(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5562324号
(P5562324)

(45)発行日　平成26年7月30日(2014.7.30)　(24)登録日　平成26年6月20日(2014.6.20)

(51)Int.Cl.		F I	
A61K 47/42	(2006.01)	A61K	47/42
A61K 38/48	(2006.01)	A61K	37/547
A61K 9/14	(2006.01)	A61K	9/14
A61K 9/06	(2006.01)	A61K	9/06
A61P 7/04	(2006.01)	A61P	7/04

請求項の数 18　(全 40 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号	特願2011-503043 (P2011-503043)
(86)(22)出願日	平成21年3月26日 (2009.3.26)
(65)公表番号	特表2011-518780 (P2011-518780A)
(43)公表日	平成23年6月30日 (2011.6.30)
(86)国際出願番号	PCT/US2009/038320
(87)国際公開番号	WO2009/123903
(87)国際公開日	平成21年10月8日 (2009.10.8)
審査請求日	平成24年3月19日 (2012.3.19)
(31)優先権主張番号	61/150,466
(32)優先日	平成21年2月6日 (2009.2.6)
(33)優先権主張国	米国(US)
(31)優先権主張番号	61/042,156
(32)優先日	平成20年4月3日 (2008.4.3)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者　505222646
ザイモジェネティクス,　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　ニュージャージー州　０８５４３　プリンストン　ルート　２０６　アンド　プロビンス　ライン　ロード
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志
(74)代理人　100102118
弁理士　春名　雅夫
(74)代理人　100160923
弁理士　山口　裕孝
(74)代理人　100119507
弁理士　刑部　俊

最終頁に続く

(54)【発明の名称】止血マイクロスフェア

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

複数の多孔性ゼラチンマイクロスフェアと、トロンビンと、湿潤剤および／または懸濁剤であって、剤：マイクロスフェアの存在比が３：１～６０：１の質量比で存在する前記剤を含む止血組成物であって、ここで、

該ゼラチンは架橋されており；

該多孔性ゼラチンマイクロスフェアは、完全に水和されている状態で、50μm～500μm（両端の値を含む）の直径を有し；

該多孔性ゼラチンマイクロスフェアが、15μm～25μm（両端の値を含む）の孔径を有する孔を有し；かつ、

止血組成物が、完全に水和されている状態で、少なくとも90分間、流動性を維持する、前記止血組成物。

【請求項２】

湿潤剤がポロキサマーである、請求項1記載の止血組成物。

【請求項３】

懸濁剤がカルボキシメチルセルロースである、請求項1または2記載の止血組成物。

【請求項４】

乾燥粉末、部分的に水和されたゲル、または完全に水和されたゲルである、請求項1記載の止血組成物。

【請求項５】

部分的または完全に水和されたゲル組成物が、血漿を含むかまたは血漿からなる希釈液で水和される、請求項4記載の止血組成物。

【請求項６】

トロンビン濃度が、再水和マイクロスフェアゲル1ml当たり125 IU～50,000 IU（両端の値を含む）の範囲内である、前記請求項のいずれか一項記載の止血組成物。

【請求項７】

シリンジを含む止血組成物送達装置であって、該シリンジが前記請求項のいずれか一項記載の止血組成物を含む、止血組成物送達装置。

【請求項８】

以下の段階を含む、完全に水和されている状態で、少なくとも90分間、流動性を維持する止血組成物を調製する方法：

(a) 架橋されており、
完全に水和されている状態で、両端の値を含み50μm～500μm（両端の値を含む）の直径を有し、かつ
15μm～25μm（両端の値を含む）の孔径を有する孔を有する、多孔性ゼラチンマイクロスフェアを得る段階；

(b) 該多孔性架橋ポリマーマイクロスフェアを、湿潤剤および懸濁剤からなる群より選択される少なくとも1つの添加物と、該剤：マイクロスフェアの存在比が３：１～６０：１の質量比で混合する段階；ならびに

(c) トロンビンを段階(a)のマイクロスフェアまたは段階(b)の混合物に添加する段階。

【請求項９】

以下の段階をさらに含む、請求項8記載の方法：

架橋ゼラチンマイクロスフェアを希釈液と混合する段階。

【請求項１０】

湿潤剤がポロキサマー、ポリエチレングリコール、またはポリソルベートである、請求項8記載の方法。

【請求項１１】

懸濁剤がカルボキシメチルセルロースである、請求項8記載の方法。

【請求項１２】

希釈液が血漿を含むかまたは血漿からなる、請求項9記載の方法。

【請求項１３】

トロンビン濃度が、再水和マイクロスフェアゲル1ml当たり、125 IU～50,000 IU（両端の値を含む）の範囲内である、請求項8～12のいずれか一項記載の方法。

【請求項１４】

以下を含む、完全に水和されている状態で、少なくとも90分間、流動性を維持する止血組成物を含むキット：

多孔質ゼラチンポリマーマイクロスフェアであって、ここで、該ゼラチンが架橋されており、該多孔性ゼラチンマイクロスフェアが、完全に水和されている状態で、50μm～500μm（両端の値を含む）の直径を有し、かつ、該多孔性ゼラチンマイクロスフェアが、15μm～25μm（両端の値を含む）の孔径を有する孔を有する、前記多孔質ゼラチンポリマーマイクロスフェア；

湿潤剤および懸濁剤からなる群より選択される少なくとも1つの添加物であって、該剤：マイクロスフェアの存在比が３：１～６０：１の質量比で存在させる、前記剤；ならびに

トロンビン。

【請求項１５】

少なくとも1つのシリンジをさらに含む、請求項14記載のキット。

【請求項１６】

希釈液をさらに含む、請求項14記載のキット。

【請求項１７】

トロンビン濃度が、再水和マイクロスフェアゲル1ml当たり125 IU～50,000 IU（両端の値を含む）の範囲内である、請求項14～16のいずれか一項記載のキット。
【請求項１８】
請求項1～6のいずれか一項記載の止血組成物のいずれかを含むキット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願
本出願は、2008年4月3日に出願した米国特許出願第61/042,156号；および2009年2月6日に出願した米国特許出願第61/150,466号の恩典を主張し、これらはすべて参照により本明細書に組み入れられる。
【０００２】
発明の分野
本発明は、トロンビンなどの止血剤および/または血漿を含み得る、多孔性架橋ゼラチンマイクロスフェアをはじめとする架橋ポリマーなどの止血組成物に関する。ある種の態様において、止血組成物は、止血の迅速でかつ信頼性のある開始を提供するために、一連のトロンビン濃度を包含するトロンビンの用量を含み得る。特定の態様において、止血組成物は、止血の迅速でかつ信頼性のある開始を提供するために、例えば1000 IU/mlまたはそれ以上といった高用量のトロンビンを含み得る。
【背景技術】
【０００３】
発明の背景
手術または損傷の結果としての出血は、受動的な止血物質および/または止血剤によって制御され得る。受動止血物質は、圧力および吸収を通じて出血を機械的に制御するものであり、断片化されるかもしくはさもなくば機械的に破砕された、酸化再生セルロースまたは架橋ゼラチン製の粉末、ガーゼ、またはスポンジであってよい。多くの場合、受動止血物質は、トロンビンなどの能動止血物質と併用される。しかしながら、改良された止血組成物、特に優れた血塊形成を付与する止血組成物の必要性が依然として残っている。
【発明の概要】
【０００４】

[本発明1001]
複数の架橋ゼラチンマイクロスフェアを含む止血組成物。
[本発明1002]
架橋ゼラチンマイクロスフェアが約50μm～約500μm（両端の値を含む）の直径を有する、本発明1001の止血組成物。
[本発明1003]
架橋ゼラチンマイクロスフェアが約110μm～約400μm（両端の値を含む）の直径を有する、本発明1003の止血組成物。
[本発明1004]
架橋ゼラチンマイクロスフェアが孔をさらに含み、該孔が約15μm～約25μm（両端の値を含む）の孔径を有する、本発明1001の止血組成物。
[本発明1005]
架橋ゼラチンマイクロスフェアがそれぞれ約50μm～約500μmの直径を有し、かつ架橋ゼラチンマイクロスフェアが約15μm～約25μm（両端の値を含む）の直径を有する孔をさらに含む、本発明1001の止血組成物。
[本発明1006]
湿潤剤をさらに含む、本発明1001、本発明1002、本発明1003、本発明1004、または本発明1005の止血組成物。
[本発明1007]

湿潤剤がポロキサマーである、本発明1006の止血組成物。
[本発明1008]
湿潤剤がポロキサマー188である、本発明1007の止血組成物。
[本発明1009]
懸濁剤をさらに含む、本発明1001、本発明1002、本発明1003、本発明1004、または本発明1005の止血組成物。
[本発明1010]
懸濁剤がカルボキシメチルセルロースである、本発明1009の止血組成物。
[本発明1011]
乾燥粉末である、本発明1001の止血組成物。
[本発明1012]
部分的に水和されたゲルである、本発明1001の止血組成物。
[本発明1013]
完全に水和されたゲルである、本発明1001の止血組成物。
[本発明1014]
血漿を含むかまたは血漿からなる希釈液で水和される、本発明1012または1013の止血組成物。
[本発明1015]
トロンビンをさらに含む、本発明1001～1014のいずれかの止血組成物。
[本発明1016]
トロンビン濃度が、再水和マイクロスフェアゲル1ml当たり約125 IU～約1,000 IU（両端の値を含む）の範囲内である、本発明1015の止血組成物。
[本発明1017]
トロンビン濃度が、再水和マイクロスフェアゲル1ml当たり約700 IU～約2,000 IU（両端の値を含む）の範囲内である、本発明1015の止血組成物。
[本発明1018]
トロンビン濃度が、再水和マイクロスフェアゲル1ml当たり約1,000 IU～約5,000 IU（両端の値を含む）の範囲内である、本発明1015の止血組成物。
[本発明1019]
トロンビン濃度が、再水和マイクロスフェアゲル1ml当たり約125 IU～約50,000 IU（両端の値を含む）の範囲内である、本発明1015の止血組成物。
[本発明1020]
ゼラチン、コラーゲン、デキストラン、キトサン、アルギン酸、タンパク質、多糖、およびポリアクリルアミドからなる群より選択される少なくとも1つのポリマーを含む架橋ポリマーマイクロスフェア；
湿潤剤および懸濁剤からなる群より選択される少なくとも1つの添加物；ならびに
トロンビン
を含む、止血組成物。
[本発明1021]
架橋ポリマーがゼラチンである、本発明1020の止血組成物。
[本発明1022]
架橋ポリマーが化学的に架橋されるか、脱水加熱的(dehydrothermally)に架橋されるか；または照射により架橋される、本発明1020の止血組成物。
[本発明1023]
架橋ポリマーが架橋ゼラチンマイクロスフェアである、本発明1019の止血組成物。
[本発明1024]
架橋ゼラチンマイクロスフェアが孔をさらに含む、本発明1023の止血組成物。
[本発明1025]
完全に水和された場合に、架橋ゼラチンマイクロスフェアが約50μm～約500μm（両端の値を含む）の直径を有する、本発明1023の止血組成物。

[本発明1026]
完全に水和された場合に、架橋ゼラチンマイクロスフェアが約110μm～約400μm（両端の値を含む）の直径を有する、本発明1023の止血組成物。
[本発明1027]
架橋ゼラチンマイクロスフェアが孔をさらに含み、該孔が約15μm～約25μm（両端の値を含む）の孔径を有する、本発明1024、本発明1025、または本発明1026の止血組成物。
[本発明1028]
乾燥粉末である、本発明1020の止血組成物。
[本発明1029]
部分的に水和されたゲルまたは完全に水和されたゲルである、本発明1020の止血組成物。
[本発明1030]
血漿を含むかまたは血漿からなる希釈液で水和される、本発明1029の止血組成物。
[本発明1031]
湿潤剤がポロキサマー、ポリエチレングリコール、またはポリソルベートである、本発明1020の止血組成物。
[本発明1032]
湿潤剤がポロキサマー188である、本発明1020の止血組成物。
[本発明1033]
懸濁剤がカルボキシメチルセルロースである、本発明1020の止血組成物。
[本発明1034]
シリンジの外筒内に存在する、本発明1020の止血組成物。
[本発明1035]
トロンビン濃度が、再水和マイクロスフェアゲル1ml当たり約125 IU～約1,000 IU（両端の値を含む）の範囲内である、本発明1020の止血組成物。
[本発明1036]
トロンビン濃度が、再水和マイクロスフェアゲル1ml当たり約700 IU～約2,000 IU（両端の値を含む）の範囲内である、本発明1020の止血組成物。
[本発明1037]
トロンビン濃度が、再水和マイクロスフェアゲル1ml当たり約1,000 IU～約5,000 IU（両端の値を含む）の範囲内である、本発明1020の止血組成物。
[本発明1038]
トロンビン濃度が、再水和マイクロスフェアゲル1ml当たり約125 IU～約50,000 IU（両端の値を含む）の範囲内である、本発明1020の止血組成物。
[本発明1039]
シリンジを含む止血組成物送達装置であって、該シリンジが本発明1001～1038のいずれかの止血組成物を含む、止血組成物送達装置。
[本発明1040]
止血組成物が乾燥粉末である、本発明1039の止血組成物送達装置。
[本発明1041]
第2シリンジおよび希釈液をさらに含む、本発明1039の止血組成物送達装置。
[本発明1042]
トロンビンが希釈液中に存在する、本発明1041の止血組成物送達装置。
[本発明1043]
希釈液が血漿であるかまたは血漿を含む、本発明1041または1042の止血組成物送達装置。
[本発明1044]
第2シリンジと、止血組成物を含むシリンジとが相互接続される、本発明1041の止血組成物送達装置。
[本発明1045]

シリンジ同士がオス/メスルアーロックシステムによって相互接続される、本発明1044の止血組成物送達装置。

[本発明1046]

以下の段階を含む、止血組成物を調製する方法：

(a) ゼラチン、コラーゲン、デキストラン、キトサン、アルギン酸、タンパク質、多糖、およびポリアクリルアミドからなる群より選択される少なくとも1つのポリマーを含む架橋ポリマーマイクロスフェアを得る段階；

(b) 該架橋ポリマーマイクロスフェアを、湿潤剤および懸濁剤からなる群より選択される少なくとも1つの添加物と混合する段階。

[本発明1047]

以下の段階をさらに含む、本発明1046の方法：

架橋ポリマーマイクロスフェアを希釈液と混合する段階。

[本発明1048]

架橋ポリマーマイクロスフェアがゼラチンである、本発明1046の方法。

[本発明1049]

架橋ポリマーが化学的に架橋されるか、脱水加熱的に架橋されるか、または照射により架橋される、本発明1046の方法。

[本発明1050]

架橋ゼラチンマイクロスフェアが孔をさらに含む、本発明1048の方法。

[本発明1051]

架橋ゼラチンマイクロスフェアが、約50μm～約500μm（両端の値を含む）の直径を有する、本発明1048の方法。

[本発明1052]

架橋ゼラチンマイクロスフェアが、約110μm～約400μm（両端の値を含む）の直径を有する、本発明1048の方法。

[本発明1053]

架橋ゼラチンマイクロスフェアが、約15μm～約25μm（両端の値を含む）の孔径を有する孔を有する、本発明1048の方法。

[本発明1054]

架橋ゼラチンマイクロスフェアが孔をさらに含み、該孔が約15μm～約25μm（両端の値を含む）の孔径を有する、本発明1051の方法。

[本発明1055]

架橋ゼラチンマイクロスフェアが孔をさらに含み、該孔が約15μm～約25μm（両端の値を含む）の孔径を有する、本発明1052の方法。

[本発明1056]

湿潤剤がポロキサマー、ポリエチレングリコール、またはポリソルベートである、本発明1046の方法。

[本発明1057]

湿潤剤がポロキサマー188である、本発明1056の方法。

[本発明1058]

懸濁剤がカルボキシメチルセルロースである、本発明1050の方法。

[本発明1059]

止血組成物がシリンジの外筒内に存在する、本発明1046の方法。

[本発明1060]

希釈液がシリンジの外筒内に存在する、本発明1047の方法。

[本発明1061]

止血組成物がシリンジの第1外筒内に存在し、かつ希釈液がシリンジの第2外筒内に存在し、該止血組成物と該希釈液とが、該外筒同士を相互接続し、該外筒の内容物を行ったり来たりさせることによって混合される、本発明1047の方法。

[本発明1062]

希釈液が血漿を含むかまたは血漿からなる、本発明1047、本発明1060、または本発明1061の方法。

[本発明1063]

トロンビンを段階(a)のマイクロスフェアまたは段階(b)の混合物に添加する段階をさらに含む、本発明1046～1062のいずれかの方法。

[本発明1064]

トロンビン濃度が、再水和マイクロスフェアゲル1ml当たり約125 IU～約1,000 IU（両端の値を含む）の範囲内である、本発明1063の方法。

[本発明1065]

トロンビン濃度が、再水和マイクロスフェアゲル1ml当たり約700 IU～約2,000 IU（両端の値を含む）の範囲内である、本発明1063の方法。

[本発明1066]

トロンビン濃度が、再水和マイクロスフェアゲル1ml当たり約1,000 IU～約5,000 IU（両端の値を含む）の範囲内である、本発明1063の方法。

[本発明1067]

トロンビン濃度が、再水和マイクロスフェアゲル1ml当たり約125 IU～約50,000 IU（両端の値を含む）の範囲内である、本発明1063の方法。

[本発明1068]

以下の段階を含む、止血を必要とする哺乳動物の身体の部位に止血組成物を送達する方法：

ゼラチン、コラーゲン、デキストラン、キトサン、アルギン酸、タンパク質、多糖、およびポリアクリルアミドからなる群より選択される架橋ポリマーマイクロスフェアを含む止血組成物を提供する段階であって、該組成物が、湿潤剤および懸濁剤からなる群より選択される少なくとも1つの添加物もまた含む、止血組成物を提供する段階；ならびに

止血を必要とする哺乳動物の身体の部位に該止血組成物を適用する段階。

[本発明1069]

架橋ポリマーマイクロスフェアがゼラチンである、本発明1068の方法。

[本発明1070]

架橋ポリマーマイクロスフェアが化学的に架橋されるか、脱水加熱的に架橋されるか、または照射により架橋される、本発明1068の方法。

[本発明1071]

架橋ポリマーが架橋ゼラチンマイクロスフェアである、本発明1068の方法。

[本発明1072]

架橋ゼラチンマイクロスフェアが孔をさらに含む、本発明1068の方法。

[本発明1073]

完全に水和された場合に、架橋ゼラチンマイクロスフェアが直径約50μm～約500μmを有する、本発明1072の方法。

[本発明1074]

完全に水和された場合に、架橋ゼラチンマイクロスフェアが直径約110μm～約400μmを有する、本発明1073の方法。

[本発明1075]

架橋ゼラチンマイクロスフェアが孔をさらに含み、該孔が約15μm～約25μm（両端の値を含む）の孔径を有する、本発明1070～1074のいずれかの方法。

[本発明1076]

前記組成物が乾燥粉末である、本発明1068の方法。

[本発明1077]

前記組成物が部分的に水和されたペーストである、本発明1068の方法。

[本発明1071]

前記組成物が完全に水和されたペーストである、本発明1068の方法。

[本発明1073]

前記組成物が、血漿を含む希釈液で水和される、本発明1077または1078の方法。
[本発明1074]
湿潤剤がポロキサマー、ポリエチレングリコール、またはポリソルベートである、本発明1068の方法。
[本発明1074]
懸濁剤がカルボキシメチルセルロースである、本発明1068の方法。
[本発明1075]
止血組成物がシリンジの外筒内に存在する、本発明1068の方法。
[本発明1076]
投与前または投与時にトロンビンを止血組成物に添加する段階をさらに含む、本発明1068～1075のいずれかの方法。
[本発明1077]
トロンビン濃度が、再水和マイクロスフェアゲル1ml当たり約125 IU～約1,000 IU（両端の値を含む）の範囲内である、本発明1076の方法。
[本発明1078]
トロンビン濃度が、再水和マイクロスフェアゲル1ml当たり約700 IU～約2,000 IU（両端の値を含む）の範囲内である、本発明1076の方法。
[本発明1079]
トロンビン濃度が、再水和マイクロスフェアゲル1ml当たり約1,000 IU～約5,000 IU（両端の値を含む）の範囲内である、本発明1076の方法。
[本発明1080]
トロンビン濃度が、再水和マイクロスフェアゲル1ml当たり約125 IU～約50,000 IU（両端の値を含む）の範囲内である、本発明1076の方法。
[本発明1081]
以下を含む、止血組成物を含むキット：
ポリマーが、ゼラチン、コラーゲン、デキストラン、キトサン、アルギン酸、タンパク質、多糖、およびポリアクリルアミドからなる群より選択される、架橋ポリマーマイクロスフェア；
湿潤剤および懸濁剤からなる群より選択される少なくとも1つの添加物。
[本発明1082]
少なくとも1つのシリンジをさらに含む、本発明1081のキット。
[本発明1083]
トロンビンをさらに含む、本発明1081のキット。
[本発明1084]
希釈液をさらに含む、本発明1081のキット。
[本発明1085]
トロンビンをさらに含む、本発明1084のキット。
[本発明1086]
トロンビン濃度が、再水和マイクロスフェアゲル1ml当たり約125 IU～約1,000 IU（両端の値を含む）の範囲内である、本発明1083または本発明1085のキット。
[本発明1087]
トロンビン濃度が、再水和マイクロスフェアゲル1ml当たり約700 IU～約2,000 IU（両端の値を含む）の範囲内である、本発明1083または本発明1085のキット。
[本発明1088]
トロンビン濃度が、再水和マイクロスフェアゲル1ml当たり約1,000 IU～約5,000 IU（両端の値を含む）の範囲内である、本発明1083または本発明1085のキット。
[本発明1089]
トロンビン濃度が、再水和マイクロスフェアゲル1ml当たり包括的に約125 IU～約50,000 IUの範囲内である、本発明1083または本発明1085のキット。
[本発明1090]

架橋ゼラチンマイクロスフェアを含むキット。
[本発明1091]
湿潤剤および懸濁剤からなる群より選択される少なくとも1つの添加物をさらに含む、本発明1090のキット。
[本発明1092]
トロンビンをさらに含む、本発明1090のキット。
[本発明1093]
希釈液をさらに含む、本発明1090のキット。
[本発明1094]
トロンビンを含む架橋ゼラチンマイクロスフェアが綿撒糸に圧縮され、かつ乾燥されている、本発明1090または1092のキット。
[本発明1095]
トロンビン濃度が、再水和マイクロスフェアゲル1ml当たり約125 IU～約1,000 IU（両端の値を含む）の範囲内である、本発明1092または本発明1094のキット。
[本発明1096]
トロンビン濃度が、再水和マイクロスフェアゲル1ml当たり約700 IU～約2,000 IU（両端の値を含む）の範囲内である、本発明1092または本発明1094のキット。
[本発明1097]
トロンビン濃度が、再水和マイクロスフェアゲル1ml当たり約1,000 IU～約5,000 IU（両端の値を含む）の範囲内である、本発明1092または本発明1094のキット。
[本発明1098]
トロンビン濃度が、再水和マイクロスフェアゲル1ml当たり約125 IU～約50,000 IU（両端の値を含む）の範囲内である、本発明1092または本発明1094のキット。
[本発明1099]
本発明1001～1045のいずれかの止血組成物のいずれかを含むキット。
【図面の簡単な説明】
【０００５】
【図１】図1Aおよび1Bは、ゲルになるよう再水和された、トロンビンおよびポリマーマイクロスフェアを含む製剤によって、血塊強度が改善され、凝固反応時間が短縮することを実証する。図1Aは、マイクロスフェアゲルの濃度の増加に伴う血塊強度のプロットである。図1Bは、マイクロスフェアゲルの濃度の増加に伴う凝固時間(分単位の反応時間)のプロットである。◆IUトロンビン/mg乾燥マイクロスフェア；■マイクロスフェアのみ；誤差±1 IU/mLトロンビン。
【図２】ヘパリンを克服するために、高レベルのトロンビンが必要とされることを示す。高トロンビンを血液中に導入した場合、混合ピペット中で部分的な血塊が形成される場合が多い。ポリマーマイクロスフェアによって、トロンビンと血液の混合が改善され、血塊形成が改善される。ヘパリン阻害剤を部分的に克服するためには、75 IU～100 IUトロンビン/mLが必要とされる。マイクロスフェアおよびトロンビンの製剤はまた、より均一な血塊を形成する。血液は10 mM $CaCl_2$で再石灰化し、3.4 mgマイクロスフェア/mlゲルを伴うかまたは伴わない；◆マイクロスフェアゲルと混合したトロンビン；■直接混合したトロンビン；▲1 IU/mLヘパリンと混合したトロンビンおよびマイクロスフェアゲル。
【図３】ヘパリンの効果を克服するために、高レベルのトロンビンが必要とされることを示す。トロンビンを血液中に導入した場合、混合ピペット中で部分的な血塊が形成される場合が多い。マイクロスフェアゲル中のトロンビンによって、トロンビンと血液の均一な混合が改善され、血塊形成が改善される。1 IU/mLヘパリンの存在下では、ヘパリンなしの同じ反応時間に関して、ほぼ100倍のトロンビンが必要とされる。マイクロスフェアゲル中のトロンビンの製剤では、トロンビンの放出が遅延することによって、血塊発生時間(R)が短縮する。血液は10 mM $CaCl_2$で再石灰化し、マイクロスフェアゲルを伴うかまたは伴わず、かつヘパリンを伴うかまたは伴わない；◆1.2 mgゼラチンビーズと混合したトロンビン；■血液中に直接混合したトロンビン；▲マイクロスフェアゲル、トロンビン、お

よび1 IUヘパリン。
【図４】図4Aおよび4Bは、非ヘパリンプロットの拡大図をグラフに示す。トロンビンを血液と直接混合する場合、迅速な血塊形成のために、血塊は不均一である。血液または液体と混合する前に、トロンビンをゼラチンビーズに添加することにより、より良好な混合が起こり得、血塊反応時間および血塊強度が改善される。◆1.2 mgゼラチンビーズと混合したトロンビン；■血液中に直接混合したトロンビン。
【図５】局所止血時間(TTH)(平均SE)対組換えトロンビン(rトロンビン)用量のモデル予測を示すグラフである。
【図６】図6Aおよび6Bは、クロピドグレルによる処置前および処置後のヘパリン処置ウサギ血液の最大血塊強度(G_{max})に及ぼすrトロンビン濃度の効果を示す。クロピドグレル処置前のウサギ3匹から血液を採取し、1 IU/mLヘパリンを添加した(6A、上図)。クロピドグレル処置およびインビボヘパリン処置後に、再度血液試料を採取した(6B、上図)。各点は、1つのトロンビン濃度における単一のTEGアッセイのピーク強度G_{max}を表す。トロンビン濃度は、25 IU～200 IU/mL血液の範囲であった。データを対数用量方程式に適合させることにより、ヘパリン(EC50=54 IU/mL)およびヘパリン+クロピドグレル(EC50=66 IU/mL)を克服するには、より高いトロンビン濃度が必要であることが実証される。
【図７Ａ】局所止血時間を示すグラフである。図7Aは、ゼラチン基質と共に適用したrトロンビンまたはプラセボのTTHを示す、ラット半腎切除モデルによるデータを示す。
【図７Ｂ】局所止血時間を示すグラフである。図7Bは、ゼラチン基質と共に適用したrトロンビンまたはプラセボのTTHを示す、ウサギ肝損傷モデルによるデータを示す。
【図７Ｃ】局所止血時間を示すグラフである。図7Cは、ゼラチン基質と共にまたは噴霧として投与したrトロンビンまたはプラセボのTTHを伴う、A-Vシャントグラフト穿刺モデルによるデータを示す。
【図８】トロンビンおよび130～380μmポリマーマイクロスフェアの組成物と、1000 IU/mLトロンビンおよび<130μm：130～380μmポリマーマイクロスフェアの50:50重量比混合物の組成物を比較する、ラット半腎切除モデルにおけるTTHを示す。P＝プラセボと混合、rTh＝1000 IU/mLトロンビンと混合。
【発明を実施するための形態】
【０００６】
発明の詳細な説明
本発明は、本明細書中に記載されている特定の方法、プロトコール、および試薬等に限定されず、したがって変動し得ることが理解されるべきである。本明細書で使用した用語は特定の態様を説明する目的にのみ用いられ、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。
【０００７】
本文が特に明記していない限り、本明細書および特許請求の範囲で使用する単数形はその複数形を含み、逆も同様である。実施例以外では、または特に指示のある場合を除き、本明細書で使用する成分の量または反応条件を表す数字はすべて、すべての例において「約」という用語により修飾されているものと理解されるべきである。
【０００８】
特定された特許およびその他の出版物はすべて、例えば、本発明に関連して使用することができる、そのような出版物中に記載された方法を説明および開示する目的で、参照により本明細書に明確に組み入れられる。これらの出版物は、本出願の出願日よりも前にそれらが開示されたというだけの理由で提供される。この点に関するいかなるものも、本発明者らが、先行発明またはその他の理由でそのような開示を先行する資格がないことを認めるものと解釈されるべきでない。日付に関するすべての記載またはこれらの文書の内容に関する表現は、本出願人に利用可能な情報に基づいており、日付の正確さまたはこれらの文書の内容に関していかなる承認も構成しない。
【０００９】
特に明記していない限り、本明細書で使用する専門用語および科学用語はすべて、本発

明が属する技術分野の当業者に一般的に理解される意味と同じ意味を有する。本発明の実施または試験において、任意の公知の方法、装置、および材料を用いることができるが、この点に関する方法、装置、および材料を本明細書に記載する。

【００１０】

本発明は、架橋ポリマーマイクロスフェアを含む止血組成物を提供する。止血組成物は架橋ゼラチンマイクロスフェアであってよい；しかし、コラーゲン、デキストラン、キトサン、アルギン酸、タンパク質、多糖、ポリアクリルアミド、およびその他のヒドロゲル組成物を用いることもできる。特定の局面において、架橋ゼラチンマイクロスフェアは、直径約50μm～約500μmを有し得る。加えて、架橋ゼラチンマイクロスフェアは、孔径約20μmを有する孔をさらに含み得る。本発明のある種の態様では、止血物質のマイクロスフェアへの所望の取り込みおよび放出、または様々な出血適用における止血組成物中の止血物質の持続的適用を最大にするために、マイクロスフェアの粒子サイズおよび孔径の両方を最適化する。粒子サイズまたは孔径を減少または増加させることで、適用に応じた、止血組成物中の止血物質の緩徐なまたは迅速な放出が可能となり得る。例えば、粒子サイズは、典型的な架橋ゼラチンマイクロスフェアにおいて約10μm～約500μm（両端の値を含む）の範囲であってよい。本発明の止血マイクロスフェアにおける粒子サイズの範囲内には、それぞれ約10～100μm、100～200μm、100～300μm、100～400μm、200～300μm、300～400μm、400～500μm、50～150μm、150～250μm、150～350μm、250～350μm、350～450μm、および10μm～500μm（両端の値を含む）の間の同様の増分範囲などといった、10～500μm内のより狭い範囲も実現可能であることが理解される。さらに、より大きな孔径が所望されるいくつかの適用における、50～200μm（両端の値を含む）または最大300μmまでというより大きな孔径と同様に、1μm～50μm（両端の値を含む）というより小さな孔径を利用することも可能である。本発明の止血マイクロスフェアにおける孔径の範囲内には、それぞれ1～50μm、50～100μm、100～150μm、150～200μm、200～250μm、250～300μm、10～60μm、20μm～70μm、30～80μm、40～90μm、60～110μm、70～120μm、80～130μm、90～140μm（両端の値を含む）、および最大約300μmまでの同様の増分範囲などといった、1μm～300μm（両端の値を含む）内のより狭い範囲も実現可能であることが理解される。

【００１１】

トロンビンなどの止血剤および/または血漿を用いることができる。ある種の態様において、止血組成物はトロンビンを含み得る。そのようなトロンビンは動物もしくはヒト血漿に由来してもよいし、または組換えヒトトロンビン(rトロンビン)などの組換えトロンビンであってもよい。さらに、トロンビンに加えて、フィブリノーゲン、第XIII因子、プロテインC、エピネフリン、トロンボモジュリン、第V因子、第VIII因子等などの付加的な止血剤を用いてもよい。

【００１２】

本局面に加えて、止血組成物を湿潤剤、例えばポロキサマーもしくはポロキサマー188、ポリエチレングリコール、またはポリソルベートと混合してもよい。あるいは、止血組成物を、カルボキシメチルセルロースなどの懸濁剤と混合してもよい。湿潤剤および/または懸濁剤を伴うまたは伴わない止血組成物は、乾燥粉末として、または止血組成物が所望の形態になるように圧縮される、乾燥される、化学結合される、もしくは熱的に形成される予備成形形状として調製することができる。本態様のさらなる局面では、能動止血物質、例えばトロンビンを、投与の前に該架橋マイクロスフェアを分散させるために用いる希釈液と混合する。特定の態様において、希釈液は、患者自身の血液に由来し得る血漿を含む。さらなる態様では、マイクロスフェアを、非重力依存的様式の適用が起こり得る十分な粘性、接着性、および密度の希釈液中に懸濁する。

【００１３】

別の態様は、架橋ポリマー(例えば、架橋ゼラチン)マイクロスフェアおよび少なくとも1つの添加物を含む止血組成物を提供する。1つの局面において、添加物は湿潤剤および/または懸濁剤である。添加物は、ポロキサマーもしくはポロキサマー188、ポリエチレン

グリコール、またはポリソルベートなどの湿潤剤であってよい。あるいは、添加物は、カルボキシメチルセルロースなどの懸濁剤であってよい。止血組成物は乾燥粉末であってよい。本態様のさらなる局面では、能動止血物質、例えばトロンビンを、該架橋ポリマーマイクロスフェアおよび1つまたは複数の添加物を分散させるために用いる希釈液と混合する。希釈液は、止血組成物を受ける対象から調製された血漿などの血漿を含み得る。

【００１４】

添加物と混合された止血組成物は、複数の多孔性架橋マイクロスフェアを含み得る。架橋ゼラチンマイクロスフェアは、60:1～3:1（両端の値を含む）(ゼラチンマイクロスフェア：ポロキサマー188の比)の範囲の重量比で、ポロキサマー188などの湿潤剤と混合してもよい。標的部位への適用を目的として調製するためには、止血組成物は水性媒体中に容易にかつ実質的に均一に分散されて、完全に水和されたペーストまたはゲルの粘度を生じる。本発明の止血組成物は使用時に調製するが、それらは長期間(例えば、数時間)にわたって物理的特性を維持して、シリンジ通過性および流動性を提供する。

【００１５】

本発明はまた、その中に配置された止血組成物を含む医療機器を作製および滅菌する方法を含む。

【００１６】

本発明の別の態様は、低用量～高用量のトロンビンという一連のトロンビン用量を保有する止血組成物を提供する。より具体的には、多孔性マイクロスフェアに、再水和マイクロスフェアゲル1 mL当たり125 IU～700 IU（両端の値を含む）トロンビン；700 IU～1,000 IU；1,000 IU；2,000 IU；または最大5,000 IUトロンビンまでを負荷する。ある種の適用では、多孔性マイクロスフェアに、再水和マイクロスフェアゲル1 mL当たり1,000 IU超のトロンビン、再水和マイクロスフェアゲル1 mL当たり2,000 IU超のトロンビン、例えば再水和マイクロスフェアゲル1 mL当たり最大5,000 IU/mL（その値を含む）までおよび最大50,000 IU/までを負荷してもよい。これらの組成物は高レベルのトロンビンを放出し、均一な血塊を生じ、アスピリンもしくはヘパリンなどの血液希釈剤、またはクロピドグレル二硫酸塩(例えば、Plavix(登録商標)またはその他の商標)などの抗凝固剤を含む血液中で適用するのに特に有用な組成物である。

【００１７】

別の態様は、通常の手術器具使用によって、または内視鏡、顕微鏡、およびロボットによる止血適用において用いるために特別に設計された器具使用の一部として適用され得る、圧縮止血組成物から成形された幾何学的止血装置を含む。例えば、多孔性マイクロスフェアを、形状および剛性を保持するか、または湿潤させた後にある種の柔軟性を達成する、円柱形状になるように、圧縮する、乾燥させる、化学結合する、または熱的に形成することができる。そのように成形された組成物は内視鏡による導入に適しており、したがってトロンビン送達のための貯蔵所、および圧力とトロンビンとを同時適用するために内視鏡機器に捕捉され得るまたは付着され得る堅固な拡張物として役立つ。あるいは、多孔性マイクロスフェアを、液体(トロンビン)保持および圧力伝達基材によるトロンビンの適用を必要とする外科解剖学的構造に適合する形状になるように圧縮する、乾燥させる、化学結合する、または熱的に形成することができる。そのような形状は、様々なサイズの血管吻合の周囲に設置するための輪状形状および半輪状形状を含み得る。それらはまた、乳房「腫瘍摘出術」によって生じる空洞欠陥、またはその他の手術誘発性空洞欠陥などの、手術によって誘発される予想可能な空洞欠陥に適合するように成形することができる。

【００１８】

さらなる態様は、関心対象の部位に該止血組成物を適用するための送達装置中の止血組成物を提供する。本態様の1つの局面において、送達装置はシリンジである。本態様のさらなる局面では、該シリンジを送達チップに取り付ける。

【００１９】

さらなる態様は、出血を減少させる目的で、止血組成物を標的部位に適用する方法を提供する。本態様の1つの局面では、一片のガーゼを用いて止血組成物を標的部位(出血)に

適用する。本局面では、止血組成物をガーゼに適用し、次にガーゼおよび止血組成物を標的部位に適用し、このようにして止血組成物を出血部位に接触させる。本態様の方法は、血液のみと比較した場合に、より強力な血塊を提供する。

【００２０】

別の局面では、シリンジからの分注によって、止血組成物を標的部位に適用する。本局面では、シリンジに止血組成物を充填し、シリンジを標的部位に向ける。次に、止血組成物をシリンジから標的部位に押し出す。任意に、次に、標的部位にある止血組成物上に一片のガーゼを適用し、外科医によってその上に機械的圧力がかけられる。本態様のさらなる局面では、チップに取り付けたシリンジに止血組成物を充填し、シリンジおよびチップを標的部位に向ける。次に、止血組成物をシリンジから標的部位に押し出す。例えば、標的部位がシリンジのみでは容易に到達できない位置にある場合、チップは有用である。そのような場所には、空洞内の奥深くにあり、器官によって部分的に妨げられる標的部位、またはその他の部位が含まれる。チップはまた、押し出される止血組成物のサイズを制御するのにも有用である。

【００２１】

例えば、チップは、使用者が、長期にわたる出血部位に止血組成物を連続して押し出せるようにするのに有用であり得る。任意に、次に、これらの標的部位にある止血組成物上に一片のガーゼを適用する。

【００２２】

本発明の態様は、水溶液中への分散に際して、最小であるが迅速でかつ完全な膨潤；最小限の「粘着性」；および許容可能なシリンジ通過性を示す架橋ゼラチンマイクロスフェアを含み得る、有効な流動性止血組成物を提供する。より具体的には、本態様は、孔によって粒子表面積が増加し、それによって凝血原表面における接触活性化が増加して、止血が促進される、多孔性が顕著なポリマーマイクロスフェア、例えば架橋ゼラチンマイクロスフェアを提供する。さらに、孔はトロンビンなどの能動止血物質を捕捉することができ、それによって適用部位における能動止血物質の保持が増加する。実際に、止血組成物は、以前に記載されているよりも高用量のトロンビンを保有し得る。これらの架橋ゼラチンマイクロスフェアは、受動止血物質として現在用いられている断片化ヒドロゲルを上回る改良物である。

【００２３】

特定の態様はまた、粉末形態で投与されない多孔性マイクロスフェアを提供する。代わりに、これらの多孔性マイクロスフェア止血組成物を、現在のゼラチンスポンジ構造(長方形六面体形状)を再現した形状、またはありとあらゆるその他の可能な構造を含む形状に結合させる。例えば、多孔性マイクロスフェアを、それらの形状および剛性を保持するか、または湿潤させた後にある種の柔軟性を達成し、内視鏡による導入に適しており、したがってトロンビン送達のための貯蔵所、および圧力とトロンビンとを同時適用するために内視鏡機器に捕捉され得るまたは付着され得る堅固な構造として役立つ円柱形状になるように圧縮する、乾燥させる、化学結合する、または熱的に形成することができる。あるいは、多孔性マイクロスフェア止血組成物を、液体(トロンビン)保持および圧力伝達基材によるトロンビンの適用を必要とする外科解剖学的構造に適合するあらゆる種類の形状になるように圧縮する、乾燥させる、化学結合する、または熱的に形成することができる。そのような形状は、様々なサイズの血管吻合の周囲に設置するための輪状形状および半輪状形状、ならびに乳房「腫瘍摘出術」によって生じる空洞欠陥またはその他の手術誘発性空洞欠陥などの、手術によって誘発される予想可能な空洞欠陥に適合する形状を含み得る。

【００２４】

架橋ゼラチン粉末の有効性および有用性は、架橋の割合および度合いに依存し、この場合、全ゼラチンのうちの架橋ゼラチンの割合とは、体温(37℃)で不溶性のゼラチンの割合を表し、架橋の度合い(程度とも称される)とは、37℃不溶性架橋ゼラチン中の架橋の量の尺度である。架橋された割合が低すぎる場合には、分散ゼラチン基質中に存在する可溶性

ゼラチンによって、止血効果を担う懸濁粒子の濃度が低下し、出血浸透を特徴とする有効性の低下が生じ得る。可溶性ゼラチンは分散産物の「粘着性を高め」得て、このことにより、ガーゼ、または圧力適用に役立てて止血を促進するために多くの場合に用いられる他の材料を除去した後に再出血が起こるため、同様にこれらの調製物では有効性が低下し得る。架橋の度合いが高すぎる場合には、架橋ゼラチンは疎水性が高くなりすぎ、水溶液中に容易にかつ均一に分散することができなくなり得、よって有用性(すなわち、シリンジ通過性)が低下する。架橋の度合いが低すぎる場合には、架橋ゼラチンは吸収性が高くなりすぎ、分散後、時間が経つにつれ様々な粘度を示しつつ、膨潤時間が延長する。部分的に水和された吸収剤を適用した後の過剰な膨潤はまた、止血物質を、骨孔、骨境界の領域、脊髄、ならびに/または視神経および視交叉において、またはそれらの近傍において用いた場合に、麻痺および神経損傷などの重篤な有害反応を潜在的に招き得る。

【００２５】

ゼラチン架橋の度合いおよび程度はまた、医療機器を最終滅菌するために多くの場合に用いられる電離放射線(すなわち、e-ビームまたはγ線照射)によっても影響を受ける。最終滅菌に必要とされる電離放射線量は、照射前の産物バイオバーデンに依存し、医療機器用のγ線照射の典型的な滅菌線量は25 kGyである；25 kGy標的γ線照射線量は、産物を15 kGy～35 kGyの範囲に曝露する場合が多い。架橋される割合および架橋の度合いは、架橋ゼラチンが乾燥粉末として照射される場合に減少し得る。しかしながら、架橋ゼラチンが水和分散物として照射される場合には、ゼラチン架橋の度合いおよび程度は増加し得る。したがって、最終滅菌された架橋ゼラチンの、溶解性、疎水性、および/または膨潤などの特性は、照射前の架橋の度合いおよび程度、ならびに照射される形態(すなわち、水和分散物または乾燥粉末)に依存する。架橋された割合および架橋の度合いが限られている架橋ゼラチンを水和分散物として照射すると、照射曝露の範囲(例えば、15 kGy～35 kGy)に起因して、バッチ内の変動が生じ得る。

【００２６】

理想的には、一連の電離放射線量(例えば、15 kGy～35 kGy)に対する乾燥粉末の曝露によって誘導される任意の変化が、溶解性、疎水性、および/または膨潤に関して無視できるように、ゼラチン架橋過程によって、架橋の度合いおよび程度が十分な産物が生成される。ゼラチンは、脱水加熱(dehydrothermal)過程、またはグルタルアルデヒドもしくはヘキサメチレンジイソシアネートなどの架橋剤を使用する化学的過程を用いて、架橋することができる。架橋ゼラチンの割合および架橋の度合いが低い架橋ゼラチンは、乾燥粉末として照射した場合、架橋の度合いおよび程度が減少するため、誘導される溶解性、膨潤、および「粘着性」は有意に増加する。架橋の割合および度合いが限られている架橋ゼラチンを水和ペーストとして照射すると、照射線量範囲(すなわち、15 kGy～35 kGy)にわたる産物曝露に起因して、溶解性、疎水性、および粘着性にバッチ内の変動が生じる。

【００２７】

既存の市販の架橋ヒドロゲル産物は、適量の水性媒体中への分散後の投与を目的とした乾燥粉末または部分水和ペーストのいずれかとして提供される。これらの粉末は、吸収性ゼラチンスポンジ、U.S.P.(例えば、GELFOAM(登録商標), Pfizer, Inc. またはSURGIFOAM(商標), Ethicon, Inc.)、または典型的な化学的もしくは脱水加熱架橋処理の過程で形成される固形物(例えば、米国特許第6,063,061号；米国特許出願公開第2003/0064109号を参照されたい)などの、架橋基質の機械的破砕によって形成される。これらの架橋ヒドロゲルは最も典型的にはゼラチンベースのヒドロゲルであるが、当業者に公知である通り、コラーゲン、デキストラン、キトサン、およびその他の組成物もまた用いられる。

【００２８】

ヒドロゲルベースの止血組成物は、乾燥、部分水和、または完全水和の状態で投与することができる。完全に水和された状態では、ヒドロゲルはさらなる液体を吸収することができず、そのサイズで十分に膨潤されている。対照的に、乾燥または部分水和ヒドロゲル組成物は、過剰な吸着能を有する。投与に際して、乾燥または部分水和ヒドロゲルは液体を吸収し、インビボでゼラチン基質の膨潤が生じる。適用後の過剰な膨潤は、止血物質を

、骨孔、骨境界の領域、脊髄、ならびに/または視神経および視交叉において、またはそれらの近傍において用いた場合に、麻痺および神経損傷などの重篤な有害反応を潜在的に招き得る。したがって、乾燥または部分水和ヒドロゲルの膨潤は、投与と関連して考慮されるべきである。

【００２９】

理想的な止血組成物は、以下の特性を少なくとも1つ有する：トロンビンなどの能動止血物質と適合する；止血ゼラチン基質の水溶解性が限定されている；最終滅菌産物を得るのに十分な広範囲の電離放射線(15 kGy～35 kGy)への曝露後に、有効性および有用性に最小限の変化を示す；水性媒体中に分散させた場合に、迅速かつ完全な膨潤を示す；完全に水和された状態で投与した場合に、効果的である；許容可能なシリンジ通過性があり、最小限の力でシリンジ(または送達装置)からの均一な分散物の完全な分注が可能になる；顕著な多孔性を含む；投与後の再吸収時間が短い(1年未満、または6カ月未満)；乾燥粉末および分散懸濁液(例えば、ゲル)の両方として、その粒子形状およびサイズによって流動特性が促進される。

【００３０】

さらなる態様において、本発明は、水溶液中への分散に際して、最小であるが迅速かつ完全な膨潤、最小限の粘着性、および改善されたシリンジ通過性を示す流動性架橋組成物をもたらす、湿潤剤および/または懸濁剤と組み合わせた多孔性架橋ゼラチンヒドロゲルマイクロスフェアを使用する。化学架橋マイクロスフェアは、ほぼ球状の微粒子を生成し、かつ平均サイズ約20μmの孔を導入するように特別に設計され、規定の粒子サイズ範囲(約50μm～約500μm)のマイクロスフェア産物を生じる乳化過程によって製造することができる。マイクロスフェアは、米国特許第7,404,971号、第4,935,365号、第5,015,576号に従って製造することができる。マイクロスフェアはまた、例えばCultiSpher(登録商標)-Sマクロ多孔性ゼラチンマイクロキャリアマイクロスフェア(Celltrix, Malmo, Sweden；Percell Biolytica, Astorp, Sweden)のように、市販もされている。止血有効性は、非臨床モデルにおいて完全に水和された分散物として確立されている。

【００３１】

規定の粒子サイズ範囲(微粒子および粗粒子を除外するサイズ)の孔を含む、乳化過程によって調製された架橋ゼラチンマイクロスフェア粉末の止血物質としての1つの利点(孔のないマイクロスフェア粉末に対して)は、非臨床出血モデルを用いて確立されている。架橋ゼラチンマイクロスフェア過程の別の利点は、流動性受動止血物質の有効性に必要な特性(すなわち、溶解性、疎水性、膨潤)の観点から、当技術分野おける架橋ゼラチンと比較して、一連のγ線照射線量(15 kGy～35 kGy)にわたって変化に抵抗性を示す乾燥粉末を生じることである。球状の粒子形状および既定のサイズ分布により、製造(例えば、送達装置への乾燥粉末の充填)および水性媒体中への分散を支援する粉末流動特性もまた促進される。本発明の多孔性マイクロスフェアは止血物質として以前に考察された利点を提供するが、この粒子は、水和分散物を送達するのに機械力に依存する送達装置中で分散物が用いられる場合に、水和分散物から水溶液が除去される「スポンジングアウト(sponging-out)」効果を有する。例えば、多孔性架橋マイクロスフェアを水溶液中に分散させ、送達装置がシリンジである場合、シリンジプランジャーに加えられる機械力によって、多孔性架橋マイクロスフェアに水溶液のスポンジングアウトが不均衡に起こる。結果として、最初に分散される材料は、後に分散される材料よりも薄い粘度を有する。さらに、後に分散される材料はスポンジングアウト効果によって非常に乾燥し得るため、後のこの材料は適正な力でシリンジから分散されなくなる。

【００３２】

しかしながら、添加物として湿潤剤(例えば、ポロキサマー188、ポリエチレングリコール3350、ポリソルベート20、またはポリソルベート80)および/または懸濁剤(例えば、カルボキシメチル-セルロース)を含めることによって、スポンジングアウト効果は改善される。湿潤剤は、用いる薬剤に応じて適切な比率で、多孔性架橋ゼラチンマイクロスフェアと混合することができる。ポロキサマー-188に関しては、例えば、60～3:1(架橋ゼラチン

：添加物)という重量比が効果的である。同様に、懸濁剤も、60～3:1(架橋ゼラチン：添加物)という重量比で、多孔性架橋ゼラチンマイクロスフェアと混合することができる。湿潤剤と懸濁剤の混合物を多孔性架橋ゼラチンマイクロスフェアと混合する場合には、湿潤剤＋懸濁剤を多孔性架橋ゼラチンマイクロスフェアと適切な比率で混合する。懸濁剤/湿潤剤はまた、ポリソルベートについて行われ得る通りに、マイクロスフェアを分散させるために用いる媒体を介して導入してもよい。架橋ゼラチンマイクロスフェア粉末と添加物の組み合わせにより、流動性受動止血物質の望ましい特性(すなわち、分散物の均一性、最小限の押出力)が長期間(数時間)にわたって保持される。記載の製剤はまた、トロンビンと適合する。

【００３３】

本発明のいくつかの態様において、止血組成物はトロンビンを含む。本明細書で用いる「トロンビン」とは、プロトロンビン(第II因子)のタンパク質切断によって生じる、α-トロンビンとしても知られる活性化酵素を示す。トロンビンは当技術分野で公知の様々な方法によって調製することができ、「トロンビン」という用語は、特定の生成方法を意味することを意図していない。本発明においては、ヒトおよび非ヒトトロンビンの両方を用いることができる。トロンビンは、止血剤として、および組織接着剤の成分として医学的に用いられる。ヒトおよび非ヒト(例えば、ウシ)トロンビンは、当技術分野で公知の方法に従って調製される。血漿からのトロンビンの精製は、例えば、Bui-Khac et al.、米国特許第5,981,254号に開示されている。Cohn画分IIIなどの血漿画分からのトロンビンの精製は、Fenton et al., 252 J. Biol. Chem. 3587-98 (1977)に開示されている。組換えトロンビンは、米国特許第5,476,777号に開示されている通りに、ヘビ毒活性化因子による活性化により、プレトロンビン前駆体から調製することができる。したがって、トロンビンは組換えトロンビンであってよい。製剤中の組換えトロンビンの量は、3000 NIH(国立衛生研究所)単位～30,000 NIH単位（両端の値を含む）の組換えトロンビン、または5000 NIH単位の組換えトロンビンであってよい。本局面において、トロンビンは、凍結乾燥粉末としてキット中に提供され得る(例えば、米国特許第7,473,543号を参照されたい)。この凍結乾燥粉末は、血漿を含む希釈液をはじめとする希釈液を用いて再構成することができる。

【００３４】

本発明の別の態様において、トロンビンを乾燥マイクロスフェアゲルに添加し、次に血液中に導入する場合、血塊形成の速度は増加し、トロンビンを血液中に直接添加する場合よりも血塊動態が遅いことが示される(図4A)。本発明の架橋ポリマーマイクロスフェアと併用する場合、トロンビンはまた、より良好な血塊強度を生じる(図4B)。マイクロスフェアゲルがないと、トロンビンの増加に伴って血塊強度は減少するのに対して、トロンビン＋マイクロスフェアゲルは血塊強度を維持する。これに関連して、トロンビンを、約1000 IU/mLの濃度で本発明の止血組成物中に含めることができる。このデータから、マイクロスフェアゲルを含む止血組成物中に、より高いトロンビン濃度を用いてもよいことも支持される。理論によって縛られることはないが、高トロンビン用量止血組成物からのトロンビンの受動拡散が、均一で強力な血塊の形成に役立つ可能性がある。この製剤の重要性は、アスピリン、ヘパリン、またはクロピドグレル二硫酸塩などの希釈剤または抗凝固剤で処理された血液において、容易に明らかである。そのように処理された血液の場合、高用量トロンビンマイクロスフェア止血組成物は、正常血液中に見出されるトロンビンの10倍を送達し、正常な血塊を生じることができる。この製剤の重要性はまた、そのような希釈剤または抗凝固剤の非存在下において均一で強力な血塊の形成が所望される、手術またはその他の出血適用においても容易に明らかである。

【００３５】

本明細書で用いる「基質」とは、少なくともマイクロスフェアおよび止血剤を含む混合物を示す。基質は、湿潤剤を含んでもよいし、含まなくてもよい。例えば、本明細書中のいくつかの実施例において用いる通り、基質は、架橋ゼラチンマイクロスフェア、止血剤としてのトロンビン(例えばrトロンビン)、およびポロキサマー188などのポロキサマーを

含む。基質は、本明細書に記載の通り、マイクロスフェア、止血剤、および1つまたは複数の湿潤剤の異なる混合物を含み得ることが理解される。

【００３６】

本明細書で用いる「分散」とは、少なくとも2つの相を含む混合物(例えば、固相および液相を含む混合物)を示す。分散物の粘性に応じて、これは懸濁液またはペーストとみなされ得る。本発明の止血組成物中のマイクロスフェアは、血漿を含む水性媒体をはじめとする水性媒体中に分散させることができる。

【００３７】

1940年代以来、トロンビンは、止血時間(TTH)を加速するため、および手術野の可視化を改善するため、ならびに創傷清拭および皮膚移植を受ける熱傷患者での使用を含むような手技で用いるための局所止血剤として、外科手技中に用いられている(Bishop et al., 32(Sl) Semin. Thromb. Hemost. 86-97 (2006)；Lundblad et al., 91(5) Thromb. Hemost. 851-60 (2004))。1000 IU/mLの局所トロンビンの安全性および有効性が、最近、ヒトの臨床試験において確認されたが(Chapman et al., 205(2) J. Am. Coll. Surg. 256-65 (2007)；Doria et al., 24(3) Curr. Med. Res. Opin. 785-94 (2008))、ヒトの臨床試験は、止血有効性に及ぼす局所トロンビンの異なる濃度の効果を比較していない。しかしながら、フィブリン塊形成におけるトロンビン濃度の重要な性質が、いくつかのインビトロ設定において実証されており、高濃度のトロンビンの存在下で形成された血塊が、より固く詰まったフィブリン鎖を有することが示される。

【００３８】

インビボにおける止血時間の変動は、間接的に、血塊の完全性に及ぼす局所トロンビン濃度の相対的効果を示し得る。125 IU/mLのヒトトロンビン＋ゼラチンスポンジのブタ肝損傷モデルにおける最近の評価から、生理食塩水＋ゼラチンスポンジを上回る活性の改善が示された(Adams et al., J. Thromb. Thrombolysis [0929-5305] (JuI. 16, 2008))。止血の緩い定義(限定された滲出もまた許容されるエンドポイントである)を用いても、最初の3分の時点後、限定された累積的止血が認められた。しかしながら、12分の評価期間中に再出血する部位もかなりの数存在し、濃度が限定された止血効果が強く指摘される。このような知見から、標準的な1000 IU/mLとより低い125 IU/mLの適用との間で、止血の開始および血塊の完全性に差があるかどうかという疑問が生じる(Adams et al., 2008)。

【００３９】

これらの知見に基づき、病理的および薬理的な凝固撹乱の両方を含む一連の臨床設定において観察された有効性を理由に、臨床診療において1000 IU/mLトロンビン濃度の採用が考案されたのかもしれない。凝固におけるトロンビン酵素の効力により、すべてとは限らないがいくつかの臨床設定において、より低濃度の局所トロンビンが効果的になり得る、ということは理にかなっている。例えば、高トロンビンを標準的なピペッティング技法によって血液中に直接添加すると、混合が起こり得るよりも速くフィブリノーゲンがフィブリンに変換され、不均一な血塊が生じる。したがって、薬理的抗凝固および血小板障害の様々な条件下で、止血時間(TTH)に及ぼすトロンビン濃度の効果を試験するため、一連のトロンビン濃度を、ウサギの活発な動脈吻合出血のモデルにおいて評価した。血塊の粘弾特性の平行評価を、改良トロンボエラストグラフィーによって行った。血塊の完全性に潜在的な臨床的有意性があるかどうかを調べるため、出血部位の血塊破裂を評価した。

【００４０】

フィブリン塊形成中のトロンビン濃度により、止血時の血塊の完全性が決まる。多くの因子が、出血創傷界面における内因性および外因性トロンビン濃度の両方を減少させるように働く；出血性の血流による除去および希釈、ATIIIなどの阻害剤に対する迅速な結合、発生する血栓内への捕捉、ならびにスポンジおよび/または灌注による機械的除去。局所トロンビンを適用するか否かを問わず、外科医は、止血が創傷閉鎖後にも耐久性があるかどうかの予測因子として、手術中の止血の全体評価に頼る。実際問題として、再出血または血腫形成が起こる場合に、不適切な血塊構造の結果が認められる。止血が遅延する場合、通常は、PT、PTT、および血小板機能測定を伴うまたは伴わない血小板数によって凝

固性を評価する。加えて、凝固における病理的撹乱を迅速に検出する手段として、トロンボエラストグラフィー(TEG)、血塊形成中の時間依存的な粘弾性変化のエクスビボ解析が行われ得る。これらの実験評価は、手術中の出血重症度と直接相関しない可能性もあり、また、血塊形成に影響する創傷中の多くの変化物のために、外科的介入に対する応答を予測しない。これらの変化物のすべてが、血塊形成中のフィブリン重合および血小板取り込みの現在の描写が高度に様式化される予測可能な結果と共に、リアルタイムで理解されるわけではない。

【００４１】

複数のインビトロ実験から、トロンビン濃度がフィブリン塊形成中の最も重要な因子であり、高濃度のトロンビンの存在下で形成された血塊は、より固く詰まったフィブリン鎖を有することが示された(Blomback et al., 997 (1-2) Biocim. Biophys. Acta 96-110 (1989)；Blomback et al.,75(5) Thromb. Res. 521-38 (1994)；Wolberg, 21(3) Blood Rev. 131-142 (2007))。加えて、正常な血小板機能が、生理的な血塊発生に必要である。1つのグループが、一連の制御されたインビボ出血モデルにおける止血のトロンビン濃度依存性について記載した。外因性のrトロンビンは、500 IU/mL～2000 IU/mLの用量で、手術に関連した肝出血のインビボウサギモデルにおいて止血を達成するのに効果的であった(Heffernan et al., 47(1) Regul. Toxicol. Pharmacol. 48-58 (2007))。このモデルにおいて、rトロンビンは、ガーゼパッドと共に適用した場合、用量依存的様式で出血を停止させるのに効果的であった。類似のウサギインビボモデルでは、ガーゼスポンジまたは吸収性ゼラチンスポンジのいずれかと共に、100 IU/mL～2000 IU/mLの濃度のrトロンビンを使用し、同様にrトロンビン用量に依存した止血時間(TTH)の短縮を示した(Meehan & Bolton, 121(2) J. Surg. Res. 323 (2004))。

【００４２】

本明細書で示したウサギインビボモデルは、ウサギ動脈静脈(AV)グラフトモデルを用いて血管吻合出血を再現する。このモデルを用いて、吸収性ゼラチンスポンジ、USPと併用した31.25 IU/mL、62.5 IU/mL、125 IU/mL、および1000 IU/mL rトロンビン、ならびにTTHに及ぼす効果を評価した。他のアッセイでは、クロピドグレル二硫酸塩、ヘパリン、またはその両方で前処置したウサギにおいて、吸収性ゼラチンスポンジ、USPと併用する止血剤として、2つの濃度のrトロンビン、125 IU/mLおよび1000 IU/mLを用いて、TTHを評価した。ヘパリンのみで処置した動物では、両方のrトロンビン濃度によって止血が加速された。特筆すべきは、125 IU/mLによって達成されたTTHの周囲の標準誤差は、1000 IU/mLで処置した動物のものよりもはるかに幅広かった。クロピドグレル二硫酸塩で処置した動物では、1000 IU/mLのrトロンビンによって、ヘパリン単独で処置した動物と同じ時点で止血が達成された。対照的に、血小板機能のクロピドグレル二硫酸塩阻害は、125 IU/mL rトロンビンの適用によって克服されなかった。有効性におけるこの相違の理由は、直感的に明らかではなく、凝固性に及ぼす血小板阻害効果の濃度依存的なトロンビン逆転は報告されていない。このことは、血管および心臓手術における局所トロンビン調製物の広範な使用の信用度を高める；それは、1000 IU/mLのトロンビンが、全範囲の臨床的出血負荷にわたって止血を加速するためである。

【００４３】

止血の達成後にグラフトをクランプで締め付けることにより、血塊完全性の積極的な試験を行った(血塊破裂試験)。結果から、考慮する必要があるトロンビン濃度の別の効果；血塊安定性が存在することが示唆される。この刺激的な試験では、PTFEグラフト材料に対する血塊境界の接着性、および血小板力の発生を測定する。血小板力の発生は、血小板が、増加するフィブリン鎖密度の結果と協定を結び、よって圧力の突然の急上昇によって血塊破損が生じないことを保証する血栓成熟の過程である。血小板機能の薬理的および機械的阻害は、心肺バイパス術後のヒトにおける出血増加と関連づけられた(Greilich et al., 105(6) Thromb. Res. 523-29 (2002))。この観点から、12分の時点でブタ肝出血モデルで評価された再出血創傷は、血塊の強度および密度の減少のために二次的に再出血した可能性が高い。特筆すべきは、肝出血は一般に低血圧静脈出血であるため、血塊破裂をこの

モデルで研究し得る妥当な手段はなかった。

【００４４】

加えて、インビボAVシャント実験におけるウサギによる試料をインビトロで用いて血塊強度を調べるために、トロンボエラストグラフ技法(TEG)をインビトロで用いた。血塊は粘性および弾性の両方の特性を有し、トロンボエラストグラフは、凝固血液の血塊強度(剪断弾性係数)を測定するために用いられており、粘性とは独立して弾性特性を測定することが実証されている(Chandler, 21(S4) Seminars Thromb. & Hemost. 1-6 (1995))。外因性のトロンビンはほぼ即時の凝固を引き起こすため、反応を遅延させ得るために、TEG実験で典型的に用いられる条件を変更する必要があった。インビトロTEG実験は、様々な抗凝固剤が血塊強度に及ぼす効果、および抗凝固剤が存在する場合の様々な濃度のrトロンビンの相互作用を実証するためにも用いた。TEG実験は、ウサギAVシャントモデルで用いたrトロンビンの濃度と直接比較することができないrトロンビン濃度を必要とするが、データから、血塊形成に及ぼすクロピドグレル二硫酸塩血小板機能障害の効果の濃度依存的逆転が確認された。

【００４５】

本研究では、すべての外科的実践に関する臨床的止血の3分野に及ぼすトロンビン濃度の効果を評価する：一連の薬理学的凝固阻害にわたる出血停止までの時間、血塊強度、および血塊破砕に対する抵抗性。1000 IU/mLのrトロンビンが、止血時間に及ぼすクロピドグレル二硫酸塩の効果を無効にするという知見は、臨床医にとって重要な意味を有する。クロピドグレル二硫酸塩は、血小板上のADP受容体を不可逆的に阻害し、手術の前にクロピドグレル二硫酸塩を中断するタイミングに関して多種多様な意見が存在する。手術期のMIのリスクが高い患者では、クロピドグレル二硫酸塩を中止することが、有害な心臓事象の発生率に影響し得ると主張されている。このように、顕著なクロピドグレル二硫酸塩血小板阻害による緊急の、急を要する、および選択的な手技を求めている患者の割合は増加し続けている。1000 IU/mL局所rトロンビンが、止血時間に対するクロピドグレル二硫酸塩血小板阻害の影響を無効にする能力により、手術集団におけるそのような変化によって生じる出血リスクが緩和され得る。

【００４６】

加えて、凝固障害患者の外科的処置は時間とともに進展した。本研究では、血塊強度に対するトロンビン濃度依存のトロンボエラストグラフによる確認から、フィブリン塊密度が、利用可能なトロンビン濃度の関数であるという考えがさらに支持される。結果として、耐久性のある止血が、おそらくは、大部分の外科的適用への標準濃度としてトロンビン1000 IU/mLが発展したことの重要な推進力であった。

【００４７】

さらに、高トロンビン濃度の存在下で形成された血塊は、血塊破砕に対してより抵抗性があるという知見は、異なるトロンビン濃度で起こる血塊の構造および成熟の差の証拠として重要である。早期回復期のストレスに抵抗する持続的な止血は、すべての手術の望ましい結果である。したがって、局所rトロンビンを1000 IU/mLで使用することは、ケアの標準として妥当である。125 IU/mLまたは1000 IU/mL rトロンビンのいずれもが、吸収性ゼラチンスポンジと共に適用した場合に、止血の開始までの時間を短縮するが、より高いトロンビン濃度でより優れた血塊の構造および成熟が起こることから、より高濃度のトロンビンが臨床設定においてより良く機能し得ることが示唆される。rトロンビンは、現在の手術集団を模倣する一連の臨床条件にわたって止血時間を一貫して短縮するが、トロンビン1000 IU/mlの現在の使用は局所止血のためのケアの標準であるものの、より高濃度のトロンビンをそのような適用で使用することが正当化されてもよい。

【００４８】

より具体的には、以下の実施例に記載する通りに、血管吻合出血のモデルとするのに、改良ヘパリン処置ウサギ動脈-静脈(AV)シャント調製物を選択した。標準ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)動脈静脈グラフトに縫合針で穿刺し、直ちにトロンビンまたはプラセボ含有吸収性ゼラチンスポンジ、USPで巻き、連続した圧力を加えながらガーゼスポンジ

で覆った。一定の間隔で、標準手順を用いて止血を評価した。1つ目の実験セット(ヘパリンのみ)では、吸収性ゼラチンスポンジ、USPを、生理食塩水、31.25 IU/mL、62.5 IU/mL、125 IU/mL、または1000 IU/mLのrトロンビンとランダムに併用し、止血時間(TTH)を盲検観察者によって評価した。同様の2つ目の実験セット(ヘパリン＋クロピドグレル二硫酸塩)では、AVシャントを挿入し、処置を、吸収性ゼラチンスポンジ、USPと併用したプラセボ、125 IU/mL、または1000 IU/mL rトロンビンにランダムに割り付け、その後盲検TTH評価を行った。止血を達成した調製物において、遠位AVグラフトの迅速なクランプ締め付けにより、5分の時点で2成分血塊破裂負荷を行った。トロンボエラストグラフ(TEG)法を用いるエクスビボ試料の連続評価により、血塊粘弾強度に及ぼすrトロンビン濃度効果の決定を得た。

【００４９】

ウサギAVシャントモデルでは、漸増濃度のrトロンビンによって、TTHが用量依存的様式で減少した。ウサギをクロピドグレル二硫酸塩で前処置した場合には、TTHは、125 IU/mLのrトロンビンと比較して、1000 IU/mLのrトロンビンを吸収性ゼラチンスポンジと共に使用した場合に、有意により低かった。さらに、1000 IU/mL rトロンビンの存在下でのTTHは再現性が高いのに対して、より低濃度でのTTHは大きく変動した。1000 IU/mLのrトロンビンによって形成された血塊はまた、125 IU/mLのrトロンビンの存在下で形成されたものよりも、血塊破裂評価中に破壊する可能性も低かった。加えて、TEG測定値から、血塊形成の速度およびインビトロで形成された血塊の強度は、特にクロピドグレル二硫酸塩などの抗凝固剤の存在下で、rトロンビンの濃度に依存することが実証された。

【００５０】

したがって、臨床的凝固機能障害を模倣するように設計された動物モデルにおいて、局所rトロンビン 1000 IU/mLは、rトロンビン 125 IU/mLと比較した場合に、止血の迅速で信頼性のある開始を提供した。トロンビン濃度が止血の開始までの時間および血塊強度の重要な決定要因であるというパラダイムは、顕著なヘパリン処置および強力な血小板阻害の存在下でさえも当てはまる。

【００５１】

別の態様では、止血組成物をキットで提供し、該キットは；第1シリンジ、第2シリンジ、シリンジチップ、希釈液、添加物、およびトロンビンのうちの1つまたは複数をさらに含む。任意に、キットはまた、希釈液中にまたは希釈液として患者血漿を用いるのに適した材料を含む。本態様の1つの局面において、止血組成物は該第1シリンジの外筒内に存在する。止血組成物は架橋ゼラチンマイクロスフェアを含んでよく、乾燥粉末として該シリンジの外筒内に存在する。あるいは、止血組成物は架橋ゼラチンマイクロスフェアであり、部分的または完全に水和されたペーストまたはゲルとして、該シリンジの外筒内に存在する。本態様のさらなる局面では、止血組成物は添加物と混合され、第1シリンジの外筒内に存在する。止血組成物のいくつかは、添加物と混合された架橋ゼラチンマイクロスフェアであってよく、乾燥粉末としてシリンジの外筒内に存在する。あるいは、止血組成物は架橋ゼラチンマイクロスフェアであり、添加物と混合され、部分的または完全に水和されたペーストまたはゲルとして該シリンジの外筒内に存在する。本明細書で用いる場合、20重量%未満の水分含量を有する粉末止血組成物は、乾燥粉末と見なされる。

【００５２】

本態様の別の局面において、添加物と混合された止血組成物を提供する。止血組成物は架橋ゼラチンマイクロスフェアであってよい。本局面において、該架橋ゼラチンマイクロスフェアは、直径約50μm～約500μmを有する。加えて、架橋ゼラチンマイクロスフェアは孔をさらに含んでよく、孔は孔径約20μmを有し得る。本局面に加えて、止血組成物は任意に、ポロキサマーもしくはポロキサマー188、ポリエチレングリコール、またはポリソルベートなどの湿潤剤である添加物と混合される。あるいは、止血組成物は、カルボキシメチルセルロースなどの懸濁剤である添加物と混合される。湿潤剤および/または懸濁剤を伴うまたは伴わない止血組成物は、乾燥粉末であってよい。

【００５３】

本態様のさらなる局面において、添加物と混合された止血組成物を提供し、この場合、該止血組成物は架橋ポリマーであり、該添加物は、湿潤剤、懸濁剤、ならびに湿潤剤および懸濁剤の両方からなる群より選択され、架橋ポリマーはゼラチンである；しかしながら、コラーゲン、デキストラン、キトサン、アルギン酸、およびその他の組成物を用いてもよい。ゼラチンは、脱水加熱的に架橋されるか、もしくは化学的に架橋されるか、または照射などの他の手段によって架橋されてよい。架橋ポリマーは、架橋ゼラチンマイクロスフェア、約50μm～約500μm（両端の値を含む）の直径を有する孔をさらに含む架橋ゼラチンマイクロスフェア、約50μm～約500μm（両端の値を含む）の直径を有し、かつ孔をさらに含み、該孔が孔径約20μmを有する架橋ゼラチンマイクロスフェアなどの、任意の形状であってよい。止血組成物は、乾燥粉末に製剤化され得る。添加物は、ポロキサマーまたはポロキサマー188などの湿潤剤であってよい。あるいは、添加物は、カルボキシメチルセルロースなどの懸濁剤であってよい。添加物と混合された架橋ポリマーには、米国特許第7,404,971号、第6,063,061号、第4,935,365号、第5,015,576号；米国特許出願公開第20050287215号、第20030064109号に記載されているもの；CultiSpher(登録商標)-GおよびCultiSpher(登録商標)-S多孔性ゼラチンマイクロスフェア(Celltrix, Malmo, Sweden；Percell Biolytica, Astorp, Sweden)が含まれるが、これらに限定されない。

【００５４】

本態様のさらなる局面において、キットは生理食塩水などの希釈液を含めるための第2シリンジを含む。他の希釈液には、当技術分野で公知のように、塩化カルシウム希釈液およびその他の物が含まれる。本局面において、希釈液は、使用者によって希釈液容器からシリンジ中に引き込まれ得る。使用者が希釈液をシリンジ中に引き込むことを可能にすることで、使用者は、止血組成物を分散させるために用いる希釈液の量を調節し、よってその後のペーストの粘度を調節できるようになる。あるいは、第2シリンジは、外筒内に希釈液を伴って該キット内に包装され得る。したがって、第2シリンジは希釈液を前充填され得る。

【００５５】

キット態様のさらなる局面において、キットはトロンビンを含む。上記の通り、「トロンビン」は、プロトロンビン(第II因子)のタンパク質切断によって生じる、α-トロンビンとしても知られる活性化酵素を意味する。トロンビンは当技術分野で公知の様々な方法によって調製することができ、「トロンビン」という用語は、特定の生成方法を意味することを意図していない。本局面において、トロンビンは、凍結乾燥粉末としてキット中に提供され得る(例えば、米国特許第7,473,543号を参照されたい)。この凍結乾燥粉末は、該希釈液を用いて再構成することができる。例えば、希釈液を該第2シリンジから該凍結乾燥トロンビンに適用する。これは、該希釈液を、凍結乾燥トロンビンを含むバイアル中に直接添加することによって行うことができ、または希釈液および凍結乾燥トロンビンの両方を別の容器中で混合してもよい。希釈液は血漿を含んでもよいし、または完全に血漿からなってもよい。したがって本局面では、キットは混合ボウルもまた含み得る。トロンビンを混合する手段は、当業者に公知である。

【００５６】

本態様のさらなる局面において、止血組成物および任意に添加物を含む第1シリンジ、ならびに希釈液および任意にトロンビンを含む第2シリンジを接続し、これら2つのシリンジの内容物を、架橋ゼラチンマイクロスフェアが希釈液中に完全に分散されるまで、行ったり来たりさせる。第1シリンジと第2シリンジをアダプターで接続し、アダプターはシリンジのルアーネジ山と相補的なルアーネジ山を含む。あるいは、シリンジの一方は他方のシリンジと相補的なルアーネジ山を有し、よって2つのシリンジは相補的なルアー接続部を用いて直接つながる。これにより、該シリンジをルアー接続部で接続し、該止血組成物の所望の分散が達成されるまで、それらそれぞれのプランジャーに交互の力を加えることによって2つのシリンジ外筒の間で内容物を行ったり来たりさせることにより、止血組成物と希釈液の混合が可能になる。止血組成物は、希釈液と混合する前は乾燥していてよいが、部分的に水和されたおよびさらには完全に水和された止血組成物を希釈液と混合する

こともできる。得られた分散止血組成物は、使用者の好みに応じて、部分的に水和され得て、さらにはより十分に水和され得る。

【００５７】

シリンジの一方は、分散止血組成物を含み、これを分注するのに十分であるべきである。したがって、シリンジは、十分な外筒容量を有する必要がある。該第1および第2シリンジを用いて止血組成物と希釈液を混合した後、分散止血組成物を2つのシリンジのうちの1つに押し出す。大用量の分散止血組成物は、使用者が該シリンジを容易に手に持ち、片手でそのプランジャーを押し下げることができないほど外筒を長くすることなく、該シリンジが分散止血組成物を収容するための外筒の長さおよび幅を有することを必要とする。シリンジは典型的に、少なくとも8 ccまたは少なくとも12 ccなど、少なくとも5 ccを含む。

【００５８】

シリンジは、その外筒管腔から止血組成物を押し出すのに必要な力に耐えるために、耐久性があるべきである。止血組成物が、例えば添加物を伴わない架橋ゼラチンマイクロスフェアである場合には、スポンジングアウト効果が生じ、これによって、分散止血組成物の後の用量をシリンジから排出することが困難になる。プランジャーは、この力に耐えるのに十分な耐久性がなくてはならない。添加物によってスポンジングアウト効果は軽減され、よって止血組成物を押し出すためにプランジャーに加えられる力の量が軽減される。

【００５９】

したがって、止血組成物は添加物と混合され得る。添加物と混合される滅菌止血組成物は、架橋ポリマーを含む。添加物と混合することができる架橋ポリマーには、米国特許第7,404,971号、第6,063,061号、第4,935,365号、第5,015,576号；米国特許出願公開第20050287215号、第20030064109号に記載されているもの；CultiSpher(登録商標)-GまたはCultiSpher(登録商標)-Sマクロ多孔性ゼラチンミクスフェア(Celltrix, Malmo, Sweden；Percell Biolytica, Astorp, Sweden)が含まれるが、これらに限定されない。添加物と混合される止血組成物は、複数の多孔性架橋マイクロスフェアを含む。架橋ゼラチンマイクロスフェアは、60:1～3:1(ゼラチンマイクロスフェア：ポロキサマー188の比)の範囲の重量比で、湿潤剤、および任意にポロキサマー188などのポロキサマーと混合することができる。標的部位への適用を目的として調製するためには、止血組成物は水性媒体中に容易にかつ実質的に均一に分散されて、完全に水和されたペーストの粘度を生じる。

【００６０】

添加物と止血組成物を混合し、次に乾燥粉末、または部分的にもしくは完全に水和されたゲルとして該第1シリンジに充填することができる。あるいは、添加物を別の成分として提供することができ、これを希釈液(血漿など)と混合し、該第2シリンジ中に引き入れ、次に止血組成物と混合する。添加物と該止血組成物を乾燥粉末として混合し、次に該第1シリンジに充填することができる。次に、希釈液のみまたは希釈液およびトロンビンを含む第2シリンジを該第1シリンジに接続し、それらのプランジャーを交互に押し下げることにより、該2つのシリンジの間でこれらのシリンジの内容物を行ったり来たりさせる。添加物を伴う止血組成物が希釈液中に十分に分散された後、分散止血組成物を標的部位に適用することができる。「標的部位」とは、分散止血組成物が送達されるべき位置である。通常、標的部位は関心対象の組織位置であるが、場合によっては、例えば材料がインサイチューで膨潤して、関心対象の位置を覆ってしまうような場合には、分散止血組成物を関心対象の位置の近傍の位置に投与してもよい。分散止血組成物は、該シリンジの開口部を通して該シリンジから直接押し出すことができる。あるいは、適切なチップを該シリンジに取り付けて、該分散止血組成物を、該シリンジの開口部および取り付けたチップを通して該シリンジから押し出すことができる。チップは、該分散止血組成物の通過を可能にするのに十分であるが、分散止血組成物が開口部から滴下するほど大きくないか、または押し出された組成物が大きく乱雑な小滴となるほど大きい管腔および開口部を有し得る。したがって、本態様の1つの局面において、キットは少なくとも1つのチップを含む。

【００６１】

本態様における希釈液は、患者自身の血漿などの血漿もまた含んでよく、または完全にそれからなってもよい。これらの態様では、例えば、患者の血液を採取し、血漿を得るための標準手順によって調製する。次に、この自己血漿は止血組成物と混合され、外科医または内科医の要求通りに患者において用いられる。

【００６２】

したがって、別の態様において、止血を必要とする標的部位に分散止血組成物を送達するための組成物および方法を提供する。本態様の1つの局面において、架橋ゼラチンマイクロスフェアなどの止血組成物を提供する。本局面において、架橋ゼラチンマイクロスフェアは約50μm～約500μm（両端の値を含む）の直径を有する。加えて、架橋ゼラチンマイクロスフェアは、孔径約20μmを有する孔をさらに含み得る。本局面に加えて、止血組成物は、ポロキサマーまたはポロキサマー188などの湿潤剤と混合してもよい。あるいは、止血組成物は、カルボキシメチルセルロースなどの懸濁剤と混合してもよい。湿潤剤および/または懸濁液を伴うまたは伴わない止血組成物は、乾燥粉末に製剤化され得る。

【００６３】

本態様のさらなる局面において、架橋ポリマー、ならびに湿潤剤、懸濁剤、および湿潤剤および懸濁剤の両方からなる群より選択される添加物からなる止血組成物を提供する。架橋ポリマーは、脱水加熱的に架橋されるか、化学的に架橋されるか、または照射などの他の手段によって架橋されるゼラチンであってよい。架橋ポリマーは、例えば、架橋ポリマーは、架橋ゼラチンマイクロスフェア；約50μm～約500μm（両端の値を含む）の直径を有して孔をさらに含み、かつ孔径約20μmを有する孔をさらに含む架橋ゼラチンマイクロスフェアであってよい。止血組成物は乾燥粉末に調製される。添加物は、ポロキサマー188などの湿潤剤であってよい。あるいは、該添加物は懸濁剤、例えばカルボキシメチルセルロースである。

【００６４】

したがって、本発明はまた、本明細書に記載する通りに止血組成物を提供する段階；および止血を必要とする哺乳動物の身体の部位に該止血組成物を適用する段階を含む、止血を必要とする哺乳動物の身体の部位に止血組成物を送達する方法もまた提供する。

【００６５】

以下の非限定的な実施例は、本発明の組成物および方法を説明する上で有用である。

【実施例】

【００６６】

実施例1．多孔性架橋ゼラチンマイクロスフェアを作製するための材料および方法。

熱ゲル化‐液体：10%(w/v)の濃度になるようにゼラチンを水中で加熱することにより、ゼラチンを溶解した。乳化剤(TWEEN(登録商標) 80、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレエート) 6 gを、ゲル化溶液100 mlに添加した。次に、乳化剤(SPAN(登録商標) 85、ソルビタントリオレエート) 30 gを含むトルエン500 mlを、その溶液中に撹拌した。初期量のトルエンは、添加されて、ゼラチン溶液中に液滴として分散される空洞形成化合物として作用した。さらなるトルエンを添加するにつれて、ゼラチン溶液はトルエン液滴で飽和していき、ゼラチン溶液がトルエン溶液中に分散された水性ゼラチン液滴となるように、最終的に十分なトルエンを添加する(例えば、500 ml)。所望のサイズのマイクロスフェアが形成されたならば、ゼラチンの凝固温度よりも低い温度になるまで分散物を冷却した。この過程により、トルエンの液滴で飽和されたゼラチンマイクロスフェアが形成される。次に、エタノールおよびアセトンでビーズを洗浄することにより、これらのトルエン液滴を除去するが、これに伴って、空洞で満たされたゼラチンマイクロスフェアが提供される。次に、安定性をさらに高めるために、ゼラチンビーズをグルタルアルデヒドで架橋する。

【００６７】

熱ゲル化‐気体：乳化剤(TRITON X-100(商標)、オクトキシノール-9) 5 gを、ゼラチン溶液(10% w/v) 100 mlに添加した。次に、高圧下の空気を溶液中に吹き込み、その中に大量の気泡を形成させた。乳化剤(SPAN(登録商標) 85) 30 gを含むトルエン/クロロホルム(

73/27、w/v) 500 ml中にその溶液を分散させ、それと同時にその系を撹拌することにより、ゼラチンマイクロスフェアを形成させた。所望のサイズのマイクロスフェアが得られた後、ゼラチンを凝固させるために分散物を冷却した。次に、エタノールおよびアセトンで洗浄することにより、有機溶媒を除去した。気体の空洞形成化合物は、得られたゼラチンマイクロスフェアから、それらの多孔性が高いために自動的に逸脱する。次に、得られたゼラチンマイクロスフェアを、例えばグルタルアルデヒドでさらに架橋する。

【００６８】

熱ゲル化‐固体：炭酸カルシウム10gをゼラチン溶液(10% w/v) 100 mlに添加し、その後、上記の熱ゲル化‐気体に従ってマイクロスフェアを生成した。炭酸カルシウムを溶解し、ビーズ内に空洞を形成するために、ゼラチンマイクロスフェアを酸で処理した。

【００６９】

実施例2．重合

アクリルアミド(17 g)およびビスアクリルアミド(1.2 g)を、Tris緩衝液(100 ml、0.05 M、pH 7)中に溶解した。過硫酸アンモニウム(0.5 g/ml、0.25 ml)および乳化剤(TRITON X-100(商標)、6 g)を、単量体溶液に添加した。次に、乳化剤(SPAN(登録商標) 85 30 g)を含むトルエン500 mlを、系中に撹拌した。次に、TEMED(共触媒、1.3 ml)を系に添加した。重合過程の終了時に、エタノールおよびアセトンで有機溶媒を洗浄除去した。

【００７０】

実施例3．架橋ゼラチンマイクロスフェアの調製

ゼラチンを8% (w/v)の濃度で水中に溶解し、60℃で保持した。TWEEN(登録商標) 80(Atlas Chemie, Enschede, Netherlands)を含む溶液(6% w/v) 100 mlに、SPAN(登録商標) 85(Atlas Chemie)を含むトルエン(6% w/v)を連続して添加した。添加したトルエンは、混合速度に応じた液滴サイズで、飽和するまでゼラチン溶液中で液滴を形成した。最終量400 mlになるまで過剰なトルエンを添加することにより、トルエンの液滴を含むゼラチンマイクロスフェアが生成された。分散物を20℃未満に冷却した後、エタノール200 mlを添加した。次に、形成されたゼラチンマイクロスフェアをエタノールでさらに洗浄し、最後にアセトンで洗浄した後、室温で一晩乾燥させた。乾燥ゼラチンマイクロスフェアを篩過し、125μm～180μmの画分を、pH7.0の0.1 Mリン酸緩衝液で膨潤させた後、グルタルアルデヒド(8.8% w/v)で15℃で30分間処理することにより架橋した。過剰なグルタルアルデヒドを除去した後、ゼラチンマイクロスフェアを121℃で20分間熱処理したが、これにより用量は約50%まで減少し、水およびアセトンで洗浄した後、最終的に60℃で一晩乾燥させた。

【００７１】

実施例4．ゼラチンマイクロスフェアおよび湿潤剤

分散の均一性およびシリンジ通過性を改善するために、ゼラチンマイクロスフェアを湿潤剤と組み合わせた。ゼラチンマイクロスフェアは上記の通りに調製することができ、または例えばCultispher(登録商標)-Sマクロ多孔性ゼラチンマイクロスフェア(Percell Biolytica, Astorp, Sweden)のように購入することもできる。湿潤剤は乾燥粉末として入手可能であり、乾燥粉末であることで乾燥粉末マイクロスフェアとの混合が促進される。しかしながら、粉末がいずれも乾燥しているという必要はない。1つの態様において、湿潤剤は、ポロキサマー188、NF(Spectrum Chemicals, Gardena, CA, Cat. #P1169)などのポロキサマーである。Cultispher(登録商標)-Sマイクロスフェアおよそ1 g～60 gをポロキサマー188 1 g～3 gと混合し、均一な混合物が得られるまで乾燥粉末を共に混合する。混合は、当技術分野で公知の様々な技法および設備を用いて行うことができる。あるいは、湿潤剤は、ゼラチンマイクロスフェアを分散させるために用いられる希釈液の成分である。本態様において、湿潤剤は、約0.25% w/v～5% w/vで希釈液中に存在する。湿潤剤を含む希釈液各1 mLに対して、Cultispher(登録商標)-Sマイクロスフェアおよそ125 mg～175 mgを添加し、次に、例えばマイクロスフェアがペースト様の粘度になるまで混合されるまで、相互接続された2つのシリンジ間を行ったり来たりさせることにより、架橋ゼラチンマイクロスフェアと、湿潤剤を伴う希釈液を混合する。

【００７２】

実施例5．マイクロスフェアならびに分散およびシリンジ通過性のための懸濁剤
分散の均一性およびシリンジ通過性を改善するために、ゼラチンマイクロスフェアを懸濁剤と組み合わせた。ゼラチンマイクロスフェアは、上記の通りに調製することができる。1つの態様において、ゼラチンマイクロスフェアはCultispher(登録商標)-Sマイクロスフェア(Percell Biolytica)であった。懸濁剤は乾燥粉末として入手可能であり、乾燥粉末であることで乾燥マイクロスフェアとの混合が促進される。しかしながら、粉末がいずれも乾燥しているという必要はない。1つの態様において、懸濁剤は、中間粘度カルボキシメチルセルロース(Spectrum, Cat. #CA192)などのカルボキシメチルセルロースである。ゼラチンマイクロスフェアと懸濁剤粉末を、均一な混合物が得られるまで共に混合する。混合は、当技術分野で公知の様々な技法および設備を用いて行うことができる。あるいは、懸濁剤は、ゼラチンマイクロスフェアを分散させるために用いられる希釈液の成分である。本態様において、湿潤剤は、約0.25% w/v～5% w/vで希釈液中に存在する。懸濁剤を伴う希釈液各1 mLに対して、Cultispher-Sマイクロスフェアおよそ125 mg～175 mgを添加し、次に、例えばマイクロスフェアがペースト様の粘度になるまで混合されるまで、相互接続された2つのシリンジ間を行ったり来たりさせることにより、架橋ゼラチンマイクロスフェアと、懸濁剤を伴う希釈液を混合する。

【００７３】

実施例6．マイクロスフェアならびに分散およびシリンジ通過性のための湿潤剤
分散の均一性およびシリンジ通過性を改善するために、ゼラチンマイクロスフェアを湿潤剤および懸濁剤と組み合わせることができる。ゼラチンマイクロスフェアは、上記の通りに調製することができる。1つの態様において、ゼラチンマイクロスフェアはCultispher(登録商標)-Sマイクロスフェア(Percell Biolytica)である。カルボキシメチルセルロースである懸濁剤、およびポロキサマー188である湿潤剤はいずれも、乾燥粉末である。次に、ゼラチンマイクロスフェアを等量の懸濁剤および湿潤剤の粉末混合物と、均一な混合物が得られるまで混合する。あるいは、懸濁剤および湿潤剤はいずれも、ゼラチンマイクロスフェアを分散させるために用いられる希釈液の成分である。本態様では、ゼラチンマイクロスフェアと、懸濁剤/湿潤剤を伴う希釈剤を、例えばマイクロスフェアがペースト様の粘度になるまで混合されるまで、相互接続された2つのシリンジ間を行ったり来たりさせることにより混合する。

【００７４】

実施例7．流動性止血基質
希釈液(生理食塩水、トロンビンを含む生理食塩水、または匹敵する媒体)を含む別のシリンジに連結された、基質を含むシリンジからなる流動性止血基質を調製した。基質は、ポロキサマー188またはカルボキシメチルセルロースなどの添加物を伴うまたは伴わない架橋ゼラチン粉末(Cultispher(登録商標)-Sマクロ多孔性ゼラチンマイクロスフェア)からなった。添加物を伴うまたは伴わない止血基質を秤量し、シリンジに移した。典型的には、組成物は、60:1 w/w～3:1 w/w比(マイクロスフェア：添加物)の範囲の添加物を伴うまたは伴わないCultispher(登録商標)-Sマイクロスフェア675 mgを含んだ。蓋をしたシリンジ外筒(プランジャーは除去しておく)に成分を入れ、プランジャーを粉末の後方の位置に戻した。メス-メスルアー接続器を用いて、希釈液4.5 mLを含む別のシリンジを粉末シリンジに連結した。次に、20回通過させることにより、乾燥粉末と緩衝液を混合した。止血基質を60秒間水和させ、次に基質を分注した。Cultispher(登録商標)-Sマイクロスフェアのみを含む(添加物を伴わない)分注された調製物は、水分含量に関して不均一性を示した；すなわち、最初の分割量は後の分割量よりも「湿って」いた。この現象は、「スポンジングアウト」と称された。しかしながら、添加物として湿潤剤(例えば、ポロキサマー188)または懸濁剤(カルボキシメチルセルロース)を含めると、この現象は最小限に抑えられた。シリンジの全内容物を分注した場合に、添加物を含む基質を押し出すのに必要な力がより一貫しており、最小化されることも、シリンジ力計測器を用いて観察され、定量的に決定された。添加物を伴わないCultispher(登録商標)-Sマイクロスフェアの基質を、分注前にシリンジに取り付けた狭孔径投与チップを通して分注することは、実用的ではなかっ

た。しかしながら、添加物として湿潤剤(すなわち、ポロキサマー188)または懸濁剤(カルボキシメチルセルロース)を含めると、この現象は最小限に抑えられ、シリンジの全内容物を狭孔径投与チップを通して最小限の力で分注することが可能となった。

【００７５】

実施例8．ラット半腎切除出血モデルを使用する、非照射CultiSpher(登録商標)-Sマイクロキャリアビーズと中実ビーズとの間のインビボ有効性比較。

多孔性架橋ゼラチンマイクロスフェアと非多孔性(中実)架橋ゼラチンマイクロスフェアとの間で止血有効性を比較するための研究を設計した。マイクロスフェアは、150 mg/mLトロンビンの単回用量を両マイクロスフェア調製物に含めることを除き、上記の通りに調製した(プラセボは、トロンビンを伴わない多孔性Cultispher(登録商標)-Sマイクロスフェアである)。

【００７６】

多孔性架橋ゼラチンマイクロスフェアおよびトロンビンで処置した動物の平均止血時間比較から、中実マイクロスフェアまたはプラセボに対して、処置動物ではTTHが大きく減少することが明らかになった。具体的には、平均TTHは以下の通りであった(平均値±sd)：プラセボでは約112±15秒、中実マイクロスフェアではおよそ79±37秒、および多孔性マイクロスフェアでは約45±6秒。任意の特定の理論に限定されることはないが、多孔性架橋ゼラチンマイクロスフェア群によって示されるTTHの減少の増大は、マイクロスフェアの多孔性によって説明することでき、該孔によってより大きな表面積が形成され、血小板が侵入して混合することが可能となり、よって凝固までの時間がより迅速になる。

【００７７】

中実ビーズと比較した多孔性架橋ゼラチンマイクロスフェアの別の利点は、基質の粘度であった。多孔性架橋ゼラチンマイクロスフェア基質は分注が容易であり、再構成の最初の1分から90分まで、切断腎臓表面に適用するのが容易であった。これと比較して、再構成1分後の中実ビーズ基質は腎臓表面から流れ落ち、60分の時点ではまさしく結晶様となり、腎臓表面に適用するのが困難であった。

【００７８】

実施例9．TEGアッセイ

公表されたアッセイに従って、トロンボエラストグラフィー(TEG)アッセイを行った。Roche et al., 96 Anesth. Analg 58-61 (2003)を参照されたい。貯蔵トロンビン溶液は、0.9%生理食塩水0.5 mLに溶解した組換えトロンビン(例えば、RECOTHROM(登録商標), Zymo Genetics, Inc., Seattle WA)の5000単位バイアルからなり、最終量600μlおよび濃度8333 IU/mLとした。10μl分割量によって、TEGアッセイにおける最終濃度が25 IU～200 IU/mlになるように、生理食塩水＋0.1% BSA中の貯蔵液から希釈物を作製した。トロンビン10μlを乾燥マイクロスフェア粉末に添加し、膨潤ゲルを生成した。これにより、血塊が発生する前に、トロンビンと血液のより均一な混合が可能になった。アッセイは2台のTEG 5000で行い、TAS 4.2.3(HAEMOSCOPE(商標) Corp., Niles, IL)などの市販のソフトウェアを用いてモニターした。

【００７９】

クロピドグレル二硫酸塩による処置前および処置後のウサギから、血液試料を採取した。各動物には、20 mg/kg経口用量のクロピドグレル二硫酸塩を毎日、3日間投与した。75 mgクロピドグレル二硫酸塩錠剤を粉砕し、滅菌蒸留水3 mLに懸濁した。ウサギに、胃管栄養により懸濁液1.6～2.2 mLを投与した。3日目の毎日の処置後に、血液試料を採取した。TEGプロトコールに従って、AVシャントモデルの1日目において、ウサギ血液を「ウサギ月/日」と命名する。この名称は、3日間の実験を通して、同じウサギの血液のそれぞれその後の採取物についても同じである。例えば、11月12日に、1日目として、処置前血液およびクロピドグレル二硫酸塩胃管栄養の2時間後血液を採取し、「Rb 11/12」と命名する。2日目、11/13および3日目、11/14にも、試料はRb 11/12のままである。明記しない限り、血液はクエン酸中に採取した。HAEMOSCOPE(商標) TEGプロトコールに記載される通りに、TEGアッセイカップ中で、血液を20μlの0.2 M $CaCl_2$、0.9% NaCl、pH 7.4(貯蔵$CaCl_2$)で

再石灰化した。

【００８０】

図1のデータは、マイクロスフェアゲルのみに関するプロトコール2、ならびにマイクロスフェアゲルおよびトロンビンに関するプロトコール3を用いて作成した。図2、3、および4におけるアッセイは、ヘパリンを伴うまたは伴わない正常なクエン酸血で、プロトコール5を用いて行った。ヘパリンは、プロトコール4に記載する通りに添加した。

【００８１】

プロトコール1．ヘパリンなしのアッセイ

ヘパリンを添加する前に、ヘパリン前のTEGパラメータを決定するために、血液を再石灰化した。ヘパリンなしのアッセイの結果は、処置前のおよびクロピドグレル二硫酸塩処置した血液試料の両方に関して同様である。クロピドグレル二硫酸塩血液試料のいくつかは、速いR値を有し、それらが高凝固性であることが示唆される。これらの結果は、当技術分野で報告されている結果と一致する。

【００８２】

プロトコール2．マイクロスフェアゲル存在下でのヘパリンなしのアッセイ

マイクロスフェアゲルの混合は、特定の方法を開発しながら改善することができる。例えば、ゲルを十分に膨潤させることにより1つのマイクロスフェアゲル調製物を作製し、次に0.9% NaCl中の1:1懸濁液になるよう調整した。アッセイの直前に、ゲルをTEGカップにピペットで入れた。

【００８３】

プロトコール3．トロンビン＋マイクロスフェアゲル

乾燥マイクロスフェア粉末(23.5 g)を、5000 IU/mL組換えトロンビン4.7 mLおよび0.9%生理食塩水56.9 mLと混合した。これにより、1 IUトロンビン/mg乾燥マイクロスフェア粉末を有する水和ゲルが得られた。同じゲル対生理食塩水比(1:2.6)を、トロンビンなしの対照として用いた。アッセイの直前に、スパチュラを用いて、様々な量の水和ゲルをTEGアッセイカップ中に量り入れた。

【００８４】

プロトコール4．ヘパリンを伴うTEGアッセイ

クロピドグレル二硫酸塩処置の全3日間にわたり、反応時間(R)、反応速度(K)、および最大振幅(MA)に及ぼすヘパリンのみおよびヘパリン＋クロピドグレル二硫酸塩の効果を決定するために、ヘパリンを血液に添加した(1 IUヘパリン/mL血液)。3日目の最終血液試料は、AVシャントモデルの開始直前にウサギにヘパリンを注入して(ヘパリン「搭載」)、アッセイした。注入したヘパリンは、およそ1単位/mL血液である。このレベルのヘパリンは、>400秒のAPTTを得るのにまさに十分である。

【００８５】

プロトコール5．ヘパリン処置血液のトロンビン活性化

アッセイの前に、蒸留USP灌注水1.5 mL中のマイクロスフェアゼラチンビーズ50 mgまたは100 mgいずれかの懸濁液を、振動により15分間膨潤させた。次に、ゼラチンビーズ懸濁液35μlを各アッセイカップに分注し、37℃で30分間乾燥させた。乾燥ゲルは、それぞれ1.21 mgまたは2.42 mg/カップのいずれかである。

【００８６】

TEGアッセイは、全量360μlに関して、血液330μl、貯蔵$CaCl_2$溶液20μl、マイクロスフェアゲル中の25 U～8333 Uの濃度範囲のトロンビン10μlから構成される。

【００８７】

標準的なピペッティング技法により高トロンビンを血液中に直接添加する場合、混合が起こり得るよりも速く、フィブリノーゲンがフィブリンに変換される。これにより、不均一な血塊が生じる。観察データから、このことが確認される：(a) TEG最大振幅(MA)は崩壊し、より低い値で安定化し得る；および(b) 混合中に、血塊の一部においてピペットチップが吸引し得る。

【００８８】

混合の問題を克服するために、マイクロスフェアゲルをTEGアッセイカップに添加した。マイクロスフェアゲルの膨潤は、最初の1分間に完全に起こる。図4Aは、血塊の反応速度(R)を示す。Rは、アッセイの開始から最初の測定可能な血塊強度(2 mm振幅)までの分表示である。トロンビンを乾燥マイクロスフェアゲルに添加すると、Rは増加し、トロンビンを直接添加する場合よりも血塊動態が遅いことが示される。マイクロスフェア孔内へのトロンビン捕捉によってより良好な混合が可能になるという予測は、最大血塊強度MAによっても支持された(図4B)。MAは、式：G=5000 MA/(100-MA)により、Gに関連している。マイクロスフェアゲルがない場合、MAはトロンビンの増加に伴って実際に減少するのに対して、トロンビン＋マイクロスフェアゲルは強度を維持した。ゲルからのトロンビンの拡散速度は、反応速度がより遅いことから、より遅いと推測された。

【００８９】

マイクロスフェアゲルは、凝血原、ならびにトロンビンの送達および混合のための基質として役立った。これは、もしかすると、架橋ゼラチンによる接触経路の活性化に起因する。架橋ゼラチンはまた、GP VI、コラーゲン受容体などの受容体を介して血小板を活性化し得る。

【００９０】

ヘパリン存在下での血塊形成は、アンチトロンビン(主にAT III)の飽和をまず必要とする。ひとたびアンチトロンビンが克服されると、トロンビン受容体を介したフィブリン形成および血小板活性化が起こり得る。血小板のトロンビン活性化はまた、クロピドグレル二硫酸塩およびアスピリンなどの血小板活性化阻害剤を回避する。そのようなトロンビン活性化は、血小板凝集阻害剤INTEGRILIN(登録商標)(エプチフィバチド、Schering-Plough, Kenilworth, NJ)、REOPRO(登録商標)(アブシキシマブ、Centocor B.V., Leiden, Netherlands)、およびAGGRESTAT(登録商標)(チロフィバン、Merck & Co, Inc, Whitehouse Station, NJ)を回避しないことが予測される。

【００９１】

実施例10. マイクロスフェア/トロンビン製剤の存在下における凝固

血液をクエン酸中に採取し、カルシウム(11 mM)を加えて戻し、アッセイを開始した。これらの条件下では、強力な血塊を形成するための十分なトロンビンが、血液中のプロトロンビンから生成される。血液中に凝固阻害剤(「搭載」)がない場合、出血を止めるためにトロンビンを添加することの主な利点は、12～21分から1分未満へと凝固時間が短縮することである。これは、約3 IUトロンビン/mLの血液で達成され得る(図1、マイクロスフェアおよびトロンビン)。

【００９２】

マイクロスフェアゲルは、血塊を強化することも見出された。正常血液中の阻害されていない凝固系は、トロンビンを添加することなく、強力な血塊を生成する。しかしながら、漸増量のマイクロスフェアゲルを血液に添加することにより、血塊強度は増加し得る。マイクロスフェアゲルおよびトロンビンによって形成された血塊は、強度において>40%の増加を示す(図1)。これらの血塊は、比較的低いトロンビン濃度≦3 IU/mLで形成された。

【００９３】

高トロンビン濃度＋マイクロスフェアゲルは、血液中に凝固阻害剤が存在する場合に有利である。これらの条件下では、凝固阻害を克服するために、非常に大量のトロンビンが典型的に必要とされる。図2(強度)および図3(反応時間)に示すように、図中に、正常クエン酸血でアッセイした血塊および1 IU/mLヘパリンで阻害した血液の血塊を組み付ける。ヘパリン阻害を克服するのに必要なトロンビン濃度は、100倍増加する。マイクロスフェアゲル(93μlゲル、十分に膨潤、/ml血液)中のトロンビンの実際の濃度は、血液中の量よりも約10倍高い。したがって、血塊を形成するためにゲル中に必要なトロンビン濃度は、およそ750 IU～2000 IUトロンビン/mLゲルである。この血塊はヘパリン不含血液の強度を獲得しないが、ヒト血液に関して正常と見なされる血塊強度の範囲内である(Roche et al., 96 Anesth. Analg 58-61 (2003))。ヘパリンにクロピドグレル二硫酸塩を追加すると、トロンビンの必要量がなおさらに増加する(図6)。クロピドグレル二硫酸塩阻害は通常

は血小板マッピングによって検出されるが、このデータから、外因性のトロンビンを添加する場合に、ヘパリンの存在下でも測定され得ることが示唆される。

【００９４】

実施例11．トロンビンを含む止血組成物のインビボ試験

ウサギ血管吻合出血モデルを使用した。PTFE動脈静脈グラフトを4-0縫合針で4回穿刺し、直ちに吸収性ゼラチンスポンジ、USPで巻き、プラセボ(媒体)またはrトロンビン(1000 IU/mLまたは125 IU/mL)を含ませた。プラセボ、標準用量のヘパリンのみ、またはヘパリンとクロピドグレル二硫酸塩で処置した動物について、全体的な平均TTHを計算した。厳格な標準誤差推定値を伴う線形モデルを用いて、結果を解析した。

【００９５】

1000 IU/mLの濃度のrトロンビンは、TTHに及ぼすヘパリンまたはヘパリンとクロピドグレル二硫酸塩の効果を完全に逆転させたが、rトロンビン125 IU/mLではそのようなことはなかった。rトロンビン1000 IU/mLは、ヘパリンまたはヘパリンとクロピドグレル二硫酸塩で処置した動物の両方において、125 IU/mLと比較して有意により低い平均TTHをもたらし($p<0.0001$)、いずれの濃度のrトロンビンもそれらそれぞれのプラセボ対照よりも優れていた($p<0.001$)。

【００９６】

強力な血小板阻害は一般に、血管手術および一般的な手術で見られる；米国では毎年、クロピドグレル二硫酸塩に関して1千8百万を超える処方箋が書かれている。このインビボ研究では、rトロンビン1000 IU/mLによって、125 IU/mLよりも有意に低い平均TTHが得られ、ヘパリンまたはヘパリンとクロピドグレル二硫酸塩の効果が完全に逆転された。これらの結果から、ケアの標準として、1000 IU/mLの局所rトロンビンの広範な臨床的有用性が支持される。

【００９７】

同様に、本発明の止血マイクロスフェアとの関連でそのような異なるトロンビン濃度を適用する場合、同様の効果が期待される；1000 IU/mLまたはそれ以上のより高いトロンビン濃度は、より低い平均TTHを有する。さらに、インビボデータから、そのようなより高濃度が望ましい場合の適用における、止血マイクロスフェア中のより高いトロンビン濃度の潜在的適用が支持される。

【００９８】

実施例12．トロンビンを含む止血組成物のインビボ試験

インビボ研究設計

様々な処置群を、異なるrトロンビン濃度に関して表1に示し、クロピドグレル二硫酸塩で前処置した動物に関して表2に示す。

【００９９】

各実験セットについては、対照パラメータを用いて動物間の一貫性を実証し、グラフト間の標準化には、体重、各グラフトの体温基線/終点、各グラフトの基線/終点平均動脈圧(MAP)、各グラフトの基線/終点AVシャント血流速度、ならびに基線およびヘパリン処置後活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)が含まれる。

【０１００】

（表１）様々な濃度のrトロンビンを用いた研究設計

処置群	rトロンビンの単位 (IU/mL)	グラフト数/群
AGS + プラセボ	0	12
AGS +rトロンビン	31.25	8
AGS +rトロンビン	62.5	8
AGS +rトロンビン	125	8
AGS +rトロンビン	1000	8

AGS＝吸収性ゼラチンスポンジ、USP、TTH＝止血時間

【０１０１】

（表２）クロピドグレル二硫酸塩およびヘパリンで前処置したウサギにおける125 IU/mLまたは1000 IU/mLを用いた研究設計

処置群[a]	抗凝固剤	グラフト数/群
AGS＋プラセボ	クロピドグレル二硫酸塩/ヘパリン	10
AGS＋rトロンビン 125 IU/mL	クロピドグレル二硫酸塩/ヘパリン	14
AGS＋rトロンビン 1000 IU/mL	クロピドグレル二硫酸塩/ヘパリン	14

AGS＝吸収性ゼラチンスポンジ、USP、TTH＝止血時間

対照目的で、ヘパリンなしでクロピドグレル二硫酸塩のみで処置したウサギに関しては、データを示していない。

【０１０２】

動物

体重2.0 kg～3.8 kgのおよそ12週齢の雌ニュージーランド白ウサギ、ロット番号2525(Charles River Laboratories, Hollister CA)を、この研究に用いた。実験の7日～10日前に動物を施設に順応させ、ZymoGenetics Vivariumにおいて良好な条件で維持した。研究プロトコールは、施設内動物実験委員会により認可された。

【０１０３】

吸収性ゼラチンスポンジおよび試験物質

ゼラチンスポンジ(GELFOAM(登録商標)吸収性ゼラチン圧縮スポンジ、USP、Pharmacia & Upjohn Co., Kalamazoo, MI、サイズ100)を2×4×1 cmの条片に切り分け、試験物質(rトロンビンまたはプラセボ)と組み合わせた。

【０１０４】

組換えヒトトロンビン、rトロンビン、(RECOTHROM(登録商標), ZymoGenetics, Inc., Seattle, WA)材料は、Abbott Laboratoriesによって製造された5,000 IU/バイアルの凍結乾燥製品からなった。研究当日に、冷蔵庫からrトロンビンのバイアルを取り出し、最低でも20～30分間室温に置いた後、滅菌生理食塩水5 mLで再構成して1000 IU/mL溶液を得た。1000 IU/mL溶液を媒体でさらに希釈して、31.25、62.5、および125 IU/mL溶液を得た。媒体溶液は、有効成分を除いたrトロンビンの製剤からなった：1.6 mMヒスチジン、200 mM NaCl、1.28 mM $CaCl_2$、0.96% w/vスクロース、1.28% w/vマンニトール、0.032% PEG-3350、およびpHを6.0に調整。

【０１０５】

クロピドグレル二硫酸塩の投与

AVシャント術を行う前に、各動物に、20 mg/kg経口用量のクロピドグレル二硫酸塩を毎日、3日間投与した。75 mgクロピドグレル二硫酸塩錠剤を滅菌蒸留水3 mLに懸濁し、作業濃度25 mg/mLを得た。各動物に、胃管栄養により1日当たり1.6 2.2 mL の25 mg/mL溶液を投与した。

【０１０６】

ウサギAVシャント術

各ウサギの体重を量り、筋肉内注射による塩酸ケタミン(50 mg/kg)で固定化した。精密ガス麻酔気化器に鼻の円錐状頭部を接続した状態で、動物を手術台に乗せ、該気化器は、流速1%～2% L/分O_2で、誘導のための4%～5%および麻酔の外科的水準を維持するための1%～2%の麻酔(ISOFLO(登録商標)イソフルラン、USP、Abbott Labs., North Chicago, IL)蒸気濃度を送達した。実験中、37℃に維持したウォータージャケット加熱パッドに動物を乗せ、体温をモニターするために直腸熱プローブを挿入した。実験の間中、血圧、平均動脈圧、および体温を測定した。

【０１０７】

AVシャントを作製するため、首の腹側表面において皮膚切開を行った。右外頸静脈および左総頸動脈を単離し、15 cm長のシリコンカテーテルチューブ(7-French, .078 I.D”.

x .125 O.D.”, Access Techs., Skokie, IL)に接続した3～4 cm長Micro-Renathaneチューブ(MRE 080, .080 O.D.” x 040 I.D.”, Braintree Scientific, Braintree, MA)でカニューレ挿入した。カテーテルを露出させ、直径3 mm、2 cm～2.5 cm長ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)グラフト部分(Bard Peripheral Vascular Inc., SN AFEP 7108)と接続し、左頸動脈および右頸静脈の血流を連結する動脈-静脈シャントを作製した。シャント中を流れる血流を、Transonic System Inc. 流量計モデルTS 410(Ithaca, NY)を用いて測定した。

【０１０８】

各ウサギに、ヘパリンの100 U/kg静脈内(i.v.)ボーラス注射を施し、続いて、大腿静脈を介した流速5 mL/時間でのヘパリン(ブタ由来、Abraxis Pharma. Prods., Schaumburg, IL)の連続50 U/kg/mL注入を施した。ヘパリン処置の前、および静脈内ヘパリンボーラス処置のおよそ5分～10分後に、APTTを測定した。動物が抗凝固処置されたこと(APTT>400秒)を保証するため、グラフト3例につき1例で、動物にヘパリンの50 U/kg静脈内ボーラス注射を施した。

【０１０９】

縫合孔出血およびTTHの測定

グラフトのいずれかにおいて縫合孔を作製するのに先立って、およそ55 mm Hgの基線MAPが達成されなければならず、かつAPTT値は400秒を超えなければならなかった。縫合孔出血の評価は、PTFEグラフト部分の中央部分を、2 4-0 18インチ絹縫合針(逆三角針サイズP-3、Ethicon Inc., Somerville, NJ)で穿刺して、4つの針孔を作製する段階からなった。

【０１１０】

縫合孔穿刺の直後に、試験物質を含む吸収性ゼラチンスポンジ(AGS)をグラフトの周りに巻き、縫合孔を完全に覆った。試験物質を含むAGSをガーゼスポンジで直ちに覆い、連続した指圧を5分の研究期間のうちの60秒間加えた。60秒後、ガーゼスポンジを出血に関して視覚的に検査した。出血の停止が起こらなかった場合には、ガーゼスポンジを新しいガーゼスポンジと交換し、試験物質を再度適用し、その後指圧を再度加えた。ガーゼスポンジ上に目に見える出血が観察されなくなるまで、この過程を反復した。止血時間を秒単位で記録した。TTHが300秒以内に達成されない事象においては、研究を終了し、300秒と記録した。5分の研究期間の終了時に、グラフトのうちのいくつかにおいて、縫合孔部位の血塊を評価した。血塊破裂の評価の後、カテーテルをクランプで締め付け、生理食塩水で洗い流し、ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)部分を除去し、新たなPTFE部分を挿入した。血圧が55 mm Hgの読み取りを達成した場合には、この過程を反復した。55 mm Hg MAPが達成され得なかった事象では、動物を安楽死させた。

【０１１１】

縫合孔血塊破裂評価

ヘパリンのみで処置したウサギの一部、およびクロピドグレル二硫酸塩/ヘパリンで処置したウサギのすべてにおいて、TTHが達成されたという条件で、5分の実験の終了時に、縫合孔部位における血塊破裂を評価した。この手順は、グラフトからおよそ2 cm～3 cm下流の頸静脈カテーテルへの血流を、10秒間クランプで締め付けて止める段階を含んだ。血流の完全な閉塞により、動脈流からの血圧が増加した。10秒間の間に血液がAGSを通して浸透する事象では、血塊破裂は陽性として記録した。漏出が認められない場合には、血管破裂は陰性として記録した。

【０１１２】

TTHの統計解析

止血時間の線形モデルは、Yが秒単位でのTTHであり、Xがカテゴリー変数としてのrトロンビン用量群であり、Zが、クロピドグレル二硫酸塩なしでは「0」、およびクロピドグレル二硫酸塩を伴う場合は「1」とコードされるクロピドグレル二硫酸塩処置である場合に与えられ、rトロンビン用量群とクロピドグレル二硫酸塩処置の間の相互作用である。

【０１１３】

結果

この研究の主要有効性エンドポイントは、止血時間(TTH)であった。TTH値は65秒～300秒の範囲であり、各処置群について平均TTHを計算した(表3)。4つの濃度のrトロンビン対媒体/対照の比較から、TTHの濃度依存的減少が実証された。プラセボ＋AGS(249±67.1)および31.25 IU/mL rトロンビン＋AGS(213±39.3)と比較して、62.5 IU/mL、125 IU/mL、および1000 IU/mL rトロンビン＋AGS(142±35.7、87±22.5、71±4.6)で処置したグラフトの間で、TTHの有意な減少(p<0.001)が認められた。

【０１１４】

（表３）漸増用量のrトロンビンによる処置後の各群の群平均±SE TTH

処置群	rトロンビン用量 (IU/mL)	グラフト数/群	TTH ± SE (s)
AGS＋ 媒体	0	12	249 ± 67.1
AGS＋rトロンビン	31.25	8	213 ± 39.3
AGS＋rトロンビン	62.5	8	142 ± 35.7
AGS＋rトロンビン	125	8	87 ± 22.5
AGS＋rトロンビン	1000	8	71 ± 4.6

AGS＝吸収性ゼラチンスポンジ、USP

【０１１５】

クロピドグレル二硫酸塩のような全身性の抗凝固剤の存在下でさえ、rトロンビンにより、ウサギAVシャントモデルにおいてTTHは有意に減少した(表4)。TTHの有意な減少は、媒体＋AGSと比較して、rトロンビン(125 IU/mLおよび1000 IU/mLの両方)＋AGSで処置したグラフトで認められた(p<0.001)。しかしながら、1000 IU/mL rトロンビンで処置したグラフトで認められた平均TTHの減少は、125 IU/mL rトロンビン群と比較して有意に大きかった(p<0.0001)。TTH測定値の変動は、より高濃度のrトロンビンで処置したグラフトにおいてはるかに小さかったことにも留意されたい。したがって、創傷部位におけるrトロンビンの濃度は、抗凝固剤クロピドグレル二硫酸塩の存在下におけるモデルのTTHに対して、非常に有意な効果を及ぼした。

【０１１６】

（表４）rトロンビンを伴うまたは伴わないクロピドグレル二硫酸塩処置後の各群の群平均±SE TTH

処置群	抗凝固剤	グラフト数/群	TTH ± SE(s)
AGS+ プラセボ	クロピドグレル二硫酸塩 /ヘパリン	10	270 ± 32.5
AGS＋rトロンビン 125 IU/mL	クロピドグレル二硫酸塩 /ヘパリン	14	183 ± 62.2
AGS＋rトロンビン 1000 IU/mL	クロピドグレル二硫酸塩 /ヘパリン	14	73 ± 8.4

AGS＝吸収性ゼラチンスポンジ、USP

【０１１７】

モデル対照パラメータには、体重、各グラフトの体温基線/終点、各グラフトの基線/終点平均動脈圧(MAP)、各グラフトの基線/終点AVシャント血流速度、および基線ヘパリン処置後活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)が含まれた。個々の動物の体重、研究の開始時および終了時のAPTTは、群間で同様であった。基線APTTおよび終点APTTの比較から、終点APTTにおける2.6倍またはそれ以上の増加値が示されたが、これはヘパリン投与に起因すると予測された。体温、MAP、血流、および各gelfoamに適用した試験物質の量の群平均比較は、各群で同様であった。

【０１１８】

図5において、平均TTHの解析から、そのそれぞれのプラセボ対照と比較して、いずれかの用量のrトロンビンで処置したグラフトにおけるTTHの有意な減少が実証される(p<0.001

)。また、125 IU/mL rトロンビン群と比較して、1000 IU/mL rトロンビンで処置したグラフトにおいて、群平均TTHの有意な減少が認められた(p<0.0001)。関心対象の第2のエンドポイントは、rトロンビン濃度および抗凝固の様々な条件下で形成された血塊の強度の評価であった。TTHが達成されたという条件で、5分の実験の終了時に、縫合孔部位における血塊破裂を評価した。ヘパリンのみで抗凝固処置したウサギで試験した異なるrトロンビン濃度間では、血塊破壊の発生率に有意な差は認められなかった。しかしながら、クロピドグレル二硫酸塩で処置したウサギの場合、1000 IU/mLのrトロンビンで処置したグラフトでは0%であるのに対して、125 IU/mLのrトロンビンで処置したグラフトでは血塊破壊の発生率ははるかに高かった(79%)(図6)。

【０１１９】

写真は、125 IU/mL rトロンビン(上の写真3枚)または1000 IU/mL rトロンビンのいずれかによる血塊破裂評価で用いたウサギAVシャントモデルグラフトを示す。1000 IU/mLのrトロンビンで処置したグラフトでは0%であるのと比較して、125 IU/mLで処置した79%のグラフトが、縫合孔部位の血塊破裂に関して陽性とされることが認められた。

【０１２０】

同様に、本発明の止血マイクロスフェアとの関連でそのような異なるトロンビン濃度を適用する場合、同様の効果が期待される；1000 IU/mLまたはそれ以上のより高いトロンビン濃度は、より低い平均TTHを有する。さらに、インビボデータから、そのようなより高濃度が望ましい場合の適用における、止血マイクロスフェア中のより高いトロンビン濃度の潜在的適用が支持される。

【０１２１】

実施例13．インビトロ研究

TEGアッセイの調製；ウサギAVモデルによる試料

AVシャントモデル法に詳述した通りに、クロピドグレル二硫酸塩処置の2時間後に血液を採取した。血液をクエン酸中に採取し、TEGアッセイプロトコールに従って、アッセイの直前に20μlの0.2 M $CaCl_2$、0.9% NaCl, pH 7.4で再石灰化した。クロピドグレル二硫酸塩処置前のウサギによる試料および1日目試料に、1単位/mlヘパリンをインビトロで添加した。3日目のクロピドグレル二硫酸塩処置後のウサギによる試料は、ヘパリンがおよそ1 U/mL血液となるようにウサギに注入されたヘパリンを含んだ(動物は>400秒のAPTTを有した)。

【０１２２】

外因性rトロンビン添加の解析を可能にするためのTEG法の適合化

標準TEGプロトコールに従って、クエン酸ウサギ血液を再石灰化した。Roche et al., 96 Anesth. Analg 58-61 (2003)を参照されたい。血液は、外因性トロンビンなしで、ウサギ血液の正常パラメータ内で凝固した。0.76～6.1 IU/mL rトロンビンを直接添加すると、TEG測定を妨げる速度で血塊形成が開始した。10倍の範囲のトロンビン量を網羅するトロンビン添加Haemoscopeの改良法を、血塊発生に用いた。

【０１２３】

トロンボエラストグラフ研究設計

TEGは、以下のものを測定する：血塊の発生に関する待ち時間、20-mm振幅という固定した血塊硬度の発生までの時間、

・角度(α)によって測定される血塊発生の動態
・血塊の最大振幅(MA)
・R値(反応時間)は、追跡の開始から、曲線が1 mm幅である時点まで測定される
・血塊強度(剪断弾性係数)は、G(ダイン/cm^2)と定義される。

【０１２４】

結果

インビボウサギ実験(実施例11および実施例12)から、AVシャントモデルにおいて、漸増用量のrトロンビンによってTTHが減少し得ることが示された。図6に、AVシャントモデルに関して調製したウサギによる血塊の血塊強度G(ダイン/cm^2)をプロットする。クロピド

グレル二硫酸塩の投与の2時間後に、ウサギから血液を採取した。血液をクエン酸中に採取し、再石灰化し、TEGアッセイにおいて用いた。処置前および1日目クロピドグレル二硫酸塩処置ウサギからの試料は、1 U/mLヘパリンと共にインビトロでインキュベートし、3日目クロピドグレル二硫酸試料に関してはAVシャント手順中にヘパリンを添加した。

【０１２５】

クロピドグレル二硫酸塩で前処置していないウサギで行った実験では、インビトロで用いたrトロンビンの濃度が増加すると、図6AのY軸に示される、G(ダイン/cm^2)として定義される血塊強度(剪断弾性係数)は増加し、EC50が54 U/mlであることが実証された。さらなる実験において、クロピドグレル二硫酸塩で2時間前処置したウサギからの試料の血塊強度は図3Bに見ることができ、EC50は66 U/mLであった。いずれの場合にも、血塊の強度はrトロンビン濃度の増加に伴って増加し、インビボAVシャントモデルによる結果が支持される。

【０１２６】

同様に、本発明の止血マイクロスフェアとの関連でそのような異なるトロンビン濃度を適用する場合、同様の効果が期待される；1,000 IU/mLまたはそれ以上のより高いトロンビン濃度は、より低い平均TTHを有する。さらに、インビトロデータから、そのようなより高濃度が望ましい場合の適用における、止血マイクロスフェア中のより高いトロンビン濃度の潜在的適用が支持される。

【０１２７】

実施例14．ゼラチンマイクロスフェア基質における止血活性の確認

ゼラチン基質を用いて適用する場合に、組換えヒトトロンビン(rトロンビン)の止血活性が維持されることを確認するため、および基質の性能特性を評価するため、以前に確立された出血モデル、ラット半腎切除およびウサギ肝損傷を用いて、非GLP薬理学研究を行った。血管手術手技においてよく見られる種類の出血を表すさらなるモデルもまた用いて、rトロンビンゼラチン基質を評価した。動脈グラフト部位の針穿刺から出血を生じるこのモデルの重要な局面には、出血部位に存在するより高い圧力および流速、ならびに動物における抗凝固剤の使用が含まれる。まとめると、これら3つの出血モデルを用いて、目的の臨床用途を模倣する一連の条件下で、rトロンビンゼラチン基質の性能および止血活性を確認した。

【０１２８】

実施例14A：インビボ研究：ラット腎出血

いずれもゼラチン基質と共に適用したrトロンビンおよびプラセボを、ラット半腎切除モデルにおいて盲検様式で比較した(n=8/群)。簡潔に説明すると、このモデルは、矢状切断を生じ、腎臓量のおよそ18%を除去するための鋳型を用いて、腎臓に標準損傷を生成することを含む。試験物質(rトロンビンを含む溶液に懸濁したゼラチン基質)またはプラセボ(有効成分なしのrトロンビンの製剤を含む溶液に懸濁したゼラチン基質)を、シリンジにより切断面に適用し、2つのガーゼスポンジを試験物質上に置き、連続した指圧を30秒間加えた。30秒後、ガーゼスポンジを出血に関して視覚的に検査した。出血時間(TTH)が達成されなかった事象では、ガーゼスポンジを交換し、さらなる試験物質を適用した。最大時間10分までにTTHが達成されるまで、指圧と視覚的検査を10～15秒おきに交互に行った。清潔なガーゼスポンジに染み込む、目で確認できる血液が見られなくなった時点で、止血時間を記載した。実験期間を通して、平均動脈圧および体温をモニターした。rトロンビンまたはプラセボで処置した個々の動物に関して、止血時間を図7Aに示す。ゼラチン基質を用いて適用したrトロンビンで処置した創傷において、同様の様式で適用したプラセボと比較して、群平均TTHの有意な減少($p<0.0001$、t-検定)が認められた。プラセボ/ゼラチン処置でも、止血は最終的に達成された。しかしながら、この群ではrトロンビン/ゼラチン群よりも、平均TTHはおよそ3倍高かった。これらのデータから、このモデルにおける能動止血剤としてのrトロンビンの重要性が実証される。

【０１２９】

実施例14B：インビボ研究：ウサギ肝出血

いずれもゼラチン基質と共に適用したrトロンビンおよびプラセボを、ウサギ肝損傷モデルにおいて盲検様式で比較した(n=6/群)。簡潔に説明すると、このモデルは、直径およそ2 cmの切片を除去するための鋳型を用いて、肝左中葉の表面に標準損傷を生成することを含む。試験物質(rトロンビンを含む溶液に懸濁したゼラチン基質)またはプラセボ(有効成分なしのrトロンビンの製剤を含む溶液に懸濁したゼラチン基質)を、シリンジにより切断面に適用し、その後2つのガーゼスポンジを試験物質上に置き、連続した指圧を60秒間加えた。60秒後、ガーゼスポンジを出血に関して視覚的に検査した。TTHが達成されなかった事象では、ガーゼスポンジを交換し、さらなる試験物質を適用した。最大時間10分までにTTHが達成されるまで、指圧と視覚的検査を10～15秒おきに交互に行った。清潔なガーゼスポンジに染み込む、目で確認できる血液が見られなくなった時点で、止血時間を記載した。実験期間を通して、平均動脈圧および体温をモニターした。rトロンビンまたはプラセボで処置した個々の動物に関して、止血時間を図7Bに示す。ゼラチン基質を用いて適用したrトロンビンで処置した創傷において、同様の様式で適用したプラセボと比較して、群平均TTHの有意な減少(p＝0.0016、t-検定)が認められた。プラセボ/ゼラチン処置でも止血は最終的に達成されたが、この群ではrトロンビン/ゼラチン群と比較して、平均TTHは2倍超高かった。これらのデータから、このモデルにおける能動止血剤としてのrトロンビンの重要性が実証される。

【０１３０】

実施例14C：インビボ研究：ウサギAVシャント

血管手術設定で起こり得る出血を模倣するため、ウサギAVシャントモデルを開発した。簡潔に説明すると、このモデルは、カテーテルを接続するために約2 cm長のPTFEグラフト部分を用いて、左頸動脈と右頸静脈の血流を連結する動脈-静脈シャントを作製する段階を含む。ウサギを静脈内ヘパリン(100 U/kg静脈内ボーラスおよび50 U/kg/時間)で処置して、シャント開存性を維持した。実験期間を通して、平均動脈圧(MAP)、シャント内の血流速度、APTT、および体温をモニターした。グラフトのいずれかの穿刺に先立って、およそ55 mm Hgの基線MAPが達成された。縫合針(逆三角針サイズP-3)によるグラフト穿刺の直後に、ゼラチン基質群についてはシリンジ、および液体rトロンビン群については噴霧ポンプを用いて、試験物質またはプラセボを投与した。グラフトを直ちにガーゼスポンジで覆い、連続した指圧を60秒間加えた。噴霧適用プラセボで処置したグラフトでは、処置は直接の圧力のみの適用と本質的に同等であった。60秒後、ガーゼスポンジを出血に関して視覚的に検査した。TTHが達成されなかった事象では、ガーゼスポンジを交換し、さらなる試験物質を適用した。TTHが達成されるまで、指圧と視覚的検査を10～15秒おきに交互に行った。清潔なガーゼスポンジに染み込む、目で確認できる血液が見られなくなった時点で、止血時間を記載した。TTHが5分の研究期間内に達成されない事象においては、研究を終了し、300秒と記録した。研究期間の終了時に、55 mm Hg MAP基準を満たしたという条件で、カテーテルをクランプで締め付け、生理食塩水で洗い流し、新たなPTFE部分を設置した。試験物質は、この研究に関して、24のグラフトの中で4つの異なる動物群にランダムに割り付けた。SAS(バージョン9.1.3)を用いて処置群間のTTH測定値を比較するために、一般化推定方程式モデルを用いた。

【０１３１】

ウサギAVシャントモデル研究の主要目的は、血管出血適用において、rトロンビンの止血活性を確認し、ゼラチン基質の性能を評価することであった。いずれもゼラチン基質と共に適用したrトロンビンおよびプラセボを、ウサギA-Vシャントモデルにおいて盲検様式で比較した。ゼラチン基質を用いて適用したrトロンビンまたはプラセボで処置した個々のグラフト部位(n=6/群)に関して、止血時間(TTH)を図7Cに示す。プラセボと比較してrトロンビンで処置したグラフトにおいて、群平均TTHの有意な減少(p<0.0001)が認められた。止血が認められなかった(300秒最大値)2群を含むプラセボ処置群におけるはるかにより高い平均TTHと比較して、rトロンビン処置グラフトのTTHの測定値はすべて、60秒という可能な限り最低の値を有した。

【０１３２】

この研究の第2の目的は、止血活性に対するrトロンビンおよびゼラチン基質の相対的寄与を評価することであった。ラット半腎切除およびウサギ肝損傷モデルによるデータから、rトロンビンとは無関係に、基質自体がいくらかの限定された止血活性を有し得ることが示唆された。その物理的特性、および創傷からの血液の流れを遅延させる能力に基づき、ゼラチン基質の受動止血効果が予測される。しかしながら、AVシャントモデルの条件下では、治療群間のより大きくかつより一貫した差によって、rトロンビンが主要な作用様式を提供することが明らかに示される。この結果は、ゼラチン基質の非存在下で送達されたrトロンビンの効果を比較することにより、さらに支持される。これは、プラセボと盲検比較した、rトロンビンの噴霧適用によって達成された。rトロンビンのみで処置したグラフトにおいて、ゼラチン基質/プラセボ群($p<0.0001$)またはプラセボのみで処置した群($p<0.0001$)と比較して、群平均TTHの有意な減少が認められた(図7C)。

【０１３３】

実施例15．rトロンビン支援TTHにおけるマイクロスフェアサイズの比較

ゼラチンマイクロスフェアを篩過し、特定のサイズ範囲の微粒子を得ることができる。CultiSpher(登録商標)-Sマクロ多孔性ゼラチンマイクロキャリアマイクロスフェアの場合、この材料を篩過して、直径約130μm～380μmのサイズを含めることができる。バッチの作製中に、材料のおよそ半分は、直径約<130μmのマイクロスフェアの画分として失われ得る。直径<380μmのサイズを有する全ゼラチンマイクロスフェア材料を含む流動性トロンビン装置と、直径約130～380μmのサイズを有するゼラチンマイクロスフェア材料を含む流動性装置の比較を行った。

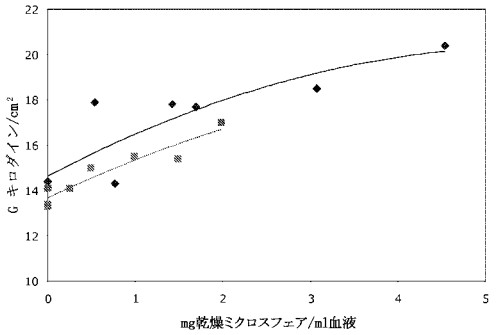
【０１３４】

より具体的には、直径約130～380μmのサイズのCultiSpher(登録商標)-Sマクロ多孔性ゼラチンマイクロキャリアN18051中のrトロンビンを、直径130～380μmのマイクロキャリアと50:50重量比で混合した直径約<130μmのサイズのCultiSpher(登録商標)-Sマクロ多孔性ゼラチンマイクロキャリア19122中のrトロンビンと比較した。ラット半腎切除モデルで試験した場合、標準的な直径130～380μm製剤を有するバッチよりも、直径<130μmを50%有する混合バッチにおいて、より高くかつより可変性の高いTTHが認められた(図8)。加えて、直径130～380μm製剤の標準バッチよりも、直径<130μmが50%の混合バッチにおいて、ガーゼに対するより高い付着性およびより多くの再出血が認められた。より小さな微粒子を含めることにより、このモデルにおける有効性は低下し、直径約130μm～約380μmの範囲のサイズを有するビーズがより効果的であることが判明した。

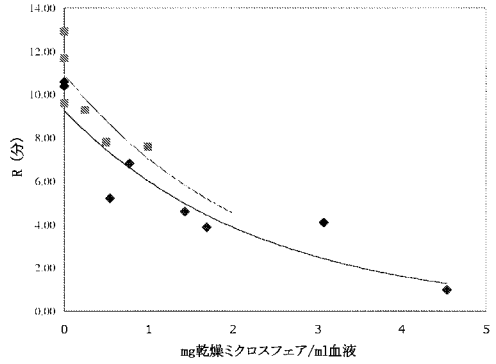
【０１３５】

以上のことから、本発明の具体的な態様を説明の目的のために本明細書に記載してきたが、本発明の精神および範囲から逸脱することなく様々な変更が行われ得ることが理解されよう。したがって、本発明は、添付の特許請求の範囲に制限される以外に、制限されることはない。

【図１】

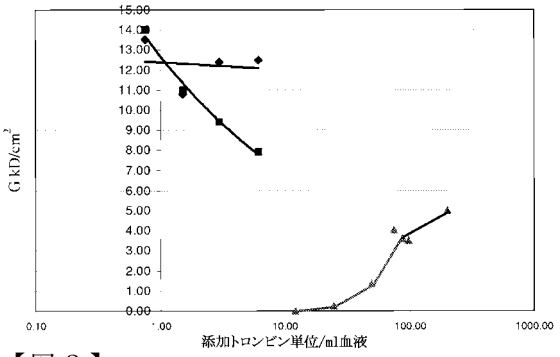


A

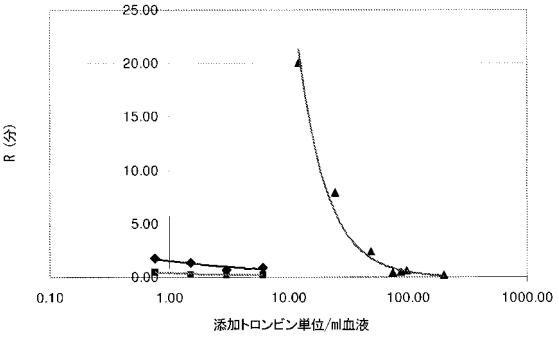


B

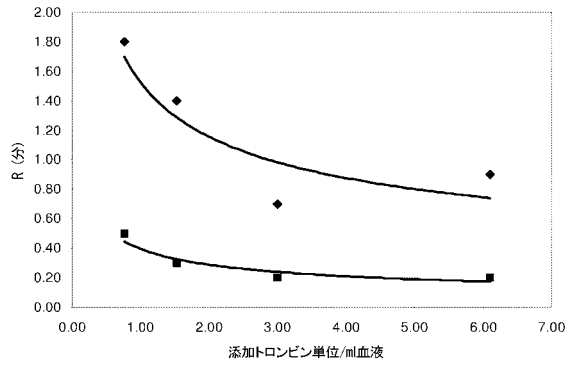
【図２】



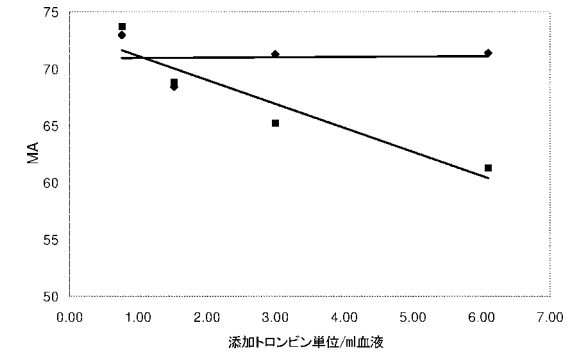
【図３】



【図４】

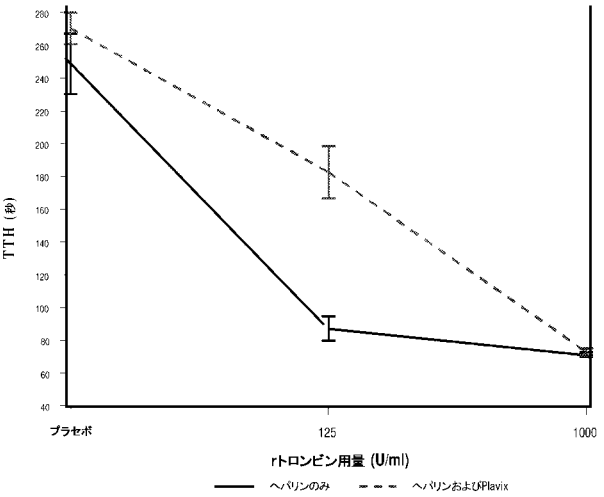


A

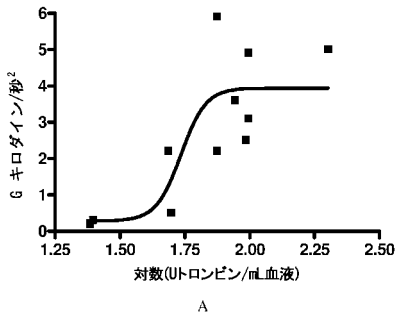


B

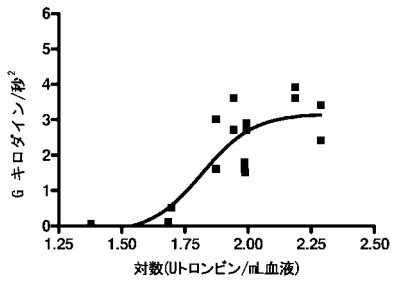
【図５】



【図６】

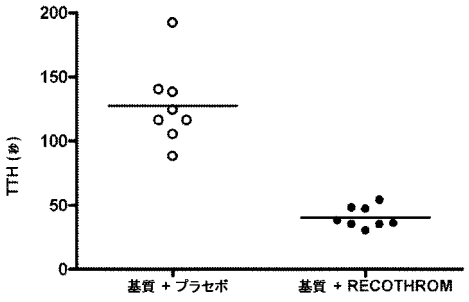


A



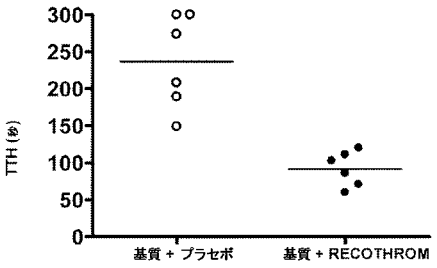
B

【図７Ａ】



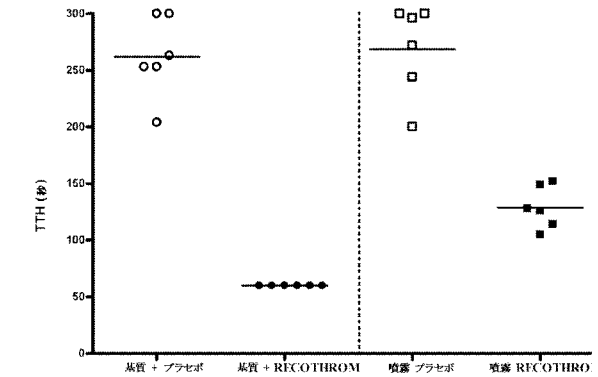
平均 ± SE: 127 ± 11.0 40.4 ± 2.9

【図７Ｂ】



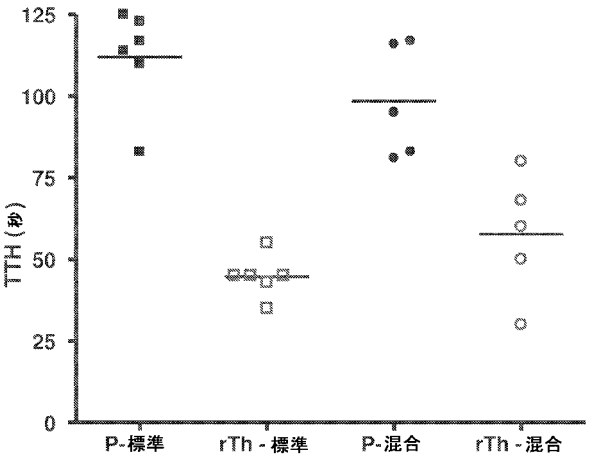
平均 ± SE: 237 ± 26.0 91.8 ± 9.6

【図７Ｃ】



平均 ± SE: 262 ± 13.6 60 ± 0 269 ± 18.7 129 ± 5.9

【図８】



平均 + SD: 112 + 15.3 45 + 6.4 98 + 17.4 58 + 18.9

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI	
A61K 47/34	***(2006.01)***	A61K	47/34
A61K 47/38	***(2006.01)***	A61K	47/38
A61K 35/16	***(2006.01)***	A61K	35/16

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100130845
弁理士 渡邉 伸一
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(72)発明者 センダーオフ リチャード アイ.
アメリカ合衆国 ワシントン州 エドモンズ 第８１ アベニュー ウェスト １８８２３
(72)発明者 メイヤー ジェフリー ディー.
アメリカ合衆国 ワシントン州 レイク フォレスト パーク ノースイースト 第２００ プレイス ５４５０
(72)発明者 ロリンズ エミリー エヌ.
アメリカ合衆国 ワシントン州 シアトル サウス ミード ストリート ３３１７
(72)発明者 ヒューズ スティーブン ディー.
アメリカ合衆国 ワシントン州 ケンモア ノースイースト 第１８７ ストリート ５５３０
(72)発明者 ガルシア リチャード エム.
アメリカ合衆国 ワシントン州 カークランド ノースイースト 第７１ ストリート １２９４１
(72)発明者 ビショップ ポール ディー.
アメリカ合衆国 ワシントン州 フォール シティ サウスイースト 第８ ストリート ２８４２５
(72)発明者 ラッセー ジェラルド ダブリュ.
アメリカ合衆国 ワシントン州 リンウッド サウス レイク スティクニー ドライブ １６１１

審査官 高橋 樹理

(56)参考文献 特開２００６－０１５１４４（ＪＰ，Ａ）
特表２００２－５１５０８６（ＪＰ，Ａ）
特開２００５－２３９７１３（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ ９／００－ ９／７２

Ａ６１Ｋ　４７／００－４７／４８