

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В СООТВЕТСТВИИ С
ДОГОВОРом О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(19) Всемирная Организация
Интеллектуальной Собственности
Международное бюро



(10) Номер международной публикации
WO 2009/116894 A2

(43) Дата международной публикации
24 сентября 2009 (24.09.2009)

РСТ

- (51) Международная патентная классификация:
Неклассифицировано
- (21) Номер международной заявки: РСТ/RU2009/000129
- (22) Дата международной подачи:
17 марта 2009 (17.03.2009)
- (25) Язык подачи: Русский
- (26) Язык публикации: Русский
- (30) Данные о приоритете:
2008109967 18 марта 2008 (18.03.2008) RU
- (71) Заявитель (для всех указанных государств, кроме US): **ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННАЯ КОМПАНИЯ "МЕДБИОФАРМ" (OBSHESTVO S OGRANICHENNOY OTVETSTVENNOSTJU "NAUCHNO PROIZVODSTVENNAYA KOMPANIYA "MEDBIOFARM")** [RU/RU]; ул. Курчатова, 24а, Обнинск, Калужская обл., 249031, Obninsk (RU).
- (72) Изобретатели; и
- (75) Изобретатели/Заявители (только для US): **ГОНЧАРОВА, Анна Яковлевна (GONCHAROVA, Anna Yakovlevna)** [RU/RU]; пр. Ленина, 210-60, Обнинск, Калужская обл., 249031, Obninsk (RU). **ПОДГОРОДНИЧЕНКО, Владимир Константинович (PODGORODNICHENKO, Vladimir Konstantinovich)** [RU/RU]; ул. Курчатова, 22а-69, Обнинск, Калужская обл., 249032, Obninsk (RU). **РОЗИЕВ, Рахимджан Ахметджанович (ROZIEV, Rakhimdzhan Akhmetdzhanovich)** [RU/RU]; ул. Энгельса, 23/21-303, Обнинск, Калужская обл., 249031, Obninsk (RU). **ХОМИЧЁНОК, Виктор Владимирович (HOMICHENOK, Viktor Vladimirovich)** [RU/RU]; ул. Ляшенко, 6-34, Обнинск, Калужская обл., 249030, Obninsk (RU). **ЦЫБ, Анатолий Федорович (TSYB, Anatoliy Fedorovich)** [RU/RU]; ул. Горького, 72-4, Обнинск, Калужская обл., 249039, Obninsk (RU). **БРУСКОВА Ольга Борисовна (BRUSKOVA, Olga Borisovna)** [RU/RU]; пос. Института, 4-35, Боровск, Калужская обл., 249013, Borovsk (RU).
- (74) Агент: **БАЗАНОВ Юрий Борисович (BAZANOV, Yuriy Borisovich)**; а/я 9004 Обнинск, Калужская обл., 249039, Oblinsk (RU).
- (81) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида национальной охраны): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида региональной охраны): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), евразийский (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), европейский патент (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Опубликована:
— без отчёта о международной поиске и с повторной публикацией по получении отчёта (правило 48.2(g))

(54) Title: OXYGEN-TRANSFERRING BLOOD SUBSTITUTE AND A PHARMACEUTICAL COMPOSITION (VARIANTS)

(54) Название изобретения: КРОВЕЗАМЕНИТЕЛЬ С ФУНКЦИЕЙ ПЕРЕНОСА КИСЛОРОДА, ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ (ВАРИАНТЫ)

(57) Abstract: The invention relates to medicine, in particular to polyhemoglobin-based blood substitutes. The invention can be used for producing blood substituting solutions comparable in terms of a gas transportation efficiency (oxygen transfer) with human blood erythrocytes. The inventive oxygen-transferring blood substitute is based on the hemoglobin which is polymerised by glutaraldehyde produced from animal blood and differs in that it is in the form of a dry substance and contains not less than 90% of polymerised hemoglobin, the molecular mass of which ranges from 192 000 to 320 000 Da and the methemoglobin content in the blood substitute is equal to or less than 5%.

(57) Реферат: Изобретение относится к медицине, а именно к кровезаменителям на основе полигемоглобина. Изобретение может быть использовано для производства кровезамещающих растворов, сопоставимых по эффективности газового транспорта (по переносу кислорода) с эритроцитами крови человека. Предложен кровезаменитель с функцией переноса кислорода, основу которого составляет полимеризованный глутаровым альдегидом гемоглобин, полученный из крови животных, отличающийся тем, что он представляет собой сухую субстанцию и содержит не менее 90% полимеризованного гемоглобина с молекулярной массой в диапазоне 192 000 - 320 000 Да, а содержание метгемоглобина в кровезаменителе составляет не более 5%.



WO 2009/116894 A2

Кровезаменитель с функцией переноса кислорода, фармацевтическая композиция (варианты)

Изобретение относится к медицине, а именно к кровезаменителям на основе полигемоглобина. Изобретение может быть использовано для производства кровезамещающих растворов, сопоставимых по эффективности газового транспорта (по переносу кислорода) с эритроцитами крови человека.

Известен кровезаменитель / L. R. Sehgal, A. L. Rosen, S. A. Gould, H.L. Sehgal, G.S. Moss / Transfusion. - 1983. - v. 23. - N 2. - P. 158-162/, представляющий собой полимерный гемоглобин.

Основным недостатком известного кровезаменителя является его относительно высокая стоимость, которая обусловлена тем, что для получения кровезаменителя используется дорогостоящий биологически активный реагент - пиридоксаль-5-фосфат (ПФ). Существует также опасность попадания свободного ПФ в конечный продукт, что может привести к нежелательным последствиям.

Известен кровезаменитель «Геленпол» /RU 2132687, А61К35/18, А61К38/42, 1999/ представляющий собой смесь тетрамера гемоглобина и олигомеров с различной длиной цепи. Олигомеры получены путём сшивания тетрамеров гемоглобина глутаровым альдегидом и модифицированы глутаминовой кислотой.

Недостатком препарата «Геленпол» является то, что для его приготовления необходима эритроцитарная масса со сроком хранения не более 36 суток, а это может негативно сказаться на запасах донорской крови.

К недостаткам так же относится то, что в кровезаменителе находится достаточно большой процент тетрамера гемоглобина, который в крови диссоциирует на димеры обуславливающие нефротоксический эффект. Тетрамер также вызывает вазоконстрикторное действие, связывая оксид азота, кроме того, тетрамер быстро элиминируется из кровяного русла, не успевая выполнить газотранспортную функцию.

Известен кровезаменитель по патенту RU 2203087, полученный из донорской крови. Кровезаменитель представляет собой водный раствор пиридоксильированного, полимеризованного гемоглобина, который содержит приблизительно 16% полимера гемоглобина с молекулярной массой приблизительно 128, приблизительно 26% полимера гемоглобина с молекулярной массой приблизительно 192 и приблизительно 58% полимера гемоглобина с молекулярной массой приблизительно 256. Данный кровезаменитель получают с использованием окиси углерода, что удорожает и удлиняет процесс, кроме того, в конечном продукте остается примесь токсичного карбоксигемоглобина (до 1.5%). Описанная технология по утверждению авторов, позволяет применять кровь других млекопитающих.

Известен кровезаменитель фирмы Biopure на основе гемоглобина, полученного, в том числе, из эритроцитов крови крупного рогатого скота /патенты US 5,084,558 (1992) и US 6,506,725 (2003) /.

Данный кровезаменитель имеет следующие параметры: распределение молекулярной массы полигемоглобина в диапазоне 68 000 - 500 000 дальтон более 90%, причем, содержание полигемоглобина более 50% содержание метгемоглобина менее 20%, содержание эндотоксина менее 0.02 ед/мл.

К недостаткам данного кровезаменителя можно отнести высокое содержание тетрамера и метгемоглобина. Высокое содержание тетрамера

обуславливает нефротоксический эффект, а метгемоглобин является токсичным. Кроме того, кровезаменитель приготовлен на дегазированном растворе и поэтому при его введении в организм в условиях геморрагического шока, он может присоединять растворённый в крови кислород, вызывая дополнительную гипоксию. Препарат фирмы Biopure представляет собою готовый для употребления продукт с фиксированной концентрацией гемоглобина в определенной среде (модифицированный лактированный раствор Рингер – Локка). В связи с этим, возможности изменения концентрации гемоглобина в растворе ограниченное, а изменение состава растворителя не возможно. Между тем, не исключены ситуации, при которых применение данного растворителя не желательны и оптимальным для введения может оказаться плазмозаменитель с иными свойствами и с иным содержанием гемоглобина.

Задачей изобретения является создание кровезаменителя, лишённого указанных недостатков.

Для решения поставленной задачи предлагается кровезаменитель с функцией переноса кислорода, основу которого составляет полимеризованный глутаровым альдегидом гемоглобин, полученный из крови животных. Отличительной особенностью предлагаемого кровезаменителя является то, что распределение молекулярной массы полигемоглобина 90% в диапазоне 192 000 – 320 000 Да, содержание метгемоглобина не более 5%. Кровезаменитель предлагается выполнить в виде сухой субстанции, например, в виде порошка или гранул с влажностью не более 7%.

Предлагаемый кровезаменитель может дополнительно содержать глюкозу и/или аскорбиновую кислоту.

То, что распределение молекулярной массы 90% полигемоглобина в диапазоне 192 000 – 320 000 Да, а содержание метгемоглобина не более 5%,

позволяет повысить качество кровезаменителя за счет исключения нежелательных побочных эффектов. Известно, что полимеризованный гемоглобин обладает меньшим кооперативным эффектом, чем нативный гемоглобин, что приводит к снижению коэффициента Хилла /Preparation and in vitro characteristics of polimerized pyridoxylated hemoglobin, L.R.Seagal, oth., TRANSFUSION, Vol. 23, No. 2-1983, p. 158 – 162/. Указанный эффект возможно обусловлен стерическими затруднениями для доступа кислорода к гему. Распределение молекулярной массы в указанном диапазоне позволяет приблизить газотранспортные свойства заявляемого кровезаменителя к нативному гемоглобину за счет большей доступности гема для кислорода.

Введение глюкозы позволяет использовать лиофильную сушку для получения сухого продукта, а аскорбиновая кислота увеличивает срок хранения препарата.

Выполнение кровезаменителя в виде сухой субстанции позволяет повысить сроки хранения продукта, а также усиливает противошоковый эффект препарата и, кроме того, позволяет расширить набор специфических терапевтических воздействий за счёт возможности растворить его в одном из прилагаемых к препарату плазмозаменяющих растворов. Выбор раствора определяется причиной, приведшей к необходимости переливать кровезаменитель, состоянием больного и характером предполагаемой терапии (лечебного процесса).

Таким образом, достигается технический результат.

Кровезаменитель получают осмотическим гемолизом эритроцитов крови крупного рогатого скота. Для этого эритроцитарную массу, выделенную, из стабилизированной крови крупного рогатого скота, путем сепарирования, подвергают гемолизу водой для инъекций. Строму (эритроцитарную оболочку) отделяют микрофльтрацией, используя

фильтры с диаметром пор 50; 20; 10; 5 и 1 мкм. Фильтрат обрабатывают *концентрированным* раствором хлористого натрия для высаживания негемовых белков. Раствор вторично фильтруют через фильтры с диаметром пор 5; 1 и 0,65 мкм, подвергают процессу *ультрафильтрации* с отсекающими мембранами 300 кДа и проводят стерилизующую фильтрацию.

Концентрацию нативного гемоглобина и продуктов его химической модификации определяют спектрофотометрически по цианметгемоглобиновому производному при длине волны 540 нм /М.С.Кушаковский / Клинические формы повреждения гемоглобина, Л-д: Медицина, 1968. - С. 23/. Используют хлористый натрий марки ХЧ ("Химически чистый", ГОСТ 42-2572-88), глюкозу (ФС 42-2419-86), аскорбиновую кислоту (ГФ Х, С. - 6), изотонический раствор (ГФ XI, вып. 1, стр. 175).

Полимеризация. 1 - 10 мас.% водный раствор гемоглобина дезоксигенируют и при 4° - 8°С, добавляют 1 - 5 мас.% водный раствор глутарового альдегида при молярном отношении *глутаровый альдегид : гемоглобин (10:1)÷(20:1)*.

Реакцию завершают добавлением водного раствора боргидрида натрия (*pH 8-9*).

Раствор полигемоглобина *подвергают ультрафильтрации на отсекающих мембранах* 450 кДа, а затем для проведения *концентрирования и промывки диафильтрацией* подают на мембраны, отсекающие полимеры менее 150 кДа. Раствор полигемоглобина промывают диафильтрацией для удаления тетрамера и низкомолекулярных соединений, концентрируют до 10 % полигемоглобина и подают на сушку. Качество препарата на предмет соответствия фракционному

составу полигемоглобина контролируют электрофорезом и *гельпроникающей* хроматографией.

В качестве растворителя заявляемого кровезаменителя из препаратов с гемодинамическим (противошоковым) действием предложено использовать полиоксидин, содержащий 1,5 % раствор полиэтиленгликоля с молекулярной массой 20 кДа в 0,9 % раствора хлорида натрия с добавлением йодида калия. Полиоксидин обладает противошоковым действием, способностью вызывать аутогемодилюцию и удерживать жидкость в сосудистом русле. Обладая дезагрегирующим действием полиоксидин восстанавливает капиллярный кровоток.

В качестве дезинтоксикационного препарата предложено использовать гемодез – 6% раствор поливинилпирролидона с молекулярной массой 12,6 кДа с добавлением сбалансированных по ионному составу солей.

В качестве регуляторов водно-солевого обмена и кислотно-основного состояния предлагается использовать раствор Рингера с содержанием ингредиентов ммоль/л Na-147, K - 4,0, Ca – 2,3, Cl – 155, HCO₃ -1,2.

В качестве полифункционального (комплексного) препарата предлагается использовать мафусол – раствор солей (хлорида натрия, хлорида калия и хлорида магния) и фумарата натрия.

Рекомендуемая концентрация кровезаменителя в растворах – 1%.

Пример 1. Стабилизированная, охлажденная до +2+4°C кровь КРС, в пластиковых емкостях объемом 10 литров, в количестве 30л, из холодильной камеры через шлюз передается в производственное помещение. С помощью перистальтического насоса кровь подается, в приемную чашу работающего сепаратора А1-ФКЖ. Сепарирование

осуществляется при 4000 об/мин. Полученная эритромаасса, в количестве 12л, по трубопроводу поступает в емкость для гемолиза.

После загрузки 12л ЭМ в одноразовый биоконтейнер Флексель 3D (E1) для гемолиза объёмом 50л (все ёмкости снабжены охлаждающей рубашкой), включается перистальтический насос для перемешивания и в ёмкость подается 36л воды для инъекций (ВДИ) температурой +6-+8⁰С (контроль температуры – датчик в паллетанке) из сборной ёмкости, размещенной в помещении подготовки растворов. Гемолиз проходит в течение 40 минут при перемешивании.

Полученный гемолизат перекачивают насосом на патронные фильтры с размером пор 50; 20; 10; 5 и 1 мкм, расположенные последовательно, и далее в биоконтейнер Флексель для осаждения негемовых белков.

После фильтрации раствор подается в биоконтейнер для осаждения негемовых белков объёмом 50 л. После перекачки насосом всего объёма, в ёмкость подается концентрированный (33.3%) раствор NaCl в количестве 0,84 кг (ВР.6) . Процесс осаждения длится 30 мин.

После осаждения негемовых белков раствор гемоглобина перекачивают насосом на патронные фильтры с размером пор 5; 1 и 0,65 мкм, расположенные последовательно и далее в емкость для концентрирования раствора гемоглобина.

Очистку раствора гемоглобина от высокомолекулярных примесей проводят на ультрафильтрационной установке с мембранами, отсекающими вещества с ММ свыше 300 кДа . Концентрирование раствора гемоглобина проводят на ультрафильтрационной установке с мембранами, отсекающими вещества с ММ свыше 70 кДа до концентрации 10 % по гемоглобину. Стерилизующую фильтрацию проводят на этой же установке с использованием мембран с размером пор 0,2 мкм.

После концентрирования 23,5л раствора гемоглобина поступает в газовихревой реактор. В реактор подается поток стерильного азота (контроль по ротаметру), для перемешивания и дезоксигенации. Дезоксигенацию проводят до достижения концентрации кислорода в равновесной газовой среде 1,0-2,0 об. % (в реакторе датчик концентрации кислорода).

Раствор 2,5% глутарового альдегида в количестве 1,83 кг переносят в реактор P1, содержащий дезоксигемоглобин (ТП.3.1.) в течение 40мин. Реакцию проводят при перемешивании в течение 1 часа, при температуре +6+8 °С в токе азота.

Для остановки реакции прибавляют раствор боргидрида натрия в количестве 0,2 кг в реактор с раствором полигемоглобина. Реакцию проводят 30 мин при перемешивании. Затем реакционная смесь передавливается азотом (избыточное давление 0,5-1 атм.) в ёмкость для диафильтрации.

Из биореактора реакционная смесь передавливается азотом (избыточное давление 0,5-1 атм.) подается в биоконтейнер объёмом 50 л. Далее раствор полигемоглобина перекачивается ПН на диафильтрацию 300кДа для удаления высокомолекулярных (свыше 6 молекул гемоглобина) соединений. После диафильтрации раствор подается ПН в ёмкость объёмом 20 л для концентрирующей и промывной диафильтрации 100кДа. Раствор промывается 150 л ВДИ для удаления модифицированного гемоглобина (внутримолекулярносшитого тетрамера) и низкомолекулярных соединений, концентрируется до 20л. Промывной раствор направляется на станцию очистки стоков.

В биоконтейнер с раствором полигемоглобина добавляют 4,83 л 40% стерильного раствора глюкозы путем стерильного соединения коннектором 0,2 л 13,6 % стерильного раствора аскорбиновой кислоты,

перемешивают. Затем приготовленный раствор перистальтическим насосом подают на установку стерилизующей фильтрации с размером пор 0,22 мкм. Фильтрат поступает в накопительную емкость для подачи на сушку.

Для сушки препарата используется лиофильная или вакуумная сушилка, обеспечивающая получение стерильного порошка в количестве 4,8 кг.

Сравнительные значения коэффициента Хилла приведены в таблице 1.

Таблица 1

коэффициент Хилла	нативный гемоглобин	кровезаменитель фирмы Biopure	Заявляемый кровезаменитель
	2.0	1.4	1.8

Лечебную эффективность полученного кровезаменителя оценивали на модели геморрагического шока у собак. Для исследований применяли стерильный лиофильно высушенный полигемоглобин, содержащий глюкозу и аскорбиновую кислоту. Порошок разводили солевым раствором. Для опыта использовали 10 беспородных собак – самцов массой 10-20 кг, у которых искусственно вызывали геморрагический шок при острой кровопотере с длительной гипотензией. Объем кровопотери составлял 45-55 мл/кг, длительность гипотензии на уровне артериального давления, равном 40 мм рт. Ст. 60 – 70 мин. Внутривенное введение раствора полимеризованного модифицированным глутаровым альдегидом

гемоглобина начинали в период выраженных расстройств системной гемодинамики, транспорта кислорода и кислотно-основного состояния организма, вызванных массивной потерей крови и длительной гипотензией. Введение препарата, полученного заявляемым методом, осуществляли в объеме кровопотери. Из 10 исследованных собак выжило 10, при этом выявлено, что вливание раствора с низкой концентрацией полигемоглобина ($0,8 \text{ г. дл}^{-1}$) обеспечивает не только стойкое восстановление системной гемодинамики, но и более высокий уровень потребления тканями кислорода.

При использовании препарата с характеристиками прототипа в аналогичном опыте выжило 9 животных из 10.

Формула изобретения

1. Кровезаменитель с функцией переноса кислорода, основу которого составляет полимеризованный глутаровым альдегидом гемоглобин, полученный из крови животных, отличающийся тем, что он представляет собой сухую субстанцию и содержит не менее 90% полимеризованного гемоглобина с молекулярной массой в диапазоне 192 000 – 320 000Да, а содержание метгемоглобина в кровезаменителе составляет не более 5%.
2. Кровезаменитель по п.1, отличающийся тем, что он дополнительно содержит глюкозу.
3. Кровезаменитель по п.1, отличающийся тем, что он дополнительно содержит аскорбиновую кислоту.
4. Кровезаменитель по п. 4, отличающийся тем, что представляет собой порошок с влажностью не более 7%.
5. Кровезаменитель по п. 4, отличающийся тем, что представляет собой гранулы с влажностью не более 7%.
6. Фармацевтическая композиция содержащая кровезаменитель по п. 1 и полиоксидин, содержащий 1,5 % раствор полиэтиленгликоля с молекулярной массой 20 кДа в 0,9 % раствора хлорида натрия с добавлением йодида калия.

7. Фармацевтическая композиция, содержащая кровезаменитель по п. 1 и 6% раствор поливинилпирролидона с молекулярной массой 12,6 кДа с добавлением сбалансированных по ионному составу солей.

8. Фармацевтическая композиция, содержащая кровезаменитель по п. 1 и раствор Рингера.

9. Фармацевтическая композиция, по п. 8, отличающаяся тем, что раствор Рингера содержит Na-147, K - 4,0, Ca – 2,3, Cl – 155, HCO₃ -1,2 ммоль/л.

10. Фармацевтическая композиция, содержащая кровезаменитель по п. 1 и раствор хлорида натрия, хлорида калия и хлорида магния и фумарата натрия.