

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-508501

(P2016-508501A)

(43) 公表日 平成28年3月22日(2016.3.22)

(51) Int.Cl.

A61K 35/14 (2015.01)
A61K 31/7068 (2006.01)
A61K 31/52 (2006.01)
A61K 31/19 (2006.01)
A61K 33/42 (2006.01)

F 1

A 6 1 K 35/14
A 6 1 K 31/7068
A 6 1 K 31/52
A 6 1 K 31/19
A 6 1 K 33/42

テーマコード(参考)

2 G 04 5
4 C 08 6
4 C 08 7
4 C 20 6

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-556127 (P2015-556127)
(86) (22) 出願日 平成26年1月30日 (2014. 1. 30)
(85) 翻訳文提出日 平成27年9月30日 (2015. 9. 30)
(86) 國際出願番号 PCT/US2014/013845
(87) 國際公開番号 WO2014/120919
(87) 國際公開日 平成26年8月7日 (2014. 8. 7)
(31) 優先権主張番号 13/756, 116
(32) 優先日 平成25年1月31日 (2013. 1. 31)
(33) 優先権主張国 米国(US)
(31) 優先権主張番号 13/844, 773
(32) 優先日 平成25年3月15日 (2013. 3. 15)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 515210684
バイオメット バイオロジクス, リミティド ライアビリティ カンパニー アメリカ合衆国, インディアナ 46582, ワルシャウ, イースト ベル ドライブ 56
(74) 代理人 100099759
弁理士 青木 篤
(74) 代理人 100077517
弁理士 石田 敏
(74) 代理人 100087871
弁理士 福本 積
(74) 代理人 100087413
弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】赤血球を回復させるための方法

(57) 【要約】

哺乳類被験体に対して輸血するための方法、使用、及びシステム。該方法は、献血された赤血球(RBCs)の量を得る工程、処理された血液組成物を形成するために、イノシンを含む等の増強組成物をRBCへと添加する工程、インキュベートされた赤血球組成物を形成するために処理された血液をインキュベートする工程、該インキュベートされた血液組成物を患者へと投与する工程、を含む。いくつかの実施形態において、該方法は、ポイントオブケアにて実施される。実施形態は、血液の単位を得る工程、増強組成物にて該血液を回復させる工程、血液の2,3-DPG濃度を測定する工程、及び被験体へと該血液を届ける工程を含む。使用は、哺乳類被験体において、減少された組織酸素化によって特徴づけられた虚血又は疾患の治療のための増強組成物の使用を含む。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

哺乳類被験体に対して輸血するための方法であって、該方法は、ポイントオブケアにおいて、以下の工程；

(a) 赤血球量に増強組成物を添加し、処理された赤血球組成物を形成する工程であって、ここで、増強組成物は、イノシン、アデニン、ピルビン酸塩、リン酸ナトリウム、及びこれらの混合物からなる群から選択される、回復させる物質を含む；

(b) 該処理された赤血球組成物をインキュベートし、インキュベートされた赤血球組成物を形成する工程であって、好適には、ここで、該インキュベートが、約35～40の温度にて約30分～約90分であって；及び、

(c) 該インキュベートされた赤血球組成物を、該被験体へと投与する工程、を含む方法。

10

【請求項 2】

該増強組成物は、以下：

(i) 約25g/L～約30g/L、好適には27g/Lのイノシン；

(ii) 約0.2g/L～約2g/Lのアデニン；

(iii) 約5g/L～約15g/L、好適には約11g/Lのピルビン酸塩、及び

(iv) 約17g/L～約23g/L、好適には約21g/Lのリン酸ナトリウムを含む、請求項1に記載の輸血するための方法。

【請求項 3】

該赤血球の量が、該添加する工程の前に、保存温度にて保存された、請求項1又は2に記載の輸血するための方法。

20

【請求項 4】

該赤血球は、該添加する工程の前に、白血球が除去されていた、請求項1～3のいずれか1項に記載の輸血するための方法。

【請求項 5】

該赤血球は、被験体に対して自己(autologous)である、請求項1～4のいずれか1項に記載の輸血するための方法。

【請求項 6】

さらに、投与する前に、該インキュベートされた赤血球組成物を洗浄する工程を含む、請求項1～5のいずれか1項に記載の輸血するための方法。

30

【請求項 7】

添加する工程、インキュベートする工程、及び投与する工程は、連続したプロセスにて実施される、請求項1～6のいずれか1項に記載の輸血するための方法。

【請求項 8】

該被験体は、組織の減少した酸素化によって特徴づけられる疾患を患う被験体である、請求項1～7のいずれか1項に記載の輸血するための方法。

【請求項 9】

哺乳類被験体における減少された組織の酸素化によって特徴づけられる疾患の治療のための、増強組成物の使用であって、

40

該増強組成物は、約25g/L～約30g/Lのイノシンを含み；及び

該使用は、ポイントオブケアにおいて、以下：

(a) 該被験体から赤血球の量を得る工程、

(b) 該赤血球に赤血球(RBC)増強組成物の量を添加し、処理された血液組成物を形成する工程であって、ここで、増強組成物は、イノシン、アデニン、ピルビン酸塩、リン酸塩、及びそれらの混合物からなる群から選択される回復させる物質を含み；

(c) 該処理された血液組成物をインキュベートし、インキュベートされた赤血球組成物を形成する工程；及び

(d) 該被験体へ該処理された血液組成物を投与する工程、を含む使用。

50

【請求項 10】

該増強組成物は、さらに、以下：

- (i) 約 0 . 2 g / L ~ 約 2 g / L のアデニン；
 - (i i) 約 5 g / L ~ 約 1 5 g / L のピルビン酸塩；及び
 - (i i i) 約 1 7 g / L ~ 約 2 3 g / L のリン酸塩
- を含む、請求項 9 に記載の使用。

【請求項 11】

さらに、該投与する工程の前に、該インキュベートされた赤血球組成物を洗浄する工程を含む、請求項 9 又は 10 に記載の使用。

10

【請求項 12】

該疾患は、減少した組織酸素化によって特徴づけられる、請求項 9 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 13】

該添加工程、該インキュベーション工程、及び該洗浄工程は、静脈内カテーテルと流体連通した閉鎖系システムにて連続的に処理が実行される、請求項 9 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 14】

該使用は、該赤血球における 2 , 3 - DPG 及び ATP の濃度を増加する、請求項 9 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の使用。

20

【請求項 15】

該疾患は、敗血症、敗血症性ショック、上部消化管出血 (UGIB) 、貧血症、重度外傷、心臓発作又は脳卒中である、請求項 9 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 16】

新鮮な血液の代謝機能を改善するための方法であって、以下：

- (a) 哺乳類被験体から新鮮な赤血球の量を得る工程、
 - (b) 該新鮮な赤血球の量に増強組成物を添加し、処理された血液組成物を形成する工程、
 - (c) 該処理された血液組成物をインキュベートし、インキュベートされた赤血球組成物を形成する工程；
 - (d) 該インキュベートされた赤血球組成物を遠心分離して、赤血球の沈殿物及び上清を形成する工程、
 - (e) 該赤血球の沈殿を単離する工程；及び、
 - (f) 該赤血球の沈殿を添加溶液中に懸濁し、赤血球懸濁液を形成する工程、
- を含む方法。

30

【請求項 17】

遠心分離する工程の前に、洗浄液で該インキュベートされた赤血球組成物を希釈する工程を、さらに含む、請求項 16 に記載された血液の代謝機能を改善するための方法。

【請求項 18】

工程 (b) から (f) は、静脈内カテーテルと流体連通した自動の閉鎖系システムにおいて、連続した工程にて実施される、請求項 16 又は 17 に記載の該血液の代謝機能を改善するための方法。

40

【請求項 19】

工程 (b) から (f) は、静脈内カテーテルと流体連通した、自動の閉鎖系システムにおいて連続した工程によって実施される、請求項 18 に記載の該血液の代謝活性を改善するための方法。

【請求項 20】

該増強組成物は、以下：

- (i) 約 2 5 g / L ~ 約 3 0 g / L のイノシン；
- (i i) 約 0 . 2 g / L ~ 約 2 g / L のアデニン；
- (i i i) 約 5 g / L ~ 約 1 5 g / L のピルビン酸塩；及び

50

(i v) 約 17 g / L ~ 約 23 g / L のリン酸ナトリウム

を含む、請求項 16 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の、該代謝機能を改善するための方法。

【請求項 21】

該方法は、該赤血球中の 2 , 3 - DPG 及び ATP の濃度を増加する、請求項 16 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の該血液の代謝機能を改善するための方法。

【請求項 22】

哺乳類被験体において、減少された組織の酸素化によって特徴づけられた疾患の治療のための、増強組成物の使用であって、

該増強組成物は、約 25 g / L ~ 約 30 g / L のイノシンを含み；及び

該使用は、ポイントオブケアにおいて、以下：

(a) 赤血球の量に対して増強組成物を添加し、処理された赤血球組成物を形成する工程であって、ここで、増強組成物は、イノシン、アデニン、ピルビン酸塩、リン酸塩、及びそれらの混合物からなる群から選択される回復させる物質を含み；

(b) 該処理された赤血球組成物をインキュベートし、インキュベートされた赤血球組成物を形成する工程であって、好適には、ここで、該インキュベートが、約 35 ~ 40 の温度にて約 30 分 ~ 約 90 分であって；及び、

(c) 該インキュベートされた赤血球組成物を、該被験体へと投与する工程、
を含む使用。

【請求項 23】

該組成物は、さらに以下：

(i) 約 0 . 2 g / L ~ 約 2 g / L のアデニン；

(i i) 約 5 g / L ~ 約 15 g / L のピルビン酸塩；及び

(i i i) 約 17 g / L ~ 約 23 g / L のリン酸ナトリウム

を含む、請求項 22 に記載の使用。

【請求項 24】

ヒト又は他の哺乳類被験体における虚血を治療する又は防止するための、増強組成物の使用であって、

該増強組成物は、約 25 g / L ~ 約 30 g / L のイノシンを含み；及び

該使用は、以下：

(a) 該被験体から血液の量を得る工程；

(b) 血液の分離を行う工程であって、ここで、血漿及び白血球は該被験体へと届けられ、及び赤血球は単離され；

(c) 回復させられた赤血球を形成するために、該赤血球を増強組成物で回復する工程；及び、

(d) 該赤血球を該被験体へと届ける工程、
を含む、使用。

【請求項 25】

該組成物は、さらに、以下：

(i) 約 0 . 2 g / L ~ 約 2 g / L のアデニン；

(i i) 約 5 g / L ~ 約 15 g / L のピルビン酸塩；及び

(i i i) 約 17 g / L ~ 約 23 g / L のリン酸ナトリウム、

を含む、請求項 24 に記載の使用。

【請求項 26】

さらに、回復させられた赤血球に対して診断テストを実施する工程を含み、ここで、診断テストは回復させられた赤血球中の 2 , 3 - DPG 又は ATP の量濃度を測定する、請求項 24 又は請求項 25 に記載の使用。

【請求項 27】

該診断テストは、血液の単位と物理的に取り付けられたデバイスによって実施される、
請求項 26 に記載の使用。

【請求項 28】

10

20

30

40

50

該診断テストは、タグ、チップ、ガラスプレート、又は妊娠試験型ストリップの上に血液のサンプルを回収する工程を含む、請求項27に記載の使用。

【請求項29】

さらに、2,3-DPG及び/又はATPの正常レベル又はより高いレベルに達するまで、該被験体に投与するために必要な回復させられた血液の量を算出する工程を含む、請求項24~28のいずれか1項に記載の使用。

【請求項30】

該方法は、被験体の手術を見込んで実施される、請求項24~29のいずれか1項に記載の使用。

【請求項31】

該赤血球を回復させることで、結果として、赤血球2,3-GDP濃度が約15 $\mu\text{mol}/\text{gHb}$ より大きくなる、請求項24~30のいずれか1項に記載の使用。

10

【請求項32】

必要に応じて、ヒト又は他の哺乳類被験体の虚血を治療するための、増強組成物の使用であって、

増強組成物は、約25g/L~約30g/Lのイノシンを含み；及び
該使用は、以下；

- (a) 血液の単位を得る工程；
- (b) 回復させられた血液を形成するために、該血液と増強組成物とを接触させる工程；
- (c) 2,3-DPG及び/又はATPの濃度を決定するために、回復させられた血液の診断テストを実施する工程；
- (d) 2,3-DPG及び/又はATPの正常レベル又はそれより高いレベルに達するまで被験体に投与するために必要な回復させられた血液の量を算出する工程；及び
- (e) 被験体に対して回復させられた血液の量を投与する工程、
を含む、使用。

20

【請求項33】

該組成物は、さらに、以下：

- (i) 約0.2g/L~約2g/Lのアデニン；
- (ii) 約5g/L~15g/Lのピルビン酸塩；及び
- (iii) 約17g/L~約23g/Lのリン酸ナトリウム、
を含む、請求項32に記載の使用。

30

【請求項34】

該血液の単位は、被験体に対して自己である、請求項32又は請求項33に記載の使用。
。

【請求項35】

該診断テストはチップ上で実施される、請求項32~34のいずれか1項に記載の使用
。

40

【請求項36】

該使用は、手術を見込んで実施される、請求項32~35のいずれか1項に記載の使用
。

【請求項37】

輸血を実施する方法であって、以下：

- (a) 血液の単位を得る工程、
- (b) 該血液中の2,3-DPG濃度を決定するために、該血液の単位の診断テストを実施する工程、
- (c) 仮に、2,3-DPG濃度が約10 $\mu\text{mol}/\text{L}/\text{gHb}$ より低ければ、該血液を回復させる工程；及び
- (d) 必要に応じて、被験体へ該血液を届ける工程、
を含む、方法。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】**【0001】****序論**

本開示は、血液を哺乳類の被検体へ輸血するための方法、及び該方法を用いた使用のためのシステムに関する。

【背景技術】**【0002】**

輸血は、多くの傷害者や怪我人の治療、例えば、事故犠牲者の治療や外科的処置中などで、重要な態様である。現在のアメリカ赤十字の統計によると、アメリカ合衆国単独において、年間500万人が輸血を受けている。一人の事故犠牲者は、100パントもの血液を必要としうる。このように、血液若しくは血液製品の収集と分配は、ヘルスケアシステムの重要な部分である。一般的に、血液はドナーから採取され、そして処理され、保存される；保存された血液又は血液製剤の単位は、必要に応じて保管から取り出され、必要とする患者に輸血される。いくつかの場合において、血液は、手術中又は手術後の輸血で彼又は彼女自身の血液を輸血することが予測される個人が献血する、自己献血の可能性もある。

【0003】

献血された血液は、一般的には構成成分へと処理され、必要とされるまで保管庫で保存される。短期間の保管は、6週間、可能であるが、血液又は血液成分は凍結されることができ、10年もの間、保存可能である。残念ながら、赤血球(RBCs)の保存は、「保存損傷」と関連があり、エネルギー産生、酸素運搬能力、酸化還元状態、及び構造的/膜の完全性が変化する。例えば、保存されたRBC中のアデニン三リン酸(ATP)濃度は、経年に減少する。ATPは、細胞によって様々な酵素的反応を触媒するために使用されるエネルギー源であるだけでなく、強力な血管拡張因子である、一酸化窒素(NO)を内皮細胞に放出させるシグナルを送る。加えて、RBC内の2,3-ジホスホグリセリン酸(2,3-DPG)は、保存14日後に有意に減少され、保存21日後にはたびたび検出されない。2,3-DPGは、脱酸素化ヘモグロビンと相互作用することによって酸素を放出するRBCの能力を増強し、それによってヘモグロビンに結合された残存した酸素の放出を促進する。そのため、ATPと2,3-DPGのレベルの低下とともに、組織を酸素化するRBCの能力は、激しく損なわれる。

【0004】

患者に対して投与する前にRBCを回復させるために、血液は、2,3-DPGとATPの細胞内濃度を増加する物質を含む増強組成物とともにインキュベートされること出来、それによって組織を酸素化するRBCの能力を改善する。このような増強組成物は、一般的には、1又は数個の活性物質、例えば、イノシン、アデニン、ピルビン酸ナトリウム及びリン酸ナトリウム(二塩基性及び一塩基性)等を含む。有益な増強組成物は、1991年以来、サイトゾル ラボラトリーズ社(現 Citra Labs, LLC)によって販売されているレジュベゾル(登録商標)赤血球プロセッシング溶液(レジュベゾル(登録商標)溶液)である。

【0005】

このような成分がRBCの代謝活性の改善に対して効果的である一方、有効性を改善する組成物や方法を開発する要求が残っている。さらに、このような成分は、ある疾患を治療する医療処置中、とりわけ有用でありうることが発見されている。

【発明の概要】**【0006】****要約**

本技術は、哺乳類被検体に対する輸血のための方法を提供し、減少した組織の酸素化に関連した疾患の治療のための方法を含む。該方法は、赤血球の量(volume)に、赤血球代謝増強組成物(本明細書中、「増強組成物」)を添加し、処理された血液組成物をインキュベートし、そして哺乳類被検体に対して該インキュベートされた血液組成物を投与する

10

20

30

40

50

ことを含む。いくつかの実施形態において、該インキュベートされた血液組成物は、被検体に投与する前に洗浄される。いくつかの実施形態において、方法は、被検体に投与する前に、血液中における $2,3\text{-DPG}$ 及びATP濃度の1つ又は両方を測定することをさらに含む。

【0007】

本方法の態様、例えば、赤血球に対する洗浄や増強組成物を添加する工程等は、哺乳類被検体に対して、ポイントオブケアにて実施されうる。このようなプロセスは、ポイントオブケアにて被検体に隣接したシステムを使用し、流体連通して連続的であってもよい。

【0008】

方法は、血液がドナーから採取された直後及び、保存前に実施されることができ、又は、該方法は、血液が保存から除かれた後であって、被検体に対して投与する直前に実施されることができる。該方法が実施される前、血液は赤血球濃縮物(RBCC)にするために処理されうる、又は、白血球除去RBCを生成するために白血球が除かれうる。

10

【0009】

本技術は、ポイントオブケアにて被検体に対してRBCを輸血するための方法も提供するものであって、献血されたRBCの量を得ること、処理された血液組成物を形成するために献血されたRBCの量に対して増強組成物を添加すること、インキュベートされたRBC組成物を形成するために処理された血液組成物をインキュベートすること、希釈されたRBC組成物を形成するために洗浄液で該インキュベートされたRBC組成物を希釈すること、該希釈されたRBC組成物を遠心分離すること、RBCの濃縮物(つまり、ペレット)と上清を形成すること、及び、被検体へインキュベートされた血液組成物を投与すること、を含んでいる。洗浄後、該洗浄されたRBC組成物はRBCの濃縮物と上清を形成するために遠心分離されうる。上清は取り除かれ、濃縮物は、再懸濁されたRBC組成物を形成するために、添加溶液とともに混合されうる。

20

【0010】

様々な実施態様において、方法は、ヒト又は他の哺乳類被検体由来の血液の量を得ること、赤血球を単離するために血液を分離すること、回復させた血液を形成するために増強組成物で該赤血球を回復させること、該回復させた血液中の $2,3\text{-DPG}$ 濃度を測定すること、 $2,3\text{-DPG}$ の正常又はより高いレベルまで、被験体に投与するために必要な回復させられた血液の量を算出すること、及び、該被検体に回復させられた血液を投与すること、を含む。このような方法は、ポイントオブケアで実施されてもよい。分離した後に残っている血液の分画は、被検体に投与されてもよく、又は、回復後の赤血球を懸濁するために使用されてもよい。

30

【0011】

本技術の方法は、虚血障害を患っている哺乳類被検体に対して処置された血液を投与することを含む。例えば、増強組成物で処理された血液は、例えば手術等の虚血イベントを見込んで、被検体に対して投与されてもよい。

40

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】図1は、輸血のための代表的な方法の図表の例である。

【0013】

【図2】図2は、血液の代謝機能を改善するための装置の図表の例である。

【0014】

【図3】図3は、血液の診断及び回復を実行するための代表的な方法の図表の例である。

【0015】

本明細書中に記載された図は、ある実施形態の記述の目的のために、本技術の人々の間における、装置、物質及び方法の普遍的な特徴を例示するために意図されたことに留意されたい。これらの図は、与えられた実施態様の特徴を正確に反映するものではなく、本技術の範囲内において、具体的な実施形態を定義するため、又は、限定するために必ずしも意図されたものではない。

50

【0016】

詳細な説明

以下の技術の説明は、1又は数個の発明の主題、製造及び使用の態様における単なる代表的なものであり、そして、本出願、又は本出願に対して優先権主張を行って出願される可能性のある他の出願、若しくはそれらにより発行する特許において、クレームされるいかなる特定の発明の範囲、適用又は使用を制限することを意図されたものではない。本技術の理解を助けるために意図された用語及びフレーズの非限定的な議論は、本明細書の最後に提供される。

【0017】

本技術は、血液の1又は数個の代謝機能を改善する組成物（本明細書では「増強組成物」として記述される）を使用した、赤血球を含む全血又は血液分画（本明細書中では、特に他に言及されない限り、「血液」と述べる）を処理する方法に関する。このような組成物は、イノシン、アデニン、ピルビン酸塩、リン酸塩、及びその混合物からなる群から選択される回復物質を含んでもよい。本技術は、血液中の2,3-DPG及び/又はATP濃度を決定するための診断テストを含む。

10

【0018】

RBC代謝増強組成物

本技術は、赤血球の1又は数個の代謝機能を直接的又は間接的に回復する、増加する、又は増強する、増強組成物を提供する。後述するように、いくつかの実施形態において、増強組成物は、組織を酸素化するための血液の能力に影響を与える、酸素輸送、酸素放出又は他の代謝パラメータを含む、赤血球の生化学的又は生体力学的機能に関連した1又は数個の細胞内構成因子の産生又は濃度を増加する。さらに後述されるように、いくつかの実施形態において、増強組成物は、アデニン三リン酸（ATP）及び2,3-ジホスホグリセリン酸（2,3-DGP）の1つ又は両方の細胞内濃度を増加する。

20

【0019】

いくつかの実施形態において、本技術の増強組成物は、イノシン、ピルビン酸塩、アデニン及びリン酸塩の安全及び有効な量を含みうる。回復物質の「安全及び有効な」量とは、RBCや他の血液を構成成分のバイアビリティー、及び、赤血球を投与した被験者に対する過度な副作用が無く（例えば、毒性、炎症、又はアレルギー反応）、RBCの生化学的又は生物力学的機能に対して所望の効果を十分に有し、本技術の方法で用いられた時に合理的な利益/リスクと釣り合う量のことである。具体的な安全及び有効な回復物質の量は、RBCの代謝状態、使用される具体的な回復物質（単数又は複数）、回復物質で処理されるRBCの条件、及びRBCが投与される被験者の健康状態等の因子によって、明らかに変わるだろう。

30

【0020】

様々な実施形態において、イノシンは、約25g/L～約30g/Lの濃度を有しうる。好適には、イノシンの濃度は、約25.0g/L、約25.5g/L、約26.0g/L、約26.2g/L、約26.4g/L、約26.6g/L、約26.8g/L、約27.0g/L、約27.5g/L、約28.0g/L、約28.5g/L、約29.0g/L、約29.5g/L、又は約30.0g/Lでありうる。様々な実施形態において、ピルビン酸塩は、約5g/L～15g/Lの濃度を有しうる。好適には、ピルビン酸塩の濃度は、約5g/L、約6g/L、約7g/L、約8g/L、約9g/L、約10g/L、約11g/L、約12g/L、約13g/L、約14g/L、又は約15g/Lでありうる。様々な実施形態において、アデニンは、約0.2g/L～約2g/Lの濃度を有しうる。好適には、アデニンの濃度は、約0.2g/L、約0.3g/L、約0.4g/L、約0.5g/L、約0.6g/L、約0.7g/L、約0.8g/L、約0.9g/L、約1.0g/L、約1.1g/L、約1.2g/L、約1.3g/L、約1.4g/L、又は約1.5g/Lでありうる。様々な実施形態において、アデニンは、約0.2g/L～約2g/Lの濃度を有しうる。好適には、アデニンの濃度は、約0.2g/L、約0.3g/L、約0.4g/L、約0.5g/L、約0.6g/L、約0.7g/L、約0.8g/L、約0.9g/L、約1.0g/L、約1.1g/L、約1.2g/L、約1.3g/L、約1.4g/L、約1.5g/L、約1.6g/L、約1.7g/L、約1.8g/L、約1.9g/L、又は約2.0g/Lでありうる。リン酸塩は、一塩基一水和物及び二塩基七水和物塩の混合物でありうる。リン酸塩はリン酸ナトリウムの塩でありうる。二塩基塩に対する一塩

40

50

基塩の比率は、約 1 : 2 ~ 約 1 : 3 でありうる。より具体的には、一塩基塩 : 二塩基塩の比率は、約 1 : 2 . 0 、約 1 : 2 . 1 0 、約 1 : 2 . 1 5 、約 1 : 2 . 2 0 、約 1 : 2 . 2 5 、約 1 : 2 . 3 0 、約 1 : 2 . 3 5 、約 1 : 2 . 4 0 、約 1 : 2 . 4 5 、約 1 : 2 . 5 0 、約 1 : 2 . 5 5 、約 1 : 2 . 6 0 、約 1 : 2 . 6 5 、約 1 : 2 . 7 0 、約 1 : 2 . 7 5 、約 1 : 2 . 8 0 、約 1 : 2 . 8 5 、約 1 : 2 . 9 0 、約 1 : 2 . 9 5 、又は約 1 : 3 . 0 でありうる。リン酸塩混合物は、終濃度が、約 1 8 g / L ~ 約 2 2 g / L を有しうる。さらに具体的には、リン酸塩混合物の濃度が、約 1 8 g / L 、約 1 8 . 5 g / L 、約 1 9 g / L 、約 1 9 . 5 g / L 、約 2 0 g / L 、約 2 0 . 1 g / L 、約 2 0 . 2 g / L 、約 2 0 . 3 g / L 、約 2 0 . 4 g / L 、約 2 0 . 5 g / L 、約 2 0 . 6 g / L 、約 2 0 . 7 g / L 、約 2 0 . 8 g / L 、約 2 0 . 9 g / L 、約 2 1 g / L 、約 2 1 . 5 g / L 、又は約 2 2 g / L でありうる。
10

【0021】

いくつかの実施形態においては、増強組成物は、以下：

- (i) 約 2 5 g / L ~ 約 3 0 g / L のイノシン；
- (i i) 約 0 . 2 g / L ~ 約 2 g / L のアデニン；
- (i i i) 約 5 g / L ~ 約 1 5 g / L のピルビン酸塩；及び
- (i v) 約 1 7 g / L ~ 約 2 3 g / L のリン酸ナトリウム

を含む。

例えば、増強組成物は、以下：

- (a) 約 2 7 (例えば、2 6 . 8) g / L イノシン；
- (b) 約 1 1 g / L ピルビン酸塩 (例えば、ピルビン酸ナトリウム) ；
- (c) 約 0 . 7 (例えば、0 . 6 8 1) g / L アデニン；及び
- (d) 約 2 1 (例えば、2 0 . 8) g / L リン酸塩 (例えば、約 6 . 2 1 g / L 一塩基一水和物；及び約 1 4 . 6 g / L 二塩基七水和物の混合物)

を含んでもよい。

好適には、組成物は、約 6 . 5 ~ 7 . 5 の pH 、より好適には約 6 . 6 ~ 7 . 4 の pH 、より好適には約 6 . 7 ~ 約 7 . 1 の pH 、より好適には約 6 . 7 ~ 約 7 . 0 の pH を有する。本技術の方法における有益な増強組成物は、標章「レジュベソル (登録商標) 」の下、シトラ ラボ L L C (前 サイトゾル ラボラトリーズ) 、ブレインツリー、マサチューセッツ州、によって商品化されている。
30

【0022】

血液処理の方法

本技術は、上述のように、本技術の増強組成物を使用する、赤血球を含む全血又は血液分画 (本明細書において、とりわけ他に言及されない限り、「血液」として述べる) を処理する方法も提供する。このような方法は、例えば；

- 1) 血液と増強組成物とを混合すること；及び
 - 2) 血液と増強組成物との該混合物をインキュベートすること
- を含む。

【0023】

本方法で処理された血液は、当業者によく知られる方法を使用して、哺乳類被検体 (「ドナー」) から得られてもよい。様々な実施形態において、ドナーはヒト被験体である。血液は、同種 (a l l o g e n e i c) (つまり、同種の被検体から供与されたもの) 、又は自家 (a u t o l o g o u s) (手術の前に採取されうるような、処理された血液が投与される被験体から得られる) であってもよい。
40

【0024】

本技術の増強組成物を使用する血液の処理は、保存されていた血液で実施されてもよく、ドナーから採血した時間の直近の時間にて「新鮮な」血液で実施されてもよい。(本明細書中で使用される、「直近の」時間とは、最初のイベント (つまり、献血) 後の 2 4 時間又はそれ未満、例えば、イベントと同時、又は、最初のイベント後、2 4 時間、1 8 時間、1 2 時間、6 時間、4 時間、2 時間、1 時間、3 0 分、1 5 分、1 0 分、2 分、1 分
50

若しくはそれ未満、である。) 血液の量は、赤血球濃縮物(R B C C)を產生するために、血漿の少なくとも一部を除去することによって、濃縮されうる。保管は、必要に応じて、例えば、1~50日、又はそれ以上であってもよい。保管は、臨床的に許容できる保管期間に対して、R B C の生存能を維持するためのように、いかなる温度及び他の条件であってもよい。例えば、保管は、約1~約6の温度であってもよい。他の実施形態において、R B C は、低温にてR B C のバイアビリティーを保存する条件調整剤の添加を伴って、約-65又はそれ以下の温度で凍結されてもよい。最適な条件調節剤(低温保存剤(cryopreservatives))はグリセロールを含む。このような条件調節剤は、投与する前に低温保存剤の除去のための、以下に記載された方法のように、投与する前にR B C から除去されることになるものとして理解される。

10

【0025】

いくつかの実施形態において、血液の量は、本技術のプロセスにおいて使用する前に、白血球が除去される。このように白血球が除去された血液は、全血よりも白血球が少なく含まれており、そして、いくつかの実施形態において、白血球は実質的に含まれないものであってもよい。他の血液構成成分は、白血球の除去前、間、又は後において、白血球が除去された血液から除かれてもよい。

【0026】

混合物のインキュベートは、血液中の赤血球が増強組成物から構成要素を同化することを許容し、R B C の生化学的及び生体力学的機能における所望の効果を達成ために十分な時間、実施される。本技術の方法、組成物及び使用の範囲を限定すること無く、インキュベーションは、R B C の代謝活性を増加し(例えば、解糖経路、ペントースリン酸経路、及びアミノ酸経路において)、新鮮なR B C に近いR B C の代謝特性を回復する可能性がある。この回復された特性は、結果として、輸血レシピエントにおいて、組織の酸素化、一酸化窒素(N O)産生能、及び輸血による副作用の低減されたリスクを含む、R B C 機能の改善を引き起こす可能性がある。例えば、インキュベーションは、R B C 中のA T P 及び2,3-D P G の濃度を増加するために十分な時間、実施されてもよい。インキュベーション中のA T P や2,3-D P G の増加の所望のレベル、機械的攪拌の使用、使用される増強組成物の量、及びインキュベーション中の血液の温度等のこのような因子に依存して、該時間は変わってもよい。いくつかの実施形態において、約50m L の増強組成物が、約550m L に及ぶ全血由来のR B C に添加される。混合は、回旋、振とう、回転、又は攪拌によって実施されうる。

20

【0027】

いくつかの実施形態において、血液は、インキュベーション中、1又は数個のR B C の所望の生化学的又は生体力学的特性を獲得しているかどうか確かめるためにテストされる。従って、例えば、A T P 、2,3-D P G 、N O 又は他のR B C 機能の生化学的マーカーの所望のレベルが得られるまで、つまり、新鮮な血液中で観察されるレベルと実質的に同等まで、インキュベーションは実施されてもよい。

30

【0028】

本明細書で有益なR B C 機能のこのようなマーカーを測定するための方法は、当業者間で知られる方法を含む。例えば、2,3-D G P は、商業的に入手可能なアッセイキットによって検出されうる。一つのそのようなアッセイにおいて、ホスホグリセリン酸(P G)及び無機リン酸(P i)を产生するために、ホスホグリセリン酸ムターゼ(P G M)が、グリコール酸-2-リン酸塩によって活性化された時、血液由来の2,3-D G P は、P G M によって分割される。2-P G 及び3-P G の両方が形成されうるが、2-P G は、3-P G を形成するためにP G M によって異性化される。A T P の存在下において、3-P G は、ホスホグリセリン酸キナーゼ(P G K)によって、1,3-D G P へと変換される。続いて、1,3-D P G は、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(G A P - D H)及びN A D H の酸化によって、グリセルアルデヒド-3-P へと変換される。グリセルアルデヒド-3-P は、トリオースリン酸イソメラーゼ(T I M)によって、ジヒドロキシアセトン-P へと変換され、ジヒドロキシアセトン-P は、グリセロール

40

50

- 3 - リン酸ヒドロゲナーゼ及びNADHの酸化によってグリセロール - 3 - Pへと変換される。2つのNADH分子の酸化は、340 nmの波長にて分光光度的に測定されうる。ここで必要的に、2,3-DPGの標準溶液を用いて標準曲線が準備されうる。0.02~0.15 μmolの範囲の血液中の2,3-DPGを決定するための、このような方法において有用なキットは、ロッシュ ダイアグノスティクス コーポレーション・ロッシュ アプライドサイエンスより商業的に入手可能である。いくつかの実施形態において、2,3-DPGを決定するために、血液のサンプルは、被検体から直接、又は、連続したプロセスにて使用される閉鎖システム（後述される）から、採取可能である。血液が回復する前及び後の2,3-DPGの違いが決定されうる。

【0029】

10

2,3-DPGを測定する代替の、他の方法において、50%ヘモグロビン飽和（P₅₀）を達成するために必要とされるO₂ガスの分圧が測定される。例えば、P₅₀はGEMプレミア3000（インスツルメンテーション ラボラトリーカンパニー、ベッドフォード、MA）の使用によって、ポイントオブケアにて測定されうる。とりわけ、血液サンプルは、凝固作用を防止するためにヘパリンと混合される。その時、血液サンプルの1滴又は2滴がガーゼパッド上に排出される。ガーゼパッドは、その時、P₅₀解析のために、GEMプレミア3000に配置される。この解析は、血液が回復される前及び後に実施されうる。

【0030】

20

2,3-DPGは、ELISAを基礎とした技術によっても検出されうる。一実施形態において、血液サンプル中の2,3-DPGは、ノヴァスバイオロジカル（リットレント、CO）によって商業化された2,3-DPG ELISAキットによって定量化されうる。アッセイプレートのウェルは、抗-2,3-DPG抗体で被覆されている。ウェルに対する脱脂粉乳又は牛血清アルブミンを含むブロッキングバッファーの添加が、抗体で被覆されていないウェルの部位をロックする。ウェルはその時、リン酸緩衝塩類溶液（PBS）等の洗浄緩衝液で1又は数回洗浄される。血漿のサンプルは、少なくとも一つのウェルへ注入され、様々な量の標準2,3-DPGが、標準曲線を形成するためにウェルへと加えられる。加えて、ビオチンに結合された2,3-DPG（2,3-DPG-ビオチン）が全てのウェルに加えられる。サンプル中、及び、標準曲線を含むウェル中の2,3-DPGは、抗-2,3-DPG抗体に結合するための2,3-DPG-ビオチンと競合する。アッセイプレートはその時、37にて約30分から約60分間インキュベートされる。ウェルはその時、別に3~5回洗浄される。続いて、ホースラディッシュペルオキシダーゼが結合されたアビジン（アビジン-HRP）をそれぞれのウェルへ加える。アビジンは、2,3-DPGに結合されたビオチンに結合する。別に3~5回洗浄した後、HRPの基質、例えば、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン（TMP）が加えられる。HRPは、プロトン供与体として使用されるTMPとともにH₂O₂の減少を触媒する。反応は、青色のTMPジイミンを生じさせる。青色TMPジイミンの吸光度は、450 nmの波長にてマイクロプレートリーダーを用いた分光光度計にて測定されうる。血液サンプル中の2,3-DPGの量は、血漿サンプルの吸光度と標準曲線の比較によって決定されうる。

30

【0031】

40

他の実施形態において、アッセイプレートの代わりに、多数の小さなストリップ（strip）を使用しうる。ストリップは、可視光に対して透明、例えば、ポリスチレン又はメタクリル酸等の物質からなる端部を含みうる。端部は、小さなウェルを含みうる。小さなウェルは、抗-2,3-DPG抗体で被覆されうる。上述の方法とは異なって、使用者は、ビオチン-2,3-DPGを含めるために処理された血液又は血漿サンプルに対し、ストリップの端部を浸してもよい。ストリップは、2,3-DPGの様々な標準濃度の溶液に浸されうる。インキュベート後、ストリップは洗浄されうる。ストリップの端部は、次に、アビジン-HRPを含む溶液へ浸される、又は、アビジン-HRPがウェルにピペットで加えられうる。結合されないアビジン-HRPは、その後、ウェルから洗い流される。ス

50

トリップの端部は、その後、T M P、水、及びH₂O₂を含むTMP基質溶液へ浸される、又は、ウェルに該基質溶液がピペットで加えられる。ストリップは、その後、450 nmの波長にてウェルで吸光度の読み取りができるようなストリップを幾何学的に受け入れるリーダーへと挿入されうる。

【0032】

他の実施形態は、Songら、Nat Commun. 2012; 3: 1283. DOI: 10.1038/ncomms2292に記載されるVチップで実施されたELISAアッセイを基礎とするものである。Vチップは、複数のウェルと流路、及び2つのプレートを含む、微少流体チップである。Vチップは、上端部及び下端部を有する。一つのプレートが、第二のプレートに対してスライドすると、流路が形成される。そのため、様々な構成要素が、反応が起こる前の流路レーンを介してVチップに予め装填される。先端流路レーンは、インク又は染料が予め装填される。先端から二番目の流路レーンは、抗2,3-DGP抗体で予め被覆され、その後、ビオチン-2,3-DGPを含むために処理された血漿サンプルで装填される。インキュベーション期間の後、このレーンは非特異的信号を防ぐために洗浄されうる。先端から二番目の流路レーンの下の流路レーンは、別途、アビジン結合カタラーゼ(アビジン-カタラーゼ)及びそのカタラーゼ基質、ペルオキシダーゼ(H₂O₂)で満たされる。カタラーゼの存在下では、H₂O₂はH₂OとO₂(g)へと分解される。一つのプレートが他のプレートに対してスライドされると、別々の流路チャネルが形成される。流路チャネルの形成は、流路レーンの構成要素を混合するための要因となる。アビジン-カタラーゼは、ビオチン-2,3-DGPに結合し、カタラーゼ反応を確保する。その反応によって放出されるO₂(g)は、流路チャネルを通って、先端のレーンのインク/染料が上方へ流れる原因となる。抗体に対して結合する2,3-DGPの量に依存する、O₂(g)が産生されるほど、インク/染料がより移動する。

【0033】

ATPは、生物発光アッセイによって血液中で検出されうる。一つのこのようなアッセイは、ATPが存在すると、ルシフェリンをオキシリルシフェリンへと変換するルシフェラーゼ(一般的には組み替えホタルルシフェラーゼ)を利用する。オキシリルシフェリンは、電気的に励起された状態で產生される。それゆえ、オキシリルシフェリンは、基底状態へと戻るときに、光の光子を放出する。血液中のATPの存在を測定するために、血液サンプルが患者から、又は、処理された若しくは未処理の血液を含むチューブから採取されうる。少量の血液サンプルは、ルシフェリン/ルシフェラーゼ溶液と混合されうる。溶液は、ルシフェリン、ルシフェラーゼ及びMg²⁺を含む、pH 7~8のトリシン緩衝液等の緩衝液でありうる。血液サンプル中のATPは反応を活性化し、その結果、発光する。発光はルミノメーターにて検出されうる。測定は、血液が回復される前及び後に行われうる。このATPアッセイに対する試薬は複数の製造業者を通して独立に入手可能であるが、いくつかの製造業者は全ての試薬を含むキットを提供する。一つのこのようなキットとしては、モレキュラ-プローブ インク社(ユージーン、又は；現ライフテクノロジー社、カルスバード、CA)のATP測定キット(A22066)である。

【0034】

他の実施形態において、ルシフェラーゼは、(a)物理的吸着；(b)捕捉(�trapping)；又は(c)共有結合/架橋、によって固相担体上に固相化されうる(Spahn et al., Recent Patents on Engineering 2008, Vol. 2, No. 3)。固相担体は、小さいサンプルチャンバを有したテストストリップでありうる。酵素は、該サンプルチャンバ内に固相化されうる。血液は、ルシフェリンの量を加えることによって処理されうる。血液：ルシフェリンの混合物は、該サンプルチャンバにピペットで加えられ、又は、その混合物は、毛細管作用によって装填されうる。血液からのATPの存在下にて、固相化されたルシフェラーゼは、発光を引き起こす反応において、添加されたルシフェリンをオキシリルシフェリンへと変換する。ストリップは、解析のための携帯式又は卓上式ルミノメーターに配置されうる

10

20

30

40

50

。

【0035】

他の方法において、テストストリップの端部は、小さなサンプルウェル及び微少電極を含みうる。微少電極は、グリセロールキナーゼ及びグリセロール-3-リン酸オキシダーゼで被覆されうる。血液は、グリセロールの量を添加することで処理されうる。グリセロールキナーゼはATP及びグリセロールをグリセロール-3-リン酸(+ATP)へと変換し、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼはグリセロール-3-リン酸をグリセロンリン酸+H₂O₂へと変換する。従って、テストストリップが、微小電極に接触する末端を含むアナライザーに配置されると、H₂O₂が電流測定によって検出されうる。

【0036】

様々な実施形態において、2,3-DPG又はATP濃度は、2,3-DPG試験デバイス及びATP試験デバイス(併せて、「試験デバイス」)によって実施される。試験デバイスは、血液の一つのユニット(又は、いくつかのユニットに対する一つのデバイス)、独立型ユニット又は総合回復デバイスの一部に、強力に及び物理的に、取り付けられうる。そのため、一実施形態において、デバイス(タグ、チップ、ガラスプレート、妊娠テスト型ストリップ、等)は、血液の単位に、無菌的に付着されうることが想像される。あるいは、無菌のサンプルは、一度又は繰り返すテストのために、複数の孔を含み、元の血液バッグの一部、若しくは、無菌接合デバイス(SCD)を使用して無菌的に取り付けられた、赤血球若しくは血液が満たされた必須チューブセグメントから得られうる。血液の単位をテストするために必要とするとき、血液の単位と試験デバイスとの間の無菌的な連結は、実施するためのテストを許容しながら解放されうる。孔は、血液の円滑な流れを可能にする。複数の孔は、除去されるためのチューブの複数のセグメントに対する手段を提供する。デバイスは、このような血液の単位、又は、繰り返してテストすることを許容するために取り付けられる多数のデバイスに結合されうる。

【0037】

他の実施形態において、血液のバッグは、2,3-DPG又はATPをテストするためのサンプルを得るために非無菌的に貫通することができ、それは、血液の単位が使用されるべき十分なレベルの2,3-DPG又はATPであれば、迅速な使用を必要とする。このような貫通は、Yセットの使用によって、又は、血液の単位から分離するデバイスにおいてテストするためのポートを介した血液のサンプルの採血によって、実施される。

【0038】

さらに、新鮮な血液は、生体内の原位置で(*in situ*)回復が必要かどうかを決定するために、2,3-DPGを測定するために患者から得られうる。このテストは、レジュベゾル(登録商標)溶液を使用して、患者の生体内の原位置における回復の後、又は、血液の単位の回復の後にも実施されうる。

【0039】

前述の手段によって、即座に血液の単位を運搬するかどうか、回復させて、その後、血液の単位を運搬するかどうか、追加の保管期間を決定するために現在の血液の単位を試験するかどうか、2,3-DPG及び/又はATPの正常、若しくは正常の血液レベルより高いレベルまで患者に戻すために必要な血液の量を決定するかどうか、或いは、例えば、回復の前及び後に該血液の診断テストを実施するかどうか、を決定するために、ポイントオブケア診断方法が2,3-DPGのレベルを測定する。正常の血液レベルは、約12.7~約1.7μモル/L/Hbであろう。

【0040】

血液は、予め決定された時間、例えば、約30秒~約24時間、増強組成物とともにインキュベートされうる。もし、血液が投与される前に保存されることになると、後述するように、インキュベーションは、血液が保存される期間にわたって行われうる。例えば、血液は、増強組成物とともに、約5分~約90分、又は約15分~約60分、約1~約45、又は約25~40、例えば約37で、インキュベートされうる。いくつかの実施形態において、血液は、約30分インキュベートされる。

10

20

30

40

50

【0041】

インキュベーションは、当業者の間で知られる、様々なデバイスや方法を用いて実施されうる。例えば、血液は、再循環水槽にて、血液と増強組成物の混合物を含むバッグを浸漬することによってインキュベートされうる。他の実施形態において、インキュベートすることは、約25～約45でセットされた浴槽温度を有する解凍デバイス中において、約5分～約60分（例えば、約30分間）実施されうる。解凍デバイスは、ヘルマーサイエンティフィック社、ノーブルズビル、IN、USA（前 サーモジエネシス社、ランチョ コルドヴァ、カリフォルニア州、USA）によって販売されるサーモラインモデル：MT202、MT204又はMT210を含む。他の例においては、インキュベートすることは、約6つの即席熱ゲルパックを含み、約25～約45の温度を有する隔離された箱の中に処理した血液組成物を置くことで実施されうる。デバイスは、隔離された箱の中で、処理された血液組成物を混合するために置かれ、又は、隔離された箱が、処理された血液組成物が、箱の中で混合されるような方法により回転されうる。サルステッド（Sarstedt）AG&Co.社から商業的に入手可能なサハラ3のような血漿融解装置は、ユニットを揺動し、加温し、インキュベートするために使用されうる。

10

【0042】

処理された血液は、インキュベートした後に保存されてもよく、又は、血液を必要とする哺乳類被験体に対して投与されてもよい。保存するための条件は、上述されたことを含む。いくつかの実施形態において、投与することは、本発明の方法を使用して、血液が得られて処理された直後の時間においてである。

20

【0043】

いくつかの実施形態において、本技術の処理されたRBC組成物は、滅菌される。滅菌は、本技術の通常の技術を有するものに知られているような方法を含んだ、薬学的に許容しうる方法によって実施されうる。滅菌の非限定的な例は、加熱、オートクレープ、放射線及び濾過を含む。

【0044】

方法は、組成物及び増強組成物の副産物の全て又は一部を除去するために、インキュベーション後に、該血液を洗浄することをさらに含んでもよい。洗浄は、本技術分野で知られる者の間の方法を使用して実施されることができ、輸血前にグリセロールを除去するために凍結された血液を処理するために使用される方法を含む。例えば、洗浄は、洗浄液をRBCの溶液容量に対して添加すること、RBCの濃縮物（例えば、ペレット）を形成するために得られる混合液を遠心分離すること、及び、上清を除くことを含んでもよい。洗浄液は、例えば、通常の生理食塩水を含んでもよい。このような洗浄は、ヘモネティクスコーポレーション社、ブレインツリー、マサチューセッツ州、より販売されるACP（登録商標）215オートメーティッドセルプロセッサー等の、本技術分野で知られるデバイスを用いて実施されてもよい。洗浄は、哺乳類被験体に血液を投与する直前の時間に実施されてもよい。

30

【0045】

いくつかの実施形態において、方法は、哺乳類被験体に投与する前に、インキュベートされた赤血球組成物の液体構成成分を除去することを含む。このような方法は、例えば、インキュベートされた赤血球組成物を遠心分離すること、赤血球の濃縮物と上清を形成すること、及び赤血球の濃縮物を単離すること、をさらに含む。赤血球の濃縮物は、その時、混合溶液中で懸濁されてもよく、これにより哺乳類被験体に投与されてもよい赤血球懸濁液を形成する。添加液は、本技術分野で知られる、通常の生理食塩水を含む、保存又は血液の投与に対して最適なものを含む。いくつかの実施形態においては、このような方法は、遠心分離する前にインキュベートされた赤血球組成物に対して、通常の生理食塩水等の洗浄液を添加することをさらに含んでいる。このように、本技術の方法は、以下を含む：

40

- (a) 哺乳類被験体から、赤血球の量を得ること、
- (b) 該赤血球の量に対して増強組成物を添加し、処理された血液組成物を形成

50

すること；

(c) 該処理された血液組成物をインキュベートし、インキュベートされた赤血球組成物を形成すること；

(d) 該インキュベートされた赤血球組成物を遠心分離して、赤血球の濃縮物及び上清を形成すること；

(e) 該赤血球の濃縮物を単離すること；及び

(f) 添加液中の赤血球の濃縮物を混合して、赤血球懸濁液を形成すること。

追加的に、該プロセスは、遠心分離する工程の前に洗浄液を用いて、該インキュベートされた赤血球組成物を希釈することを含んでもよい。

【0046】

本技術の方法は、連続的であってもよく、ここで、2又は数個の連続的な工程（例えば、増強溶液を加えること、及びインキュベーションすること）が、工程段階を通して、実質的に中断されることなく、RBCの流れで実施される。このように、例えば、増強溶液を加えて、RBCと増強溶液の混合物を単離条件（例えば、加温及び混合）に暴露する装置に、RBCの液体量が流れてもよい。このような流れは、洗浄液の添加、遠心分離、RBCの懸濁を含むさらなる工程段階に対する連続する方法において続けてもよい。後述するように、このようなプロセスは、静脈内カテーテルと流体連通する自動化された閉鎖系システムにおいて実施されてもよい。

【0047】

輸血及び処理の方法

本技術は、被験体に対する輸血のための方法に関する。このような方法は、本技術の方法に従って処理されたRBCを含む血液の液体量を、哺乳類被験体に対して投与するための最適な手順を含む。さらに後述するように、輸血は、失血又は血液機能減少に関連した疾患や障害の治療のためなど、医療的に適切な処置に従って実施されてもよい。あるいは、輸血は、手術のストレスに関連した苦痛に抵抗するために被験者の医療的な最適化のために、手術を見込んで実施されてもよい。投与のための具体的な方法は、例えば、静脈内カテーテルの使用を介する等、本技術分野で知られていることを含む。

【0048】

本技術は、血液の処理が、処理された血液が投与される直前の時間に実施される方法を提供する。例えば、上記で定義されたように、このような血液の直前の投与は、赤血球のインキュベーション後、24時間、18時間、12時間、10時間、8時間、4時間、1時間、30分、15分、10分、2分、1分又はそれより短い時間実施されてもよい。いくつかのプロセスにおいて、該方法は、「ポイントオブケア」であって、ここで、本技術のプロセスは、近接した場所、例えば、同一の部屋（例えば、ベッドサイド）又は、RBCが輸血される哺乳類被験体の別のすぐ近接した場所において、実施される。さらに後述するように、このようなポイントオブケアのプロセスは、血液を採取する工程、増強組成物を添加する工程、インキュベートする工程、洗浄する工程及び投与する工程等、2又は数個の本発明のプロセスの連続的な工程を実施することに適した装置を含むシステムを使用して実施されてもよい。いくつかの実施形態において、このようなシステムは、被験体から血液を採取するため、又は、被験体に対して血液を投与するために、静脈内カテーテル等のデバイスと流体連通している。いくつかの実施形態においては、投与されるRBCは自家（autologous）である。

【0049】

上述したように、輸血を必要とする被験体は、減少した組織酸化によって特徴づけられる障害を有しうる。このような障害は、血流が固定、制限、減少、又は停止される時のものを含む。さらに、輸血は、血液が、怪我、手術又は疾患を通して失われる時に必要になりうる。治療されうる被験体及び疾患は以下を含む：敗血症又は敗血性ショックを有し、貧血であって輸血を必要とする被験体； 上部消化管出血（「UGIB」）を有し、貧血であって輸血を必要とする被験体； 重い外傷にさらされ、貧血であって輸血を必要とする被験体； 集中治療室において重篤疾患を有し（成人及び小児）、貧血であって輸血を

10

20

30

40

50

必要とする被験体；直視下心臓手術を経験し、低体温性虚血性のクロスクランプの間、心臓を灌流するために血液性心筋保護液を受け入れ、直視下心臓手術中に、より多くの酸素化を心筋に提供することを受けた被験体；脳卒中を罹患し、脳卒中に続き、交換輸血を介して体循環の酸素運搬能力の上昇、又は、動脈カテーテルを介した虚血領域に対する直接投与によって、又は、静脈循環を介した逆向き灌流によって、虚血性脳組織を治療する被験体；分娩合併症を経験する被験体；出血性潰瘍を有する被験体；溶血性貧血を有する被験体；血小板減少、肺炎及び急性呼吸困難を有する被験体。

【0050】

インキュベートされたRBCの量の遠心分離を含む、上述の方法に付言して、図1は、哺乳類被験者に対する輸血のための代表的な方法10を示す。工程12において、血液の量はドナーから採取される。血液の量は、血液が輸血される被験体から、つまり自己血が得られる、又は、血液の量は、適切なドナー由来の同種のものである。いくつかの実施形態において、血液の量は、本技術で共通に使用される、様々な添加溶液中にて、1～6で保存される。いくつかの実施形態において、血液の量は凍結保存される。血液の量は、赤血球濃縮物(RBCC)を產生するために遠心分離することによって、又は、白血球除去RBC(LR-RBCs；一方で、非白血球除去血液はNLR-RBC)を产生するために白血球を除去することによって、処理されうる。さらに他の実施形態において、血液の量は、保存される前に、赤血球(RBC)増強組成物で処理される。あるいは、方法10は、血液の量が回収された直後に実施されうる。

10

【0051】

工程14において、増強組成物は、RBCの量に加えられ、処理された血液組成物を形成する。増強組成物は、後述するように、機能的に閉鎖された無菌流体通路を通じて搬送されうる。続いて、工程16において、処理された血液組成物はインキュベートされ、インキュベートされた血液組成物を形成する。

20

【0052】

オプションの工程18において、インキュベートされた血液組成物は、希釈された血液組成物を形成するために、生理食塩水又は他の洗浄液で希釈されうる。インキュベートされた血液組成物は、洗浄の24時間以内に輸血されうる。

【0053】

工程20において、工程16由来のインキュベートされた血液組成物、または工程18由来の希釈された血液組成物は、遠心分離される。遠心分離する結果、RBCの濃縮物及び上清が得られる。上清は除去されうる。オプションの工程22において、RBCの濃縮物は添加溶液、例えば生理食塩水等と混合される。

30

【0054】

最後に、工程23において、工程16由来のインキュベートされた血液組成物、工程18由来の希釈された血液組成物、又は工程22由来の再懸濁された血液組成物のいずれかが、被験体に輸血されうる。

【0055】

図2に関連して、2,3-DPG及び/又はATPの診断を実施すること、及びポイントオブケアにて赤血球を回復させるための方法200は、図表で説明した態様に含まれうる。工程205において、血液の単位が得られる。血液の単位は、治療を必要とする被験体(自家)から得られる、又は、治療を必要とする被験者とは異なる被験体(同種)から得られる。さらに、自家又は同種の血液は、ポイントオブケアにて、つまり、手術室において、又は、医療施設において、採取できることができる、あるいは、血液は保管、つまり、血液バンクから得られることができる。血液がポイントオブケアで得られる時、それは、静脈(IV)ラインから採取できる。

40

【0056】

工程205において血液を採取後、該血液は工程210にて分離を受けうる。血液は、IVラインを通して患者から直接分離デバイス(例えば、アフェレーシスデバイス等)へと回収されうる。分離する間、血液は分離デバイスへと採取され、赤血球、バフィーコー

50

ト、及び血漿分画へと分画され、少なくとも一つの分画が除去され、そして、少なくとも一つの分画が患者へと戻される。従来の分離とは異なり、それは、バフィーコート及び/又は血漿の除去、並びに赤血球を患者へと戻すことを含み、工程210は、赤血球の除去、並びにバフィーコート及び血漿を患者に戻すことを含む。

【0057】

回収された赤血球の酸素化能力は、回復による工程220にて増強されうる。シトララボズ L L C (ブレインツリー、MA) によって商業化されているレジュベゾル (登録商標) 赤血球処理溶液 (レジュベゾル (登録商標) 溶液) で赤血球を処理することが、赤血球を回復させることができる。回復させられた赤血球は、血液中で通常観察されるレベルと同様又はそれよりも高いATP及び/又は2,3-DGP濃度を有する。例えば、新鮮で、正常な血液は、約8.86~16.64 μmol/L/gHbの2,3-DGP濃度を有する。それゆえ、診断テストは、工程225において回復させられた血液で実施されうる。診断テストは、回復させられた血液中のATP及び/又は2,3-DGP濃度を測定するテストを含む。ATP及び/又は2,3-DGPの濃度の測定は、本技術分野で共通的に使用されている方法、及び本明細書で記述された方法によって実施されうる。これらの方法は、電気化学的方法、抗体の使用を含む方法、例えばELISA、又は化学的方法を含む。本明細書に記載される方法は、方法200に対して迅速、正確、及び特に有用である。回復させられた血液は、通常の血液と比較して、正常化された、又は増加されたATP及び/又は2,3-DGP値、並びに、組織を酸素化する血液の増加した能力によって特徴づけられる。あるいは、赤血球は、回復工程220の後、すぐに、工程235において患者に届けられる。

10

20

30

40

【0058】

工程230において、回復させられた血液中の測定された2,3-DGP濃度は、2,3-DPGのレベルを、正常の血液のレベル又はそれ以上に戻すために患者に投与するために必要な回復させられた血液の単位の総数を決定するために使用されうる。工程230の実施に関わらず、回復させられた血液は、工程235にて患者に届けられうる。患者が、正常の血液に対応する濃度よりも高い2,3-DGP濃度の回復させられた血液を投与されている時は、血液の酸素化の能力は増強される。このような増強は、虚血を患った患者、又は、近い将来、その後手術を経験する「医学的に最適化する」患者にとって有益である。

【0059】

上述のように、工程205は、生きているドナーから、又は、血液バンクから血液を得ることを含みうる。いずれかのシナリオにおいて、工程235で届けられる血液は、輸血を必要とする患者に対して、自家又は同種でありうる。アフェレーシスが必要ではないとき、工程205で得られた血液は、上述のように工程215にて診断テストを受けることができ、又は、工程220にて回復させられることができうる。血液が、方法200の実施の数時間以内にドナーから得られた時、つまり、新鮮な時、それに対する回復させることの必要性は最小限である。それにもかかわらず、回復させる新鮮な血液は、2,3-DPGのレベルが、新鮮な血液よりも約150% (約18 μmol/L/gHb) 又はそれ以上を有する血液を誘導することができる。このような血液は、虚血の組織を酸素化するための、並外れて増強された能力を有する。逆に、古い血液、又は約8日より長い期間保存された血液は、一般的には、2,3-DPG及びATPのレベルが減少し、酸素化能力が減少している。工程215でATP及び/又は2,3-DPG濃度値を測定することは、工程205で得られた血液の状態についての情報を提供する。低い値、つまり、約8.0 μmol/L/gHbより低い値は、その血液が、低い代謝活性及び組織を酸素化するための弱い能力を有することを示す。このような血液を輸血することの意図された有益な効果を得るために、古い血液は、工程220においてレジュベゾル (登録商標) 溶液を用いて回復させられるべきである。さらに、血液は、工程215にて診断テストを実施、又は工程220にて血液を回復させた後、工程240にて保管庫にて保管されうる。

【0060】

50

血液が工程 220において回復させられた後、追加的な診断テストが工程 225において実施されうる。このテストは、（工程 215が実施に前もって実施されたら）工程 215において実施された診断テストで測定されたそれぞれの濃度と比較して、回復させる工程 220の後に 2,3-DPG 及び / 又は ATP がどれくらい増加したかについての情報を提供する。オプションの工程 230において、回復させられた血液における測定された 2,3-DPG 及び / 又は ATP の濃度は、正常な血液又はそれより高い、2,3-DPG 及び / 又は ATP のレベルに戻すために患者に投与するために必要な回復させられた血液の単位の総数を決定するために使用されうる。オプションの工程 230が実施されることに関わらず、回復させられた血液は、工程 235において患者に届けられる。もし、工程 225において回復させられた血液の診断テストの実施が行われなかつたら、その時、患者に対して、2,3-DPG 及び / 又は ATP の正常又はそれより高いレベルにするために投与するために必要な回復させらせた血液の量を算出することが実施できない。このようなシナリオにおいて、工程 230はスキップされ、工程 220で回復させられた血液が、工程 235で必要とされる患者に届けられる。あるいは、工程 225において診断テストが回復させられた血液で実施されたあと、回復させられた血液は、工程 340にて保存されうる。

10

【0061】

システム

上述のように、本技術のプロセスは、連続するプロセスにおける本発明の工程の 2 又は数個の連続的な工程を実施するために適用されたシステム装置において実施されてもよい。例えば、一つのこのようなシステムは、以下：

20

(a) 増強溶液の供給量と流体連通し、インキュベートする間、RBC の量の温度を維持するための温度制御デバイスを含む、増強組成物と RBC の量とを混合するためのインキュベーションシステム；

(b) インキュベートされた RBC に対して洗浄液を添加するための、洗浄システム；

(c) インキュベートされた RBC の液体量から RBC を単離するための、遠心分離システム；及び

(d) RBC 懸濁液を形成するために、単離された RBC に対して添加溶液の量を加えるための、懸濁システム、

30

を含む。

【0062】

いくつかのポイントオブケアの実施形態において、該システムは、RBC 懸濁液が直接被験体へ投与されるように、静脈内カテーテル又は他のデバイスと流体連通している。代替的に又は追加的に、該システムは、被験体から直接全血の量を得るために第二の静脈内カテーテルと連通していてもよく、該被験体は、RBC 懸濁液が投与される同一の被験体であつてもよい。

【0063】

いくつかの実施形態において、該システムは自動化され、例えば、工程段階中、臨床オペレーターによって実質的な介入がなく、本技術のプロセスの 1 又は数個の工程が実行される。好適には、このようなシステムは、微生物の混入に対して、プロセス中に使用される RBC、増強組成物及び他の組成物の暴露が最小化又は除去するために「閉鎖系」である。

40

【0064】

上述のように、血液のインキュベーションは、RBC の生化学的マーカーの所望のレベルが達成されるまで、行われてもよい。このように、インキュベーションシステムは、血液の部分標本 (aliquot) が得られ、マーカーの濃度が調べられ、それに沿ってインキュベーションの期間が調節される測定デバイスを含んでもよい。例えば、上述のようなロッシュ ダイアグノスティックス コーポレーション - ロッシュ アプライドサイエンス社 (インディアナポリス、IN) から入手可能であるような、2,3-DPG アッセ

50

イのための試薬を閉鎖系システムのチューブへと注入することによって、2, 3 - DPGはオンラインで検出されうる。チューブは、例えば、分光光度計に設置されることができる石英製などの透明な部分を含みうる。血液が回復させられる前及び後の間の2, 3 - DPGの違いが決定されうる。他の実施形態において、ATPは、閉鎖系システムにおいて、血液を含むシステムにおけるチューブの透明な部分へ、ルシフェリン／ルシフェラーゼ溶液(上述)を注入することによって、オンラインで検出されうる。チューブのこの透明な部位は、外部の光が侵入できない暗箱で囲まれうる。外部のコンピュータに接続された光電子増倍管(PMT)は、暗箱内で、透明なチューブの直下に配置される。PMTはアッセイによって產生された光を検出することができ、コンピュータは、その結果を表示することができる。測定は、血液が回復させられる前及び後に実施されうる。

10

【0065】

図3、本技術の方法における有用な閉鎖系Y型チューブセット300システムを描写する。チューブセット300は、第一チューブ315の先端部と結合したドリップチャンバー310と貫通孔を有するスパイク305を含む。スパイク305は血液処理バイアル320の内部と第一チューブ315の間に流体連通経路を完成するために、血液処理バイアル320又はボトルに対して挿入されうる。血液処理バイアル320は、増強組成物を含みうる。また、第一クリップ320は、第一チューブ315を通過する流体を調節するために第一チューブ315に結合されうる。

【0066】

第一チューブ315は、Y型コネクタ330の入口に対する第二端部で結合される。直列の微生物バリアフィルタ335は、貫通孔を有するスパイク305から第一チューブ315を通ってY形状コネクタ330の入口へ流れる物質を濾過するために、第一チューブ315流路に配置される。一つの代表的な直列の微生物バリアフィルタ335は、平らな0.2ミクロンフィルタである。

20

【0067】

運搬バッグ340は、第二チューブ345の第一端部に結合されうる。第二チューブ345の第二端部は、Y型コネクタ330の他の入口に結合される。運搬バッグ340は、最初は空であり、例えば、上清廃棄物質等を回収するために使用されうる。付加的に又は代替的に、運搬バッグ340は、最初は、例えば洗浄液等の処理剤を含んでも良い。第二クリップ350は、第二チューブ345を通る流体を調節するために第二チューブ345に結合されうる。さらに、第二運搬バッグ355は第三チューブ360によって第二チューブ345に結合しうる。第二運搬バッグ355は、最初は空であり、例えば、上清廃棄物質等を回収するために使用されうる。付加的に又は代替的に、運搬バッグ340は、運搬バッグ340は、最初は、例えば洗浄液等の処理剤を含んでも良い。第三クリップ365は、第二チューブ345を通る流体を調節するために第二チューブ345に結合されうる。

30

【0068】

第4チューブ370は、Y型コネクタ330の出口と第一端部で結合しうる。第4チューブ370の第二端部は、第4チューブの流体チャネルを密封するシール375によって定義される。例えば、シール375は、溶着密封、又は、ラジオ波(RF)チューブシーラー(図示せず)を使用した血液バッグ385に結合された第五チューブ380に溶着されうる。加えて、血液バッグ385は、被験体に対して処理された血液を運搬可能な第六チューブ390を含みうる。最初は、シールされていない、又は、微生物バリアフィルタによって保護されていない潜在的導入点の無いY型チューブセット300が与えられているので、このY型チューブセット300は、機能的に閉鎖されている。換言すれば、Y型チューブセット300は、ボトル380の血液増強組成物が血液バッグ385へ運搬されるための、機能的に閉鎖された、無菌の流体通路(第4チューブ370を経由して)を提供する。

40

【0069】

血液増強組成物は、無菌で機能的に閉鎖された流体経路によって献血の量に対して加え

50

られうるので、血液はこのように移転した後 24 時間より長い期間保存されうる。付加的な処理後のデバイスは、機能的に閉鎖された、無菌環境において血液を維持する間、さらにその血液を処理するために使用されうる。例えば、献血の量は、機能的に閉鎖された、無菌の遠心分離機を使用して処理されうる。これは、例えば、血液バッグに含まれた献血の量に対して増強組成物を運搬する前に、全血の組成物を除去して血液バッグ中に RBC を残すために実施されうる。一つの代表的な機能的に閉鎖された無菌の遠心分離機は、COBE スペクトラ アフェレーシス システムである。24 時間を超えた洗浄後の保存は、例えば、ヘモネティクス血液細胞プロセッサー モデルACP215 等の「機能的に閉鎖された」血液細胞処理システムを使用して達成されうる。

【0070】

10

これらの本技術における方法やシステムは、以下の非限定的な例として記載される。

【実施例】

【0071】

実施例 1

組み立てられたY型チューブセットは、図2で示されるように組み立てられて、RBC の単位と結合される。チューブセットは、0.2 μm フィルターを含む。RBC 増強組成物（レジエベゾル（登録商標）溶液）は、処理された血液組成物を形成するために、貫通孔を有するスパイクを経由してRBCへと移行される。処理された血液組成物は混合され、インキュベートされて、インキュベートされた血液組成物を形成する。処理された血液組成物はRBC の濃縮物及び上清を形成するために遠心分離される。上清は空の廃棄バッグへと移行され、RBC の濃縮物は、第二移行バッグから移行された100 mL の添加溶液に再懸濁された。

20

【0072】

30

実施例 2

Y型チューブセットは、図2で示されるように組み立てられ、250 mL RBC の単位と結合される。生理食塩水を含む100 mL 添加溶液は、RBC に移行された。チューブセットは0.2 μm フィルターを含む。50 mL RBC 増強組成物（レジュベゾル（登録商標）溶液）は、処理された血液組成物を形成するために、貫通孔を有するスパイクを経由してRBCへと移行された。処理された血液組成物は、混合され、インキュベートされて、インキュベートされた血液組成物を形成した。インキュベートされた血液組成物は、そのとき、200 mL の洗浄溶液を含む第一移送バッグからの200 mL 洗浄溶液にて希釈され、希釈された血液組成物を形成した。希釈された血液組成物は、RBC の濃縮物及び上清を形成するために遠心分離された。上清は、今は空になった第一移送バッグへと移され、RBC の濃縮物は、第二移送バッグから移された100 mL の追加溶液で再懸濁された。

【0073】

実施例 1 及び 2 に従って処理された血液は、以下の結果を伴い、最終的に処理されたRBC 懸濁物中の回復物質の濃度が解析される。

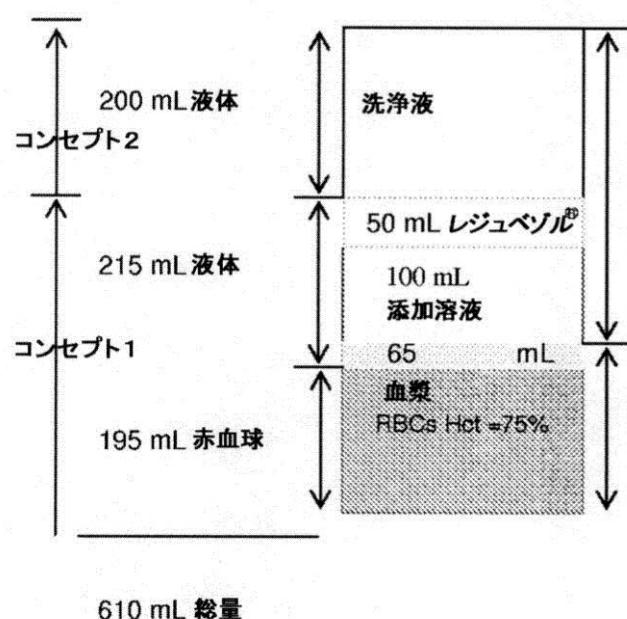
【0074】

【表1】

構成物 又は 代謝産物	血清又は血漿中 のリファレンス 濃度 (mMol/L)	2, 3-DPG増強細胞の1単位輸血した後の <i>in vivo</i> *血漿濃度		
		追加処理なし (mMol/L) **	コンセプト1、 推定75%除去 (mMol/L)	コンセプト2、 推定85%除去 (mMol/L)
ピルビン酸	0.034-0.102	2.19	0.55	0.33
アデニン	n/a	0.110	0.027	0.016
イノシン	n/a	2.19	0.55	0.33
リン酸塩	0.74-1.52	2.19	0.55	0.33
乳酸塩	0.3-2.2	2.19	0.55	0.33
尿酸	0.16-0.51	2.19	0.55	0.33
ヒポキサンチン	0.0001-0.0011	2.19	0.55	0.33

*総血漿量=2.28リットル

**Dr. Lobeによる2000レポート参照



コンセプト1 レジュベゾル（登録商標） の希釀
<u>215 mL = 4.3</u>
<u>50 mL</u>
レジュベゾル（登録商標）中のそれぞれの構成物の濃度は、 $\geq 100 \text{ mMol/L}$ であり、及び、遠心分離及び全上清の75%の除去後の濃度は、 $\geq 23.3 \text{ mMol/L}$ となり、53.8 mLの推定残存量が赤血球中に残存する。
最初 = $23.3 \text{ mMol/L} \times 0.215 \text{ mL} = 5.01 \text{ mMol}$
最後 = $23.3 \text{ mMol/L} \times 0.0538 \text{ L} = 1.25 \text{ mMol}$
それぞれの構成物の残存% = 25%
コンセプト2 レジュベゾル（登録商標） の希釀
<u>350 mL = 7</u>
<u>50 mL</u>
レジュベゾル（登録商標）中のそれぞれの構成物の濃度は、 $\geq 100 \text{ mMol/L}$ であり、及び、希釀、遠心分離及び全上清の75%の除去後の濃度は、 $\geq 14.3 \text{ mMol/L}$ となり、53.8 mLの推定残存量が赤血球中に残存する。
最初 = $14.3 \text{ mMol/L} \times 0.350 \text{ mL} = 5.01 \text{ mMol}$
最後 = $14.3 \text{ mMol/L} \times 0.0538 \text{ L} = 0.769 \text{ mMol}$
それぞれの構成物の残存% = 15%

【0075】

輸血の前に、保存と同時に保存の後にレジュベゾル（登録商標）と一緒に保存されたLR-RBCの処理した結果、2.3-DPGがより回復する。LR-RBC単位の処理

前のパックされた細胞重量は、N L R - R B C 単位より大きいが（表1）、近年の研究は、本発明の結果、450mLの全血（WB）由来のN L R - R B Cと比較したとき、レジュベゾル（登録商標）溶液で処理された500mLの全血（WB）由来L R - R B C中のレベルに対して2,3-DPGの濃度が優位に高くなることを証明する（表2）。

【0076】

【表2】

表2：回復前の全RBC重量（グラム）

LR-RBC由来	450mL由来NLR-RBC	
350.1	338.1	平均値 (n=14)
18.3	19.5	SD
318.9-379.0	305.0-366.5	範囲

10

【0077】

【表3】

表3：要約；回復後、脱グリセロール化、及び、脱グリセロール化24時間後のATP及び2,3-DPG値

20

500mLのWB由来 L R - R B C		450mLのWB由来 N L R - R B C		
ATP (μ mol/gHbg)	2,3-DPG (μ mol/gHbg)	ATP (μ mol/gHbg)	2,3-DPG (μ mol/gHbg)	
7.94	11.04	7.75	8.13	平均値 回復後 (n=14)
1.09	1.54	0.73	1.60	SD
5.89-9.60	9.05-13.68	6.27-8.75	5.75-11.01	範囲
NS	†	NS	†	† p<0.0001 NS p<0.27
7.50	16.72	7.82	13.91	平均値 脱グリセロール後 (n=13)
0.84	1.64	0.68	1.89	SD
6.62-8.94	13.67-19.58	6.80-9.20	11.17-17.29	範囲
NS	*	NS	*	† p<0.0005 (n=13) NS p<0.27
7.59	17.73	8.39	15.64	平均値 脱グリセロール24時間後 (n=14)
0.85	2.08	0.91	1.48	SD
6.62-9.05	13.42-20.87	6.76-9.53	12.73-18.59	範囲
NS	+	NS	+	† p<0.0058 NS p<0.77

30

【0078】

本明細書中に記述される実施態様及び例示は代表的なものであって、本技術の構成や方法の全範囲を記述することを限定するために意図されたものではない。実施態様、物質、組成物、及び方法の同等の変化（changes）、修飾（modifications）、変更（variations）は、実質的に同様な結果を伴って、本技術の範囲内で行われうる。

40

【0079】

50

用語の非限定的な議論

本明細書中で使用される見出し（例えば、「序論（Introduction）」及び「要約（Summary）」）及び小見出しは、本開示内の話題の一般的な編成に対してのみ意図されたものであり、技術や技術のいかなる態様の開示を限定するために意図されたものではない。特に、「序論」にて開示された主題は、新規技術を含みうるものであり、先行技術の説明を構成しない。「要約」において開示された主題は、本技術、又は本技術のいかなる実施態様の全体の範囲の徹底的又は完全な開示ではない。特に有用性を有するような本明細書の部分内の材料の分類又は議論は、利便性のために作成されたものであって、与えられた構成又は方法にて使用されるとき、本明細書の分類に従って、物質が必然的に、又は単独で機能しなければならないことが引用されて推論されるべきではない。

10

【0080】

本技術の実施態様を示す一方で、明細書及び具体例は、例示のみを目的とするために意図されるものであり、本技術の範囲を限定するために意図されたものではない。さらに、述べられた特徴を有する複数の実施形態の説明は、付加的な特徴を有する他の実施形態、又は、述べられた特徴の異なった組み合わせを取り入れている他の実施形態を除外するために意図されたものではない。具体例は、本技術の組成物及び方法をいかに作り、使用するかを説明する目的のために提供されるものであり、明示的に別に述べられない限り、本技術の与えられた実施形態が作られ、若しくは作られなかったり、又は試験されたり、若しくは試験されなかったりすることを説明するために意図されたものではない。いくつかの実施態様、物質、組成物、及び方法の同等の変化（changes）、修飾（modifications）、変更（variations）は、実質的に同様な結果を伴って、本技術の範囲内で行われる。

20

【0081】

本明細書中で使用されるように、用語「好適な（preferred）」又は「好適（preferable）」は、ある状況下において、確かな利益を与える本技術の実施形態をいう。しかしながら、他の実施形態もまた、同一又は他の状況下において、所望されてもよい。さらには、1又は数個の所望された実施形態の詳述は、他の実施形態で有益ではなく、他の実施形態が本技術の範囲から除くために意図されたものではない。

【0082】

含む（including）、含む（containing）、有する（having）等の非制限的な用語の類義語のように、オープンエンドの用語「含む（comprising）」は、本技術の実施形態を述べたり、クレームするために本明細書中で使用されるが、実施形態は、代替的に「～からなる（consisting of）」又は「～から実質的になる（consisting essentially of）」等の、より限定する用語を使って記述されてもよい。このように、物質、構成物又は工程段階を列挙する与えられた実施形態のために、本出願にてこのような付加的な物質、構成物又はプロセスが明確には列挙されないけれども、付加的な物質、構成物又はプロセスを除くこのような物質、構成物又はプロセスからなる実施形態、或いは、実施形態の重要な特性に影響を及ぼす付加的な物質、構成物又はプロセスを除くこのような物質、構成物又はプロセスから実質的になる、実施形態を本技術もまた明確に含む。例えば、要素Dが本明細書中で除外されているように明確には記載されていないが、要素A、B及びCを列挙する構成物又はプロセスは、本技術分野で列挙されるであろう要素Dを除外してA、B及びCからなる、及び、A、B及びCから実質的になる実施形態をとりわけ想起する。

30

【0083】

本明細書中で使用されるように、用語「含む（include）」及びその変形は、リストの中のアイテムの列挙が、本技術の物質、構成物、デバイス及び方法においても有用である他のアイテムを除外することが無いよう、非限定的に意図される。同様に、用語「～できうる（can）」及び「～でもよい（may）」及びそれらの変形は、実施態様が、ある要素又は特徴を含みうる又は含んでもよい列挙が、これらの要素又は特徴を含んでいない本技術の他の実施態様を除外しないように、非限定的に意図される。

40

50

【0084】

特別なパラメータに対する値及び値の範囲の開示（例えば、温度、分子量、重量パーセント等）は、本明細書中で、有用な他の値及び値の範囲を排除しない。与えられるパラメータに対する2又は数個の具体的な値は、パラメータに対して要求されるであろう値の範囲に対するエンドポイントを定義するかもしれないことが想像される。例えば、もし、パラメータXが本明細書中で値Aを有することが例示され、値Zを有することも例示された場合、パラメータXは、約A～約Zの値の範囲を有する可能性があることが想像される。同様に、パラメータに対する値の2又は数個の範囲の開示（このような範囲が、入れ子になっていて、重複して、又は別個である）は、開示された範囲のエンドポイントを使用してクレームされル可能性がある値の範囲の全ての潜在的な組み合わせを包含することが想像される。例えば、もし、パラメータXが、本明細書中で、1～10，又は2～9、又は3～8の範囲の値を有することが例示されたら、パラメータXは、1～9，1～8，1～3、1～2、2～10、2～8，2～3、3～10、及び3～9を含む値の他の範囲を有する可能性があることが想像される。

10

【0085】

要素や層が、他の要素若しくは層に「載せられる（on）」、「結合される（engaged to）」、「結合される（connected to）」又は「結合される（coupled to）」ことに関する場合、それは、提示される他の要素若しくは層、又は、介入する要素若しくは層に、直接的に載せられる（on）、結合される（engaged）、結合される（connected）又は、結合される（coupled to）可能性がある。反対に、他の要素又は層に「直接のせられる（directly on）」、「直接結合される（directly engaged to）」、「直接結合される（directly connected to）」、又は「直接結合される（directly coupled to）」ことに関する場合、提示される介入する要素又は層は有さない可能性がある。要素の間の関係を記述するために使用される他の用語は、同様の方法で解釈されるべきである（例えば、「～の間（between）」と「直接～の間（directly between）」、「隣接した（adjacent）」と「直接隣接した（directly adjacent）」等）。本明細書中で使用されるように、用語「及び／又は（and/or）」は、関連してリストされたアイテムの1又は数個のいずれか、及び全ての組み合わせを含む。

20

30

【0086】

用語、第一、第二、第三等は、本明細書中で、様々な要素、構成要素、領域、層、及び／又は部分を記述するために使用される可能性があるが、これらの要素、構成要素、領域、層及び／又は部分は、これらの用語によって限定されるべきではない。これらの用語は、他の領域、層、部位から、一つの要素、構成要素、領域、層又領域を区別するためにだけ使用されている。本明細書中で使用される時の「第一」、「第二」、及び他の数字で表した用語等の用語は、明確に文脈によって示されない限り、順番や順序を暗示するものではない。このように、以下で述べられた第一の要素、構成要素、領域、層又は部分は、例の実施形態の教示から逸脱しない範囲で、第二の要素、構成要素、領域、層又は部分と呼ばれることができる。

40

【図1】

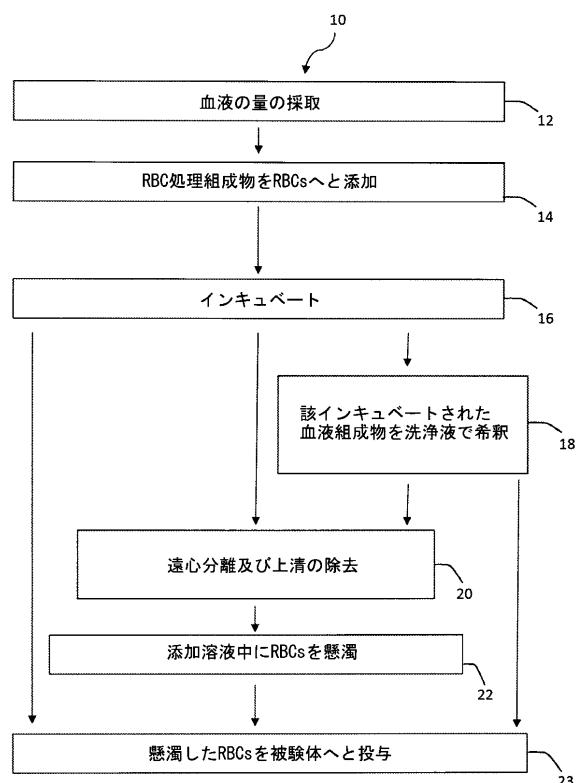


Figure 1

【図2】

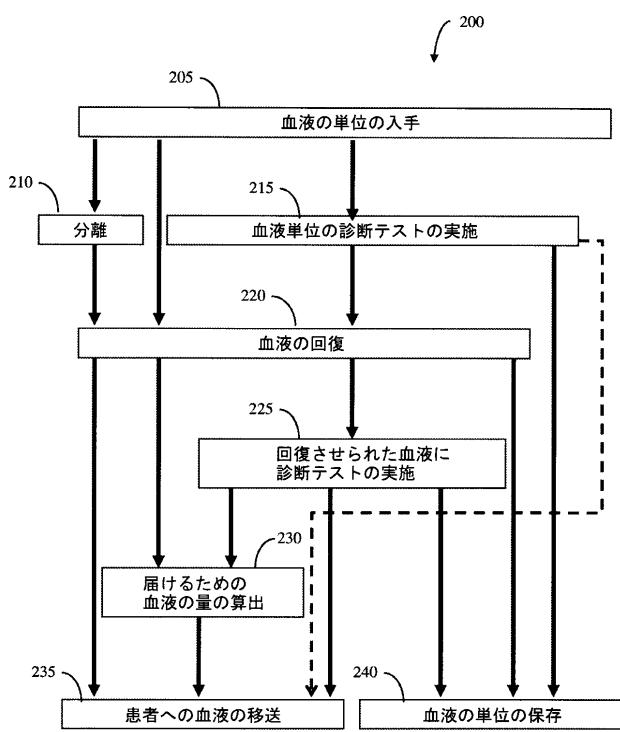


Figure 2

【図3】

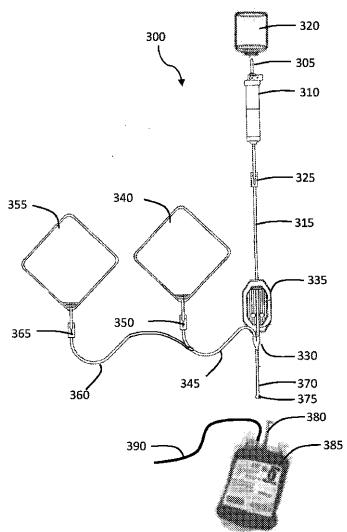


Figure 3

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US2014/013845
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K35/14 A61K31/19 A61K31/70 A61K31/7076 C12N5/078 A61P7/00		
ADD. <small>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</small>		
B. FIELDS SEARCHED <small>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)</small> A61K C12N		
<small>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</small>		
<small>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)</small> EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, CHEM ABS Data, BIOSIS, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO 2014/039660 A1 (BIOMET BIOLOGICS LLC [US]) 13 March 2014 (2014-03-13) the whole document -----	16-21
X	VALERI C R ET AL: "The survival, function and hemolysis of human RBCs stored at 4C in additive solution (AS-1, AS-3 or AS-5) for 42 days and then biochemically modified, frozen, thawed, washed and stored at 4C in sodium chloride and glucose solution for 24 hours", TRANSFUSION, AMERICAN ASSOCIATION OF BLOOD BANKS, BETHESDA, MD, US, vol. 40, 1 November 2000 (2000-11-01), pages 1341-1345, XP002971657, ISSN: 0041-1132, DOI: 10.1046/J.1537-2995.2000.40111341.X the whole document -----	1-3,5-37
Y	----- -----	4 -/-
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
<small>* Special categories of cited documents :</small>		
<small>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</small>		
<small>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</small>		
<small>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</small>		
<small>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</small>		
<small>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</small>		
<small>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</small>		
<small>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</small>		
<small>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</small>		
<small>"&" document member of the same patent family</small>		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
30 April 2014	13/05/2014	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Greif, Gabriela	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2014/013845

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MEYER ERIN K ET AL: "Rejuvenation capacity of red blood cells in additive solutions over long-term storage.", TRANSFUSION JUL 2011, vol. 51, no. 7, July 2011 (2011-07), pages 1574-1579, XP002722955, ISSN: 1537-2995 the whole document -----	1-3,5-37
Y	WO 2011/103179 A1 (VIACELL LLC [US]; ERICSON DANIEL G [US]; THOMPSON JEFFREY A [US]) 25 August 2011 (2011-08-25) the whole document -----	4
X	US 2005/233302 A1 (HESS JOHN R [US] ET AL) 20 October 2005 (2005-10-20) the whole document -----	1-37
Y	PATRICK BURGER ET AL: "An improved red blood cell additive solution maintains 2,3-diphosphoglycerate and adenosine triphosphate levels by an enhancing effect on phosphofructokinase activity during cold storage", TRANSFUSION, vol. 50, no. 11, 29 November 2010 (2010-11-29), pages 2386-2392, XP055090049, ISSN: 0041-1132, DOI: 10.1111/j.1537-2995.2010.02700.x the whole document -----	1-37
Y	TATSURO YOSHIDA ET AL: "The effects of additive solution pH and metabolic rejuvenation on anaerobic storage of red cells", TRANSFUSION, vol. 48, no. 10, 1 October 2008 (2008-10-01), pages 2096-2105, XP055090047, ISSN: 0041-1132, DOI: 10.1111/j.1537-2995.2008.01812.x the whole document -----	1-37
Y	J. R. HESS: "An update on solutions for red cell storage", VOX SANGUINIS, vol. 91, no. 1, 1 July 2006 (2006-07-01), pages 13-19, XP055090051, ISSN: 0042-9007, DOI: 10.1111/j.1423-0410.2006.00778.x page 16, paragraph 4-5 -----	4 -/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2014/013845

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>SCOTT K L ET AL: "Biopreservation of Red Blood Cells: Past, Present, and Future", TRANSFUSION MEDICINE REVIEWS, GRUNE AND STRATTON, ORLANDO, FL, US, vol. 19, no. 2, 1 April 2005 (2005-04-01), pages 127-142, XP004849638, ISSN: 0887-7963, DOI: 10.1016/J.TMRV.2004.11.004 the whole document</p> <p>-----</p>	1-37

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2014/013845

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2014039660	A1 13-03-2014	NONE		
WO 2011103179	A1 25-08-2011	CA CN EP JP US WO	2789709 A1 102869364 A 2536416 A1 2013519731 A 2011256522 A1 2011103179 A1	25-08-2011 09-01-2013 26-12-2012 30-05-2013 20-10-2011 25-08-2011
US 2005233302	A1 20-10-2005	US	2005233302 A1 2012129148 A1 2012329036 A1	20-10-2005 24-05-2012 27-12-2012

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 7/06 (2006.01)	A 6 1 P 7/06	
A 6 1 P 9/02 (2006.01)	A 6 1 P 9/02	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/02	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	D

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,R,S,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

- (74)代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一
- (74)代理人 100150810
弁理士 武居 良太郎
- (74)代理人 100197169
弁理士 柴田 潤二
- (72)発明者 アラン グレイ
アメリカ合衆国, インディアナ 01864, ノース リーディング, タワー ヒル ロード 4
4
- (72)発明者 ジョエル シー. ヒギンズ
アメリカ合衆国, インディアナ 46510, クレイブル, サウス ビーバー ダム ロード
8025
- (72)発明者 マシュー ディー. ランドリガン
アメリカ合衆国, インディアナ 46814, フォート ウェイン, ウエスト ハーバーサイド
ドライブ 2412
- (72)発明者 グラント カニンガム
アメリカ合衆国, インディアナ 46570, ワルシャウ, サウス ワイルドウッド トレイル
3416

F ターム(参考) 2G045 CA02 DA02 DA15 FB01 FB03 GC10
4C086 AA01 AA02 CB07 EA18 HA07 MA03 MA04 MA16 NA05 ZA02
ZA36 ZA43 ZA55 ZA89 ZB35 ZC75
4C087 AA01 AA02 BB34 CA21 DA03 DA07 DA17 DA32 MA02 MA16
MA66 NA05 ZA02 ZA36 ZA43 ZA55 ZA89 ZB35 ZC75
4C206 AA01 AA02 DA09 MA03 MA04 ZA02 ZA36 ZA43 ZA55 ZA89
ZB35 ZC75