

# Hämoglobin-Hyperpolymere, künstliche Sauerstoffträger eines neuen Typs – Konzept und aktueller Stand der Entwicklung

W. K. R. Barnikol  
H. Pötzschke

## *Haemoglobin Hyperpolymers, a New Type of Artificial Oxygen Carrier – The Concept and Current State of Development*

### Zusammenfassung

Künstliche Sauerstoffträger werden klinisch benötigt, wenn ein Patient in einen geweblichen Sauerstoffmangel gerät, den er nicht kompensieren kann. Es sind zwei Fälle zu unterscheiden: (1) Der starke Blutverlust (z.B. nach Unfall) und (2) die Minderperfusion (z.B. bei Arteriosklerose oder Herzinfarkt) oder die Anämie, beide ohne Blutverluste. Im ersten Fall wird ein isotonischer Sauerstoff transportierender Plasma-Expander gebraucht, im zweiten ein (hyponkotisches) so genanntes Blut-Additiv. Der zweite Fall stellt den größeren Indikationsbereich.

Gewisse Experimente haben gezeigt, dass gelöstes Hämoglobin Sauerstoff schneller abgibt als Erythrozyten (wirksamer plasmatischer Transport) und dass es auch die Freisetzung des Sauerstoffs aus Erythrozyten erleichtert (Mediator-Wirkung).

Das Prinzip des Blut-Additivs findet sich in der Natur, bei niederen Tieren (z. B. beim Regenwurm) in Form riesiger, molekular proteinärer Sauerstoffträger. Nach diesem natürlichen Prinzip wurde das neue Sauerstoff transportierende Blut-Additiv (so genannte Hämoglobin-Hyperpolymere: HP<sub>3</sub>Hb) mit hoher Sauerstoff-Affinität (Halbsättigungsdruck  $p_{50} = 16$  Torr) und hoher Kooperativität ( $n_{50} = 2,1$ ) konzipiert und entwickelt.

Das bisher im kleinen technischen Maßstab (aseptisch unter GMP-ähnlichen Bedingungen) hergestellte Produkt besteht aus polymerisiertem und pegyliertem hochreinem Schweine-Hämoglobin ohne Monomere und ohne Oligomere, sein mittleres Molekulargewicht beträgt etwa 800 kDa. Es ist hinreichend Endotoxin-arm ( $< 0,029$  EU/mL), mit Blutplasma verträglich und erhöht bei einer Wirk-Konzentration von 3 g/dL im Blutplasma sowohl dessen onkotischen Druck als auch die Viskosität nur wenig. Das Produkt ist bis zu 2 Jahren lagerstabil und wird als Carbonyl-Derivat verabreicht. Die Halbwertszeit in wachen Ratten beträgt

### Abstract

In the clinical setting, artificial oxygen carriers are needed when a patient has a tissue oxygen deficiency which he/she can not automatically compensate. There are two quite different situations where this might occur: (1) Heavy blood loss (e.g., following an accident) and (2) insufficient perfusion (e.g., as a result of arteriosclerosis or myocardial infarction) or anaemia, both without blood loss. In the first instance, an iso-oncotic oxygen-transporting plasma expander is required, whereas in the second instance a (hypo-oncotic) so-called blood additive is needed. This second type of situation also presents the greater range of very important indications.

Experimental work has shown that, in comparison to erythrocytes, dissolved haemoglobin is able to release oxygen more rapidly (effective plasmatic transport), while at the same time also facilitating oxygen release from erythrocytes (mediator function).

Blood additives occur naturally in lower forms of life (e.g., earthworm) where they can be found in the form of giant oxygen-carrying molecules. Using these natural forms as a basis, new oxygen-transporting blood additives were designed and developed (so-called haemoglobin hyperpolymers: HP<sub>3</sub>Hb) which exhibit a strong oxygen affinity (half saturation partial pressure  $p_{50} = 16$  Torr) and high cooperativity ( $n_{50} = 2.1$ ).

One product has, up until now, been produced aseptically on a small technical scale and consists of highly purified, polymerised and pegylated porcine haemoglobin which is free of monomers and oligomers, with a mean molecular weight of approximately 800 kDa. It is sufficiently low in endotoxin ( $< 0,029$  EU/mL), blood plasma compatible, and – at an effective concentration of 3 g/dL in blood plasma – causes only minor increases in oncotic

#### Institutsangaben

Bereich Klinische Physiologie, Universität Witten/Herdecke

#### Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Dr. W. K. R. Barnikol · Bereich Klinische Physiologie · Private Universität Witten/Herdecke · 58448 Witten (Ruhr) · E-mail: barnikol@uni-wh.de

#### Bibliografie

Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther 2005; 40: 46–58

© Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York · DOI 10.1055/s-2004-825918 · ISSN 0939-2661

30 h. Es bewahrt Ratten im Ölsäure-induzierten Lungenschock vor dem Tod. Einzelne Selbstversuche Freiwilliger mit mehrfacher Anwendung ergaben keinen Einfluss auf Blutdruck und Herzfrequenz, keine Erhöhung der Transaminasen-Spiegel und keine Immunreaktionen; Letzteres auch nicht an ausgesucht sensiblen Mäusen.

Darüber hinaus ist das Blut-Additiv als künstlicher Sauerstoffträger universell, denn es kann, und zwar gemischt mit einem (herkömmlichen) Plasma-Expander, auch zur Therapie eines Sauerstoffmangels mit Blutverlust Verwendung finden.

### Stichwörter

Hämoglobin-Hyperpolymere · künstliche Sauerstoffträger · Blut-Additiv · Sauerstofftransport · Arzneimittelentwicklung · plasmatisch

pressure or viscosity. The product has a shelf-life of up to 2 years and is administered as a carbonyl derivative. Its half-life in the conscious rat is 30 h. This product was found to prevent death in rats where acute lung injury was induced using oleic acid. In human self-experiments this product was repeatedly administered: No effects on blood pressure and heart rate, no increase in blood transaminase concentration and no immunological reaction were seen; the latter was also not found in selected sensitive mice.

Furthermore, the blood additive is universally applicable as an oxygen transporter, since, when mixed with a conventional plasma expander, it can also be used to treat an oxygen deficiency occurring together with blood loss.

### Key words

Haemoglobin hyperpolymers · artificial oxygen carrier · blood additive · oxygen transport · drug development · plasmatic

### Einleitung

Seit vielen Jahren ist ein Bedarf für medizinische künstliche Sauerstoffträger erkannt, und es werden vielfältige Anstrengungen unternommen, die dafür notwendigen wissenschaftlichen Grundlagen zu erforschen sowie tragfähige Konzepte und schließlich klinisch verwendbare künstliche Sauerstoffträger herzustellen [1–3]. Die wichtigsten Entwicklungen künstlicher medizinischer Sauerstoffträger sind (Per-)Fluorokarbone, Hämosen (mit Hämoglobin-Lösungen gefüllte Liposomen) und molekular-dispers gelöste Hämoglobin-Derivate.

Dabei konzentrierten sich bislang die pharmazeutischen Entwicklungen auf künstliche Sauerstoffträger, die fehlendes (verloren gegangenes) Blut oder die heterologe Bluttransfusion zu dessen Therapie ersetzen (substituieren) können. Dies zeigt sich im früher überwiegend verwendeten Begriff „Blutersatz“ (englisch: *blood substitute*) für solche Zubereitungen. Der Sauerstoffmangel mit Blutverlust muss durch Substitution sowohl des fehlenden Blutvolumens (durch ein Plasma-Ersatzmittel) als auch der fehlenden Sauerstofftransportkapazität (durch einen künstlichen Sauerstoffträger) behandelt werden. Die Kombination beider Anforderungen ergibt ein Sauerstoff transportierendes Plasma-Ersatzmittel. Zwei Präparate dieser Art, und zwar im Plasma gelöste Hämoglobin-Derivate, sind national (in Russland und Südafrika) zur Vermarktung zugelassen, einige weitere befinden sich derzeit in der späten klinischen Entwicklung [1–3].

Darüber hinaus gibt es aber auch gewebliche Sauerstoffmängel ohne einen Blutverlust, die auf ganz verschiedenen pathophysiologischen Mechanismen beruhen können. Hierzu zählen insbesondere Minderperfusions durch Gefäßerkrankungen, Thrombosen oder Embolien, oder ein Kreislaufschock, Organschok-Zustände sowie (chronische) Anämien. Ein solcher Sauerstoffmangel ohne Blutverlust erfordert eine isolierte Bereitstellung einer zusätzlichen Sauerstofftransportkapazität im vorhandenen Blut. Dies vermag ein künstlicher Sauerstoffträger, der als ein „Blut-Additiv“ dem Blut zugemischt wird. Abb. 1 verdeutlicht beide klinischen Situationen schematisch anhand der Änderungen des Blutvolumens.

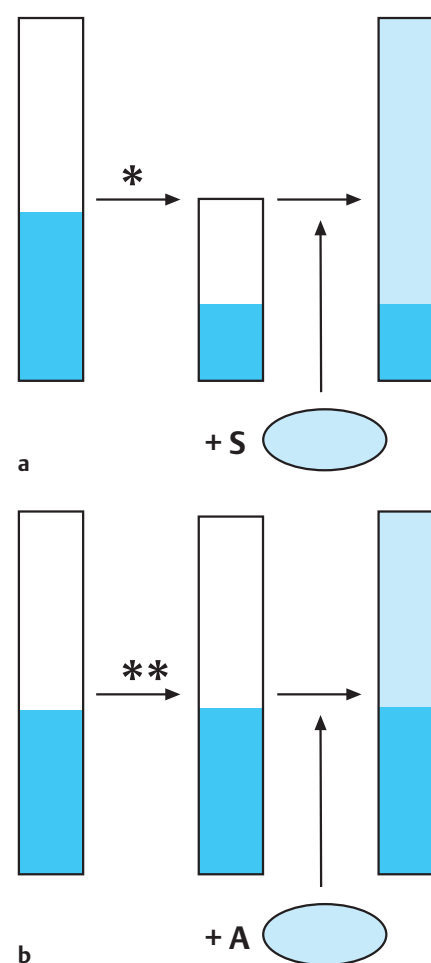


Abb. 1 Schematische Darstellung der Volumenveränderungen und der Therapie des Sauerstoffmangels mit einem im Blutplasma gelösten Sauerstoffträger (a) bei starkem Blutverlust (★) und (b) bei Sauerstoffmangel ohne Blutverlust (★★, z. B. Verminderung der Durchblutung). S: Sauerstoff transportierender Plasma-Expander („Blut-Substitut“), A: Sauerstoff transportierendes Blut-Additiv.

Von den notwendigen prinzipiellen konzeptuellen Unterschieden zwischen den genannten künstlichen Sauerstoffträgern sowie dem Stand der Entwicklung eines Blut-Additivs handelt dieser Aufsatz. Unseres Wissens gibt es bisher das Konzept eines Blut-Additivs nicht.

Beide Formen künstlicher Sauerstoffträger haben ihre eigenen Indikationen. Starke Blutverluste durch Unfälle und Unglücke (Naturkatastrophen), Gewalttaten oder Kriegseinwirkungen etc. erfordern (vorteilig) eine Therapie mit einem Sauerstoff transportierenden Plasma-Ersatzmittel.

„Andere“ gewebliche Sauerstoffmängel ohne Blutverlust, wie Lungenschock, Herzinfarkte, Schlaganfälle, Arterienverschlüsse, Nierenschock, Tinnitus-Erkrankungen, Hörstürze, Sehstörungen, Schwindel, Plazenta-Insuffizienzen und Anämien sowie prätherapeutische Tumoroxxygenierungen, benötigen für eine therapeutische Verbesserung der Sauerstoffversorgung ein Sauerstoff transportierendes Blut-Additiv. Unter diesen genannten Indikationen verbergen sich weit verbreitete Zivilisations-Erkrankungen. Qualitativ und quantitativ ist das Indikationsfeld des Sauerstoffmangels ohne Blutverlust bei weitem wichtiger und größer.

### Effizienz und Vorteile im Plasma gelöster künstlicher Sauerstoffträger auf Hämoglobin-Basis

Für jeden Sauerstoffträger – den natürlichen und einen künstlichen – kommt es darauf an, möglichst wirksam zu sein, dies heißt, möglichst unter allen Bedingungen ausreichend Sauerstoff aus der Alveolarluft aufnehmen und möglichst unter allen Bedingungen in ausreichender Weise Sauerstoff aus den Kapillaren an die Zellen abgeben zu können.

Dazu muss zunächst der Sauerstoff so schnell wie möglich aus den verschiedenen „Zubereitungen“ des Hämoglobins im Blut freigesetzt werden können. Als „Zubereitung“ kommen Erythrozyten, Liposomen gefüllt mit Hämoglobin („Hämosomen“) und freie Hämoglobin-Lösungen infrage. Die Geschwindigkeit der Freisetzung des Sauerstoffs kann in Schnell-Mischkammern gemessen werden. Solche Untersuchungen von Farmer et al. [4] zeigen, dass von den 0,2 µm kleinen Hämosomen die Entsättigung 11-mal und von frei gelöstem Hämoglobin 14-mal schneller erfolgt als von Erythrozyten. Die Dispersionsform des Hämoglobins ist also für die Effizienz der Sauerstoffabgabe von großer Bedeutung; das frei gelöste Hämoglobin gibt am schnellsten Sauerstoff ab.

Page et al. [5] haben die geometrischen Bedingungen des mikrozirkulatorischen Systems simuliert und die diffusive Sauerstoffabgabe in einer durchströmten künstlichen Kapillare photometrisch vermessen. Die Kapillare war in Silikon gegossen. Durch Überströmen des Silikonkörpers mit Stickstoff wurde der Sauerstoffgehalt des Silikons auf null gehalten, so dass das Material anstelle der Zellen als Sauerstoff-Senke dienen konnte. Experimentell ermittelt wurden Sauerstoff-Entlade-Kurven, d. h. die Abhängigkeit der Sauerstoffsättigung des Hämoglobins von der Verweildauer in der künstlichen Kapillare.

In allen vermessenen Flüssigkeiten war der Gehalt des angewendeten Rinderhämoglobins gleich, nämlich 10,2 g/dL. Das gelöste Hämoglobin gibt den Sauerstoff wesentlich schneller ab als Erythrozyten, mischt man beide Zubereitungen im Verhältnis 1 : 1, so wird der Sauerstoff genauso schnell freigesetzt wie im Falle reiner Hämoglobin-Lösung. Da die Abgabe bis unter 50% erfolgt, heißt dies, dass das gelöste Rinderhämoglobin als Mediator für

die Sauerstoffabgabe aus den Erythrozyten wirkt, und zwar genauso effektiv, als wäre das Erythrozytenhämoglobin frei gelöst. Dies ist eine sehr wichtige Erkenntnis; bedeutet sie doch, dass die Mediator-Wirkung des gelösten Hämoglobins extrem effektiv ist.

Mischt man frei gelöstes Hämoglobin und Erythrozyten im Verhältnis 1 : 9, dann erhöht sich immer noch die Geschwindigkeit der Sauerstoffabgabe erheblich. Damit besitzen im Plasma gelöste Hämoglobine bezüglich der Sauerstoffabgabe zwei günstige Eigenschaften, nämlich den effizienten plasmatischen Transport und die Mediator-Wirkung.

Neben ihrer Effizienz besitzen im Blutplasma gelöste künstliche Sauerstoffträger eine Anzahl weiterer Vorteile, nämlich lange Lagerfähigkeit, Blutgruppen-Unabhängigkeit, keine Infektionsgefährdung durch Hepatitis und erworbenen Immundefekt (AIDS). Im Plasma gelöste Sauerstoffträger sind unabhängig von der Spendebereitschaft, sie passieren verengte Gefäße und belasten das retikulo-endotheliale System (RES) praktisch nicht.

Hämoglobin-basierte Sauerstoffträger sind auch zur experimentellen Organperfusion sowie zur Konservierung von Organ-Transplantaten sehr geeignet. Ein weiteres Einsatzgebiet ist die Sauerstoffversorgung der Zellen in Kulturen durch solche Träger.

### Das eigene Konzept eines Blut-Additivs

Für die Entwicklung eines verträglichen und wirksamen künstlichen Sauerstoffträgers auf Basis gelösten Hämoglobins als Blut-Additiv haben sich während der letzten Jahre aufgrund zahlreicher Untersuchungen bestimmte Anforderungen herauskristallisiert.

Die basale Forderung an ein Blut-Additiv ist zunächst, dass es als ein Additiv in vorhandenes Blut eingebracht werden kann, ohne *in vivo* dessen Volumen merklich zu vergrößern. Das Volumen des Blutplasmas und die Verteilung der Körperflüssigkeit auf die verschiedenen Flüssigkeits-Kompartimente des Organismus werden durch den onkotischen (kolloid-osmotischen) Druck des Blutplasmas bestimmt, der als eine kolligative Eigenschaft (überwiegend) der Anzahl der gelösten Makromoleküle proportional ist. Ein Blut-Additiv muss also, im Vergleich zum Blutplasma, stark hyponkotisch sein (Prinzip der Hyponkose), damit es nach einer Gabe den resultierenden onkotischen Druck des Plasmas nicht zu sehr vergrößert. Um entsprechend die Anzahl der zu verabreichenden Moleküle eines aus Hämoglobin-Derivaten bestehenden Blut-Additivs so gering wie möglich zu halten, muss dessen Molare Masse möglichst groß sein, was durch intermolekulares Vernetzen (Polymerisieren) der Moleküle des nativen Hämoglobins geschehen kann.

Eine weitere sehr wichtige Eigenschaft ist eine optimierte Sauerstoff-Affinität, die bereits das Blut mit seinem Sauerstoffhalbsättigungsdruck ( $p_{50}$ ) von etwa 25 Torr nicht besitzt. Vielmehr haben Untersuchungen von Conover et al. [6] gezeigt, dass sich Organe mit solchen Trägern am besten versorgen lassen, die einen Halbsättigungsdruck zwischen 15 und 20 Torr besitzen.

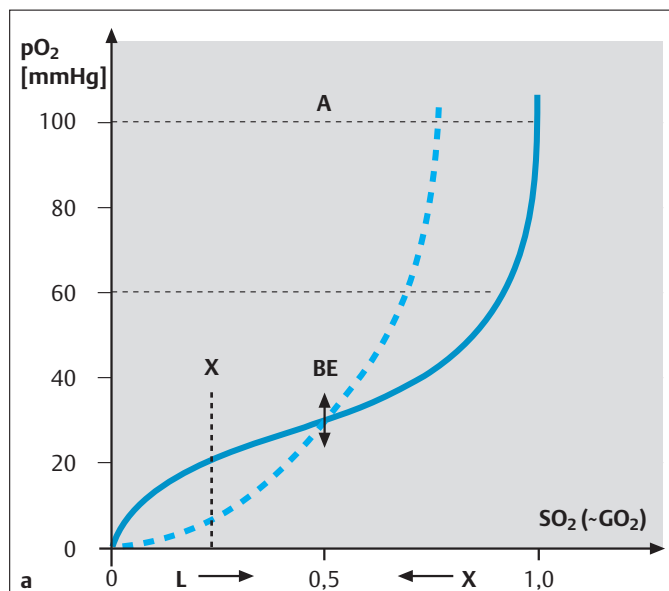


Abb. 2a Eine hyperbolische (gestrichelt) und eine sigmoidale (durchgezogen) Sauerstoff-Bindungskurve gleicher Affinität (gleichen Sauerstoffhalbsättigungsdrucks  $p_{50}$ ) im Vergleich, dargestellt als Entladekurven.  $pO_2$ : Sauerstoffpartialdruck,  $SO_2$ : Sättigung der Sauerstoff-Bindungsstellen ( $GO_2$ : der proportionale Sauerstoffgehalt der Lösung), A: hier Alveole/alveolär, L: Lunge, X: peripheres Gewebe, BE: Bohr-Effekt.

Das Sauerstoff transportierende Blut-Additiv soll Mangel-Gewebe kompensatorisch versorgen. Hierbei kommt es gewiss zur Entsättigung des Hämoglobins unter 50%, gemessene gewebliche Sauerstoffpartialdrücke unter 25 Torr (schon im normalen Gewebe, siehe z.B. [7–9]) weisen darauf hin. In diesem Fall ist eine möglichst hohe Kooperativität der Sauerstoff-Bindung, d.h. eine ausgeprägte Sigmoidität der Bindungskurve, unbedingt notwendig, soll das Additiv die gewünschte Wirkung haben. Dies veranschaulicht Abb. 2a.

Der Sauerstoffpartialdruck der Entladekurve ist funktionell zugleich der intrakapilläre Treibdruck der Diffusion des Sauerstoffs von der Kapillare zu den Gewebe-Zellen. Durch die S-Form der Bindungskurve wird das Blut in der Lunge nicht nur bereits bei einem alveolären Sauerstoffpartialdruck von 60 Torr fast vollständig gesättigt, sondern gleichzeitig bleibt der kapilläre Sauerstoffpartialdruck bei Entsättigung auf 25% noch über 20 Torr. Beides leistet die hyperbolische Bindungskurve nicht. Jedoch ist gerade ein großer kapillärer Sauerstoffpartialdruck (als treibende Kraft für die Diffusion des Sauerstoffs von der Kapillare ins Gewebe) notwendig, um hypoxisches Gewebe noch ausreichend versorgen zu können.

Weitere Anforderungen an das Additiv sind seine Verwendbarkeit als Sauerstoff transportierender Blutvolumen-Ersatz (zusammen mit einem Plasma-Expander) und die Verträglichkeit mit menschlichem Blutplasma. Günstig ist ferner ein nicht zu geringer onkotischer Druck der Zubereitung zur aquaretischen Wirkung auf ein Schockgewebe; günstig sind weiterhin eine geringe Viskosität sowie eine große Verweildauer. Das Additiv darf nicht über die Nieren ausgeschieden werden und nicht die Gefäße verlassen (keine Extravasation). Immuntoleranz muss gegeben sein.

Bezüglich einer späteren kommerziellen Nutzung eines Blut-Additivs ist es sehr vorteilhaft, wenn die Herstellung kostengünstig ist, damit ein entwickeltes Fertig-Arzneimittel nicht zu teuer wird. Einflussfaktoren auf den Herstellungspreis sind die Einfachheit oder Komplexität der technischen Ausgestaltung der Apparaturen und Prozesse sowie die Material- und Betriebskosten.

Ein im Plasma lösliches Sauerstoff transportierendes Blutadditiv, das den genannten Forderungen genügt, muss aus Molekülen bestehen, die sehr viele (hunderte) Bindungsstellen für Sauerstoff besitzen, es müssen gleichsam „molekulare Erythrozyten“ sein [10–12]. In der Natur gibt es ein solches Sauerstoff transportierendes Additiv. Und zwar besitzen niedere Tiere, wie Schnecken und Regenwürmer, riesige Proteine mit Molekulargewichten von 8,4 bzw. 3,6 MDa (Hämocyanin, Erythrocrurin), Letzteres hat etwa 200 Bindungsstellen für Sauerstoff. Messungen haben ergeben, dass das Erythrocrurin des Regenwurms bei physiologischen Bedingungen einen Halbsättigungsdruck ( $p_{50}$ ) von 9 Torr und eine Kooperativität ( $n_{50}$ ) von 12 hat [13].

Das funktionierende Natur-Vorbild gibt konzeptionelle Sicherheit für die Entwicklung des künstlichen Sauerstoff transportierenden Blut-Additivs; denn mit Sicherheit liefern geeignete synthetisierte hochmolekulare Sauerstoff-Binder ebenfalls in hinreichender Weise Sauerstoff an die Zellen, zumal insbesondere der Regenwurm auch ein kapilläres System besitzt. Es gilt also, einen hypotonischen Sauerstoffträger mit erhöhter Sauerstoff-Affinität und möglichst hoher Kooperativität zu entwickeln, der den genannten Anforderungen genügt. Da das Erythrocrurin des Regenwurms, gleich dem Human-Hämoglobin, aus globulären, Häm tragenden Untereinheiten, mit einem Molekulargewicht von etwa 15 kDa besteht, ist der Plan vorgegeben: Säugetier-Hämoglobin soll unter Beachtung bestimmter Bedingungen zu analogen Riesen-Molekülen vernetzt und dann maskiert werden, um molekulare Wechselwirkungen zu verringern.

Optimales Ausgangsprodukt wäre gewiss Human-Hämoglobin; nur bleibt dessen Verfügbarkeit begrenzt, es sei denn, man kann zukünftig Hämoglobin gentechnisch preiswert herstellen. Unsere Wahl fiel daher auf Schweine-Hämoglobin, weil es unbegrenzt verfügbar ist und dem Hämoglobin des Menschen funktionell und strukturell sehr ähnelt: Es hat den gleichen Effektor (2,3-Bisphosphoglycerat) und die gleichen Kennwerte der Sauerstoff-Bindung. Das Problem der BSE (bovine spongiose Enzephalopathie) gibt es bei dieser Wahl nicht.

Wegen der großen Ähnlichkeit kann zudem ein Herstellungsprozess ohne Änderung auf beide erwähnten Hämoglobine angewendet werden. Abb. 2b veranschaulicht schematisch den Herstellungsprozess. Im Prinzip besteht die Herstellung aus drei Schritten. Im ersten werden die Hämoglobin-Moleküle kovalent vernetzt. Hierbei wird die zentrale Kavität des Hämoglobins reversibel mit Inositolhexaphosphat blockiert. Es entsteht Vernetzungsprodukt mit einer sehr breiten Molekulargewichtsverteilung vom monomeren Hämoglobin bis zu Riesen-Molekülen. Der zweite Schritt besteht in einer Maskierung des Vernetzungsproduktes durch kovalente Anknüpfung eines Polyethylenglycols. Dies verhindert unerwünschte Wechselwirkungen mit den Proteinen des Blutplasmas, insbesondere mit den großen Mole-

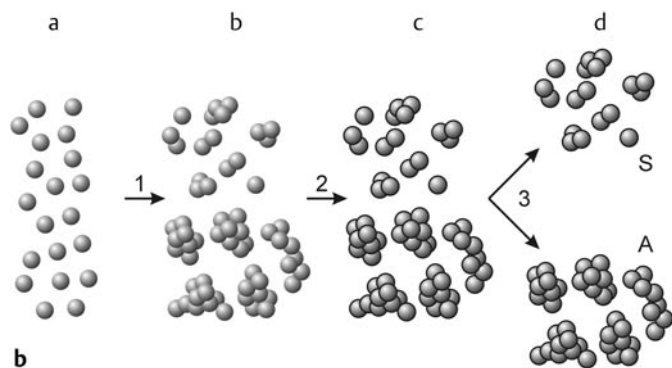


Abb. 2b Schematische Darstellung des Herstellungsprozesses der Hyperpolymeren, gegliedert in die drei Hauptschritte der Synthese und Aufarbeitung. Aus nativem Hämoglobin (a) entsteht durch eine chemische Vernetzung (1) vernetztes Hämoglobin (b), aus diesem durch eine molekulare Maskierung (2) maskiertes Vernetzungsprodukt (c), dieses wird getrennt (3) in (d) Monomere und Oligomere (S: Blut-Substitut) sowie in (Hyper-)Polymere (A: Blut-Additiv).

külen wie Fibrinogen und bestimmten Antikörpern. Die beiden Schritte können in *einem* Reaktor ohne Zwischenschritte durchgeführt werden, was die Herstellung einfach und kostengünstig macht. Die Produktausbeute beträgt hierbei etwa 70%. Das maskierte Vernetzungsprodukt wird im dritten Schritt mittels Ultrafiltration (mit Filtern der nominellen Molekulargewichts-Trenngrenze 1 MDa) zu etwa gleichen Teilen in eine nieder- und eine hochmolekulare Fraktion zerlegt. Erstere ist als Sauerstoff transportierender Plasma-Expander (Volumen-Substitut) ein hochwertiges „Abfallprodukt“ und kann, unter Abdeckung der entsprechenden Indikationen, zur Bekämpfung des Sauerstoffmangels mit Blutverlust eingesetzt werden. Die zweite Fraktion (ebenfalls etwa 35%) ist das gewünschte hyperpolymere Hämoglobin, das Blut-Additiv, welches der Bekämpfung des Sauerstoffmangels ohne Blutverlust mit seinen vielen Indikationen dient.

### Eigenschaften des Blut-Additivs – bisherige Ergebnisse der Arzneimittel-Entwicklung

Die Herstellung von Hämoglobin-Hyperpolymeren wurde optimierend entwickelt und mit aseptischer Technik in einem kleinen Technikumsmaßstab standardisiert. Die Molekulargewichtsverteilung des so hergestellten optimierten Produktes besitzt ein mittleres Molekulargewicht (Median) von etwa 800 kDa, die 10- und 90%-Perzentile betragen etwa 180 bzw. 3600 kDa. Das Produkt enthält somit praktisch kein monomeres Hämoglobin und keine Oligomeren mehr.

Die Endotoxinaktivität der Zubereitungen ist kleiner als 0,029 EU/mL, der Nachweisgrenze des Endotoxin-Tests.

Abb. 3a zeigt zunächst das elektronenmikroskopische Bild eines sehr großen hyperpolymeren Hämoglobins. Das Bild vermittelt einen sperrigen Eindruck, das Molekül ist keineswegs so kompakt wie ein globuläres Protein. Dazu passend beträgt der polymer-chemische Mark-Houwink-Koeffizient der Hyperpolymeren in wässriger Lösung 0,38 [14]. Dieser Koeffizient ist ein charakte-

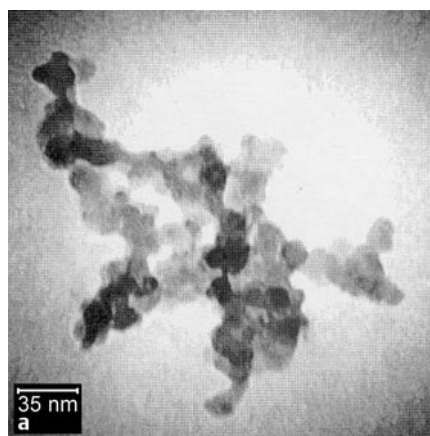


Abb. 3a Elektronenmikroskopisches Hellfeld-Bild in Transmission eines sehr großen einzelnen Moleküls hyperpolymeren Hämoglobins.

Tab. 1 Kennwerte der Sauerstoff-Bindung (Sauerstoffhalbsättigungsdruck  $p_{50}$  und mittlerer Hillscher Index  $n_{50}$ ) verschiedener Hämoglobin-Zubereitungen bei 37 °C, 40 Torr  $p_{CO_2}$  und einem pH von 7,4. Die nativen Hämoglobine und die Hämoglobin-Hyperpolymeren (HP<sub>3</sub>Hb) sind in Abwesenheit organischer Phosphate, insbesondere DPG (2,3-Bisphosphoglycerat) und ATP (Adenosintriphosphat), vermessen

Hämoglobin (Hb)/-Derivat	$p_{50}/\text{Torr}$	$n_{50}$
menschliches Vollblut	25	2,5
humanes Hb	15	2,5
Schweine-Hb	15	2,5
HP <sub>3</sub> Hb	16	2,1

ristischer Parameter für die Form eines Polymeren in Lösung; für globuläre Proteine hat er einen Wert von null.

Tab. 1 gibt Kennwerte der Sauerstoff-Bindung des künstlichen Trägers und verschiedener Hämoglobin-Zubereitungen im Vergleich wieder; es handelt sich um den Sauerstoffhalbsättigungsdruck ( $p_{50}$ ) als Maß für die mittlere Sauerstoff-Affinität und um den  $n_{50}$ -Wert (Hillscher Koeffizient) als Maß für die Sigmoidität der Sauerstoff-Bindungskurve;  $n_{50}$  gleich 1 bedeutet keine Sigmoidität (und Kooperativität), sondern eine hyperbolische Form der Bindungskurve. Aus der Tabelle geht hervor, dass die Hämoglobine von Mensch und Schwein funktionell sehr ähnlich sind, sie haben die gleichen Kennwerte der Sauerstoff-Bindung: Aber auch ihre Primärstruktur weist große Ähnlichkeit auf [15]. Das synthetisierte Blut-Additiv besitzt einen  $p_{50}$ -Wert von 16 Torr und eine Kooperativität von 2,1. Nach Arbeiten von Conover et al. [6] können Gewebe nicht nur am besten mit künstlichen Sauerstoffträgern versorgt werden, deren  $p_{50}$ -Wert zwischen 15 und 20 Torr liegt, sondern auch deren Kooperativität möglichst groß ist. Die Kooperativität des synthetisierten Additivs erreicht mit  $n_{50} = 2,1$  fast die des natürlichen Hämoglobins.

Es ist eine Wirk-Konzentration des Trägers im Blutplasma von etwa 3 g/dL Träger vorgesehen. Im Vergleich zum Blut-Gehalt des nativen Hämoglobins von 15 g/dL beträgt – berücksichtigt man das Volumen der Blutzellen – somit der des künstlichen Additivs nur etwa 1,5 g/dL, also nur ein Zehntel.

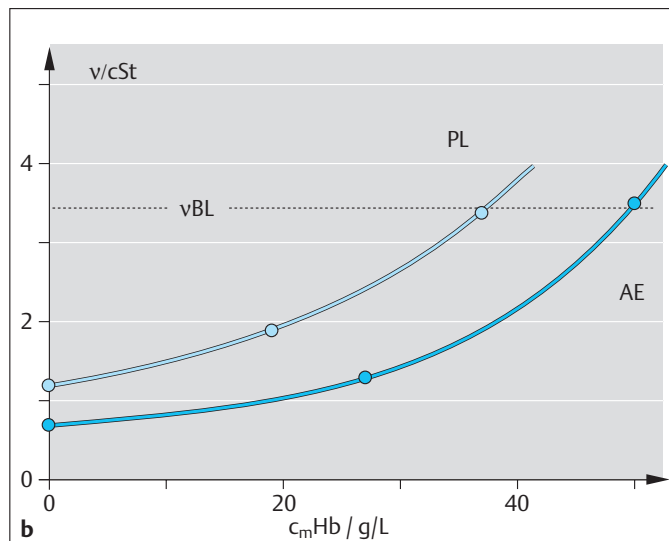


Abb. 3b Die kinematische Viskosität ( $v$ ) von Lösungen des Blut-Additivs ( $\text{HP}_3\text{Hb}$ ) in einem wässrigen Elektrolyt (AE) und in frischem menschlichem Blutplasma (PL) als Funktion des Hämoglobin-Gehalts bei  $37^\circ\text{C}$ ,  $c_m\text{Hb}$ : Hämoglobin-Konzentration,  $v\text{BL}$ : kinematische Viskosität des Blutes.

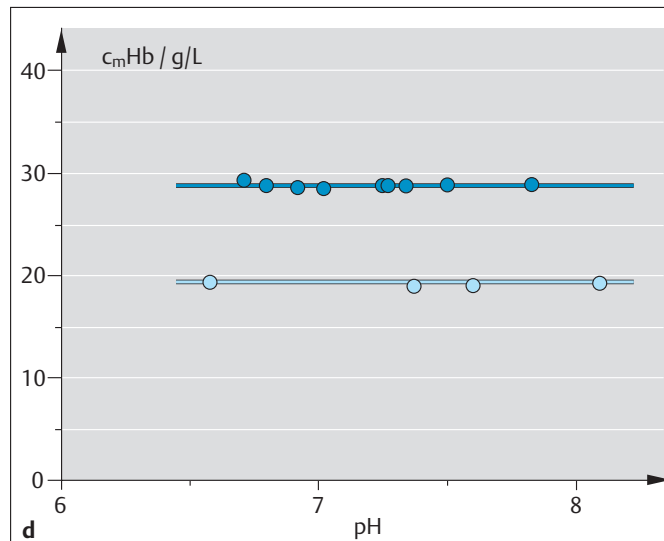


Abb. 3d Prüfung der Verträglichkeit des Additivs mit frischem Human-Plasma in Mischungen. Gezeigt ist die Konzentration der Hämoglobin-Hyperpolymeren ( $c_m\text{Hb}$ ) im Zentrifugationsüberstand nach standardisierter Inkubation als Funktion der Protonen-Aktivität (als pH).

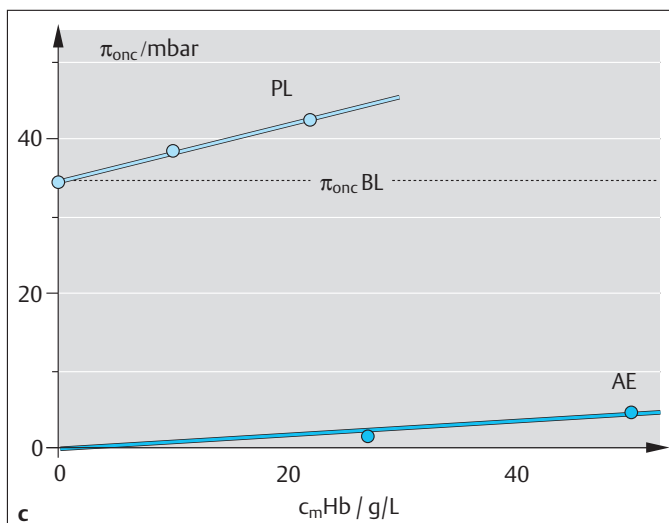


Abb. 3c Der kolloid-osmotische Druck ( $\pi_{\text{onc}}$ ) von Lösungen des Additivs ( $\text{HP}_3\text{Hb}$ ) in einem Elektrolyt (AE) und in frischem Human-Plasma als Funktion der Hämoglobin-Konzentration ( $c_m\text{Hb}$ , bei Raumtemperatur).  $\pi_{\text{onc}}\text{BL}$ : onkotischer Druck des Blutes (des Plasmas).

Abb. 3b zeigt Messungen der Viskosität in Elektrolyt (AE) und in frischem Blutplasma. Die kinematische Viskosität, in frischem Blutplasma ermittelt, ist nicht nur größer als in Elektrolyt, sondern auch die Zunahme mit der Konzentration ist verstärkt. In beiden Fällen ist die Abhängigkeit nicht linear. Dennoch bleibt die Viskosität bei der vorgesehenen therapeutischen Konzentration von  $3 \text{ g/dL}$  unter derjenigen des Blutes.

Abb. 3c gibt Messungen des kolloid-osmotischen Drucks wieder, unter ähnlichen Lösungsbedingungen wie in Abb. 3b. Im Gegensatz zur Viskosität finden sich hierbei nahezu lineare Abhängigkeiten. Jedoch ist gleichermaßen der Zuwachs des kolloid-osmotischen Drucks durch das Additiv in frischem Blutplasma größer

als in Elektrolyt-Lösung: Die Zunahme des onkotischen Drucks des Blutplasmas beträgt bei der vorgesehenen therapeutischen Konzentration um  $3 \text{ g/dL}$  etwa  $12 \text{ mbar}$ .

Unerlässlich ist, dass der künstliche Sauerstoffträger mit frischem Human-Plasma im physiologisch relevanten pH-Bereich von  $6,9$  bis  $7,7$  verträglich bleibt. Dies wurde mit Fällungsversuchen überprüft. Abb. 3d gibt hierzu die Ergebnisse für zwei Zubereitungen unterschiedlicher Konzentrationen wieder. Die photometrisch bestimmten Konzentrationen im Überstand der zentrifugierten Mischung zeigen keine Veränderung in Abhängigkeit vom pH-Wert zwischen  $6,5$  und  $8,2$ .

Aufgrund der präsentierten Eigenschaften ist der Träger für eine Applikation in einen Organismus geeignet; dies kann durch portionsweise venöse Infusion geschehen. Von großem Interesse ist hierbei die Verweildauer des Trägers im Blutplasma des Organismus, beispielsweise erfasst in Form der Halbwertszeit. Diese wurde an wachen Ratten ermittelt, Abb. 3e gibt die Ergebnisse entsprechender Untersuchungen wieder. Man erkennt, dass die Halbwertszeit mit der Anfangskonzentration zunimmt: Bei  $2,2 \text{ g/dL}$  beträgt sie etwa  $18 \text{ h}$ , bei  $3,0 \text{ g/dL}$  knapp  $30 \text{ h}$  (und bei  $1 \text{ g/dL}$  etwa  $9 \text{ h}$ ). Gleichartige Messungen der Verweildauer wurden an wachen Mäusen durchgeführt. Hier betrug bei einer Ausgangskonzentration des Trägers im Blutplasma von etwa  $3 \text{ g/dL}$  die Halbwertszeit  $15 \text{ h}$ .

Die Wirksamkeit des Blut-Additivs wurde an einem Modell eines mit Ölsäure induzierten Lungenschocks narkotisierter Ratten [16] überprüft. Wie Abb. 3f zeigt, war die spezifische Menge der venös applizierten Ölsäure so bemessen, dass die Vergleichs-Tiere ohne Applikation des Trägers in etwa  $3 \text{ h}$  verstarben. Alle Tiere der Verum-Gruppe, die mit dem Blut-Additiv behandelt waren (die Anfangskonzentration im Plasma betrug etwa  $2,5 \text{ g/dL}$ ), überlebten den Lungenschock und wurden nach etwa  $7 \text{ h}$  in Narkose getötet: Das Blut-Additiv bewahrte diese Tiere vor dem Tod.

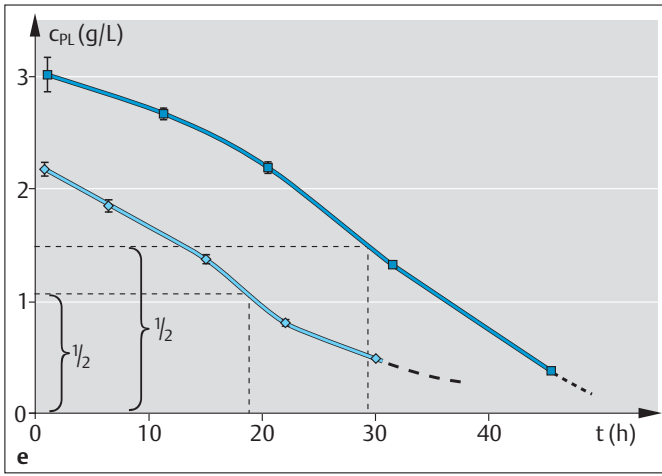


Abb. 3e Der Verlauf der Konzentration der Hämoglobin-Hyperpolymeren im Blutplasma ( $c_{PL}$ ) wacher Ratten bei zwei verschiedenen Anfangskonzentrationen. t: Versuchsdauer,  $\frac{1}{2}$ : hälftige Anfangskonzentrationen.

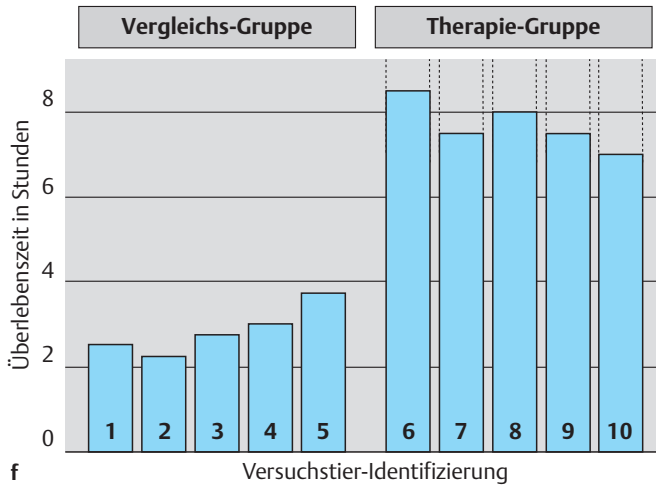


Abb. 3f Demonstration einer Wirksamkeit: Die Überlebenszeiten narkotisierter Ratten nach einem mit Ölsäure induzierten Lungenschock (a) ohne Therapie (Vergleich) und (b) mit Gabe des Blut-Additivs (Therapie).

In einzelnen explorativen freiwilligen Selbstversuchen wurde der neue künstliche Träger auch am Menschen in geringer Dosierung angewandt. Hier interessierte insbesondere, ob das Blut-Additiv eine Blutdrucksteigerung bewirkt. Abb. 3g zeigt den Verlauf entsprechender Messwerte von zwei Probanden. Beim männlichen Probanden (P1) stieg der systolische Blutdruck während der Vorperiode (etwa 40 Minuten) von 140 auf 165 Torr stetig an. Es war die allererste Anwendung des Trägers an einem Menschen. Die nachfolgende Gabe von 1,16 g Träger löste jedoch keine Blutdruckerhöhung aus. Diastolischer Blutdruck und Herzfrequenz blieben während der gesamten Messperiode konstant. Bei der Probandin (P2) waren während des analogen Versuchs alle Messgrößen konstant. Das Sauerstoff transportierende Blut-Additiv hatte in den gezeigten Fällen keinen Einfluss auf den Blutdruck und die Herzfrequenz.

Interessant und wichtig ist die Frage, ob das im Blutplasma gelöste Additiv die Leber schädigt. Die Leber hat eine offene Strom-

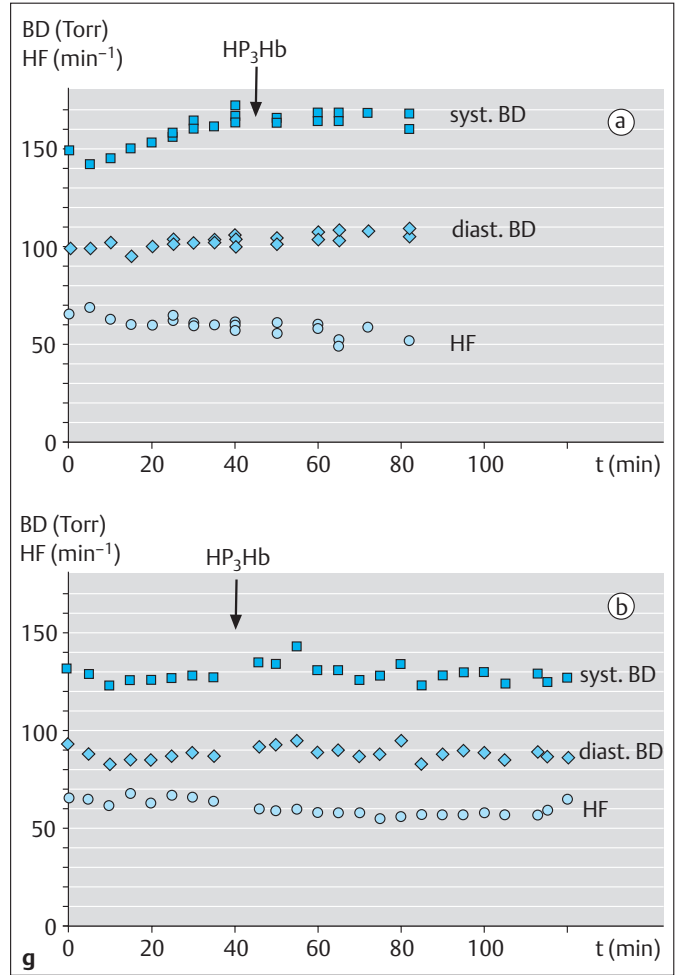


Abb. 3g Verlauf des systolischen und diastolischen Blutdrucks (BD) sowie der Herzfrequenz (HF) unter venöser Gabe (jeweils 1,16 g  $HP_3Hb$ ) des Blut-Additivs ( $HP_3Hb$ ) bei Menschen im Selbstversuch, (a) Proband P1, 70 kg Körpergewicht (KG), (b) Probandin P2, 65 kg KG. t: Versuchsdauer.

bahn, so dass der Träger in direkten Kontakt mit den Hepatozyten kommen kann. Ein Indiz für eine Leberschädigung ist eine Erhöhung des Blutspiegels der Transaminasen GOT (Glutamat-Oxalacetat-Transaminase = Aspartat-Aminotransferase: AST) und GPT (Glutamat-Pyruvat-Transaminase = Alanin-Aminotransferase: ALT). Abb. 3h gibt die Ergebnisse entsprechender Untersuchungen wieder. Der künstliche Sauerstoffträger wurde mehrfach im Abstand von 14 Tagen verabreicht. Man kann erkennen, dass er den Blutspiegel der Transaminasen in den gezeigten Fällen nicht signifikant verändert.

Weiterhin gilt es zu klären, ob der so zubereitete Sauerstoffträger immunogen wirkt. Dazu wurde der Träger 3-mal im Abstand von jeweils 14 Tagen in Mengen von 0,6 bis 2,4 g zwei Personen intravenös verabreicht. Nach der dritten Applikation wurden bei beiden Personen keine klinischen Zeichen einer Immunreaktion beobachtet.

Die Immunogenität des Blut-Additivs sowie monomeren porcinen Hämoglobins (PHb) wurde auch an Mäusen (mit dem ausgesuchten, gegen Hämoglobin natürlicherweise hoch sensiblen Stamm C3H/HeN) getestet. Das Immunisierungsschema umfass-

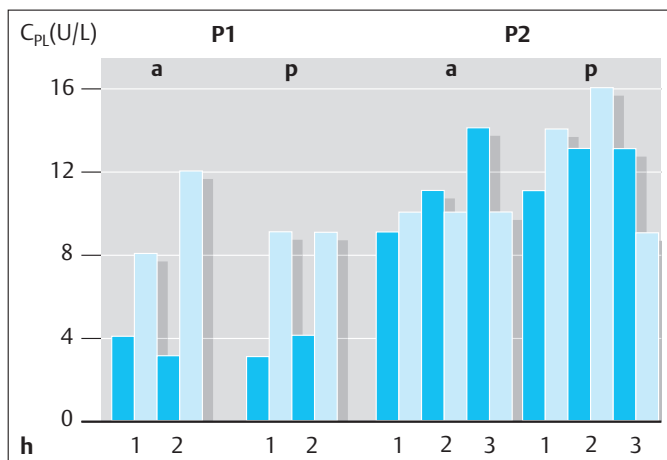


Abb. 3h Transaminasen-Spiegel ( $C_{pl}$ ) vor (a) und nach (p) mehrfacher venöser Gabe verschiedener Trägermengen bei zwei Probanden. Proband P1 – 1: 0,58 g, 2: 2,32 g, Probandin P2 – 1, 2, 3: jeweils 1, 16 g, gefüllte Balken: GPT, leere Balken: GOT.

te drei Gaben in jeweils wöchentlichem Abstand. Nach der dritten Gabe des nativen Hämoglobins ergaben sich sehr niedrige Titer, Schock-Zeichen wurden nicht beobachtet. Nach der dritten Gabe des Blut-Additivs waren die Titer der drei Immunglobulin-Kategorien ein wenig erhöht; ferner wurde beobachtet, dass die Tiere nach dieser dritten Gabe für etwa 15 bis 20 Minuten ruhig sitzen blieben.

Ein weiteres wichtiges Kriterium für die klinische Brauchbarkeit des Trägers ist eine hinreichend lange und möglichst einfache Lagerfähigkeit. Die strukturelle Stabilität erwies sich als nicht limitierend: Selbst bei einer Lagertemperatur von 45 °C waren die Hyperpolymeren etliche Monate ohne Zeichen einer molekularen Veränderung oder einer erkennbaren Trübung strukturell stabil, bei Raumtemperatur (22 °C) bislang etwa 18 Monate.

Die funktionelle Stabilität betrifft speziell die irreversible Umwandlung des (reduzierten) funktionsfähigen Hämoglobins in das zum Sauerstofftransport im Blut nicht mehr fähige, oxidierte Methämoglobin (Hämoglobin). Diese Umwandlung kann durch eine Ligandierung der Sauerstoff-Bindungsstellen mit Kohlenmonoxid sehr effektiv (etwa 100-fach) vermindert werden. Bei 5 °C beträgt dann die tägliche Zunahme an Methämoglobin weniger als 0,001 % und bei 22 °C nur etwa 0,01 % (< 4%/Jahr). Je nach akzeptierter oberer Grenze der Methämoglobin-Fraktion beträgt die „funktionelle“ Lagerfähigkeit auch bei Raumtemperatur so bis zu zwei Jahre.

### Methodik

„AE“ ist eine wässrige Elektrolytlösung, die die Zusammensetzung der Blutplasmaflüssigkeit (das „Extrazellulär-Milieu“) imitiert: Sie enthält 125 mM NaCl, 4,5 mM KCl, 20 mM NaHCO<sub>3</sub> (und 3 mM NaN<sub>3</sub>).

Hämoglobin vom Schwein (PHb) wird aus dem Blut von Schlachttieren gewonnen. Für die Aufreinigung des Hämoglobins wurde ein eigenes technisches Verfahren mit fraktionierter Ultrafiltration entwickelt.

Die Herstellung der Hyperpolymeren erfolgte in einem Klasse-A-Reinraum mit aseptischen Verfahren und Arbeitstechniken. Sie ist an anderer Stelle ausführlich beschrieben [17], die dort vorgestellte Variante enthielt allerdings noch zusätzlich Pyridoxal-Phosphat kovalent angeknüpft: Das hoch gereinigte Schweine-Hämoglobin wird mit Glutardialdehyd (GDA) als bifunktionellem Vernetzer zu Multimeren (P<sub>2</sub>Hb) vernetzt, die instabilen Verknüpfungen werden stabilisiert, indem die gebildeten Aldimine mit Natriumborhydrid als Reduktionsmittel zu Amidinen reagieren. Anschließend erfolgt eine chemische Ankopplung (PEGylierung) eines Polyethylenglykols (PEG) zur Modifikation der Moleküloberflächen der Multimere (P<sub>3</sub>Hb). Durch Ultrafiltration (nominelle Trenngrenze: 1 MDa = 1000 kDa) werden die kleinen (Monomere und Oligomere) von den größeren Molekülen, den so genannten Hyperpolymeren (HP<sub>3</sub>Hb), abgetrennt.

Endotoxin-Aktivitätsgehalte wurden mit einem kinetisch-turbidimetrischen Limulus-Amöbozyten-Lysat(LAL)-Test bestimmt.

Das Bild eines Hyperpolymer-Moleküls in Abb. 3a ist eine Transmissionselektronenmikroskopie(TEM)-Hellfeldabbildung, angefertigt durch M. Rosenbaum [18], der die Struktur zudem mit Hilfe einer Eisen-Spektroskopie verifizierte.

Molmassen (Molekulargewichte) wurden mit Hilfe der Volumenausschluss-Chromatografie (mit dem Gel „Sephacryl S-400 HR“, Pharmacia Biotech, D) ermittelt. Deren Eichung erfolgte indirekt gemäß einer Methode [14], die letztlich auf Lichtstreuungsmessungen [18] und Onkometrie basiert.

Analysen der Sauerstoff-Gleichgewichtsbindung der Hämoglobinpolymeren in Lösung, insbesondere der Kennwerte Halbsättigungsdruck ( $p_{50}$ ) und mittlerer systemischer Hill-Koeffizient ( $n_{50}$ ), erfolgten mit der Apparatur (so genannte „Bindungskurvenkammer“) der von Barnikol et al. [19] modifizierten Methode nach Niesel und Thews. Gemessen wird photometrisch die Transmission monochromatischen Lichts durch eine sehr dünne Schicht einer Hämoglobinlösung bei veränderlicher und dabei jederzeit bekannter Sauerstoffspannung in dieser Schicht.

Viskositäten von Hämoglobin-Hyperpolymeren enthaltenden Lösungen wurden als Kinematische Viskositäten ( $\nu$ ) in geeichten Mikro-Kapillarriskosimetern nach Ubbelohde („Mikro-Ubbelohde-Viskosimeter mit hängendem Kugelniveau – Typ 53 610“ und „– Typ 53 613“, Schott, D) bei 37 °C bestimmt.

Die Ermittlung der onkotischen (kolloid-osmotischen) Drücke von Hämoglobin-Hyperpolymer-Lösungen erfolgte mit einem Membranosometer („Membran-Osmometer MO mit Digitalanzeige“, Knauer, D) mit Celluloseacetat-Membranen der nominellen Porenweite 20 000 g/mol.

Eine mögliche Unverträglichkeit mit Blutplasmabestandteilen in Form einer Ausfällung der Hämoglobin-Hyperpolymeren aus (verdünntem) Blutplasma wurde gemäß den Angaben bei Domack [20] getestet. Bewertet werden die (relativen) Hämoglobinkonzentrationen frisch hergestellter isovolämischer Mischungen menschlichen Blutplasmas und wässriger Lösungen der Hyperpolymeren nach 30 min Inkubation bei 37 °C, aufgetragen über dem variierten pH-Wert.



Zur Ermittlung der Verweildauern der Hämoglobin-Hyperpolymeren im Blutplasma (einschließlich der Plasmahalbwertszeiten) in der wachen Ratte bekamen männliche Ratten von etwa 350 g Körpergewicht in ganz leichter (i.p.) Barbiturat-Narkose eine Injektion einer Polymerenlösung in die Penisvene. In gewissen zeitlichen Abständen wurde dann den wachen Tieren durch Punktion einer Schwanzvene venöses Blut entnommen und im Plasma der Hämoglobingehalt mittels der Drabkin'schen Methode (HiCN-Methode) ermittelt.

Zur Ermittlung der Wirksamkeit der Anwendung der Hämoglobin-Hyperpolymeren zur Behandlung der Mortalität eines Lungenschocks erhielten die Ratten beiderlei Geschlechts mit etwa 300 g Körpergewicht eine andauernde Barbiturat-Narkose, einen venösen Katheter in eine *Vena jugularis* gelegt und über diesen regelmäßig physiologische Kochsalzlösung zur Deckung ihres Flüssigkeitsbedarfes (je Tier etwa 1 mL/h). Nach venöser Gabe von 48  $\mu\text{L}$  Ölsäure/kg Körpergewicht erhielten nur die Therapie-Tiere nach 15 min im Abstand von 30 min zwei Injektionen des Blut-Additivs, die zusammen zu einer Plasma-Anfangskonzentration von 2,5 g/dL führten.

Der Blutdruck der Freiwilligen (Selbstversuche) wurde auskultatorisch indirekt nach Riva-Rocci gemessen, die Herzfrequenz als Radialispulsfrequenz palpatorisch ermittelt.

Die klinisch-chemische Bestimmung der Transaminasenspiegel (GOT und GPT) in Nüchtern-Venenblut mittels eines Blutanalytik-Vollautomaten („Olympus“) nach der bei 25 °C optimierten Standardmethode als UV-Test gemäß DGKC führte ein medizinisch-diagnostisches Großlabor durch. Die Normalwerte (Frauen/Männer) betragen für die GOT  $\leq 15/19$  U/L und für die GPT  $\leq 19/23$  U/L

Der Nachweis oder Ausschluss möglicher adverser Effekte und allergischer Reaktionen erfolgte durch ärztliche Inspektion und anamnestiche Befragung.

Die immunologischen Untersuchungen wurden am Institut für Immunologie der Universität Mainz durchgeführt. Ermittelt wurde die Immunogenität des Blut-Additivs sowie monomeren porcinen Hämoglobins (PHb) an dem ausgesuchten, gegen Hämoglobin natürlicherweise hoch sensiblen Mäuse-Stamm C3H/HeN. Die Tiere erhielten im Abstand von jeweils 7 Tagen 3-mal je 1 mg des Hämoglobins i.v. Beobachtet wurde bei der dritten Gabe das Verhalten der Tiere. Nach weiteren 7 Tagen wurden mit Hilfe eines ELISA die Titer der Immunglobuline im venösen Blut ermittelt: Gesamt-IgG, IgG<sub>1</sub> als Indikator für die humorale und IgG<sub>2a</sub> für die zelluläre Immunogenität.

## Diskussion

Der Organismus hat im Umgang mit Sauerstoff drei grundsätzliche Probleme: Erstens ist Sauerstoff bei einem Partialdruck von über 100 Torr für Zellen auf Dauer oxidativ-toxisch. Zweitens besitzt der Organismus für Sauerstoff, anders als für die zellulären Hauptsubstrate (Glucose, Fett), keine metabolischen Speicher, sondern nur geringfügige funktionelle im Blut und Alveolarraum von etwa 100 mmol O<sub>2</sub>, die nicht vollständig ausschöpfbar sind

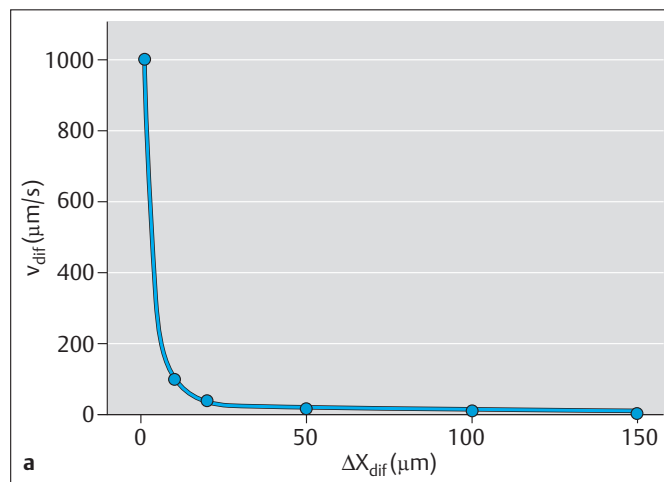


Abb. 4a Abhängigkeit der Molekülgeschwindigkeit des diffundierenden Sauerstoffs ( $v_{\text{diff}}$ ) von der Diffusionsstrecke ( $\Delta x_{\text{diff}}$ ) gemäß einer Modifikation der Gleichung von Einstein und Smoluchowski:  $v_{\text{diff}} = 2 \cdot \text{DO}_{2,\text{ef}} / \Delta x_{\text{diff}}$ .  $\text{DO}_{2,\text{ef}}$  ist der effektive Diffusionskoeffizient des Sauerstoffs (mit einem Schätzwert von  $1000 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ).

und nur für wenige Minuten ausreichen: Der Mensch erstickt innerhalb von Minuten. Deshalb ist der Organismus mit seinen Zellen auf eine ständige Sauerstoffzufuhr angewiesen. Drittens ist Sauerstoff in wässrigem Milieu wenig löslich und damit auch wenig diffusibel.

Die Probleme werden im Organismus mit Hilfe von Hämoglobin gelöst; ohne diesen Sauerstoffbinder ist ein Säugetier-Organismus nicht lebensfähig, weil seine Zellen nicht ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden könnten. Dies tritt ein, wenn etwa die Hälfte des Hämoglobins verloren geht, oder wenn der Hämoglobin-Fluss durch ein Gewebe entsprechend verringert wird.

Besonders kritisch ist die Diffusion des Sauerstoffs von den Erythrozyten zu den Gewebezellen zu sehen und umgekehrt vom Alveolarraum in die roten Blutzellen. Das verdeutlicht das Diagramm in Abb. 4a, welches gemäß einer modifizierten Gleichung nach Einstein und Smoluchowski die Abhängigkeit der Molekülgeschwindigkeit vom Weg bei freier Diffusion darstellt. Diese Geschwindigkeit ist eine maßgebliche Größe der zellulären Sauerstoffversorgung. Die Abbildung zeigt, dass die Diffusionsgeschwindigkeit der Sauerstoffmoleküle bei dem gegebenen Diffusionskoeffizienten in zellulären Dimensionen hyperbolisch abfällt: Bereits bei 20  $\mu\text{m}$  beträgt die Geschwindigkeit nur noch 3% des Anfangswertes. Folglich gibt es einen kritischen Diffusionsabstand im Gewebe, ab dem die Zellen nicht mehr genug Sauerstoff erhalten. Dies heißt auch, dass eine ruhende wässrige Schicht von nur etwa 50 bis 100  $\mu\text{m}$ , die sich beispielsweise stets über dem hypoxischen Wundboden einer chronischen Wunde bildet, für Zellen bezüglich der diffusiven Sauerstoffversorgung eine absolute Sperre darstellt. Gelingt es andererseits, den Diffusionsabstand zu verringern, so wird eine überproportional verbesserte zelluläre Sauerstoffversorgung erreicht.

Im Übrigen ergibt sich ein kritischer Diffusionsabstand des Sauerstoffs auch aus experimentellen Untersuchungen: Jünger et al. [21] haben an chronisch-venös insuffizientem Gewebe (Wunden) gleichzeitig die Kapillardichte und den Sauerstoffpartial-

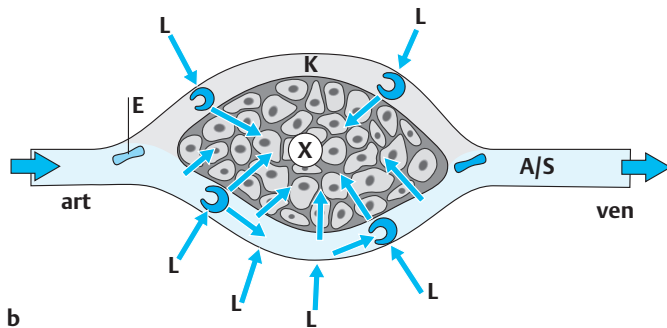


Abb. 4b Schema zur Erklärung der Effizienz im Blutplasma gelöster künstlicher Sauerstoffträger, Pfeile symbolisieren die Sauerstoff-Diffusion. art: arterieller Zufluss, K: Kapillare, ven: venöser Abfluss, E: Erythrozyt, X: Gewebe, L: Lunge, A: Blut-Additiv, S: „Blut-Substitut“.

druck transkutan bestimmt. Letzterer nimmt mit der Kapillardichte ab; die Kapillaren degenerieren. Für reparative Vorgänge in der Wunde ist wenigstens ein Sauerstoffpartialdruck zwischen 35 und 40 Torr notwendig [22]. Dies entspricht einer kritischen Kapillardichte von 20/mm<sup>2</sup> und für dieses Gewebe einer geschätzten kritischen Diffusionsstrecke von 90 µm. In ödematösem (Schock-)Gewebe wird der interkapilläre Abstand akut vergrößert und somit die zelluläre Sauerstoffversorgung schlechter.

Es gibt insgesamt drei primäre Auslöser für eine mangelhafte zelluläre Sauerstoffversorgung: erstens eine Degeneration der Kapillaren, zweitens eine ödematöse Aufweitung des Gewebes und drittens eine Minderperfusion, beispielsweise bei Arteriosklerose. Alle drei münden in einen gemeinsamen Endzustand, nämlich in einen Zerfall des betroffenen Gewebes.

In Experimenten wurde gezeigt, wie effektiv im Plasma gelöstes Hämoglobin Sauerstoff von kapillär-ähnlichen Röhren auch aus Erythrozyten freisetzen kann (siehe oben). Die große Effizienz gelöster Sauerstoffträger lässt sich anhand der 1. Fick'schen Gleichung qualitativ erklären. Dies ist in Abb. 4b veranschaulicht.

Die Abbildung stellt eine kapilläre Aufzweigung dar; im oberen Teil sollen gedanklich nur Erythrozyten strömen, im unteren dagegen zusätzlich ein künstlicher Sauerstoffträger, der im Blutplasma gelöst ist. Die Fick'sche Gleichung für die Diffusion des Sauerstoffs von einer (Gewebs-)Kapillare (K) in das Gewebe (X) lautet:

$$m'O_2 = DO_{2,ef} \cdot \alpha_{O_2,ef} \cdot (F_{ef}/d_{ef}) \cdot (pO_{2,K,ef} - pO_{2,X,ef})$$

Die Gleichung enthält hier effektive (ef) Größen:  $m'O_2$  ist der Sauerstoffstrom ( $d(mO_2)/dt$ ),  $DO_2$  der Diffusionskoeffizient des Sauerstoffs,  $\alpha_{O_2}$  sein Löslichkeitskoeffizient sowie  $pO_{2,K}$  und  $pO_{2,X}$  der kapilläre und der gewebliche Sauerstoffpartialdruck. Für die Sauerstoffaufnahme in der Lunge gilt die Gleichung analog.

In der unteren Kapillare wird der Sauerstoff sehr effektiv von den Erythrozyten an das Hämoglobin des Blutplasmas und von dort diffusiv an die Zellen des Gewebes abgegeben (plasmatischer und Mediator-Transport). Begünstigend kommt hinzu, dass zwar der Gehalt des Blutes an künstlichem Träger nur rund

1,5 g/dL beträgt, aber dadurch, dass sich der Träger nur im Plasma befindet, ist die wirksame Konzentration für die erleichterte Diffusion doppelt so groß bei etwa 3 g/dL. Deshalb ist nunmehr die große Oberfläche der Kapillare die Diffusionsfläche ( $F_{ef}$ ) und nicht nur die kleine Oberfläche der Erythrozyten wie in der oberen Aufzweigung. Das Schema der Abb. 4b verdeutlicht zudem, dass sich durch die Gegenwart des Trägers im Blutplasma auch der Diffusionsabstand ( $d_{ef}$ ) von der Kapillare zu den Zellen verkürzt. Somit vergrößert der Träger im Plasma den Geometriefaktor  $F_{ef}/d_{ef}$  der Fick'schen Gleichung durch zwei Effekte überproportional.

Diese Betrachtungen sind im Übrigen nicht nur für die Sauerstoffabgabe von der Kapillare an die Zellen gültig, sondern gleichermaßen auch für die Lunge, wo der Sauerstoff aus dem Alveolarraum in die Kapillare aufgenommen wird, weil ein Diffusionsvorgang keiner Gleichrichtung unterliegt. Dies untermauern insbesondere o. g. Experimente zum Lungenschock.

Im Übrigen konnte die enorme Effizienz Hämoglobin-basierter, im Blutplasma gelöster künstlicher Träger bezüglich der zellulären Sauerstoffversorgung vielfach in Tierversuchen demonstriert werden. So haben Standl et al. [7] an Hunden bei radikalem isovolämischem Austausch (bis zu einem Hämatokrit von unter 5%) mit einem vernetzten Rinder-Hämoglobin im Vergleich mit einem Plasma-Expander gezeigt, dass der mittlere muskuläre Sauerstoffpartialdruck im ersten Fall sogar zunahm, während er im zweiten Fall abnahm. Die gleiche Arbeitsgruppe fand ein ähnliches Ergebnis bei gleichem Versuchsablauf nach 95%iger Reduktion der Perfusion eines Muskels [8].

In einer weiteren Hämodilutionsstudie zeigten Standl et al., dass solche künstlichen Sauerstoffträger dem Blut selbst bezüglich der Oxygenierung überlegen sind [9], dies bei einer Konzentration des Trägers im Blutplasma von 2,6 g/dL. Die Niere bewahren diese Träger nach Ischämie vor Funktionsstörungen und Zerstörung der Zellstrukturen [23]. Im Pankreas restituieren Hämoglobin-basierte Sauerstoffträger nach hämorrhagischem Schock Schäden des mikrozirkulatorischen Systems [24].

Die Applikation des Blut-Additivs erfolgt, wie bei den Lungenschock-Versuchen an Ratten, stets als intravenöse Infusion mit möglichst großer Konzentration in einem möglichst geringen Volumen. Da das Additiv bei der vorgesehenen therapeutischen Konzentration im Blutplasma von 3 g/dL nur einen geringen onkotischen Druck ausübt, scheidet die Niere reguliert das infundierte Wasser weitgehend wieder aus. Am Ende der vollständigen Applikation ist das Blut-Additiv dem Blut des Patienten mit nur geringer Volumenvergrößerung zugesetzt, wobei sich die Fähigkeit des Blutes Sauerstoff in die Gewebe abzuliefern außerordentlich verbessert hat.

Einleitend wurde ausgeführt, dass es zwei grundsätzlich unterschiedliche Sauerstoffmangelsituationen des Organismus gibt, die mit und ohne Blutverlust, und dass es zu deren Bekämpfung zweier verschiedener Zubereitungen künstlicher Sauerstoffträger bedarf, nämlich des Sauerstoff transportierenden (iso-onkotischen) Plasma-Expanders (wie er bei der Herstellung des Blut-Additivs häufig als hochwertiges „Abfallprodukt“ anfällt) bzw. des Blut-Additivs. Somit scheint das Blut-Additiv für die Be-

kämpfung des Sauerstoffmangels nach starkem Blutverlust nicht geeignet zu sein.

Jedoch lässt sich das Blut-Additiv mit einem herkömmlichen Plasma-Expander, wie Hydroxyethyl-Stärke, mischen. Man erhält dann einen Sauerstoff transportierenden Plasma-Expander und kann mit Hilfe des Additivs auch einen Sauerstoffmangel mit Blutverlust wirksam bekämpfen. In Kombination mit einem herkömmlichen Plasma-Expander wird also das Blut-Additiv zu einem universellen künstlichen Sauerstoffträger, mit dem alle Arten des Sauerstoffmangels bekämpft werden können. Vorteil der Kombination gegenüber den bisher entwickelten Sauerstoff transportierenden Plasma-Expandern ist, dass der Arzt die Behandlung auf den Bedarf des einzelnen Falles abstimmen kann: Bei sehr großen Blutverlusten muss er mehr Additiv verabreichen als bei geringeren Verlusten.

Wie im Ergebnisteil dargelegt, wurden wichtige physiko-chemische Eigenschaften des neuartigen Trägers nicht nur *in vitro* in einer elektrolytischen Lösung (AE) vermessen, sondern es diente als Lösungsmittel auch humanes Blutplasma. Die vergleichenden Messungen zeigten hierbei, dass die Zunahme der kinematischen Viskosität und des onkotischen Drucks im Humanplasma andere, nämlich größere Werte aufwies als in der einfachen Elektrolyt-Lösung. Entscheidend für eine Anwendung im Organismus sind jedoch allein die Eigenschaften in Human-Plasma. Nach unserer Kenntnis wurden bisher derartige simulierte *in-vivo*-Messungen zur Charakterisierung künstlicher Sauerstoffträger nicht durchgeführt.

Die geringe, aber bestimmte Erhöhung des onkotischen Drucks hat unseres Erachtens einen wünschenswerten Effekt. In jedem Sauerstoffmangel-Gewebe kommt es in gewissem Grade schließlich auch zu struktureller Zerstörung, so dass die Semi-permeabilität der Gefäßwände leidet. Dies führt zur Ödembildung und infolge zur Vergrößerung des interkapillären Abstandes, was – wie oben erläutert – die diffusive zelluläre Sauerstoffversorgung verschlechtert. Eine Hyperonkosie des Blutes bewirkt umgekehrt einen Sog für die interstitielle Flüssigkeit des Gewebes zurück in das Gefäßsystem, der den interkapillären Abstand verringert und die diffusive Sauerstoffversorgung der Zellen verbessert. Insofern wirkt eine bestimmte geringe Hyperonkosie des Blutes durch den zugesetzten künstlichen Sauerstoffträger synergetisch zu seiner Aufgabe.

Wir hatten festgestellt, dass nach intravenöser Verabreichung des Trägers in zwei Selbstversuchen in einem klassischen Immunisierungs-Schema keine Zeichen einer Immunreaktion erkennbar waren. Wir führen dies auf die große molekulare Ähnlichkeit des humanen und porcinen Hämoglobins zurück.

Gegenüber Human-Hämoglobin hoch sensibilisierte Mäuse zeigten auf unser Produkt sowohl bezüglich der humoralen als auch der zellulären Immunogenität eine außerordentlich geringe Reaktion. Dennoch sehen wir solche Untersuchungen kritisch, sie können die direkte Testung am Menschen nicht ersetzen, da Mäuse typischerweise anders als Menschen sind. Also weder ein positives noch ein negatives Ergebnis der Immun-Untersuchungen an Mäusen erscheinen uns zwingend übertragbar auf den Menschen, höchstens liefern sie Hinweise. Eine Immuntoleranz

könnte aber zusätzlich auch diätetisch gefördert sein (eigene Resultate an Mäusen). Allerdings sind auch in seltenen Fällen extreme Allergien gegen Nahrung vom Schwein bekannt. Ob diese aber auf dem Hämoglobin des Schweins beruht, müsste noch untersucht werden. Infrage kämen beispielsweise auch die interzelluläre Matrix und ihre Abbauprodukte.

Ein zentrales Problem, deren Beantwortung über die Wirksamkeit des Blut-Additivs entscheidet, ist, wie dessen Sauerstoff-Bindungseigenschaften ( $p_{50}$  und  $n_{50}$ ) eingestellt werden müssen, damit der künstliche Träger auch einen lokalen Sauerstoffmangel-Bereich eines Organs, beispielsweise einen Herz- oder Hirn-Infarkt, erfolgreich kompensieren kann. Denn wenn im Falle einer lokalen Infarzierung eines Organs die bekannte gewebliche Sauerstoffregulation noch intakt ist, dann drosseln alle Gewebe außer der Lunge ihre Durchblutung bei einem Sauerstoff-Überangebot (Hyperoxie) und erhöhen die Durchblutung im Falle einer Hypoxie; die Lunge reagiert umgekehrt (Euler-Liljestrand-Mechanismus).

Wird nun durch einen künstlichen Sauerstoffträger der genannten noch intakten Sauerstoffregulation eines Herzens mit lokaler Infarzierung eine Hyperoxie signalisiert, dann drosselt das betroffene Herz seine Perfusion und die Wirkung des Blut-Additivs zur Therapie des Infarktes würde (teilweise) aufgehoben. Das Blut-Additiv wurde daher derart geplant und entworfen, dass das gewebliche Sauerstoffregulationssystem nicht stimuliert wird. Kommt hingegen ein Organsystem insgesamt in Sauerstoffmangel, dann tritt das erläuterte Sauerstoffregulationsproblem nicht mehr auf.

Zur Lösung des zentralen Problems tragen mehrere gedankliche Ansätze bei. Neuere experimentelle Ergebnisse weisen darauf hin, dass nicht allein der Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ) eine Signal-Größe für die gewebliche Sauerstoffregulation ist, sondern auch der (verringerte) Sauerstoffgehalt des Blutes [25], wie im Falle einer Anämie. Von solchen Befunden ausgehend wurde daher eine neue Wirkgröße für Atemgase, insbesondere für den Sauerstoff, geschaffen, nämlich das Respirationspotenzial als multiplikative integrale Größe aus Sauerstoffpartialdruck und Sauerstoffgehalt [26–28]. Somit ist für die Wirksamkeit eines künstlichen Trägers auch der Sauerstoffgehalt des Blutes maßgebend.

Richtungsweisend für den Entwurf eines effektiven künstlichen Sauerstoffträgers waren die Untersuchungen von Conover et al. [6], gemäß derer sich ein niedriger  $p_{50}$ -Wert zwischen 15 und 20 Torr für die Oxygenierung verschiedener Organsysteme als optimal erwies. Ferner berichten Baines et al. [29], dass in der perfundierten isolierten Niere die Sauerstoffversorgung sowie die tubuläre Glucose- und Phosphat-Resorption bei Anwendung eines hochaffinen ( $p_{50} = 13$  Torr) besser als bei einem wenig affinen ( $p_{50} = 34$  Torr) Sauerstoffträger ist.

Schließlich lernen wir von der Natur (vergl. oben: Regenwurm), dass ein funktionsfähiges Sauerstofftransportsystem mit niedrigem  $p_{50}$ -Wert (9 Torr) eine sehr hohe Kooperativität ( $n_{50} = 12$ ) hat [13]. Diese Überlegungen gaben uns die Strategie für die Entwicklung unseres künstlichen Sauerstoffträgers (Blut-Additiv) vor, welches lokale hypoxische Bereiche innerhalb von Organ-

funktions-Systemen wirksam mit Sauerstoff zu versorgen vermag. Der Träger muss also bei dem vorgegebenen niedrigen  $p_{50}$ -Wert zwischen 15 und 20 Torr eine möglichst große Kooperativität besitzen. Anders formuliert: Der Träger muss genügend Sauerstoff unter nicht zu hohem Sauerstoffpartialdruck auch in die venösen Areale eines lokalen Sauerstoffmangel-Bereiches liefern.

Wir hatten in zwei Fällen in freiwilligen Selbstversuchen festgestellt, dass es nach intravenöser Verabreichung des Blut-Additivs nicht zu einer nachweisbaren Erhöhung des arteriellen Blutdrucks kam.

Eine vorübergehende Erhöhung des Blutdrucks für bis zu drei Stunden um rund 25 Torr nach Verabreichung von molekular dispersen künstlichen Sauerstoffträgern auf Basis von Hämoglobin wurde insbesondere an narkotisierten Ratten gefunden, siehe z. B. [30, 31]. Die Untersuchungen zeigen, dass sich der Effekt mit der (hydrodynamischen) Molekülgröße des Sauerstoffträgers verringert und zeitlich verkürzt, wobei die Vernetzung des Hämoglobins sehr wirksam ist. Sakai et al. haben den Einfluss der Molekülgröße systematisch an Goldhamstern untersucht und den Blutdruck sowie die Kaliberänderung von Arteriolen (mit 158  $\mu\text{m}$  Durchmesser) gemessen [32]. Sie untersuchten verschiedene Hämoglobin-Derivate und Hämosomen mit Durchmessern von 7 bis 68 bzw. 224 nm. Mit Verringerung der Größe der Moleküle/Hämosomen nahmen die Blutdruckerhöhung zu und der Arteriolendurchmesser ab, wobei die Effekte nach zwei Stunden am größten waren. Keinen Blutdruck-Effekt fanden Matheson et al. an wachen und narkotisierten Katzen nach Infusion eines vernetzten Human-Hämoglobins, welches das Retentat einer Ultrafiltration über Filtern mit einer nominellen Molekulargewichts-Trenngrenze von 300 kDa war [33]. Das Produkt hat einen  $p_{50}$ -Wert von etwa 4 Torr und besitzt keine Kooperativität.

Es gibt eine Hypothese, die die genannten Effekte schlüssig erklärt: Hämoglobin und seine Derivate dringen abhängig von der Molekülgröße in unterschiedlichem Ausmaß in die Wand der arteriellen Gefäße ein (Extravasation), binden dort das vorhandene Stickstoffmonoxid (NO) und heben damit die relaxierende Wirkung dieser Signal-Substanz auf die glatte Muskulatur der Gefäßwand auf, was dann zu einer Gefäß-Konstriktion und einer Blutdruckerhöhung führt.

Es gibt für den beobachteten Blutdruck-Effekt noch eine weitere interessante Hypothese, nämlich die schon ausführlich diskutierte Sauerstoffregulation der Gewebe. Wird durch einen hochwirksamen künstlichen Träger dem gesamten Organismus „Hyperoxie“ signalisiert, so erhöht sich regulativ der totale periphere Widerstand und der Blutdruck nimmt zu.

Die nicht messbare Wirkung unseres Blut-Additivs auf den Blutdruck des Menschen lässt sich dadurch erklären, dass es aufgrund seines hohen Molekulargewichts und der Sperrigkeit der Träger-Moleküle nicht zur Extravasation kommt und dass den normalen Geweben durch das hoch affine Blut-Additiv keine Hyperoxie signalisiert wird, so dass die vaskuläre Konstriktion nicht stattfindet. Wir erwarten mit dem Blut-Additiv keinen Blutdruck-Effekt in der Ratte.

Unverändertes, natives Hämoglobin scheiden Maus und Ratte in weniger als 1 h aus. Das im Plasma gelöste Blut-Additiv besitzt in Ratten und Mäusen bei einer Anfangskonzentration im Plasma von 3 g/dL dagegen eine Halbwertszeit von 15 bzw. 30 h. Auch andere Autoren haben verschiedene Halbwertszeiten des gleichen Sauerstoffträgers an verschiedenen Tieren gefunden, beispielsweise rund 3,1 und 6,5 h in der Ratte bzw. der Katze für so genanntes Sebacyl-Hämoglobin [34] oder mit einem Vernetzungsprodukt davon 7 bzw. 10 h [33].

Die Halbwertszeit unseres Trägers hängt stark von der Anfangskonzentration ab: Bei 2,2 g/dL beträgt sie in der Ratte 18 h und bei 1 g/dL 9,5 h. Diese Abhängigkeit haben Keipert et al. bereits erhoben [35]: Sie finden mit einem Poly-Hämoglobin bei Anfangskonzentrationen des Trägers in Ratten von 1, 3 sowie 9,5 g/dL Halbwertszeiten von 7, 9 bzw. 30 h.

Unseres Wissens ist an der Ratte bei nur 3 g/dL Anfangskonzentration eine Halbwertszeit von 30 h bisher noch nicht erreicht worden; die große Halbwertszeit ist sogar länger als die hämosomaler Zubereitungen [36]. Wir führen die enorm große Verweildauer ebenfalls auf die besondere Struktur und Beschaffenheit des hyperpolymeren Hämoglobins zurück. Wie das elektronenmikroskopische Bild zeigt, sind die Moleküle des Blut-Additivs nicht globulär, sondern sperrige Moleküle. Darauf weist auch der Mark-Houwink-Exponent von 0,38 hin, welcher im Falle globulärer Moleküle einen Wert nahe null haben müsste. Auf der anderen Seite haben so genannte statistische Knäuel frei durchspülter, linearer Polymere einen Exponenten von meist größer als 0,7. Die Sperrigkeit des Träger-Moleküls verringert die Extravasation und hat damit eine Verlängerung der Verweildauer sowie eine Verhinderung des Blutdruck-Effektes zur Folge. Betrachtet man die vergleichenden Messungen an verschiedenen Spezies, so ist für den Menschen eine Halbwertszeit des Blut-Additivs von etwa 50 h zu erwarten, zieht man den von Chang et al. [36] ermittelten Faktor von 1,7 als Verhältnis der Halbwertszeiten des Menschen und der Ratte heran. Ursache dieser Unterschiede ist wohl die Stoffwechselaktivität, welche in der Reihenfolge Maus – Ratte – Mensch abnimmt.

Beim Abbau künstlicher Sauerstoffträger ist auch das retikuloendotheliale System (RES) betroffen. Hämoglobin-Polymere haben einen geringeren Einfluss auf das RES der Leber als Perfluorocarbone im Falle einer magnetometrischen Messung der Relaxation [37].

Für das Blut-Additiv gibt es keine klinische Indikation, die dessen unmittelbare sofortige Wirkung erforderte. Deshalb kann es als (inaktiviertes) mit Kohlenmonoxid ligandiertes Derivat, das sehr stabil ist, gelagert und auch verabreicht werden. Nach einer Applikation wird im Blut dieser Schutzligand zügig entfernt und über die Lungen abgeatmet und das Blut-Additiv so innerhalb weniger Minuten wieder aktiviert. Kohlenmonoxid ist eine endogene Substanz.

### Danksagung

Gedankt sei allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitarbeitern für ihre individuellen Beiträge zu diesem Projekt.

- <sup>1</sup> Abstracts from the IV<sup>th</sup> International Conference on Current Issues in Blood Substitute Research – Symposium CIBSR 2002, 06.–08. Juni 2002, Stockholm, Schweden. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 2003; 31: 479–523
- <sup>2</sup> Chang TMS. Oxygen Carriers. *Current Opinion in Investigational Drugs* 2002; 3: 1187–1190
- <sup>3</sup> Riess JG. Oxygen Carriers (“Blood Substitutes”) – Raison d’Etre, Chemistry, and Some Physiology. *Chemical Reviews* 2001; 101: 2797–2919
- <sup>4</sup> Farmer MC, Rudolph AS, Vandegriff KD, Hayre MD, Bayne SA, Johnson SA. Liposome-encapsulated hemoglobin: Oxygen binding properties and respiratory function. In: Chang TMS, Geyer RP (Eds). *Blood Substitutes*. New York: Dekker, 1989: 289–299
- <sup>5</sup> Page TC, Light WR, McKay CB, Hellums JD. Oxygen transport by erythrocyte/hemoglobin solution mixtures in an in vitro capillary as a model of hemoglobin-based oxygen carrier performance. *Microvascular Research* 1998; 55: 54–64
- <sup>6</sup> Conover CD, Linberg R, Shum KL, Shorr RGL. The ability of polyethylene glycol conjugated bovine hemoglobin (PEG-Hb) to adequately deliver oxygen in both exchange transfusion and top-load rat models. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Immobilization Biotechnology* 1999; 27: 93–107
- <sup>7</sup> Standl T, Reeker W, Redmann G, Kochs E, Werner C, Schulte am Esch J. Haemodynamic changes and skeletal muscle oxygen tension during complete blood exchange with ultrapurified polymerized bovine hemoglobin. *Intensive Care Medicine* 1997; 23: 856–872
- <sup>8</sup> Horn EP, Standl T, Wilhelm S, Jacobs EE, Freitag U, Freitag M, Schulte am Esch J. Bovine haemoglobin increases skeletal muscle oxygenation during 95% artificial stenosis. *Surgery* 1997; 121: 411–418
- <sup>9</sup> Standl T, Horn EP, Wilhelm S, Greim C, Freitag M, Freitag U, Sputtek A. Bovine haemoglobin is more potent than autologous red blood cells in restoring muscular tissue oxygenation after profound isovolaemic haemodilution in dogs. *Canadian Journal of Anaesthesiology* 1996; 43: 714–723
- <sup>10</sup> Barnikol WKR, Pötzschke H, Dinkelmann S, Domack U, Guth S, Burkhard O. Hyperpolymere Hämoglobine als künstliche Sauerstoffträger – Ein innovativer Ansatz der medizinischen Entwicklung. *Therapiewoche* 1996; 46: 811–815
- <sup>11</sup> Barnikol WKR, Burkhard O. Low viscosity of densely and highly polymerized human hemoglobin in aqueous solution – the problem of stability. In: Rakusan K, Biro GP, Goldstick TK, Turek Z (Eds). *Oxygen Transport to Tissues XI* (Back N et al. (Eds.). *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Volume 248). New York: Plenum, 1989: 335–340
- <sup>12</sup> Barnikol WKR, Burkhard O. Huge compact soluble molecules: A new old concept to develop an oxygen carrying blood substitute. *Biomaterials, Artificial Cells, and Artificial Organs* 1988; 16: 639–642
- <sup>13</sup> Barnikol WKR, Burkhard O. Feinstruktur der Sauerstoff-Bindung und intermolekulare Wechselwirkung des Hämoglobins im Tierreich: Regenwurm, Frosch, Ente und Forelle. *Funktionelle Biologie und Medizin* 1983; 2: 53–58
- <sup>14</sup> Poetzschke H, Barnikol WKR, Domack U, Dinkelmann S, Guth S. Molar Masses and Structure in Solution of Haemoglobin Hyperpolymers – A Common Calibration of Size Exclusion Chromatography of These Artificial Oxygen Carriers. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Immobilization Biotechnology* 1997; 25: 527–540
- <sup>15</sup> Kleinschmidt T, Sgouros JG. Hemoglobin sequences (Mini Review). *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 1987; 368: 579–615
- <sup>16</sup> Davidson KG, Bersten AD, Barr HA, Dowling KD, Nicholas TE, Doyle IR. Lung function, permeability, and surfactant composition in oleic acid-induced acute lung injury in rats. *American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology* 2000; 279: L1091–L1102
- <sup>17</sup> Barnikol WKR, Burkhard O, Pötzschke H, Domack U, Dinkelmann S, Guth S, Fiedler B, Manz B. New Artificial Oxygen Carriers Made of Pegulated Polymerised Pyridoxylated Porcine Haemoglobin (P<sub>4</sub>Hb). *Comparative Biochemistry and Physiology – Part A* 2002; 132: 185–191
- <sup>18</sup> Rosenbaum M. Entwicklung einheitlicher Polyhämoglobine und deren Struktur in Lösung. Dissertation (Dr. rer. nat.). Bayreuth: 1995
- <sup>19</sup> Barnikol WKR, Doehring W, Wahler W. Eine verbesserte Modifikation der Mikromethode nach Niesel und Thews (1961) zur Messung von O<sub>2</sub>-Hb-Bindungskurven in Vollblut und konzentrierten Hb-Lösungen. *Respiration* 1978; 36: 86–95
- <sup>20</sup> Domack U. Entwicklung und Evaluation eines künstlichen Sauerstoffträgers auf der Basis von Rinderhämoglobin. Dissertation (Dr. rer. nat.). Mainz: 1997
- <sup>21</sup> Jünger M, Hahn M, Klyscz T, Steins A. Role of microangiopathy in the development of venous leg ulcus. In: Messmer R (Ed). *Microcirculation in Chronic Venous Insufficiency* (Progress in Applied Microcirculation, Volume 23). Basel: Karger, 1999: 180–193
- <sup>22</sup> Dissemmond J. Bedeutung von Sauerstoff in der Genese und Therapie chronischer Wunden. *Hartmann Wundforum* 2001; 2: 16–19
- <sup>23</sup> Whitley D, Patterson R, Greenburg AG. Cell-free hemoglobin preserves renal function during normothermic ischemia. *Journal of Surgical Research* 1998; 77: 187–191
- <sup>24</sup> Dobschuetz E, Hoffmann T, Messmer K. Diaspirin cross-linked hemoglobin effectively restores pancreatic microcirculatory failure in hemorrhagic shock. *Anaesthesiology* 1999; 91: 1754–1762
- <sup>25</sup> Guth S. Sauerstoffabhängiger Atmungs- und Kreislauftrieb der nar-kotisierten Ratte – Systemanalyse mit Hilfe des Respiratorischen Potentials, einer neuen Kenngröße für Wirkungen der Atmungsgase. Dissertation (Dr. med.). Mainz: 1996
- <sup>26</sup> Barnikol WKR. Das respiratorische Potential: Ein neuer Begriff zur Charakterisierung des Zustandes der Atmungsgase in Körperflüssigkeiten. *Pflügers Archiv* 1991; 418: R112
- <sup>27</sup> Barnikol WKR. The respiratory potential of oxygen: A new quantity to characterize state, effects and bio-availability of oxygen. In: Erdmann W, Bruley DF (Eds). *Oxygen Transport to Tissues XIV* (Back N et al. (Eds). *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Volume 317). New York: Plenum, 1992: 473–478
- <sup>28</sup> Barnikol WKR. Das Respirationspotential: Eine neue integrative systemische Kenngröße zur funktionellen Zustandscharakterisierung respiratorischer Gase im Organismus. In: Barnikol WKR (Hrsg). *Beiträge zur klinischen Physiologie*, Band 1 (Deutsche Hochschulschriften 1243). Frankfurt a.M.: Hänssel-Hohenhausen, 1999: 1–54
- <sup>29</sup> Baines AD, Ho P. O<sub>2</sub>-affinity of crosslinked hemoglobins modifies O<sub>2</sub>-metabolism in proximal tubules. *Journal of Applied Physiology* 2003; 95: 563–570
- <sup>30</sup> Abassi Z, Kotob S, Pieruzzi F, Abouassali M, Keiser HR, Fratantoni JC, Alayash AI. Effect of polymerization on the hypertensive action of diaspirin cross-linked hemoglobin in rats. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1999; 91: 1754–1762
- <sup>31</sup> Rohlfis RJ, Bruner E, Chiu A, Gonzales A, Gonzales ML, Magde MD, Vandegriff KD, Winslow RM. Arterial pressure responses to cell-free hemoglobin solutions and the reaction with nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273: 12128–12134
- <sup>32</sup> Sakai H, Hara H, Yuasa M, Tsai AG, Takeoka SH, Tsuchida E, Intaglietta M. Molecular dimensions of Hb-based O<sub>2</sub> carriers determine constriction of resistance arteries and hypertension. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology* 2000; 279: H908–H915
- <sup>33</sup> Matheson B, Kwansa HE, Bucci E, Rebel A, Koehler RC. Vascular response to infusions of a nonextravasating hemoglobin polymer. *Journal of Applied Physiology* 2002; 93: 1479–1486
- <sup>34</sup> Bucci E, Razynska A, Kwansa H, Matheson-Urbaitis B, O’Hearne O, Ulatowski JA, Koehler RC. Production and characteristics of an infusible oxygen carrying fluid based on hemoglobin intramolecularly cross-linked with sebacic acid. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1996; 128: 146–153
- <sup>35</sup> Keipert PE, Chang TMS. Effect of partial and total isovolemic exchange transfusions in fully conscious rats using pyridoxylated polyhemoglobin solution as a colloidal oxygen-delivering blood replacement fluid. *Vox Sanguinis* 1987; 53: 7–14
- <sup>36</sup> Chang TMS, Powanda D. Analysis of polyethylen-glycol-poly lactide nano-dimension artificial red blood cells in maintaining systemic hemoglobin levels and prevention of methemoglobin formation. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology* 2003; 31: 231–247
- <sup>37</sup> Lutz J, Kettemann M, Bruch E, Barnikol WKR, Pux B. Comparison of the effect of PFC emulsions and modified hemoglobin-solutions on the phagosomal motion in sessile macrophages in the liver (Abstract). *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Immobilization Biotechnology* 1996; 24: 384