



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2005113240/14, 03.10.2003

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
03.10.2003

(30) Конвенционный приоритет:
03.10.2002 US 60/415,935

(43) Дата публикации заявки: 10.12.2005

(45) Опубликовано: 10.06.2008 Бюл. № 16

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO 97/35883, 02.10.1997, формула, описание. EP 1093720 A1, 25.04.2001, описание с.26, 33. US 5194590 A, 16.03.1993, реферат, формула, описание. US 5464814 A, 07.11.1995, формула, описание. Клиническая хирургия. / Под ред. Р.КОНДЕНА и др. - М.: Практика, 1998, с.204-208; 433-434. Интенсивная терапия. Реанимация. Первая помощь. / Под ред. В.Д.МАЛЫШЕВА. - М.: Медицина, 2000, с.142).

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу:
03.05.2005

(86) Заявка РСТ:
US 03/31377 (03.10.2003)

(87) Публикация РСТ:
WO 2004/037279 (06.05.2004)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег. № 517

(72) Автор(ы):

ГОУЛД Стивен А. (US),
ДЬЮВОСКИН Ричард Э. (US),
ДАБЛДЭЙ Марк Д. (US),
ХАЙДС Джордж А. (US)

(73) Патентообладатель(и):

НОРТФИЛД ЛЭБОРЭТЕРИЗ, ИНК. (US)

(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С МАССИВНОЙ ПОТЕРЕЙ КРОВИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к анестезиологии, реаниматологии и трансфузиологии, и может быть использовано при восполнении объема циркулирующей крови вследствие массивной кровопотери. Для этого млекопитающему вводят раствор полимеризованного гемоглобина. Введение этого средства осуществляют в таком объеме, который в

каждом конкретном случае обеспечивает поддержание артериального давления выше 60 мм рт.ст. Использование изобретения позволяет предотвратить необратимые нарушения в сердечно-сосудистой системе, которые возникают при массивной кровопотере, за счет поддержания компенсаторных реакции организма на адекватном уровне. 5 н. и 38 з.п. ф-лы, 4 ил., 5 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

A61K 38/42 (2006.01)**A61K 35/14** (2006.01)**A61P 7/08** (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2005113240/14, 03.10.2003**(24) Effective date for property rights: **03.10.2003**(30) Priority:
03.10.2002 US 60/415,935(43) Application published: **10.12.2005**(45) Date of publication: **10.06.2008 Bull. 16**(85) Commencement of national phase: **03.05.2005**(86) PCT application:
US 03/31377 (03.10.2003)(87) PCT publication:
WO 2004/037279 (06.05.2004)

Mail address:
**129090, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3,
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i
Partnery", pat.pov. E.E.Nazinoj, reg. № 517**

(72) Inventor(s):

**GOULD Stiven A. (US),
D'JuVOSKIN Richard Eh. (US),
DABLDEhJ Mark D. (US),
KhAJDS Dzhordzh A. (US)**

(73) Proprietor(s):

NORTFIELD LEhBOREhTERIZ, INK. (US)(54) **METHOD OF MEDICAL TREATMENT OF PATIENTS WITH HEAVY BLOOD LOSS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to medicine, specifically to anaesthesiology, resuscitation science and transfusiology, and can be applied for replacement of circular blood as a result heavy blood loss. For this purpose mammal is injected with polymerised haemoglobin. Injection

is made in such amount to provide in every certain case blood pressure level higher 60 mm of mercury column.

EFFECT: possibility to prevent irreversible damages of cardiovascular system caused by heavy blood loss.

43 cl, 4 dwg, 5 tbl, 8 ex

Родственная заявка

Данная заявка заявляет притязания предварительной заявки на патент США №60/415935, поданной 3 октября 2002 г.

Область изобретения

5 Изобретение относится к применению растворов гемоглобина для лечения пациентов, нуждающихся в крови или другом переносчике кислорода. Конкретнее изобретение относится к введению раствора гемоглобина пациентам, страдающим от массивной потери крови.

Уровень техники

10 Следующее описание относится к ряду ссылок по цифре в скобках. Полные описания ссылок можно найти в разделе, озаглавленном «Ссылки», непосредственно предшествующем формуле изобретения.

Решающими проблемами при реанимации в результате острой потери крови при травме и операции являются восстановление общего объема крови и поддержание способности
15 переносить кислород во избежание неадекватной доставки кислорода к тканям [1, 2, 3, 4]. Недостаточное замещение эритроцитов может привести к критическим уровням анемии, необратимой ишемии и смерти [5, 6].

Физиологические последствия глубокой анемии хорошо понятны. У хирургического пациента с кровотечением, но в остальном здорового компенсаторная реакция сердечно-сосудистой системы должна быть адекватной до тех пор, пока концентрация гемоглобина в эритроцитах (RBC) не упадет ниже 5 г/дл [26]. По мере продолжения потери крови и
20 дальнейшего падения концентрации гемоглобина RBC, компенсаторные реакции начинают отказывать [7, 8, 29, 31]. Сердечная компенсация становится неадекватной, когда концентрации гемоглобина RBC падает ниже 3,5 г/дл [32, 33, 34, 35] при уровнях
25 смертности, которые, по сообщениям, находятся в диапазоне от 50 до 95%, когда концентрации гемоглобина RBC падает ниже 3 г/дл [9, 10, 11, 12, 13, 14, 29].

Современные способы реанимации включают первоначальное бескровное (не кровью) замещение объема солевыми растворами с последующими переливаниями эритроцитов, когда имеется совместимая кровь и ее поставка адекватна [1, 2]. Целью современных
30 способов лечения является восстановление объема крови, достаточного для поддержания среднего артериального давления выше 60 мм рт.ст. и для замещения количества эритроцитов, достаточного для поддержания уровня циркулирующего гемоглобина выше 6 г/дл в соответствии с нормами Американского Общества Анестезиологов (ASA) [7] или от 7 до 10 г/дл в соответствии с нормами Согласительной конференции Национальных
35 институтов здоровья (NIH) [8]. Однако имеются случаи, когда эритроциты временно недоступны, их доставка неадекватна или их нельзя использовать вследствие несовместимости или религиозного возражения. Это может привести к требующим неотложных мер, угрожающим жизни ситуациям с величинами смертности, как сообщалось, от 50 до 95% для уровней гемоглобина ≤ 3 г/дл [9, 10, 11, 12, 13, 14]. В этих
40 ситуациях необходим заместитель цельной крови, такой как раствор для восстановления объема, а также со способностью переносить кислород. Кроме того, учитывая риски инфекции или другой токсичности, связанной с лечением для замещения крови, пациенты могут выбрать раствор переносчика кислорода для восстановления объема и способности переносить кислород, даже когда имеется цельная кровь.

45 До настоящего изобретения положительные результаты применения раствора полимеризованного гемоглобина в качестве средства для лечения пациентов с массивным кровотечением не были изучены. Хотя в патенте США №6498141 речь идет о том, что до 5 л раствора гемоглобина можно ввести пациенту, не было предложения использовать раствор полимеризованного гемоглобина для лечения пациентов, страдающих от
50 массивного кровотечения, включая тех пациентов, которые имеют общий Hb менее чем 7 г/дл. Сообщалось, что почти все пациенты с уровнем Hb менее чем 5 г/дл, которые отказываются от переливания крови, умирают без использования крайних мер, таких как гипотензивная анестезия, гипотермия, мышечный паралич и применение седативных

средств [29]. Однако несмотря на необходимость терапии без использования крови для лечения массивного кровотечения применение заменителя крови, такого как переносящий кислород раствор полимеризованного гемоглобина, не исследовалось для такого лечения.

Необходим альтернативный переносчик кислорода, который можно вводить в больших количествах и который обеспечивает немедленную, поддерживающую жизнь терапию до тех пор, пока не смогут быть восстановлены адекватные уровни эритроцитарного гемоглобина (концентрации гемоглобина в RBC).

Сущность изобретения

В одном аспекте изобретение предоставляет способ лечения млекопитающего, страдающего от угрожающего жизни уровня гемоглобина эритроцитов (Hb RBC) в результате потери крови. Способ включает введение млекопитающему раствора полимеризованного гемоглобина.

В другом аспекте изобретение предоставляет способ предотвращения анемии, необратимой ишемии или гиповолемического шока у пациента, страдающего от массивной потери крови. Способ включает введение пациенту объема раствора полимеризованного гемоглобина, достаточного для поддержания общего Hb выше 5,0 г/дл и артериального давления выше 60 мм рт.ст.

В еще одном аспекте изобретение предоставляет способ поддержания средних уровней циркулирующего Hb выше 5,0 г/дл у пациента, страдающего от массивной потери крови.

Способ включает введение пациенту раствора полимеризованного гемоглобина в количестве, по меньшей мере, одного объема крови пациента.

Кроме того, изобретение предоставляет способ лечения человека, имеющего концентрацию гемоглобина ниже примерно 7 г/дл в результате массивной потери крови. Способ включает введение человеку раствора полимеризованного гемоглобина.

В еще одном аспекте изобретение предоставляет способ поддержания жизни у человека, страдающего от массивной потери крови. Способ включает предотвращение гиповолемического шока и дальнейшего снижения артериального давления введением человеку раствора полимеризованного гемоглобина.

В различных аспектах раствор гемоглобина может представлять собой бесклеточный раствор, включающий по существу раствор лишенного тетрамеров поперечно сшитого полимеризованного гемоглобина, который по существу лишен стромы и других примесей. Раствор гемоглобина можно вводить в количестве, по меньшей мере, 5 л или, по меньшей мере, одного объема крови пациента. Введение раствора гемоглобина может поддерживать средний уровень циркулирующего гемоглобина более чем 5,0 г/дл и артериального давления выше 60 мм рт.ст. Раствор гемоглобина можно вводить со скоростью, по меньшей мере, 2 единицы/мин, и можно избежать токсичности, связанной с сужением сосудов и нарушением функции почек, поджелудочной железы, желудочно-кишечного тракта и сердца.

Кроме того, полимеризованный гемоглобин может иметь распределение по молекулярной массе:

(а) примерно от 5 до 30 мас.% полимеризованного гемоглобина полимера, имеющего молекулярную массу примерно 128 кДа;

(b) примерно от 15 до 30 мас.% полимеризованного гемоглобина полимера, имеющего молекулярную массу примерно 192 кДа; и

(с) примерно от 35 до 75 мас.% полимеризованного гемоглобина полимера, имеющего молекулярную массу примерно 256 кДа.

Краткое описание чертежей

Конкретные варианты реализации изобретения описаны со ссылкой на следующие чертежи, на которых:

Фиг.1 представляет собой график, изображающий зависимость средней концентрации гемоглобина в плазме ($\pm$ стандартное отклонение) от дозы раствора полимеризованного гемоглобина. Одна единица раствора полимеризованного гемоглобина содержит 50 г полимеризованного гемоглобина в 0,5 л.

Фиг.2 представляет собой график, изображающий зависимость средней концентрации общего гемоглобина ($\pm$ стандартное отклонение) и концентрации гемоглобина RBC (пунктирная линия) от дозы раствора полимеризованного гемоглобина. Заштрихованная область представляет указатель эталонной концентрации 7-10 г/дл в соответствии с
 5 Согласительным заявлением NIH. Пунктирная линия представляет угрожающий жизни уровень 3 г/дл. Одна единица раствора полимеризованного гемоглобина содержит 50 г полимеризованного гемоглобина в 0,5 л.

Фиг.3 представляет собой график, изображающий данные по отдельным пациентам для 40 пациентов с раствором гемоглобина RBC с самым низким уровнем гемоглобина ≤ 3
 10 г/дл, показывающий концентрацию общего гемоглобина как сумму концентрации гемоглобина RBC и концентрации гемоглобина в плазме. Линия представляет угрожающий жизни уровень 3 г/дл.

Фиг.4 представляет собой логистическую регрессию, показывающую смертность у пациентов, которые получали PolyHeme®, и у анамнестических контролей. Смертность
 15 увеличивается в обеих группах по мере того, как падает концентрация гемоглобина RBC. Кривые начинают разделяться при концентрации гемоглобина RBC примерно 7,0 г/дл и становятся значимо различными ($p < 0,05$) при концентрации гемоглобина RBC ниже примерно 5,0 г/дл.

Подробное описание

20 Перед дальнейшим подробным описанием настоящего изобретения будет определен ряд терминов. До тех пор пока это яснее не диктуется контекстом, используемые в настоящем описании формы единственного числа включают формы множественного числа.

Используемый в настоящем описании термин «поперечно сшитый» означает химическое
 25 размещение молекулярных «мостиков» на молекуле или в молекулу, или между молекулами с целью изменения формы, размера, функции или физических характеристик молекулы. Поперечно сшитые молекулы могут быть полимеризованы или не полимеризованы, т.е., поперечно сшитые молекулы могут быть тетрамерными.

Используемый в настоящем описании термин «тетрамер» относится к молекулам
 30 гемоглобина, имеющим молекулярную массу примерно 64 кДа; то есть термин относится и к нативным и к внутримолекулярно поперечно сшитым молекулам гемоглобина.

Используемый в настоящем описании термин «по существу свободный от тетрамера» обозначает уровень чистоты в отношении примеси тетрамеров, при котором определенные биологические реакции на тетрамер, введенный млекопитающему, больше не
 35 присутствуют. Основным критерием является отсутствие изменений почечной функции, когда вливаются фармацевтически эффективные количества, то есть на уровне чистоты примерно 99% или лучше (присутствует менее чем примерно 1% тетрамера).

Предпочтительный продукт, получаемый способом изобретения, содержит не более чем примерно 0,8% тетрамера на основании массы общего гемоглобина (THb). Другими
 40 словами, по существу свободный от тетрамера продукт в соответствии с изобретением содержит не более чем физиологически приемлемые количества тетрамера неполимеризованного гемоглобина. Особенно предпочтительные продукты изобретения содержат менее чем примерно 0,5% тетрамера; наиболее предпочтительные продукты изобретения содержат примерно 0,3-0,4% тетрамера. Было обнаружено, что такие
 45 количества тетрамера являются физиологически приемлемыми.

Используемый в настоящем описании термин «сверх очищенный продукт» и «очищенный продукт» имеют такое же значение, что и термин «по существу свободный от тетрамера».

Используемый в настоящем описании % общего гемоглобина (THb) определяется в виде
 50 граммов гемоглобина/100 мл раствора.

Используемый в настоящем описании термин «полимеризующий раствор» означает раствор, содержащий «поперечно сшивающий» или полимеризующий агент, такой как глутаральдегид, сложные имидоэфиры, диаспирин или другие, в биологически приемлемом

носителе.

Используемый в настоящем описании термин «полимеризованный» означает размещение молекулярных мостиков между молекулами или тетрамерными субъединицами, где размер и масса полученной в результате полимеризованной молекулы увеличивается в отношении нативного или тетрамерного гемоглобина. Полимеризованный гемоглобин не является тетрамерным гемоглобином.

Пациенты, страдающие от массивной потери крови, немедленно нуждаются в крови или альтернативном носителе кислорода. Было обнаружено, что растворы полимеризованного гемоглобина можно применять для лечения таких пациентов вместо предоставления растворов, не содержащих крови, с последующим вливанием RBC. В способе по изобретению было обнаружено, что, по меньшей мере, до 20 единиц (10 л) или примерно 2 объема крови пациента можно ввести пациентам с массивным кровотечением в виде раствора полимеризованного гемоглобина вместо эритроцитов в качестве исходного замещения переноса кислорода. Способ может сохранить жизнь во время быстрого, массивного кровотечения у пациентов с угрожающими жизни уровнями концентрации гемоглобина RBC, которые не получают эритроциты. Альтернативно полимеризованный гемоглобин можно вводить в соответствии с изобретением в комбинации с эритроцитами. Введение полимеризованного гемоглобина может быть приблизительно в то же время или по существу перед или после введения эритроцитов.

Для того чтобы быть полезным для лечения пациентов с массивной потерей крови, раствор полимеризованного гемоглобина представляет собой предпочтительно переносящую кислород реанимационную жидкость, универсально совместимую, немедленно доступную и не вызывающую заболеваний. Раствор предпочтительно может вливаться быстро и в массивных количествах, и раствор должен избегать токсических воздействий, наблюдавшихся ранее при использовании не модифицированного гемоглобина [16, 17, 18, 19] и в недавно проведенных испытаниях модифицированного гемоглобина [20, 21, 22, 23]. Указанные токсические воздействия включают сужение сосудов и нарушением функции почек, поджелудочной железы, желудочно-кишечного тракта и сердца. Тетрамерные виды гемоглобина с низкой молекулярной массой были связаны с указанными непереносимыми побочными эффектами.

В одном аспекте изобретения раствор полимеризованного гемоглобина имеет следующие общие характеристики, показанные в таблице 1.

Таблица 1	
Общий гемоглобин (г/дл) ¹	9,5-12,0
Метгемоглобин (% общего Hb) ¹	<8,0
Карбоксигемоглобин (% общего Hb) ¹	<0,5
P ₅₀ (торр) ¹	23-32
Осмоляльность (моль/кг) ²	280-360
Натрий (моль/л) ³	135-155
Калий (моль/л) ³	3,5-4,5
Хлорид (моль/л) ³	85-110
Свободное железо (м.д.) ⁴	<2,0
Распределение молекулярной массы - максимум 128 кДа (%) ⁵	5-30
Распределение молекулярной массы - максимум 192 кДа (%) ⁵	15-35
Распределение молекулярной массы - максимум 256 кДа (%) ⁵	35-75
Тетрамер (64K) (%) ⁵	<1,0
Фосфолипиды (нг/Hb) ⁶	<50
Гликолипиды (нг/Hb) ⁶	<2
1 - определен спектрофотометрически.	
2 - определен осмометрией.	
3 - определен ионно-специфическим электродом.	
4 - определено атомной абсорбцией.	
5 - определено ВЭЖХ с исключением по размеру, мас.% полимеризованного гемоглобина.	
6 - определены ВЭЖХ.	

Один пример раствора гемоглобина, который можно использовать в изобретении, представляет собой PolyHeme® (Northfield Laboratories, Inc., Evanston, Illinois). PolyHeme® представляет собой стерильный, апирогенный, изотонический и изоонкотический раствор гемоглобина. Раствор принимает и отдает кислород аналогично эритроцитам, что является

5 основным требованием к любому переносчику кислорода [15, 24, 36, 37]. Некоторые свойства единицы этого раствора гемоглобина сведены в таблице 2.

Таблица 2	
Характеристики PolyHeme®	
Показатель (на единицу)	Данные измерения
Объем	500 мл
Масса гемоглобина	50 г
Концентрация Hb	10 г/дл
P ₅₀	26-32 мм рт.ст.
Концентрация Met Hb (мас./мас.)	<8,0%
Концентрация тетрамера (мас./мас.)	≤1,0%
Период полувыведения (t _{1/2})	24 ч
Срок хранения	>1 года
P ₅₀ =напряжение кислорода при насыщении гемоглобина 50%	

Получение PolyHeme® предназначено для того, чтобы избежать токсичных воздействий, обычно связанных с раствором гемоглобина, и включает полимеризацию

20 глутаральдегидом и последующую очистку для удаления всего неполимеризованного тетрамера. Ранний опыт показал, что вливание до 6 единиц (300 г, 3 л) PolyHeme® при неотложной помощи в случаях потери крови хорошо переносилось и помогало избежать токсических воздействий, связанных с растворами гемоглобина [24, 25]. Препарат

25 подходящих растворов гемоглобина, таких как PolyHeme®, можно получить, как показано в примере 8.

1 единица PolyHeme® представляет собой раствор, содержащий 50 г гемоглобина в 500 мл (10 г/дл). Это эквивалентно массе гемоглобина, функционально доставленной при переливании 1 единицы эритроцитов. PolyHeme® имеет срок хранения более чем 1 год при 2-8°C.

30 Специалистам в данной области известны другие растворы гемоглобина, включающие растворы гемоглобина, полученные из не человеческой крови. Эти растворы можно использовать для способа настоящего изобретения при условии, что их можно быстро влить и в массивных количествах, и растворы помогают избежать токсических

35 воздействий, обычно связанных с растворами гемоглобина. Кроме того, такие растворы должны принимать и отдавать кислород аналогично эритроцитам.

Пациенты, страдающие от угрожающей жизни потери крови, в целом признаются как те пациенты, которые потеряли, по меньшей мере, примерно 60% одного объема крови или обычно примерно один полный объем крови (один полный объем крови составляет

40 примерно 5 л у человека массой 70 кг). Объем будет варьироваться в зависимости от размера и других факторов. Потеря крови в таком количестве представляет собой обычно результат травмы, кровотечения или операции. Пациенты, страдающие от массивной потери крови, могут получить раствор гемоглобина вместо эритроцитов в качестве

45 первоначальной замены переносящего кислород субстрата. Быстрое введение раствора гемоглобина можно осуществить способами, часто используемыми для инфузионной/трансфузионной терапии. Было обнаружено, что пациенты, страдающие от массивной потери крови, переносят вливание полимеризованного гемоглобина со скоростью двух единиц или более/мин.

Когда эритроциты временно недоступны или их нельзя применять, было показано, что

50 вливание раствора гемоглобина, такого как PolyHeme®, улучшает выживание у пациентов, имеющих перед вливанием концентрации гемоглобина RBC ниже примерно 5 г/дл. В различных вариантах реализации изобретения пациент может получить до 20 единиц (1000 г, 10 л) раствора гемоглобина, такого как PolyHeme®. Поскольку средний объем крови у здорового человека составляет приблизительно 10 единиц или 5 л, это представляет

массивное переливание с обменом примерно двух общих объемов крови.

В соответствии с настоящим изобретением вливание раствора полимеризованного гемоглобина поддерживает концентрацию общего гемоглобина в терапевтически адекватном диапазоне ($>5,0$ г/дл), даже хотя пациенты имеют концентрацию гемоглобина RBC ≤ 3 г/дл. На фиг.3 показан существенный резерв концентрации гемоглобина, обеспечиваемый PolyHeme®, у каждого из различных индивидуумов при таких критически низких уровнях концентрации гемоглобина RBC.

На фиг.4 показано сравнение смертности пациентов, не получающих лечение, и пациентов, получающих PolyHeme®. Хотя смертность возрастает по мере падения концентрации гемоглобина RBC в обеих группах, кривые начинают разделяться по мере того как концентрация гемоглобина падает ниже примерно 7 г/дл и становятся значительно разными ниже уровня концентрации гемоглобина 5 г/дл, когда смертность снижается у пациентов, получающих PolyHeme®. Данное наблюдение согласуется с физиологическими наблюдениями, документирующими адекватную сердечно-сосудистую компенсацию при концентрации гемоглобина 5 г/дл [26].

Растворы гемоглобина могут упростить и содействовать раннему лечению требующей неотложных вмешательств потери крови обеспечением возможности немедленного, быстрого и одновременного увеличения объема и замещения гемоглобина без переливания эритроцитов. Такие растворы способны помочь избежать начала угрожающей жизни анемии и последующей гибели до тех пор, пока критическое кровотечение можно будет остановить хирургически и будут доступны переливания эритроцитов. Использование растворов гемоглобина для обеспечения поддерживающей жизнь терапии поддержанием адекватной концентрации общего гемоглобина во время требующего неотложных вмешательств кровотечения целесообразно, даже если период наблюдения требует последующего переливания эритроцитов. Дополнительными выгодами применения растворов гемоглобина в сравнении с RBC являются возможность хранения, безопасность во время введения и возможность избежать канцелярских ошибок во время такого продолжающегося массивного кровотечения.

Примеры

Пример 1 - Популяции исследования

30-дневную смертность у пациентов, получавших PolyHeme®, сравнивали с анамнестической контрольной группой пациентов, которые отказались от переливания крови по религиозным причинам. Подходящими считали пациентов мужского и женского пола в возрасте, по меньшей мере, 18 лет на основании следующих критериев включения: требующая неотложных вмешательств потеря крови вследствие травмы и/или операции, клиническое решение о необходимости неотложного переливания в предвидении низкой концентрации гемоглобина и/или систолическое артериальное давление <100 мм рт.ст. вследствие потери крови. Критерии исключения включали: тяжелую травму головы (балльная оценка по шкале комы Глазго ≤ 8), отсутствие острой потери крови, признаки или симптомы тяжелой дисфункции органов или беременность. Исследование проводили в травматологических центрах I уровня, сертифицированных Американской коллегией хирургов, и специализированных учреждениях третичной медицинской помощи.

Имеется множество сообщений в литературе, описывающих объединенный исход у пациентов с кровотечением, которые отказались от переливания крови по религиозным соображениям. Было выбрано одно исследование в качестве основы для сравнения, потому что данные получены одним исследователем и, таким образом, методология, использованная при сборе и анализе данных, стандартизирована [29]. В дополнение к самой большой серии пациентов ($n=300$) с концентрацией гемоглобина ≤ 8 г/дл, используются действительные измерения концентрации гемоглобина у отдельных пациентов в отличие от объединенной классификации в других сообщениях. Общие демографические и медицинские характеристики в группах лечения и анамнестического контроля представляли собой возраст, балльная оценка физического состояния ASA, риск сердечно-сосудистой патологии или ее наличие в анамнезе, дата поступления, пол, раса

и адрес больницы. Хотя эти 2 группы отличались по всем указанным параметрам, подтверждающее моделирование определило, что ни один из указанных параметров не изменил исход первоначального анализа. Важной аналогией является прогрессирующая потеря крови в хирургической клинике, не сопровождающаяся замещением эритроцитов.

- 5 Хотя за последние годы произошли подвижки в интенсивной терапии, сохраняется высокая смертность, связанная с прогрессирующей анемией, особенно при уровнях концентрации гемоглобина ≤ 3 г/дл.

Пример 2 - Методы

- 10 Все пациенты, которым вводили PolyHeme®, получали одинаковое лечение в соответствии с руководствами «Поддержание жизни при тяжелых травмах» и Американской ассоциации банков крови по жидкостной и трансфузионной терапии, за исключением того, что PolyHeme® вливали вместо эритроцитов, когда принималось клиническое решение о том, что было показано лечение переливанием переносчика кислорода. Все пациенты получали вливания 1-2 л кристаллоида в качестве первоначального замещения у них
- 15 объема. Показание для вливания PolyHeme® и его частота зависели от клинического состояния пациента. Пациенты могли получать до 1, 3, 6, 10 и, наконец, 20 единиц (1000 г, 10 л) PolyHeme® по мере увеличения допустимой дозы. Если пациенты требовали дополнительной терапии переносчиком кислорода, после того как была достигнута максимальная доза, по показаниям переливали эритроциты. По показаниям вводили
- 20 факторы свертывания и тромбоциты после высокого объема потери крови. PolyHeme® вливали перед операцией, во время операции и после операции для пробуждения наркотизированных пациентов в палатах неотложного лечения, операционных и отделениях интенсивной терапии.

Пример 3 - Определения гемоглобина

- 25 Как показано в уравнении ниже, после вливания PolyHeme® общий гемоглобин равен сумме гемоглобина, переносимого эритроцитами, и PolyHeme® в плазме.

Концентрация общего гемоглобина = концентрация гемоглобина RBC + концентрация гемоглобина PolyHeme®

- 30 Плазму и эритроциты разделяли для количественной характеристики гемоглобина, переносимого каждым компонентом. Концентрацию общего гемоглобина и концентрацию гемоглобина плазмы определяли соответственно в образцах цельной крови и плазмы с использованием автоматизированных счетчиков клеток. Концентрацию гемоглобина RBC получали из гематокрита (Hct), измеренного счетчиком клеток в виде $Hct/3$. Поэтому можно было документировать прогрессирующее падение концентрации гемоглобина RBC,
- 35 которое происходит вследствие продолжающейся потери крови, нелеченной замещением эритроцитов, и наблюдать воздействие PolyHeme® в плазме при поддержании концентрации общего гемоглобина.

Пример 4 - Статистический анализ

- 40 Средняя величина и стандартное отклонение представлены для непрерывных переменных величин, а частота и процент представлены для номинальных переменных величин.

- Логистическую регрессию использовали для анализа смертности. Использовали условия для группы лечения (PolyHeme® или анамнестический контроль), самую низкую концентрацию гемоглобина RBC и их взаимодействие. Взаимодействие между
- 45 концентрацией гемоглобина RBC и группой лечения считается целесообразным для анализа смертности, потому что при достаточно высокой концентрации гемоглобина пациенту не будет угрожать риск смерти вследствие анемии, и по мере снижения концентрации гемоглобина ожидается увеличение риска смерти. Пациенты, у которых концентрация гемоглобина RBC была >8 г/дл, не были включены, поскольку им не
- 50 угрожал риск смерти вследствие анемии.

Подтверждающий анализ проводили для испытания того, могли ли какие-либо наблюдавшиеся различия быть вызваны параметрами демографических/медицинских характеристик. Параметры, имеющиеся в группе лечения и анамнестического контроля,

представляли собой возраст, балльную оценку физического состояния ASA, риск сердечно-сосудистой патологии, пол, больницу, расу и год операции. Каждый из указанных параметров с их взаимодействием с концентрацией гемоглобина RBC и лечением испытывали отдельно на предварительных моделях. В последующем все значимые демографические параметры были включены в полный логистический регрессионный анализ.

Пример 5 - Результаты

Возраст 171 пациента находился в диапазоне от 17 до 85 лет. Этиология потери крови у этих пациентов включала тупую травму (n=86), проникающую травму (n=41) и нетравматическое происхождение (n=44). Доза PolyHeme®, которую получал 171 пациент, показана в таблице 3. Максимальная скорость вливания составляла приблизительно 2 единицы (100 г, 1 л) в минуту при неостанавливаемом кровотечении.

Таблица 3			
Влитая доза PolyHeme®			
Единицы	Масса (г)	Объем (л)	Реципиенты
1-2	50-100	0,5-1,0	45
3-4	150-200	1,5-2,0	45
5-9	250-450	2,5-4,5	47
10-20	500-1000	5,0-10,0	34

Эффекты гемоглобина показаны на фиг.1, 2 и 3. Увеличение концентрации гемоглобина плазмы с увеличением доз PolyHeme® показано на фиг.1. Максимальная концентрация гемоглобина плазмы была 8,0 г/дл у одного пациента, который получил 8 единиц (400 г, 4 л) PolyHeme®. Максимальная средняя концентрация гемоглобина плазмы была $5,9 \pm 1,1$ г/дл у группы пациентов, которые получали 20 единиц (1000 г, 10 л) PolyHeme®, отражая равновесие между продолжающейся потерей крови и замещением.

Связь между концентрацией общего гемоглобина и концентрацией гемоглобина RBC для всех пациентов показано на фиг.2. Чертеж иллюстрирует, что концентрация гемоглобина RBC падает вследствие прогрессирующего кровотечения без переливания эритроцитов, концентрация общего гемоглобина поддерживается в диапазоне от 7 до 10 г/дл вливанием PolyHeme®. При кровотечении, требующем более чем 6 единиц (300 г, 3 л) PolyHeme®, концентрация гемоглобина RBC падает ниже угрожающего жизни уровня 3 г/дл.

Было 40 пациентов, у которых концентрация гемоглобина RBC была ≤ 3 г/дл. На фиг.3 показана концентрация общего гемоглобина для каждого отдельного пациента в виде суммы концентрации гемоглобина RBC и концентрации гемоглобина плазмы. У пациента на правом крайнем конце концентрация гемоглобина RBC была 0,2 г/дл при концентрации общего гемоглобина 7,5 г/дл. У 29 пациентов концентрация общего гемоглобина была ≥ 6 г/дл. Из 11 пациентов с концентрацией общего гемоглобина < 6 г/дл только 1 пациент получил полную дозу 20 единиц (1000 г, 10 л). У всех пациентов концентрация общего гемоглобина была значительно больше, чем критический уровень 3 г/дл.

Данные смертности показаны в таблице 4. Всего было 18 случаев смерти из 171 пациентов при смертности 10,5%. Хотя смертность увеличивалась по мере падения концентрации гемоглобина RBC, ее дальнейшего увеличения не было, когда концентрация гемоглобина RBC падала ниже 3 г/дл. 9 пациентов из 12 с концентрацией гемоглобина RBC ≤ 1 г/дл выжили.

Таблица 4			
Кумулятивная смертность при самом низком уровне гемоглобина RBC после вливания у пациентов, получавших PolyHeme® (N=171)			
Концентрации гемоглобина RBC (г/дл)	Случаи смерти/количество пациентов	Смертность (%)	95% CI (%)
$\leq 12,0$	18/171	10,5	6,4 до 16,1
$\leq 11,0$	18/170	10,6	6,4 до 16,4
$\leq 10,0$	18/165	10,9	6,6 до 16,7
$\leq 9,0$	18/158	11,4	6,9 до 17,4
$\leq 8,0$	16/150	10,7	6,2 до 16,8
$\leq 7,0$	15/133	11,3	6,5 до 17,9
$\leq 6,0$	14/100	14,0	7,8 до 22,2

≤5,0	14/84	16,7	9,3 до 26,1
≤4,0	13/62	21,0	11,5 до 32,7
≤3,0	10/40	25,0	12,7 до 41,2
≤2,0	8/30	26,7	12,3 до 45,9
≤1,0	3/12	25,0	5,5 до 57,2
CI = доверительный интервал.			

Случаи смерти происходили на ранней стадии (0-й день - 1-й день), вследствие обескровливания, включая один, который произошел в результате неизвестного ранее существовавшего заболевания печени, которое нарушило гемостаз. 3 случая смерти произошли на промежуточной стадии (1-й день - 7-й день). Один случай был вследствие обескровливания, и 2 других были вследствие имевшейся травмы. 5 случаев смерти произошли на поздней стадии (7-й день или позднее). 4 случая были вследствие недостаточности множества органов, и 1 был вследствие осложнений ранее существовавшего легочного фиброза. Ни один случай смерти не считался вызванным PolyHeme®.

Пример 6 - Анамнестические контроли

В таблице 5 показаны данные смертности для 300 анамнестических контрольных пациентов. Всего было 48 случаев смерти при смертности 16,0%. Наблюдалось значительное увеличение смертности по мере падения концентрации гемоглобина RBC при отсутствии выживших при концентрации гемоглобина RBC ≤2 г/дл.

Таблица 5			
Кумулятивная смертность при самом низком уровне гемоглобина RBC после вливания у анамнестических контролей (N=300)			
Концентрации гемоглобина RBC (г/дл)	Случаи смерти/количество пациентов	Смертность (%)	95% CI (%)
≤8,0	48/300	16,0	12,0 до 20,6
≤7,0	48/201	23,9	18,2 до 30,4
≤6,0	43/145	29,7	22,4 до 37,8
≤5,0	38/91	41,8	31,5 до 52,6
≤4,0	27/59	45,8	32,7 до 59,3
≤3,0	20/31	64,5	45,4 до 80,8
≤2,0	7/7	100,0	59,0 до 100,0
≤1,0	-	-	-

Пример 7 - Сравнение смертности

Логистическая регрессия дала две различных кривых (фиг.4), по одной для каждой группы лечения. Хотя смертность возрастала в обеих группах по мере снижения концентрации гемоглобина RBC, смертность в группе PolyHeme® была ниже, чем у анамнестических контролей при всех уровнях концентрации гемоглобина RBC ниже 7,3 г/дл. Это снижение достигло значимого уровня при всех уровнях концентрации гемоглобина RBC ниже 5,3 г/дл (<0,05).

Указанные 2 группы отличались по следующим демографическим и медицинским характеристикам: возраст, балльная оценка физического состояния ASA, группа лечения, самая низкая концентрация гемоглобина RBC и их взаимодействие (p<0,05). Однако подтверждающее моделирование определило, что ни один из указанных параметров не изменил исход первоначального анализа.

Пример 8 - Получение растворов гемоглобина

PolyHeme® можно получить следующими способами. Различные модификации способа описаны в патенте США №6498141, описание которого полностью включено сюда в качестве ссылки.

1. Аспирация и фильтрация клеток

Мешочки с просроченной донорской кровью прокалывают и примерно 150 мл 1% (мас./об.) водного раствора хлорида натрия вводят в мешочек. Содержимое мешочков аспирируют под пониженным давлением или вакуумом. Аспирированную кровь пропускают через 3 объемных фильтра для адсорбции лейкоцитов. Обычно примерно 225 единиц просроченной цельной крови аспирируют, фильтруют и в последующем переносят в

резервуар 1. Затем фильтры споласкивают примерно 75 л 1% (мас./об.) водным раствором хлорида натрия.

2. Промывание и лизис клеток

Перед введением крови в резервуар 1 резервуар 1 загружают примерно 40-50 л 1% водного раствора хлорида натрия. После того как все 225 единиц просроченной цельной крови были аспирированы, профильтрованы и перенесены и фильтры были сполоснуты, резервуар и связанные с ним трубки содержат примерно 365-390 л 4% раствора общего гемоглобина. Во время этапов аспирации и фильтрации, резервуар 1 поддерживают при пониженном давлении, т.е., 20-28 дюймов рт.ст. После того как вся просроченная цельная кровь перенесена в резервуар 1, вакуум отключают, и одноокись углерода вводят в резервуар так, чтобы резервуар содержал атмосферу однооксида углерода.

Резервуар 1 соединяют с проточным тангенциальным фильтром с размером пор 0,65 мкм. Исходную загрузку 365-390 л 4% раствора общего гемоглобина концентрируют приблизительно до 215-225 л 7% раствора общего гемоглобина микрофильтрацией через проточный тангенциальный фильтр. pH раствора гемоглобина в данной точке составляет примерно от 6 до 6,5. После концентрирования до 7% общего гемоглобина раствор промывают добавлением 1% (мас./об.) раствора хлорида натрия, подвергая диафильтрации и удаляя фильтрат с такой же скоростью, с которой добавляется раствор хлорида натрия. 215-225 л раствора гемоглобина обычно промывают примерно 8 объемами 1% раствора хлорида натрия (примерно 1800 л). После промывания раствор концентрируют примерно до 90-95 л, т.е., примерно 16% по общему гемоглобину, и добавляют «воду для инъекций» (WFI) для доведения объема раствора примерно до 220 л. При добавлении WFI клетки набухают и разрушаются, высвобождая гемоглобин в раствор. Концентрация полученного раствора гемоглобина составляет примерно 7% по общему гемоглобину (THb).

Полученный раствор осветляют еще при нахождении в резервуаре 1. Сначала раствор концентрируют примерно до 90 л и фильтрат переносят в резервуар 2. По мере того как раствор прокачивают через фильтр, примеси стромы эритроцитов и материал клеточных стенок задерживается и удаляется фильтром. Оставшийся 90 л раствора в резервуаре 1 промывают (диафильтруют) примерно 280 л WFI. Данный объем промывного раствора добавляют в резервуар 2. Объем, полученный в результате в резервуаре 2, составляет примерно 405-415 л 3,3% раствора общего гемоглобина.

3. Тепловая обработка

Затем полученный раствор лишенного стромы гемоглобина обрабатывают теплом в резервуаре 2 при температуре примерно 60-62°C в течение периода примерно 10 ч. В течение этого времени раствор умеренно перемешивают. По мере нагревания раствора и превышения температуры примерно 55°C, образуется осадок.

4. Осветление и снижение содержания вирусов

Затем полученный лишенный стромы, обработанный теплом 3,3% THb (мас./об.) раствор гемоглобина фильтруют через предварительный фильтр с размером пор 0,2 мкм с последующим предварительным фильтром с размером пор 0,1 мкм и затем прокачивают через ультрафильтр на 100 кДа для уменьшения содержания вирусов в резервуар 3.

5. Концентрация после ультрафильтрации

Затем профильтрованный раствор гемоглобина концентрируют до 85-105 л (примерно 14% THb) и после этого промывают и диафильтруют 4 объемами WFI (350 л).

Концентрацию и диафильтрацию осуществляют с использованием ультрафильтра молекулярной массы 10 килодальтон (кДа). Дренаж, связанный с ультрафильтром, собирает фильтрат. В этой точке раствор гемоглобина содержит менее чем 50 нг фосфолипида на 1 г гемоглобина и менее чем 2 нг гликолипида на 1 г гемоглобина (по данным тонкослойной хроматографии), менее чем 1% метгемоглобина (по данным измерения совместной оксиметрией), менее чем примерно 0,03 единиц эндотоксина на 1 мл при pH примерно от 6 до 6,5. Данный гемоглобин в растворе представляет собой в первую очередь карбоксигемоглобин.

6. Дегазация

Затем полученный раствор карбоксигемоглобина переносят в сосуд емкостью 175 л (резервуар 4). Кислород барботируют через раствор со скоростью 66 л/мин в течение 18 ч при 10°C. Полученный раствор содержит менее чем 5% карбоксигемоглобина на основании массы общего гемоглобина.

После оксигенации раствор барботируют аналогичным потоком азота в течение примерно 3-3,5 ч при 10°C до тех пор, пока менее чем 10% карбоксигемоглобина на основании массы общего гемоглобина не останется в растворе.

7. Химическая модификация

Раствор карбоксигемоглобина переносят в резервуар 5 для химической модификации. В резервуар 5, содержащий раствор карбоксигемоглобина примерно при 4°C, добавляют водный раствор пиридоксил-5-фосфата (P5P) (93,75 г/л) в молярном отношении P5P к гемоглобину от 1:1 до 3:1. Предпочтительно отношение P5P к гемоглобину 2:1.

Пиридоксилирование проводят при температуре примерно 4°C. Раствор P5P обычно добавляют в течение примерно 1 мин и смешивают в течение приблизительно 15 мин, после чего раствор боргидрида натрия/гидроокиси натрия добавляют к раствору гемоглобина при молярном отношении боргидрида натрия к гемоглобину примерно 20:1. Подходящий водный раствор боргидрида натрия/гидроокиси натрия содержит 0,8 г гидроокиси натрия на 2 л и 90,8 г боргидрида натрия на 2 л. Раствор боргидрида натрия добавляют как можно быстрее в течение периода примерно 1 мин и затем перемешивают в течение 1 ч.

8. Удаление реагента

Полученные 150 л раствора пиридоксилированного гемоглобина в последующем диалфильтруют с использованием ультрафильтра на 10 килодальтон для удаления избытка реагентов 4 объемами (600 л) WFI. Дренаж, связанный с ультрафильтром, собирает фильтрат от фильтра.

9. Концентрация полимеризованного гемоглобина

В резервуар 5, содержащий пиридоксилированный гемоглобин, добавляют количество WFI, достаточное для получения 4,5% раствора полного гемоглобина (примерно 265 л раствора гемоглобина). Раствор глутаральдегида добавляют к раствору пиридоксилированного гемоглобина в молярном отношении глутаральдегида к гемоглобину примерно 24:1. Раствор глутаральдегида обычно добавляют в течение периода примерно 2,5 ч отмеривающим насосом к раствору гемоглобина. Реакции полимеризации дают возможность протекать в течение примерно 15-18 ч. Целевое распределение молекулярной массы составляет примерно 75% полимера и 25% тетрамера. Целевые полимеры имеют молекулярные массы менее чем примерно 600000, причем преобладающая фракция молекулярных масс находится в диапазоне от 100000 до 350000.

Когда реакция полимеризации достигает целевого распределения молекулярной массы (примерно через 15-18 ч), водный глицин (примерно 166 г/л) добавляют (в качестве гасителя) к раствору гемоглобина в молярном отношении глицина к гемоглобину 140:1. Раствор pH в этой точке составляет 8,9. Затем полученный раствор смешивают в течение 30-40 мин, после чего раствор боргидрида натрия/гидроокиси натрия (имеющий определенную выше концентрацию) добавляют к раствору гемоглобина при молярном отношении боргидрида натрия к гемоглобину 28:1. Данную полученную смесь перемешивают в течение примерно 1 ч. Раствор затем концентрируют примерно до 150 л ультрафильтрацией и промывают 4 объемами (600 л) WFI. Дополнительное аликвотное количество боргидрида натрия в том же молярном соотношении, как указано выше, добавляют к концентрированному раствору и снова смешивают в течение 1 ч. Полученный раствор промывают 4 объемами WFI (600 л), приводя к получению полимеризованного, пиридоксилированного, лишённого стромы гемоглобина, который подвергся тепловой обработке.

Полученный раствор оксигенируют, давая возможность раствору стоять в атмосфере кислорода и в последующем переносят в сосуд с повторным циклом фильтрации (сосуд

10). Гемоглобин затем разбавляют примерно до 4% THb. Затем 4% раствор THb диафильтруют с использованием 10 mM NaCl/20 мкМ NaOH и фильтра для молекулярной массы 300000, имеющегося в продаже от компании Millipore Corp. Фильтрацию продолжали до тех пор, пока примерно 97% материала гемоглобина не проходило через фильтр и в резервуар 11, где он непрерывно концентрируется до 4-8% THb с использованием ультрафильтра на 70 кДа. (Примерно 3% материала, т.е. полимеры с высокой молекулярной массой, удерживается в резервуаре 10). Количество гемоглобина определяют спектрофотометрически с использованием совместного оксиметра.

Полученный материал в резервуаре 11 составляет примерно 4-8% THb и содержит примерно 25% тетрамера на основе THb. Раствор гемоглобина переносят в резервуар 12 и затем диафильтруют с использованием буфера 10 mM NaCl/20 мкМ NaOH и фильтра молекулярной массы 100000, имеющегося в продаже от компании Pall-Filtron. Фильтрацию продолжают до тех пор, пока уровень тетрамера, по данным определения хроматографией с исключением по размеру с использованием колонки TOSO BioSep TSKG-3000 SWXL 300×7,8 мм, не будет менее чем 1,0 мас.% (обычно 0,3%) гемоглобина. Полученный очищенный раствор гемоглобина остается исходно в резервуаре 11 и в последующем переносится в газообменный резервуар 8 для деоксигенации.

10. Деоксигенация

Газообменный резервуар 8 оборудован по существу таким же образом, как газообменный резервуар 4. Деоксигенацию осуществляют примерно через 2,5 ч барботированием азотом примерно при 10°C и раствором с pH примерно 8,8. Барботирование азотом продолжают до тех пор, пока в растворе не останется менее чем примерно 16% оксигемоглобина на основании массы общего гемоглобина. Полученный раствор деоксигемоглобина в последующем переносят в резервуар 9 для составления композиции.

11. Приготовление композиции

В резервуаре 9 для приготовления композиции раствор сначала концентрируют примерно до 7% общего гемоглобина. Затем растворы электролитов добавляют к раствору гемоглобина. Глюкозу и глицин добавляют для достижения конечных концентраций примерно 1 г/л и 3,5 г/л соответственно. Хлорид калия добавляют к раствору для получения концентрации калия примерно от 3,5 до 4,5 mM. 3M хлорид натрия затем добавляют для получения концентрации хлорида 85-110 mM. В последующем добавляют лактат натрия для получения концентрации иона натрия 135-155 mM. 0,45 молярный раствор аскорбиновой кислоты добавляют для подъема концентрации аскорбиновой кислоты примерно до 1000 мг/л. Аскорбиновую кислоту добавляют в качестве консерванта/антиоксиданта для хранения. pH доводят до 8,7-9,1 при 10-15°C с использованием 0,22 M NaOH. Полученный раствор гемоглобина имеет конечную осмолярность примерно 280-360 ммоль/кг.

Затем полученный раствор гемоглобина концентрируют примерно до 10% общего гемоглобина с использованием фильтра, связанного с ловушкой, и затем 10% раствор гемоглобина стерилизуют фильтрацией и в асептических условиях помещают в предварительно стерилизованные мешочки.

Учитывая широкое разнообразие вариантов реализации, к которым можно применить принципы настоящего изобретения, следует понимать, что продемонстрированные варианты реализации являются только иллюстративными и не должны восприниматься как ограничивающие объем настоящего изобретения. При отсутствии специальных указаний формулу изобретения не следует понимать как ограниченную описанным порядком или элементами. Поэтому все варианты реализации, которые входят в пределы объема и сущности следующей формулы изобретения, и ее эквиваленты заявляются как изобретение.

Источники информации

1. Moore FA, Moore EE. Trauma resuscitation. In: Wilmore DW, Cheung LY, Harken AH, Holcroft JW, Meakins JL, and Soper NJ, editors. ACS Surgery - Principles & Practice. New

York: WebMD Corporation Publication; 2002. p.31-61.

2. American College of Surgeons Committee on Trauma. Advanced Trauma Life Support Program for Physicians 1997 Instructional Manual. 6th ed. Chicago: American College of Surgeons; 1997. p.97-117.

5 3. Farion KJ, McLellan BA, Boulanger BR, Salazi JP. Changes in red cell transfusion practice among adult trauma victims. *J Trauma* 1998; 44(4):583-587.

4. Baker JB, Korn CS, Robinson K, Chan L, Henderson SO. Type and crossmatch of the trauma patient. *J Trauma* 2001; 50(5):878-881.

10 5. DeFoe GR, Ross, CS, Olmstead EM, Surgenor SD, Fillinger MP, Groom, RC, et al. Lowest hematocrit on bypass and adverse outcomes associated with coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg* 2001; 71:769-776.

6. Wu WC, Rathore SS, Wang Y, Radford MJ, Krumholz HM. Blood transfusion in elderly patients with acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2001 October 25; 345(17):1230-1236.

15 7. Practice guidelines for blood component therapy: A report by the American Society of Anesthesiologists Task Force on Blood Component Therapy. *Anesthesiology* 1996; 84(3):732-747.

8. Consensus Conference. Perioperative red blood cell transfusion. *JAMA* 1988 Nov; 260(18):2700-2703.

20 9. Gould SA, Rosen AL, Sehgal LR, Sehgal HL, Langdale LA, Krause, et al. Fluosol DA-20 as a red cell substitute in acute anemia. *N Engl J Med* 1986; 314(26):1653-1656.

10. Spence RK, McCoy S, Costabile J, Norcross ED, Pello MJ, Alexander JB, et al. Fluosol DA-20 in the treatment of severe anemia: Randomized, controlled study of 46 patients. *Crit Care Med* 1990; 18(11): 1227-1230.

25 11. Spence RK, Costabile JP, Young GS, Norcross ED, Alexander JB, Pello MJ, et al. Is hemoglobin level alone a reliable predictor of outcome in the severely anemic patient? *Am Surg* 1992; 58(2):92-95.

12. Carson JL, Poses RM, Spence RK, Bonavita G. Severity of anaemia and operative mortality and morbidity. *Lancet* 1988; 1(8588):727-729.

30 13. Carson JL, Duff A, Poses RM, Berlin JA, Spence RK, Trout R, et al. Effect of anaemia and cardiovascular disease on surgical mortality and morbidity. *Lancet* 1996; 348(9034):1055-1060.

14. Viele MK, Weiskopf RB. What can we learn about the need for transfusion from patients who refuse blood? The experience with Jehovah's Witnesses. *Transfusion* 1994; 34(5):396-401.

35 15. Sehgal LR, Gould SA, Rosen AL, Sehgal HL, Moss GS. Polymerized pyridoxylated hemoglobin: a red cell substitute with normal O₂ capacity. *Surgery* 1984; 95:433-438.

16. Amberson WR, Jennings JJ, Rhode CM. Clinical experience with hemoglobin-saline solutions. *J Appl Physiol* 1949; 1(7):469-489.

40 17. Brandt JL, Frank NR, Lictman HC. The effects of hemoglobin solutions on renal functions in man. *Blood* 1951; 6:1152-1158.

18. Miller JH, McDonald RK. The effect of hemoglobin on renal function in the human. *J Clin Invest* 1951; 30:1033-1040.

19. Savitsky JP, Docze J, Black J, Arnold JD. A clinical trial of stroma-free hemoglobin. *Clin Pharmacol Ther* 1978; 23(1):73-80.

45 20. Carmichael FJ, Ali AC, Campbell JA, Langlois SF, Willan AR, Pierce CH, et al. A phase I study of oxidized raffinose cross-linked human hemoglobin. *Crit Care Med* 2000 July; 28(7):2283-2292.

50 21. Kasper SM, Walter M, Grune F, Bischoff A, Erasmi H, and Buzello W. Effects of a hemoglobin-based oxygen carrier (HBOC-201) on hemodynamics and oxygen transport in patients undergoing preoperative hemodilution for elective abdominal aortic surgery. *Anesth Analg* 1996; 83:921-927.

22. LaMuraglia GM, O'Hara PJ, Baker WH, Naslund TC, Norris EJ, Li J, et al. The reduction of the allogenic transfusion requirement in aortic surgery with a

hemoglobin-based solution. J Vase Surg 2000 Feb; 31(2):299-308.

23. Sloan EP, Koenigsberg M, Gens D, Cipolle M, Runge J, Mallory MN, et al. Diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) in the treatment of severe traumatic hemorrhagic shock. A randomized controlled efficacy trial. JAMA 1999; 282:1857-1864.

24. Gould SA, Moore EE, Moore FA, Haenel JB, Burch JM, Sehgal H, et al. Clinical utility of human polymerized hemoglobin as a blood substitute after acute trauma and urgent surgery. J Trauma 1997; 43(2):325-332.

25. Gould SA, Moore EE, Hoyt DB, Burch JM, Haenel JB, Garcia J, et al. The first randomized trial of human polymerized hemoglobin as a blood substitute in acute trauma and emergent surgery. J Am Coll Surg 1998 August; 187(2): 113-122.

26. Vengelen-Tyler V, editor. American Association of Blood Banks Technical Manual. 13th ed. Bethesda (MD): American Association of Blood Banks; 1999:p.451-481.

27. Huston P, Peterson R. Withholding proven treatment in clinical research. N Eng J Med 2001 September 20; 345(12):912-913.

28. Emanuel EJ, Miller FG. The ethics of placebo-controlled trials - A middle ground. N Eng J Med 2001 September 20; 345(12):915-919.

29. Carson JL, Noveck H, Berlin JA, Gould SA. Mortality and morbidity in patients with very low blood counts who decline blood transfusion, Transfusion 2002; 42:812-818.

30. Reiner AP. Massive Transfusion. In: Speiss BD, Counts R, and Gould SA, editors. Perioperative Transfusion Medicine. Baltimore: Williams and Wilkins; 1998. p.351-364.

31. Weiskopf RB, Viele MK, Feiner J, Kelley S, Lieberman J, Noorani M, et al. Human cardiovascular and metabolic response to acute, severe isovolemic anemia. JAMA 1998; 279(3):217-221.

32. Wilkerson DK, Rosen AL, Sehgal LR, Gould SA, Sehgal HL, Moss GS. Limits of cardiac compensation in anemic baboons. Surgery 1988; 103(6):665-670.

33. Levy PS, Chavez RP, Crystal GJ, Kim SJ, Eckel PK, Sehgal LR, et al. Oxygen extraction ratio: A valid indicator of transfusion need in a limited coronary reserve? J Trauma 1992; 32(6):769-774.

34. Schwartz JP, Ludkowski MJ, Segil LJ, Miletich DJ, Law WR, Gould SA. The influence of coronary stenosis on transfusion need. Surg Forum 1993; XLFV:226-228.

35. Moss GS, DeWoskin R, Rosen AL, Levine H, Palani CK. Transport of oxygen and carbon dioxide by hemoglobin-saline solution in the red cell-free primate. Surg Gynecol Obstet 1976; 142:357-362.

36. Points to consider on efficacy evaluation of hemoglobin- and perfluorocarbon-based oxygen carriers. Center for Biologics Evaluation and Research. Transfixion 1994 Aug; 34(8):712-713.

37. Fratantoni JC. Red Cell Substitutes: Evolution of approaches for demonstrating efficacy. In: Tsuchida E, editor. Blood substitutes-Present and future perspectives. Switzerland: Elsevier Science SA; 1998. p.33-39.

Формула изобретения

1. Способ лечения млекопитающего, страдающего от угрожающего жизни уровня гемоглобина эритроцитов (RBC Hb) в результате потери крови, включающий введение млекопитающему раствора полимеризованного гемоглобина, где введение раствора гемоглобина поддерживает артериальное давление выше 60 мм рт.ст.

2. Способ по п.1, где раствор гемоглобина представляет собой бесклеточный раствор, включающий, по существу, раствор лишенного тетрамеров, поперечно сшитого, полимеризованного гемоглобина, который, по существу, свободен от стромы и других примесей.

3. Способ по п.1, где потеря крови представляет собой массивную потерю крови.

4. Способ по п.1, где раствор гемоглобина вводят в количестве, по меньшей мере, 5 л.

5. Способ по п.1, где раствор гемоглобина вводят в количестве, по меньшей мере, одного объема крови млекопитающего.

6. Способ по п.1, где введение раствора гемоглобина дополнительно поддерживает средний уровень циркулирующего Hb выше 5,0 г/дл.

7. Способ по п.1, где раствор гемоглобина вводят со скоростью, по меньшей мере, примерно 2 единицы/мин.

5 8. Способ по п.1, где раствор помогает избежать токсичности, связанной с сужением сосудов и нарушением функции почек, поджелудочной железы, желудочно-кишечного тракта и сердца.

9. Способ по п.1, где полимеризованный гемоглобин имеет распределение молекулярной массы:

10 (a) от 5 до 30 мас.% полимеризованного гемоглобина полимера, имеющего молекулярную массу 128 кДа;

(b) от 15 до 30 мас.% полимеризованного гемоглобина полимера, имеющего молекулярную массу 192 кДа; и

15 (c) от 35 до 75 мас.% полимеризованного гемоглобина полимера, имеющего молекулярную массу 256 кДа.

10. Способ по п.1, где угрожающий жизни уровень RBC Hb составляет менее чем 3,0 г/дл.

11. Способ предотвращения анемии, необратимой ишемии или гиповолемического шока у пациента, страдающего от массивной потери крови, включающий введение пациенту 20 объема раствора полимеризованного гемоглобина, достаточного для поддержания общего Hb выше 5,0 г/дл и артериального давления выше 60 мм рт.ст.

12. Способ по п.11, где раствор гемоглобина представляет собой бесклеточный раствор, включающий, по существу, раствор лишенного тетрамеров, поперечно сшитого, полимеризованного гемоглобина, который, по существу, свободен от стромы и других 25 примесей.

13. Способ по п.11, где перед лечением уровень RBC Hb у пациента составляет менее чем 5,0 г/дл.

14. Способ по п.11, где перед лечением уровень RBC Hb у пациента составляет менее чем 3,0 г/дл.

30 15. Способ по п.11, где раствор гемоглобина вводят в количестве, по меньшей мере, 5 л.

16. Способ по п.11, где раствор гемоглобина вводят в количестве, по меньшей мере, одного объема крови млекопитающего.

17. Способ по п.11, где введение раствора гемоглобина поддерживает артериальное давление выше 60 мм рт.ст.

35 18. Способ по п.11, где раствор гемоглобина вводят со скоростью, по меньшей мере, примерно 2 единицы/мин.

19. Способ по п.11, где раствор помогает избежать токсичности, связанной с сужением сосудов и нарушением функции почек, поджелудочной железы, желудочно-кишечного тракта и сердца.

40 20. Способ по п.11, где полимеризованный гемоглобин имеет распределение молекулярной массы:

(a) от 5 до 30 мас.% полимеризованного гемоглобина полимера, имеющего молекулярную массу 128 кДа;

45 (b) от 15 до 30 мас.% полимеризованного гемоглобина полимера, имеющего молекулярную массу 192 кДа; и

(c) от 35 до 75 мас.% полимеризованного гемоглобина полимера, имеющего молекулярную массу 256 кДа.

21. Способ поддержания средних уровней циркулирующего Hb выше 5,0 г/дл у пациента, страдающего от массивной потери крови, включающий введение пациенту раствора 50 полимеризованного гемоглобина в количестве, по меньшей мере, одного объема крови пациента, где введение раствора гемоглобина поддерживает артериальное давление выше 60 мм рт.ст.

22. Способ по п.21, где раствор гемоглобина представляет собой бесклеточный

раствор, включающий, по существу, раствор лишенного тетрамеров, поперечно сшитого, полимеризованного гемоглобина, который, по существу, свободен от стромы и других примесей.

23. Способ по п.22, где полимеризованный гемоглобин имеет распределение молекулярной массы:
 - (а) от 5 до 30 мас.% полимеризованного гемоглобина полимера, имеющего молекулярную массу 128 кДа;
 - (b) от 15 до 30 мас.% полимеризованного гемоглобина полимера, имеющего молекулярную массу 192 кДа; и
 - (с) от 35 до 75 мас.% полимеризованного гемоглобина полимера, имеющего молекулярную массу 256 кДа.
24. Способ по п.21, где раствор гемоглобина вводят в количестве, по меньшей мере, 5 л.
25. Способ по п.21, где раствор гемоглобина вводят в количестве, по меньшей мере, одного объема крови млекопитающего.
26. Способ по п.21, где раствор гемоглобина вводят со скоростью, по меньшей мере, примерно 2 единицы/мин.
27. Способ по п.22, где раствор помогает избежать токсичности, связанной с сужением сосудов и нарушением функции почек, поджелудочной железы, желудочно-кишечного тракта и сердца.
28. Способ лечения человека, имеющего концентрацию гемоглобина ниже примерно 7 г/дл в результате массивной потери крови, включающий введение человеку раствора полимеризованного гемоглобина, где введение раствора гемоглобина поддерживает артериальное давление выше 60 мм рт.ст.
29. Способ по п.28, где раствор гемоглобина представляет собой бесклеточный раствор, включающий, по существу, раствор лишенного тетрамеров, поперечно сшитого, полимеризованного гемоглобина, который, по существу, свободен от стромы и других примесей.
30. Способ по п.28, где раствор гемоглобина вводят в количестве, по меньшей мере, 5 л.
31. Способ по п.28, где раствор гемоглобина вводят в количестве, по меньшей мере, одного объема крови млекопитающего.
32. Способ по п.28, где введение раствора гемоглобина поддерживает средний уровень циркулирующего гемоглобина более чем 5,0 г/дл.
33. Способ по п.28, где раствор гемоглобина вводят со скоростью, по меньшей мере, примерно 2 единицы/мин.
34. Способ по п.28, где раствор помогает избежать токсичности, связанной с сужением сосудов и нарушением функции почек, поджелудочной железы, желудочно-кишечного тракта и сердца.
35. Способ по п.28, где полимеризованный гемоглобин имеет распределение молекулярной массы:
 - (а) от 5 до 30 мас.% полимеризованного гемоглобина полимера, имеющего молекулярную массу 128 кДа;
 - (b) от 15 до 30 мас.% полимеризованного гемоглобина полимера, имеющего молекулярную массу 192 кДа; и
 - (с) от 35 до 75 мас.% полимеризованного гемоглобина полимера, имеющего молекулярную массу 256 кДа.
36. Способ поддержания жизни у человека, страдающего от массивной потери крови, включающий предотвращение гиповолемического шока и дальнейшего снижения артериального давления введением человеку раствора полимеризованного гемоглобина, где введение раствора гемоглобина поддерживает артериальное давление выше 60 мм рт.ст.
37. Способ по п.36, где человек имеет концентрацию гемоглобина ниже примерно 7 г/дл.
38. Способ по п.36, где раствор гемоглобина представляет собой бесклеточный раствор, включающий, по существу, раствор лишенного тетрамеров, поперечно сшитого,

полимеризованного гемоглобина, который, по существу, свободен от стромы и других примесей.

39. Способ по п.36, где раствор гемоглобина вводят в количестве, по меньшей мере, 5 л.

40. Способ по п.36, где раствор гемоглобина вводят в количестве, по меньшей мере,

5 одного объема крови млекопитающего.

41. Способ по п.36, где раствор гемоглобина вводят со скоростью, по меньшей мере, примерно 2 единицы/мин.

42. Способ по п.36, где раствор помогает избежать токсичности, связанной с сужением сосудов и нарушением функции почек, поджелудочной железы, желудочно-кишечного

10 тракта и сердца.

43. Способ по п.36, где полимеризованный гемоглобин имеет распределение молекулярной массы:

(а) от 5 до 30 мас.% полимеризованного гемоглобина полимера, имеющего молекулярную массу 128 кДа;

15 (b) от 15 до 30 мас.% полимеризованного гемоглобина полимера, имеющего молекулярную массу 192 кДа; и

(с) от 35 до 75 мас.% полимеризованного гемоглобина полимера, имеющего молекулярную массу 256 кДа.

20

25

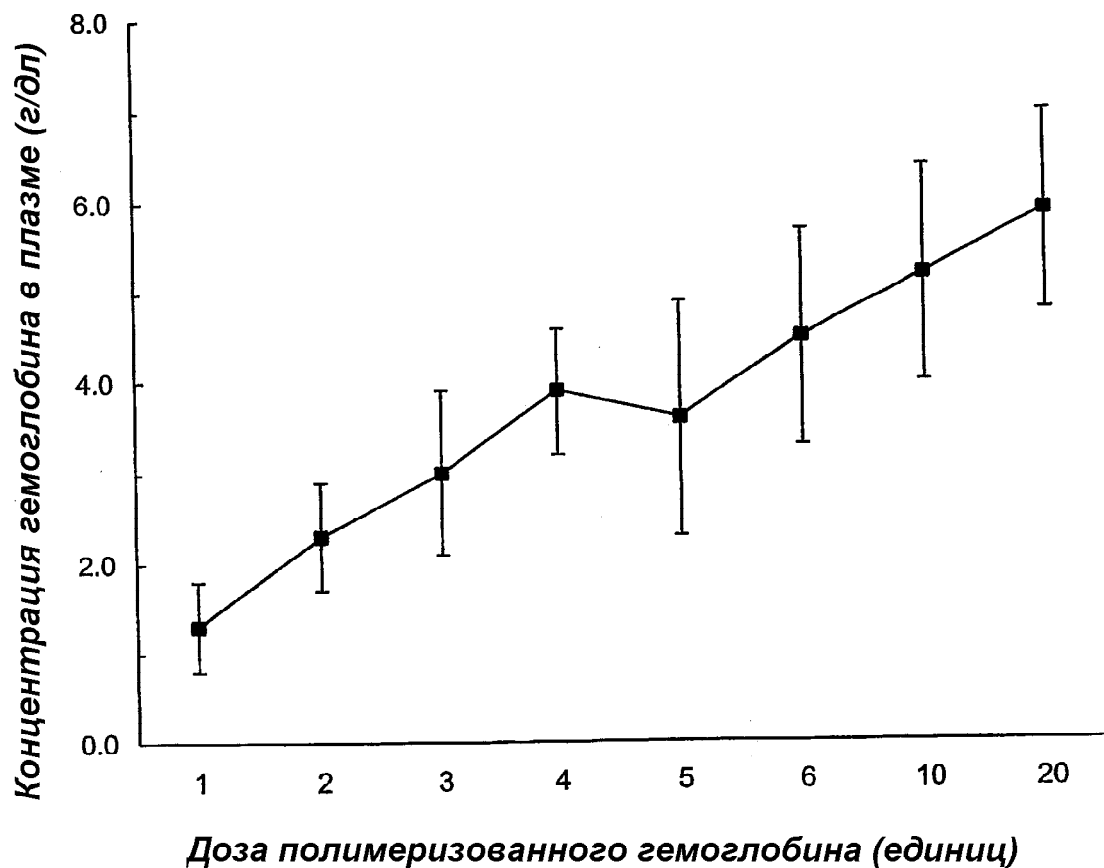
30

35

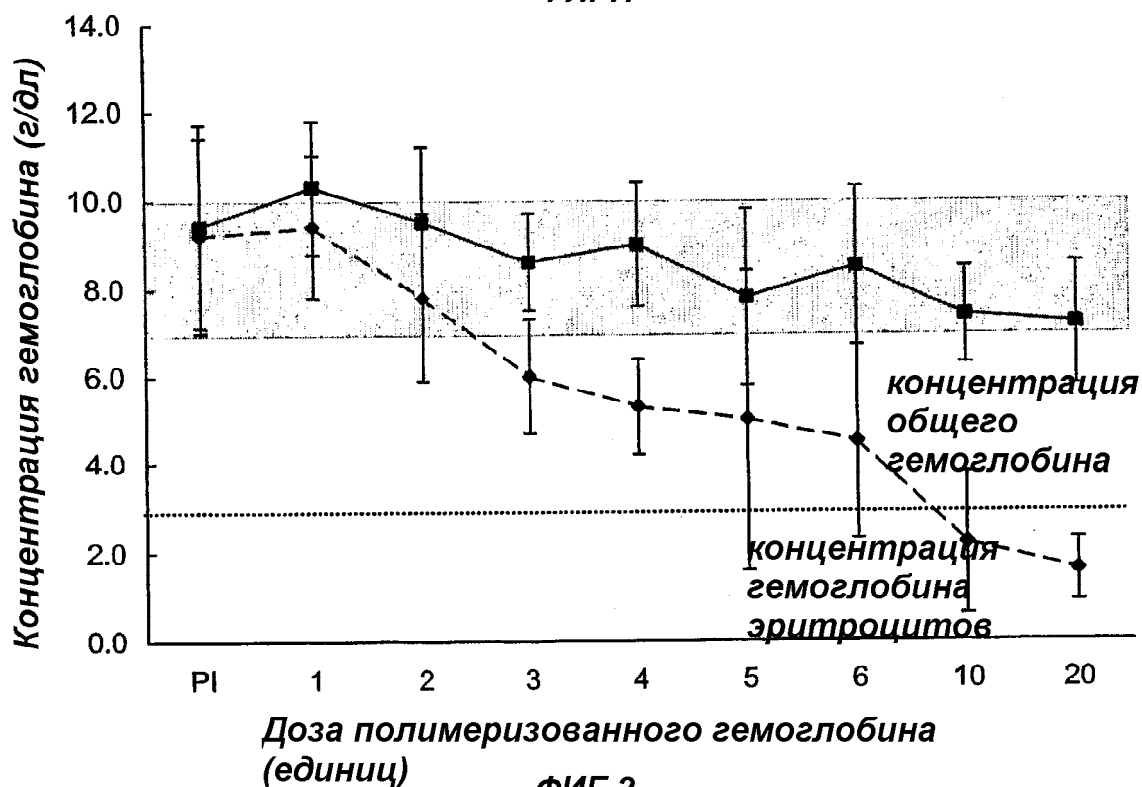
40

45

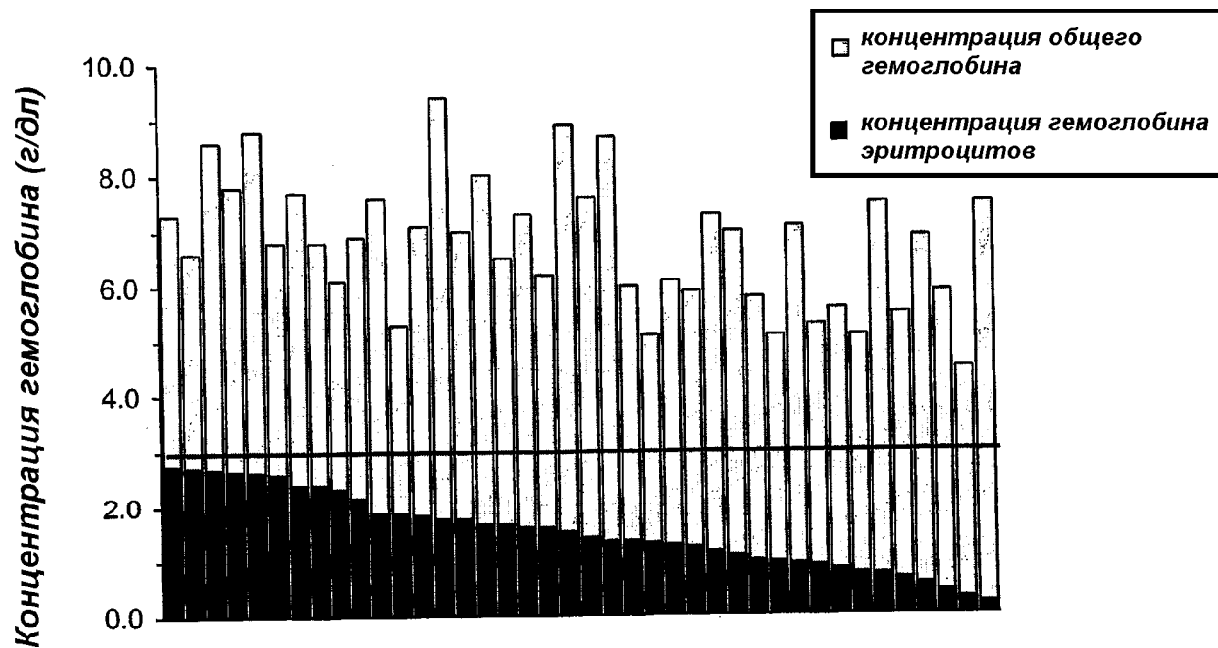
50



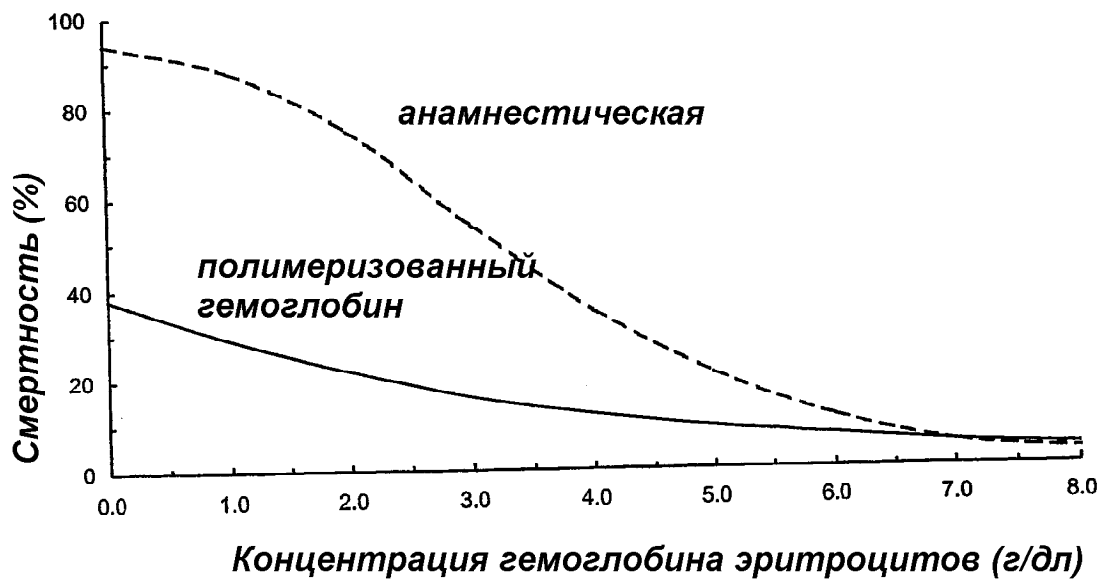
ФИГ.1



ФИГ.2



ФИГ.3



ФИГ.4