

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6184971号
(P6184971)

(45) 発行日 平成29年8月23日(2017.8.23)

(24) 登録日 平成29年8月4日(2017.8.4)

(51) Int.Cl.	F I
A 6 1 K 35/19 (2015.01)	A 6 1 K 35/19 Z
A 6 1 K 47/18 (2006.01)	A 6 1 K 47/18
A 6 1 K 47/20 (2006.01)	A 6 1 K 47/20
A 6 1 K 47/02 (2006.01)	A 6 1 K 47/02
A 6 1 K 47/42 (2017.01)	A 6 1 K 47/42

請求項の数 16 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-542934 (P2014-542934)
 (86) (22) 出願日 平成24年11月23日(2012.11.23)
 (65) 公表番号 特表2014-533715 (P2014-533715A)
 (43) 公表日 平成26年12月15日(2014.12.15)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2012/052911
 (87) 国際公開番号 W02013/076507
 (87) 国際公開日 平成25年5月30日(2013.5.30)
 審査請求日 平成27年11月13日(2015.11.13)
 (31) 優先権主張番号 1120224.9
 (32) 優先日 平成23年11月23日(2011.11.23)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)
 (31) 優先権主張番号 1120230.6
 (32) 優先日 平成23年11月23日(2011.11.23)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(73) 特許権者 514002662
 セル セラピー リミテッド
 CELL THERAPY LIMITE
 D
 英国 エスエー2 8ビービー シングル
 トン パーク スウォンジ スウォンジ
 ユニバーシティー スクール オブ メデ
 イシン ルーム 137 ファースト フ
 ロアー インスティテュート オブ ライ
 フ サイエンス(番地なし)
 Institute of Life S
 ciences First Floor
 , Room 137 School o
 f Medicine Swansea
 University Singleto
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血小板溶解物ゲル

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

創傷、肛門裂傷、膣萎縮または皺の治療において使用するための医薬組成物の製造における、ヒト血小板溶解物の使用であって、

前記ヒト血小板溶解物は、ヒト血小板の集団を4回の凍結融解サイクルに供することによって生産されるものであり、ここで、各サイクルの凍結部分が、約 - 190 以下の温度で行われる、

使用。

【請求項2】

それを必要とする患者における創傷、肛門裂傷、膣萎縮または皺を治療する方法において使用するためのヒト血小板溶解物であって、

前記ヒト血小板溶解物は、ヒト血小板の集団を4回の凍結融解サイクルに供することによって生産されるものであり、ここで、各サイクルの凍結部分が、約 - 190 以下の温度で行われる、

ヒト血小板溶解物。

【請求項3】

血小板溶解物を含む医薬組成物を製造する方法であって、

(a) 血小板の集団を4回の凍結融解サイクルに供するステップ、ここで、各サイクルの凍結部分は、約 - 190 以下の温度で行われるものであり、および

(b) 前記血小板溶解物を、少なくとも1つの薬学的に許容できるポリマー、および、

10

20

リジン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アラニン、メチオニン、プロリン、セリン、アスパラギン、システイン、ポリアミノ酸、プロタミン、アミノグアニジン、亜鉛イオンおよびマグネシウムイオンからなる群から選択される、少なくとも1つの薬学的に許容できる正電荷の化学種と、生じる組成物が、室温で1000～5000, 000 mPa・s (cps) の範囲の粘度を有する水性ゲルであるように混合するステップ、

を含む、

方法。

【請求項4】

請求項3に記載の方法であって、

低温手段として液体窒素が用いられて、それによって、各サイクルの凍結部分における浸漬が、95%以上の血小板の溶解をもたらし、より多くの増殖因子の放出、および、制限されないが線維芽細胞およびPGDFのアッセイにより測定可能な、細胞の増殖、修復および再生における改善された機能をもたらす、

方法。

【請求項5】

請求項3または4に記載の方法であって、

前記血小板溶解物の濃度が、1gの組成物あたり、0.1μg～1,000μgの範囲内である、

方法。

【請求項6】

請求項3～5のいずれか1項に記載の方法であって、

前記ポリマーが、(i)セルロースポリマー、または(ii)カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースまたはメチルセルロースである、

方法。

【請求項7】

請求項6に記載の方法であって、

前記セルロースポリマーの濃度が1.5%(w/w)～4.0%(w/w)であり、

前記ポリマーが、450,000～4,000,000の分子量を有する、

方法。

【請求項8】

請求項3～7のいずれか1項に記載の方法であって、

前記ポリマーが、プルロニック酸、またはプルロニックF-127である、

方法。

【請求項9】

請求項8に記載の方法であって、

前記ポリマーの濃度が、15%(w/w)～30%(w/w)である、

方法。

【請求項10】

請求項3～9のいずれか1項に記載の方法であって、

前記電荷種の濃度が、0.1%(w/w)～3.0%(w/w)の範囲内である、

方法。

【請求項11】

請求項3～10のいずれか1項に記載の方法であって、

前記粘度が、25において、50,000～150,000 mPa・s (cps) の範囲である、

方法。

【請求項12】

請求項3～11のいずれか1項に記載の方法であって、

ステップ(b)が、前記血小板溶解物をメチルパラベン、プロピルパラベンおよびm-

10

20

30

40

50

クレゾールからなる群から選択される防腐剤と混合することをさらに含む、
方法。

【請求項 13】

請求項 3 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法であって、
前記血小板溶解物が、ヒト由来である、

方法。

【請求項 14】

請求項 3 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法を用いて製造された血小板溶解物を含む医
薬組成物。

【請求項 15】

請求項 14 に記載の医薬組成物であって、
それを必要とする患者における創傷、肛門裂傷、膣萎縮または皸を治療する方法におい
て使用するための、

医薬組成物。

【請求項 16】

創傷、肛門裂傷、膣萎縮または皸の治療において使用するための医薬組成物の製造にお
ける、請求項 14 に記載の医薬組成物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血小板溶解物を含む医薬組成物、および、創傷、肛門裂傷、膣萎縮または皸
を治療するためのその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

およそ 15% の糖尿病患者が、彼らの生涯で潰瘍を有する。1 型または 2 型の糖尿病を
有する人々のうち、年間の人口ベースで 1% ~ 3.6% の発生率である。2030 年まで
に、毎年およそ 1300 万の人々が、糖尿病性足部潰瘍を患うであろう。足部潰瘍は、非
外傷性下肢切断の 84% を超える。加えて、最初の切断後 3 年の死亡率は、20 ~ 50%
という高さで見積もられている。1 つの潰瘍の治療の平均費用は 8,000 ドルであり、
感染性潰瘍の治療の平均費用は 17,000 ドルであり、大切断術の平均費用は 45,0
00 ドルである。足部潰瘍およびその後遺症による超過コストは、潰瘍が現れてから 2 年
の期間で、患者あたり平均 27,987 ドルであった (American Diabetes
Association; US Department of Health and Human Services; Diabetes Care; Journal
of Clinical Investigations; JAMA 293:217
- 228, 2005; Diabetes Care 22:157-162, 1999)
。

【0003】

損傷部位への自由な血流は、シグナル分子および栄養のためのアクセスを提供する。増
殖の制御およびコラーゲン形成の再構築は、分子プロセスの調整 (例えばプロテアーゼと
プロテアーゼ阻害剤のバランス) を要する。細菌およびデブリが貪食および除去されるの
を確かにする免疫応答および炎症性応答は、感染を防止する (J Invest Dermatol. 2007 May; 127(5):1018-29)。治療されなければ、
糖尿病性潰瘍は、少し刺激を受けているが破損していない皮膚パッチから、広範囲の組織
死および感染を含む生命を脅かす可能性のある創傷に進行し得る。糖尿病性皮膚潰瘍の治
療は、創傷の乾燥、壊死組織の創傷清拭 (切除)、および全身性の抗生物質投与を含み得
る (American College of Foot and Ankle Sur
geons; Medscape website; Clinical Diabetes
Spring 2009 vol. 27 no. 2 52-58)。

【0004】

10

20

30

40

50

化粧品での血小板溶解物の使用に関して、健康な皮膚には、生理学的な細胞および分子レベルでの厳密な調整が必要であることが良く知られている。健康な皮膚の維持に必要な3つの重要な機能は、機能的な結合組織細胞、損傷されていない皮膚細胞外マトリックス（ECM）、および、増殖と再構築プロセスの厳密な分子制御を含む。

【0005】

新しい組織を形成するためのプロセスは、プロテアーゼ、組織阻害剤、および、炎症促進性分子と抗炎症性分子を含む多くの因子の作用とバランスを要する。これらの因子の調和された制御は、一時的な足場（scaffold）が分解される一方で、恒常的なコラーゲン組織が生産されることを確実にする。

【0006】

機能的な結合組織細胞

線維芽細胞およびケラチン生成細胞のような皮膚中の細胞は、皮膚の構造骨格として機能する細胞外マトリックス（ECM）を合成、維持および供給するために必要である。皮膚におけるコラーゲンの大部分を産生する線維芽細胞にとって、健康と弾力性を維持することは特に重要である[1]。血小板と増殖因子ベースの溶液は、有益な因子の局所濃度を上昇させることにより、創傷治癒を高める[2, 3]。現行の治療は侵襲性であり、または、創傷治癒過程の加速が最小限である。ハイドロコロイドゲルのような高度な被覆材は、糖尿病性潰瘍の治療において、伝統的な非付着性のガーゼを超える改善はあまりされていない[6]。創傷治癒における技術革新もまた、患者の質調整生存年（QALY）の成果がほとんど改善されずに、この15年間にわたって制限されている[7]。

【0007】

健康な皮膚では、真皮における損傷されていないI型コラーゲン原線維は、機械的安定性および線維芽細胞のための付着部位を提供する。線維芽細胞の表面上の受容体（インテグリン）は、コラーゲン（および真皮細胞外マトリックス中の他のタンパク質）に付着する。線維芽細胞中の細胞骨格機構（アクチン-ミオシン微小繊維；示さず）は、損傷されていないコラーゲンマトリックスを引っ張り、同様に、機械的抵抗を与える。発生する動的機械的張力は、細胞内の足場（scaffold）（微小管/中間フィラメント；示さず）の集合を促進し、外側に押して線維芽細胞を引き伸ばす。この伸長は、線維芽細胞が、正常なレベルのコラーゲンおよびプロテアーゼを産生するのに必要である。

【0008】

損傷されていない皮膚細胞外マトリックス（ECM）

損傷されていないコラーゲン（ECM中で最も豊富なタンパク質）、エラスチン、ヒアルロン酸、プロテオグリカン、フィブロネクチン、およびラミニンの健康的なバランスは、健康で皺のない皮膚に必須である。これらの構成要素は、皮膚を支える足場（scaffold）を作り、均一に分布したテクスチャーを与える[8]。

【0009】

増殖と再構築プロセスの厳密な分子制御

新しい組織の形成は、プロテアーゼ、組織阻害剤、および炎症促進性分子と抗炎症性分子を含む多くの因子の作用およびバランスを必要とする。これらの因子の調和された制御が、恒常的なコラーゲン組織が生産されること；損傷された分子が切断および除去されること、および結合組織の全体的な健康を確実なものにする[9]。

【0010】

全ての線維性コラーゲンは、三重らせん立体配置で互いの周りに巻き付いた3つのポリペプチド鎖からなる。プロコラーゲンと呼ばれる可溶性の三重らせんは、線維芽細胞の内側に集まる。プロコラーゲンは線維芽細胞から分泌されて、そのペプチド末端は、細胞外空間で、2つの酵素により除去される[10]。末端の除去によりコラーゲンが産生されて、自然発生的に、酵素的にクロスリンクされる大きな線維にアSEMBルする（すなわち、成熟する）。このクロスリンクは、正常な構造的サポートに必須である[11]。I型コラーゲンは、酵素的分解により自然に分解されるが、ヒトの皮膚におけるこの分解は、非常に遅い[12]。ヒトは、I型コラーゲンの分解を開始することが可能な酵素を4つ

10

20

30

40

50

だけ発現する [1 3]。

【 0 0 1 1 】

これらのコラゲナーゼは、マトリックスメタロプロテイナーゼ (M M P) と呼ばれる、マトリックスタンパク質分解酵素のファミリーメンバーである [1 4]。M M P は、様々な細胞外マトリックスタンパク質の生理学的分解に関与している [1 2]。ヒトで発現する 4 つのコラゲナーゼのうち、間質コラゲナーゼ (M M P - 1) のみが、皮膚コラーゲンの正常なターンオーバーに関与している [1 4]。健康で若い皮膚では、M M P - 1 の発現は非常に低く、最も高感度な測定方法による検出限界に近い。

【 0 0 1 2 】

いったん M M P - 1 により切断されると、コラーゲンは解け、ゼラチンと呼ばれる解けたコラーゲンは、それから、ゼラチナーゼと呼ばれる他の M M P ファミリーメンバーにより、さらに分解される。また、これらのゼラチナーゼは、正常な皮膚において、非常に低レベルで発現される [1 4 , 1 5]。加えて、皮膚は、これらの M M P の天然の阻害剤を発現する。これらのマトリックスメタロプロテイナーゼの組織阻害剤 (T I M P) は、さらに、コラーゲンの分解を遅らせる役割を果たす。このように、ヒト皮膚での I 型コラーゲンは、非常に安定しており、交換されるのに平均しておよそ 3 0 年を要する [1 , 1 2]。

【 0 0 1 3 】

皺

皺は、習慣的な顔の表情、加齢、日焼け、喫煙、水分不足および様々な他の因子によって引き起こされる。ストレス下では、線維芽細胞は E C M 分子をより少なく産生し、既存のマトリックスを分解する分子をより多く産生する。このことは、フィードバックループにおいて、結合組織細胞のさらなる機能障害を導く。

【 0 0 1 4 】

結合組織細胞の機能障害

ヒト皮膚において、機械的張力、コラーゲン合成、およびコラゲナーゼ (C O L a s e) によるコラーゲンのフラグメント化の間には、繊細な関係が存在する。高齢のヒトの皮膚では、線維芽細胞がインテグリンに付着せず、フラグメント化コラーゲン原線維は、正常な機械的張力を維持するための十分な機械的安定性を提供することができない。機械的張力の低下は、線維芽細胞を崩壊させて、崩壊した線維芽細胞は、プロコラーゲンをより少なく産生し、コラゲナーゼ (C O L a s e) をより多く産生する。コラーゲン産生の減少およびコラゲナーゼにより触媒されるコラーゲンのフラグメント化の増加は、機械的張力をさらに低下させて、それにより、コラーゲンの継続的な減少をもたらす [1]。

【 0 0 1 5 】

存在する E C M の分解

存在する E C M 分子、特にコラーゲン線維は、物理的、化学的、またはタンパク質分解の損傷を経て分解され、E C M の至る所でコラーゲンおよび他の分子フラグメントを放つ。

【 0 0 1 6 】

I 型コラーゲンのターンオーバー速度の遅さは、その機能を害する年齢依存的な修飾を蓄積させる。これらの修飾は、糖類に由来する新しいクロスリンクの形成を含む [1 4]。重要なことに、これらのクロスリンクは、M M P 仲介のターンオーバーの遅い正常なプロセスの間に効率的に分解および除去されることができず、皮膚が老化するにつれて細胞外マトリックス内にフラグメント化コラーゲンを蓄積させる [1 5 , 1 6]。クロスリンクは、コラーゲンフラグメントの完全な除去を阻害する。フラグメントは、修復されることができず、または新しく作られたコラーゲン原線維内に取り込まれることができず、したがって、三次元コラーゲンマトリックスで欠陥を生じる。これらの欠陥は、真皮の構造のおよび機械的な完全性を害し、それにより、その機能を悪化させる。フラグメント化コラーゲンの蓄積は、ヒトの皮膚の外観における加齢に伴う変化の中心にある [1]。

【 0 0 1 7 】

10

20

30

40

50

脱調節された分子シグナル

崩壊した線維芽細胞および分解されたECMは、皺部位において、メタロプロテアーゼの組織阻害剤(TIMP)に対するマトリックスメタロプロテアーゼの濃度を不釣り合いに増加させて、組織再生を妨げる[1, 10-20]。

【0018】

活性酸素種(ROS)は、環境誘導性および内因性の加齢の両方による副産物であり、皮膚内での生化学的反応のカスケードを引き起こし、マトリックスメタロプロテナーゼ(MMP)および炎症促進性サイトカインの産生をもたらす。線維芽細胞およびケラチン生成細胞から分泌されるMMPは、コラーゲン形成を減少させて、コラーゲン分解を亢進させて、皮膚マトリックスの分解の原因となる[19]。

10

【0019】

現行の皺治療

現行の上市されている治療は失敗であり、若々しい外観を持続的な結果で作り出さない。それらは、根本的原因に取り組みず皺の症状を治療することを目的としている。毒素は

皮膚を引っ張る顔の筋肉を一時的に緩めるが、根本的な細胞外マトリックスを修復しない。Botox(登録商標)およびDysport(登録商標)は、飲むこと、話すこと、および息を吸うことに問題を有しながら「フローズンフェイス」をもたらすことができる。充填剤(ヒアルロン酸、コラーゲン、ポリ-L-乳酸、およびヒドロキシルアパタイトなど)は、短期間、「すき間を埋める」が、皮膚を正常な生理機能に回復させず、または

20

【0020】

化粧品における技術革新は、この10年間、散発的な進歩で、この30年間あまりなされていない。第一および第二世代の注射可能な治療は、作用発現が早いですが、効果の持続が制限される。

【0021】

血小板溶解物療法

臨床での血小板溶解物(PL)の幅広い適合および用途に影響を及ぼす様々な長年にわたる論点がある。主な論点は、限定されないが以下であった：ドナー由来のサンプルが処理中に汚染されるリスクがあること；血小板の質が、数および有益な増殖因子を分泌する能力の観点から患者間で異なり、製剤に整合性がないこと；診療所キットにおける血小板定量の必要性があること；血小板の数の固有の差異のせいで、治療製剤が患者ごとに高い変動性を引き起こし、効能に影響すること；現行の方法は不便であり、臨床医は、血液を遠心分離して血小板を血液から分離しなければならないこと、および、25~30分間で続き得るこのプロセスの変動性が、再度エラーを引き起こすこと；および、現行のプロセスは1回の治療あたり130ドル(Plateletex)の見積コストであり、費用効果的でないこと。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0022】

本発明は、これらの長年にわたる持続的な問題に対する非自明の解決法である。

【課題を解決するための手段】

【0023】

本発明は、血小板溶解物を含む医薬組成物を提供する。これらは、創傷、例えば、潰瘍性創傷、肛門裂傷、膺萎縮または皺などに、治療的に適用され得る。

【0024】

本発明者らはまた、それらの増殖因子を溶液中に血小板溶解物として放出するように血小板を溶解する、より効率的な方法も発明した。新規の血小板溶解物は、それ自体、治療に使うことができ、または、本発明の医薬組成物に製剤化されてよい。

【0025】

50

本発明の組成物または溶解物は、これらの増殖因子を含む安定化され凍結乾燥された粉末を生産するために凍結乾燥されてよく、創傷治癒での治療的適用のために用いることができるが、また、天然の増殖因子の送達の必要性が増している他の治療的適用のためにも用いることができる。

【0026】

本発明は、(a)治療用血小板溶解物、(b)少なくとも1つの薬学的に許容できるポリマーおよび(c)リジン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アラニン、メチオニン、プロリン、セリン、アスパラギン、システイン、ポリアミノ酸、プロタミン、アミノグアニジン、亜鉛イオンおよびマグネシウムイオンからなる群から選択される、少なくとも1つの薬学的に許容できる正電荷の化学種を含む医薬組成物であつて、前記組成物が、室温で1000~500,000 mPa·s (cps)の範囲の粘度を有する水性ゲルである医薬組成物を提供する。

10

【0027】

また、本発明は：

- 血小板溶解物を生産する方法であつて、血小板の集団を少なくとも1回の凍結融解サイクルに供するステップを含み、各サイクルの凍結部分が、-78 以下の温度で行われる、方法；

- 血小板溶解物を生産する方法であつて、血小板の集団を、機械的ホモジナイゼーション(「ワーリングブレンダー」)、液体ホモジナイゼーション、超音波処理、アルコールおよびドライアイスまたは他の方法を用いた凍結融解、75%より高いが典型的に90%より高い液体窒素中での機械的研削、増殖因子を血小板および顆粒から溶液中に放出させる溶解に、供するステップを含み、回転羽根が細胞および組織をすり碎いて分散させ；細胞または組織懸濁液は狭い空間を通すことにより剪断され；高周波音波が細胞を剪断し；凍結および解凍の繰り返しサイクルが氷晶形成を介して細胞を破壊し；液体窒素中で凍結された組織を研削し、溶解は、血小板および顆粒から溶液中に増殖因子を放出するものである、方法；

20

- 本発明の方法を用いて生産された、血小板溶解物；

- 必要とする患者における創傷、肛門裂傷、腔萎縮または皺の治療での使用のための、本発明の医薬組成物または本発明の血小板溶解物；

- 必要とする患者における創傷、肛門裂傷、腔萎縮または皺を治療する方法であつて、前記患者に、治療的有效量の本発明の医薬組成物または本発明の血小板溶解物を投与するステップを含む、方法；

30

- 本発明の医薬組成物を生産する方法であつて、結果として生じる組成物が、室温で1000~500,000 mPa·s (cps)の範囲の粘度を有する水性ゲルであるように、血小板溶解物を少なくとも1つの薬学的に許容できるポリマーおよび少なくとも1つの薬学的に許容できる正電荷の化学種と混合するステップを含む、方法；および

- 本発明の医薬組成物を生産する方法であつて、(a)請求項14から20のいずれか一項に記載の方法を用いて血小板溶解物を生産するステップおよび(b)結果として生じる組成物が、室温で1000~500,000 mPa·s (cps)の範囲の粘度を有する水性ゲルであるように、前記血小板溶解物を少なくとも1つの薬学的に許容できるポリマーおよび少なくとも1つの薬学的に許容できる正電荷の化学種と混合するステップを含む、方法

40

を、提供する。

【図面の簡単な説明】

【0028】

【図1】図1は、本発明の血小板溶解物および本発明の医薬組成物を生産するために用いられるプロトコルのフローチャートを示す。

【図2-3】図2および図3は、本発明が、便利で一貫していてcGMP適合である、費用効果的で差別化された成果を提供することを示す。

【図4-7】図4~図7は、品質管理がされて使いやすく費用効果的な、一貫した創傷ケ

50

ア製品を提供するという、長年にわたって存在し続ける必要性を解決することを示す。

【発明を実施するための形態】

【0029】

発明の詳細

本発明の医薬組成物または本発明の血小板溶解物は適用されて、全ての構成要素は、我々の製品が安全であり患者に対して効果的であることを確かめる厳密な試験を受ける。これらのプロセスは、血小板スクリーニングおよび滅菌血小板ゲルを生産するのを可能にする方法を含む。本発明は、安全で効果的な、そして滅菌のプロセスを実行する。好ましい実施態様では、滅菌血小板溶解物は滅菌メチルセルロースゲルと混合されて、本発明の治療用血小板組成物が作られる。本発明のプロトコルのフローチャートは、図10に見ることができる。

10

【0030】

本発明の医薬組成物の皺に対する効能

本発明は、皺と関連する各問題に直接対処して皮膚および基礎をなす足場 (scaffold) を改善する、再生療法を提供する。本発明の医薬組成物または本発明の血小板溶解物を用いた治療は、損傷した皮膚の変性サイクルを、正常な皮膚に見られる健康的な生理機能に戻す。本発明の医薬組成物または本発明の血小板溶解物は、結合組織内の細胞のバランスを取り戻し、分子シグナルを平衡化し、および細胞外マトリックスを回復させることにより作用する。自然治癒および組織再生プロセスは、コラーゲン合成の増加、コラーゲン細胞外マトリックスの再生およびマトリックス内の線維芽細胞の増殖を導く。

20

【0031】

結合組織内の、バランスが取り戻された細胞

本発明の医薬組成物は血小板に由来するので、典型的に、血小板由来の様々な増殖因子を含み、細胞増殖を促進する。本発明の医薬組成物または本発明の血小板溶解物は、典型的に、1つまたは複数の、好ましくは全ての、以下の増殖因子：PDGF、VEGF、FGF、EGF、TGF、特にTGF- β 、およびCTGFを含む。前記組成物は、好ましくは、2、3、4、5または6つのこれらの増殖因子を含む。

【0032】

血小板由来増殖因子 (PDGF) は、細胞の増殖および産生、血管修復およびコラーゲン産生を促進する。血管内皮成長因子 (VEGF) は、血管内皮細胞の増殖および産生を促進する。線維芽細胞増殖因子 (FGF) は、組織修復、細胞増殖、コラーゲン産生およびヒアルロン酸産生を促進する。上皮増殖因子 (EGF) は、上皮細胞増殖、血管新生および創傷治癒を促進する。形質転換増殖因子 (TGF)、特にTGF- β は、上皮細胞の増殖および新生、および創傷治癒を促進する。結合組織増殖因子 (CTGF) は創傷修復を促進する。

30

【0033】

したがって、本発明の医薬組成物または本発明の血小板溶解物は、新しい線維芽細胞の形成を促進する。これらの新しい線維芽細胞は、弾力的で健康的になり始めて、新しいコラーゲンおよびより少ないメタロプロテアーゼを産生する。線維芽細胞 (構造骨格の合成、維持および提供において主要な細胞) の復元は、より健康で回復した皮膚をもたらす [1]。

40

【0034】

また、PDGFは、線維芽細胞の運動性を高めて、投与部位に線維芽細胞を移動させることも示されている。

【0035】

回復された細胞外マトリックス (ECM)

血小板の顆粒に見られる天然の増殖因子 (例えば、PDGF、VEGF、FGF、EGF、およびTGF) は、コラーゲンおよびヒアルロン酸の産生、組織修復、内皮細胞および上皮細胞の増殖および再生、および、新しい血管の形成を促進する (酸素を回復させて望ましくない分子を除去する)。これらの因子は全て、皺が寄って損傷したECMを、

50

その健康的な段階に戻して再生させるのに役立つ。これらの各増殖因子は、個々におよび互いに共同して相加的に、皮膚の再生および復元において役割を果たす。新しい、フラグメント化されていないコラーゲンの産生を刺激する治療は、高齢者の外観および健康に実質的な改善をもたらす [1]。

【 0 0 3 6 】

平衡された分子シグナル

皺元への血小板溶解物の適用は、高濃度の T I M P タンパク質投与量を与えてメタロプロテアーゼの不均衡を対処して、E C Mのさらなる分解を防止して、そして皮膚再生のスピードを高める。血小板溶解物の皮膚への直接的な適用は、高濃度の T I M P タンパク質投与量を与えてメタロプロテアーゼの不均衡に対処して、コラーゲン組織の増殖および再構築を助ける。血小板は、例えば、ほとんどの M M P を阻害するが優先的に M M P - 2 および M M P - 9 を阻害する T I M P - 2 を含む [2 0]。本発明の医薬組成物または本発明の血小板溶解物は、典型的に、T I M Pメタロペプチダーゼ阻害剤 2 (T I M P - 2) を含む。

10

【 0 0 3 7 】

本発明の利点

本発明の医薬組成物または本発明の血小板溶解物は、慢性の創傷治癒の市場に容易に適用されて、多血小板血漿よりも、そして他の自家再生細胞療法よりも、以下の利点をもたらす。

【 0 0 3 8 】

1 . 生産

インハウスでスケールアップされた c G M P は、インビトロの血小板産生プラットフォームに適合し、高収率で安全、純粋かつ活性の血小板をもたらす。

20

【 0 0 3 9 】

2 . 製剤化

血小板は、重要な増殖因子を放出させるために溶解される。溶解物は、標準的で有効な治療投与量に濃縮されて、冷蔵温度での長期保管のために凍結乾燥される。人工皮膚アッセイで試験する Q C は、全バッチで一貫した高濃度の増殖因子を確認し、自家の多血小板血漿に見られる患者間の変動性がないことを確認する。

【 0 0 4 0 】

3 . 投与

(a) 本発明の医薬組成物または本発明の血小板溶解物を投与するステップ、(b) 凍結乾燥された本発明の血小板溶解物を再水和するステップ、(c) 凍結乾燥された本発明の血小板溶解物を、ポリマーゲル化因子と混合するステップ、または(d) 本発明の医薬組成物を再水和するステップの、効率的なワンステップ工程は、臨床医のために現行プロセスを単純化させて、患者投与を標準化させる。

30

【 0 0 4 1 】

現行の多血小板血漿療法のプロセスは、血液をスピンのステップと、患者ごとに増殖因子濃度が異なる未濃縮で性質不明の血漿を分離するステップを含む。他の皮膚促進因子(例えば、ポリ-L-乳酸)と違い、血小板療法は、その効果が急速に生じる。それは再生可能であり、使用しやすい。

40

【 0 0 4 2 】

さらなる利点を以下の表 1 に示す。

【 0 0 4 3 】

【表 1】

表 1. 前世代製品に対する本発明の治療用組成物（第 4 世代にラベル化）の利点

表は、CTLの第4世代の多血小板血漿ゲルに対する主な利点を示す

世代	製品	例	価格	臨床利便性	汚染リスク	好ましくない不純物	効能	長期安定性	増殖因子の数	病身 ² の患者での使用
第1	製造された増殖因子	Regranex	✓	✓	✓	✓	X	✓	X	✓
第2	自家(自己)血小板ゲル	Autologel	X	X	X	X	X ¹	X	X ¹	X
第3	同種異系(ドナー)血小板ゲル	学術的試験	X	✓	✓	X	✓	X	✓	✓
第4	メチルセルロースを含む同種異系(ドナー)血小板ゲル	CTL	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

1 患者ごとに異なる 2 異常な血液または血小板生理機能

10

【 0 0 4 4 】

公知の製品が非天然性で一時的なのに対し、血小板療法は天然で持続的な解決策であり、本発明の医薬組成物および本発明の血小板溶解物は、患者に対して、受診をより少なくしてコストを抑える、より良い解決策を提供する。公知の製品とは異なり、本発明の医薬組成物および本発明の血小板溶解物は、血小板および増殖因子の濃度を標準化して、一貫した結果を導く。

20

【 0 0 4 5 】

加えて、前記の治療組成物は、品質管理されて使いやすく費用効果的な、一貫した皮膚再生製品の提供に関する障害を解決する。

【 0 0 4 6 】

生産：本発明の組成物は、一貫した皮膚再生の結果を確実にする、c G M P 適合の標準化された製品である。

30

【 0 0 4 7 】

有用性：本発明の組成物は、ワンステップ適用の血小板溶解物製剤であり、医師の時間を大幅に節約する。

【 0 0 4 8 】

費用：本発明の組成物は、他の多血小板血漿療法と比較して費用効果的な価格で皮膚再生をもたらす。

【 0 0 4 9 】

解決されるべき問題に対する、他の非自明の解決策は、他の市場で市販されている血小板溶解物 / メチルセルロースゲルがなく、文字通り、他の血小板溶解物 / メチルセルロースゲルはない。

40

【 0 0 5 0 】

糖尿病性潰瘍

糖尿病性患者は、しばしば、血流を妨げる末梢動脈の疾患を患い、シグナル分子および栄養が創傷部位に届くのが制限される。高濃度のサイトカインは、創傷部位において、阻害剤に対するメタロプロテアーゼの濃度を増加させて、正常な組織再生を妨げる。免疫調節因子の活性化が低いことは、細菌性一酸化窒素のレベルが低いことと相まって、感染の可能性と重症度を増大させる [2 1]。創傷治癒の正確なプロセスは未だ完全には理解されていないが、そのプロセスに必須な因子のサブセットを血小板が分泌することが知られている。創傷治癒に重要な因子は、通常、血小板、マクロファージおよび線維芽細胞により分泌される。P D G F、E G F および T G F は、創傷治癒のプロセスにおいて必須の因

50

子であると考えられている。さらなる因子が、重要な役割を果たし、血小板により創傷部位に補充されるマクロファージおよび線維芽細胞により分泌される。皮膚は、おそらく、たいていの対象が損傷する器官である。皮膚の修復は、炎症、肉芽組織形成、および上皮形成および結合組織マトリックスの再構築として通常説明される4段階に分けることができる複合的プロセスである。これらの各段階は本来複合的であり、優れた創傷治癒のためには、プロセスが連続的かつ協調的に生じなければならないことが明らかである。優れた創傷治癒は、結果として生じる瘢痕組織が、構造的、組織学的、機能的、および審美的に明らかに無傷の皮膚と最大限に似ているような方法での、真皮および上皮部分を含む皮膚の復元として定義することができ、そのような瘢痕組織は、肥大型瘢痕またはケロイドとは異なる。

10

【0051】

明確性のために、ヒトの皮膚の組成の簡略化した説明を以下に提供する。上部は主に上皮細胞を含む上皮からなる。5つの異なる層が上皮に見られる。上皮の基底、すなわち、基底層は、基底膜を介して真皮に接着している。真皮は、線維芽細胞および他の結合組織細胞を含む結合組織、および結合組織マトリックス物質からなる。血管、神経、感覚器官、汗腺、皮脂腺、および毛包は、真皮に存在する。臨床実験は、血小板溶解物製剤の適用が、潰瘍のような慢性創傷および火傷における創傷治癒を誘導することを示している。

【0052】

糖尿病性潰瘍は、糖尿病性患者での神経障害および下肢における循環の減少の結果である。これらの治癒が困難な創傷は、特定の創傷被覆材に大部分を吸収させることにより現在のところ扱われている大量の滲出液を形成する。滲出液は、多種多様なタンパク質および細胞を含む。これらのタンパク質のうちの1つはトロンピンであり（現在の仮説であり、確認する必要がある）、血小板を活性化する凝血カスケードの構成要素である。血小板は血中の小細胞であり、活性化されると血塊を形成して、それらの増殖因子内容物を放出する。それらは組織損傷により活性化されて、血塊はさらなる出血を防ぐ。増殖因子は、損傷した組織の再生および修復を促進する。血小板の創傷治癒能力は、広く様々な製剤、例えば、多血小板血漿、血小板溶解物、血小板ゲルおよび血小板において、多くの研究者により達成が試みられている。これらの製剤は、インビトロで活性化された血小板により調製されて、それから、適切な製剤に調製されて、そして創傷に適用される。

20

【0053】

治療用の血小板の濃度は、1mlあたり 1×10^9 血小板であると説明されていて、我々は、遠心分離を介して血小板を分離および濃縮することによりこれを取得する。理想的な濃度は臨床的評価を通じて決定される必要があるが、末梢血中の濃度のおおよそ2倍である多血小板血漿中の濃度（すなわち、患者の血中レベルが 2×10^8 血小板/mlの場合は、 4×10^8 血小板/ml）から 2×10^9 血小板/mlまで及ぶ可能性がある。ゴールドスタンダードは、加工するまで攪拌しながら、分離された血小板を室温で保管することであるとされている（Welsh Blood Serviceに従った標準的なガイドライン）。

30

【0054】

血小板溶解物

血小板溶解物（PL）は、創傷治癒に対してポジティブの影響があることが示された。治療用血小板溶解物は、治療に適切な血小板溶解物である。本発明の血小板溶解物または本発明の医薬組成物で用いられる血小板溶解物は、典型的に、1つまたは複数の、好ましくは全ての、上述のPDGF、VEGF、FGF、EGF、およびTGFを含む。それはまた、典型的に、TIMP-2を含む。

40

【0055】

血小板の溶解は、化学的方法（すなわち $CaCl_2$ ）、浸透的方法（蒸留水の使用）、または凍結融解の工程を介して達成することができる。また、本発明に用いるための血小板溶解物は全血由来してもよく、本明細書中に参照により援用される米国特許第5,198,357号[22]に記載のようにして調製することができる。

50

【0056】

以前は、PLは、めったに1回を超えないサイクルで、-20度から-80度に及ぶ様々な温度での凍結融解サイクルを介して調製されていた。我々のデータは、血小板全体の数は、-80/+37度での凍結融解サイクルによってのみ、適度に影響を受けることを示している。実際に、-20、-80および液体窒素凍結の比較では、-20および-80は、それぞれ80%および50%の溶解に終わった一方で、液体窒素のみが90%の溶解を達成することができた。しかし、上記実験が3回の凍結融解サイクルを含んだこと、そしてそれにより、1回の凍結融解で-80度を用いた最新文献におけるPLの調製は、約20%の溶解しか達成できないことを示すことに注目すべきである。また、液体窒素は、3回またはそれ以上の凍結融解サイクルを1時間でこなうことを可能にする利点を有しており、したがって、臨床状況のための非常に適切な方法である。さらに、フリーザーは、特に、頻繁にドアを開ける多数のユーザーがいる場合に経時的に温度が異なり得るのに対し、液体窒素は液体状のガスが常に-196であるので、プロセス標準化を容易にし、当然、標準化は、臨床での使用のための製品を調製する場合、特に重要である。

10

【0057】

本発明は、血小板溶解物(PL)を生産する方法であって、血小板の集団を少なくとも1回の凍結融解サイクルに供するステップを含み、各サイクルの凍結部分が、-78以下の温度で行われる方法を提供する。前記方法は、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30またはそれ以上の任意の数の凍結融解サイクルを含んでよい。前記方法は、好ましくは、血小板の集団を、5回以下の凍結融解サイクル、例えば4回以下の凍結融解サイクル、3回以下の凍結融解サイクルまたは2回以下の凍結融解サイクルに供するステップを含む。前記方法は、さらに好ましくは、血小板の集団を、1回のみでの凍結融解サイクル、2回のみでの凍結融解サイクル、3回のみでの凍結融解サイクルまたは4回のみでの凍結融解サイクルに供するステップを含む。

20

【0058】

各サイクルでの融解温度は、血小板組成物を融解する任意の温度であってよく、例えば、約5~-約50、例えば、約10~-約45または約20~-約40である。各サイクルでの融解温度は、典型的に、約37である。

【0059】

各サイクルでの凍結温度は、好ましくは約-79以下、約-80、約-81以下、約-82以下、約-83以下、約-84以下、約-85以下、約-86以下、約-87以下、約-88以下、約-89以下、約-90以下、約-100以下、約-110以下、約-120以下、約-130以下、約-140以下、約-150以下、約-160以下、約-170以下、約-180以下、約-190以下または約-196である。

30

【0060】

同一の方法の異なるサイクルにおける凍結温度および融解温度は、典型的に同一である。

【0061】

好ましい実施態様では、液体窒素は、各凍結サイクルにおいて低温手段として用いられる。各サイクルの凍結部分における液体窒素中の浸漬は、典型的に、95%以上の血小板溶解をもたらす、より多くの増殖因子の放出、および、制限されないが線維芽細胞およびPGDFのアッセイにより測定可能な、細胞の増殖、修復および再生における改善された機能をもたらす。

40

【0062】

また、本発明は、本発明の方法を用いて生産される血小板溶解物を提供する。当該血小板溶解物は、約80%よりも高い血小板溶解、例えば、約85%よりも高い、または約90%よりも高い血小板溶解から生じるので、公知の溶解物とは異なる。したがって、より多くの増殖因子、および、制限されないが線維芽細胞およびPGDFのアッセイにより測定可能な、細胞の増殖、修復および再生における改善された機能を含む。

50

【0063】

血小板溶解物は、本発明の医薬組成物中に、組成物1gあたり約0.1 μ g～約1,000 μ gの範囲の濃度で、例えば、組成物1gあたり約0.2 μ g～約750 μ g、組成物1gあたり約0.5 μ g～約500 μ g、組成物1gあたり約1 μ g～約250 μ gあたり、組成物1gあたり約2 μ g～約200 μ g、または組成物1gあたり約10 μ g～約100 μ gの範囲の濃度で存在する。

【0064】

本発明の血小板溶解物または本発明の医薬組成物で用いられる血小板溶解物は、任意の哺乳類の血小板由来であってよい。哺乳類は、好ましくはヒトである。しかしながら、ヒトでなくてよい。適切なヒトでない動物は、限定されないが、マーモセットまたはサルなどの霊長類、ウマ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、アルパカ、グアナコ、シカまたはブタなどの商業用の飼育動物、イヌ、ネコ、マウス、ラット、モルモット、フェレット、スナネズミまたはハムスターなどのペット、またはアナグマまたはシカなどの野生動物を含む。

10

【0065】

薬学的に許容できるポリマー

本発明の医薬組成物は、少なくとも1つの薬学的に許容できるポリマーを含む。前記組成物は、例えば1、2、3、4、5、10またはそれ以上の、任意の数の薬学的に許容できるポリマーを含んでよい。

【0066】

ポリマーは、治療での使用に適切であれば、薬学的に許容できる。ポリマーは、好ましくは、創傷、例えば本明細書に挙げられる任意の創傷、肛門裂傷、膣萎縮または皺への局所投与に適切である。

20

【0067】

薬学的に許容できるポリマーは、当技術分野でよく知られている。任意のそのようなポリマーを、本発明に従って用いてよい。

【0068】

ポリマー濃度は、好ましくは約15% (w/w)～約30% (w/w)、例えば約17% (w/w)～約25% (w/w)または約20% (w/w)～約23% (w/w)である。

【0069】

ポリマーは好ましくはセルロースポリマーである。適切なセルロースポリマーは本分野で知られている。セルロースポリマーは、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースまたはメチルセルロースである。セルロースポリマーの濃度は、好ましくは約1.5% (w/w)～約4.0% (w/w)、例えば約2.0% (w/w)～約3.0% (w/w)である。セルロースポリマーは、好ましくは、約450,000～約4,000,000の分子量、例えば約500,000～約3,500,000、約500,000～約3,000,000または約750,000～約2,500,000または約1000,000～約2,000,000の分子量を有する。

30

【0070】

ポリマーは、好ましくはプルロニック酸、場合によりプルロニックF-127である。

40

【0071】

薬学的に許容できる正電荷の化学種

本発明の医薬組成物は、リジン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アラニン、メチオニン、プロリン、セリン、アスパラギン、システイン、ポリアミノ酸、プロタミン、アミノグアニジン、亜鉛イオンおよびマグネシウムイオンからなる群から選択される、少なくとも1つの薬学的に許容できる正電荷の化学種を含む。

【0072】

種は、治療での使用に適切であれば、薬学的に許容できる。種は、好ましくは、創傷、例えば本明細書に挙げられる任意の創傷、肛門裂傷、膣萎縮または皺への局所投与に適切である。

50

【 0 0 7 3 】

前記組成物は、挙げられた種のうちの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15または16個など、任意の数の薬学的に許容できる種を含んでよい。

【 0 0 7 4 】

電荷種の濃度は、好ましくは、約0.1% (w/w) ~ 約3.0% (w/w) の範囲内、例えば、約0.2% (w/w) ~ 約2.5% (w/w)、約0.5% (w/w) ~ 約2.0% (w/w) または約1.0% (w/w) ~ 約1.5% (w/w) の範囲内である。

【 0 0 7 5 】

粘度

本発明の医薬組成物は水性ゲルである。組成物中のポリマー（単数または複数）は、ネットワークを形成し、その中で水分子が分散している。本発明の医薬組成物は、好ましくはハイドロゲルである。

【 0 0 7 6 】

水性ゲルは、室温で約1000 ~ 約500,000マイクロパスカル・秒 (mPa·s) (センチポイズ; cpsとしても知られる) の範囲の粘度を有する。粘度は、剪断応力または引張応力のいずれかにより変形されることに対するゲルの抵抗力の尺度である。粘度は、当技術分野で知られている任意の方法を用いて測定することができる。適切な方法は、限定されないが、粘度計またはレオメータを用いることを含む。

【 0 0 7 7 】

室温は典型的に、約18 ~ 約25、例えば約19 ~ 約24、または、約20 ~ 約23、または、約21 ~ 約22である。室温は、好ましくは、18、19、20、21、22、23、24 および25 のいずれかである。粘度は、最も好ましくは25 で測定される。

【 0 0 7 8 】

ゲルは、好ましくは、室温で約1000 ~ 約500,000 mPa·s、例えば、室温で約1500 ~ 約450,000 mPa·s、室温で約2000 ~ 約400,000 mPa·s、室温で約2500 ~ 約350,000 mPa·s、室温で約5000 ~ 約300,000 mPa·s、室温で約10,000 ~ 約250,000 mPa·s、室温で約50,000 ~ 約200,000 mPa·s、または、室温で約50,000 ~ 約150,000 mPa·s の範囲の粘度を有する。

【 0 0 7 9 】

ゲルは、最も好ましくは、25 で約50,000 ~ 150,000 mPa·s (cps) の範囲の粘度を有する。

【 0 0 8 0 】

防腐剤

本発明の医薬組成物または本発明の血小板溶解物は、1つまたは複数の防腐剤をさらに含んでよい。適切な防腐剤は当技術分野で知られている。適切な防腐剤は、限定されないが、メチルパラベン、プロピルパラベンおよびm-クレゾールを含む。

【 0 0 8 1 】

さらなる増殖因子

血小板溶解物由来の増殖因子に加えて、本発明の医薬組成物または本発明の血小板溶解物は、1つまたは複数の、さらなる、または外因性の増殖因子をさらに含んでよい。任意の増殖因子が存在してよい。

【 0 0 8 2 】

さらなる量の、1つまたは複数の、好ましくは全ての、PDGF、VEGF、FGF、EGF、TGF、特にTGF- β 、およびCTGFが、本発明の医薬組成物または本発明の血小板溶解物に加えられてよい。

【 0 0 8 3 】

本発明の医薬組成物または本発明の血小板溶解物は、1つまたは複数の抗生物質、鎮痛

10

20

30

40

50

剤または創傷清拭剤をさらに含んでよい。本発明の医薬組成物または本発明の血小板溶解物は、銀をさらに含んでよい。

【0084】

細胞

本発明の医薬組成物または本発明の血小板溶解物は、1つまたは複数の幹細胞をさらに含んでよい。これらは組成物の創傷治癒特性を助けることができる。幹細胞は、間葉系幹細胞(MSC)または造血性幹細胞であってよい。

【0085】

本発明の医薬組成物または本発明の血小板溶解物は、1つまたは複数の前駆細胞、単核細胞または内皮前駆細胞をさらに含んでよい。

10

【0086】

本発明の医薬組成物または本発明の血小板溶解物は、国際出願PCT/GB2012/051600に記載の中胚葉性系列の前駆細胞をさらに含んでよい。これらの細胞は、検出可能なレベルのCD29、CD44、CD73、CD90、CD105およびCD271を発現し、検出可能なレベルのCD14、CD34およびCD45を発現しない。

【0087】

組成物または溶解物に存在する任意の細胞は、好ましくは自家である。換言すれば、細胞は、好ましくは、細胞が投与される患者由来である。あるいは、細胞は、好ましくは同種異系である。換言すれば、細胞は、好ましくは、細胞が投与される患者に免疫学的に適合する患者由来である。

20

【0088】

定義

以下の定義は、本明細書中で頻繁に用いられる特定の用語の理解を助けるために提供されて、本開示の範囲を限定することを意図しない。

【0089】

「血小板溶解物」(別称「血小板放出物」)は、これらの血小板の溶解を経て放出される血小板中に含まれる天然の増殖因子の組み合わせを指す。

【0090】

「タンパク質」、「ペプチド」および「ポリペプチド」は、互換的に用いられて、アミノ酸ポリマー、または、2またはそれ以上の相互作用または結合のアミノ酸ポリマーのセットを意味する。

30

【0091】

「幹細胞」は、未分化で、細胞分裂を経て長時間、再生することが可能であり、特殊な機能を有する細胞になるように誘導可能な特性を有する任意の細胞を指す。

【0092】

「凍結乾燥」(別称、フリーズドライ、凍結乾燥または低温乾燥)は、脱水プロセスであり、典型的に、腐敗しやすい物質を保存し、または、物質の輸送をより便利にするために用いられる。フリーズドライは、物質を凍らせてから周囲の圧力を低下させて、物質中の凍結水を固相から気相に直接昇華させることにより作用する。組成物を凍結乾燥させる方法は、当技術分野で知られている。

40

【0093】

凍結乾燥

凍結乾燥は、結果として生じる物質がより保管しやすく、小さい空間に保管することができ、より扱いやすく、状況に応じて選択される製剤化(例えば、乾燥粉末、軟膏、懸濁液、溶液、ジェル、クリーム、または生体適合性、合成または天然の固体マトリックス)において適用することができて、最適な投与量で投与することができて、通常、より長い品質保持期間を有し、そして、最も活性である製剤を容易にスクリーニングすることができる点に利点がある。凍結乾燥された細胞抽出物の1つの利点は、抽出ゲルとは対照的に、必要であるまさにその瞬間に物質がすぐに利用可能であることである。

【0094】

50

また、本発明は、本発明の方法を用いて生産される血小板溶解物を提供し、ここで、前記血小板溶解物は凍結乾燥され、または凍結乾燥形状である。本発明は、さらに、本発明の方法を用いて生産される血小板溶解物の抽出物に関し、ここで、前記血小板溶解物は、凍結乾燥され、または凍結乾燥形状である。本発明の血小板溶解物を生産する方法は、血小板溶解物を凍結乾燥するステップをさらに含んでよい。血小板溶解物を凍結乾燥するのに適切な方法は、当技術分野で知られている。

【0095】

そのような抽出物は、従来の様式で形成することができる。用語「抽出物」は、ヒト細胞溶解物から得られた溶解物の産物を指し、その治療活性が維持されている。そのような抽出物は上述されている。血小板溶解物抽出物は、例えば、上述の凍結乾燥が後に続く血液細胞の溶解および/または破碎の後に調製することができる。

10

【0096】

そのような凍結乾燥組成物は、乾燥粉末として、軟膏で、懸濁液で、溶液で、ジェルで、クリームで、または生体適合性、合成または天然の固体マトリックスで適用することができて、状況に応じて選択されて、最適な投与量で投与される。

【0097】

本発明の医薬組成物は凍結乾燥され、または凍結乾燥形状であってよい。本発明の医薬組成物を生産する方法は、医薬組成物を凍結乾燥するステップをさらに含んでよい。医薬組成物を凍結乾燥するのに適切な方法は、当技術分野で知られている。

【0098】

薬剤、方法および治療用途

本発明の医薬組成物または本発明の血小板溶解物は、ヒトまたは動物の体の治療方法で用いてよい。したがって、本発明は、必要とする患者における創傷、肛門裂傷、膣萎縮または皺の治療での使用のための、本発明の医薬組成物または本発明の血小板溶解物を提供する。

20

【0099】

本発明はまた、必要とする患者における創傷、肛門裂傷、膣萎縮または皺を治療する方法であって、前記患者に、治療的有効量の本発明の医薬組成物または本発明の血小板溶解物を投与するステップを含む、方法を提供する。

【0100】

本発明は、治療的有効量の、本発明の医薬組成物または本発明の血小板溶解物の患者への投与に関する。治療的有効量は、創傷、肛門裂傷、膣萎縮または皺の1つまたは複数の症状を改善する量である。治療的有効量は、好ましくは、創傷、肛門裂傷、膣萎縮または皺を修復する量である。適切な量を以下により詳細に述べる。

30

【0101】

本発明の医薬組成物または本発明の血小板溶解物は、任意の適切な患者に投与してよい。患者は任意の哺乳類であってよい。患者は一般にヒト患者である、患者は、幼児、子どもまたは成人であってよい。患者は、典型的に、創傷、肛門裂傷、膣萎縮または皺を有することが知られている。

【0102】

本発明の医薬組成物または本発明の血小板溶解物を調製するために用いられる血小板は、好ましくは自家である。換言すれば、前記血小板は、好ましくは、本発明の医薬組成物または本発明の血小板溶解物が投与される患者由来である。あるいは、前記血小板は、好ましくは同種異系である。換言すれば、前記血小板は、好ましくは、本発明の医薬組成物または本発明の血小板溶解物が投与される患者に免疫学的に適合する患者由来である。

40

【0103】

治療で用いられる本発明の医薬組成物または本発明の血小板溶解物は、1つまたは複数の幹細胞または上述の中胚葉性系列の前駆細胞を含んでよい。また、上述のさらなる増殖因子を含んでもよい。

【0104】

50

本発明は、創傷、肛門裂傷、膣萎縮または皸を治療するため、または疼痛緩和するための、他の方法および物質と組み合わせて用いてよい。ある場合には、本発明の医薬組成物または本発明の血小板溶解物は、創傷、肛門裂傷、膣萎縮または皸を修復する、または疼痛緩和する目的の他の物質と同時に、連続して、または別々に投与してよい。本発明の医薬組成物または本発明の血小板溶解物は、創傷、肛門裂傷、膣萎縮または皸のための既存の治療と組み合わせて用いてよく、例えば、そのような治療と単に合わせてよい。このように、本発明は、既存の治療または化粧品の効能を高めるために用いてよい。

【0105】

医薬組成物および投与

本発明の医薬組成物および本発明の血小板溶解物は、調剤分野での常法を用いて、薬学的に許容できる担体および/または賦形剤とともに製剤化されてよい。製剤の正確な特性は、組成物または溶解物の特性および所望の投与経路を含む様々な因子に依存する。製剤の適切なタイプは、Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Edition, Mack Publishing Company, Eastern Pennsylvania, USAに全て記載されている。

10

【0106】

本発明の医薬組成物または本発明の血小板溶解物は、典型的に滅菌されている。

【0107】

本発明の医薬組成物または本発明の血小板溶解物は、任意の経路で投与されてよい。本発明の医薬組成物または本発明の血小板溶解物は、典型的に、創傷、肛門裂傷、膣萎縮または皸に局所的に投与される。

20

【0108】

本発明の医薬組成物または本発明の血小板溶解物は、生理的に許容できる担体または希釈剤とともに調製してよい。適切な担体または賦形剤は、例えば、水、生理食塩水、ブドウ糖、グリセロールなど、およびそれらの組み合わせである。凍結乾燥組成物または溶解物は、典型的に、治療的使用の前に再水和される。

【0109】

加えて、必要に応じて、本発明の医薬組成物または本発明の血小板溶解物は、少量の補助物質、例えば、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤、および/または効能を高めるアジュバントを含んでよい。そのような物質は、当技術分野で知られている。

30

【0110】

本発明の医薬組成物または本発明の血小板溶解物は、投与製剤に適合する様式で、治療的有効量で投与してよい。投与すべき量は、治療される対象、対象の免疫系の能力および所望の修復度合に依存する。投与が必要とされる正確な量は、熟練者の判断に依存し得て、対象ごとに特有であってよい。

【0111】

任意の適切な量の本発明の医薬組成物または本発明の血小板溶解物が、対象に投与されてよい。例えば、創傷、肛門裂傷、膣萎縮または皸を被覆するのに十分な量が、典型的に投与される。したがって、投与される実際の量は、創傷、肛門裂傷、膣萎縮または皸のサイズに依存する。例えば、投与される本発明の医薬組成物の量は、約0.1g~100gの範囲、例えば約0.5g~約75g、約1g~約50g、約2g~約20gまたは約3g~10gの範囲であってよい。

40

【0112】

本発明の医薬組成物または血小板溶解物は、そのいずれかは凍結乾燥形状であってよく、創傷に治療的に適用してよい。血小板の処理は、増殖因子を溶液中に放出し、凍結乾燥処理は、これらの因子からなる、安定化されて凍結乾燥された薬剤粉末を生産する。この凍結乾燥された医薬組成物または血小板溶解物は、異なる温度でよりいっそう長期の安定性で、臨床的な創傷患者の効果的な治療のために、他の技術と組み合わせることができる。これは、この治療の調製および輸送の物流プロセスを回避する。

【0113】

50

一実施態様は、乾燥した、本発明の凍結乾燥医薬組成物、または、乾燥した、凍結乾燥血小板溶解物である。治療の直前に水と混ぜると、ゲル様の粘度が形成される。

【0114】

他の実施態様では、本発明の医薬組成物または本発明の血小板溶解物は、代わりに、異なる以下のものと組み合わせることができる：

【0115】

・以下のような製剤/送達方法：

ローション、シェイクローション、クリーム、軟膏、ジェル、フォーム、経皮パッチ、粉末、固体、スポンジ、テープ、ペースト、絆創膏、ガーゼ、シリンジ、スプレー

【0116】

・以下のような処理：

間葉系幹細胞、造血性幹細胞、単核細胞、内皮前駆細胞、中胚葉性前駆細胞、抗生物質、鎮痛剤、銀、創傷清拭剤、医療機器

【0117】

・以下のようなパッケージ方法：

滅菌パッケージ、瓶、箱、缶

【0118】

・保管方法

理想的に室温粉末；必要に応じて冷蔵または冷凍される。

【0119】

なお、本発明は、さらに、好ましくは凍結乾燥形状であり、例えばヒト皮膚などの皮膚の表面創傷の治療を促進するために用いることができる、上記で定義された抽出物を活性物質として含む医薬組成物に関する。当該医薬組成物は、好ましくは、表面創傷上への適用に適切な製剤中に、凍結乾燥された抽出物を含む。そのような製剤は、乾燥粉末として、または、ジェル、クリーム、軟膏、懸濁液、溶液、または、生体適合性、合成または天然の固体マトリックスの形状のいずれかで、表面創傷上に直接適用することができ、それらはいずれも、従来の様式で、必要に応じて、従来の薬学的に許容できる賦形剤および添加剤とともに調製することができる。通常、凍結乾燥された抽出物は、治療されるべき表面創傷のタイプおよび組成物が用いられる状況に依存する濃度で、そのような組成物に組み込まれる。例えば、本発明の、凍結乾燥された血小板溶解物の抽出物は、 1 cm^2 あたりの、創傷治療のための活性物質の量が、製剤中に見られる活性物質の量と同等であるような濃度で適用することができる。

【0120】

創傷

本発明に従って治療される創傷は、好ましくは皮膚創傷である。皮膚創傷は、好ましくは潰瘍である。

【0121】

本発明の医薬組成物または血小板溶解物で治療することができる創傷のタイプの例は、限定されないが、熱、化学、電気および放射線で誘導される、皮膚火傷；網状皮膚自家移植片で被覆された火傷、全体的厚みおよび部分的厚みの機械的創傷、例えば切開、擦傷および裂傷を含み；これらのタイプの創傷はまた、皮膚における手術および切除の創傷；皮膚の様々な潰瘍化、例えば、床擦れ、静脈性および動脈性の潰瘍、および糖尿病および血管炎などの基礎疾患に起因する潰瘍；角膜の創傷；鼓膜の病変；および水疱性類天疱瘡、表皮水疱症および紅斑性狼瘡などの病状に起因する病変を含む。

【0122】

本発明はなお、さらに、本発明の医薬組成物を創傷の表面に適用することによる、（例えばヒト皮膚などの皮膚における）表面創傷の治療の促進に関する。

【0123】

肛門裂傷

肛門裂傷は、肛門管の皮膚での切れや裂けである。そのような裂け目は、本発明の医薬

10

20

30

40

50

組成物または本発明の血小板溶解物を裂け目に適用することにより治療され得る。

【0124】

膣萎縮

萎縮性膣炎（膣萎縮または泌尿生殖器萎縮としても知られる）は、組織の菲薄化と収縮、および潤滑性の減少に起因する膣（および尿路外側）の炎症である。それは典型的に、エストロゲンホルモンの分泌の減少に起因する。萎縮は、本発明の医薬組成物または本発明の血小板溶解物を局所的に適用することにより治療され得る。

【0125】

皸

本発明に従って治療される皸は、典型的に、皮膚の皸である。皸は、本発明の医薬組成物または本発明の血小板溶解物を皸に適用することにより治療され得る。

10

【0126】

以下の実施例が本発明を説明する。

【実施例】

【0127】

（実施例1）血小板溶解物

全血サンプルを採取して、溶解プロセスをモニターするための手段として、血小板の数の分析のために保存した。全血を遠心分離して（120 × g、15分、連続的に、室温）血小板を、残りの血液細胞から分離した。血小板は最終的に、残存する血液細胞の暗赤色柱の上部に存在した、多血小板血漿（PRP）として知られる黄色い血漿になった。

20

【0128】

PRPの小サンプルを保存して血小板を分析した。血小板がより少ない容量中に濃縮されているので、血小板濃度は、全血と比較して、より高いことが示された。血漿の量は個人間で異なるが、性別に関連があり、例えば、量は男性でより少なく、したがって、PRPと比較した全血中の血小板濃度は、男性において、より増加した。

【0129】

PRPを別容器、例えば50mlチューブに移して、それから、液体窒素（-196）中に、凍るまでまたは5分間浸漬した。その後、PRPが融解するまで、チューブを37の水浴、またはインキュベーターなどの他の熱源に移した。これは、1回の液体窒素凍結/融解サイクルと称された。このサイクルを、さらに3回、合計で4回の凍結/融解サイクルを繰り返した。これらのサイクルの後、結果として生じた産物は、4回の凍結/融解サイクルを経て生産されたC4PL（血小板溶解物）と称された。分析すると、これにはPRP中の最初の血小板の数の約5%が含まれていた。C4PLは、血小板デブリのゲル塊を含んでいて、それは、C4PLを新しいチューブに移すことにより（重いゲル塊がチューブの底に落ちる）、または、遠心分離することにより（3200 × g、20分、休憩有）、および、上清を用いることにより、除去することができる。また、C4PLは、顕微鏡下で見ることのできる微小なデブリも含んでいた。

30

【0130】

（実施例2）血小板溶解物ゲル

実施例1のようにして調製された血小板溶解物を、目盛り付き滅菌ファルコンチューブ中に移した。既に冷凍されていたならば、血小板溶解物を室温でまず解凍した。血小板溶解物に、グルコン酸カルシウムおよび血漿またはトロンピンを適切な比率で加えた。血漿が既に冷凍されていたならば、使用前に37で解凍した。本明細書で用いられた適切な比率は以下を含む：例えば、1：5部の血小板溶解物、2部の血漿、2部のグルコン酸カルシウム；および、例えば、2：3部の血小板溶解物、1部のトロンピン、および0.5部のグルコン酸カルシウム。結果として生じた懸濁液を、注意深くゆっくり振とうに供して、10 ~ 12 × 360°チューブの回転を完了させて、それから、滅菌分取デバイス中にサイズで分画した。デバイスは、シリンジおよびマイクロニードルディスペンサーを含んだ。ある場合には、サイズによる分画は、治療されるべき潰瘍のサイズおよび形状に従って決定した。

40

50

【 0 1 3 1 】

(実施例 3) 血小板溶解物ゲルの有用性

腔萎縮の治療について：約 1 0 0 0 c p s の粘度を有する 2 ~ 1 0 m l の血漿溶解物ゲルを、腔内に、毎日または一日おきに 1 ~ 2 週間適用した。症状が再発したら、これを 1 週間繰り返した。

【 0 1 3 2 】

5 m m の直径の糖尿病性足部潰瘍の治療について：7 0 , 0 0 0 - 1 0 0 , 0 0 0 c p s の粘度を有する 2 ~ 3 m l の血漿溶解物ゲルを、潰瘍に局所的に、一日おきに毎日、2 ~ 3 週間適用した。

[参考文献]

1. Fisher, G.J., J. Varani, and J.J. Voorhees, Looking older: fibroblast collapse and therapeutic implications. *Archives of dermatology*, 2008. 144(5): p. 666.
2. *JAMA* 293:217-228, 2005;
3. *Diabetes Care* 22:157-162, 1999.
4. *J Invest Dermatol.* 2007 May;127(5):1018-29.
5. *Clinical Diabetes Spring* 2009 vol. 27 no. 2 52-58.
6. *Adv Skin Wound Care.* 2008 Dec;21(12):568-75.
7. UK NIHR Health Technology Assessment: Randomised controlled trial of three dressing preparations (2009).
8. Schott, M. *Cosmetics >> Skin Basics.* [cited 2011 06 Sep]; Available from: <http://www.moritexcosmetics.com/index.php/skin-basics/>.
9. Systems, R.D. *Minireviews - Matrix Metalloproteinases (MMPs).* 1999 [cited 2011 06 Sep].
10. Bornstein, P., The biosynthesis of collagen. *Annual Review of Biochemistry*, 1974. 43(1): p. 567-603.
11. Siegel, R., Lysyl oxidase. *International review of connective tissue research*, 1979. 8: p. 73
12. DeGroot, J., et al., Accumulation of advanced glycation end products as a molecular mechanism for aging as a risk factor in osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 2004. 50(4): p. 1207-1215.
13. Page-McCaw, A., A.J. Ewald, and Z. Werb, Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007. 8(3): p. 221-233.
14. Lapière, C.M., Tadpole collagenase, the single parent of such a large family. *Biochimie*, 2005. 87(3-4): p. 243-247.
15. Fisher, G.J., et al., Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature*, 1996. 379(6563): p. 335-339.
16. Monnier, V.M., et al., Cross Linking of the Extracellular Matrix by the Maillard Reaction in Aging and Diabetes: An Update on "a Puzzle Nearing Resolution". *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2005. 1043(1): p. 533-544.

10

20

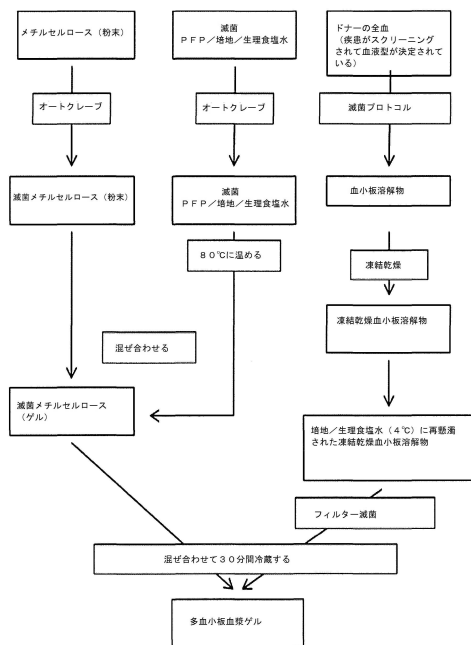
30

40

- 17. Rittié, L., et al., Decreased contraction of glycated collagen lattices coincides with impaired matrix metalloproteinase production. Biochemical and biophysical research communications, 1999. 264(2): p. 488-492.
- 18. Vater, C., E. Harris Jr, and R. Siegel, Native cross-links in collagen fibrils induce resistance to human synovial collagenase. Biochemical Journal, 1979. 181(3): p. 639.
- 19. Fisher, G.J., et al., Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. New England Journal of Medicine, 1997. 337(20): p. 1419-1429.
- 20. Telgenhoff, D. and B. Shroot, Cellular senescence mechanisms in chronic wound healing. Cell Death Differ, 2005. 12(7): p. 695-8.
- 21. J Invest Dermatol. 2007 May;127(5):1018-29.
- 22. U.S. Pat. No. 5,198,357: Preparation of a blood platelet lysate for use in a cell culture medium for hybridoma cells.
- 23. Vox Sang. 2009 Aug;97(2):110-8. Epub 2009 Apr 9.
- 24. Biologicals, Volume 39, Issue 2, March 2011, Pages 73-80.

10

【図1】



【図2】

治療時間 (分)	アレルギー	治療あたりの費用	治療 ²	総費用
15	可能性有り	約1,000ドル	6	約6,000ドル
30	無し	約2,000ドル	3	約6,000ドル
15	無し	約1,000ドル	1	約1,000ドル

分子：皮膚充地剤および各種因子

自家細胞療法：多血小板血漿または血小板共細胞

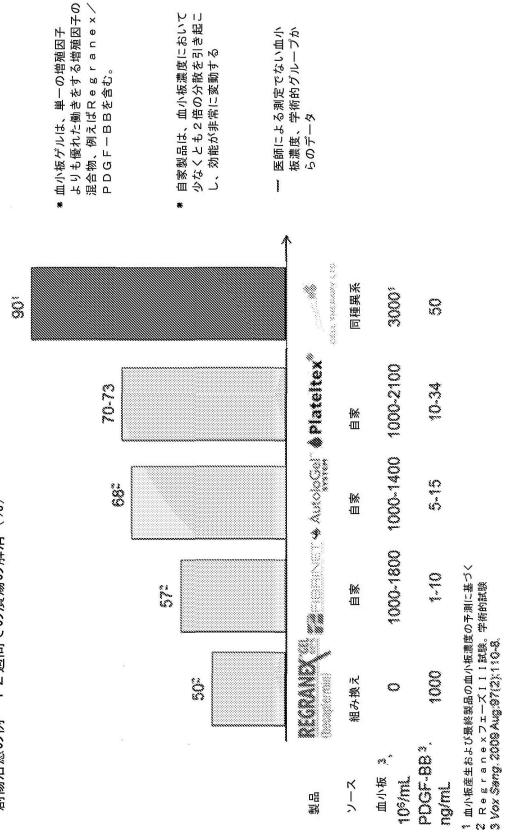
細胞療法原料物：血小板および増殖因子を含む培養化製品

1st 世代: RIGRANDX, RABINSE
2nd 世代: MyCells, SELPHYL
3rd 世代: GENE THERAPY 1378

CTLの減減少プラットフォーム

【図3】

創傷治癒の例 1 2 週間での潰瘍の解消 (%)



- 血小板ゲルは、単一の増殖因子よりも優れた働きをする増殖因子の混合物、例えばRegranex/PDGF-BBを含む。
- 自家製品は、血小板濃度において少なくとも2倍の分散を引き起こし、効率が非常に変動する

医師による測定でない血小板濃度、学術的グループからのデータ

【図5】

血小板療法品質管理

品質管理の3段階:

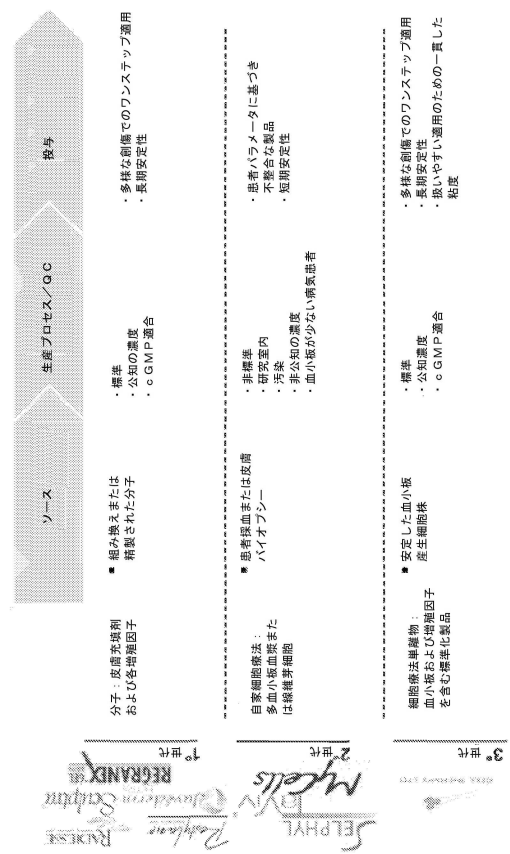
- ソース**: 患者の健康状態に応じて可変の血小板の数および質に交換された自家ソース
- 生産**: マルチステップ、研究室内操作、および無菌性は、変動性、エラーおよび潜在的汚染を生じる
- 機能試験**: N/A

Plateletex Autologel System (Cytomatrix) の品質管理:

- インビトロの血小板の品質管理されたソースは、高品質で汚染のない血小板を確実にものにする
- 製品の構成要素の正確な定量化は、標準化製品を確実なものにする
- 自動CELS (Electric Cell-substrate Impedance Sensing) 創傷治癒アッセイ

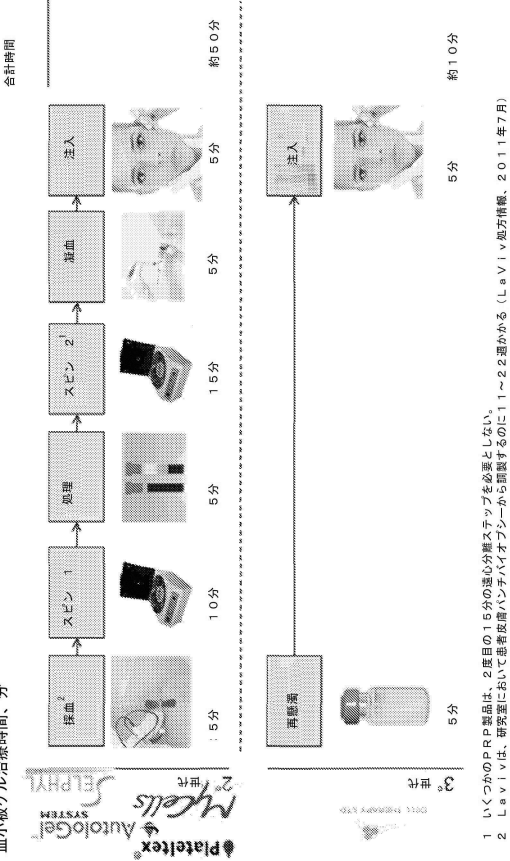
【図4】

CTLの賦減少プラットフォーム



【図6】

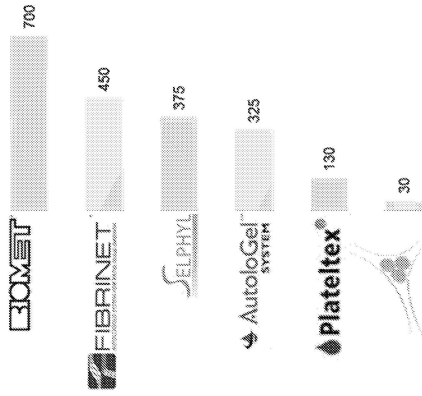
血小板ゲル治療時間、分



1 いくつかのPRP製品は、2度目の15分の遠心分離ステップを必要としない。
 2 LaVivは、研究室において患者皮膚パンチバイオプシーから調製するのに1~22分かかる (LaViv 処方情報, 2011年7月)

【 7 】

治療あたりの費用、米ドル



・CTLの同種系との連続投与された血小板溶解物を血管から取り出して、およそ5分で投与する

・1回の治療あたり30ドルの費用になると見積もられる

・ストリンジユニットな機器と線分針に起因して、CTLの製造プロセスは、有害により高い効率を有することが期待される

CELL THERAPY LTD

- 1 生涯コストは、治療する時間および経済的効果を考慮して、治療、重症の感染、切断術を減らすコストを含む
- 2 GALY=質調整生存年

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K 47/38	(2006.01)	A 6 1 K 47/38
A 6 1 K 47/34	(2017.01)	A 6 1 K 47/34
A 6 1 K 47/14	(2006.01)	A 6 1 K 47/14
A 6 1 K 9/06	(2006.01)	A 6 1 K 9/06
A 6 1 P 15/02	(2006.01)	A 6 1 P 15/02
A 6 1 P 17/00	(2006.01)	A 6 1 P 17/00
A 6 1 P 17/02	(2006.01)	A 6 1 P 17/02

- (31)優先権主張番号 1120231.4
 (32)優先日 平成23年11月23日(2011.11.23)
 (33)優先権主張国 英国(GB)
 (31)優先権主張番号 1120235.5
 (32)優先日 平成23年11月23日(2011.11.23)
 (33)優先権主張国 英国(GB)

(73)特許権者 514002662

セル セラピー リミテッド

CELL THERAPY LIMITED

英国 エスエー2 8ピーピー シングルトン パーク スウォンジ スウォンジ ユニバーシティー スクール オブ メディシン ルーム 137 ファースト フロアー インスティテュート オブ ライフ サイエンス(番地なし)

Institute of Life Sciences First Floor, Room
 137 School of Medicine Swansea University S
 ingleton Park Swansea SA2 8PP United Kingdom

(74)代理人 100113376

弁理士 南条 雅裕

(74)代理人 100179394

弁理士 瀬田 あや子

(74)代理人 100185384

弁理士 伊波 興一朗

(72)発明者 ハウゼ トーマス アヴェレル

スウェーデン王国 エス-504 38 ボラス スカンガタン 16

(72)発明者 エヴァンズ マーティン ジョン

英国 シーエフ15 8ピーキュー ラディル カーディフ モイクレア ウィンザー ロード

(72)発明者 レジナルド アジャン

英国 シーヴィ37 7イーイー ウォリックシャー ストラトフォード-アボン-エイヴォン
 フェルドン ウェイ 5

(72)発明者 ピーパー イーナ ローラ

英国 エスエー3 5エーユー スウォンジ ベイズウォーター コート 3

(72)発明者 パーキンス ブライアン リー

英国 エスエー3 5エーユー スウォンジ ベイズウォーター コート 3

審査官 佐々木 大輔

(56)参考文献 特開2008-246200(JP,A)

特開2011-219428(JP,A)

J. Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2010, Vol.14, No.36, pp.6764-6

767

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

A 6 1 K 3 5 / 0 0 - 3 5 / 7 6 8

A 6 1 K 9 / 0 0 - 9 / 7 2

A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 4 8

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)