filter ist ein Filter von 30.000 Dalton (z. B. Millipore Helicon, Kat. # CDFU050LT).

[0139] Daraufhin wurde die Poly(Hb)-Lösung mit 66,75 g Natriumborhydrid gemischt und wiederum durch die Statikmischvorrichtung rezirkuliert. Je neun Liter Poly(Hb)-Lösung wurde spezifisch ein Liter 0,25 M Natrium-borhydridlösung mit einer Geschwindigkeit von 0,1 bis 0,12 lpm zugegeben.

[0140] Vor der Zugabe des Natriumborhydrids zur Poly(Hb)-Lösung wurde der pH-Wert der Poly(Hb)-Lösung durch Einstellen des pH-Wert auf ca. 10 alkalisch eingestellt, um das Natriumborhydrid zu konservieren und die Wasserstoffgasbildung zu verhindern. Der pH-Wert der Poly(Hb)-Lösung wurde durch Diafiltrieren der Po-ly(Hb)-Lösung mit ca. 215 l depyrogeniertem, deoxygeniertem 12 mM Natriumboratpuffer eingestellt, der einen pH-Wert von ca. 10,4 bis 10,6 aufwies. Die Poly(Hb)-Lösung wurde durch Rezirkulieren der Poly(Hb)-Lösung aus dem Polymerisationsreaktor durch das Ultrafilter von 30 kD diafiltriert. Der Natriumboratpuffer wurde der Poly(Hb)-Lösung mit einer Geschwindigkeit zugegeben, die der Geschwindigkeit des Fluidverlusts durch das Ultrafilter durch die Diafiltrierung ungefähr entsprach. Die Diafiltrierung wurde fortgesetzt, bis das Volumen des Fluidverlusts durch das Ultrafilter durch die Diafiltrierung ungefähr dreimal so hoch war wie das Anfangsvolu-men der Poly(Hb)-Lösung im Polymerisationsreaktor.

[0141] Auf das Einstellen des pH-Werts hin wurde Natriumborhydridlösung dem Polymerisationsreaktor zu-gesetzt, um Bindungen in der Poly(Hb)-Lösung zu reduzieren und ein beständiges Poly(Hb) in Lösung zu bin-den und zubilden. Während der Natriumborhydridzugabe wurde die Poly(Hb)-Lösung im Polymerisationsreak-tor kontinuierlich durch die Statikmischvorrichtung und die Polypropylenmikrofilter-Phasenübertragungsmem-bran rezirkuliert, um gelösten Sauerstoff und Wasserstoff zu entfernen. Die Strömung durch eine Statikmisch-vorrichtung erzeugte auch turbulente Natriumborhydridströmungsbedingungen, durch die Natriumborhydrid schnell und wirksam mit der Poly(Hb)-Lösung gemischt wurde. Die Strömungsgeschwindigkeiten der Po-ly(Hb)-Lösung und des Stickstoffgases durch die Gasphasenübertragungsmembran von 0,05 µm betragen je-weils ca. 2,0 bis 4,0 lpm bzw. 12 bis 18 lpm. Nach Abschluss der Natriumborhydridzugabe wurde die Reduktion im Polymerisationsreaktor fortgesetzt, während ein darin enthaltener Rührer sich mit ca. 75 Umdrehungen pro Minute drehte.

[0142] Ungefähr eine Stunde nach der Natriumborhydridzugabe wurde die beständige Poly(Hb)-Lösung aus dem Polymerisationsreaktor durch das Ultrafilter von 30.000 Dalton rezirkuliert, bis die Konzentration der be-ständigen Poly(Hb)-Lösung 110 g/l betrug. Auf das Konzentrieren hin wurden der pH-Wert und die Elektrolyte

der beständigen Poly(Hb)-Lösung zur Bildung eines beständigen, polymerisierten Hb-Blutersatzmittels auf physiologische Niveaus zurückgebracht durch Diafiltrieren der beständigen Poly(Hb)-Lösung durch das Ultrafilter von 30.000 Dalton mit einem filtrierten, deoxygenierten Puffer von niedrigem pH-Wert, der 27 mM Natriumlactat, 12 mM NAC, 15 mM NaCl, 4 mM KCl und 1,36 mM CaCl₂ in WFI (pH-Wert 5,0) enthielt. Die Diafiltrierung wurde fortgesetzt, bis das Volumen des Fluidverlusts durch Diafiltrierung durch das Ultrafilter ungefähr 6mal so hoch war wie das Volumen des konzentrierten Hb-Produkts vor der Diafiltrierung.

[0143] Nachdem der pH-Wert und die Elektrolyte wieder auf physiologische Niveaus gebracht worden waren, wurde das beständige polymerisierte Hb-Blutersatzmittel auf eine Konzentration von 5,0 g/dl durch Zugeben des filtrierten, deoxygenierten Puffers von niedrigerem pH-Wert zum Polymerisationsreaktor verdünnt. Das verdünnte Blutersatzmittel wurde dann durch Rezirkulieren aus dem Polymerisationsreaktor durch die Statikmischvorrichtung und ein Reinigungsfilter von 100.000 Dalton gegen einen filtrierten deoxygenierten Puffer, der 27 mM Natriumlactat, 12 mM NAC, 15 mM NaCl, 4 mM KCl und 1,36 mM CaCl₂ in WFI (pH-Wert 7,8) enthielt, diafiltriert. Die Diafiltrierung wurde fortgesetzt, bis das Blutersatzmittel weniger als oder gleich ca. 10% modifizierte tetramere und unmodifizierte tetramere Spezies, durch GPC bestimmt, enthielt, wenn diese unter Dissoziationsbedingungen durchgeführt wurde.

[0144] Das Reinigungsfilter wurde unter Bedingungen eines geringen Membrandrucks mit einer beschränkten Permeatlinie betrieben. Auf die Entfernung wesentlicher Mengen von modifiziertem tetramerem Hb und unmodifiziertem tetramerem Hb hin wurde die Rezirkulation des Blutersatzmittels durch das Ultrafilter von 30.000 Dalton fortgesetzt, bis die Konzentration des Blutersatzmittels ca. 130 g/l betrug.

[0145] Das beständige Blutersatzmittel wurde dann in einem geeigneten Behälter mit einem Umfeld von niedrigem Sauerstoffgehalt und einem geringen Eindringen von Sauerstoff gelagert.

Beispiel 2

Lagerung von Hämoglobin-Blutersatzmittel: Folienumwicklung

[0146] Das Hämoglobin-Blutersatzmittel, wie in Beispiel 1 hergestellt, in einer Stericon-Packung von 600 ml verpackt, wurde mit einer Folienlaminatverpackung (KAPAK 50303, im Folgenden als ‚Folie‘ bezeichnet), Cryovac BYV 200- oder Cryovac P640B-Packung umwickelt. KAPAK 50303 ist ein Folienlaminatbehälter, in dem die Folienschicht Aluminiumfolie ist. Cryovac BYV200 ist ein Laminat, das eine 0,0006 Zoll (oder 0,015 Millimeter) dicke, doppelseitige, mit Saran beschichtete Polyvinylalkoholschicht enthält. Die Sauerstoffdurchlässigkeit dieser beiden Lamine beträgt weniger als 0,02 cm³ pro 100 Quadratzoll (oder 0,02 cm³ pro 645 Quadratcentimeter) pro 24 Std. pro Atmosphäre bei 72°F (oder 22°C) und einer Feuchte von 0%. Cryovac P640B ist ein Laminatmaterial, das eine 0,0006 Zoll (oder 0,015 Millimeter) dicke, mit Saran beschichtete, biaxial orientierte Nylonschicht, eine Klebstoff- und eine Schicht Abdichtmittel aus linearem Polyethylen niedriger Dichte umfasst. Die Sauerstoffdurchlässigkeit des Materials beträgt ca. 8 bis 15 cm³ pro 100 Quadratzoll (oder ca. 8 bis 15 cm³ pro 645 Quadratcentimeter) pro 24 Std. pro Atmosphäre bei 72°F (oder 22°C) und einer Feuchte von 0%. Die verpackten Blutersatzmittel wurden ca. 418 Tage lang bei Raumtemperatur gehalten, wobei in regelmäßigen Abständen eine Probebestimmung der Konzentration und/oder Niveaus des N-Acetyl-L-cysteins (NAC), Bis-N-acetyl-L-cysteins (NAC₂), gesamten Hb (GHb), oxygenierten Hämoglobins (HbO₂) und Methämoglobins (methHb) stattfand. Die Ergebnisse sind in Tabelle II aufgeführt.

Tabelle II

Daten bezüglich der Beständigkeit der Umwicklungen

Tag	Umwicklung	NAC (%)	NAC ₂ (%)	GHb (g/dl)	HbO ₂ (%)	metHB (%)
0	Folie	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	Folie	0,1688	0,0155	11,3	3,3	-0,3
43	BYV200	0,1509	0,0365	11,1	2,7	0,3
43	P640B	0,0507	0,1927	11,2	5,6	6,2
117	Folie	0,1721	0,0136	11,7	2,6	0,0
117	BYV200	0,1433	0,0238	11,9	3,0	0,1
117	P640B	0,0022	0,2355	12,5	12,7	30,7
180	Folie	0,1818	0,0108	12,1	2,9	-0,1
180	BYV200	0,1674	0,0327	12,5	2,5	0,2
180	P640B	n.b.	0,2259	12,8	18,2	49,6
418	Folie	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

[0147] Der obige Versuch wurde im Wesentlichen wiederholt, wobei ein Hämoglobin-Blutersatzmittel mit einer Folienlaminatpackung (KAPAK 50303) umwickelt wurde. Die verpackten Blutersatzmittel wurden ca. 24 Monate lang bei Raumtemperatur gehalten, wobei in regelmäßigen Abständen eine Probebestimmung der Konzentration und/oder Niveaus des N-Acetyl-L-cysteins (NAC), Bis-N-acetyl-L-cysteins (NAC₂), gesamten Hb (GHb), oxygenierten Hämoglobins (HbO₂) und Methämoglobins (metHb) stattfand. Die Ergebnisse sind in Tabelle III aufgeführt.

Tabelle III

Daten bezüglich der Beständigkeit der Folienumwicklungen

Monat	NAC (%)	NAC ₂ (%)	GHb (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

Beispiel 3

Lagerung von Hämoglobin-Blutersatzmittel: primäre Packung

[0148] Das Hämoglobin-Blutersatzmittel, wie in Beispiel 1 hergestellt, wurde in einem primären Sauerstoffbarrierepackung (E-13135 und E13242, American National Can) verpackt. Die Konstruktion der primären Packung ist oben im Einzelnen besprochen worden. Die primäre Packung ist ein Laminatmaterial, das eine Polyethylenschicht mittlerer Dichte, eine Ethylenvinylalkohol-/Nylonschicht und eine Schicht Abdichtmittel aus linearem Polyethylen niedriger Dichte umfasst.

Beispiel 4

Lagerung von Hämoglobin-Blutersatzmittel: transparente Umwicklung

[0149] Das Hämoglobin-Blutersatzmittel, wie in Beispiel 1 hergestellt, in einer geeigneten primären Packung verpackt, wurde mit einer transparenten Laminatpackung, die aus Polyester (PET)/Siliciumdioxid (SiO₂)/Polyethylenlaminat (von Rollprint, Addison, IL hergestellt) und einem Metallfolienlaminat bestand, mit Hilfe der automatisierten Tiromat-Verpackungsmaschine umwickelt. Die Konstruktion der Behälter ist im Einzelnen oben besprochen. Die Sauerstoffdurchlässigkeit des Materials beträgt ca. 0,0005 cm³ pro 100 Quadratzoll (oder ca. 0,0005 cm³ pro 645 Quadratzentimeter) pro Atmosphäre pro Tag (25°C, 100%/50% RF). Die verpackten Blutersatzmittel wurden ca. 12 Monate lang bei 40°C und 100%/60% RF gehalten und die Konzentration und/oder Niveaus des N-Acetyl-L-cysteins (NAC), Bis-N-acetyl-L-cysteins (NAC₂), gesamten Hb (THb), oxygenierten Hämoglobins (HbO₂) und Methämoglobins (metHb) wurden gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle IV aufgeführt. Das Halten der Proben für 12 Monate bei erhöhter Temperatur von 40°C hatte die Wirkung einer Lagerung für 24 Monate bei 23°C.

Tabelle IV

Daten der beschleunigten Beständigkeit bei transparenten SiO_x-Umwicklungen

Monat	NAC (%)	NAC ₂ (%)	GHb (g/dl)	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

[0150] Der obige Lagerversuch wurde mit einem anderen transparenten Laminatmaterial wiederholt, das auf Polyester aufgebrachtes Siliciumdioxid umfasste und von Perfecseal (Philadelphia, PA) hergestellt worden war. Die Sauerstoffdurchlässigkeit des Materials beträgt ca. 0,01375 cm³ pro 100 Quadratzoll (oder ca. 0,01375 cm³ pro 645 Quadratzentimeter) pro Atmosphäre pro Tag (25°C, 100%/50% RF). Die Ergebnisse sind in Tabelle V aufgeführt.

Tabelle V

Daten der beschleunigten Beständigkeit bei transparenter SiO_x-Umwicklung II

Monat	NAC (%)	NAC ₂ (%)	GHb (g/dl)	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

Beispiel 5

Analyse des polymerisierten Hämoglobins

[0151] Die Endotoxinkonzentration im Hämoglobinprodukt wird durch das Verfahren 'Kinetische/turbidimetrische LAL 5000-Methodologie', das von Associates of Cape Cod, Woods Hole, Massachusetts, J. Levin et al., J. Lab. Clin. Med., 75: 903–911 (1970) entwickelt worden ist, bestimmt. Verschiedene Verfahren wurden zum Prüfen auf irgendwelche Spuren von Stroma, beispielsweise ein Ausfällungsassay, Immunblotten und enzymgekoppelter Immunsorbentassay (ELISA) auf ein spezifisches Zellmembranprotein oder Glykolipid hin, wie es den mit dem Stand der Technik vertrauten Fachleuten bekannt ist, angewendet.

[0152] Das Zählen der teilchenförmigen Substanzen erfolgte durch das Verfahren 'Teilchenförmige Substanzen in Injektionen: Injektionen großer Volumen bei Eindoseninfusionen', US-Arzneibuch., 22: 1596, 1990.

[0153] Um die Glutaraldehydkonzentration zu bestimmen, wurde eine repräsentative Probe von 400 µl des Hämoglobinprodukts mit Dinitrophenylhydrazin derivatisiert und dann wurde ein Aliquot von 100 µl der Derivatlösung in eine YMC AQ-303 ODS-Säule bei 27°C mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/min zusammen mit einem Gradienten injiziert. Der Gradient bestand aus zwei mobilen Phasen, 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) in Wasser und 0,08% TFA in Acetonitril. Die Gradientenströmung bestand aus konstanten 60% 0,08%igem TFA in Acetonitril für 6,0 Minuten, einem linearen Gradienten bis zu 85% 0,08% TFA in Acetonitril über 12 Minuten, einem

linearen Gradienten bis zu 100% 0,08% TFA in Acetonitril über 4 Minuten Haltezeit bei 100% 0,08 TFA in Acetonitril für 2 Minuten und Reäquilibrieren bei 45% 0,1% TFA in Wasser. Die Ultravioletterfassung wurde bei 360 nm gemessen.

[0154] Um die NAC-Konzentration zu bestimmen, wurde ein Aliquot Hämoglobinprodukt 1:100 mit entgastem Natriumphosphat in Wasser verdünnt und 50 µl wurden in eine YMC AQ-303 ODS-Säule mit einem Gradienten injiziert. Die Gradientenpuffer bestanden aus einer Lösung von Natriumphosphat in Wasser und einer Mischung von 80% Acetonitril in Wasser mit 0,05% TFA. Die Gradientenströmung bestand aus 100% Natriumphosphat in Wasser für 15 Minuten, dann einem linearen Gradienten bis zur 100%igen Mischung von 80% Acetonitril und 0,05% TFA über 5 Minuten bei einer Haltezeit von 5 Minuten. Das System wurde bei 100% Natriumphosphat 20 Minuten reäquilibriert.

[0155] Die Phospholipidanalyse erfolge durch ein Verfahren auf der Basis von Vorgehensweisen, die in den folgenden beiden Veröffentlichungen enthalten waren: Kolarovic et al., 'Ein Vergleich der Extraktionsverfahren bei der Isolierung von Phospholipiden aus biologischen Quellen', Anal. Biochem., 156: 244–250, 1986 und Duck-Chong, C. G., 'Eine schnelle empfindliche Methode für das Bestimmen von Phospholipidphosphor unter Anwendung des Aufschlusses mit Magnesiumnitrat', Lipids, 14: 492–497, 1979.

[0156] Die Osmolarität wurde durch Analyse auf einem Advanced Cryomatic Osmometer (fortschrittlichen cryomatischen Osmometer), Modell #3C2, Advanced Instruments, Inc., Needham, Massachusetts, bestimmt.

[0157] Die Gesamtkonzentrationen an Hämoglobin, Methämoglobin und Oxyhämoglobin wurden auf einem Co-Oximeter, Modell #482, von Instrumentation Laboratory, Lexington, Massachusetts bestimmt.

[0158] Die Konzentrationen von Na⁺, K⁺, Cl⁻, Ca⁺⁺, pO₂ wurden durch ein Novastat Profil 4, NovaBiomedical Corporation, Waltham, Massachusetts bestimmt.

[0159] Die Sauerstoffbindungskonstante P₅₀ wurde durch einen Hemox-Analysator, TCS Corporation, Southampton, Pennsylvania, bestimmt.

[0160] Die Temperatur und der pH-Wert wurden durch Standardverfahren, die den mit dem Stand der Technik vertrauten Fachleuten bekannt sind, bestimmt.

[0161] Das Molekulargewicht (M. W.) wurde durch Ausführen von Gelpermeationschromatographie (GPC) an den Hämoglobinprodukten unter Dissoziationsbedingungen bestimmt. Eine repräsentative Probe des Hämoglobinprodukts wurde auf die Molekulargewichtsverteilung hin analysiert. Das Hämoglobinprodukt wurde auf 4 mg/ml innerhalb einer mobilen Phase von 50 mM Bis-Tris (pH-Wert 6,5), 750 mM MgCl₂ und 0,1 mM EDTA verdünnt. Die Puffer dienten zum Dissoziieren von Hb-Tetramer in Dimere, die nicht zu anderen Hb-Dimeren durch intramolekulare oder intermolekulare Vernetzungen vernetzt worden sind, von dem Poly(Hb)-Lösung. Die verdünnte Probe wurde in eine TosoHaas G3000SW-Säule injiziert. Die Strömungsgeschwindigkeit betrug 0,5 ml/min und die Ultravioletterfassung wurde bei 280 aufgezeichnet.

[0162] Die Ergebnisse der obigen Tests an veterinären (OXYGLOBIN^{wz}) und menschlichem Hb-Blutersatzmitteln, die dem erfindungsgemäßen Verfahren gemäß gebildet worden waren, sind jeweils in den Tabellen VI und VII zusammengefasst.

Tabelle VI

PARAMETER	ERGEBNISSE
pH-Wert (18 – 22 °C)	Physiologisch akzeptabler pH-Wert
Endotoxin	<0,5 EI/ml
Sterilitätstest	Entspricht den Erwartungen
Phospholipide ^a	<3,3 nm/ml
Gesamtes Hämoglobin	12,0 – 14,0 g/dl
Methämoglobin	<15 %
Oxyhämoglobin	<10 %
Natrium, Na ⁺	145 – 160 mM
Kalium K ⁺	3,5 – 5,5 mM
Chlorid, Cl ⁻	105 – 120 mM
Calcium, Ca ⁺⁺	0,5 – 1,5 mM
Bor	<10 ppm
Osmolarität	290 – 310 mOsm
Glutaraldehyd	<3,5 µg/ml
N-Acetyl-L-cystein	<0,2 %
M.W. > 500.000	<15 %
Unmodifiziertes Tetramer	<5 %
Gehalt teilchenförmiger Substanz >10 µm	<12/ml
Gehalt teilchenförmiger Substanz >25 µm	<2/ml

a in Hb vor der Polymerisation gemessen

Tabelle VII

PARAMETER	ERGEBNISSE
pH-Wert (18 – 22 °C)	Physiologisch akzeptabler pH-Wert
Endotoxin	<0,5 EI/ml
Sterilitätstest	Entspricht den Erwartungen
Phospholipide ^a	<3,3 nm/ml
Gesamtes Hämoglobin	12,0 – 14,0 g/dl
Methämoglobin	<15 %
Oxyhämoglobin	<10 %,
Natrium, Na ⁺	145 – 160 mM
Kalium K ⁺	3,5 – 5,5 mM
Chlorid, Cl ⁻	105 – 120 mM
Calcium, Ca ⁺⁺	0,5 – 1,5 mM
Bor	<10 ppm
Osmolarität	290 – 310 mOsm
Glutaraldehyd	<3,5 µg/ml
N-Acetyl-L-cystein	≤0,2 %
M.W. > 500.000	≤15 %0
M.W. ≤ 65.000	<10 %
M.W. < 32.000	<5 %
Gehalt teilchenförmiger Substanz >10 µm	<12/ml
Gehalt teilchenförmiger Substanz >25 µm	<2/ml

a in Hb vor der Polymerisation gemessen

[0163] Diejenigen, die mit dem Stand der Technik vertraut sind, werden sich über viele Äquivalente der spezifischen Ausführungsformen der hier beschriebenen Erfindung im Klaren sein oder diese unter Anwendung von nicht mehr als Routineversuchen feststellen können. Diese und alle anderen derartigen Äquivalente sollen durch die folgenden Ansprüche umfasst werden.

Patentansprüche

1. Verfahren für das Konservieren eines deoxygenierten Hämoglobin-Blutersatzmittels, umfassend das Halten eines deoxygenierten Hämoglobin-Blutersatzmittels, das in einer primären Packung enthalten ist; wobei das Verfahren gekennzeichnet ist durch: eine Sauerstoffbarriere-Folienumhüllung, die ein transparentes Laminatmaterial und ein Folienlaminatmaterial umfasst, die zusammen eine Kammer bilden, wobei das transparente Laminatmaterial eine Siliciumoxidschicht umfasst und wobei die primäre Packung und das darin enthaltene Blutersatzmittel innerhalb der Kammer zwischen dem Folienlaminatmaterial und dem transparenten Laminatmaterial der Sauerstoffbarriere-Folienumhüllung eingeschlossen sind.

2. Konserviertes deoxygeniertes Hämoglobin-Blutersatzmittel, umfassend:
ein deoxygeniertes Hämoglobin-Blutersatzmittel, das innerhalb einer primären Packung enthalten ist; und gekennzeichnet durch:
eine Sauerstoffbarriere-Folienumhüllungspackung, die ein transparentes Laminatmaterial und ein Folienlaminatmaterial umfasst, die zusammen eine Kammer bilden, wobei das transparente Laminatmaterial eine Siliciumdioxidschicht umfasst und wobei die primäre Packung und das darin enthaltene Blutersatzmittel innerhalb der Kammer zwischen dem Folienlaminatmaterial und dem transparenten Laminatmaterial eingeschlossen sind, wodurch das deoxygenierte Hämoglobin-Blutersatzmittel in einer Umgebung konserviert wird, die im Wesentlichen sauerstofffrei ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder konserviertes deoxygeniertes Hämoglobin-Blutersatzmittel nach Anspruch 2, wobei das transparente Laminatmaterial des Weiteren eine Polyesterschicht umfasst.
4. Verfahren oder konserviertes deoxygeniertes Hämoglobin-Blutersatzmittel nach Anspruch 3, wobei das transparente Laminatmaterial des Weiteren eine Schicht lineares Polymer niedriger Dichte umfasst.
5. Verfahren oder konserviertes deoxygeniertes Hämoglobin-Blutersatzmittel nach Anspruch 4, wobei die Schicht lineares Polymer niedriger Dichte aus der Gruppe ausgewählt ist bestehend aus Polyethylen, Polypropylen und Copolymeren derselben.
6. Verfahren oder konserviertes deoxygeniertes Hämoglobin-Blutersatzmittel nach Anspruch 5, wobei die Schicht lineares Polymer ein lineares Polyethylen niedriger Dichte ist.
7. Verfahren oder konserviertes deoxygeniertes Hämoglobin-Blutersatzmittel nach Anspruch 6, wobei das transparente Laminatmaterial und das Folienlaminatmaterial kontinuierlich an einem Umfang der Sauerstoffbarriere-Folienumhüllung verbunden sind.
8. Verfahren oder konserviertes deoxygeniertes Hämoglobin-Blutersatzmittel nach Anspruch 7, wobei die Sauerstoffbarriere-Folienumhüllung eine Sauerstoffdurchlässigkeit von weniger als ca. $0,01 \text{ cm}^3$ pro 645 cm^2 über 24 Stunden bei einer Atmosphäre mit 23°C aufweist.
9. Verfahren oder konserviertes deoxygeniertes Hämoglobin-Blutersatzmittel nach Anspruch 8, wobei die Sauerstoffbarriere-Folienumhüllung eine Sauerstoffdurchlässigkeit von weniger als ca. $0,0005 \text{ cm}^3$ pro 645 cm^2 über 24 Stunden bei einer Atmosphäre mit 25°C aufweist.
10. Verfahren oder konserviertes deoxygeniertes Hämoglobin-Blutersatzmittel nach Anspruch 9, wobei die Siliciumoxidschicht eine Dicke im Bereich zwischen ca. 100 \AA und ca. 2000 \AA aufweist und wobei die Polyethylenschicht wahlweise eine Dicke zwischen ca. $0,013$ und ca. $0,254$ Millimetern aufweist, wobei die Polyethylenschicht, in welchem Falle, noch weiter wahlweise eine Dicke von ca. $0,0508$ Millimetern aufweist, wobei die Sauerstoffdurchlässigkeit der Sauerstoffbarriere-Folienumhüllung, in welchem Falle, noch weiter wahlweise weniger als ca. $0,0005 \text{ cm}^3$ pro 645 cm^2 über 24 Stunden bei einer Atmosphäre von 25°C und einer relativen Innen-/Außenfeuchte von $100\%/50\%$ beträgt, wobei das transparente Laminatmaterial, in welchem Falle, noch weiter wahlweise eine Sauerstoffdurchlässigkeit von ca. $0,0005 \text{ cm}^3$ pro 645 cm^2 pro Tag bei 25°C und einer relativen Innen-/Außenfeuchte von $100\%/50\%$ aufweist, wobei das Hämoglobin-Blutersatzmittel, in welchem Falle, noch weiter wahlweise unter einer Stickstoff-, Argon- oder Heliumatmosphäre gehalten wird.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen