

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7645637号
(P7645637)

(45)発行日 令和7年3月14日(2025.3.14)

(24)登録日 令和7年3月6日(2025.3.6)

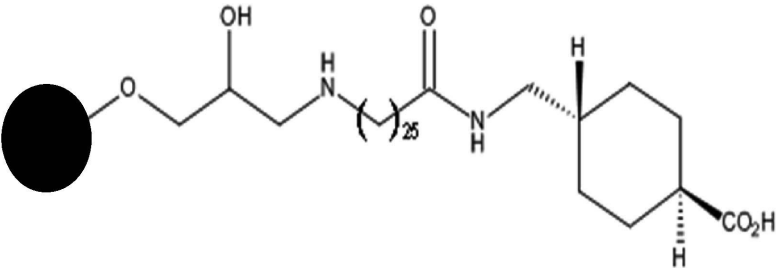
(51)国際特許分類		F I		
G 0 1 N	33/48 (2006.01)	G 0 1 N	33/48	K
A 6 1 K	35/14 (2015.01)	A 6 1 K	35/14	
A 6 1 K	35/16 (2015.01)	A 6 1 K	35/16	
A 6 1 M	1/02 (2006.01)	A 6 1 M	1/02	1 3 0
A 6 1 M	1/36 (2006.01)	A 6 1 M	1/36	1 6 5
請求項の数 14 (全121頁) 最終頁に続く				
(21)出願番号	特願2020-541776(P2020-541776)	(73)特許権者	520276969	
(86)(22)出願日	平成31年2月28日(2019.2.28)		プラスフリー リミテッド	
(65)公表番号	特表2021-515189(P2021-515189 A)		イスラエル国 ナザレ ワディ エル ハジ 13	
(43)公表日	令和3年6月17日(2021.6.17)		Wadi El Haj 13, Nazareth, Israel	
(86)国際出願番号	PCT/IL2019/050228	(74)代理人	100079108	
(87)国際公開番号	WO2019/167048		弁理士 稲葉 良幸	
(87)国際公開日	令和1年9月6日(2019.9.6)	(74)代理人	100109346	
審査請求日	令和4年2月28日(2022.2.28)		弁理士 大貫 敏史	
(31)優先権主張番号	62/636,511	(74)代理人	100117189	
(32)優先日	平成30年2月28日(2018.2.28)		弁理士 江口 昭彦	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100134120	
前置審査			弁理士 内藤 和彦	
		(72)発明者	ヒジャージ, アブド アルラウフ	最終頁に続く

(54)【発明の名称】 生体液から線溶タンパク質を除去するための体外装置及びマトリックス、その方法及び使用

(57)【特許請求の範囲】
【請求項1】

複数のコンジュゲート又は前記複数のコンジュゲートを含む任意の組成物であって、各コンジュゲートが粒子と少なくとも1つのリンカーと少なくとも1つのアミノ酸、その誘導体又はその類似体とを含み、前記複数のコンジュゲートが少なくとも2つの異なるコンジュゲートを含み、及び前記アミノ酸、その誘導体又はその類似体が、4-（アミノメチル）シクロヘキサンカルボン酸（トラネキサム酸）であり、前記コンジュゲートが、

(a)
【化1】



(式中、

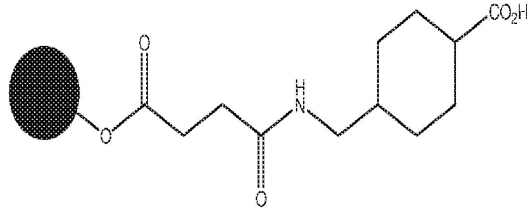
【化 2】



は粒子を表す)である、

(b)

【化 3】



10

(式中、

【化 4】

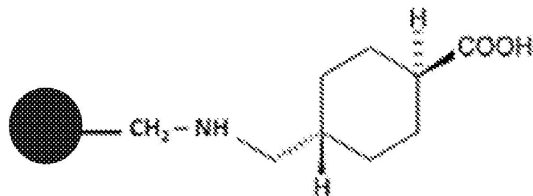


20

は粒子を表す)である、及び

(c)

【化 5】



30

(式中、

【化 6】



は粒子を表す)である、

40

の1つである、複数のコンジュゲート又は組成物。

【請求項 2】

(a) 前記少なくとも2つの異なるコンジュゲートの前記粒子及び／又は前記リンカーが異なる、

(b) 前記粒子が約90 μm～約150 μmの平均粒径を有する、

(c) 前記粒子が、多糖ビーズ、ガラスビーズ、綿ビーズ、プラスチックビーズ、ナイロンビーズ、ラテックスビーズ、磁性ビーズ、常磁性ビーズ、超常磁性ビーズ、デンプンビーズ、シリコンビーズ、PTFEビーズ、ポリスチレンビーズ、ガリウムヒ素ビーズ、金ビーズ、又は銀ビーズのうちの少なくとも1つである、及び

(d) 前記粒子がアガロースビーズ又はセファロースビーズである、

50

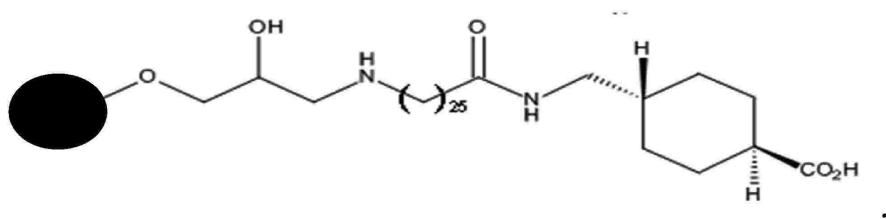
の少なくとも1つである、請求項1に記載の複数のコンジュゲート又は組成物。

【請求項 3】

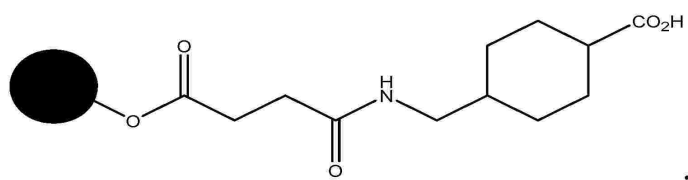
粒子と少なくとも1つのリンカーと少なくとも1つのアミノ酸、その誘導体又はその類似体とを含むコンジュゲートであって、

【化 7】

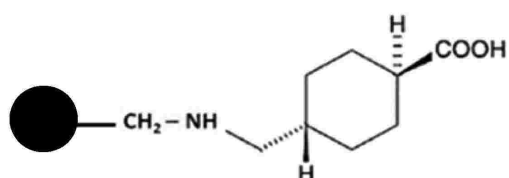
(a)



(b)

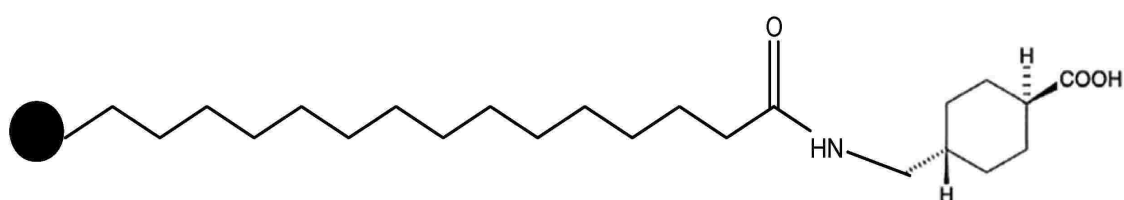


(c)



,又は

(d)



(式中、

【化 8】



は粒子を表す) のうちのいずれか1つである、コンジュゲート。

【請求項 4】

前記粒子がアガロースビーズ又はセファロースビーズであり、約90 μm～約150 μmの平均粒径を有する、請求項3に記載のコンジュゲート。

【請求項 5】

1つ又は複数の哺乳類体液から少なくとも1つの線溶タンパク質を枯渇させる装置であって、

- 少なくとも1つの流体入口ポートと、少なくとも1つの流体出口ポートとを有するハウジング

を含み；

－ 前記ハウジングが少なくとも1つのチャンバを備え、前記少なくとも1つのチャンバが、前記少なくとも1つの流体入口ポート及び前記少なくとも1つの流体出口ポートと流体連通している制御容積を画成し；

－ 前記制御容積が、第1の粒子の第1の集合と第2の粒子の第2の集合とを少なくとも含む複数の粒子集合を収容し；

－ 前記第1の粒子は前記第2の粒子と寸法が異なり；

－ 前記第1の粒子及び前記第2の粒子のうちの少なくとも一方は、アミノ酸、その誘導体又はその類似体にコンジュゲートされているコンジュゲート粒子であり、前記アミノ酸、その誘導体又はその類似体が、トラネキサム酸であり、及び前記コンジュゲート粒子が、請求項1若しくは2に記載の複数のコンジュゲート又は組成物、又は請求項3若しくは4に記載のコンジュゲートによって定義される、装置。

10

【請求項6】

前記ハウジングが長手方向軸を含み、且つ本体部分と、前記少なくとも1つの流体入口ポートを有する入口端部キャップ、及び前記少なくとも1つの流体出口ポートを有する出口端部キャップを含む一对の端部キャップとを含む、請求項5に記載の装置。

【請求項7】

(i) 前記制御容積が、前記本体部分の長手方向両端に提供される対応するバリア部材によって画成される、

(ii) 前記バリア部材が、前記制御容積から前記粒子が抜け出ることを防止するように構成され、

20

(a) 前記バリア部材が、前記制御容積を通じた前記1つ又は複数の哺乳類体液の貫流を同時に許容するように構成される、又は

(b) 前記バリア部材が、前記制御容積を通じた前記1つ又は複数の哺乳類体液の貫流を同時に許容するように構成され、ここで前記装置の使用において、前記1つ又は複数の哺乳類体液が前記入口端部キャップ及び前記流体入口ポートを通して前記制御容積に入り、前記制御容積を出た後、前記出口端部キャップ及び前記流体出口ポートを通して流れる、の少なくとも1つである、及び／又は

(iii) 前記バリア部材が、各々、それを通じた前記1つ又は複数の哺乳類体液の貫流を可能にする複数の開口であって、前記粒子より小さいサイズの開口を含む、の少なくとも1つである、請求項6に記載の装置。

30

【請求項8】

複数の装置を含む、1つ又は複数の哺乳類体液から少なくとも1つの線溶タンパク質を枯渇させることに用いられる装置一式であって、各装置が、請求項5～7のいずれか1項に記載のとおりであり、前記複数の装置のうちの前記装置が、前記複数の装置のそれぞれの前記制御容積間に流体連通を提供するようにして相互接続される、装置一式。

【請求項9】

(a) 前記複数の装置のうちの一つが直列に相互接続され、前記直列に相互接続された前記装置のうちの一つについて、前記対の一つの一方の前記装置のそれぞれの前記流体入口ポートが、前記対の一つのもう一方の前記装置のそれぞれの前記流体出口ポートに接続され且つそれと流体連通している、

40

(b) 前記複数の装置の一つが並列に相互接続され、前記並列に相互接続された前記装置について、それぞれの前記流体入口ポートが互いに相互接続され且つ流体連通し、及びそれぞれの前記流体出口ポートが互いに相互接続され且つ流体連通している、及び／又は

(c) 前記複数の装置の一つが並列に相互接続され、前記並列に相互接続された前記装置について、それぞれの前記流体入口ポートが少なくとも1つの供血側血漿リザーバに接続され且つそれと流体連通し、及び前記それぞれの前記流体出口ポートが少なくとも1つの受血側血漿リザーバに接続され且つそれと流体連通している、の少なくとも1つである、請求項8に記載の装置一式。

50

【請求項 10】

1つ又は複数の哺乳類体液から少なくとも1つの線溶タンパク質を枯渇させるためのキットであって、

- － 請求項 5～7 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 つの装置、
- － 前記少なくとも 1 つの入口ポートと選択的に流体連通している生理食塩水リザーバ；
- － 受血側血漿リザーバ及び洗浄廃液リザーバであって、前記少なくとも 1 つの流体出口ポートと選択的且つ非同時に流体連通している受血側血漿リザーバ及び洗浄廃液リザーバを含むキット。

【請求項 11】

1つ又は複数の哺乳類体液から少なくとも1つの線溶タンパク質を枯渇させるシステムであって、

- － 請求項 5～7 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 つの装置、
- － 生理食塩水リザーバ及び供血側リザーバであって、前記少なくとも 1 つの流体入口ポートと選択的且つ非同時に流体連通している生理食塩水リザーバ及び供血側リザーバ；受血側血漿リザーバ及び洗浄廃液リザーバであって、前記少なくとも 1 つの流体出口ポートと選択的且つ非同時に流体連通している受血側血漿リザーバ及び洗浄廃液リザーバを含むシステム。

【請求項 12】

1つ又は複数の哺乳類体液又はその任意の製剤から少なくとも1つの線溶タンパク質を枯渇させるエキソビオ又はインビトロの方法であって、前記方法が、

(i) 前記 1つ又は複数の体液を前記少なくとも1つの線溶タンパク質に特異的なアフィニティー枯渇手順に供するステップ；及び

(ii) ステップ (i) で得られた前記少なくとも1つの線溶タンパク質が枯渇した体液を回収するステップを含む；

前記アフィニティー枯渇手順が、前記体液を有効量の複数のコンジュゲート又は前記複数のコンジュゲートを含む組成物と接触させること、又は前記複数のコンジュゲート又は組成物を含む装置、装置一式、キット又はシステムに前記体液を適用することを含み、各コンジュゲートが粒子と少なくとも1つのリンカーと少なくとも1つのアミノ酸、その誘導体又はその類似体とを含み、前記複数のコンジュゲートが少なくとも2つの異なるコンジュゲートを含み、前記アミノ酸、その誘導体又はその類似体が、トラネキサム酸であり、及び前記複数のコンジュゲート又は組成物が請求項 1 又は 2 に記載のとおりであり、前記コンジュゲートが請求項 3 又は 4 に記載のとおりであり、前記装置が請求項 5～7 のいずれか 1 項に記載のとおりであり、前記装置一式が請求項 8 又は 9 に記載のとおりであり、前記キットが請求項 10 に記載のとおりであり、及び前記システムが請求項 11 に記載のとおりである、方法。

【請求項 13】

(a) 前記体液が、少なくとも1つの凝固因子を含む全血、血漿又は血液由来製剤のうちの少なくとも1つである、

(b) 前記血液由来製剤が、全血、血漿、新鮮凍結血漿 (FFP)、多血小板血漿 (PRP) 及びクリオプレシペートのうちの少なくとも1つである、

(c) 前記線溶タンパク質が、プラスミノゲン及び組織プラスミノゲン活性化因子 (tPA) のうちの少なくとも1つである、

(d) 前記方法が、前記線溶タンパク質枯渇体液における凝固時間及び総凝血塊溶解時間のうちの少なくとも一方を決定することにより、ステップ (ii) で回収された前記線溶タンパク質枯渇体液中のプラスミノゲンの量を測定するステップを更に含む、及び／又は

(e) 前記方法が、線溶活性が低下している少なくとも1つの血液及び／又は血液由来製剤の調製における使用のためである、

の少なくとも1つである、請求項 12 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 14】

それを必要としている対象の1つ又は複数の体液から少なくとも1つの線溶タンパク質を体外手技によって枯渇させる方法における使用のための体外機器内、又は前記体外機器に接続した装置、装置一式、キット若しくはシステム内に含まれる有効量の複数のコンジュゲート又はその組成物であって、前記方法が、

(i) 前記対象の体液を体外機器へと移送するステップ；

(ii) 前記体液を少なくとも1つの線溶タンパク質に特異的なアフィニティー枯渇手順に供するステップであって、前記枯渇が、前記機器への及びそこからの血液の移送前、移送中又は移送後に実施され、それにより少なくとも1つの線溶タンパク質が枯渇した前記対象の体外体液が入手されるステップ；及び

(iii) ステップ(ii)で入手した前記体液を前記対象に再導入又は返還するステップを含み；

前記アフィニティー枯渇手順が、前記体外機器内、又は前記体外機器に接続した装置、装置一式、キット若しくはシステム内に含まれる前記有効量の複数のコンジュゲート又はその組成物に前記体液を接触させることを含み、各コンジュゲートが粒子と少なくとも1つのリンカーと少なくとも1つのアミノ酸、その誘導体又はその類似体とを含み、前記複数のコンジュゲートが少なくとも2つの異なるコンジュゲートを含み、及び前記アミノ酸、その誘導体又はその類似体が、トラネキサム酸であり、及び前記複数のコンジュゲート又は組成物が請求項1又は2に記載のとおりであり、前記コンジュゲートが請求項3又は4に記載のとおりであり、前記装置が請求項5～7のいずれか1項に記載のとおりであり、前記装置一式が請求項8又は9に記載のとおりであり、前記キットが請求項10に記載のとおりであり、及び前記システムが請求項11に記載のとおりである、有効量の複数のコンジュゲート又はその組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、凝固及び輸血医学の分野に関する。より具体的には、本発明は、生体液から線溶剤を枯渇させるための特別な装置及びマトリックス、結果として得られる線溶活性を欠いている生体液製剤、その方法及び使用を提供する。

【0002】

背景技術

本明細書に開示される主題に背景として関連すると考えられる参考文献を以下に挙げる。

Selighson U et al. Classification, Clinical Manifestations & Evaluation of Disorders of Hemostasis. In: Williams Hematology, 8th ed, 2010, pp2322-2330

Abdel-Wahab OI et al. Effect of fresh-frozen plasma transfusion on prothrombin time and bleeding in patients with mild coagulation abnormalities. Transfusion 2006; 46: 1279-1285

Holland LL et al. Toward rational fresh frozen plasma transfusion: The effect of plasma transfusion on coagulation test results. Am J Clin Pathol 2006; 126: 133-139

Meheux CJ et al. Efficacy of Intra-articular Platelet-Rich Plasma Injections in Knee Osteoarthritis: A Systematic Review. Arthroscopy, 2016, 32, 495-505

Pap G et al. Expression of stromelysin and urokinase type plasminogen activator protein in resection specimens and biopsies at different stages of osteoarthritis of the knee. Pathol. Res. Pract. 2000, 196: 219-226

米国特許第7,125,569号

米国特許第3,998,946号

【0003】

本明細書に上記の参考文献を認めることをもって、それらの参考文献が何らかの形で本

10

20

30

40

50

明細書に開示される主題の特許性に関連することを意味すると推論されてはならない。

【背景技術】

【0004】

発明の背景

正常な止血は、極めて繊細な均衡の上に成り立っているシステムである。それがあべきとおりに機能しているとき、血液は血管系内で流体状態に維持され、しかし傷害を塞ぐ必要が生じると速やかに凝血する。1960年代に2つのグループが凝血塊形成モデルを提案しており、これは一つの凝血（凝固）因子の活性化が別の因子の活性化につながり、最終的に凝血塊形成につながる一連の逐次的な段階を想定したものであった。これらの凝固因子が逐次的活性化により凝血塊の形成を生じさせると、線溶系と呼ばれる対応するシステムが更に活性化され、凝血塊の融解（溶解）の原因となる。この線溶系は抗凝血タンパク質（プラスミノゲン活性化因子、プラスミノゲン及びプラスミン）を含み、これが逐次的活性化を受けて凝血塊の溶解につながる（Selighson U et al.）。

10

【0005】

凝固因子の欠乏に起因する止血機能不全は、凝血塊形成の障害（又は欠如）を引き起こす。同様に、過剰な線溶活性の結果、形成された凝血塊の急速且つ不必要な融解が生じる。他方で、凝固カスケードが過度に刺激され又は線溶系が抑制されれば、病的凝血塊の形成が引き起こされ得る。従って、上記システムの各々が不全となる帰結は、出血又は凝固傾向の増大である可能性がある。

【0006】

20

補充療法は出血性障害の治療に有効であるが、しかしながら、この治療は十分でないこともある。出血患者又は凝固検査に延長が認められる患者には、それが止血を改善し、出血を修正及び／又は防止するであろうという想定のもとに、高頻度で新鮮凍結血漿（FFP）が輸血される。マサチューセッツ総合病院（Massachusetts General Hospital）にて実施された前向き監査（prospective audit）において、プロトロンビン時間（PT）及び国際標準化比（INR）などの凝固パラメータに対するFFPの効果が調査された（Abdel-Wahab OI et al.）。データは、このセッティングでのFFP輸血が99%の患者でPTを修正できず、僅か15%の患者においてINRが正常値の少なくとも半分に修正されたに過ぎなかったことを示した。同様に、Holland et al.は、FFPでは時間が経つにつれINRが変化しなくなったことを報告した。この研究者らは、FFPがINRを修正できないのは、注入されたFFP中に存在する凝固因子が被輸血者の血漿によって希釈されたことが原因であるとの仮説を立てた。FFPは凝固系及び線溶系の全ての成分（タンパク質）を含有し、従って理論的には遺伝性又は後天性凝固因子欠乏症患者の出血の治療に好適である。加えて、この製剤は、凝固障害を伴う対象の手術手技前、手技中及び手技後の出血を防止するはずである。しかしながら、こうした血漿由来製剤は凝固因子に加えて線溶タンパク質を含有するため、製剤の凝固因子の補充中及び補充後に形成された止血凝血塊の望ましくない溶解（融解）を引き起こす可能性がある。

30

【0007】

従って、現在に至るまで、過剰出血の治療には限られた解決法しかないように見える。米国では毎年19万2千人を超える患者が、傷害に関連した失血が原因で死亡している（National trauma instituteによる）。大量の失血は、外傷手術、分娩、播種性血管内凝固症候群（DIC）、消化管出血等に付随して起こる。これらの例では、いずれにおいても出血を止める効率的な血漿輸血が必要である。しかしながら、最近の研究によれば、血漿輸血では大量出血を食い止めることができず、一方で他の治療は低い有効性及び死亡リスクの増加を示すことが明らかになっている。大多数の治療選択肢は凝固の増強に重点が置かれるが、しかしながらそうした大量出血治療によっては不十分な転帰しか得られず、場合によっては死亡に至る。対照的に、同様に大量出血に寄与する線溶亢進に対しては、治療が幾つかある。線溶亢進は、潜在的に線溶活性がフィブリン形成より速く、凝血塊の完全性が脅かされるようになると起こる。現在、外傷患者の57%及び肝硬変患者の60%が線溶亢進を呈し、従って凝固増強によるこれらの患者の転帰は不良であるものの、別

40

50

の治療選択肢はない。本明細書に開示される主題は、線溶亢進の原因となる血漿タンパク質を有効且つ特異的に抽出及び除去する革新的な体外装置を生み出すために開発された。本明細書に開示される主題の医療装置を使用すると、医師は輸血用血漿を改善し、止血を線溶亢進から凝固へとシフトさせ、ひいては大量出血を防止することができる。

【0008】

米国特許第3,998,946号は、フィブリンへの重合化なしにフィブリノーゲンを除去し、プラスミノゲン及びプラスミン並びに他の化合物を除去するが、凝固第Ⅰ因子は保持するヒュームドコロイドシリカによる血漿の処理方法又は関連製剤を開示している。フィブリノーゲンを欠いているため、得られる製剤は凝血塊形成を支持することができず、そのため出血性及び止血障害の治療には使用することができない。

【0009】

米国特許第7,125,569号、並びにその対応する出願及び特許は、1つ又は複数のタンパク質混合物からプラスミン（プラスミノゲン）のみを除去するための極めて特殊な樹脂を用いた特異的方法を開示している。得られる製剤は、生体用接着剤として用いられるプラスミン（プラスミノゲン）不含フィブリノーゲンを調製する目的で作製された。しかしながら、得られる混合物はなお組織プラスミノゲン活性化因子（tPA）を含有し、そのため明らかに線溶活性を呈する。より具体的には、この製剤中のtPAが治療部位でプラスミノゲンを活性化したため、それが新しく形成されたフィブリン網の切断につながった。プラスミノゲンは通常は血中に高濃度で存在し（約2 μ M）、従って何らかの手術介入中に何らかの血液漏出があると、血管外部位のプラスミノゲン濃度が上昇する。更に、手術介入中にかかる接着剤が傷害血管に塗布される場合、生体用接着剤中に存在するtPAが血中に存在するプラスミノゲンに接触し、それによって線溶カスケードが活性化し得る。従って、米国特許第7,125,569号に開示されるプラスミノゲン不含製剤は、生体用接着剤としての局所適用にのみ使用されてもよく、輸血における全身使用又は線溶療法若しくは血栓溶解療法に関連する出血の治療には不適切である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

従って、当該技術分野では、哺乳類体液、具体的には血液、血漿及びその任意の製剤から線溶タンパク質を枯渇させる有効な装置及びコンジュゲートが必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0011】

発明の概要

第1の態様において、本開示は、各コンジュゲートが粒子と少なくとも1つのリンカーと少なくとも1つのアミノ酸、その誘導体又はその類似体とを含む複数のコンジュゲート又は複数のコンジュゲートを含む組成物を提供し、ここで複数のコンジュゲートは少なくとも2つの異なるコンジュゲートを含む。アミノ酸又はその類似体は、4-（アミノメチル）シクロヘキサンカルボン酸（トラネキサム酸）、 ϵ -アミノカプロン酸（本明細書ではアミノカプロン酸とも称される）及びリジンのうちの少なくとも1つ又はこれらの任意の組み合わせであってもよく、ここでアミノ酸誘導体は、シクロヘキサンカルボン酸、4-メチルシクロヘキサンカルボン酸のうちの少なくとも1つ又はこれらの任意の組み合わせであってもよい。

【0012】

一部の更なる態様において、本開示は、少なくとも1つの粒子と少なくとも1つのリンカーと少なくとも1つのアミノ酸、その誘導体又はその類似体とを含むコンジュゲートを提供する。一部の具体的な実施形態において、本明細書に開示される主題のコンジュゲートは、

10

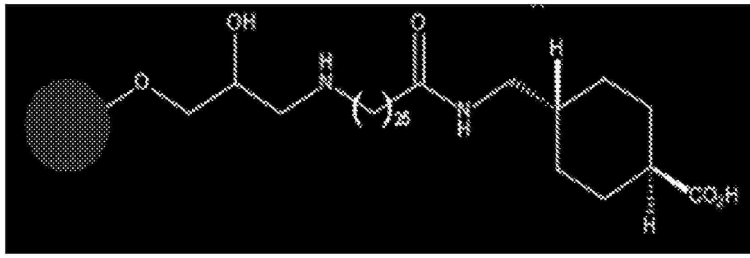
20

30

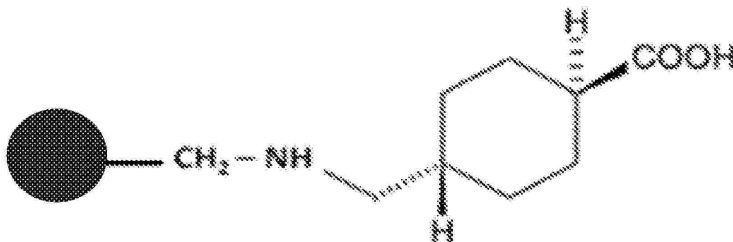
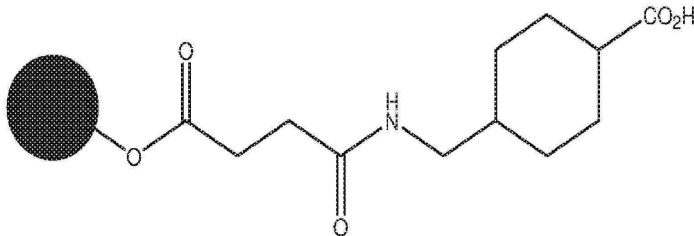
40

50

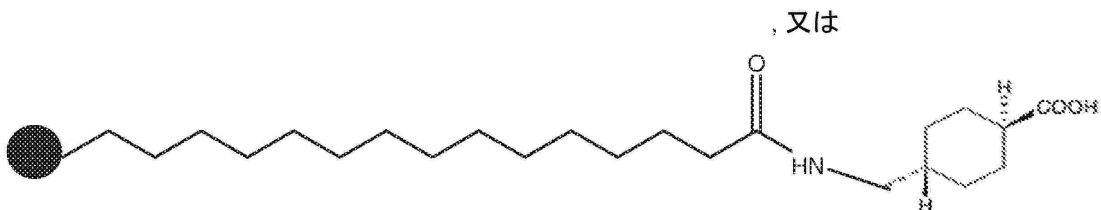
【化 1】



10



20



30

(式中、
【化 2】



は粒子を表す) のうちのいずれか 1 つであってもよい。

【0013】

40

なおも別の態様において、本明細書に開示される主題は、1 つ又は複数の哺乳類体液から少なくとも 1 つの線溶タンパク質を枯渇させる装置を提供し、この装置は、

— 少なくとも 1 つの流体入口ポートと、少なくとも 1 つの流体出口ポートとを有するハウジングを含み；

— このハウジングは少なくとも 1 つのチャンバを備え、前記少なくとも 1 つのチャンバは、少なくとも 1 つの流体入口ポート及び少なくとも 1 つの流体出口ポートと流体連通している制御容積を画成し；

— 前記制御容積は、本明細書に開示される主題により定義されるとおりの複数のコンジュゲート又は複数のコンジュゲートを含む組成物及び本明細書において上記に定義される

50

とおりのコンジュゲートのうちの少なくとも一方を収容する。

【0014】

本明細書に開示される主題の別の態様によれば、1つ又は複数の哺乳類体液から少なくとも1つの線溶タンパク質を枯渇させる装置が提供され、この装置は、

－ 少なくとも1つの流体入口ポートと、少なくとも1つの流体出口ポートとを有するハウジング

を含み；

－ このハウジングは少なくとも1つのチャンバを備え、前記少なくとも1つのチャンバは、少なくとも1つの流体入口ポート及び少なくとも1つの流体出口ポートと流体連通している制御容積を画成し；

－ 前記制御容積は、第1の粒子の第1の集合と第2の粒子の第2の集合とを少なくとも含む複数の粒子集合を収容し；

－ ここで前記第1の粒子は前記第2の粒子と寸法が異なり；

－ ここで前記第1の粒子及び前記第2の粒子のうちの少なくとも一方は、アミノ酸、その誘導体又はその類似体とコンジュゲートしたコンジュゲート粒子であり、ここで前記アミノ酸又はその類似体は、4－（アミノメチル）シクロヘキサンカルボン酸（トラネキサム酸）、 ϵ －アミノカプロン酸及びリジンのうちの少なくとも1つであり、及び前記そのアミノ酸誘導体は、シクロヘキサンカルボン酸、4－メチルシクロヘキサンカルボン酸又はこれらの任意の組み合わせである。

【0015】

例えば、前記第1の粒子及び前記第2の粒子はコンジュゲート粒子であり、各コンジュゲート粒子がアミノ酸、その誘導体又はその類似体とコンジュゲートしており、ここで各前記アミノ酸又はその類似体は、4－（アミノメチル）シクロヘキサンカルボン酸（トラネキサム酸）、 ϵ －アミノカプロン酸及びリジンのうちの少なくとも1つであり、及び前記そのアミノ酸誘導体は、シクロヘキサンカルボン酸、4－メチルシクロヘキサンカルボン酸又はこれらの任意の組み合わせである。

【0016】

加えて、及び／又は代わりに、例えば、前記第1の粒子及び前記第2の粒子はTXAコンジュゲート粒子、具体的には、シクロヘキサンカルボン酸コンジュゲート粒子、4－メチルシクロヘキサンカルボン酸コンジュゲート粒子又はこれらの任意の組み合わせである。なおも加えて、例えば、前記第1の粒子及び前記第2の粒子はTXAコンジュゲート粒子である。

【0017】

本明細書で使用されるとき、用語のコンジュゲート粒子とは、アミノ酸、その誘導体又はその類似体にリンカーを介してコンジュゲートした粒子を指す。

【0018】

加えて、又は代わりに、例えば、前記コンジュゲート粒子は、本明細書において上記に定義される複数のコンジュゲート又は組成物によって定義される。

【0019】

加えて、又は代わりに、例えば、前記ハウジングは長手方向軸を含み、及び本体部分と、前記少なくとも1つの流体入口ポートを有する入口端部キャップ、及び前記少なくとも1つの流体出口ポートを有する出口端部キャップを含む一対の端部キャップとを含む。

【0020】

例えば、前記制御容積は、本体部分の長手方向両端に提供される対応するバリア部材によって画成される。

【0021】

例えば、前記バリア部材は、前記制御容積から前記粒子が抜け出ることを防止するように構成される。

【0022】

例えば、前記バリア部材は、制御容積を通じた1つ又は複数の哺乳類体液の貫流を同時

10

20

30

40

50

的に許容するように構成されるか、又は前記バリア部材は、制御容積を通じた1つ又は複数の哺乳類体液の貫流を同時に許容するように構成され、ここで装置の使用時、1つ又は複数の哺乳類体液は入口端部キャップ及び流体入口ポートを通して制御容積に入り、制御容積を出た後、出口端部キャップ及び流体出口ポートを通して流れる。

【0023】

加えて、又は代わりに、例えば、前記バリア部材は各々が、それを通じた1つ又は複数の哺乳類体液の貫流を可能にする複数の開口であって、前記粒子より小さいサイズの開口を含む。

【0024】

更なる態様において、本明細書に開示される主題は、複数の装置を含む、1つ又は複数の哺乳類体液から少なくとも1つの線溶タンパク質を枯渇させることに用いられる装置一式 (battery) に関し、ここで各装置は本明細書に開示される主題により定義されたとおりである。複数の装置のうちの装置は、前記複数の装置のそれぞれの前記制御容積間に流体連通を提供するようにして相互接続されている。

【0025】

本明細書に開示される主題の別の態様は、1つ又は複数の哺乳類体液から少なくとも1つの線溶タンパク質を枯渇させるためのキットに関し、このキットは、

- 本明細書に開示される主題により定義されたとおりの少なくとも1つの装置、
- 前記少なくとも1つの入口ポートと選択的に流体連通している生理食塩水リザーバ；
- 受血側血漿リザーバ及び洗浄廃液リザーバであって、前記少なくとも1つの流体出口ポートと選択的且つ非同時に流体連通している受血側血漿リザーバ及び洗浄廃液リザーバを含む。

【0026】

なおも別の態様において、本明細書に開示される主題は、1つ又は複数の哺乳類体液から少なくとも1つの線溶タンパク質を枯渇させるシステムを提供し、このシステムは、

- 本明細書に開示される主題により定義されたとおりの少なくとも1つの装置、
- 生理食塩水リザーバ及び供血側リザーバであって、前記少なくとも1つの流体入口ポートと選択的且つ非同時に流体連通している生理食塩水リザーバ及び供血側リザーバ；
- 受血側血漿リザーバ及び洗浄廃液リザーバであって、前記少なくとも1つの流体出口ポートと選択的且つ非同時に流体連通している受血側血漿リザーバ及び洗浄廃液リザーバを含む。

【0027】

従って、なおも別の態様において、本明細書に開示される主題は、1つ又は複数の哺乳類体液又はその任意の製剤から少なくとも1つの線溶タンパク質を枯渇させる方法に関する。より具体的には、この方法は、(i) 前記1つ又は複数の体液を少なくとも1つの線溶タンパク質に特異的なアフィニティー枯渇手順に供するステップ；及び(ii) ステップ(i) で得られた少なくとも1つの線溶タンパク質が枯渇した体液を回収するステップを含む。アフィニティー枯渇手順は、有効量の複数のコンジュゲート又は複数のコンジュゲートを含む少なくとも1つの組成物と体液を接触させることを含み得る点に留意すべきである。或いは、体液は、複数のコンジュゲート又はその任意の組成物を含む装置、装置一式、キット又はシステムに適用されてもよい。一部の実施形態において、各コンジュゲートは少なくとも1つの粒子と少なくとも1つのリンカーと少なくとも1つのアミノ酸、その誘導体又はその類似体とを含む。一部の具体的な実施形態において、複数のコンジュゲートは少なくとも2つの異なるコンジュゲートを含み、及びここで前記アミノ酸、その誘導体又はその類似体は、4-(アミノメチル)シクロヘキサンカルボン酸(トラネキサム酸)、ε-アミノカプロン酸、リジン、シクロヘキサンカルボン酸及び4-メチルシクロヘキサンカルボン酸のうちの少なくとも1つである。一部の更なる具体的な実施形態において、複数のコンジュゲートは少なくとも2つの異なるコンジュゲートを含み、及びここで前記アミノ酸、その誘導体又はその類似体は、4-(アミノメチル)シクロヘキサンカルボン酸(トラネキサム酸)、ε-アミノカプロン酸及びリジンのうちの少なくとも1

つである。

【0028】

なおも別の態様において、本明細書に開示される主題は、それを必要としている対象の出血性、止血障害及びそれに関連する任意の出血性又は病的状態の治療、防止、予防、改善、抑制方法を提供する。より具体的には、本方法は、線溶活性が低下した治療有効量の少なくとも1つの血液及び／又は血液由来製剤を治療下の対象に投与するステップを含み得る。一部の実施形態において、製剤は本明細書に記載されるとおりの方法により調製されてもよい。

【0029】

図面の簡単な説明

本明細書に開示される主題の更なる理解のため、及びそれが実際にどのように行われ得るかを例示するため、ここで実施形態について、添付の図面を参照しながら、あくまでも非限定的な例として説明する。

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1】図1：コンジュゲート2コンジュゲート2の調製についての化学反応の概略図。

【図2】図2：プラスミノゲン（PLG）検量線PLG濃度計算用の検量線を表すグラフ。

【図3】図3：プラスミノゲン枯渇クリオプレシピテート未処理のクリオプレシピテートとClearPlasmaを使用してろ過したクリオプレシピテートとのプラスミノゲン濃度を表すグラフ。

【図4】図4：コンジュゲート1（「アガロース4%ビーズにコンジュゲートしたTXA」）を有するClearPlasmaによる血漿ろ過血液の流れ及び血漿と赤血球の分離を示す概略図。加えて、この模式図は、tPAレベルが低下したプラスミノゲン枯渇血漿を生成するClearPlasmaの使用を示す。

【図5】図5：ClearPlasmaを使用するとブタの肝傷害における失血が減少するヒストグラムは、肝裂傷後30分間に見られたとおりの失血量を示す。統計量はスチューデントt検定（両側分布等分散）を用いて計算した。データは平均値±SDとして表す。P<0.05の値を有意と見なした。

【図6】図6A～6L：コンジュゲート1（「アガロース4%SuperflowビーズにコンジュゲートしたTXA」）を有するClearPlasmaは線溶活性を消失させるブタが血漿アフエレーシスを受け、血漿はClearPlasmaを用いて処理するか、又は未処理とした。結果として得られるブタ全血の凝固及び線溶をTEGにより判定した。

【図6A】図6A：麻酔前に対照ブタから入手した血液の凝固。

【図6B】図6B：麻酔前の0.083μM Wt-tPAでの対照ブタからの血液

【図6C】図6C：麻酔後の対照ブタの血液。

【図6D】図6D：麻酔後の0.083μM Wt-tPAでの対照ブタの血液。

【図6E】図6E：血漿アフエレーシス及びプラスミノゲン枯渇前の対照ブタの血液。

【図6F】図6F：0.083μM Wt-tPAでの血漿アフエレーシス及びプラスミノゲン枯渇前のブタの血液。

【図6G】図6G：血漿アフエレーシス前のブタの血液。

【図6H】図6H：0.083μM Wt-tPAでの血漿アフエレーシス前のブタの血液。

【図6I】図6I：血漿アフエレーシス及びプラスミノゲン枯渇後の対照ブタの血液。

【図6J】図6J：0.083μM Wt-tPAでの血漿アフエレーシス及びプラスミノゲン枯渇後のブタの血液

【図6K】図6K：血漿アフエレーシス制御後のブタの血液。

【図6L】図6L：0.083μM Wt-tPAでの血漿アフエレーシス後のブタの血液

【図7】図7A～7F：TEG分析-ClearPlasmaはヒト血漿中の線溶活性を消失させるClearPlasmaを通して流れる新鮮凍結血漿（PDPと称される）の凝固及び線溶を未処理

10

20

30

40

50

血漿（FFPと称されるとおり）の凝固及び線溶とトロンボエラストグラフィー（TEG）によって比較した。

【図7A】図7A：FFPは更なる処理なしに凝血塊形成を実証する。

【図7B】図7B：組織プラスミノゲン活性化因子（tPA-1.85 nM）を加えると凝血塊分解が生じる。

【図7C】図7C：図7A及び図7Bのオーバーレイ。

【図7D】図7D：プラスミノゲン枯渇血漿（PDP）は更なる処理なしに凝血塊形成を実証する。

【図7E】図7E：組織プラスミノゲン活性化因子（tPA-1.85 nM）を加えても凝血塊分解は生じなかった。

【図7F】図7F：図7D及び図7Eのオーバーレイ。このデータは（3つの独立した実験からの）代表的な実験を示している。

【図8】図8：マウスにおける尾切断後の出血時間ClearPlasma、血漿又は生理食塩水のいずれかで治療した尾切断後の個々のマウス（1～8番の番号を付与）の出血時間を示すグラフ。

【図9】図9：各マウスのペレットサイズ結果（24時間時点）ClearPlasma、血漿又は生理食塩水のいずれかで治療した尾切断後の個々のマウス（1～8番の番号を付与）のペレットサイズを示すグラフ。

【図10】図10：マウスにおける尾切断後の出血試験結果：出血試験からの血液細胞ペレットを遠心し、上清を吸引した。次に定規を用いてペレットサイズを測定した。ペレットサイズ測定値の統計的分析は、一元配置ANOVAと、続く事後LSD/SHELF（ $p < 0.05$ を有意と見なす）を用いて実施した。

【図11】図11A～図11B：ClearPlasmaはブタにおいてプラスミノゲン及びtPAタンパク質の両方のレベルを低下させる雌ブタが麻酔下でHaemonetics mcs+システムを使用した血漿アフエーシスを受けた。いずれの手順も同様に行った（血液ろ過量、治療される抗凝血物質、血漿採取時間及び量）。

【図11A】図11A：未ろ過対照血漿との比較におけるClearPlasmaでろ過したブタからの血漿試料（PDPと称される）中のプラスミノゲン枯渇を表すグラフ。

【図11B】図11B：未ろ過対照血漿との比較におけるClearPlasmaでろ過したブタからの血漿試料（PDPと称される）中のtPA枯渇を表すグラフ。4つの独立した実験からの代表的な結果。

【図12】図12：本装置本明細書に開示される主題の第1の例に係る装置を横断面側面図で示す。

【図12A】図12A：図12の例の代替的変形例に係る装置を分解等角図で示す。

【図12B】図12B：図12の例の代替的変形例に係る装置の一部を断面詳細側面図で示す。

【図13】図13：図13A～図13D：本装置

【図13A】図13A：図12の例に係る装置の本体部分を上面図で示す。

【図13B】図13B：図13Aの例に係る装置の本体部分を側面図で示す。

【図13C】図13C：図13Bの例に係る装置の本体部分をA-Aに沿った断面側面図で示す。

【図13D】図13D：図13Cの例に係る装置の「G」における一部を断面詳細側面図で示す。

【図14】図14：図14A～図14D：本装置の端部キャップ

【図14A】図14A：図12の例に係る装置の端部キャップを上面図で示す。

【図14B】図14B：図14Aの例に係る装置の端部キャップを側面図で示す。

【図14C】図14C：図14Bの例に係る装置の端部キャップをA-Aに沿った断面側面図で示す。

【図14D】図14D：図14Cの例に係る装置の「G」における一部を断面詳細側面図で示す。

10

20

30

40

50

【図 15】図 15：本システム本明細書に開示される主題の例に係るシステムを概略的に図示し、このシステムは洗浄構成にある。

【図 16】図 16：本システム図 15 の例に係るシステムを概略的に図示し、このシステムは治療構成にある。

【図 17】図 17：本キット図 15 の例に係るシステムに対応するキットを概略的に図示する。

【図 18】図 18：本システム本明細書に開示される主題の別の例に係るシステムを概略的に図示し、このシステムは装置の装置一式を含んでいる。

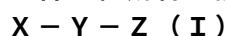
【図 19】図 19：本システム本明細書に開示される主題の別の例に係るシステムを概略的に図示し、このシステムは装置の装置一式を含んでいる。

【発明を実施するための形態】

【0031】

発明の詳細な説明

本開示は、その最も広義の態様によれば、複数のコンジュゲート又は複数のコンジュゲートを含む組成物を提供し、各コンジュゲートは一般式 (I)



のものであり、

式中：

X は、固体支持体部分、例えば粒子であり；

Y は、部分 X 及び Z を連結する化学反応性部分であり；

Z は、アミノ酸、その誘導体又はその類似体のうちの少なくとも 1 つを含む部分であり；及び

式中、各「-」は、相互作用／会合、例えばスペーサーとして働くか又は選択性を導く部分として働く 1 つ又は複数の介在原子を任意選択で含む化学結合を意味する。

【0032】

用語のアミノ酸とは、本明細書で使用されるとき、アミン ($-NH_2$) 基及びカルボキシル ($-COOH$) 基を含有する化合物 (例えば、有機化合物) を指し、本明細書に詳述されるとおりの、その任意の誘導体又はその任意の類似体を包含する。本開示との関連において用語「部分」は、本明細書に記載されるとおり機能する原子、原子団及び分子の任意の機能的断片を指し得る。部分はまた、カプセル、スフェア、ナノ粒子、リボソーム等、本明細書に記載されるとおり機能する少なくとも 1 つの材料の (即ち単一の原子又は複数の原子の) 物理的要素の形態であってもよい。

【0033】

「アミノ酸類似体」は、天然に存在するアミノ酸と同じ化学構造、即ち、カルボキシル基及びアミノ基、又は R 基を有する化合物 (本明細書では構造的類似体とも称される) である。例としては、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムが挙げられる。なおも一部の更なる実施形態において、用語のアミノ酸類似体はまた、機能的類似体、具体的には同じ生物学的機能を果たす分子も包含する。あるアミノ酸、例えばリジンのかかる機能的類似体の非限定的な例はトラネキサム酸 (TXA) であり、これはリジンに対する機能的類似体として働き、そのためプラスミノーゲン上の 4～5 個のリジン受容体部位と可逆的に結合することによって抗線溶剤として機能する。

【0034】

「アミノ酸誘導体」は、本明細書で使用されるとき、アミノ酸又はその任意の類似体 (構造的及び／又は機能的) の断片 (一部、部分)、例えば少なくともアミノ基を欠く断片を少なくとも含む類似体化合物である。具体的な例では、アミノ酸誘導体は、アミノ酸又はその類似体のシクロヘキサンカルボン酸断片、即ちアミノ基を欠く断片を含む。

【0035】

アミノ酸、その誘導体又はその類似体は、一部の実施形態において、4- (アミノメチル) シクロヘキサンカルボン酸 (トラネキサム酸)、 ϵ -アミノカプロン酸、リジン、シ

10

20

30

40

50

クロヘキサンカルボン酸、4-メチルシクロヘキサンカルボン酸のうちの少なくとも1つ又はこれらの任意の組み合わせであってもよい。

【0036】

第1の態様において、本開示は、各コンジュゲートが粒子と少なくとも1つのリンカーと少なくとも1つのアミノ酸、その誘導体又はその類似体とを含む複数のコンジュゲート又は複数のコンジュゲートを含む組成物を提供する。一部の実施形態において、複数のコンジュゲートは少なくとも2つの異なるコンジュゲートを含む。なおも更に、一部の実施形態において、アミノ酸、その誘導体又はその類似体は、4-(アミノメチル)シクロヘキサンカルボン酸(トラネキサム酸)、 ϵ -アミノカプロン酸、リジン、シクロヘキサンカルボン酸及び4-メチルシクロヘキサンカルボン酸のうちの少なくとも1つ又はこれらの任意の組み合わせであってもよい。なおも更に、一部の実施形態において、アミノ酸、その誘導体又はその類似体は、4-(アミノメチル)シクロヘキサンカルボン酸(トラネキサム酸)、 ϵ -アミノカプロン酸及びリジンのうちの少なくとも1つ、又はこれらの任意の組み合わせであってもよい。なお一部の実施形態において、アミノ酸、その誘導体又はその類似体はトラネキサム酸(TXA)であってもよい。

【0037】

コンジュゲートとは、本明細書で使用されるとき、少なくとも1つの粒子、少なくとも1つのリンカー及び少なくとも1つのアミノ酸、その誘導体又はその類似体を含めた幾つかの要素(成分)で構成され、それらが全てそこに会合している化合物を指す。本願では「少なくとも1つの粒子」と表現されるが、特許請求される複数のコンジュゲートに適用可能な任意の固体支持体が本明細書に包含されることに留意しなければならない。

【0038】

本明細書に開示される主題のコンジュゲート又はその任意の組成物のうちのいずれか1つはまた、物質の組成物(composition of matter)とも称され得る。ほとんどの一般的な用語において、「物質の組成物」は「コンジュゲート」と同様に(両者とも同義的に使用される)、少なくとも1つの粒子と少なくとも1つのリンカーと少なくとも1つのアミノ酸、その誘導体又はその類似体との会合であって、以下に詳述するとおり、全体としてのその物質の組成物(又はコンジュゲート)に帰され得る且つその個別の状態ではコンジュゲート(conjugate)の成分のうちのいずれの1つにも帰されないものであり得る特性を生み出す会合を指す。

【0039】

一部の実施形態において、本明細書に開示される主題のコンジュゲートのうちのいずれか1つは、少なくとも1つの粒子とリンカーである少なくとも1つの化学反応性部分との会合及び少なくとも1つのリンカーと少なくとも1つのアミノ酸、その誘導体又はその類似体との会合(association)であって、リンカーが粒子とアミノ酸、その誘導体又はその類似体との間に位置し、従って一方の末端で(一方のアームで)粒子に会合し、もう一方の末端で(第2の異なるアームで)アミノ酸、その誘導体又はその類似体に会合しているような会合を包含する。

【0040】

本明細書で使用されるとき、用語「会合」又はその任意の語学上の変化形は、2つの実体(例えば粒子とリンカー)を一体に保持する化学的力又は物理的力を指す。かかる力は、当業者に公知のいかなる種類の化学的又は物理的結合相互作用であってもよい。かかる会合相互作用の非限定的な例は、共有結合、イオン結合、配位結合、錯体化、水素結合、ファンデルワールス結合、疎水性-親水性相互作用等である。従って、リンカーと少なくとも1つの粒子の、及びリンカーとアミノ酸の会合/コンジュゲーションは、共有結合、静電相互作用、酸塩基相互作用、ファンデルワールス相互作用等を含めた任意の化学結合によるものであってよい。理解されるとおり、粒子及びリンカーの会合と、リンカーとアミノ酸、その誘導体又はその類似体の会合とは同じであってもよく、又は以下に更に詳述するとおり異なってもよい。

【0041】

例えば及び以下に詳述するとおり、シクロヘキサンカルボン酸又は4-メチルシクロヘキサンカルボン酸である（即ちアミノ酸類似体の少なくともNH₂基（アミノ基）を欠いている）アミノ酸誘導体について、リンカーは、アミノ基（単独での、又はメチレン基に結合した、即ち-NH₂-CH₂-である（「-」は共有結合である））を含んでもよい。代替的な例では、アミノ酸又はその類似体（即ちアミノ酸のNH₂基（アミノ基）を含む）について、リンカーはアミノ基（単独での、又はメチレン基に結合した、即ち-NH₂-CH₂-である（「-」は共有結合である））を含まなくてもよい。

【0042】

上記に指摘したとおり、複数のコンジュゲートは、本明細書に開示される主題によって組成物で提供されてもよい。本明細書で使用されるとおりの組成物は、少なくとも2つの異なるコンジュゲートを含む複数のコンジュゲートを含む。異なるコンジュゲートとは、少なくとも1つのパラメータが異なると理解されるべきであり、より具体的には、コンジュゲート成分のうちの少なくとも1つ、例えば粒子、リンカー、アミノ酸、その誘導体又はその類似体、時にコンジュゲート成分のうちの少なくとも2つ及び時にコンジュゲート成分のうちの少なくとも3つの少なくとも1つのパラメータ又は特性の点で異なる種々のコンジュゲートであると理解されるべきである。従って、複数のコンジュゲート又はその組成物のうちの少なくとも2つの異なるコンジュゲートが、異なる粒子及び／又は異なるリンカー及び／又は異なるアミノ酸、その誘導体又はその類似体を含み得る。換言すれば、本明細書で「異なるコンジュゲート」と称されるコンジュゲートは、少なくとも1つ、少なくとも2つ又は3つ全ての成分が同一でない（例えば異なる）ようなコンジュゲート成分、例えば粒子、リンカー、アミノ酸を含む。

【0043】

一部の実施形態において、少なくとも2つの異なるコンジュゲートは異なる粒子を含む。

【0044】

一部の実施形態において、少なくとも2つの異なるコンジュゲートは異なるリンカーを含む。

【0045】

一部の実施形態において、少なくとも2つの異なるコンジュゲートは異なるアミノ酸、その誘導体又はその類似体を含む。

【0046】

一部の実施形態において、少なくとも2つの異なるコンジュゲートは、同一の粒子、同一のリンカー及び異なるアミノ酸、その誘導体又はその類似体を含む。

【0047】

一部の他の実施形態において、少なくとも2つの異なるコンジュゲートは、同一の粒子、異なるリンカー及び同一のアミノ酸、その誘導体又はその類似体を含む。

【0048】

一部の他の実施形態において、少なくとも2つの異なるコンジュゲートは、異なる粒子、同一のリンカー及び同一のアミノ酸、その誘導体又はその類似体を含み得る。

【0049】

一部の実施形態において、少なくとも2つの異なるコンジュゲートは、異なる粒子及び異なるリンカーを含む。一部の実施形態において、少なくとも2つの異なるコンジュゲートは、異なる粒子、異なるリンカー及び同一のアミノ酸、その誘導体又はその類似体を含む。

【0050】

一部の実施形態において、少なくとも2つの異なるコンジュゲートは、異なる粒子及び異なるアミノ酸、その誘導体又はその類似体を含む。一部の実施形態において、少なくとも2つの異なるコンジュゲートは、異なる粒子、異なるアミノ酸、その誘導体又はその類似体及び同一のリンカーを含む。

【0051】

一部の実施形態において、少なくとも2つの異なるコンジュゲートは、異なるリンカー

及び異なるアミノ酸、その誘導体又はその類似体を含む。一部の実施形態において、少なくとも2つの異なるコンジュゲートは、異なるリンカー、異なるアミノ酸、その誘導体又はその類似体及び同一の粒子を含む。

【0052】

一部の実施形態において、少なくとも2つの異なるコンジュゲートは、異なる粒子、異なるリンカー及び異なるアミノ酸、その誘導体又はその類似体を含む。

【0053】

用語の異なるリンカーとは、異なる点がリンカーの化学式などのリンカー特性であり得るというように理解されなければならない。

【0054】

上述のとおり、本明細書に開示される主題によって提供されたとおりの複数のコンジュゲート又はその任意の組成物は、少なくとも2つの異なるコンジュゲート、少なくとも3つの異なるコンジュゲート、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも10の異なるコンジュゲート、少なくとも11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100又はそれ以上の異なるコンジュゲートを含み得る。

【0055】

なおも更に、異なるコンジュゲートと言うとき、それは、異なる点が、コンジュゲート又はその任意の成分（例えば、粒子、リンカー及びアミノ酸）の少なくとも1つの特徴（特性、パラメータ）、例えば、サイズ、化学組成、形状、構造、密度、伝導率、溶解度、材料等であり得るというように理解されなければならない。例えば、サイズ及び／又は異なる組成及び／又は異なる形状及び／又は異なる構造のうちの少なくとも1つの点で異なる粒子、リンカー又はアミノ酸のうちの少なくとも1つは、異なる粒子と見なされる。

【0056】

意外にも、本明細書に記載されたとおりの少なくとも2つの異なるコンジュゲートを含む複数のコンジュゲート又は少なくとも2つの異なるコンジュゲートを含む組成物が、体液、具体的には血液、血漿及び任意の血液製剤からのプラスミノゲン、プラスミン及び／又はtPAなどの線溶タンパク質の枯渇において有効であることが分かった。

【0057】

一部の実施形態において、複数のコンジュゲートは、約10 µm以下～約500 µm以上の間の平均粒径を有する粒子を含む。具体的には、µm、20 µm、30 µm、40 µm、50 µm、60 µm、70 µm、80 µm、90 µm、100 µm、110 µm、120 µm、130 µm、140 µm、150 µm、160 µm、170 µm、180 µm、190 µm、200 µm、250 µm、300 µm、350 µm、400 µm、450 µm、500 µm又はそれ以上。一部の具体的な実施形態において、複数のコンジュゲートは、少なくとも70 µm以下、時に少なくとも80 µm、時に少なくとも90 µm、時に少なくとも100 µm、時に少なくとも110 µm、時に少なくとも120 µm、時に少なくとも130 µm、時に少なくとも140 µm、時に少なくとも150 µmの平均粒径を有する粒子を含む。一部の実施形態において、複数のコンジュゲートは約90 µm～約150 µm以上の間の平均粒径を有する。

【0058】

用語「平均径 (average size)」又は「平均直径 (average diameter)」又は「径平均値 (mean size)」は、直径測定値の算術平均値を指し、ここで直径は平均値の±25%の範囲である。粒子の径平均値は、当該技術分野において公知の任意の方法によって測定することができる。

【0059】

一部の実施形態において、複数のコンジュゲートは、平均径が異なる少なくとも2つの異なる粒子を含む。理論によって拘束されるものではないが、2つ以上の異なるサイズの粒子（例えばビーズ）を使用すると、表面積の最大化という利点が得られ、そのため体液

10

20

30

40

50

、例えば血漿が主にビーズの表面上を流れ、死空間がほとんどなくなることに留意しなければならない。異なるサイズのビーズが多くあると、樹脂床における自由空間が少なくなる。

【0060】

他方で、樹脂を緊密に充填すると、血漿が流れるところがほとんどなくなり、つまり流量が下がることになる。

【0061】

より具体的には、本発明者らは、意外にも、異なるサイズの粒子の混合物がマイクロ流体力学的流動性を改善し、同じ流量を維持しながらも、より多くの血漿をコンジュゲート（樹脂）に曝露し得ることを見出した。更に、少なくとも2つの粒径のコンジュゲートを混合するとビーズの量が減少し、従って使用するコンジュゲートのコストが最小限となり得る。一部の実施形態において、本明細書に開示される主題のコンジュゲートは、異なるサイズの少なくとも2つの粒子集合を使用したコンジュゲートを含む樹脂を形成し得る。一部の詳細な実施形態において、粒子は、約0.001:1~約1:10000、より具体的には、約0.01:1~1:10000、約1:1~1:1000の比で存在してもよい。なおも一部の更なる実施形態において、この比は、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:20、1:30、1:40、1:50、1:60、1:70、1:80、1:90、1:100、1:200、1:300、1:400、1:500、1:600、1:700、1:800、1:900、1:1000であってもよい。より具体的には、本明細書に開示される主題に係る複数のコンジュゲート又はその組成物の粒子は、一部の実施形態において約1:1~1:10、具体的には1:4の比を呈する少なくとも2つの異なるサイズであってもよい。一部の実施形態において、本明細書では本明細書に開示される主題の樹脂とも称される、本明細書に開示される主題の複数のコンジュゲートは、平均径が約90 µm以下の粒子と、平均径が150 µm以上の粒子との異なるコンジュゲートの混合物を含み得る。なおも一部の更なる具体的な実施形態において、本明細書に開示される主題の複数のコンジュゲート又は組成物は、平均径が90 µmの粒子と平均径が150 µmの粒子との4:1の比のコンジュゲートを含み得る。

【0062】

用語の粒子は、本明細書で使用されるとき、共有結合又は非共有結合のいずれかによって取り付けられてもよい、化学的又は生物学的化合物、小分子又は大分子に取り付けることのできる表面を有する物質の一部分を指す。粒子は多孔質材料を含み得る。粒子は、「球状」（概して、実質的に（ほぼ）丸いボールの幾何学的形状を指す）、又は「非球状」、例えば、「細長い」形状で、定義付けられた長軸及び短軸を有する）であってもよい。粒子の非限定的な例としては、多糖ビーズ、ガラスビーズ、綿ビーズ、プラスチックビーズ、ナイロンビーズ、ラテックスビーズ、磁性ビーズ、常磁性ビーズ、超常磁性ビーズ、デンプンビーズなど、シリコンビーズ、PTFEビーズ、ポリスチレンビーズ、ガリウムヒ素ビーズ、金ビーズ、又は銀ビーズのうちの少なくとも1つなどのビーズが挙げられる。一部の実施形態において、粒子は、任意選択で異なる架橋度、異なる材料（アガロース）%の、アガロースビーズを含むビーズである。

【0063】

このように、アガロースビーズは、様々な架橋度のアガロースを含むビーズ、例えばセファロースビーズと呼ばれるビーズを包含する。一部の実施形態において、ビーズはアガロースビーズを含む。一部の実施形態において、ビーズはセファロースビーズを含む。一部の実施形態において、複数のコンジュゲートは、アガロースビーズとセファロースビーズとを含む粒子の組み合わせを含む。本開示において、アガロースビーズ及びセファロースビーズのいずれかである粒子は、異なる粒子を有する2つの異なるコンジュゲートと見なされることに留意しなければならない。

【0064】

セファロースは、海藻から抽出された多糖ポリマー材料であるアガロースが架橋されて

ビーズ状になった形態のものの商標名である。その商品名は、セパレーションファルマシアアガロース (Separation-Pharmacia-Agarose) に由来する。セファロースは、GE Healthcare (旧Pharmacia、Pharmacia LKB Biotechnology、Pharmacia Biotech、Amersham Pharmacia Biotech、及びAmersham Biosciences) の登録商標である。様々なグレード及びケミストリーのセファロースが利用可能である。

【0065】

本明細書に記載されるとおり、複数のコンジュゲートは、異なるサイズ、異なる形状、異なる組成及び異なる材料など、異なる特性の粒子を任意選択で有する少なくとも2つの異なるコンジュゲートを含んでもよい。一部の実施形態において、複数のコンジュゲートは、平均径が約90 μm のアガロースビーズを含んでもよい。一部の実施形態において、複数のコンジュゲートは、平均径が約150 μm のアガロースビーズを含んでもよい。一部の実施形態において、複数のコンジュゲートは、平均径が約90 μm のセファロースビーズを含んでもよい。一部の実施形態において、複数のコンジュゲートは、平均径が約150 μm のセファロースビーズを含んでもよい。本開示において、平均径が約90 μm のセファロースビーズ及び平均径が約150 μm のセファロースビーズのいずれかである粒子は、異なる粒子を有する2つの異なるコンジュゲートと見なされることに留意しなければならない。

【0066】

本明細書に記載されるとおりの粒子、具体的にはビーズは、本明細書でリンカーと呼ばれる化学反応性部分に会合されてもよい。リンカーは、本明細書で使用されるとき、任意の長さのオリゴマー鎖及びポリマー鎖を含め、任意の原子集合で構成される任意の化学的実体であってよく、これは一部の実施形態によれば、一方の末端が粒子への、及び他方の末端が少なくとも1つのアミノ酸、その誘導体又はその類似体への結合能を有するものである。更に、本発明者らにより、粒子表面のリンカー被覆率は約9～約23 μmol ビーズ/ m^2 液抜き後媒体の範囲であり得ることが見出された。より具体的には、一部の実施形態において、液抜き後媒体とは、本明細書では乾燥ビーズを指すことに留意しなければならない。

【0067】

本明細書に記載されるとおり、リンカーは一端が粒子への、及び第2の端部がアミノ酸、その誘導体又はその類似体への結合能を有し、従ってリンカーは両側に官能性末端を有する。換言すれば、リンカーは二官能性リンカーであり得る。一部の実施形態において、リンカーは二官能性架橋剤であり、粒子は、この二官能性架橋剤に結合するビーズである。本明細書で使用されるとき、用語「架橋剤」は、アミノ酸、ペプチド、タンパク質又は他の分子上にある特異的官能基（例えば、第一級アミン、カルボキシル、スルフヒドリル等）と化学的に結び付く能力を有する反応性末端を2つ以上含む試薬を指す。

【0068】

一部の実施形態において、リンカー（又は架橋剤）は二官能性リンカーであってもよく、又は二官能性リンカーの一部／断片を含んでもよい。

【0069】

理解されるとおり、リンカーは様々な実験要件に応じて異なる長さを有し得る。長さとは、架橋剤の分子スパン、即ち、コンジュゲートした成分間、例えば粒子とアミノ酸との間の距離を指す。一部の実施形態において、架橋剤は切断可能である（即ち、必要に応じて連結を逆戻りさせる又は壊すことができるかどうか、例えばEDC）。一部の実施形態において、架橋剤はゼロ長さの架橋剤である。一部の実施形態において、架橋剤は、最終的な架橋共有結合の一部となることなく直接的なコンジュゲーションを生じさせる。架橋剤はホモ二官能性架橋剤又はヘテロ二官能性架橋剤であってもよい。ホモ二官能性架橋剤は、両末端に同じ種類の反応基を有する試薬である。アミン架橋剤（即ちアミン反応基に結合する）が、例えば、グルタルアルデヒド、ビス（イミドエステル）類又はビス（スクシンイミジルエステル）類（NHSエステルとしても知られる）から選択されてもよい。一部の実施形態によれば、限定はされないが、ピメルイミド酸ジメチル（DMP）又はグ

ルタルアルデヒドなどのホモ二官能性架橋剤は、磁性ビーズ上の NH_2 基（主要な基）と、トラネキサム酸の NH_2 基とに結合することができる。スルフヒドリル架橋剤が、例えばマレイミド類又はピリジルジチオール類から選択されてもよい。

【0070】

一部の実施形態において、リンカーはヘテロ二官能性架橋剤である。ヘテロ二官能性架橋剤は、両末端に異なる種類の反応基を有する試薬、例えば限定はされないが、アミン対スルフヒドリル又はアミン対カルボキシルである。

【0071】

アミン対スルフヒドリル架橋剤は各末端に NHS エステル類及びマレイミド類を有し、又は各末端に NHS エステル類及びピリジルジチオール類を有し得る。アミン基及びスルフヒドリル基を結合し得るヘテロ二官能性架橋剤の例は、限定はされないが、 N -スクシンイミジル-3-[2-ピリジルジチオ]-プロピオネート（SPDP）、スクシンイミジル-4-（ N -マレイミドメチル）シクロヘキサノ-1-カルボキシレート（SMCC）、又はスクシンイミジル-4-（ p -マレイミドフェニル）ブチレート（SMPB）から選択される。

【0072】

アミン対カルボキシル架橋剤はカルボジイミドを有し得る。第一級アミン類との反応が自然に起こるようにカルボキシル基を活性化し、かかるカルボジイミド架橋剤。こうした架橋剤は、カルボキシル基（グルタミン酸塩、アスパラギン酸塩、 C 末端）を第一級アミン類（リジン、 N 末端）及び N -ヒドロキシコハク酸イミド（ NHS ）にコンジュゲートし得る。アミン基及びカルボキシル基を結合し得るヘテロ二官能性架橋剤の例は、限定はされないが、ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）及び（1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（EDC）、1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド、塩酸塩（EDAC）から選択される。これらの架橋剤は、アミンコンジュゲーション用のカルボン酸塩の安定活性化のためカルボキシル基（グルタミン酸塩、アスパラギン酸塩、 C 末端）を第一級アミン類（リジン、 N -末端）及び N -ヒドロキシコハク酸イミド（ NHS ）にコンジュゲートするために使用される。

【0073】

一部の実施形態において、リンカーは芳香族系である。非限定的な例としては、安息香酸又は置換安息香酸、ベンゼンスルホニルクロリド、ベンズアルデヒド、クロロメチルベンゼンが挙げられる。

【0074】

一部の具体的な実施形態において、使用されるリンカーは1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（EDC）である。

【0075】

本明細書において上記に詳述されるとおり、アミノ酸誘導体、例えばシクロヘキサノカルボン酸又は4-メチルシクロヘキサノカルボン酸を含むコンジュゲート（即ちアミノ酸の NH_2 基（アミノ基）を欠いている）について、リンカーはアミノ基（単独での、又はメチレン基に結合した、即ち $-\text{NH}_2-\text{CH}_2-$ である（「 $-$ 」は共有結合である））を含んでもよい。従って、一部の実施形態において、本明細書に記載されるリンカーは、少なくとも追加のアミノ基又はメチレン基に結合したアミノ基を含み得ることに留意しなければならない。従って、かかる実施形態において、アミノ酸誘導体に結合するリンカー末端は、リンカーのアミノ基又はリンカーのメチレン基である。換言すれば、リンカーの一端とアミノ酸誘導体との間の会合は、シクロヘキサン環とアミノ基又はメチレン基との共有結合を含む。かかる会合は、当業者に公知の任意の公知の合成方法によることができる。

【0076】

一部の実施形態において、ビーズは、ビーズ上に存在するスペーサー又はコーティングを介してリンカーに会合されてもよい。このように、ビーズは初めにスペーサー／コーティングとの会合によって活性化され（「活性化ビーズ」）、次にリンカーと反応する。時

10

20

30

40

50

に、スペーサー／コーティングが少なくとも1つのアミノ酸に直接結合する場合、リンカーはそれ以上不要であり得ることに留意しなければならない。時に、リンカーへの結合能のある官能基がビーズになく、スペーサー又はコーティングが使用されてもよい。

【0077】

活性化ビーズは、ビーズへの結合及びリンカー及び／又はアミノ酸への結合を可能にする活性部分を有する好適な材料でビーズをプレコーティングすることにより入手される。換言すれば、ビーズは、リンカー又はアミノ酸のいずれかへの共有結合性の結合を可能にする反応基を含むようにプレコーティングされる。

【0078】

一部の実施形態において、ビーズは、例えば任意のコーティング材料でプレコーティングすることにより活性化されてもよい。かかる材料の非限定的な例としては、例えば、アミノ酸、タンパク質、エポキシ、トシル、カルボン酸、カルボキシル化ポリビニルアルコールが挙げられる。「プレコーティング」と言うとき、それは、結果としてビーズが活性材料でコーティングされ、ひいては活性材料によってトラネキサム酸との（即ち直接）又は少なくとも1つのリンカーを介したビーズの共有結合性の結合が可能となる予備的ステップと理解されなければならない。一部の実施形態において、ビーズは、アミノ酸、ペプチド又はその任意の誘導体でプレコーティングされる。プレコーティングされた磁性ビーズは、例えば活性基として、第一級アミン（ $-NH_2$ ）、カルボキシル（ $-COOH$ ）、スルフヒドリル（ $-SH$ ）又はカルボニル（ $-CHO$ ）を含み得る。一部の実施形態において、ビーズは、第一級又は第二級アミノ基と反応し得る部分を含むようにプレコーティングされる。一部の他の実施形態において、磁性ビーズはポリリジンでコーティングされる。

【0079】

本明細書で使用されるとき、用語「リンカー」は、ビーズ上に存在する任意のスペーサー又はプレコーティングを包含する。

【0080】

一部の実施形態において、リンカーは、原子鎖、例えば直鎖を含むか、又はそれである。一部の実施形態において、リンカーは、少なくとも1原子、少なくとも4原子、時に5原子、時に10原子、時に20原子、時に30原子、時に40原子を含む。一部の実施形態において、リンカーは1～40原子の直鎖であるか、又はそれを含む。一部の実施形態において、リンカーは1原子の直鎖であるか、又はそれを含む。一部の実施形態において、リンカーは5原子を含む直鎖である。一部の実施形態において、リンカーは15原子を含む直鎖である。

【0081】

一部の実施形態において、リンカーは31原子を含む直鎖である。一部の実施形態において、リンカーは、26-（2-ヒドロキシ-3-メトキシプロピルアミノ）-ヘキサコサン酸2,5-ジオキソピロリジン-1-イルエステルの断片である。一部の実施形態において、リンカーは、4-オキソペンタン酸メチルエステルの断片である。一部の実施形態において、リンカーはメチレンである。

【0082】

本明細書に記載されるとおり、アミノ酸誘導体について、リンカーは一端（シクロヘキサン環との反応性のある末端）にアミノ基又はメチレン（ $-CH_2-$ ）基を含む。

【0083】

理解されるとおり、リンカーがアミノ酸、その誘導体又はその類似体に会合すると、リンカーはその会合に起因して修飾され、一部の実施形態では、リンカーの断片を含む。

【0084】

リンカー特性はリンカー内の原子の性質に依存する。酸素、窒素又は硫黄など、少なくとも1つの孤立電子対を有する原子を少なくとも1つ含むリンカーが分かった。一部の実施形態において、リンカーは少なくとも1つの酸素原子を含む。

【0085】

一部の他の実施形態において、リンカーから少なくとも1つのアミノ酸、その誘導体又はその類似体への間の会合は共有結合であってもよい。一部の更なる実施形態において、リンカーから少なくとも1つのアミノ酸への間の会合は、アミノ酸の窒素（N）原子とリンカーの炭素（C）原子との結合によってもよい。理解されたとおり、会合及び化学結合の形成時、アミノ基（ $-\text{NH}_2-$ ）は1個の水素原子を失い $-\text{NH}-$ となる。一部の実施形態において、共有結合性の会合は、アミン、イミン又はアミド結合を介したものである。一部の実施形態において、アミノ酸はトラネキサム酸（TXA）である。本明細書に詳述されたとおり、一部の実施形態において、アミノ酸誘導体はシクロヘキサンカルボン酸であり、シクロヘキサンカルボン酸とリンカーの会合／相互作用はシクロヘキサン環及びリンカーのメチレン基を介したものである。以下の実施例1.1に詳述するとおり、複数のコンジュゲートの少なくとも一部において、ビーズは26-（2-ヒドロキシ-3-メトキシプロピルアミノ）-ヘキサコサン酸2,5-ジオキソピロリジン-1-イルエステルでプレコーティングされてもよい。従って、26-（2-ヒドロキシ-3-メトキシプロピルアミノ）-ヘキサコサン酸2,5-ジオキソピロリジン-1-イルエステルと会合したアガロースビーズが、少なくとも1つのアミノ酸又はその類似体との会合に供される。コンジュゲート中のリンカーは、26-（2-ヒドロキシ-3-メトキシプロピルアミノ）-ヘキサコサン酸2,5-ジオキソピロリジン-1-イルエステルの断片、具体的には26-（2-ヒドロキシ-3-メトキシプロピルアミノ）-ヘキサコサナールである。理解されたとおり、26-（2-ヒドロキシ-3-メトキシプロピルアミノ）-ヘキサコサン酸2,5-ジオキソピロリジン-1-イルエステルとアミノ酸又はその類似体との間の会合に起因して、リンカーは、26-（2-ヒドロキシ-3-メトキシプロピルアミノ）-ヘキサコサン酸2,5-ジオキソピロリジン-1-イルエステルの断片、具体的には26-（2-ヒドロキシ-3-メトキシプロピルアミノ）-ヘキサコサナールである。

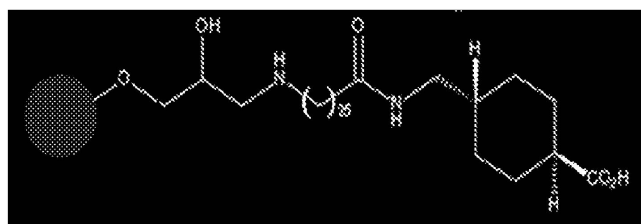
【0086】

以下の実施例1.2に詳述するとおり、複数のコンジュゲートの少なくとも一部において、ビーズは水酸化物でプレコーティングされてもよく、無水コハク酸及びピリジンと反応し、続いてN-ヒドロキシルコハク酸アミド（N-Hydroxylsuccinamide）（NHS）及びEDCと反応し得る。従って、4-（2,5-ジオキソピロリジン-1-イル）-4-オキソ酪酸メチルエステルと会合したアガロースビーズが、少なくとも1つのアミノ酸又はその類似体との会合に供される。コンジュゲート中のリンカーは、4-（2,5-ジオキソピロリジン-1-イル）-4-オキソ酪酸メチルエステルの断片、具体的には4-オキソ酪酸メチルエステルである。

【0087】

一部の実施形態において、コンジュゲートは、平均径が90 μm のアガロースビーズを含む。一部の実施形態において、リンカーは26-（2-ヒドロキシ-3-メトキシプロピルアミノ）-ヘキサコサナールを含む。一部の実施形態において、コンジュゲートは、構造（本明細書では「コンジュゲート1」と称される）：

【化3】



（式中

【化 4】



は粒子、例えばアガロースビーズ、具体的には平均径が $90\ \mu\text{m}$ の 4% アガロースビーズを表す) を有し得る。

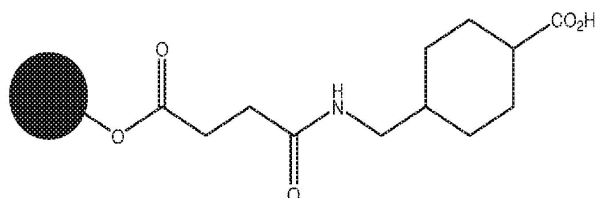
【0088】

一部の実施形態において、アミノ酸は T X A であり、粒子は平均径が $90\ \mu\text{m}$ のアガロースビーズであり、及びリンカーは 26- (2-ヒドロキシ-3-メトキシプロピルアミノ)-ヘキサコサナールを含み、及びコンジュゲートは、本明細書においてコンジュゲート 1 と称される構造を有する。アミノ酸誘導体がシクロヘキサンカルボン酸である一部の実施形態において、粒子は平均径が $90\ \mu\text{m}$ のアガロースビーズであり、及びリンカーは 26- (2-ヒドロキシ-3-メトキシプロピルアミノ)-ヘキサコサン酸メチルアミドを含み、及びコンジュゲートは、本明細書においてコンジュゲート 1 と称される構造を有する。

【0089】

一部の実施形態において、本明細書に開示される主題のコンジュゲートは、平均径が $150\ \mu\text{m}$ のセファロースビーズを含む。一部の実施形態において、リンカーは 4-オキソ酪酸メチルエステルを含む。一部の実施形態において、コンジュゲートは、構造 (本明細書において「コンジュゲート 2」と称される) :

【化 5】



(式中

【化 6】



は粒子、例えば平均径が $150\ \mu\text{m}$ のセファロースビーズを表す) を有し得る。

【0090】

一部の実施形態において、アミノ酸は T X A であり、粒子は平均径が $150\ \mu\text{m}$ のセファロースビーズであり、及びリンカーは 4-オキソ酪酸メチルエステルを含み、及びコンジュゲートは、本明細書においてコンジュゲート 2 と称される構造を有する。

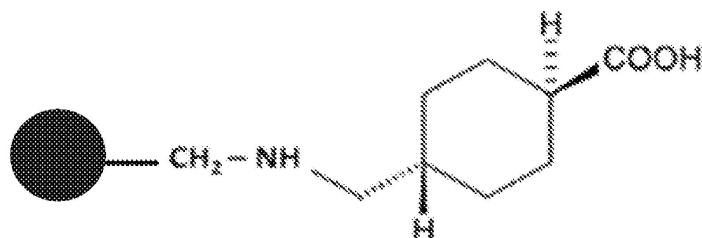
【0091】

アミノ酸誘導体がシクロヘキサンカルボン酸である一部の実施形態において、粒子は平均径が $150\ \mu\text{m}$ のセファロースビーズであり、及びリンカーは N-メチルスクシンアミド酸メチルエステルを含み、及びコンジュゲートは、本明細書においてコンジュゲート 2 と称される構造を有する。

【0092】

一部の実施形態において、コンジュゲートは、平均径が $150\ \mu\text{m}$ のアガロースビーズを含む。一部の実施形態において、リンカーはメチレンを含む。一部の実施形態において、コンジュゲートは、構造 (本明細書では「コンジュゲート 3」と称される) :

【化 7】



(式中
【化 8】



は粒子、例えば平均径が150 μmのアガロースビーズを表す)を有し得る。

【0093】

一部の実施形態において、アミノ酸はTXAであり、粒子は平均径が150 μmのアガロースビーズであり、及びリンカーはメチレンを含み、及びコンジュゲートは、本明細書においてコンジュゲート3と称される構造を有する。

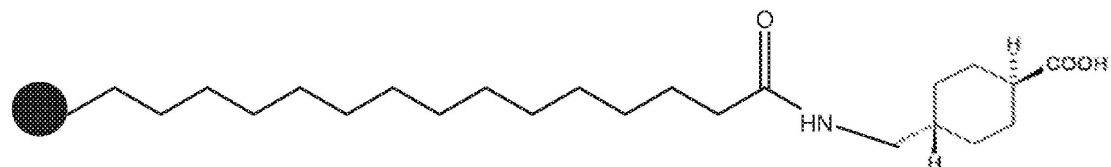
【0094】

アミノ酸誘導体がシクロヘキサンカルボン酸である一部の実施形態において、粒子は平均径が150 μmのアガロースビーズであり、及びリンカーはジメチルアミンを含み、及びコンジュゲートは、本明細書においてコンジュゲート3と称される構造を有する。

【0095】

一部の実施形態において、コンジュゲートはアガロースビーズを含む。一部の実施形態において、リンカーは15原子の炭素鎖を含む。一部の実施形態において、リンカーはヘキサデカナルである。一部の実施形態において、コンジュゲートは、構造(コンジュゲート4)：

【化 9】



(式中
【化 10】



は粒子を表す)を有し得る。

【0096】

一部の実施形態において、コンジュゲートはアガロースビーズを含む。一部の実施形態において、リンカーは15原子の炭素鎖を含む。一部の実施形態において、リンカーはヘキサデカン酸メチルアミドである。一部の実施形態において、コンジュゲートは、構造(コンジュゲート4)を有し得る：

【0097】

10

20

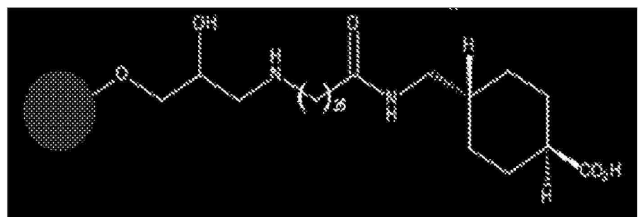
30

40

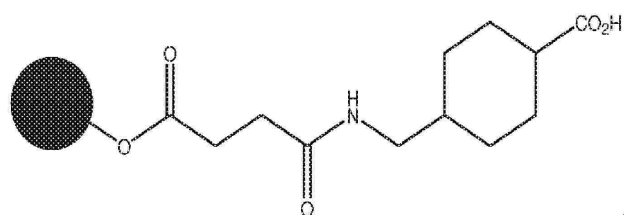
50

一部の更なる態様において、本開示は、少なくとも1つの粒子と少なくとも1つのリンカーと少なくとも1つのアミノ酸、その誘導体又はその類似体とを含む少なくとも1つのコンジュゲートを提供する。一部の実施形態において、本明細書に開示される主題のコンジュゲートは、以下のコンジュゲートのうちのいずれか1つ又はこれらの任意の組み合わせであってもよい。より具体的には、

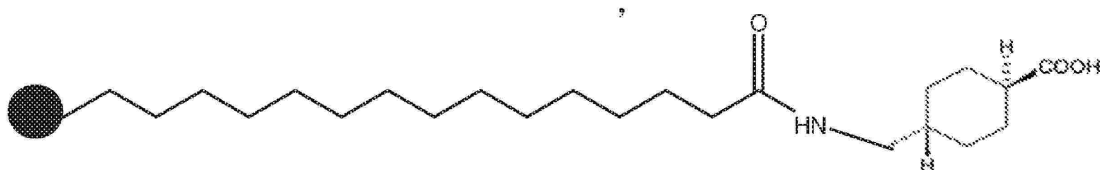
【化11】



10



20



30

(式中

【化12】



40

は粒子を表す)のうちの少なくとも1つ。

【0098】

一部の実施形態において、粒子はアガロースビーズ又はセファロースビーズである。一部の他の実施形態において、粒子は、具体的には上記に定義されるとおり、約10 μm以下～約500 μm以上の間の平均粒径を有する。より具体的には、約90 μm～約150 μmの間。一部の実施形態において、本明細書に開示される主題のコンジュゲートは少なくとも1つの線溶タンパク質に結合してもよく、より具体的には、前記線溶タンパク質は組織プラスミノゲン活性化因子(tPA)及び任意選択で、プラスミノゲンであってもよい。

【0099】

50

図12～図19を参照すると、本明細書に開示される主題の第1の例に係る、哺乳類体液、詳細には血漿又は全血を処理する装置が参照符号100で略指示され、これは、ハウジング300と、第1の粒子又はビーズ210の第1の集合110及び第2の粒子又はビーズ220の第2の集合120を少なくとも含む粒子、具体的にはビーズの複数の集合を含む。

【0100】

この例及び他の例に係る装置は、ヒト血漿 (human blood plasma) (本明細書ではまた「ヒト血漿 (human plasma)」と同義的に使用される) 及び／又はヒト全血 (本明細書ではまた「ヒト血液」と同義的に使用される)、及び／又はその任意の製剤との特定の使用が見出されるが、これはまた、他の哺乳類だが非ヒトの血漿又は哺乳類だが非ヒトの全血、又は実に、例えば少なくとも一部の種類の非哺乳類血漿又は非哺乳類全血を含めた、少なくとも一部の種類の動物血漿又は動物全血の処理にも使用することができる。

10

【0101】

本明細書において明らかになるであろうとおり、本装置は、哺乳類体液を処理する一例として、哺乳類体液 (例えばヒト血漿及び／又はヒト全血及び／又は他の哺乳類血漿及び／又は他の哺乳類全血) から少なくとも1つの線溶タンパク質 (例えばtPA及び／又はプラスミノゲン) を枯渇させるように構成される。

【0102】

ハウジング300は長手方向軸AAを画成し、本体部分350と、流体入口ポート330を有する入口端部キャップ310、及び流体出口ポート340を有する出口端部キャップ320を含む一対の端部キャップとを含む。この例の代替的変形例において、ハウジングは、2つ以上の本体部分、及び／又は各本体部分につき2つ以上の入口ポート、及び／又は1つ又は2つ以上の入口ポート、及び／又は各本体部分につき2つ以上の出口ポート、及び／又は1つ又は2つ以上の出口ポートを含むことができる。

20

【0103】

入口端部キャップ310及び出口端部キャップ320の各々は、それぞれの円錐台状内表面370とそれぞれの円錐台状外表面380とを有する略円錐台状基部360を有する。この例及び少なくとも一部の他の例において、円錐台状内表面370及び円錐台状外表面380は高度に研磨されている。この例の代替的変形例において、円錐台状内表面370及び／又は円錐台状外表面380は研磨されていない。

30

【0104】

例えば、流体入口ポート330、及び流体出口ポート340は、各々がそれぞれの円錐台状基部360から遠方に突出し、各々に好適なそれぞれの防漏性コネクタ部分335が装着されていてもよい。例えば、かかる防漏性コネクタ部分335は、そこへの導管 (例えば医療グレードのチューブ類) の接続を促進するルアーロックの形態であってもよい。或いは、流体入口ポート330、及び流体出口ポート340は、各々に、そこへの導管 (例えば医療グレードのチューブ類) の接続を促進する任意の他のタイプの好適な防漏性コネクタ部分335が装着されてもよい。

【0105】

少なくともこの例では、及び図14A～図14Dもまた参照すると、各円錐台状基部360は、そのそれぞれの小端312、322からそれぞれの大端314、324まで増加する横断面面積 (長手方向軸AAと直交する) を有する。少なくともこの例では、各円錐台状基部360は複数のウェブ部材301を備え、これらはそれぞれの入口端部キャップ310又は出口端部キャップ320の内表面から内側に半径方向且つ軸方向に突出している。しかしながら、この例の少なくとも一部の代替的変形例及び他の例において、ウェブ部材は省略されてもよい。理論によって拘束されるものではないが、ウェブ部材301は装置100の全体的剛性を増強することができ、及び／又は装置100に出入りする、詳細には長手方向軸AAに略沿ってチャンバ400に入る未処理体液の流れを整える助けとなることができる。

40

【0106】

50

更に理論によって拘束されるものではないが、ウェブ部材 301 は、バリア部材 352、354 をそれぞれ長手方向端部 E1、E2 において所定位置に保持し、又は他の方法で維持するのに役立ち、及びより詳細には、以下で更に明確になるであろうとおり、バリア部材 352、354 をハウジング 300 においてそれぞれの入口端部キャップ 310 又は出口端部キャップ 320 と本体部分 350 との間に締め付けるのに役立ち得る。

【0107】

ウェブ部材 301 は、各々が、組み立てられた装置 100 においてそれぞれのバリア部材 352、354 に面する自由端 306 を有する。図 14B 及び図 14C で最も良く分かるとおり、自由端 306 はそれぞれの円錐台状内表面 370 から遠方に、長手方向軸 AA と平行な長手方向にそれぞれの大端 314、324 を越えて突出している。

10

【0108】

少なくともこの例では、流体入口ポート 330 は入口端部キャップ 310 の小端 312 につなぎ合わされ、流体出口ポート 340 は出口端部キャップ 320 の小端 322 につなぎ合わされている。この例の代替的変形例において、流体入口ポート 330 は任意の他の好適な位置で入口端部キャップ 310 と接続されてもよく、及び／又は流体出口ポート 340 は任意の他の好適な位置で出口端部キャップ 320 と接続されてもよい。

【0109】

この例において、及び図 13A～図 13D もまた参照すると、本体部分 350 は、略円筒壁 355 を含み（即ち本装置の長手方向軸 AA を横断して円形断面を有する）、及び長手方向に対向する端部 356、358 を有する。

20

【0110】

この例においてハウジング 300、詳細には円筒壁 355 を備える本体部分 350 は、比較的剛性である。比較的剛性とは、本体部分 350 が、その自重下で又は装置の動作時に複数の粒子集合並びに装置を流れる血漿又は他の体液のフローを収容しているとき著しい変形なしに（例えば訓練されていない観察者の肉眼で見える変形なしに）その形状を維持することを意味する。

【0111】

この例の代替的変形例において、本体部分は、半可撓性、又は完全に可撓性（例えば可撓性バッグの形態）であってもよく、及び／又は本体部分は非円筒横断面を有し、例えば楕円、多角形などであってもよい。

30

【0112】

この例及び他の例では、本体部分 350 の横断面は、装置の長手方向軸 AA に沿って略均一である。この例の代替的変形例において、本体部分 350 の横断面は、代わりに装置の長手方向軸 AA に沿って不均一であってもよい—例えば、長手方向軸 AA に沿って横断面の形状が変化してもよく、及び／又は横断面のサイズが変化してもよい。例えば本体部分は円錐台形で、長手方向軸 AA に沿って本体部分の円形横断面のサイズが増加し、又は代わりにサイズが減少してもよい；例えばかかる円錐台形は、約 0.5° 又は約 1° の半頂角を例えば有するほぼ円筒形であってもよい（図 13C を参照）。

【0113】

ハウジング 300、詳細には本体部分 350 及び入口端部キャップ 310 及び出口端部キャップ 320 は、各々が、任意の好適な医療上適合性のある材料で作られていてもよい。例えば、かかる材料には、医療グレードプラスチック、例えば以下：Covestro、USA が供給する PC (Makrolon 2458)、Apec (登録商標) 1745 ポリカーボネート；ポリプロピレン；ポリスルホン；ポリエーテルエーテルケトン (PEEK) のうちのいずれか 1 つが含まれ得る。

40

【0114】

少なくともこの例では、ハウジング 300、詳細には本体部分 350、入口端部キャップ 310 及び出口端部キャップ 320 は透明であり、即ち、透明材料で作られている。しかしながら、この例の代替的変形例において、ハウジング 300、詳細には本体部分 350 及び／又は入口端部キャップ 310 及び／又は出口端部キャップ 320 は透明でなく、

50

例えば半透明若しくは不透明であり、又は透明部分、半透明部分若しくは不透明部分の任意の組み合わせである。

【0115】

ハウジング300、詳細には本体部分350は、制御容積Vを画成する内部チャンバ400を含む。この例において、制御容積Vは、この例では円筒状内表面である本体部分350の内表面によって画成されるその横断外周囲Pと、本体部分350の長手方向両端にある長手方向端部E1及びE2とによって画成される。

【0116】

制御容積Vの長手方向端部E1及びE2は、本体部分350の長手方向両端に提供された、それぞれ対応するバリア部材352、354によって画成される。本明細書において更に明確になるであろうとおり、バリア部材352、354は、第1の粒子210及び第2の粒子220が本体部分350から抜け出ること、詳細には制御容積Vから、特に入口端部キャップ310及び流体入口ポート330を通して、又は出口端部キャップ及び流体出口ポート340を通して抜け出ることを防止するように構成される。バリア部材352、354はまた、本体部分350を通じた、詳細には制御容積Vを通じた体液、詳細には液体、より詳細には血漿、及びより詳細にはヒト血漿の貫流を同時に可能にするようにも構成され、特に、1つ又は複数の哺乳類体液は入口端部キャップ310及び流体入口ポート330を通して制御容積Vに入り、制御容積Vを出た後、出口端部キャップ及び流体出口ポート340を通して流れる。

【0117】

少なくともこの例では、バリア部材352、354は互いに同様又は同一であり、それぞれフィルタディスク352A、354Aの形態であり、各々が、それぞれのフィルタディスク352A、354Aの厚さだけ隔てられたそれぞれの上流表面及びそれぞれの下流表面を有する。バリア部材352、354、詳細にはフィルタディスク352A、354Aは、流体、詳細には液体、より詳細には体液、及びより詳細にはヒト血漿又はヒト全血（又は代わりに、任意の哺乳類又は非哺乳類血漿又は全血）の細孔を通じた貫流を可能にするための複数の細孔又は他の開口を含み、これらの細孔は、(a) 第1の粒子210の平均径又はメジアン径又は(b) 第2の粒子220の平均径又はメジアン径のうちの小さい方より小さいサイズである。例えば、第1の粒子210又は第2の粒子220のうちの小さい方の粒子が約90 μm の有効（平均又はメジアン）直径を有する（例えば大きい方の粒子が約150 μm の有効（平均又はメジアン）直径を有する）例では、細孔は、90 μm 未満、例えば80 μm ；70 μm ；60 μm ；50 μm ；40 μm 、又は40 μm 未満のうちのいずれか1つの有効（平均又はメジアン）直径を有する。このような粒子直径の例では、細孔は範囲45 μm ～50 μm 以内の有効（平均又はメジアン）直径を有することができ、例えば、又は代わりに細孔は、以下の範囲：20 μm ～80 μm ；30 μm ～70 μm ；40 μm ～55 μm ；40 μm ～50 μm ；40 μm ～60 μm ；40 μm ～70 μm ；40 μm ～80 μm のうちのいずれか1つ以内の有効（平均又はメジアン）直径を有することができる。

【0118】

バリア部材352、354がフィルタディスク352A、354Aの形態である少なくとも一部の例の特徴は、フィルタディスク352A、354Aを迅速に製造できることである。

【0119】

本装置の少なくとも一部の例の別の特徴は、装置100を通るフローを制御できることである。例えば制御容積Vに多量の粒子（即ち第1の粒子210及び第2の粒子220）を選択すると、装置100を通る体液の体積流量が低下する傾向があり、一方で制御容積V中の粒子量を減少させることを選択すると、粒子が体液から線溶タンパク質を枯渇させる能力及び有効性が低下することになる。従って、事実上、本装置の体積流量は、制御容積V中の粒子の（即ち第1の粒子210及び第2の粒子220の）量と、この量の粒子を制御容積Vに収容したとき制御容積Vに収容することのできる体液の体積との比に依存し

得る。

【0120】

この例及び他の例の代替的変形例において、バリア部材は、例えば、繊維又はプラスチック基質を含むフィルタであって、リガンドがコンジュゲートされる場所である繊維又はプラスチック基質にリガンドがコンジュゲートされるフィルタ、又は例えば好適な膜、例えばそこを通る体液の一方向のフローは許容するが、膜を通る反対方向のフローは許容しない一方向膜を備えてもよい。

【0121】

この例及び他の例において、フィルタディスク352A、354Aとしては、Spectrum、USAが供給するSpectra Mesh（登録商標）織布フィルタ（例えば、ナイロン、PEEK、ポリプロピレン、ポリエステル、ステンレス鋼を含む）、又はYair Technologies、Israelが供給するMS（登録商標）ナイロンメッシュフィルタのうちのいずれか1つを挙げることができる。

10

【0122】

少なくともこの例では、バリア部材352、354、詳細にはフィルタディスク352A、354Aは、ハウジング300に対して、詳細には本体部分350に対して、及び任意選択でまた入口端部キャップ310及び出口端部キャップ320に対しても、制御容積Vの完全性が維持されるように装着される。換言すれば、バリア部材352、354、詳細にはフィルタディスク352A、354Aとハウジング300、詳細には本体部分350との間の接続は、この接続からの第1の粒子210又は第2の粒子220のいかなる漏出も最小限に抑え又はそれを回避する一方、装置100を通過する体液に対するバリア部材352、354、詳細にはフィルタディスク352A、354Aの露出面積を最大化するようなものである。更に、バリア部材352、354、詳細にはフィルタディスク352A、354Aは、ハウジング300に対して、詳細には本体部分350に対して、及び任意選択でまた入口端部キャップ310及び出口端部キャップ320に対しても、2つのバリア部材352、354、詳細には2つのフィルタディスク352A、354Aの類似のそれぞれの上流表面が上流方向に向く一方で、そのそれぞれの下流表面が下流方向に向くように装着される。

20

【0123】

少なくともこの例では、特に図13D及び図14Dを参照すると、本体部分350の端部356、358の各々は、それぞれの端部356、358の内縁344（例えば図12B、図13Cを参照）から半径方向にずれた、それぞれの内側レッジ357及び外側レッジ353を画成する隆起した環状ショルダ359を含む。バリア部材352、354、詳細にはフィルタディスク352A、354Aの各々は、それぞれの内縁344の外径より大きく、それぞれの環状ショルダ359の内径より小さい外径を有し、従ってそれぞれの内側レッジ357に着座する。それぞれの入口端部キャップ310及び出口端部キャップ320は、各々が、円錐台状基部360のそれぞれの大端314、324にそれぞれの環状縁351を有し、それがそれぞれの入口端部キャップ310及び出口端部キャップ320をそれぞれ端部356、358に封止固定する。例えば、それぞれの環状縁351は、それぞれの外側レッジ353に接着されるか、熱溶接されるか、超音波溶接されるか、又は他の方法で封止固定されてもよい。

30

40

【0124】

この例において、それぞれの端部356、358の各々の環状ショルダ359は、略三角形の横断面を有する突出リップ359Aを含み、その三角形の頂点がそれぞれの端部356、358から遠ざかる方に向き、略三角形の横断面は頂点に向かって本体部分350から遠ざかる長手方向軸AAと略平行の方向に収束する。それぞれの環状縁351は、各々が、入口端部キャップ310、本体部分350及び出口端部キャップ320を長手方向軸AAに対して同時に整列させたとき突出リップ359Aと正しく合わさる環状凹部351Aを含む。

【0125】

50

ウェブ部材 301 は、それぞれの入口端部キャップ 310 又は出口端部キャップ 320 が本体部分 350 に封止固定されたとき、それぞれのバリア部材 352、354、詳細にはフィルタディスク 352A、354A がハウジング 300 に対して動かなくなり、それぞれのウェブ部材 301 とそれぞれの内側レッジ 357 との間が当接した、且つ任意選択で締め付けられている関係となるように、長手方向軸 AA と平行に寸法 D (図 14C) を有することに留意すべきである。

【0126】

熱溶接又は超音波溶接の過程で、例えば、それぞれのリップ 359A が変形してそれぞれの環状凹部 351A と封止接続をなし、それによりそれぞれの入口端部キャップ 310 又は出口端部キャップ 320 が本体部分 350 に封止固定される。

10

【0127】

図 13A ~ 図 14D の例の代替的変形例において、及びかかる一例として図 12B を参照すると、それぞれの端部 356、358 の各々の環状ショルダ 359 が、円錐台状内表面 370 と略平行の傾斜面 359B を (突出リップ 359A の代わりに) 有する。他方で、この例において、それぞれの環状縁 351 は各々が (環状凹部 351A の代わりに)、入口端部キャップ 310、本体部分 350 及び出口端部キャップ 320 が長手方向軸 AA に対して同時に整列したとき外側レッジ 353 と正しく合わさる突出リップ 351B を含む。突出リップ 351B は略三角形の横断面を有し、三角形の頂点がそれぞれの端部 356、358 の方に向き、略三角形の横断面は、頂点に向かって長手方向軸 AA と平行な方向に、即ち本体部分 350 に向かって収束する。熱溶接又は超音波溶接の過程で、それぞれのリップ 351B が変形してそれぞれの環状外側レッジ 353 と封止接続をなす。

20

【0128】

非限定的な例として、図 13A ~ 図 13D は、この例の一実施態様に係る、本体部分 350 の様々な部分の寸法データ (mm 単位) を提供する (公差は例えば ± 0.05)。この例の代替的な実施態様において、寸法データは比例して変化させることができ、例えば注釈が付されている寸法全てを同じ比率で増加又は減少させることができ、例えば 50%、100%、150%、200% などだけ増加させるか、又は 10%、25%、50% などだけ減少させることができる。

【0129】

同様に非限定的な例として、図 14A ~ 図 14D は、この例の一実施態様に係る、入口端部キャップ 310 の様々な部分の寸法データ (mm 単位) を提供し (公差は例えば ± 0.05)、同様の寸法データが適宜修正して出口端部キャップ 320 に適用される。この例の代替的な実施態様において、寸法データは比例して変化させることができ、例えば注釈が付されている寸法全てを同じ比率で増加又は減少させることができ、例えば 50%、100%、150%、200% などだけ増加させるか、又は 10%、25%、50% などだけ減少させることができる。図 12 及び図 13A ~ 図 14D の例に関して、本体部分 350 は本体部分 350 の内径とほぼ同じサイズの長手方向寸法 (長手方向軸 AA と平行) を有することに留意すべきである。この例の代替的変形例において、例えば図 12A を参照すると、長手方向寸法は本体部分 350 の内径より大きくてもよい。この例の更に他の代替的変形例において、長手方向寸法は本体部分 350 の内径より小さくてもよい。

30

40

【0130】

この例の代替的変形例において、ハウジング 300 は一体に形成されてもよく、長手方向端部 E1 及び E2 の各々に横断方向スロットを提供することにより、それぞれのバリア部材 352、354、詳細にはフィルタディスク 352A、354A を横断方向に挿入してハウジング 300 に対して封止することを可能にしてもよい。

【0131】

少なくともこの例では、ハウジング 300、詳細には本体部分 350 は、円筒壁 355 に提供された粒子入口ポート 390 を含み、第 1 の粒子 210 の第 1 の集合 110 及び第 2 の粒子 220 の第 2 の集合 120 を少なくとも含む前記複数の粒子集合を粒子入口ポート 390 から制御容積 V に充填可能であるように構成される。粒子入口ポート 390 は、

50

制御容積Vへの前記複数の粒子集合の充填後に粒子入口ポート390を可逆的又は永久的に封止するための封止キャップ392を含む。例えば、かかる封止キャップ392は、粒子入口ポート390の相補的なテーパ状の内壁394に当接するテーパ状の高度に研磨されたステム部分393と、粒子入口ポート390の口部に提供される環状フランジ399を変形可能に係合するヘッド部分395とを有する。

【0132】

或いは粒子入口ポート390は、制御容積Vへの前記複数の粒子集合の充填後に、別の方法で可逆的又は永久的に封止されてもよい。

【0133】

装置100は、初めにバリア部材352、354、詳細にはフィルタディスク352A、354Aをハウジング300の端部356、358と正しく合わさるように置き、次に入口端部キャップ310及び出口端部キャップ320を本体部分350に封止固定して、それによりバリア部材352、354、詳細にはフィルタディスク352A、354Aをハウジング300に対して係合させることにより組み立てられる。組立体の完全性は、粒子入口ポート390を圧力源（例えば1バールゲージ圧に設定する）に結合する一方で、入口ポート330及び出口ポート340を可逆的に封止し、漏出があるかどうかを、例えばハウジング300を例えば水などの液体に沈めて確かめることにより試験してもよく、漏出があるかは、ハウジング300から漏れ出る気泡を観察することにより検出し得る。例えばハウジング300は、ハウジング300から漏れ出る気泡が30秒毎に1つ以下である漏出を観察できた場合、十分に封止されていると見なすことができる。

【0134】

装置100の上記の例の少なくとも一部の適用において、最終使用者への供給前に、装置100に前記複数の粒子集合が予め充填される。そのような場合、前記複数の粒子集合に保存剤が使用されてもよい。例えば、かかる保存剤は20%エタノールであってもよい。

【0135】

装置100の上記の例の他の代替的な適用において、装置100には前記複数の粒子集合が最終使用者によって充填される。少なくともこの例では、制御容積Vのサイズは20ml〜約35mlである。

【0136】

この例の代替的変形例において、及び他の例において、制御容積Vのサイズは異なってもよく、例えば35ml未満又は35ml超であってもよい。例えば、本装置のサイズ、ひいては制御容積Vのサイズは、例えば線形縮尺倍率によって拡大縮小されてもよい。例えば、線形縮尺倍率は、以下の値：2、3、4、5、10、20、30、40、50、又は50超のうちのいずれか1つであってもよい。或いは、例えば線形倍率は、制御容積Vのサイズが現在の例の「n」倍の大きさである（ここでnは、以下の値：2、3、4、5、10、20、30、40、50、100、150又は150超のうちのいずれか1つである）というようなものであってよく；対応して又は代わりに、制御容積Vが70ml、100ml、150ml、175ml、200ml、250ml、500ml、1リットル、1.5リットル、2リットル、2.5リットル、3リットル、4リットル、5リットル又は5リットル超に拡大されてもよい。

【0137】

この例において、第1の粒子210及び／又は第2の粒子220はコンジュゲート粒子（本明細書において「コンジュゲート」と称される）であってもよく、各々が、任意選択で、例えば本明細書に開示されるとおりの、コンジュゲート粒子のうちのいずれか1つ、又は少なくとも2つ以上の異なるコンジュゲートを含み得るその組成物を含み得る。

【0138】

これらの例の少なくとも一部の代替的変形例において、第1の集合110及び第2の集合120のうちの一方の集合のみがコンジュゲート粒子を含み、一方、第1の集合110及び第2の集合120のうちの他方は非コンジュゲート粒子を含む。これらの例の更に他の代替的変形例において、第1の集合110及び第2の集合120は両方ともに同じコン

ジュゲート粒子を含み、従って事実上単一の、組み合わせられたコンジュゲート粒子集合のみが存在する。

【0139】

少なくともこの例では、第1の粒子210及び／又は第2の粒子220はコンジュゲート粒子であり、ここで第1の粒子は第2の粒子と寸法が異なる。詳細には、第1のコンジュゲート粒子210及び第2のコンジュゲート粒子220は第2の粒子と寸法が異なる。少なくとも一部のかかる例において、第1のコンジュゲート粒子は第2の粒子の平均径と異なる平均径を有する。なおも一部の更なる実施形態において、第1の粒子、具体的にはコンジュゲートは、第2のコンジュゲートと化学的に異なってもよい。

【0140】

理論によって拘束されるものではないが、本発明者らは、第1のコンジュゲート粒子が第2の粒子の平均径と異なる平均径を有する少なくとも2つの粒子集合を含めると、粒子間に間隔が付与されることになり得るため、全ての粒子が同じサイズ又は同様のサイズである類似の並び方ほど実質的に稠密でない並び方がもたらされると考える。ひいては、低い稠密度というこの特徴により、同じ又は同様のサイズの粒子による類似の並び方よりも大きい露出面積が粒子の各々にもたらされる。ひいては露出面積が大きくなったことにより、コンジュゲート粒子と体液との間の（かかる体液が装置100を通じて流されるときの）より高い相互作用が可能となり、そのため粒子が体液から少なくとも1つの線溶タンパク質を枯渇させる有効性が増加する。従って、体液から少なくとも1つの線溶タンパク質を枯渇させる点で、比較的少ない総量である寸法の異なる第1のコンジュゲート粒子及び第2のコンジュゲート粒子が、寸法が同様である比較的多い総量の第1のコンジュゲート粒子及び第2のコンジュゲート粒子と同程度に有効となることができ、これには経済的効果があり得る。

【0141】

単一のコンジュゲート粒子集合を用いてどの程度プラスミノゲンを吸収し得るかを計算する一つの方法は、以下のとおりである：

樹脂容量計算

－ 標準新鮮凍結血漿単位から開始する－

- ・ 各単位が250 mL血漿を有する
- ・ 血漿中のプラスミノゲン濃度は160 µg/mLである
- ・ 従って、1単位のFFP中におけるプラスミノゲンの総量は40 mgである
- ・ プラスミノゲンの分子質量は92 kDaである
- ・ 計算の目的上、1ダルトン単位は数値的に1 g/molと等価と考える。
- ・ 従って92000 Daは92000 g/mol又は92000 µg/µmol又は92 mg/µmolである

・ 1 FFP単位中40 mgにおけるモル数を計算すると－

$$40 \text{ mg} \div 92 \text{ mg} / \mu\text{mol} = 0.435 \mu\text{mol}$$

－ 16～23 µmolビーズ/mL液抜き後樹脂に働く25原子リンカーを有するSephacrose 4 Fast Flowは1.317グラムのプラスミノゲンを減少させることができ、これは1血漿単位中の33倍の多さである。

【0142】

図15及び図16を参照すると、本明細書に開示される主題の一例に係る、参照符号1000で略指示される、1つ又は複数の哺乳類体液から少なくとも1つの線溶タンパク質を枯渇させるシステムは、装置100、生理食塩水リザーバ1100、供血側リザーバ1200、受血側血漿リザーバ1300及び洗浄廃液リザーバ1400を含む。

【0143】

生理食塩水リザーバ1100及び供血側リザーバ1200は、流体入口ポート330と第1の三方弁70を介して選択的且つ非同時に流体連通している。

【0144】

受血側血漿リザーバ1300及び洗浄廃液リザーバ1400は、流体出口ポート340

と第2の三方弁90を介して選択的且つ非同時に流体連通している。

【0145】

導管82、84が、それぞれ生理食塩水リザーバ1100及び供血側リザーバ1200を第1の三方弁70のそれぞれのポート72、74に接続し、もう一つの導管76が第1の三方弁70の第3のポート76を装置100の入口ポート330に接続する。

【0146】

導管62、64が、それぞれ受血側血漿リザーバ1300及び洗浄廃液リザーバ1400を第2の三方弁90のそれぞれのポート92、94に接続し、もう一つの導管66が第2の三方弁90の第3のポート96を装置100の出口ポート340に接続する。

【0147】

少なくともこの例では、装置100は、本明細書におけるその例、又はそれらの例の代替的変形例に開示されるとおりである。いずれの場合にも、制御容積Vが、第1の粒子の第1の集合及び第2の粒子の第2の集合を少なくとも含む前述の複数の粒子集合を収容する。

【0148】

生理食塩水リザーバ1100は、好適な分量の生理食塩水が入った任意の好適なリザーバを含んでもよく、この分量は典型的には制御容積Vのサイズの数倍である。この例では生理食塩水リザーバ1100はシリンジの形態であるが、この例の代替的変形例において生理食塩水リザーバ1100は他の形態をとることができ、例えば圧迫することにより生理食塩水を導管82を通じてバッグから押し出すことのできる非剛性のバッグであってもよい。

【0149】

供血側リザーバ1200は、装置100によって処理されることになる哺乳類体液が入ったバッグ又は他のリザーバを含んでもよい。例えば、供血側リザーバ1200には、ヒト血漿及び／又はヒト全血及び／又は他の哺乳類血漿及び／又は他の哺乳類全血が入っていてもよい。或いは、代わりに供血側リザーバ1200は、血液が（導管84に接続された又はその一部である）カテーテルを通じて装置100に直接流れるか、又は装置100への送達前に全血から血漿を分離する好適な血液製剤分離装置を介して間接的に流れることが可能な方法でその血管に血液カテーテルが挿入されている生体ドナー、例えばヒトを含んでもよい。

【0150】

受血側血漿リザーバ1300は、装置100による処理後に処理済みの哺乳類体液を受け取るためのバッグ又は他のリザーバを含んでもよい。例えば、血漿リザーバ1300には、少なくとも1つの線溶タンパク質が完全に又は部分的に枯渇したヒト血漿及び／又はヒト全血及び／又は他の哺乳類血漿及び／又は他の哺乳類全血が入っていてもよい。或いは、代わりに受血側血漿リザーバ1300は、装置100から（導管62に接続された又はその一部である）カテーテルを通じて処理済みの哺乳類体液が流れることが可能な方法でその血管に血液カテーテルが挿入されている生体患者、例えばヒトを含んでもよい。

【0151】

洗浄廃液リザーバ1400は、生理食塩水リザーバ1100から装置を通過した後の生理食塩水を入れることが可能なバッグ又は他のリザーバを含んでもよい。

【0152】

図17を参照すると、本明細書に開示されるとおりの装置100は、生理食塩水リザーバ1100、受血側血漿リザーバ1300及び洗浄廃液リザーバ1400と共に、キット800として提供されてもよいことに留意すべきである。キット800は、第1の三方弁70、並びに生理食塩水リザーバ1100に接続し且つポート72を介して第1の三方弁70に接続する導管82、及び第1の三方弁70に接続し且つ装置100の入口ポート330に接続する導管86を更に含んでもよい。キット800は、第2の三方弁90、並びにそれぞれ受血側血漿リザーバ1300及び洗浄廃液リザーバ1400に接続し且つそれぞれのポート92、94を介して第2の三方弁90に接続する導管62、64、及び第2

10

20

30

40

50

の三方弁 90 の第 3 のポート 96 に接続し且つ装置 100 の出口ポート 340 に接続する導管 66 を更に含んでもよい。キット 800 は、ポート 74 を介して第 1 の三方弁 70 に接続する導管 84 を更に含んでもよく、ここで導管 84 のもう一方の端部は供血側リザーバ 1200 に接続可能である。

【0153】

システム 1000 は、例えば以下のとおり使用することができる。

【0154】

キット 800 はその無菌包装から開梱され、様々な構成要素を点検して全ての構成要素の完全性が確認されてもよい。

【0155】

図 15 を参照すると、第 1 の三方弁 70 がポート 74 を遮断しつつポート 72 と 76 との間に流体連通を提供するように設定され、及び第 2 の三方弁 90 がポート 92 を遮断しつつポート 94 と 96 との間に流体連通を提供するように設定されていることを確実にすることにより、洗浄構成がセットアップされる。次に装置 100 が、生理食塩水を生理食塩水リザーバ 1100 から第 1 の三方弁 70 を介して装置 100 に通し、第 2 の三方弁 90 を介して洗浄廃液リザーバ 1400 まで流すことによりプライミングされる（生理食塩水で洗浄される）。

【0156】

供血側リザーバ 1200 がキット 800 に接続され、システム 1000 が提供される。供血側リザーバが、装置 100 によって処理されることになる哺乳類体液が入ったバッグ又は他のリザーバの形態である例では、供血側リザーバ 1200 は導管 84 に融着されてもよい。次に供血側リザーバ 1200 は、例えば IV ポールから吊り下げられてもよく、又は蠕動ポンプに接続されてもよく、以下で更に明確になるであろうとおり、装置 100 によって処理されることになる哺乳類体液がそこに選択的に流れることが可能となり得る。

【0157】

供血側リザーバ 1200 が生体ドナー、例えばヒトである例では、生体ドナーの血管に血液カテーテルが挿入され、そのカテーテルが導管 84 に接続されるか、又はその一部である。

【0158】

図 16 を参照すると、洗浄構成が完成し、装置 100 が生理食塩水で（図 15 の構成を用いて）プライミングされた後、処理構成がセットアップされる。処理構成は、第 1 の三方弁 70 がポート 72 を遮断しつつポート 74 と 76 との間に流体連通を提供するように設定され、及び第 2 の三方弁 90 がポート 94 を遮断しつつポート 92 と 96 との間に流体連通を提供するように設定されていることを確実にすることによりセットアップされる。次に、詳細には未処理の哺乳類体液を供血側リザーバ 1200 から第 1 の三方弁 70 を介して装置 100 に通し、第 2 の三方弁 90 を介して受血側血漿リザーバ 1300 まで流すことによって少なくとも 1 つの線溶タンパク質を哺乳類体液から枯渇させることにより、未処理の哺乳類体液が処理される。

【0159】

図 18 を参照すると、本明細書に開示される主題に係る、参照符号 2000 で略指示される、1 つ又は複数の哺乳類体液から少なくとも 1 つの線溶タンパク質を枯渇させるシステムの別の例は、複数の装置 100 を含む装置一式 2500 を含む。図 18 の示される例では、装置一式 2500 は 4 つの装置 100 を含み、この例の代替的変形例では、代わりに装置一式 2500 は 2 つ、3 つ又は 4 つより多い装置 100 を適宜修正して含んでもよい。

【0160】

システム 2500 はまた、図 15 及び図 16 に示されるシステム 1000 について本明細書に開示されるとおり、生理食塩水リザーバ 1100、供血側リザーバ 1200、受血側血漿リザーバ 1300 及び洗浄廃液リザーバ 1400、並びに第 1 の三方弁 70 及び第 2 の三方弁 90 も適宜修正して含む。この例において、装置一式 2500 は、複数の装置

10

20

30

40

50

１００のそれぞれの制御容積Ｖ間に流体連通を提供するようにして相互接続されている複数の装置１００を含む。

【０１６１】

少なくともこの例では、（装置一式２５００の）各装置１００は、本明細書におけるその例、又はそれらの例の代替的変形例に開示されるとおりである。いずれの場合にも、装置一式２５００の各装置１００の制御容積Ｖは、第１の粒子の第１の集合及び第２の粒子の第２の集合を少なくとも含むそれぞれの前記複数の粒子集合を収容する。

【０１６２】

少なくともこの例では、装置一式２５００の複数の装置１００は直列に相互接続され、ここで直列に（隣接して）相互接続された装置１００の各対について、対のうちの一方の装置１００のそれぞれの流体入口ポート３３０が対のうちの他方の装置１００のそれぞれの流体出口ポート３４０に接続され且つそれと流体連通している。装置一式２５００の最も上流の装置１００（図１８では装置１００Ａとも指示される）は、図１５及び図１６に示されるシステム１０００の装置１００と同様の方法で、適宜修正して、第１の三方弁７０を介して生理食塩水リザーバ１１００及び供血側リザーバ１２００に接続する。装置一式２５００の最も下流の装置１００（図１８では装置１００Ｂとも指示される）は、図１５及び図１６に示されるシステム１０００の装置１００と同様の方法で、適宜修正して、第２の三方弁９０を介して受血側血漿リザーバ１３００及び洗浄廃液リザーバ１４００に接続する。

【０１６３】

この例において、生理食塩水リザーバ１１００は、装置一式２５００内の全ての装置１００を洗浄し及びプライミングするのに十分な生理食塩水を有する。

【０１６４】

本明細書に開示されるとおりの装置１００の装置一式２５００は、生理食塩水リザーバ１１００、受血側血漿リザーバ１３００及び洗浄廃液リザーバ１４００と共に（及びそれぞれの供血側リザーバ１２００は除いて）、キット２８００として提供されてもよいことに留意すべきである。キット２８００は、第１の三方弁７０、並びに生理食塩水リザーバ１１００に接続し且つポート７２を介して第１の三方弁７０に接続する導管８２、及び第１の三方弁７０に接続し且つ最も上流の装置１００Ａの入口ポート３３０に接続する導管８６を更に含んでもよい。キット２８００は、第２の三方弁９０、並びにそれぞれ受血側血漿リザーバ１３００及び洗浄廃液リザーバ１４００に接続し且つそれぞれのポート９２、９４を介して第２の三方弁９０に接続する導管６２、６４、及び第２の三方弁９０の第３のポート９６に接続し且つ最も下流の装置１００Ｂの出口ポート３４０に接続する導管６６を更に含んでもよい。キット２８００は、ポート７４を介して第１の三方弁７０に接続する導管８４を更に含んでもよく、ここで導管８４のもう一方の端部は供血側リザーバ１２００に接続可能である。

【０１６５】

システム２０００は、本明細書にシステム１０００について開示されるとおりの洗浄構成及び処理構成と同様に、詳細にはそれぞれの洗浄構成から開始した後それぞれの処理構成が続くシステム１０００と同様の方法で、適宜修正して使用することができる。

【０１６６】

システム２０００の特徴は、装置一式２５００内での連続的な供血側リザーバ１２００から各装置１００への哺乳類体液であって、それにより高品質の処理済み哺乳類体液の提供が可能となることであり、即ち、装置一式２５００内で一つの装置１００から次の装置１００へと処理されて枯渇していく哺乳類体液が送られるにつれ、哺乳類体液中の少なくとも１つの線溶タンパク質のレベルは連続的にますます枯渇していく。

【０１６７】

他方で、直列接続の複数の装置１００はシステム２０００に背圧をセットアップし得ることが可能であってもよく、この背圧により、システム２０００を通じた哺乳類体液の流量が例えばシステム１０００内と比べて低くなり得る。

【0168】

図19を参照すると、本明細書に開示される主題に係る、参照符号3000で略指示される、1つ又は複数の哺乳類体液から少なくとも1つの線溶タンパク質を枯渇させるシステムの別の例は、複数の装置100を含む装置一式3500を含む。図19の示される例では、装置一式3500は4つの装置100を含み、この例の代替的変形例では、代わりに装置一式3500は2つ、3つ又は4つより多い装置100を適宜修正して含んでもよい。

【0169】

システム3500はまた、図15及び図16に示されるシステム1000について本明細書に開示されるとおり、生理食塩水リザーバ1100、供血側リザーバ1200、受血側血漿リザーバ1300及び洗浄廃液リザーバ1400、並びに第1の三方弁70及び第2の三方弁90も適宜修正して含む。この例において、装置一式3500は、複数の装置100のそれぞれの制御容積V間に流体連通を提供するようにして相互接続されている複数の装置100を含む。

【0170】

少なくともこの例では、(装置一式3500の)各装置100は、本明細書におけるその例、又はそれらの例の代替的変形例に開示されるとおりである。いずれの場合にも、装置一式3500の各装置100の制御容積Vは、第1の粒子の第1の集合及び第2の粒子の第2の集合を少なくとも含むそれぞれの前記複数の粒子集合を収容する。

【0171】

少なくともこの例では、装置一式3500の複数の装置100は並列に相互接続され、装置100のそれぞれの流体入口ポート330が入口マニホールド3330を介して互いに相互接続され且つ流体連通している。更に、装置100のそれぞれの流体出口ポート340が出口マニホールド3340を介して互いに相互接続され且つ流体連通している。装置一式3500の入口マニホールド3330は、図15及び図16に示されるシステム1000の装置100と同様に、第1の三方弁70を介して生理食塩水リザーバ1100且つ供血側リザーバ1200に適宜修正して接続する。装置一式3500の出口マニホールド3340は、図15及び図16に示されるシステム1000の装置100と同様に、第2の三方弁90を介して受血側血漿リザーバ1300及び洗浄廃液リザーバ1400に適宜修正して接続する。

【0172】

この例において、生理食塩水リザーバ1100は、装置一式3500内の全ての装置100を洗浄し及びプライミングするのに十分な生理食塩水を有する。

【0173】

本明細書に開示されるとおりの装置100の装置一式3500は、生理食塩水リザーバ1100、受血側血漿リザーバ1300及び洗浄廃液リザーバ1400、入口マニホールド3330及び出口マニホールド3340と共に(及びそれぞれの供血側リザーバ1200は除いて)、キット3800として提供されてもよいことに留意すべきである。キット3800は、第1の三方弁70、並びに生理食塩水リザーバ1100に接続し且つポート72を介して第1の三方弁70に接続する導管82、及び第1の三方弁70に接続し且つ入口マニホールド3330に接続する導管86を更に含んでもよい。キット3800は、第2の三方弁90、並びにそれぞれ受血側血漿リザーバ1300及び洗浄廃液リザーバ1400に接続し且つそれぞれのポート92、94を介して第2の三方弁90に接続する導管62、64、及び第2の三方弁90の第3のポート96に接続し且つ出口マニホールド3340に接続する導管66を更に含んでもよい。キット3800は、ポート74を介して第1の三方弁70に接続する導管84を更に含んでもよく、ここで導管84のもう一方の端部は供血側リザーバ1200に接続可能である。システム3000は、本明細書にシステム1000について開示されるとおりの洗浄構成及び処理構成と同様に、詳細にはそれぞれの洗浄構成から開始した後それぞれの処理構成が続くシステム1000と同様の方法で、適宜修正して使用することができる。

【0174】

システム3000の特徴は、哺乳類体液を装置一式3500内の複数の装置100の間で分割し、装置100において哺乳類体液を同時に処理することにより、供血側リザーバ1200からの哺乳類体液の比較的高い体積フロー及び／又は体積流量を処理できることである。

【0175】

他方で、複数の装置はシステム2000に背圧をセットアップすることが可能であり、この背圧により、システム2000を通じた哺乳類体液の流量が例えばシステム1000内と比べて低くなり得る。

【0176】

システム3000の代替的変形例において、装置一式3500内の複数の装置100の流体入口ポート330は、それぞれの供血側血漿リザーバに直接接続され且つそれと流体連通していてもよく、及び／又は流体出口ポート340の各々は、それぞれの受血側血漿リザーバに直接接続され、且つそれと選択的に流体連通していてもよい。

【0177】

システム3000の別の代替的変形例において、各装置100は、例えば装置一式2500に対応する直列接続の装置100の装置一式に適宜修正して置き換えられてもよい。

【0178】

提案される生理学的細胞ベースの止血モデルは、活性化第VII因子(VIIa)が組織因子担持細胞に結合すると惹起され、第IX因子及び第X因子の更なる活性化につながり、ひいてはこれが第II因子(プロトロンビン)を切断(活性化)してトロンビン(IIa)が形成される。トロンビンは第XI因子を活性化させ、ひいてはこれが他の因子を活性化して、より多くのトロンビンが生成される。次にトロンビンが更にフィブリノーゲンを切断して予備的なフィブリン塊が形成され、次にこれが第XIII因子の架橋作用によって安定化して堅い止血凝血塊となる。

【0179】

血管外傷に応答して凝固系が上記のとおり活性化されると、組織及び血管における架橋フィブリンの沈着につながり、ひいては血流が損なわれる。従って、フィブリン塊を適切に融解することのできる、それにより凝血塊が生理学的必要性を超えて更に成長することを防ぎ、凝血塊がそれ以上必要でなくなると凝血塊溶解を惹起する更なるシステムが必要である。このシステムは線溶タンパク質を含むものであり、次にはそれらが活性化されて、セリンプロテアーゼ、プラスミンの作用を通じてフィブリンをその可溶性分解産物に変換する。生理的条件下では、線溶は、活性化因子、抑制因子及び補因子の正確に測られた関与によって厳密に調節される。

【0180】

線溶系の主要な構成要素であるプラスミノーゲンは、主に肝臓で合成される。560～561位の単一のArg-VaIペプチド結合でプラスミノーゲンが切断(活性化)されると、活性のセリンプロテアーゼ、プラスミンが生じ、ひいてはこれがフィブリン塊を融解する。プラスミノーゲンの切断はプラスミノーゲン活性化因子によって媒介される。

【0181】

主要な内因性プラスミノーゲン活性化因子は組織プラスミノーゲン活性化因子(tPA)である。機能的には、tPAそれ自体は、プラスミノーゲンの弱い活性化因子である。しかしながら、フィブリンの存在下では、tPA依存性プラスミノーゲン活性化の触媒効率が500倍増加する。超過したプラスミン活性はまた凝固因子も切断し、それにより新たな凝血塊の形成を妨げ得る。

【0182】

第2の内因性プラスミノーゲン活性化因子は単鎖u-PA又はプロウロキナーゼである。u-PAは、フィブリンに対する親和性がtPAと比べてはるかに低い。uPAはフィブリンの存在下又は非存在下で有効なプラスミノーゲン活性化因子であるが、そのプラスミノーゲン活性化活性はフィブリンによって大きく刺激される。u-PAは、活性化内皮

10

20

30

40

50

細胞、マクロファージ、腎上皮細胞、及び一部の腫瘍細胞を含め、幾つかの細胞に発現する。

【0183】

線溶系は、線溶タンパク質の活性化因子（上記に詳述したとおり）及び抑制因子の作用によって実に均衡がとれている。プラスミンの主要な抑制因子は $\alpha 2$ 抗プラスミン—主に肝臓で合成され、血漿中に比較的高濃度（ $2\mu\text{M}$ ）で循環する単鎖糖タンパク質である。血流中又は凝血塊の近傍に放出されたプラスミンは、 $\alpha 2$ 抗プラスミンとの不可逆的な1：1の化学量論的複合体の形成を受けて直ちに中和される。

【0184】

プラスミノゲン活性化因子の抑制因子の中でも、プラスミノゲン活性化因子抑制因子-1（PAI-1）は最も遍在性が高い。これは、内皮細胞、単球、マクロファージ、ヘパトサイト、脂肪細胞、及び血小板によって放出される。PAI-1は、tPA及びuPAの両方に対する最も重要性の高い即効性の生理学的抑制因子である。

【0185】

プラスミノゲン活性化因子抑制因子2（PAI-2）は、ヒト胎盤によって合成される。主に妊娠中、ヒト血漿に高レベルのPAI-2が認められる。

【0186】

最後に、トロンビン活性化可能線溶抑制因子（TAFI）は、カルボキシ末端アルギニン及びリジン残基に特異性のある、強力な線溶抑制因子として作用する血漿カルボキシペプチダーゼである。

【0187】

様々な凝固異常を有する患者の治療は、特発性出血エピソード、外傷の間、及び手術手技全体を通じて不可欠である。多くのかかる状況下で血液／血漿由来製剤（例えば標準血漿又は新鮮凍結血漿—FFP）が使用される。これらの製剤は凝固因子及び線溶タンパク質を含有し、従って、止血凝血塊の形成を誘導することにより出血を止め、及び欠損している又は障害された凝固異常を修正するとされている。一般に、任意の凝固因子の欠如又は異常は、安定した止血凝血塊を作り出す能力が不十分であるため、出血傾向に至り得る。いかなる理論によっても拘束されないが、本発明者らは、線溶タンパク質の存在が止血凝血塊の溶解に関与し、凝血塊の融解及び出血現象の悪化を招き得ると想定した。

【0188】

従って、利用可能な1つ又は複数の血液／血漿由来製剤による欠損凝固因子の補充後に止血凝血塊が形成された後、必要に応じて線溶系による凝血塊融解が達成される。しかしながら、凝血塊の融解が望ましくなく、例えば出血状況での止血凝血塊の確保、又はより多くの凝血塊の生成のために実に逆の活性が求められる場合には、凝固因子で構成されるが線溶因子が枯渇している体液、具体的には血液又は血漿及び任意の由来製剤による治療が望ましい解決法であり得る。

【0189】

本明細書において指摘するとおり、本明細書に開示される本主題は、体液、具体的には血液、血漿及びその製剤から線溶タンパク質を枯渇させるためのコンジュゲート、複数のコンジュゲート又はその任意の組成物、並びに装置、キット及びシステムを提供し、従って更にはこれらの製剤を使用した方法を提供する。

【0190】

従って、更に別の態様において、本明細書に開示される主題は、1つ又は複数の哺乳類体液又はその任意の製剤から少なくとも1つの線溶タンパク質を枯渇させる方法に関する。より具体的には、本方法は、第1のステップ（i）において、1つ又は複数の体液又はその任意の調製物を少なくとも1つの線溶タンパク質に特異的なアフィニティー枯渇手順に供するステップを含む。次のステップ（ii）は、ステップ（i）で得られた少なくとも1つの線溶タンパク質が枯渇した体液を回収するステップを伴う。

【0191】

アフィニティー枯渇手順は、本明細書に開示される主題により開示されるとおり、本明

10

20

30

40

50

細書に開示される主題に係る複数のコンジュゲートの有効量又は複数のコンジュゲートを含む少なくとも1つの組成物に体液を接触させることを含む点に留意すべきである。或いは、アフィニティー枯渇手順は、本明細書に開示される主題において、本明細書に開示される主題のコンジュゲート、任意の複数のコンジュゲート又は複数のコンジュゲートを含む任意の組成物を含む装置、装置一式、キット又はシステムに体液を適用することにより実施されてもよい。

【0192】

一部の実施形態において、各コンジュゲートは少なくとも1つの粒子と少なくとも1つのリンカーと少なくとも1つのアミノ酸、その誘導体又はその類似体とを含むことに留意しなければならない。一部の具体的な実施形態において、複数のコンジュゲートは少なくとも2つの異なるコンジュゲートを含み、ここで前記アミノ酸、その誘導体又はその類似体は、4-(アミノメチル)シクロヘキサンカルボン酸(トラネキサム酸)、ε-アミノカプロン酸、リジン、シクロヘキサンカルボン酸及び4-メチルシクロヘキサンカルボン酸のうちの少なくとも1つである。一部の更なる具体的な実施形態において、複数のコンジュゲートは少なくとも2つの異なるコンジュゲートを含み、ここで前記アミノ酸、その誘導体又はその類似体は、4-(アミノメチル)シクロヘキサンカルボン酸(トラネキサム酸)、ε-アミノカプロン酸及びリジンのうちの少なくとも1つである。

10

【0193】

一部の実施形態において、本明細書に開示される主題の方法において有用なコンジュゲート粒子は、本明細書において上記に本明細書に開示される主題により定義されるとおりであってよいことに留意しなければならない。なおも一部の更なる実施形態において、本明細書に開示される主題の方法は、本明細書において上記に定義するとおりの本明細書に開示される主題によって提供される装置、装置一式、キット又はシステムのうちのいずれかを使用し得る。

20

【0194】

一部の実施形態において、本明細書に開示される主題の方法は、少なくとも1つの凝固因子を含む全血、血漿又は血液由来製剤のうちの少なくとも1つであってよい体液から線溶タンパク質を枯渇させることに適用可能であり得る。

【0195】

一部の具体的な実施形態において、かかる血液由来製剤は、全血、血漿、新鮮凍結血漿(FFP)、多血小板血漿(PPP)及びクリオプレシピテートのうちの少なくとも1つであってもよい。

30

【0196】

一部の実施形態において、本明細書に開示される主題の方法は、エキソピボ又はインピトロで、より具体的には、もはや人体の一部でない体液において実施されてもよいことが理解されなければならない。

【0197】

輸血は、なおも救命に最も不可欠な要素である。現代の貯蔵血液療法では、全血よりむしろ血液成分が輸血される。

【0198】

血液成分療法とは、血液を各成分に分離して特定の所望の成分のみを患者に輸血することを可能にし、そのようにして不要な成分の使用を回避することを指す。血液成分を使用することにより、数人の患者を1人の供血者からの血液で治療することができる。

40

【0199】

用語「新鮮凍結血漿」(FFP)は、本明細書で使用されるとき、供血後に凍結及び保存されている、且つ輸血に使用されることになる主要な血液成分、即ちヒト血液の無細胞液体画分を指す。供血後、1単位のヒト血液が遠心され、血液の細胞含有物が分離され、残りの血漿が採取から8時間以内に-18C(0F)以下で凍結される。

【0200】

FFPは、凝固系、線溶系及び補体系のあらゆる成分(因子/タンパク質)を含有する

50

。単一又は複数の凝固欠乏、並びに外傷又は手術で起こるとおりの既存の又は予想される出血における F F P の使用については、明確に定義された適応症例が存在する。

【0201】

「クリオプレシピテート」は、本明細書で使用されるとき、採取から 6～8 時間以内の急速凍結（F F P について行われるとおり）及び 4℃での急速解凍によって 1 単位の新鮮血漿から得られる血漿の沈降タンパク質に関する。クリオプレシピテートは、第 V I I I 因子、第 X I I I 因子、フォン・ヴィレブランド因子及びフィブリノーゲンが豊富である。従って、この成分は、上述の凝固タンパク質の欠如又は障害に関連する遺伝性又は後天性病態における出血の治療又は防止に好適である。

【0202】

「多血小板血漿」（P R P）血液成分は、1 単位の新鮮（供血）血液から遠心又はアフエーシス手技によって調製される。

【0203】

標準単位の全血から調製されることに加えて、血液成分はアフエーシス手技によって入手されてもよい。アフエーシスは、半自動血液分離器具であるフェーシス機器／機械を用いて行われる。この手技では、供血に血漿が使用されると計画される場合、供血者の抗凝固処理された全血が機器に通され、そこで血液が赤血球、血漿、及び白血球／血小板画分に分離され、次にそれらが対象に返血される。分離した血漿のみが対象に返血されず、しかし更に供血に使用される。

【0204】

血小板、顆粒球、血液幹細胞、単核球、及び血漿の採取に幾つかの半自動血液細胞分離器具が利用可能である。これらの器具はいずれも、遠心を用いて血液成分を分離する。一部のアフエーシス手技は、供血者からの連続血流を血液細胞分離器に通しながらの 2 回の静脈穿刺を含む；他の手順は、単回の静脈穿刺及び断続的な血液採取及び返血によって達成することができる。

【0205】

なおも一部の更なる具体的な実施形態において、本明細書に開示される主題の方法は、プラスミノーゲン及び組織プラスミノーゲン活性化因子（t P A）のうちの少なくとも一方であってよい線溶タンパク質の枯渇に用いられ得る。

【0206】

より具体的には、プラスミノーゲン（別名 P E G、酵素エントリ E C：3．4．2 1．7）は、本明細書で使用されるとき、線溶系の主要な構成要素であり、主に肝臓で合成される。ヒトにはプラスミノーゲンの 2 つの主要なグリコフォームが存在する—2 個のグリコシル化部分（N 2 8 9 への N 結合型及び T 3 4 6 への O 結合型）を含有する I 型プラスミノーゲン、一方、I I 型プラスミノーゲンは単一の O 結合型糖のみ（T 3 4 6 への O 結合型）を含有する。I I 型プラスミノーゲンは I 型グリコフォームと比べて細胞表面に優先的に動員される。逆に、I 型プラスミノーゲンは凝血塊に一層容易に動員されるように見える。循環中では、プラスミノーゲンは閉じた活性化抵抗性のコンホメーションをとる。凝血塊との結合時、又は細胞表面との結合時、プラスミノーゲンは開いた形態をとり、これは、組織プラスミノーゲン活性化因子（t P A）、ウロキナーゼプラスミノーゲン活性化因子（u P A）、カリクレイン、及び第 X I I 因子（ハーゲマン因子）を含めた種々の酵素によって活性プラスミンに変換されることができる。より具体的には、5 6 0～5 6 1 位の単一の A r g－V a l ペプチド結合でプラスミノーゲンが切断（活性化）されると、活性のセリンプロテアーゼ、プラスミンが生じ、ひいてはこれがフィブリン塊を融解する。

【0207】

完全長プラスミノーゲンは 7 ドメインを含む。C 末端キモトリプシン様セリンプロテアーゼドメインに加えて、プラスミノーゲンは N 末端 Pan Apple ドメイン（P A p）を 5 個のクリングルドメイン（K R 1～5）と共に含有する。Pan-Apple ドメインは、プラスミノーゲンが閉じた形態を維持するのに重要な決定基を含有し、クリングルドメインは、受

10

20

30

40

50

容体及び基質に存在するリジン残基への結合に関与する。

【0208】

一部の実施形態において、本明細書に開示される主題が言及するプラスミノーゲンはヒトプラスミノーゲンであってもよい。かかる実施形態において、プラスミノーゲン遺伝子（GenBank：AY192161.1、chr6q26にマッピングされる）は約52.5 kbのDNAにわたり、19エクソンを含有する（OMIM番号173350）。一部の実施形態において、プラスミノーゲンは、本明細書で使用されるとき、配列番号1によって示されるとおりの配列を含む核酸配列によってコードされるアミノ酸配列を含むヒトプラスミノーゲンを指すことに留意しなければならない。一部の更なる実施形態において、ヒトプラスミノーゲンは、配列番号1によって示されるとおりの配列と少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の相同性を有する配列を含む核酸配列によってコードされるアミノ酸配列を含んでもよい。なおも一部の更なる実施形態において、かかるヒトプラスミノーゲン分子は、配列番号2によって示されるとおりのアミノ酸配列を含んでもよい。なおも一部の他の実施形態において、かかるヒトプラスミノーゲン分子は、配列番号2によって示されるとおりの配列と少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の相同性を有するアミノ酸配列を含んでもよい。

10

【0209】

「プラスミノーゲン欠乏体液」又は「プラスミノーゲン不含体液」は、本明細書で使用されるとき、本明細書に開示される主題の製剤（一部の実施形態によれば、血液、血漿又は血液製剤などの体液を線溶タンパク質結合剤、具体的にはプラスミノーゲン結合剤で処理することにより調製されたもの）が、未処理の血液又は血液製剤と比較したときプラスミノーゲン量の約100%～50%の低下、減少、減弱を呈することを意味する。より具体的には、体液、具体的には血液又は血液製剤に通常存在するプラスミノーゲンの少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%が、具体的には未処理の血液又は血液製剤と比較したとき、本明細書に開示される主題の製剤から除去される。換言すれば、本明細書に開示される主題の製剤は、他の製剤又は未処理の血液若しくは血液製剤中のプラスミノーゲンの量の約0.01%～約50%の量のプラスミノーゲンを含んでもよい。具体的には、未処理の血液又は血液製剤と比較したときプラスミノーゲンの量の約0.01%以下、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%又はそれ未満。

20

【0210】

プラスミノーゲンは、活性化されて活性プラスミン酵素を形成すると、タンパク質分解活性、具体的にはタンパク質から小型のポリペプチド又はアミノ酸への切断又は分解を呈する。これに関連して、本明細書に開示される主題の方法によって処理される体液は、プラスミノーゲン又はプラスミンタンパク質分解活性を欠いている。一部の具体的な実施形態において、プラスミン及びプラスミノーゲンのタンパク質分解活性はフィブリンの切断を伴い、従ってフィブリン塊を融解する。用語「プラスミン及びプラスミノーゲン活性を欠いている」は、本明細書に開示される主題の方法によって処理される体液がプラスミン及びプラスミノーゲンのタンパク質分解性活性を完全に欠損しているか、又は少なくとも、血液、血漿又は血液製剤などの体液、具体的には未処理血液又は血液製剤における活性プラスミン又はプラスミノーゲンのタンパク質分解活性と比較したとき約1%～99.9%のうちのいずれか1つ、具体的には、約1%～約5%、約5%～10%、約10%～15%、約15%～20%、約20%～25%、約25%～30%、約30%～35%、約35%～40%、約40%～45%、約45%～50%、約50%～55%、約55%～60%、約60%～65%、約65%～70%、約75%～80%、約80%～85%、約85%～90%、約90%～95%、約95%～99%、又は約99%～99.9%又

30

40

50

は100%だけ「低下した」、「減少した」、「緩和された」、「抑制された」又は「減弱された」タンパク質分解性活性を呈することを意味すると理解されなければならない。

【0211】

なおも更に、一部の実施形態において、本明細書に開示される主題の方法によって処理される体液は、tPAを欠いている。本明細書に開示される主題の方法、コンジュゲート及び装置を用いたtPAの枯渇は、図9によって明確に実証されている。

【0212】

組織プラスミノゲン活性化因子（別名PLAT；酵素エントリEC3.4.21.68.）に関して本明細書で使用される用語tPAは、プロ酵素プラスミノゲンを強力な線溶酵素プラスミンに変換して活性化する分泌型セリンプロテアーゼに関することが理解されなければならない。tPAは血管内皮細胞において単一のポリペプチド鎖として合成され、これが中心に位置するアルギニン-イソロイシン結合でプラスミン又はトリプシンによるタンパク質分解切断を受けると、N末端に由来する重鎖とC末端軽鎖とで構成される2本鎖のジスルフィド結合した形態になる。tPA遺伝子（DNA受託番号NT_167187.1、8p11.21にマッピングされる）は、2つのクリングル領域（K1及びK2）及び成長因子と類似の領域を含む重鎖ドメインと、セリンプロテアーゼ触媒部位を含む軽鎖ドメインとをコードする14個のエクソンを含有する。tPA遺伝子が選択的にスプライシングされると、線溶は別として、細胞遊走及び組織リモデリングなど、複数の生物学的過程に関与する異なるアイソフォームをコードする複数の転写変異体が生じる。tPA活性の増加は、過剰出血として現れる線溶亢進を引き起こす；tPA活性の低下は、血栓症又は塞栓症を招き得る線溶低下につながる。tPAと関連付けられる表現型には、家族性線溶亢進（tPA放出の増加に起因する）及び家族性血栓形成傾向（tPA放出の低下に起因する（OMIM番号612348））が含まれる。一部の実施形態において、tPAは、本明細書で使用されるとき、配列番号3によって示されるとおりの配列を含む核酸配列によってコードされるアミノ酸配列を含むヒトtPAを指すことに留意しなければならない。一部の更なる実施形態において、ヒトtPAは、配列番号3によって示されるとおりの配列と少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の相同性を有する配列を含む核酸配列によってコードされるアミノ酸配列を含んでもよい。なおも一部の更なる実施形態において、かかるヒトtPA分子は、配列番号4によって示されるとおりのアミノ酸配列を含んでもよい。なおも一部の他の実施形態において、ヒトtPAは、配列番号4によって示されるとおりの配列と少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の相同性を有するアミノ酸配列を含んでもよい。

【0213】

「tPA欠乏体液」又は「tPA不含体液」は、本明細書で使用されるとき、本明細書に開示される主題の方法によって処理される体液（一部の実施形態によれば、血液、血漿又は血液製剤などの体液を本明細書に開示される主題のコンジュゲートで処理することにより調製されたもの）が、未処理の血液又は血液製剤と比較したとき、通常存在するtPA量の約100%～50%の低下、減少、減弱を呈することを意味する。より具体的には、体液から、具体的には未処理の血液、血漿又は血液製剤と比較したとき少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%のtPAが除去される。換言すれば、本明細書に開示される主題の方法によって処理される体液は、他の製剤中又は未処理の血液若しくは血液製剤中におけるtPA量の約0.01%～約50%の量のtPAを含み得る。具体的には、未処理の体液、例えば血液、血漿又は血液製剤などと比較したときtPA量の約0.01%以下、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%以下、更には60%又は70%。

【0214】

なおも一部の更なる実施形態において、本明細書に開示される主題の方法によって調製される体液又は具体的には血液、血漿若しくは血液由来の製剤は、プラスミノゲン及びtPAを欠いていてもよく、そのため、上記に特定したとおりの任意の線溶活性を欠いていてもよい。なおも一部の更なる実施形態において、本明細書に開示される主題の方法によって調製される体液又は製剤はまた、任意の他の線溶剤、例えばウロキナーゼ（uPA）を欠いていてもよい。なおも更に、一部の実施形態において、本明細書に開示される主題の方法によって調製される体液製剤に追加的な抗線溶剤が加えられてもよいことが理解されなければならない。

【0215】

一部の任意選択の実施形態において、本方法は、ステップ（ii）で回収された線溶タンパク質枯渇体液中のプラスミノゲンの量を、前記線溶タンパク質枯渇体液における凝固時間及び総凝血塊溶解時間のうちの少なくとも一方を決定することにより測定するステップを更に含んでもよい。

【0216】

一部の実施形態において、本明細書に開示される主題の方法は、線溶活性が低下している少なくとも1つの血液及び／又は血液由来製剤の調製において用いられてもよい。

【0217】

線溶活性は、本明細書で使用されるとき、血液及び血液由来製剤中の一部のタンパク質分解酵素がフィブリン及び凝血塊を融解させる能力を指す。フィブリンを切断する主要なタンパク質分解酵素はプラスミンである。プラスミンは、プラスミノゲンがtPA及び／又はuPAによって活性化されることにより形成される。プラスミンがフィブリンを分解すると、フィブリン分解産物（FDP）が形成される。FDPはトロンビンと競合し、従ってフィブリンノーゲンからフィブリンへの変換を妨げることにより凝血塊形成を減速させる。この効果はトロンビン凝固時間（TCT）試験で見ることができ、活性な線溶を有する人ではこれが延長する。FDP、及び特異的FDP、D-ダイマーは、抗体-抗原技術を用いて測定することができる。これはTCTよりも特異的であり、線溶が起こっていることを確認する。従ってこれは、深部静脈血栓症、肺塞栓症、DIC及び急性心筋梗塞における治療の有効性の指標を得るために用いられる。或いは、全血中のトロンボエラストメトリー（TEM）によれば、ヘパリン下の患者であっても、線溶活性、特に線溶亢進のより迅速な検出が可能である。このアッセイでは、線溶阻害薬アプロチニンの非存在下又は存在下でのTEMプロファイルを比較することにより、線溶の増加が評価される。なおも更に、全体的な線溶の検査を真性グロブリン溶解時間（ELT）アッセイによって測定することができる。ELTは、血漿から真性グロブリン画分（主に、重要な線溶因子フィブリンノーゲン、PAI-1、tPA、 α 2-抗プラスミン、及びプラスミノゲン）を凝血させ、次に凝血塊融解に必要な時間を観察することにより線溶を測定する。溶解時間が短くなることが、線溶亢進状態及び出血リスクを示す。

【0218】

上記に指摘したとおり、本明細書に開示される主題の方法によって処理される体液、血液、血漿又は血液製剤は、低下した、又は減少した線溶活性を呈する。用語「低下した」、「減少した」、「緩和された」、「抑制された」又は「減弱した」は、本明細書において参照されるとき、tPA及び／又はプラスミノゲンを含む血液、血漿又は血液製剤などの体液との比較、本明細書に開示される主題のコンジュゲートによって処理されなかった血液又は血液製剤との比較、通常の血液又は血液製剤との比較、又は市販の血液製剤との比較で、ある過程、具体的には線溶活性の約1%～99.9%のうちのいずれか1つ、具体的には、約1%～約5%、約5%～10%、約10%～15%、約15%～20%、約20%～25%、約25%～30%、約30%～35%、約35%～40%、約40%～45%、約45%～50%、約50%～55%、約55%～60%、約60%～65%、約65%～70%、約75%～80%、約80%～85%、約85%～90%、約90%～95%、約95%～99%、又は約99%～99.9%、又は更には100%の遅延、制限、減少又は低下を指すことが理解されなければならない。換言すれば、これらの製剤

10

20

30

40

50

は線溶活性を呈しないか、又は高々、最小限の低下した線溶活性、具体的には、未処理の血液又は血液製剤の線溶活性と比較したとき約0.01%以下、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%以下の線溶活性を呈する。一部の実施形態において、上記に定義されるとおり低下した線溶活性を呈する又は線溶活性を呈しない、本明細書に開示される主題によって提供される方法、コンジュゲート、組成物、並びに装置、装置一式、キット又はシステムによって処理される体液、血液、血漿又は血液製剤は、本明細書で後に考察するとおり、本明細書に開示される主題によって開示される任意の治療適用に用いられてもよい。

【0219】

更に一部の他の具体的な実施形態において、本明細書に開示される主題の方法は、それを必要としている対象の及び／又はそうした対象にある少なくとも1つの線溶タンパク質体液を枯渇させるためインビボ／エキソビボで用いられてもよい。

【0220】

従って、その別の態様において、本明細書に開示される主題は、それを必要としている対象の1つ又は複数の体液から少なくとも1つの線溶タンパク質を体外手技によって枯渇させる方法を提供する。より具体的には、本方法は以下のステップを含む：

第1のステップ(i)において、前記対象の体液を体外機器へと移送するステップ。一部の実施形態において、本明細書に開示される主題により提供される装置、装置一式、キット又はシステムが、かかる体外機器と見なされてもよい。

【0221】

第2のステップ(ii)は、体液を少なくとも1つの線溶タンパク質に特異的なアフィニティー枯渇手順に供するステップを含む。かかる枯渇は、前記機器への及びそこからの血液の移送前、移送中又は移送後に実施されてもよいことに留意しなければならない。このようにして、対象の体外体液が入手される。この体外体液は少なくとも1つの線溶タンパク質が枯渇している。

【0222】

次のステップ(iii)は、ステップ(ii)で入手された、少なくとも1つの線溶タンパク質が枯渇している体液を対象に返還する、又は再導入するステップを含む。

【0223】

アフィニティー枯渇手順は、対象の体液を有効量の複数のコンジュゲート又はその任意の組成物と具体的にはエキソビボで接触させることを含む点に留意しなければならない。なおも更に、前記体外機器内、又は本明細書に開示される主題により定義されるとおりの、かかる体外機器に接続した装置、装置一式、キット又はシステム内に、本明細書に開示される主題のコンジュゲート又はその任意の組成物が含まれてもよい。上述のとおり、本明細書で考察される各コンジュゲートは、一部の実施形態において、少なくとも1つの粒子と少なくとも1つのリンカーと少なくとも1つのアミノ酸、その誘導体又はその類似体とを含んでもよい。なおも一部の更なる実施形態において、複数のコンジュゲートは少なくとも2つの異なるコンジュゲートを含む。一部の更なる実施形態において、アミノ酸、その誘導体又はその類似体は、4-(アミノメチル)シクロヘキサンカルボン酸(トラネキサム酸)、ε-アミノカプロン酸、リジン、シクロヘキサンカルボン酸及び4-メチルシクロヘキサンカルボン酸のうちの少なくとも1つであってもよい。なおも一部の更なる実施形態において、アミノ酸、その誘導体又はその類似体は、4-(アミノメチル)シクロヘキサンカルボン酸(トラネキサム酸)、ε-アミノカプロン酸及びリジンのうちの少なくとも1つである。更に一部の実施形態において、アミノ酸、その誘導体又はその類似体はトラネキサム酸(TXA)であってもよい。

【0224】

一部の実施形態において、体外機器は心肺バイパス機(CPB)であり、及びここで体外機器は血漿アフエレーション機械である。

【0225】

用語「体外」は、体外で行われる医療手技を指す。例えば、かかる体外手技は、循環手技、即ち、患者の循環から血液が取り出され、それに対してある処理が適用された後、それが循環に返還される手技に関し得る。血液を体外に運び出す機器は全て、体外循環と呼ばれる。かかる循環手技には、例えば限定はされないが、アフエレーシス、自己血輸血、血液透析、血液ろ過、血漿アフエレーシス、体外二酸化炭素除去、体外心肺蘇生、体外式膜型人工肺（ECMO）及び直視下心臓手術中の心肺バイパスが含まれる。

【0226】

心肺バイパス（CPB）は、手術時に心肺機能を一時的に代わって担い、患者の体の血液循環及び酸素含量を維持する技法である。CPBポンプそれ自体は、人工心肺又は「ポンプ」と称されることが多い。心肺バイパスポンプは血液灌流技師によって操作される。CPBは体外循環の一形態である。体外式膜型人工肺は、概して長期治療に使用される。

【0227】

アフエレーシス機は、患者又は供血者の体から取り出された血液を受け取り、それをその様々な成分：血漿、血小板、白血球及び赤血球に分離する装置である。

【0228】

一部の実施形態において、本明細書に開示される主題の方法において有用なコンジュゲート粒子は、本明細書に開示される主題により定義されるとおりであってよいことに留意しなければならない。なおも一部の更なる実施形態において、本明細書に開示される主題の方法は、本明細書において上記に定義するのとりの装置、装置一式、キット又はシステムを使用してもよい。

【0229】

一部の実施形態において、本明細書に開示される主題の方法は、少なくとも1つの凝固因子を含む全血、血漿又は血液由来製剤のうちの少なくとも1つであってよい少なくとも1つの線溶タンパク質を体液から枯渇させることに適用可能であり得る。

【0230】

一部の具体的な実施形態において、かかる血液由来製剤は、全血、血漿、新鮮凍結血漿（FFP）、多血小板血漿（PRP）及びクリオプレシピテートのうちの少なくとも1つであってよい。

【0231】

なおも一部の更なる具体的な実施形態において、本明細書に開示される主題の方法は、プラスミノゲン及びtPAのうちの少なくとも1つであってよい線溶タンパク質の枯渇に用いられてもよい。一部の具体的な実施形態において、本明細書に開示される主題の方法は、tPAの枯渇に用いられてもよい。なおも一部の更なる実施形態において、本明細書に開示される主題の方法は、プラスミノゲンの枯渇に用いられてもよい。なおも更に、特定の実施形態において、本明細書に開示される主題の方法は、プラスミノゲン及びtPAの枯渇に用いられてもよい。

【0232】

なおも一部の更なる実施形態において、本方法は、本明細書に開示される主題のコンジュゲート、複数のコンジュゲート又はその任意の組成物、又は具体的にはTXAコンジュゲート粒子からプラスミノゲン及びtPAのうちの少なくとも一方を回収するステップを更に含んでもよい。本明細書に開示される主題の方法によって体液から取り出される枯渇させる線溶タンパク質は、他の目的に用いられてもよいことが理解されなければならない。一部の具体的な実施形態において、本明細書に開示される主題の機器又はコンジュゲートからプラスミノゲン及び／又はtPAを回収することは、前記機器上で、有効量のコンジュゲート、その組成物又は具体的にはTXA、その誘導体又はその任意の類似体を、前記プラスミノゲン及び／又はtPAに結合した組成物、コンジュゲート又は具体的にはTXAコンジュゲート粒子に適用することにより実施されてもよい。なおも一部の更なる実施形態において、回収されたプラスミノゲンは、線溶が必要な場合に前記対象の治療に用いられ得る。

【0233】

なおも更に、本開示は、それを必要としている対象の1つ又は複数の体液から少なくとも1つの線溶タンパク質を体外手技によって枯渇させる方法における使用のための体外機器を更に提供することが理解されなければならない。より具体的には、本方法は以下のステップ：第1のステップ(i)において、前記対象の体液を～に(into)移送するステップを含む。一部の実施形態において、本明細書に開示される主題により提供される装置、装置一式、キット又はシステムが、かかる体外機器と見なされてもよい。第2のステップ(ii)は、体液を少なくとも1つの線溶タンパク質に特異的なアフィニティー枯渇手順に供するステップを含む。かかる枯渇は、前記機器への及びそこからの血液の移送前、移送中又は移送後に実施されてもよいことに留意しなければならない。このようにして、対象の体外体液が入手される。この体外体液は少なくとも1つの線溶タンパク質が枯渇している。次のステップ(iii)は、ステップ(ii)で入手された、少なくとも1つの線溶タンパク質が枯渇している体液を対象に返還する、又は再導入するステップを含む。

10

【0234】

更に別の態様において、本明細書に開示される主題は、それを必要としている対象の出血性、止血障害及びそれに関連する任意の出血性又は病的状態を治療、防止、予防、改善、抑制する方法を提供する。より具体的には、本方法は、線溶活性が低下した治療有効量の少なくとも1つの血液及び／又は血液由来製剤を治療下の対象に投与するステップを含んでもよい。一部の実施形態において、製剤は、本明細書に記載されるとおりの方法により調製されてもよい。

【0235】

一部の実施形態において、本明細書に開示される主題の方法は、遺伝性又は後天性出血性障害であってもよい止血障害に適用可能であり得る。

20

【0236】

止血障害は、遺伝性又は後天性のいずれかに分類される出血性障害である。後天性出血性障害は、本明細書で以下に考察するとおり、外傷、手術又は線溶治療など、外因(後天的原因)によって出血が引き起こされる障害である。

【0237】

1つ以上の凝固因子の遺伝的欠乏によって起こる出血性障害は、世界中に分布するまれな障害である。これらの欠乏に関与する突然変異遺伝子のホモ接合体又は複合ヘテロ接合体は、様々な重症度の、通常は特定の凝固因子の活性低下の程度に関係する出血徴候を呈する。

30

【0238】

更に別の実施形態において、本明細書に開示される主題の方法は、遺伝性止血障害に関連する出血及び未確定の出血傾向の治療、予防、改善、抑制又は遅延に適用可能である。

【0239】

「遺伝性止血障害」は、本明細書で使用されるとき、少なくとも1つの凝固因子の遺伝的欠乏に関する。より具体的には、凝固第I、II、V、VII、X及びXI因子をコードする遺伝子に、前記因子のうちの少なくとも1つの欠乏又はその活性低下につながる多数の突然変異が同定されている。これらの突然変異のホモ接合体は、特発性又は外傷／手術後のいずれかに出血傾向を呈する。様々な欠乏のヘテロ接合体は、出血傾向を示すことはまれである。

40

【0240】

未確定の出血傾向とは、本明細書で使用されるとき、その状態の正確な診断は確立することができないが、出血傾向にある状態に関する。

【0241】

軽度出血症状の評価に回される一部の患者は、手術又は分娩など、出血を生じさせる攻撃的イベントが起こるまで認識されていなかった可能性のある診断未確定の出血傾向を有する。かかる個体には、出血徴候に関して臨床的なばらつきがよく見られ、環境因子及び他の遺伝因子が出血リスクを改善し得ることが示唆される。軽度出血問題は、重大な止血チャレンジ(手術、抜歯、大外傷、初経又は分娩)に直面するまで明らかにならないこと

50

もあるが、こうした個体について、予測的な術後出血リスクは確立されていない。性別は出血徴候に影響を及ぼす。女性は、月経及び／又は分娩に伴う厄介な出血があるため、評価に回されることが多くなる。加えて、抜歯後24時間以上持続する又は問題となる出血については、出血性障害の可能性が浮上する。軽度の皮膚粘膜出血を有する患者の診断を確立できないことは、実際にはよく見られる問題である。

【0242】

未確定の出血傾向の診断の証となるのは、通常の臨床検査である。診断を確立できないことは、手術を受ける又は分娩を行う必要のある患者にとって問題となり得る。

【0243】

未確定の出血性障害を有する患者の軽度出血症状には、歯科及び口腔外科手術についてε-アミノカプロン酸又はトラネキサム酸による線溶阻害薬療法が用いられてもよく、これは他の手術手技に伴う出血を減少させ得る。しかしながら、例えば手術又は分娩時に重度の出血が起こる場合、血液又は血液由来成分が必要となる。

【0244】

より具体的な実施形態において、遺伝性止血障害は、少なくとも1つの凝固因子の欠乏及び未確定の出血傾向のうちの少なくとも一方に起因する障害であり得る。

【0245】

なおも一部の更なる実施形態において、少なくとも1つの凝固因子の欠乏は、第XI因子、第X因子、第V因子、第VII因子、第II因子（プロトロンビン）及び第I因子（フィブリノーゲン）のうちの少なくとも1つの欠乏であり得る。従って、一部の実施形態において、本明細書に開示される主題により記載される方法は、本明細書に開示されるとおりの第XI因子、第X因子、第V因子、第VII因子、第II因子（プロトロンビン）及び第I因子（フィブリノーゲン）のうちの少なくとも1つの欠乏によって引き起こされる遺伝性止血障害に付随する任意の形態の出血に適用可能であり得る。

【0246】

なおも一部の更なる実施形態において、本明細書に開示される主題の方法は、凝固第I、II、V、VII、X及びXI因子の遺伝的欠乏によって特徴付けられる障害であって、それに関連する出血傾向のうちの少なくとも1つ又は任意の出血傾向を含む障害の治療に適用可能であり得る。凝固第I、II、V、VII、X及びXI因子の遺伝的欠乏は、大多数の集団において記載されている常染色体劣性出血性障害である。その相対頻度は、一部には近交系集団で特定の突然変異遺伝子が高頻度である結果として集団間で様々である。幾つかの集団調査が示すところによれば、これらの出血性障害には第XI因子及び第VII因子の欠乏がよく見られ、あまり見られない障害は、第V因子及び第X因子の欠乏並びに無フィブリノーゲン血症であり、及び最もまれな障害は第II因子（プロトロンビン）及び第XIII因子の欠乏である。突然変異遺伝子に関してホモ接合又は複合ヘテロ接合である罹患患者における出血徴候の重症度は様々であり、通常は欠乏の程度に係する。一部の患者は軽い青あざを有するのみで、又は外傷後にのみ過剰出血を呈する。通常は正常な第VII、XIII、又はX因子活性の1パーセント未満である他の患者は、重症血友病患者と同様の頭蓋内出血及び関節血症を呈し得る。

【0247】

一部の具体的な実施形態において、本明細書に開示される主題の方法は、遺伝性第XI因子欠乏症に関連する出血、又は第IX因子欠乏症に罹患している患者の任意の後天性出血又は止血病態の治療、防止、低減、減弱、又は抑制に適用可能であり得る。

【0248】

遺伝性第XI因子欠乏症は、常染色体劣性形質として遺伝する。この障害は、ホモ接合体又は複合ヘテロ接合体において、主に傷害関連である軽度から中等度の出血傾向として示される。多くの集団において罹患対象が記載されているが、ユダヤ人、特にアッシュケナージ系ユダヤ人に、この障害が多く見られる。

【0249】

機能不全タンパク質の結果としての第XI因子欠乏症はまれであり、患者の大多数は第

10

20

30

40

50

XⅠ因子タンパク質レベルが低下している。様々な血統の非ユダヤ人及びユダヤ人患者に合わせて150を上回る突然変異が報告されており、そのほとんどがミスセンス突然変異である。

【0250】

ホモ接合体及び複合ヘテロ接合体での多くの出血徴候は、傷害関連である。過剰出血が傷害時に起こり、又は外傷後数時間若しくは数日で始まり得る。出血傾向は、止血チャレンジ及び様々な傷害部位に応じて異なる。線溶活性が高い組織（尿路、扁桃腺、鼻、歯槽）が関わる手術手技は、重度の第XⅠ因子欠乏症患者では遺伝子型に関係なく高頻度で過剰出血を伴う。現在では、凝血塊溶解の防止における第XⅠ因子の実証されている機能を踏まえると、部位関連の出血傾向を理解することができる。第XⅠ因子欠乏症は、それ自体は線溶の増加を伴い、従って、こうした患者における線溶に富む部位での手術の更なる出血リスクにより、出血傾向は更に一層増加し得る。

10

【0251】

第XⅠ因子欠乏症を有する出血患者の現在の治療はFFPに基づく。手術手技を受けなければならない重度第XⅠ因子欠乏症患者は、慎重に評価され、細心の注意を払って手術準備が行われなければならない。局所線溶活性が高い部位の手術を受ける患者においては、抗線溶剤の使用が検討されなければならない。従って、一部の実施形態において、本明細書に開示される主題により提供されるtPA及び／又はプラスミノゲン欠乏FFPは、第XⅠ因子欠乏症患者、より具体的には上記で考察した病態のいずれかに罹患している対象の治療に特に関連性が高いものであり得る。

20

【0252】

他の実施形態において、本明細書に開示される主題の方法は、遺伝性第ⅤⅠⅠ因子欠乏症に関連する出血、又は第ⅤⅠⅠ因子欠乏症に罹患している患者の任意の後天性出血若しくは止血病態の治療、防止、低減、減弱、抑制に適用可能であり得る。

【0253】

第ⅤⅠⅠ因子の遺伝的欠乏は、多くの集団に観察されているまれな常染色体劣性障害である。第ⅤⅠⅠ因子欠乏症は、凝固時間検査プロトロンビン時間（PT）の延長を生じる唯一の血液凝固障害であるため、推定診断は容易に行うことができる。第ⅤⅠⅠ因子欠乏症を引き起こす多くの突然変異がミスセンス突然変異となっている。

【0254】

第ⅤⅠⅠ因子欠乏に関するホモ接合体及び複合ヘテロ接合体で出血徴候が起こる。第ⅤⅠⅠ因子活性が正常値の1パーセント未満である患者は、重度の関節症につながる関節血症及び致命的な脳内出血など、重度の出血徴候を高頻度で示す。

30

【0255】

やや高いレベルの第ⅤⅠⅠ因子（正常値の5パーセント以上の第ⅤⅠⅠ因子活性）を有する患者は、鼻出血、歯肉出血、月経過多、及び青あざができ易いことによって特徴付けられる、はるかに軽度の疾患を有する。抜歯、扁桃摘出術、及び泌尿生殖器管が関わる手技など、一部の手術手技は、手技前に前療法が導入されない場合、高頻度で出血を伴う。対照的に、開腹術、ヘルニア縫合術、付録切除術、及び子宮摘出術などの手術手技は問題なく行われている。この明らかな相違は、それぞれの外傷組織が呈する局所線溶の程度の差によって説明することができる。

40

【0256】

FFPによる補充療法は、関節血症又は脳内出血など、重度の出血を示す患者に不可欠である。抜歯、扁桃摘出術、鼻の手術、及び泌尿器科介入は局所線溶に起因して出血を伴う可能性が高いため、手術を要する場合には手術部位を考慮しなければならない。従って、一部の実施形態において、本明細書に開示される主題により提供されるtPA及びプラスミノゲン欠乏FFPは、第ⅤⅠⅠ因子欠乏症、具体的には上記で考察した病態のいずれかを有する患者の治療に特に関連性が高いものであり得る。

【0257】

更に別の実施形態において、本明細書に開示される主題の方法は、遺伝性第X因子欠乏

50

症に関連する出血、又は第Ⅹ因子欠乏症に罹患している患者における任意の後天性出血若しくは止血病態の治療、防止、低減、減弱、抑制に適用可能であり得る。

【0258】

中等度から重度の出血傾向である遺伝性第Ⅹ因子欠乏症は、常染色体劣性障害である。現在記載されている第Ⅹ因子欠乏症を引き起こす95個の突然変異には、大型欠失、小型フレームシフト欠失、ナンセンス突然変異、及びミスセンス突然変異が含まれる。第Ⅹ因子欠乏症の臨床徴候は第Ⅹ因子の機能レベルに関係する。重度の第Ⅹ因子欠乏症を有し及び機能性第Ⅹ因子レベルが正常出血値の1パーセント未満である個体は、特発的に及び外傷後に出血する。出血は主に関節及び軟部組織に起こるが、しかしながら、月経過多など、粘膜からの出血が女性で特に問題となり得る。更に異例の出血は、脳内出血、腸壁内出血（急性腹症のような症状が生じ得る）、尿路出血、及び軟部組織出血であって、出血性仮性嚢胞又は偽腫瘍の発育を伴うものである。軽度の第Ⅹ因子欠乏症を有する個体では、出血はあまり見られず、通常は外傷後又は術中若しくは術後にのみ起こる。第Ⅹ因子欠乏症患者は新鮮凍結血漿を使用して治療される。従って、一部の実施形態において、本明細書に開示される主題により提供されるtPA及び／又はプラスミノゲン欠乏FFP（又は任意の他の血液製剤）は、第Ⅹ因子欠乏症患者、具体的には上記で考察した病態のいずれかに罹患している患者の治療に特に関連性が高いものであり得る。

10

【0259】

なおも一部の他の実施形態において、本明細書に開示される主題は、遺伝性第Ⅴ因子欠乏症に関連する出血、又は第Ⅴ因子欠乏症に罹患している患者における任意の後天性出血若しくは止血病態の治療、防止、低減、減弱、及び抑制に適用可能であり得る。

20

【0260】

遺伝性第Ⅴ因子欠乏症は、あまり見られない遺伝性出血性障害の中の一つであり、ホモ接合体又は複合ヘテロ接合体において中等度の出血傾向として現れる。第Ⅴ因子欠乏症は常染色体劣性形質として遺伝する。血漿第Ⅴ因子活性が正常値の25～60パーセントの範囲であるヘテロ接合体は、通常は無症候性である。第Ⅴ因子タンパク質アッセイによれば、多くのホモ接合体及び複合ヘテロ接合体が、機能不全タンパク質よりむしろ、真の欠乏を有することが指摘される。全体で80を上回る個別的な突然変異が同定されており、そのうち4分の1がミスセンスである。第Ⅴ因子レベルが正常値の1～10パーセント未満の範囲であるホモ接合体又は複合ヘテロ接合体患者は、生涯にわたって出血傾向を呈する。多く見られる徴候には、斑状出血、鼻出血、歯肉出血、軽微な裂傷後の出血、及び月経過多が含まれる。重度の第Ⅴ因子欠乏症を有する患者では、50パーセントを超える妊娠で分娩後出血が起こる。他の部位からの出血はあまり見られない。外傷、抜歯、及び手術は、高い過剰出血リスクをもたらす。重度の特発性出血が起こる場合、又は手術が実施される場合、新鮮凍結血漿補充が行われなければならない。血漿補充療法を計画する際には、泌尿生殖器管、口腔、及び鼻など、局所線溶活性が高い部位での手術手技について考慮することが、こうした部位での手術は過剰出血を招くことになり、及び分娩後出血が多く見られるため、重要である。従って、一部の実施形態において、本明細書に開示される主題により提供されるtPA及びプラスミノゲン欠乏製剤は、第Ⅴ因子欠乏症、具体的には上記で考察した病態のいずれかを有する患者の治療に特に関連性が高いものであり得る。

30

40

【0261】

特定の実施形態において、本明細書に開示される主題の方法は、遺伝性第ⅠⅠ因子欠乏症に関連する出血、又は第ⅠⅠ因子欠乏症に罹患している患者における任意の後天性出血若しくは止血病態の治療、防止、低減、減弱、抑制に特に適用可能であり得る。

【0262】

遺伝性第ⅠⅠ因子（プロトロンビン）欠乏症は、最もまれな凝固因子欠乏症の一つである。これは2つの形態：真の欠乏であるⅠ型（低プロトロンビン血症）、及び機能不全のプロトロンビンが産生されるⅠⅠ型（プロトロンビン異常症）を呈する。これらの常染色体劣性障害は遺伝的に異質であり、軽度から中等度の出血傾向によって特徴付けられる。

【0263】

50

プロトロンビンの異常は常染色体劣性様式で遺伝する。Ⅰ型欠乏症の個体の中では、ヘテロ接合体が正常値の約50パーセントのプロトロンビンレベルを呈し、一方、ホモ接合体が典型的には正常値の10パーセント未満のレベルを示す。プロトロンビン欠乏症を引き起こす50を上回る突然変異が同定されており、そのほとんどがミスセンス突然変異である。

【0264】

遺伝性Ⅰ型及びⅠⅠ型欠乏症は、通常は機能性プロトロンビンの欠乏程度と相関する軽度から中等度の皮膚粘膜及び軟部組織出血によって特徴付けられる。プロトロンビンレベルが正常値の約1パーセントであれば、特発的に又は外傷後に出血が起こり得る。手術による出血は重篤となり得る。月経過多、鼻出血、歯肉出血、青あざができ易い、及び皮下血腫が起こり得る。

【0265】

先天性プロトロンビン欠乏症患者の補充療法はFFPの投与からなる。従って、一部の実施形態において、本明細書に開示される主題により提供されるtPA及びプラスミノゲン欠乏FFPは、第ⅠⅠ因子欠乏症、具体的には上記で考察した病態のいずれかを有する患者の治療に特に関連性が高いものであり得る。

【0266】

なおも一部の他の実施形態において、本明細書に開示される主題は、遺伝性フィブリノーゲン欠乏症に関連する出血又は遺伝性フィブリノーゲン欠乏症に罹患している患者における任意の後天性出血若しくは止血病態の治療、防止、低減、減弱、抑制に適用可能であり得る。

【0267】

「フィブリノーゲン（第Ⅰ因子）欠乏症」は、本明細書で使用されるとき遺伝性フィブリノーゲン異常に関し、無フィブリノーゲン血症（フィブリノーゲンの完全な欠如）、異常フィブリノーゲン血症及び低異常フィブリノーゲン血症を含む。遺伝性のフィブリノーゲン障害はまれであり、Ⅰ型及びⅠⅠ型障害に細分することができる。Ⅰ型障害（無フィブリノーゲン血症及び低フィブリノーゲン血症）は循環中のフィブリノーゲンの量に影響を及ぼす。ⅠⅠ型障害（異常フィブリノーゲン血症及び低異常フィブリノーゲン血症）は、循環フィブリノーゲンの質に影響を及ぼす。最も重症型のフィブリノーゲン欠乏症である無フィブリノーゲン血症は、常染色体劣性遺伝及び血漿中におけるフィブリノーゲンの完全な欠如によって特徴付けられる。

【0268】

異常フィブリノーゲン血症は、正常レベルの機能的に異常な血漿フィブリノーゲンの存在によって定義される。低異常フィブリノーゲン血症は、低レベルの機能不全タンパク質によって定義される。これらは、3つのフィブリノーゲンコード遺伝子における多くの異なる突然変異によって引き起こされる異質性障害である。異常フィブリノーゲン血症及び低異常フィブリノーゲン血症は常染色体優性障害である。最も罹り易い患者は、これらの3つのフィブリノーゲン遺伝子のうちの1つのコード領域におけるミスセンス突然変異に関してヘテロ接合である。分泌型フィブリノーゲン六量体は、これらの3つのフィブリノーゲン鎖の各々のコピーを2つ含み、結果として生じるフィブリン網がこの分子の複数のコピーを含むため、1つの突然変異アレルに関するヘテロ接合性が、フィブリン塊の構造及び機能を損なうのに十分である。

【0269】

無フィブリノーゲン血症に起因する出血は、通常は新生児期に現れ、症例の85パーセントが臍帯出血を示し、しかし発症年齢が遅くなることも珍しくない。出血は皮膚、消化管、尿生殖路、又は中枢神経系に起こることもあり、頭蓋内出血が主な死亡原因である。無フィブリノーゲン血症患者には、興味深い特発性脾破裂への易罹患性がある。月経期の女性は機能性子宮出血を経験し得る。加えて、無フィブリノーゲン血症女性では、妊娠第一期における流産が通常である。こうした患者はまた、分娩前及び分娩後出血も有し得る。黄体破裂後の腹腔内出血もまた認められている。

【0270】

フィブリノーゲンを含有する市販の製剤による補充療法が、先天性フィブリノーゲン欠乏症患者の唯一の治療選択肢である。従って、一部の実施形態において、本明細書に開示される主題の方法は、フィブリノーゲン欠乏症、具体的には上記で考察した病態のいずれかを有する患者の治療に特に関連性が高いものであり得る。特に、一部の実施形態において、ここでは本明細書に開示される主題のコンジュゲート及び方法によって調製される線溶タンパク質枯渇体液にフィブリノーゲンが補足される。

【0271】

遺伝性凝固因子欠乏症の治療に使用される血液由来製剤の市販の調製物と対照的に、本明細書に開示される主題のコンジュゲート、組成物及び方法によって調製される線溶タンパク質枯渇体液は、欠損している因子を提供すること（凝固促進品質）に加えて、製剤からのt-PA及びプラスミノーゲンの除去により、出血の場合に更なる凝血塊溶解の防止に不可欠な抗線溶品質となるため、実質的な利点を有する。

10

【0272】

一部の実施形態において、本明細書に開示される主題の方法は、後天性止血障害の治療に適用可能であり得る。後天性止血障害は、手術によって引き起こされる出血、外傷によって引き起こされる出血、急性消化管出血、熱傷に関連する出血、出血性脳卒中、気腫及び慢性閉塞性肺疾患（COPD）に関連する肺傷害、分娩に関連する出血、播種性血管内凝固症候群（DIC）、及び線溶療法又は血栓溶解療法によって起こる出血のうちの少なくとも1つであってもよい。一部の具体的な実施形態において、本明細書に開示される主題の方法は、手術手技、具体的には小手術又は大手術手技に関連する出血の治療、防止、低減、減弱、及び抑制に適用可能であり得る。

20

【0273】

手術手技は、特に線溶タンパク質に富む場所（例えば、組織、臓器）で手術が実施されるとき、止血系に対する大きなチャレンジである。出血性障害を有しない又はそれが軽度から中等度である患者であっても、手術後は過剰に出血し得る。手術による外傷の程度に加えて、手術部位における線溶活性の大きさを考慮しなければならない。

【0274】

手術手技が待機的である、予定されている、又は緊急でない場合（例えば、帝王切開術、又は術前の準備に十分な時間を取る任意の他の大手術）、本明細書に開示される主題の製剤が、手術介入時の過剰出血の防止又は低減を促進するための術前治療に用いられてもよいことが理解されなければならない。従って、一部の実施形態において、本明細書に開示される主題は、遺伝性障害を有する患者、線溶亢進に罹患している患者及び／又は手術が予定されている患者に特に有用な予防的方法を提供し得る。

30

【0275】

一部の更なる具体的な実施形態において、本明細書に開示される主題の方法は、外傷によって引き起こされる出血（外傷性出血）の治療に好適である。

【0276】

外傷性出血は、任意の種類の傷害、例えば、労働災害及び自動車事故、戦闘又は落下によって引き起こされる任意の傷害によって引き起こされ得る。出血を引き起こし得る外傷性創傷には様々な種類がある。一般に、外傷は血管に損傷を引き起こし、そのため血液が体外へと外部に流れ出るか、又は脳、肺、肝臓、腎臓、脾臓などの生体器官若しくは胸部及び腹部などの生体腔へと内部に流れ込む。

40

【0277】

出血を止める物理的処置に加えて、通常、血液凝固を惹起するため血液及び血液由来成分が投与され、それが最終的には出血の停止をもたらすことになる。

【0278】

本明細書に開示される主題のt-PA及び／又はプラスミノーゲン欠乏血液及び血液由来製剤は、更なる抗線溶品質を提供し、そのため形成された凝血塊の融解が防止されることになり、これは迅速な出血停止に不可欠であり得るため、市販の血液由来製剤と比べて利

50

点を示す。

【0279】

一部の具体的な実施形態において、本明細書に開示される主題のコンジュゲート及び方法によって調製される線溶タンパク質枯渇体液は、急性又は慢性消化管出血の治療に好適であり得る。

【0280】

「消化管（GI）出血」、別名、胃腸出血は、本明細書で使用されるとき、口から直腸までの消化管におけるあらゆる形態の出血に関する。「急性消化管出血」は、短期間に大量の失血があり、急性失血及び出血性ショックが引き起こされることを意味する。症状には、赤色の血又は黒色の血（「コーヒー残渣」とも称される消化された血液が原因）のいずれかの嘔吐（吐血（hematemesis））、血便、又は黒色便（下血と呼ばれる消化された血液）が含まれ得る。対照的に、慢性消化管出血は、長期間にわたる少量の血液の出血である。この場合、症状は鉄欠乏性貧血である。GI出血は、典型的には2つの主な種類：上部消化管出血及び下部消化管出血に分けられる。上部GI出血の原因としては、とりわけ、消化性潰瘍疾患、食道静脈瘤（一部の実施形態では、肝硬変及び癌に起因して起こり得る）が挙げられる。下部GI出血の原因としては、とりわけ、痔核、癌、及び炎症性腸疾患が挙げられる。上部及び下部消化管の内視鏡検査で出血部位を特定し得る。明確でない場合には、医用イメージングが有用となり得る。

10

【0281】

急性上部GI出血は、下部GI出血よりも多く見られる。上部GI出血は、毎年10万人当たり50～150人の成人に起こる。下部GI出血は、毎年10万人当たり20～30人に起こると推定される。その結果、米国では1年に約30万人が入院している。GI出血による死亡リスクは5%～30%である。出血リスクは男性でより多く見られ、年齢と共に上昇する。

20

【0282】

上部消化管出血の最も多く見られる発生源は消化性潰瘍である。食道炎及びびらん性疾患が、次に多く見られる原因である。肝硬変患者では、出血の50～60%が食道静脈瘤に起因する。消化性潰瘍患者のほぼ半分がヘリコバクター・ピロリ感染症を有する。他の原因としては、胃潰瘍又は十二指腸潰瘍、マロリー・ワイス裂傷、癌、及び血管異形成が挙げられる。幾つもの医薬が上部GI出血を引き起こすことが分かっている：NSAIDs、COX-2阻害薬、SSRIs、コルチコステロイド類、及び抗凝固薬。

30

【0283】

下部消化管出血は、典型的には結腸、直腸又は肛門からである。下部消化管出血のよく見られる原因としては、痔核、癌、血管異形成、潰瘍性大腸炎、クローン病、及び大動脈腸管瘻が挙げられる。

【0284】

急性消化管出血治療の初期の焦点は蘇生に置かれ、気道確保並びに静脈内輸液及び血液を用いた輸液蘇生から開始される。

【0285】

下部GI出血の診断及び治療には、結腸鏡検査法が有用である。クリップ法、焼灼法、及び硬化療法を含め、幾つもの技法が用いられてもよい。手術は、上部GI出血の治療にはほとんど用いられないが、問題を引き起こしている腸の一部を切り取ることによる下部GI出血の管理には未だによく用いられる。血管造影による塞栓術は、上部及び下部GI出血の両方に用いることができる。

40

【0286】

なおも更に、本明細書に開示される主題のコンジュゲート及び機器を用いて、本明細書に開示される主題の方法により調製されるプラスミノゲン及び／又はtPA枯渇血液製剤は、出血性脳卒中の治療に用いられてもよい。

【0287】

「出血性脳卒中」は、本明細書で使用されるとき、脳実質に直接起こる出血に関する。

50

通常の機構は、慢性高血圧によって損傷を受けた脳内小動脈からの漏出と考えられる。脳内出血患者は、虚血性脳卒中患者と比べて、頭痛、精神状態の変化、発作、悪心嘔吐、及び／又は著しい血圧上昇を有する可能性がより高い。とは言え、これらの所見のいずれも、出血性脳卒中と虚血性脳卒中とを確実に区別するものではない。特異的症状は局所神経障害から生じ得る。この種の障害は脳病変部に依存する。優位半球（通常は左半球）に病変がある場合、以下からなる症候群が生じ得る：右不全片麻痺、右片側感覚消失、左注視優先、右視野欠損及び失語症。非優位半球（通常は右半球）に病変がある場合、以下からなる症候群が生じ得る：左不全片麻痺、左片側感覚消失、右注視優先及び左視野欠損。

【0288】

脳イメージングは、疑わしい出血性脳卒中の判定において極めて重要なステップであり、緊急時対応で入手されなければならない。脳イメージングは出血の診断に役立ち、脳室内出血、脳浮腫、又は水頭症などの合併症を同定し得る。非造影コンピュータ断層撮影法（NCC T）スキヤニング又は磁気共鳴画像法（MRI）のいずれも最適なモダリティである。

【0289】

出血性脳卒中に対して血液製剤による治療が適応となる場合、血液バンクから入手された血液、FFP及び血小板が使用される。本明細書に開示される主題のコンジュゲート及び方法によって調製される線溶タンパク質枯渇体液の血栓形成促進（prothromboyic）品質及び線溶品質を考慮すると、これは出血性脳卒中に罹患している患者において従来の血液製剤よりも適切な出血停止であるように思われる。

【0290】

一部の具体的な実施形態において、本明細書に開示される主題の方法は、気腫及びCOPDに関連する肺傷害の治療に好適であり得る。より具体的な実施形態において、本明細書に開示される主題の方法は、本明細書に開示される主題のコンジュゲート及び方法によって調製される線溶タンパク質枯渇体液の治療有効量を治療下の対象に投与するステップを含んでもよく、その $\alpha 1$ -アンチトリプシンの高濃度化に起因して、その使用は気腫及びCOPDを有する対象の治療に一層適切となる。これらの疾患では、白血球プロテアーゼが肺の弾性を破壊するため肺不全（lung fuller）となり、結果として肺気腫及び慢性閉塞性肺疾患（COPD）を発症する。従って、本明細書に開示される主題のコンジュゲート及び方法によって調製される線溶タンパク質枯渇体液中の $\alpha 1$ -アンチトリプシンが白血球プロテアーゼの活性を阻害し、それによって肺組織の弾性を回復させ得る。

【0291】

気腫は、慢性（長期）肺疾患の一形態である。気腫のある人は限定的にしか空気を吐き出すことができないため呼吸困難を有する。気腫の原因は複数あるが、喫煙が圧倒的に多く見られる。

【0292】

気腫は、主な種類の慢性閉塞性肺疾患（COPD）のうちの一つである。気腫のある人は、何かが空気の流れを塞いでいるかのように息を吐き出すため、これは「閉塞性」と呼ばれる。COPDの他の形態は慢性気管支炎であり、これもまた喫煙によって引き起こされ得る。

【0293】

気腫は、肺の空気嚢の繊細な内膜が修復不可能な損傷を受けると起こる。最も一般的には、タバコの煙中にある毒素が損傷を生じさせる。気腫の肺変化は、空気嚢間の脆弱な組織が破壊され、肺にエアポケットが発達するにつれ、何年にもわたってゆっくりと進行する。損傷を受けた肺組織のそれらの空間に空気が閉じ込められるようになる。肺がゆっくりと拡大し、呼吸に更に多くの労力を要する。

【0294】

気腫のこの問題は、気流制限と呼ばれる。肺機能検査時、気腫を有する人は、気腫を有しない人と比べてその肺を空にするのにはるかに長い時間がかかる。

【0295】

喫煙に加えて、気腫の主な原因として他に知られているのは、 $\alpha 1$ -アンチトリプシン欠乏症である。しかしながら、これは喫煙と比べると重要な原因ではない。 $\alpha 1$ -アンチトリプシンは、ヒト血中に循環する天然タンパク質である。その主な機能は、白血球が正常組織に損傷を与えるのを防ぐことである。従って、 $\alpha 1$ -アンチトリプシンを高濃度化した本明細書に開示される主題のコンジュゲート及び方法によって調製される線溶タンパク質枯渇体液による気腫を有する対象の治療は、プロテアーゼの活性を阻害し、それにより肺組織の弾性を回復させ得る。

【0296】

慢性閉塞性肺疾患（COPD）は、長期にわたる気流低下によって特徴付けられる閉塞性肺疾患の一種である。主な症状には、息切れ及び痰の喀出を伴う咳が含まれる。COPDは、典型的には時間と共に悪化する。最終的には階段を上ったり又は物を運んだりすることが困難になる。慢性気管支炎及び気腫は、異なる種類のCOPDに用いられる旧来の用語である。用語「慢性気管支炎」は、2年にわたって毎年少なくとも3ヵ月間存在する湿性咳嗽を定義付けるため未だに用いられている。

【0297】

COPDは、慢性の不完全に可逆的な気流低下（気流制限）及び完全に息を吐き出すことができないこと（空気とらえこみ現象）が存在する閉塞性肺疾患の一種である。気流低下は、肺組織の破綻（気腫として知られる）及び末梢気道病変（閉塞性細気管支炎として知られる）の結果である。これらの2つの要因の相対的な寄与は人によって様々である。末梢気道の重篤な破壊は、肺組織を置き換えるブラとして知られる大型エアポケットの形成につながり得る。この形態の疾患は、嚢胞性肺気腫と呼ばれる。

【0298】

喫煙は、COPDの最も多く見られる原因であり、大気汚染及び遺伝学などの幾つもの他の要因がより小さい役割を果たしている。発展途上国世界では、一般的な大気汚染源の一つは、不十分な換気下での暖房及び調理用の火である。こうした刺激源に長期間曝露すると、肺に炎症反応が引き起こされ、末梢気道の狭小化及び肺組織の破綻が起こる。診断は、肺機能検査によって測定したときの気流低下に基づく。喘息と対照的に、気流減少は気管支拡張薬の使用によってもあまり改善しない。

【0299】

COPDの最も多く見られる症状は、喀痰喀出、息切れ、及び湿性咳嗽である。これらの症状は長期間存在し、典型的には時間と共に悪化する。異なる種類のCOPDが存在するかどうかは不明である。先に気腫と慢性気管支炎とに分けられたが、気腫は、疾患それ自体というよりむしろ、あくまでも肺変化を記述するものであり、慢性気管支炎は単に、COPDに伴い起こることも又は起こらないこともある症状を記述するものである。

【0300】

進行したCOPDは高い肺動脈圧につながり、それにより右心室が歪み、右心不全（right heart failure）となる。この状況は肺性心と称され、下肢腫脹及び頸静脈膨隆の症状につながる。COPDは、肺性心の原因として他のいずれの肺疾患よりも多く見られる。酸素補給の使用以来、肺性心はあまり見られなくなっている。

【0301】

結果的に、本明細書に開示される主題のコンジュゲート及び方法によって調製された線溶タンパク質枯渇体液は、その高濃度化された $\alpha-1$ 抗プラスミンが白血球のプロテアーゼを阻害し、それにより損傷を受けた肺組織の弾性品質を修復するため、COPDの補完治療として有益であり得る。

【0302】

なおも更に、本明細書に開示される主題のコンジュゲート及び機器を使用した、本明細書に開示される主題の方法によって調製されるプラスミノゲン及び／又はtPA枯渇血液製剤は、熱傷及びそれに関連する任意の出血の治療に用いられてもよい。用語「熱傷」は、本明細書で使用されるとき、皮膚及び場合によっては皮膚の下層組織への損傷を伴う組織の傷害を指す。熱傷は、熱、炎、化学薬品、電気、又は放射線との接触によって引き

10

20

30

40

50

起こされ得る。

【0303】

熱傷は主に事故によって引き起こされ、原因に応じて高温熱傷、電気熱傷、化学熱傷、放射線熱傷に分類することができる。熱傷の重症度は、熱傷の幅及び深さ、熱傷を引き起こす物体の温度との接触時間、及び皮膚の状態に応じて第1度、第2度、第3度及び第4度熱傷に分けられる。第2度以上の熱傷では、やけど跡が残ることもあり、病院での治療が必要である。

【0304】

第1度熱傷は皮膚の発赤及びそう痒を伴う疼痛を引き起こす。これは、皮膚層の最外層である表皮の損傷、並びに疼痛及び発赤を伴う腫脹を引き起こす。症状は数日で消失するが、表皮落屑及び色素沈着が残り得る。回復後、瘢痕（やけど跡）は残らない。日焼けは、最もよく見られる第1度熱傷の例である。

【0305】

第2度熱傷は表皮及び真皮を冒し、事故後24時間で発赤、疼痛、腫脹、及び水疱が生じる。第2度熱傷は汗腺又は汗孔を冒し得る。重度の灼熱感及び激痛が起こる。水疱が破裂すると、蝕まれた範囲が残り、分泌物が多量に放出される。熱傷範囲が体表面積の約15パーセント以上になる場合、特別な注意を払わなければならない。第2度熱傷は数週間で治癒するが、多くの場合に色素沈着又は色素脱失が残る。二次感染が起こる場合、一部の症状が重篤化し、治るまでに更に時間がかかる。

【0306】

第3度熱傷は表皮、真皮、及び更には皮下脂肪までも冒し、皮膚の色が濃くなるか又は薄くなり、皮膚表面直下の血管が凝固する。熱傷領域は無感覚になり得るが、患者は極度の激痛を感じ、皮膚組織及び構造の死滅があり、治療に多くの時間を要するとともに、やけど跡が後に残る。事故後2週間で痂皮が脱落し、潰瘍化した表面が現れる。多量の体液が分泌され、出血が起こる可能性が高いが、徐々に新しい組織が形成されると、表皮の再生につながり、第3度熱傷は治癒するとともに、瘢痕が後に残る。深部の皮膚壊死が生じると、又は二次感染が起こると、治癒は遅れ、凸凹の瘢痕表面が生じるためケロイドが形成され又は変形し、又は運動障害が生じる。熱傷範囲が体表面積の10パーセント以上になる場合、特別な注意が必要となる。

【0307】

第4度熱傷は、熱傷領域の炭化して黒ずんだ組織を伴い、皮膚層に広がって、脂肪層、靱帯、筋膜、筋肉、及び更には骨組織にまでも傷害を与える。第4度熱傷には主に高電圧電気熱傷が含まれ、場合によっては、ウイルス感染が起こると真皮深層第2～3度熱傷が第4度熱傷へと展開し得る。熱傷範囲が20パーセント以上の範囲である場合、全身に反応が起こり得る；体液が過度に失われるため低血圧症、ショック、急性腎機能障害が起こり得るとともに、後に創傷感染又は肺炎、敗血症、及び多臓器不全症候群が起こり得る。

【0308】

44℃（111°F）より高い温度では、タンパク質はその三次元形状を失い始め、分解し始める。これにより細胞及び組織損傷が生じる。熱傷の直接的な健康への影響の多くは皮膚の正常機能の破壊に続発する。これには、皮膚の感覚、蒸発による水分損失を防ぐ能力、及び体温を調節する能力の破壊が含まれる。細胞膜が破壊されると、細胞から細胞外の空間へとカリウムが失われ、水及びナトリウムが取り込まれる。

【0309】

広範囲の（総体表面積の30%を超える）熱傷では、顕著な炎症反応がある。これにより毛細血管からの体液漏出が増加し、続いて組織浮腫が生じる。これが全体的な血液量損失を引き起こすとともに、残りの血液が深刻な血漿損失を被るため、血液が更に濃縮される。腎臓及び消化管などの臓器への血流が低下するため、腎不全及び胃潰瘍が生じ得る。

【0310】

なおも一部の更なる実施形態において、手術によって引き起こされる出血は、小手術又は大手術によって引き起こされる出血であり得る。大手術は、麻酔又は呼吸補助を伴う任

10

20

30

40

50

意の手術手技として定義される。大手術中の出血の場合、治療には、市販のFP、FFP又はクリオプレシピテートによる欠損している又は非機能性の凝固因子の補充が含まれる。

【0311】

本明細書において上記に詳述したとおり、麻酔又は呼吸補助を伴う任意の手術手技に関する大手術と対照的に、小手術は、生体において損傷を修復し又は疾患を止めるために実施される、器具による切開を伴う医療手技である。小手術は、人体の任意の一部を鋭利な刃で突き刺す又は開く行為である切開又は切除を含むため、出血傾向のある対象では、この手技は重大な出血を引き起こし得る。

【0312】

一部の実施形態において、本明細書に開示される主題の方法は、任意の歯科治療又は手技を含み得る小手術に適用可能であり得ることに留意しなければならない。用語「歯科治療」は、顎（下顎骨）、口腔、顎顔面領域並びに人体の隣接及び関連構造の軟組織及び硬組織の疾患、障害及び病態の防止及び／又は治療を目指す任意の治療を指す。かかる治療は、明らかに、歯科学、歯科矯正学、歯周病学、口腔内科学及び口腔外科学に関するが、また、一般に口腔の健康に関わり得る歯科学及び医薬実践の他の分野に関してもよい。

【0313】

なおも更に、大手術は直視下心臓手術又は肝移植術であってもよい。

【0314】

大手術は、麻酔又は呼吸補助を伴う任意の手術手技として定義される。大手術時の出血の場合、治療には、市販のFP、FFP又はクリオプレシピテートによる欠損している又は非機能性の凝固因子の補充が含まれる。しかしながら、上記製剤中のtPA及びプラスミノーゲンの存在が手術の傷害部位で線溶活性を媒介する結果、出血を止める又は防ぐために形成された凝血塊の融解が促進され得るため、この補充は十分でないこともある。従って、大幅に低下した線溶活性を示す本明細書に開示される主題のtPA及びプラスミノーゲン欠乏製剤の投与は、市販の製剤と比べてより良好且つより効率的な治療選択肢であり、なぜなら、本明細書に開示される主題の製剤による凝固因子の補給に加えて、その抗線溶活性が（実施例によって実証されるとおり）、市販の製剤中に存在する線溶タンパク質によって引き起こされる凝血塊溶解が寄与する出血を減少させ又は防止し得るためである。

【0315】

詳細な実施形態において、本明細書に開示される主題の方法は、直視下心臓手術に適用可能である。一部の手術手技は、直視下心臓手術など、重度の出血を引き起こすことを予想し得る。そうした手術では、体外循環（心肺バイパス—CPB）が用いられる。

【0316】

心血管手術（直視下心臓手術）は、心臓外科医によって実施される心臓又は大血管の手術である。高頻度でこれは、虚血性心疾患の合併症を治療し（例えば、冠動脈バイパス移植術）、先天性心疾患を修正し、又は心内膜炎、リウマチ性心疾患及びアテローム性動脈硬化症を含めた様々な原因による心臓弁膜症を治療するために行われる。これにはまた、心臓移植も含まれる。

【0317】

直視下心臓手術時、心臓は一時的に停止させる。直視下心臓手術を受けている患者は心肺バイパス下に置かれ、つまり、機械が患者のためにその血液及び酸素をポンプで送ることである。機械が正常な心肺と同じ機能を果たすことは決してなく、従って、多くの手術手技と同様に、この機械にかかる時間は最小限に抑えられる。この人工的方法はバイパスを提供し、心肺機能に関する患者の必要性を一時的に解消する。

【0318】

これらの手術で起こる出血現象は、手術時に使用される、意図的に凝固欠乏を生じさせる抗凝固に起因する。加えて、血液が体外循環を通過することにより生じる血小板機能異常症が、出血傾向に寄与する。

【0319】

本明細書に開示される主題の方法は、C P Bによる直視下心臓手術を受ける対象に特に適用可能であり得ることが理解されなければならない。本明細書に開示される主題の製剤、組成物及び方法は、そうした患者に以下のとおりの二重の有益な効果を付与し得る：

【0320】

1. 直視下心臓手術時、血液は、人工心肺（C P B機械）に加えられたチューブを通して流れることになり、一方でチューブは、血液からセー P A及び／又はプラスミノージェンを枯渇させるためトラネキサム酸でコーティングされる（実験手順に詳述するとおり）。ポンプが血流をC P B機械から患者へと送ることになる。このチューブを通して流れる間、セー P A及びプラスミノージェンが枯渇した血液が患者の循環に返血される。

【0321】

このようにして返血された血液は線溶活性が乏しく、且つ抗線溶活性が高濃度化しており、従って出血傾向からの保護が提供される。

【0322】

2. 上述の理由によって出血が起こる場合、次に患者は、本明細書に開示される主題のコンジュゲート及び方法によって調製される線溶タンパク質枯渇体液で出血を止めるため治療されてもよく、この体液は、その抗線溶品質に起因して、出血を停止させる効力がより高いと予想される。

【0323】

更なる実施形態において、本明細書に開示される主題の方法は、肝移植術に関連する出血の治療における実施に好適である。

【0324】

肝臓は、止血及び血栓症において中心的な役割を果たす。肝実質細胞は、多くの凝固因子の合成部位、生理学的凝固抑制因子、及び線溶系の必須成分である。肝臓はまた、活性化した凝固因子及び酵素阻害因子複合体を循環からクリアランスすることにより止血及び線溶も調節する。従って、肝疾患を有する患者に肝機能障害が起こると、複雑な止血の乱れが続く、それが出血につながり得る。

【0325】

肝移植の最初の段階、病的肝臓の除去（肝外段階）においては、大幅な止血変化が起こり得る。活性化した凝固因子が循環から除去されないため、その消費が血小板消費及び二次線溶亢進と共に増大し得る。更に、不完全なセ P Aクリアランスの結果として一次線溶亢進もまた起こる。肝移植中の最も重大な止血変化は、ドナー肝の再灌流後に起こる。移植片に血小板が取り込まれることにより血小板減少症の増悪が生じ、内皮細胞アポトーシスの誘導によって移植片に損傷が引き起こされる。再灌流された移植片からの組織因子及びセ P Aの放出が、更に線溶を引き起こす。従って、線溶亢進は、肝外相及び再灌流相における止血障害に大きく寄与すると考えられる。更に、移植片は、凝固を抑制し得るヘパリン様物質を放出する。加えて、この相では低体温症、代謝性アシドーシス、及び血液希釈などの他の要因が止血に悪影響を与える。肝移植は長時間にわたる手技であり、側副静脈の流通可能性を含む手術創表面が広範囲に及ぶ。手術技法の向上及び麻酔学的ケアにより、肝移植中の失血は著しく減少している。無制御の出血が起こる場合、濃縮赤血球、血小板、及び新鮮凍結血漿を輸血することができる。トラネキサム酸（リジン類似体）及びアプロチニン（セリンプロテアーゼ阻害薬）などの合成抗線溶剤の使用が、よく行われている方法である。

【0326】

従って、本明細書に開示される主題の製剤、本明細書に開示される主題により記載されるコンジュゲート、組成物、及び方法は、その抗線溶品質のおかげで、肝移植術によって引き起こされる線溶亢進状態に関連する出血の停止に特に適用可能であり得ることが理解されなければならない。

【0327】

本明細書に開示される主題の方法は、任意の臓器又は組織移植、例えば、肝臓、腎臓、肺、心臓、脾臓、皮膚、血管などが関わる任意の手術に適用可能であり得ることが理解さ

10

20

30

40

50

れなければならない。

【0328】

なおも一部の更なる実施形態において、本明細書に開示される主題の方法は、線溶療法又は血栓溶解療法の結果として生じる出血であり得る後天性止血障害に適用可能であり得る。

【0329】

線溶療法／血栓溶解療法は、主として急性心筋梗塞（急性冠状動脈血栓症）を有する患者又は急性脳卒中（急性大脳動脈血栓症）を有する患者において投与される。線溶療法／血栓溶解療法の目標は、血栓の線溶タンパク質分解を加速させることによって実現する閉塞血管の血流の速やかな回復である。線溶療法では典型的には、プラスミノゲン活性化が血栓に限定されないため、線溶状態となる。これらの効果は複合的であり、フィブリノーゲンレベルの低下、フィブリノーゲン分解産物の増加、及び凝固因子の減少が含まれる。線溶療法の合併症は出血である。出血性合併症は抗凝固薬療法よりも線溶療法でより頻度が高く、迅速な診断及び管理が必要である。過度の出血には2つの問題が寄与する。第一に、線溶効果は血栓症部位に限定されず、通常は全身性である。従って、治療に必要なカテーテルによって生じるか、又は脳、消化管、若しくは他の場所の病変内に生じるかのいずれかである血管外傷部位の出血を防止するために必要な任意の止血血栓もまた融解を受け易い。最も重度の合併症は頭蓋内出血であり、これは約1%の患者に起こり、高い死亡率及び生存者における重度の身体障害を伴う。最も多く見られる出血性合併症は、動脈及び静脈内カテーテルの留置など、侵襲的血管手技に関する。これらの部位における何らかの出血は高頻度にあり、局所圧迫又は他の単純な処置で管理できるならば、それが療法を中断する理由となってはならない。この問題は、静脈及び動脈穿刺の制限並びに局所的処置の早期導入によって最小限に抑えることができる。大量出血はまた、胃腸潰瘍又は泌尿生殖器病変など、既存の病変によっても生じ得る。

【0330】

線溶／血栓溶解後の出血性合併症の治療は、局所部位を対象とした処置を伴い、全身性凝固性低下状態の修正は、全身性プラスミン血症によって引き起こされる止血異常を修正するための補充療法を含む。多くの場合にフィブリノーゲン補充が必要であり、これはクリオプレシピタートの投与によって達成することができ、及び新鮮凍結血漿を使用して他の止血タンパク質を補充することができる。

【0331】

線溶療法／血栓溶解療法は抗凝固薬又は抗凝固剤の使用を伴うことに留意しなければならない。本明細書で使用されるとき、用語「抗凝固薬剤」は、血液の凝血を妨げる任意の薬剤を意味することが意図される。クマリン誘導体ビスヒドロキシクマリン（ジクマロール）及びワルファリン（クマジン（Coumadin））などの一部の抗凝固薬は、凝血塊形成物質であるプロトロンビン、及び他の凝血因子の合成を阻害する。抗凝固薬としては、限定はされないが、 β 2アドレナリン受容体拮抗薬、神経ペプチドV2拮抗薬、プロスタサイクリン類似体、トロンボキサシンターゼ阻害薬、カルシウム作動薬、クマリン誘導体、エラスターゼ阻害薬、非ステロイド系抗炎症薬、トロンビン阻害薬、リポキシゲナーゼ阻害薬、第V i l a 因子阻害薬、第X a 因子阻害薬、ホスホジエステラーゼI I I 阻害薬、ヘパリン、及びフィブリノーゲン糖タンパク質I I b / I I I a 拮抗薬として作用する化合物を挙げることができる。

【0332】

クマリンは、ビタミンK拮抗薬である。このクラスの著名なメンバーはワルファリン（クマジン（Coumadin））である。これらの抗凝固薬は、深部静脈血栓症（DVT）、肺塞栓症（PE）を有する患者の治療、並びに心房細動（AF）、及び機械的人工心臓弁を有する患者における塞栓の防止に用いられる。他の例は、アセノクマロール、フェンプロクモン、アトロメンチン、及びフェニンジオンである。

【0333】

ヘパリンは、通常はブタ腸から作られる生物学的物質である。これは、トロンビンによ

10

20

30

40

50

る凝血を阻止するアンチトロンビンⅢを活性化することによって働く。より高度に処理された製剤である低分子量ヘパリンは、例えばエノキサパリン（クレキサン）のようにAPTT凝固パラメータをモニタする必要がなく、且つ副作用が少ないため有用である。

【0334】

フォンダパリヌクスは、アンチトロンビンに結合するヘパリン中の5つの糖（五糖）で構成される合成糖であり、第Ⅹa因子の阻害薬である。これは低分子量ヘパリンよりも小さい分子である。別の例はイドラパリヌクスナトリウムであり、これはフォンダパリヌクスと同様の化学構造及び作用方法を有する。

【0335】

リバーロキサバン、アピキサバン及びエドキサバンなどの薬物は、第Ⅹa因子を直接阻害することによって働く（アンチトロンビン活性化を通じて働くヘパリン及びフォンダパリヌクスとは異なる）。

10

【0336】

更なる例としては、限定はされないが、Portola Pharmaceuticalsのベトリキサバン、Astellasのダレキサバン（YM150）、並びに最近ではTakedaのレタキサバン（TAK-442）及びPfizerのエリバキサバン（PD0348292）が挙げられる。

【0337】

別の種類の抗凝固薬は、直接トロンビン阻害薬である。このクラスの現在のメンバーとしては、限定はされないが、二価の薬物であるヒルジン、レピルジン、及びビバリルジン；及び一価の薬物であるアルガトロバン及びダビガトランが挙げられる。

20

【0338】

アンチトロンビンタンパク質それ自体が、ヒト血漿から精製し得るか又は組換え産生し得るタンパク質療法用抗凝固薬剤として使用される（例えば、Atryn、これは遺伝子修飾されたヤギの乳で産生されるものである）。

【0339】

上記に指摘したとおり、抗凝固薬投与、例えばヘパリンは、急性静脈血栓症、術後（特に整形外科）及び寝たきり患者の血栓症予防、及び開存性を維持するための静脈ラインのフラッシングに適応のある標準的な抗血栓療法である。しかしながら、その効力に起因して、ヘパリン及びLMWHは欠点を被る。単純な運動ストレス及び付随する物理的物体との接触の結果としての又は手術部位における制御されない出血が、主要な合併症である。加えて、ヘパリンで治療された患者の約5%（最高30%までの範囲）、及び未分画ヘパリン（UFH）の投与を受けている患者の約2%が免疫介在性血小板減少症（HIT）を発症し、これは、出血（血小板数が減少する結果としての）又は血管内血小板凝集に起因した動脈及び静脈血栓症のいずれかによって複雑化し得る。本明細書に開示される主題の製剤及び方法は、これらの抗凝固剤のかかる望ましくない効果を防止し得る。

30

【0340】

より具体的には、播種性血管内凝固症候群（DIC）は、全身にわたって微小血管内で凝血塊形成が生じる凝血カスケードの広範な活性化によって特徴付けられる病的過程である。これは組織血流障害につながり、最終的には多臓器損傷につながり得る。加えて、凝固過程で凝固因子及び血小板が消費されるため、正常な凝血が妨げられ、様々な部位から重度の出血が起こり得る。

40

【0341】

なおも一部の更なる実施形態において、本明細書に開示される主題は、分娩又は妊娠に関連する任意の出血、例えば分娩後出血（PPH）の治療、防止、予防、改善、抑制に適用可能な方法を提供する。分娩後出血（postpartum bleeding）又は分娩後出血（postpartum hemorrhage：PPH）は、分娩後最初の24時間以内における500ml又は1,000mlより多い血液の喪失として定義されることが多い。徴候及び症状には、当初は、心拍数の上昇、起立時の立ちくらみ感、及び呼吸数の増加が含まれ得る。この病態は、出産後最長6週間まで起こり得る。最も多く見られる原因は、分娩後の子宮収縮の低下、全ての胎盤が娩出されなかったこと、子宮裂傷、又は凝血不良である。

50

【0342】

分娩後出血の原因は、一般に「4つのT」と称される、子宮弛緩、外傷、胎盤遺残、及び凝固障害である：

緊張（Tone）：子宮弛緩とは、子宮が収縮できないことであり、持続的出血につながり得る。遺残胎盤組織及び感染症が子宮弛緩の一因であり得る。子宮弛緩は、分娩後出血の最も多く見られる原因である。

外傷（Trauma）：子宮、子宮頸部、膣及び会陰を含む産道の傷害、これは出産が適切にモニタされたとしても起こり得る。これらの器官は全て、妊娠中に血管化が進むため、出血は相当量となる。

組織（Tissue）：胎盤又は胎児からの組織の遺残は出血につながり得る。

トロンビン（Thrombin）：凝固障害として知られる疾患を有するなど、凝血不全があると、出血性障害が起こる。

【0343】

一部の実施形態において、本明細書に開示される主題のtPA及び／又はプラスミノゲン不含製剤及びそれを使用した任意の方法は、上記で考察したとおりのPPHの治療及び防止に適用可能であり得ることが理解されなければならない。

【0344】

なおも一部の更なる実施形態において、本明細書に開示される主題の方法はまた、GPSの治療にも適用可能であり得る。グッドパスチャー症候群（GPS）は、まれな自己免疫疾患であり、抗体が肺及び腎臓の基底膜を攻撃するため、肺からの出血及び腎不全につながる。前記患者の治療に通常使用される血液製剤などの体液から、本明細書に開示される主題のコンジュゲート及び方法を用いてtPA及び／又はプラスミノゲンなどの線溶タンパク質を枯渇させると、治療が向上し得る。

【0345】

なおも一部の更なる実施形態において、本明細書に開示される主題の方法は、血管破裂によって引き起こされる出血の治療に適用可能であり得る。

【0346】

一部の具体的な実施形態において、変形性膝関節症（OA）の患者の治療に血漿又は多血小板血漿の関節内注射が用いられる。膝へのPRP注射は、有意な臨床的改善をもたらすことが示されている（Meheux CJ et al.）。他方で、コラーゲン及びアグレカンコアタンパク質などの種々の細胞外マトリックス成分を分解するウロキナーゼ型のプラスミノゲン活性化因子（PA）の発現は、OAの発症において特に重要と思われる（Pap G et al.）。膝関節炎の種々の段階での切除標本及び生検におけるストロメライシン及びウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子タンパク質の発現（Pap G. et al.）。従って、本明細書に開示される主題のコンジュゲート及び方法によって調製される線溶タンパク質枯渇体液の注射であれば、有害な効果が防止され、転帰が向上し得る。

【0347】

なおも更に、手術手技は、遺伝性止血障害の患者において重度の出血を引き起こすことが予想され得る。こうした患者は、術中又は術後に過剰に出血し得る。遺伝性止血障害の患者に関して、手術による外傷の程度に加え、手術部位の線溶活性の大きさが考慮されなければならないことが理解されるべきである。従って、口腔、鼻咽頭腔、並びに泌尿生殖器系、特に前立腺床など、線溶活性に富む部位の手術手技は、遺伝性止血障害患者では最終的に過剰出血となり得る。従って、一部の実施形態において、本明細書に開示される主題の方法は、かかる出血にも同様に具体的に適用可能であり得る。

【0348】

上述のとおり、本明細書に開示される主題の方法は、本明細書に開示される主題のコンジュゲート又は本明細書に開示される主題により開示される任意の組成物、装置、装置一式、キット又はシステムを使用して、本明細書で上記に考察される方法によって得られる線溶活性が低下した又は全くない体液又はその製剤の投与又は再導入を伴う。

【0349】

一部の詳細な実施形態において、投与は体外機器を使用して実施されてもよい。なおも一部の更なる実施形態において、線溶活性不含製剤は、本明細書で考察するとおりの任意の装置、装置一式、キット又はシステムを使用して対象に投与されてもよい。

【0350】

一部の実施形態において、上記で考察したとおりの線溶活性が低下した製剤は、同種異系対象から入手された体液から調製されてもよいことが理解されなければならない。なおも一部の更なる実施形態において、特に待機的手技（例えば、計画されている手術）の場合、対象は自己供給源の体液製剤によって治療されてもよい。

【0351】

「自己」供血は、本明細書で使用されるとき、血液の必要性を予想し且つ供血計画を作成できる場合に、被輸血者が自己使用のため供血し得る概念である。最も一般的には、この状況は待機的手術で起こる。輸血用の自己血は、術前の供血によって入手することができる。用語「同種血」は、本明細書で使用されるとき、同じ種の無関係の供血者から採取された血液に関する。より具体的には、一部の実施形態において、本明細書に開示される主題の血液又は血液製剤が少なくとも1人又はそれ以上のヒト対象から入手される場合、同種異系供給源とは、結果として得られる製剤が他の1人又は複数のヒト個体に用いられ得ることを意味する。

【0352】

上記に指摘したとおり、本明細書に開示される主題は、出血性、止血障害及びそれに関連する任意の病態の治療方法を提供する。本明細書で使用されるとき、「疾患」、「障害」、「病態」などは、それらが対象の健康に関するとき、同義的に使用され、かかる用語の各々及び全てに帰される意味を有する。

【0353】

本明細書において病的状態に言及するときの、同義的に使用される用語「関連する」及び「関係する」は、因果関係を共有する、偶然より高い頻度で共存する、又は少なくとも1つの疾患、障害、病態又は病的状態が第2の疾患、障害、病態又は病的状態を引き起こす場合、のうちの少なくとも1つである疾患、障害、病態、又は任意の病的状態を意味することが理解される。

【0354】

上述のとおり、本明細書に開示される主題は、上記に指定したとおりの障害の治療方法を提供する。用語「治療」は、本明細書で使用されるとき、疾患に関連する望ましくない症状を改善すること、かかる症状の発現をそれが起こる前に防止すること、疾患の進行を減速させること、症状の悪化を減速させること、寛解期の開始を促すこと、疾患の進行慢性期に引き起こされる不可逆的な損傷を減速させること、前記進行期の開始を遅延させること、重症度を低下させるか又は疾患を治癒すること、生存率を改善すること又はより速い回復、又は疾患が起こるのを防止すること、又は上記のうちの2つ以上の組み合わせに有効な、本明細書に開示される主題の組成物の治療量を投与することを指す。治療は、最初に止血病態が発症したときに行われてもよく、又は上記に挙げた治療効果を実現するため、例えば1日1回超、1日毎～7日毎、7日毎～15日毎、15日毎～30日毎、毎月～2ヵ月毎、2ヵ月毎～6ヵ月毎、又は更にそれ以上投与することによる連続投与であってもよい。

【0355】

用語「予防」は、生物学的又は医学的事象の発生リスク、具体的には、組織、系、動物又はヒトにおいて研究者、獣医師、医師又は他の臨床医が防止しようとする出血に関連する障害の発生又は再発リスクの防止又は低減を指し、及び用語「予防有効量」は、この目標を実現するであろう医薬組成物の量を意味することが意図される。従って、詳細な実施形態において、本明細書に開示される主題の方法は、出血性障害に関連する病態の予防、即ち防止において特に有効である。従って、前記組成物を投与される対象は、前記出血性障害に関連する症状が出る可能性が低く、その症状が過去に既に出たことのある対象においてそれが再発する可能性もまた低い。

10

20

30

40

50

【0356】

用語「改善」は、本明細書において参照されるとき、本明細書に開示される主題に係る組成物及び方法によってもたらされる症状の低下、及び対象の状態の向上を指し、ここで前記向上は、本明細書に記載される出血性障害に関連する病的過程の阻害、その大きさの大幅な低下、又は罹患対象の生理学的状態の向上という形で現れ得る。

【0357】

用語「阻害する」及びこの用語のあらゆる変化形は、病的症状の進行及び増悪又は病的過程進行であって、関連する病的過程症状又は過程の制限又は阻止を包含することが意図される。

【0358】

用語「消失させる」は、任意選択で、以下に記載される本明細書に開示される主題の方法に係る、病的症状及び場合によっては病的原因の実質的な根絶又は除去に関する。

【0359】

用語「遅延させる」、「発症を遅延させること」、「遅らせる」及びそのあらゆる変化形は、本明細書に開示される主題に係る治療の非存在下よりも後に出現するように、タンパク質ミスフォールディング又はタンパク質凝集に関連する障害、具体的には、出血性障害及びその症状の進行及び／又は増悪を減速させること、その進行、更なる増悪又は展開を減速させることを包含することが意図される。

【0360】

上述のとおり、治療又は防止には、疾患の発症の防止又は延期、症状の発症の防止又は延期及び／又は発症するであろう又は発症すると予想されるかかる症状の重症度の低下が含まれる。これには更に、既存の症状を改善すること、更なる症状を防止すること、及び症状の根底にある代謝的原因を改善又は防止することが含まれる。用語「抑制」、「緩和」、「低減」又は「減弱」は、本明細書において参照されるとき、ある過程、具体的には出血性障害の、約1%～99.9%のうちのいずれか1つ、具体的には、約1%～約5%、約5%～10%、約10%～15%、約15%～20%、約20%～25%、約25%～30%、約30%～35%、約35%～40%、約40%～45%、約45%～50%、約50%～55%、約55%～60%、約60%～65%、約65%～70%、約75%～80%、約80%～85%、約85%～90%、約90%～95%、約95%～99%、又は約99%～99.9%の遅延、制限又は低減に関することが理解されなければならない。

【0361】

毎日、毎週又は毎月のスケジュールでの単回又は複数回投与が行われてもよく、用量レベル及びパターンは治療担当医師によって選択される。より具体的な実施形態は、典型的には2～3用量／週の使用に関する。

【0362】

本明細書に開示される主題は、それを必要としている対象、又は患者の治療に関する。「患者」又は「必要としている対象」とは、ヒト、家畜及び非家畜哺乳類、例えばイヌ及びネコ対象、ウシ、サル、ウマ及びマウス対象、げっ歯類、家禽類、水産養殖魚類及び外来観賞魚類を含めた、上述の病原体に感染していてもよい任意の生物であって、それに対して本明細書に記載される防御的及び予防的製剤、1つ又は複数のキット及び方法が所望される生物を意味する。治療対象はまた、任意の爬虫類又は動物園動物であってもよいことが理解されなければならない。

【0363】

「哺乳類対象」とは、ヒト、ウマ、イヌ、及びネコ対象、より具体的にはヒトを含めた、提案される療法が所望される任意の哺乳類が意味される。具体的に非ヒト対象の場合、本明細書に開示される主題の方法は注射（静脈内（IV）、動脈内（IA）、筋肉内（IM）又は皮下（SC））、飲用水、飼料、噴霧、経口洗浄による投与及びそれを必要としている対象の消化管への直接投与を用いて実施されてもよいことに留意しなければならない。

10

20

30

40

50

【0364】

本明細書に開示される主題は、その更なる態様において、線溶活性の減少を示す、且つ本明細書に開示される主題の方法のいずれかによって調製された任意の体液製剤を提供することが理解されなければならない。従って、本明細書に開示される主題は、その一部の実施形態において、少なくとも1つの線溶タンパク質、具体的には、tPA、及び／又はプラスミノゲンのうちの少なくとも一方が欠如している又はその量が低下している任意の哺乳類体液製剤を包含する。一部の実施形態において、本明細書に開示される主題の方法によって製造される製剤は、tPAが欠如している。なおも一部の更なる実施形態において、本明細書に開示される主題の方法によって作製される製剤は、tPA及びプラスミノゲンが欠如している。上記に指摘したとおり、本明細書に開示される主題の方法によって作製されるかかる製剤は、本明細書に記載される手順、コンジュゲート、組成物、装置及びシステムのいずれかに供された任意の体液、具体的には、哺乳類の血液、血漿又は任意の血液製剤であってもよい。

10

【0365】

更に別の態様において、本明細書に開示される主題は、それを必要としている対象における出血性、止血障害及びそれに関連する任意の出血性又は病的状態の治療、防止、予防、改善、抑制方法における使用のための線溶活性が低下した治療有効量の少なくとも1つの血液及び／又は血液由来製剤を提供する。かかる体液製剤は、本明細書に開示される主題の方法によって調製されることが理解されなければならない。なおも一部の更なる実施形態において、かかる体液製剤は、本明細書に開示される主題のコンジュゲートのいずれか、その任意の組成物又は本明細書に定義するとおりの本明細書に開示される主題の複数のコンジュゲートを含む任意の装置、装置一式、キット若しくはシステムによって調製されてもよい。

20

【0366】

なおも一部の更なる実施形態において、本明細書に開示される主題によって使用される血液及び／又は血液由来製剤は、具体的には、本明細書で上記に開示されるとおりの本明細書に開示される主題により定義されるとおり、任意の止血障害、具体的には遺伝性又は後天性出血性障害の治療に適用可能であり得る。

【0367】

本明細書に開示される主題の他の態様との関連における、本明細書に開示される主題によって記載されるコンジュゲートのいずれか、その任意の組成物、及び本明細書に開示される主題によって記載される任意の装置、装置一式、キット又はシステムは、この態様にも同様に適用可能であり得ることが理解されなければならない。なおも更に、本明細書に開示される主題は、本明細書で上記に開示される病態又は障害のいずれかに対する本明細書に記載される治療法又は任意の他の方法のいずれかによる使用のための本明細書に開示される血液及び／又は血液由来製剤のいずれかを更に包含することが理解されなければならない。

30

【0368】

本明細書で使用される全ての科学技術用語は、特記しない限り、当該技術分野で一般的に使用される意味を有する。本明細書に提供される定義は、本明細書で頻繁に使用される特定の用語の理解を促進するものであり、本開示の範囲を限定するよう意図するものではない。

40

【0369】

本明細書において定義及び使用されるとおりの全ての定義は、辞書的定義、参照によって援用される文献中の定義、及び／又は定義される用語の通常の意味に優先すると理解されなければならない。

【0370】

用語「約」は、本明細書で使用されるとき、言及される値よりも最大1%、より具体的には5%、より具体的には10%、より具体的には15%、及びある場合には最大20%上下に偏差していてもよい値を示し、この偏差範囲は整数値を含み、且つ該当する場合に

50

は非整数値も同様に含んで、連続する範囲を成す。本明細書で使用されるとき、用語「約」は±10%を指す。

【0371】

不定冠詞「a」及び「an」は、ここで本明細書及び特許請求の範囲において使用されるとき、明確にそうでない旨が指示されない限り、「少なくとも1つ」を意味するものと理解されなければならない。本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用されるとき、単数形「a」、「an」及び「the」は、内容上特に明確に指示されない限り複数の指示対象を含むことに留意しなければならない。

【0372】

語句「及び／又は」は、ここで本明細書及び特許請求の範囲において使用されるとき、そのように接続された要素、即ちある場合には等位接続で存在し、他の場合には離接接続で存在する要素の「いずれか一方又は両方」を意味するものと理解されなければならない。「及び／又は」を伴い挙げられる複数の要素も同様に、即ち、そのように接続された要素の「1つ以上」と解釈されなければならない。任意選択で、「及び／又は」節によって具体的に特定される要素以外の他の要素が、具体的に特定されるそれらの要素に関係があるか否かに関わらず存在してもよい。従って、非限定的な例として、「A及び／又はB」という表現は、「～を含む (comprising)」などの非制限的文言と併せて使用されるとき、一実施形態ではAのみ（任意選択でB以外の要素を含む）を指し；別の実施形態ではBのみ（任意選択でA以外の要素を含む）を指し；更に別の実施形態ではA及びBの両方（任意選択で他の要素を含む）を指すなどとなる。

【0373】

ここで本明細書及び特許請求の範囲において使用されるとき、「又は」は、上記に定義されるとおりの「及び／又は」と同じ意味を有するものと理解されなければならない。例えば、リスト中の項目を分けるとき、「又は」又は「及び／又は」は包含的である、即ち、数ある要素又は列挙されている要素のうちの少なくとも1つの包含だが、2つ以上もまた包含し、且つ任意選択で、追加的な列挙されていない項目を包含すると解釈されるものとする。「～のうちの1つのみ」又は「～のうちの正確に1つ」など、明確にそうでない旨が指示される用語のみが、又は特許請求の範囲で使用される場合には「～からなる (consisting of)」が、数ある要素又は列挙されている要素のうちの正確に1つの要素の包含を指すことになる。一般に、用語「又は」は、本明細書で使用されるとき、「いずれか」、「～のうちの1つ」、「～のうちの1つのみ」、又は「～のうちの正確に1つ」などの排他性の用語が前に付く場合には排他的選択肢（即ち、「いずれか一方であるが、両方ではない」）を指示するとのみ解釈されるものとする。「～から本質的になる (consisting essentially of)」は、特許請求の範囲で使用されるとき、特許法の分野で使用されたとおりのその通常の意味を有するものとする。

【0374】

ここで本明細書及び特許請求の範囲において使用されるとき、1つ以上の要素のリストを参照した語句「少なくとも1つ」は、要素リスト中にある要素の任意の1つ以上から選択される少なくとも1つの要素を意味するが、必ずしも要素リスト中に具体的に挙げられるあらゆる要素のうちの少なくとも1つを含むものでなく、要素リスト中の要素の任意の組み合わせを除外しないものと理解されなければならない。この定義はまた、語句「少なくとも1つ」が参照する要素リスト中に具体的に特定される要素以外の要素が、具体的に特定される要素と関係があるか否かに関わらず、任意選択で存在し得ることも許容する。従って、非限定的な例として、「A及びBのうちの少なくとも1つ」（又は、同等に「A又はBのうちの少なくとも1つ」、又は、同等に「A及び／又はBのうちの少なくとも1つ」）は、一実施形態では、少なくとも1つの、任意選択で2つ以上を含むAであって、Bは存在しないこと（及び任意選択でB以外の要素を含む）を指すことができ；別の実施形態では、少なくとも1つの、任意選択で2つ以上を含むBであって、Aは存在しないこと（及び任意選択でA以外の要素を含む）を指すことができ；更に別の実施形態では、少なくとも1つの、任意選択で2つ以上を含むA、及び少なくとも1つの、任意選択で2つ

10

20

30

40

50

以上を含む B（及び任意選択で他の要素を含む）を指すことができるなどとなる。

【0375】

また、明確にそうでない旨が指示されない限り、2つ以上のステップ又は動作を含む本明細書に特許請求される任意の方法において、方法のステップ又は動作の順序は、必ずしも方法のステップ又は動作が記載されている順序に限定されないことも理解されなければならない。

【0376】

本明細書並びに以下の実施例及び特許請求の範囲全体を通じて、文脈上特に必須でない限り、「～を含む (comprising)」、「～を包含する (including)」、「～を持つ (carrying)」、「～を有する (having)」、「～を含有する (containing)」、「～が関わる (involving)」、「～を保持する (holding)」、「～で構成される (composed of)」などの移行句は全て、オープンエンド形式である、即ち、～を含むが限定はされないことを意味するものと理解されるべきである。米国特許庁特許審査手順マニュアル (United States Patent Office Manual of Patent Examining Procedures) に示されているとおり、移行句「～からなる (consisting of)」及び「～から本質的になる (consisting essentially of)」のみが、それぞれ、クローズド又はセミクローズド移行句であるものとする。より具体的には、用語「～を含む (comprises)」、「～を含んでいる (comprising)」、「～を包含する (includes)」、「～を包含している (including)」、「～を有している (having)」及びこれらの活用形は、「～を包含しているが、限定はされない」を意味する。用語「～からなる (consisting of)」は「～を包含し、且つそれに限定される」を意味する。用語「～から本質的になる (consisting essentially of)」は、組成物、方法又は構造が追加の成分、ステップ及び／又は部分を包含し得るが、但し、その追加の成分、ステップ及び／又は部分が、特許請求される組成物、方法又は構造の基本的な新規の特徴を実質的に変えない場合に限ることを意味する。

【0377】

この本明細書に開示される主題の様々な実施形態は、範囲形式で提供され得ることに留意しなければならない。範囲形式での記述は単に便宜上で、簡潔にするためであることが理解されなければならない。本明細書に開示される主題の範囲に関する柔軟性のない限定と解釈されてはならない。従って、範囲の記述は、具体的に開示される全ての可能な部分範囲並びに当該範囲内にある個々の数値を有するものと見なされなければならない。例えば、1～6などの範囲の記述は、1～3、1～4、1～5、2～4、2～6、3～6等の具体的に開示される部分範囲、並びに当該範囲内にある個々の数、例えば、1、2、3、4、5、及び6を有すると見なされなければならない。これは範囲の広さに関わらず適用される。本明細書において数値範囲が指示される場合は常に、指示される範囲内にある任意の引用される数字（分数又は整数）を包含することが意図される。第1の指示数字と第2の指示数字と「の間の範囲にわたっている／範囲である」及び第1の指示数字「から」第2の指示数字「までの範囲にわたっている／範囲である」という語句は、本明細書では同義的に使用され、第1及び第2の指示数字並びにそれらの間にある全ての分数及び整数を包含することが意図される。

【0378】

本明細書で使用されるとき、用語「方法」は、限定はされないが、化学、薬理学、生物学、生化学及び医学分野の当業者に公知であるか、又はそうした当業者によって公知の様式、手段、技法及び手順から容易に開発されるかのいずれかである様式、手段、技法及び手順を含め、所与の課題を遂行するための様式、手段、技法及び手順を指す。

【0379】

明確にするため個別の実施形態との関連で記載されている本明細書に開示される主題の特定の特徴がまた、単一の実施形態に組み合わせて提供されてもよいことが理解される。逆に、簡略にするため単一の実施形態との関連で記載されている本明細書に開示される主題の様々な特徴がまた、個別に又は任意の好適な部分的組み合わせで又は本明細書に開示される主題の任意の他の記載される実施形態において好適なとおり提供されてもよい。様

々な実施形態との関連で記載される特定の特徴は、それらの要素なしには実施形態が動作不能な場合を除いて、それらの実施形態の必須の特徴であると見なされてはならない。

【0380】

本明細書において上記に描出されるとおりの及び以下の特許請求の範囲の部分に特許請求されるとおりの本明細書に開示される主題の様々な実施形態及び態様は、以下の実施例に実験的裏付けが見出される。

【0381】

開示され及び記載される、この本明細書に開示される主題が、本明細書に開示される詳細な例、方法ステップ、及び組成に限定されず、従って方法ステップ及び組成は幾らか異なってもよいことが理解されるべきである。また、本明細書に開示される主題の範囲は添付の特許請求の範囲及びその均等物によってのみ限定されることになるため、本明細書で使用される用語は詳細な実施形態を説明する目的で用いられているに過ぎず、限定する意図はないことも理解されるべきである。

【0382】

以下の例は、本明細書に開示される主題の態様を実行する際に本発明者らが用いた技法を代表するものである。これらの技法は、本明細書に開示される主題の実施に好ましい実施形態を例示するものであるが、当業者であれば、本開示を踏まえて、本明細書に開示される主題の趣旨及び意図される範囲から逸脱することなく多数の変形例を作成し得ると認識するであろうことが理解されなければならない。

【実施例】

【0383】

実施例

実験手順

試薬：

セファロース4B200 (Sigma Aldrich)

ヒト血漿 — 健常供血者の血漿はMDA Bloodから入手した

及び／又はヒトクリオプレシピテート — クリオプレシピテートはHadassah Blood Bankから入手した

【0384】

方法

ビーズ回収 (方法 # 1)

1. ビーズをRTにおいて300×gで2分、100mMリジン PH=9.0及び1M NaClによって3回洗浄した。

2. ビーズを室温 (RT) において300×gで2分間、3M NaClによって3回洗浄した。

3. ビーズをRTにおいて300×gで2分間、H₂Oによって3回 (×3) 洗浄した。

4. ビーズをRTにおいて300×gで2分間、0.5MのNaOHによって3回洗浄した。3回目の洗浄でビーズをNaOHと共に30分間インキュベートする。

5. ビーズをRTにおいて300×gで2分間、H₂Oによって3回洗浄した。

6. ビーズをRTにおいて300×gで2分間、0.5Mクエン酸ナトリウムによって3回洗浄した

7. ビーズをRTにおいて300×gで2分間、a — 10mMクエン酸ナトリウム PH=6.8、b — 120mM NaCl、c — 120mMグリシンによって3回洗浄した。

8. ビーズをRTにおいて300×gで2分間、H₂Oによって3回洗浄した。

9. ビーズを20%エタノール+1M NaClによって3回洗浄した*。3回目の洗浄後、20%エタノール+1M NaClを加えると70%スラリーが得られ、穏やかに反転させることにより再懸濁し、4℃で保存した。

【0385】

蠕動 (peristaltic) ポンプによるビーズ回収 (方法 # 2)

1 — フィルタを蠕動ポンプに接続した。

- 2 - 150 mL の各溶液をフィルタに15分間流した：
- a - 100 mM リジン PH = 9.0 及び 1 M NaCl
- b - 3 M NaCl
- c - H₂O
- d - 0.5 M NaOH (フィルタをNaOHと30分間インキュベートする)
- e - H₂O
- f - 0.5 M クエン酸ナトリウム
- g - 10 mM クエン酸ナトリウム PH = 6.8
120 mM NaCl
120 mM グリシン
- h - H₂O
- i - 20% エタノール + 1 M NaCl

10

NaOHを除いて緩衝液は全てオートクレーブで滅菌した
【0386】

PLG 検出

実施例7のPLG検出は、キット：ab196262 PLG human simple step ELISA KIT
を使用して実施した。

【0387】

【表1】

20

表1: プレート調製(1:10⁵血漿希釈):

	A (標準段階 希釈液- ng/μl)	B (標準段階 希釈液- ng/μl)	C コンジュゲート1	D コンジュゲート6
4	1.875	→	↓	↓
5	3.75	→	血漿69B	1:10
6	7.5	→	↓	↓
7	15	→		未処理 血漿69B
8	30	→	↓	↓

30

【0388】

試薬調製：

試薬は全て、使用前に室温にする。

使用する試薬の調製（36ウェル用）：

1×洗浄緩衝液PT（36 mL）：3.6 mLの10×洗浄緩衝液PT + 32.4 mLの
脱イオン水

抗体カクテル（1.8 mL）：180 μLの10×捕捉抗体 + 180 μLの10×検出抗
体 + 1440 μLの抗体希釈剤CPI

【0389】

試料調製：

血漿を段階希釈で試料希釈剤NS中に10⁵倍希釈した：

50

1 : 100 血漿 = 10 μ L 血漿 + 990 μ L 試料希釈剤 NS

1 : 10⁵ 血漿 = 1 μ L 血漿 + 999 μ L 試料希釈剤 NS

【0390】

標準調製：

1－ ストック標準溶液 (120 ng/mL)：ピペットで200 μ Lの水を加えることによるPEGタンパク質標準試料の再構成。10分間室温に保ち、穏やかに混合する。

2－ 8本の1.5 mLチューブに標準1～8の表示を付す。

チューブ1には、225 μ Lの試料希釈剤NSを加えた。

チューブ2～8には、150 μ Lの試料希釈剤NSを加えた。

75 μ Lのストック標準溶液をチューブ1に加えた。

150 μ Lの標準を次のチューブ (チューブ2～7)に加えた。

標準#8はタンパク質を含まず、ブランク対照である。

【0391】

アッセイ手順：

余分なマイクロプレートストリップをプレートフレームから取り外し、それらを乾燥剤パックの入ったフォイル袋に戻し、密閉し直し、4℃の保管場所に戻す。

1－ 50 μ Lの全ての試料又は標準を適切なウェルに加えた。

2－ 各ウェルに50 μ Lの抗体カクテルを加えた。

3－ プレートを密閉し、400 rpmに設定したプレートシェーカー上において室温で1時間インキュベートした。

4－ 各ウェルを3×350 μ L 1×洗浄緩衝液PTによって洗浄した (ウェルからの吸引又はデカントによって洗浄し、次に各ウェルに350 μ L 1×洗浄緩衝液PTを分注する)

5－ 各ウェルに100 μ LのTMB基質を加え、400 rpmに設定したプレートシェーカー上において暗所下で10分間インキュベートした。

6－ 各ウェルに100 μ Lの停止液を加えた。プレートをプレートシェーカー上において1分間振盪することにより混合した。

7－ OD吸光度を450 nmで読み取った。

【0392】

トロンボエラストグラフィー (TEG)

TEG器具TEG 5000機 (60) (Haemonetics, Braintree, MA) (2019年10月31日まで有効)

使い捨てカップ及びピン [HAE-07-052]

【0393】

TEG用試薬：

1. WT-tPA 1 mg/mL (Acytilyse 50 mg) [Acytilyse 50 mg、Boehringer Ingelheim; 1バイアルの2, 333 mg粉末は50 mgの活性アルテプラゼを含有する (WT-tPA)]

2. 塩化カルシウム0.2 M [Haemonetics、カタログ番号7003 ロット番号：150597BA]

3. 新鮮凍結ヒトクエン酸塩加血漿

4. FVII Valin (1 mg/mLストック) DPD-V304-037 Bulk B

5. Level I対照 [Haemonetics、カタログ番号8001、ロット番号：HM03199 有効期限：2018年10月]

6. Level II対照 [Haemonetics、カタログ番号8002、ロット番号：HM03178 有効期限：2018年10月]

7. PBS×10、Biological Industries ロット番号：1626505

8. TEG Hemostasis system希釈水 ロット番号：0110-1404

【0394】

アッセイは、「トロンボエラストグラフィー (TEG) によってモニタする凝血塊溶解

10

20

30

40

50

(Clot lysis monitored by thromboelastography (TEG))」プロトコルに従い実施した。TEGの使用前に、level I及びlevel II対照を使用することによりキャリブレーションを行い、各対照を両方のチャンネルで試験した（プロトコルに記載されるとおり）。WT-tPA試薬は、PBS×1 5 µL WT-tPA (16.66 µM) + 595 µL PBS×1 = ワーキング濃度 0.185 µM（試料中の最終濃度は1.85 nMである）に1:90希釈した。

【0395】

外出血モデル（マウスにおける尾切断）

動物及び条件：

種／系統：マウス、c57ブラック

性別／匹数／年齢：雄、24匹、8週齢

供給元：Harlan Laboratories、イスラエル

体重：体重は研究開始時に20～25 gであった。この群の最低及び最高体重は群平均体重の±10%の範囲内であった。

馴化期間：7日。

識別情報：油性マーカー（24時間以下の実験）及びケージ札。

動物のハンドリングは、国立衛生研究所（National Institute of Health：NIH）及び実験動物管理評価認定協会（Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care：AAALAC）に従い行った。動物は、ポリスルホン（PSU）ケージ（4～6匹のマウス／ケージ）、ステンレス鋼製格子天板付き、ペレット飼料及び透明のポリカーボネートボトルに入った飲用水用の設備を有するもので飼育した；寝わら：蒸気滅菌した清浄な稲の籾殻を使用した。寝わら材料はケージと共に少なくとも週2回交換した。

食餌：動物には市販のげっ歯類用の餌を不断給餌した。動物には、公営水道から得たオートクレーブ処理した飲用水を自由に摂取させた。

混入物：供給される飼料及び水の中に予想される混入物のいずれも、本研究の結果に影響を与える可能性はない。

環境条件：動物は、十分な新鮮空気の供給を伴う標準的な実験室条件下で飼育する。動物は、温湿度が制御された環境で飼った。温度範囲は20～24℃であったとともに、RHは30～70%であり、12時間明期及び12時間暗期サイクルとする。

獣医学的ケア：本研究に適合させるため、動物は入荷時に検査した。これは24時間実験であったため、研究開始後に獣医学的フォローアップは不要であった。

倫理委員会：本研究は、「イスラエル動物実験委員会（Israel Board for Animal Experiments）」による承認後に、「イスラエル動物福祉法（Israel Animal Welfare Act）」に準拠して実施した。

責任者：

1. 施設管理者、動物の健康及び馴致のあらゆる側面を監督する。及び全ての動物プログラム要員の支援を受けた。

2. 研究責任者が、全ての研究及び技術スタッフが十分に訓練を受けた者であることを確認にした。スタッフは要求される手順の実施経験がある。

【0396】

試験モデルの樹立

動物をその体重に従いケタミンとキシラジンの混合物（それぞれ100及び10 mg / kg）で麻酔した。動物を静脈内注射による種々の治療：200 µLの生理食塩水、200 µLの血漿及び200 µLのプラスミノゲン枯渇血漿で治療した。これに続き、動物を腹臥位に置いた。尾の遠位7 mm部分をメスで切断した。この尾を直ちに、予め水浴で37℃に温めておいた等張生理食塩水が入った50 mLファルコンチューブに浸した。尾の向きは垂直とし、先端を体の水平面の約2 cm下に位置させた。出血が止まった場合であっても各動物を60分間モニタして、再出血があるか検出した。ストップウォッチを使用して出血時間を決定した。出血オン／オフサイクルが起こった場合、60分の時間の

10

20

30

40

50

中での出血時間の合計を記録した。施設内動物倫理委員会の規定に従い60分後に実験を終了して、実験中の死亡を回避した。尾の切れ端を含めた体重を再び記録し、体重の減少から実験期間中の失血量を推定した。チューブの遠心後にペレット状の血液を推定した。実験の終了時、麻酔の過量投与によって動物を犠牲にした。

【0397】

選択したげっ歯類種は、よく使用される実験室系統のc57ブラック健常若齢成体動物である。このマウスモデルは、過剰出血の治療に対するプラスミノゲン枯渇血漿の有効性に関して初期情報を提供する第一歩である。

【0398】

3群にわたる合計24匹のマウスを利用した。各群に8匹の動物が含まれた。対照群は生理食塩水のみを投与を受け、2番目の群は未処理血漿の投与を受け、3番目の群はプラスミノゲン枯渇血漿(PDP)の投与を受けた。動物を各群に無作為に分けた。各群から1匹の動物が血漿又は対照治療のいずれかを受け、これは単回200μL用量として静脈内適用された。動物の総数は、動物が失った血液量に関して有意な情報を生み出す1群当たりの動物の数として、これが最小限であることを実証する先行研究に基づいている。治療は静脈内注射によって投与した。

【0399】

clear plasmaを使用したプラスミノゲン枯渇クリオプレシピテート：

1 - ClearPlasmaアセンブリ：

- ・ フィルタに樹脂を充填する。
- ・ 充填入口をロックする
- ・ 流量調整弁をオフに設定する。
- ・ 延長チューブ（流量調整弁付き）にクランプを取り付ける。
- ・ クランプを閉じる
- ・ フィルタに延長チューブを取り付ける
- ・ 収集バッグにクランプを取り付ける
- ・ クランプを閉じる
- ・ 収集バッグをフィルタと取り付ける。

1 ClearPlasmaに18mL樹脂：TXAコンジュゲートTXA及び／又はシクロヘキサンカルボン酸（90～100μm superflow樹脂を充填するコンジュゲート1。

2 60mLの水で樹脂を洗浄する。

3 60mLの生理食塩水で樹脂を洗浄する。

4 クリオプレシピテートバッグをClearPlasmaに接続する

5 16mLのクリオプレシピテートをフィルタに22分間流す。

6 上清を新しいチューブにプラスミノゲンが枯渇したクリオプレシピテート。

【0400】

2 - PLG検出

- ・ E-80PMG-ヒトプラスミノゲンELISAキット、ロット番号10-（ICL, Inc.）
- ・ 使用説明書はキット添付文書からのものである。（1）

【0401】

【表 2】

・ 表2: プレート調製:

	1	2	3	4
A	BLK	BLK		
B	6.25ng/ml	6.25ng/ml		
C	12.5ng/ml	12.5ng/ml		
D	25ng/ml	25ng/ml		
E	50ng/ml	50ng/ml		
F	100ng/ml	100ng/ml		
G	200ng/ml	200ng/ml	未処理	未処理
H	未処理	未処理	PDPフィルタ	PDPフィルタ

【0402】

試料の希釈:

試料の1/5, 000希釈液を段階希釈で調製する:

1:100クリオプレシピテート(1:100=5μLクリオプレシピテート(1:100+495μL 1×希釈液)。

1:5000クリオプレシピテート(1:50=10μLの希釈クリオプレシピテート(1:100)+490μL 1×希釈液)。

各段階で十分に混合する。

【0403】

アッセイ手順:

1 使用前に全ての試薬を室温にする。

2 100μLの試料(デュプリケート)を予め指定しておいたウェルにピペッティングする。

3 マイクロタイタープレートを室温で60分間インキュベートする。インキュベーション中、プレートはカバーをしたまま水平に保つ。

4 インキュベーション後、ウェルの内容物を吸引する。

5 ウェルに洗浄緩衝液を完全に充填し、プレートを反転させ、次に内容物を廃棄物容器に流し込む/振り落とす。これに続いて吸収紙上でウェルを強く叩くことにより残留緩衝液を取り除く。3回繰り返して合計4回の洗浄とする。

6 100μLの適切に希釈した酵素抗体コンジュゲートを各ウェルにピペッティングする。室温で60分間インキュベートする。インキュベーション中、プレートは暗所下でカバーをしたまま水平に保つ。

7 ステップ5/6に記載されるとおりウェルを洗浄し、吸い取る。

8 100μLのTMB基質溶液を各ウェルにピペッティングする。

9 暗所下室温で正確に10分間インキュベートする。

10 10分後、各ウェルに100μLの停止液を加える。

11 各ウェルの内容物の吸光度(450nm)を決定する。

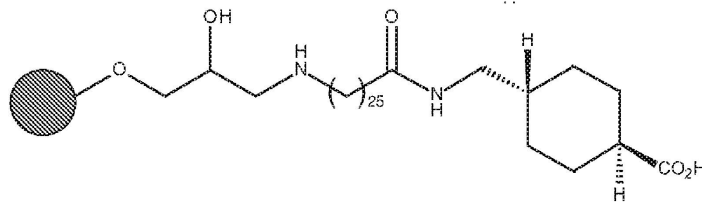
【0404】

実施例1

樹脂の合成

実施例1. 1-コンジュゲート1の合成

【化 13】



樹脂作製及びフィルタ充填－スケールアップ

このプロセスは、NHS 活性化セファロース Fast Flow (GE Healthcare カタログ番号 17-0906-02) 製品説明書に従い実施した。

【0405】

このプロセスは、製造者から適切な文書と共に受領したナイーブビーズの新しい清浄なバッチで開始した。

【0406】

このプロトコルに使用した樹脂容積は、 8×50 mL チューブ内にある 112 mL の液抜き後樹脂 (8×14 mL) であった (当初は 70% 樹脂スラリー; チューブ 1 本当たり 14 mL の液抜き後樹脂)。このプロトコルでは 3 つの完全な ClearPlasma フィルタのバッチが生じる。調製、カップリング及びカップリング後洗浄を可能な限り清浄に行った。エンドトキシン洗浄及び充填段階は清浄環境で行った。

【0407】

使用した実験器具

$0.2 \mu\text{m}$ フィルタ (例えば Steritop)、 3×1 L ボトル (1mM HCl; 0.1M トリス-HCl、 $\text{pH } 8.5$; 0.1M 酢酸塩緩衝液、 0.5M NaCl、 $\text{pH } 4.5$)、 2×0.5 L ボトル (カップリング緩衝液; 4M 尿素)、 4×1 L ボトル (70% EtOH、 50mM トリス-HCl $\text{pH } 7.5$ 、 50mM トリス-HCl、 0.1M NaCl、 $\text{pH } 7.5$ 、パイロジェンフリー水中、 20% EtOH)、有機性廃棄物容器、オートクレーブ処理したへら、ピーカー、メスシリンダ、清浄なプラスチックピペット、チューブローラ/ローテータ、 50mL カテーテル先端シリンジ、滅菌 ClearPlasma フィルタケーシング

【0408】

使用した試薬

重炭酸ナトリウム (NaHCO_3)、炭酸ナトリウム (Na_2CO_3)、塩化ナトリウム、トラネキサム酸、 37% HCl、NaOH、トリス-HCl、酢酸、酢酸ナトリウム、エタノール、尿素、Ddw (再蒸留水)、パイロジェンフリー水

【0409】

溶液

最終的な緩衝液及び溶液は全て、使用前に $0.2 \mu\text{m}$ フィルタでろ過した。

【0410】

カップリング緩衝液 - 100mL 0.2M NaHCO_3 、 0.5M NaCl、 $\text{pH } 8.3$ 。 1.68g の量の重炭酸ナトリウムを秤量し、 70mL ddw に溶解した。pH を (1M NaOH 又は 1M HCl) で 8.3 に調整した。 2.92g の量の塩化ナトリウムを秤量し、重炭酸ナトリウム溶液に溶解した。容積を DDW で 100mL に調整した。

【0411】

リガンド溶液 - 85mL 25mM (1 当量) 又は 50mM (2 当量) 又は 125mM (5 当量) 又は 250mM (10 当量) トラネキサム酸、カップリング緩衝液中、pH は $6 \sim 9$ に調整。所望の量のトラネキサム酸を 85mL 0.2M NaHCO_3 、 0.5M NaCl、 $\text{pH } 8.3$ に溶解した。pH を所望のレベルに調整した。この溶液を 0.2μ

でろ過した

【0412】

樹脂一次洗浄液－1.5 L 1 mM HCl。50 mL チューブの中に44 mL の量のDDWを加えた。1 mL HClを加え（約37%、12 M）、0.25 M HClとした。2 L ボトルの中に1400 mL DDWを加えた。6 mL 0.25 M HClを加えた。容積を1500 mLに調整した。この溶液を0.2 μでろ過した。

【0413】

樹脂ブロッキング液－250 mL 0.3 M トリス-HCl、pH 8.5。11.82 g の量のトリス-HClを200 mL DDWに溶解した。pHを1 M NaOH又は1 M HClで8.5に調整した。容積をddwで250 mLに調整した。この溶液を0.2 μでろ過した。

10

【0414】

塩基性洗浄液－1.5 L 0.1 M トリス-HCl、pH 8.5。23.64 g の量のトリス-HClを1300 mL DDWに溶解した。pHを1 M NaOH又は1 M HClで8.5に調整した。容積をddwで1500 mLに調整した。この溶液を0.2 μでろ過した。

【0415】

樹脂酸性洗浄液－1.5 L 0.1 M 酢酸塩緩衝液、0.5 M NaCl、pH 4.5。12.3 g の量の酢酸ナトリウムを1300 mL DDWに溶解した。pHを1 M NaOH又は0.1 M 酢酸（1.15 mL 氷酢酸をddwで合計200 mLにしたもの）で4.5に調整した。43.83 g の量の塩化ナトリウム及び溶解した。容積を1500 mLに調整した。この溶液を0.2 μでろ過した。

20

【0416】

エンドキシン洗浄液（EW）1－600 mL 70% EtOH。420 mL 高品質エタノールを180 mL DDWと共に混合する。

【0417】

EW2－600 mL 50 mM トリス-HCl pH 7.5。3.63 g の量のトリス-HClを500 mL DDWに溶解した。pHを1 M HClで7.5に調整した。容積をDDWで600 mLに調整した。

【0418】

EW3－パイロジェンフリー水中300 mL 4 M 尿素。72 g の量の尿素を200 mL 灌注用DDWに溶解した。容積を灌注用水で300 mLに調整した。

30

【0419】

EW4－パイロジェンフリー水中600 mL 50 mM トリス-HCl、0.1 NaCl、pH 7.5。3.63 g の量のトリス-HClを500 mL 灌注用DDWに溶解した。pHを1 M HClで7.5に調整した。3.51 g の量の塩化ナトリウムを緩衝液に溶解した。容積を灌注用水で600 mLに調整した。

【0420】

エンドキシンフリー保存液（EFS）－パイロジェンフリー水中550 mL 20% EtOH。110 mL の容積の高品質エタノールを440 mL 灌注用水と共に混合した。

40

【0421】

1 M HCl－pH調整。4.17 mL 37% 塩酸をDDWで50 mLに希釈した。

【0422】

1 M NaOH－pH調整。2 g NaOHを50 mL DDW中に希釈した。

【0423】

エンドキシンフリー溶液のpH調整には、灌注用水で作製した溶液を使用した。

【0424】

調製

－樹脂を再懸濁し（NHS 活性化セファロースビーズ、100% イソプロパノール中70% スラリー）、8×14 mL を8×50 mL PP チューブに移した。

50

- － チューブを400gで3分間スピンドウンした。
- － 保存溶媒を吸引した。
- － チューブに1mM HClを45mLまで充填し、樹脂を再懸濁した。
- － チューブを400gで3分間スピンドウンし、吸引した。
- － 洗浄を更に4回繰り返した（合計5回の洗浄）。

【0425】

カップリング

- － 各チューブに7mLの樹脂を加えた。
- － pHを7.5～8に調整した（必要に応じて）。
- － チューブを2～4時間（室温）／一晚（4℃）穏やかに連続回転させた。
- － 樹脂をスピンドウンし、吸引し、回転させながら25mL（各チューブ）0.1M トリス-HCl、pH 8.5で2～4時間ブロックした。

10

【0426】

洗浄

樹脂をスピンドウンし、吸引した。

30mL 0.1M トリス-HCl pH 8～9を加えて再懸濁し、スピンドウンし、吸引した。

30mL 0.1M 酢酸塩緩衝液、0.5M NaCl、pH 4～5を加えて再懸濁し、スピンドウンし、吸引した。

これらの洗浄（トリスから酢酸塩まで）を5回繰り返した。

20

このプロセスが：

- ・ 更なる時間続くとき－洗浄ステップ（添加、スピンドウン、吸引）を30mL 20% EtOHで2回実施し、50%スラリーとして20% EtOH中に保存した。
- ・ 直接エンドトキシン洗浄へと続くとき－30mL 70% EtOH（EW1）を加えた。

【0427】

エンドトキシン洗浄

樹脂が20% EtOH中に保存されている場合、それをスピンドウンし、吸引し、及び30mL 70% EtOH（EW1）を加えた。

樹脂を70% EtOH中で30分間（回転させながら）インキュベートした。

樹脂を洗浄し、30mL 50mM トリス-HCl pH 7.5（EW2）を加えた。

30

樹脂を洗浄し、30mL 50mM トリス-HCl pH 7.5を加え、この樹脂を30分間（回転させながら）インキュベートした。

樹脂を洗浄し、15mL 4M 尿素（EW3）を加えた。

樹脂を洗浄し、15mL 4M 尿素を加え、この樹脂を30分間（回転させながら）インキュベートした。

樹脂を洗浄し、30mL 50mM トリス-HCl、0.1M NaCl、pH 7.5（EW4）を加えた。

樹脂を洗浄し、30mL 50mM トリス-HCl、0.1M NaCl、pH 7.5を加え、この樹脂を30分間（回転させながら）インキュベートした。

樹脂を洗浄し、30mL 20% EtOH（EFS）を加えた。

40

洗浄を繰り返した。

樹脂は充填時まで70%スラリーとして20% EtOH（EFS）中に保存した。

【0428】

充填

チューブからの樹脂を全て1つの容器にプールした。

ビーズが沈降している場合、容器を穏やかに回転させて均一な懸濁液にした。

- － 滅菌50mL カテーテル先端シリンジに懸濁液を充填した。
- － ケーシングに懸濁液を穏やかに充填した。継ぎ足しが必要な場合、上記と同じ方法を用いた。
- － フィルタが満杯に近付いたところで、出口ルアーロックカバーを開けて、過剰な保存

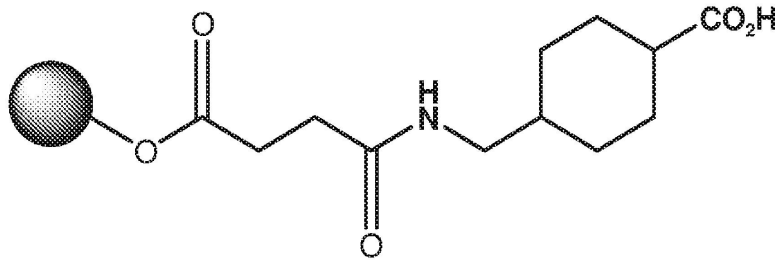
50

溶液容積をフィルタから流出させた。樹脂区画が充満した後、出口を閉じた。
充填した製品は製品仕様に従い保存した。

【0429】

実施例 1. 2-コンジュゲート 2 の合成

【化 14】



10

コンジュゲート 2 の調製のための反応を図 1 に概略的に示す。

【0430】

より具体的には、以下の手順を用いた：

1. 4.2 ml の量のセファロース 4B200 (Sigma Aldrich) をシェーカーを使用してガラス漏斗フィルタに通してアセトンで洗浄した。セファロースは 1 ml の反応性官能基を含有し、従って 4.2 ml は 4.2 mmol を含有するものと見なした。

20

2. 無水コハク酸 (0.42, 4 mmol) を CH_2Cl_2 (3 ml) 中のビーズのスラリーに加え、続いてピリジン (0.339 ml) を加えた。この混合物を一晩振盪した (shacked)。

3. ビーズをろ過し (filets)、アセトンで洗浄した。

4. ビーズを CH_2Cl_2 に懸濁し、N-ヒドロキシコハク酸アミド (N-Hydroxylsuccinamide) NHS (0.483 g) を加えた後、続いて EDC (0.8 g) を加えた。この混合物を一晩振盪し、次にろ過した。

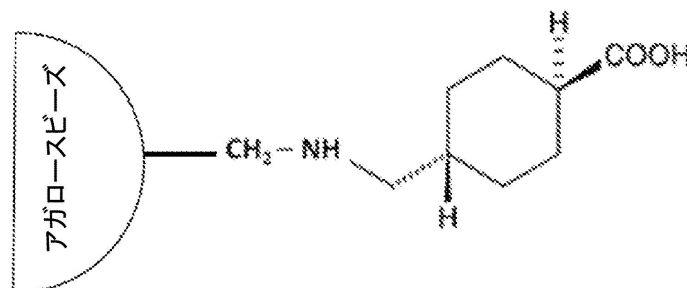
5. この生成物を DMF (3 ml) に懸濁し、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (0.54 g) 及び 4-(アミノメチル)シクロヘキサンカルボン酸 (0.66 g) を加えた。この混合物を一晩振盪した。この生成物をアセトンで洗浄し、更なる試験に回した。

30

【0431】

実施例 1. 3-コンジュゲート 3 の合成 (「TXA-グリオキサールアガロース樹脂」)

【化 15】



40

手順

1. グリオキサールアガロースビーズをガラスフィルタを使用して蒸留水で洗浄する。

2. リガンド溶液を調製し、活性及び／又は 280 nm での吸光度を試験する。

3. 1 ml グリオキサールアガロースビーズを pH 10.05 の緩衝液中の 9 ml TXA 溶液に加える。

4. 穏やかに攪拌し、頻繁に pH を確認する。懸濁液のアリコートを取り、活性又は

50

280 nmでの吸光度に関してアッセイする。

5. 穏やかな攪拌を数時間続けるか、又は活性測定値が一定のままとなるまで続ける（これは完全な固定化を示す）。マグネチックスターラは避ける。注記：固定化時間が長くなるほど、強力な生体分子／ビーズ反応及び安定性に有利に働くが、好ましくない歪みが生じることもある。

6. 活性／吸光度が一定になったところで、懸濁液に10 mg 固体水素化ホウ素ナトリウムを加え、蓋のない容器内において室温で30分間攪拌して水素を逃がす。このステップを火気の近くで実施しないこと。可能であれば換気扇の近くで行う。

7. 真空フィルタを使用して懸濁液を25 mMリン酸緩衝液pH 7.0で洗浄することにより、過剰なホウ化水素を取り除く。続いて、懸濁液を蒸留水で十分に洗浄し、ろ過乾固する。

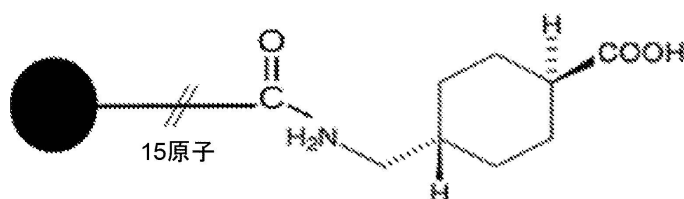
10

8. リガンドがカップリングしたグリオキサールアガロースビーズは、保存剤を含有する水中20%エタノールに4～10℃で保存しなければならない。

【0432】

実施例1. 4-コンジュゲート4の合成（「TXA-ECHアガロース樹脂」）

【化16】



20

トラネキサム酸（TXA）とECH-アガロースビーズ（G-Biosciences、#786-1223）とのコンジュゲーション

1. リガンド溶液を調製する—ddw中50 mM TXA、pHをHClで5.2に調整。
2. 2 mL樹脂を10 mL ddwで洗浄する。遠心3分間×500 gによってスピンドウンする。

3. 樹脂を160 mL 0.5 M NaClで洗浄する。

30

4. 液抜き後の樹脂に4 mLリガンド溶液を加える。

5. 最終反応物において100 mMが得られるようにEDC（カップリング剤）を加える。

6. 1時間回転させて、pHをHClで5.0に調整する。回転を一晩続ける。

7. 樹脂をスピンドウンし、デカントする。

8. 樹脂を3サイクルの交互の溶液で洗浄する：

a. 0.1 M酢酸塩、0.5 M NaCl、pH 4.0

b. 0.1 Mトリス-HCl、0.5 M NaCl、pH 8.0

9. ddwで2回洗浄する。

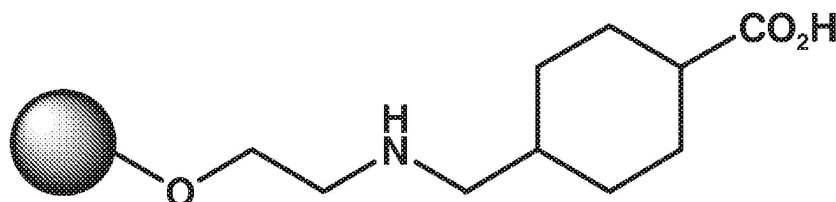
10. 1回洗浄し、次に20% EtOHに2～8℃で保存する。

【0433】

40

実施例1. 5-コンジュゲート5の合成

【化17】



50

反応物－シアノ水素化ホウ素ナトリウム
【化 1 8】



第一段階ではシッフ塩基 (Schieff base) が調製され、次にこれがシアノ水素化ホウ素ナトリウム (sodium cyanoborohydride) (NaCNBH_3) 又は好ましくは水素化ホウ素ナトリウム (NaBH_4) で還元されると、最終的な材料が得られる。シッフ塩基 (Schieff base) 中の二重結合は、 $1590 \sim 1690 \text{ cm}^{-1}$ の赤外吸光度が特徴的である。アルデヒド中のカルボニルは、 $2700 \sim 2900 \text{ cm}^{-1}$ の赤外吸光度が特徴的なその出発物質である。最終的な材料には、トラネキサム酸 (tannzamic acid) もまた必要になる。

【0434】

より具体的には、以下の手順を用いた：

1. グリオキサルアガロースビーズをガラスフィルタを使用して蒸留水で洗浄した。
2. リガンド溶液を調製し、活性及び／又は 280 nm での吸光度を試験した。
3. $\text{pH } 10.05$ の緩衝液中の 9 mL リガンド溶液に 1 mL の量のグリオキサルアガロースビーズを加えた。リガンドが室温で不安定な場合、以下のステップは低温で実行した。
4. 穏やかな攪拌を実施し、頻繁に pH を確認した。懸濁液のアリコートを取り、活性又は 280 nm での吸光度に関するアッセイを実施した。
5. 穏やかな攪拌を数時間維持するか、又は活性測定値が一定のままとなるまで維持した（これは完全な固定化を示す）。マグネチックスターラは避けた。

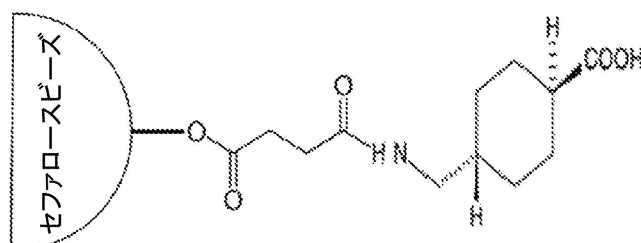
注記：固定化時間が長くなるほど、強力な生体分子／ビーズ反応及び安定性に有利に働くが、好ましくない歪みが生じることもある。

6. 活性／吸光度が一定になったところで、懸濁液に 10 mg 固体水素化ホウ素ナトリウムを加え、蓋のない容器内において室温で 30 分間攪拌して水素を逃がした。このステップが火気の近くで実施されることはなく、むしろ可能な限り換気扇の近くで行った。
7. 真空フィルタを使用して懸濁液を 25 mM リン酸緩衝液 $\text{pH } 7.0$ で洗浄することにより、過剰なホウ化水素を取り除いた。続いて、懸濁液を蒸留水で十分に洗浄し、ろ過乾固した。
8. リガンドがカップリングしたグリオキサルアガロースビーズは、保存剤を含有する水中 20% エタノールに $4 \sim 10^\circ\text{C}$ で保存した。

【0435】

実施例 1. 6-コンジュゲート 6 TXA-セファロース樹脂の合成

【化 1 9】



1. 4.2 mL の量のセファロースビーズをシェーカーを使用してガラス漏斗フィルタに通してアセトンで洗浄した。I

2. 無水コハク酸 (0.42, 4 mmol) を CH_2Cl_2 (3 ml) 中のビーズのスラリーに加え、続いてピリジン (0.339 ml) を加えた。この混合物を一晩振盪した (shacked)。

3. ビーズをろ過し (filets)、アセトンで洗浄した。

4. ビーズを CH_2Cl_2 に懸濁し、N-ヒドロキシコハク酸アミド (N-Hydroxylsuccinamide) NHS (0.483 g) を加えた後、続いて EDC (0.8 g) を加えた。この混合物を一晩振盪し、次にろ過した。

5. この生成物を DMF (3 ml) に懸濁し、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (0.54 g) 及び 4-(アミノメチル) シクロヘキサンカルボン酸 (0.66 g) を加えた。この混合物を一晩振盪した。

最終的なビーズをアセトンで2回洗浄し、更にエタノール70%で洗浄し、遠心し、20%エタノールに懸濁した。

【0436】

実施例 2

新規に合成された TXA コンジュゲート ECH-アガロースビーズ、Sterogene Superflow 及び グリオキサールアガロースビーズ-コンジュゲート 1 の活性の判定

材料：

- ・血漿：MDA Blood Bank から健常供血者の血漿を入手した。使用した血漿は Rh 陰性であるとともに、種々のウイルス抗原 (例えば、HBV、HCV、HTLV、HIV) に対しても陰性である。

- ・ビーズ：

1. 実施例 1 に記載される手順により合成された TXA コンジュゲート グリオキサールアガロースビーズ

2. TXA コンジュゲート ECH-アガロースビーズ (新規ビーズ)、Daren laboratories-コンジュゲート 4

3. Sterogene Superflow sterogene ビーズ) -コンジュゲート 1

- ・器具：

シェーカー：KRS-3016 (MRC)

ELISA リーダー：800TS (BioTek)

実験は非無菌環境で行った。

- ・溶液調製：

結合緩衝液 (30 ml)：

クエン酸ナトリウム (10 mM) - 0.3 ml

NaCl (120 mM; 調製日：2017年9月25日) - 1.2 ml

DDW = 28.5 ml

【0437】

プラスミノーゲン枯渇

1. ビーズは既に20%エタノール及び70%樹脂中に保存されていた。1 ml の量のビーズを15 ml チューブに移した。

2. チューブに水を充填し、及び

3. チューブを室温において $300 \times g$ で2分間遠心した。

4. 上清を取り除いた。

5. これらのステップを3回繰り返した。

6. ビーズを結合緩衝液に懸濁する*：

a - 10 mM クエン酸ナトリウム PH = 7.16

b - 120 mM 塩化ナトリウム

7. 遠心ステップを第3節にあるとおり実施した。

8. 上清を取り除いた。

9. これらのステップを2回繰り返した

10. ビーズに1 ml の量の74E血漿を加えた。

11. この混合物を穏やかに反転させることにより十分に混合し、室温で2時間インキュベートした（プレートシェーカー—80rpmで振盪した場合）。

12. 遠心ステップを第3節にあるとおり実施し、血漿枯渇プラスミノーゲンが入った新しいチューブに上清を移した。

13. ELISAアッセイを用いて血漿枯渇を試験した。

14. 残りの血漿（未枯渇及び枯渇済みを含む）を−20℃でインキュベートした。

【0438】

PLG検出

キットAb108893ヒトプラスミノーゲンELISAキット（abacam（登録商標））を製造者の指示に従い使用した。

【0439】

プレートは表3にある以下のとおり調製した（1：20，000血漿希釈）：

【0440】

【表3】

表3: プレート調製

	1	2
A	ブランク	未枯渇47E 血漿
B	↓	↓
C	コンジュゲート1	
D	↓	
E	コンジュゲート2	
F	↓	
G	TXAコンジュゲート ECHアガロースビーズ コンジュゲート4	
H	↓	

【0441】

試薬調製

試薬は全て、使用前に室温（18～25℃）に平衡化させた。使用直前に新鮮な試薬を調製した。

1－ 1×Diluent M：1.5mlの10×Diluent M濃縮物についての15mlの試薬グレード水による1：10希釈液。穏やかに且つ十分に混合する。

2－ 1×洗浄緩衝液：2mlの20×洗浄緩衝液、濃縮物についての38mlの試薬グレード水による1：20希釈液。穏やかに且つ十分に混合する。

3－ 1×ビオチン化プラスミノーゲン検出抗体：最初に50×ビオチン化プラスミノーゲン抗体バイアルをスピンして底の内容物を収集する。12μlの50×ストックビオチン化プラスミノーゲン抗体を588μlの1×Diluent Mに加える。穏やかに且つ十分に混合する。

4－ 1×SPコンジュゲート：100×ストレプトアビジン—ペルオキシダーゼコンジュゲート（SPコンジュゲート）を短時間スピンドウンし、6μlのコンジュゲートを594μlの1×Diluent Mで1：100希釈する。

【0442】

標準調製：

- 1－ 標準物質を室温に平衡化させた。
- 2－ 7本のチューブに#2～8の表示を付した
- 3－ チューブ#2～8に120 μ Lの1×Diluent Mを加える。
- 4－ 標準#2を調製し、120 μ Lの標準1番をチューブ#2に加え、穏やかに混合する。
- 5－ 標準#3を調製し、120 μ Lの標準2番をチューブ#3に加え、穏やかに混合する。
- 6－ 以下の表を指針として用いて、後続の段階希釈液を調製する。
- 7－ 1×Diluent Mはゼロ標準、0 ng/mL（チューブ#8）として働く。

10

【0443】**試料調製**

試料は段階希釈で1×Diluent Mにより1：20，000希釈する：

- a－ 1：100血漿＝5 μ Lの血漿＋495 μ L 1×Diluent M
- b－ 1：20，000血漿＝5 μ Lの希釈血漿＋995 μ L 1×Diluent M

【0444】

以下の手順を用いた：

- 1－ 全ての試薬、ワーキング標準物質及び試料は、指示どおり調製した。アッセイは室温（18～25℃）で実施する。
- 2－ 余分なマイクロプレートストリップはプレートフレームから取り外し、中に乾燥剤が入ったフォイル袋に直ちに戻した。水蒸気への曝露を最小限に抑えるためポーチをしっかりと密閉し直し、減圧デシケータに保存した。
- 3－ 各ウェルに50 μ Lの量のプラスミノゲン標準物質又は試料を加えた。ウェルをシールテープで覆い、1時間インキュベートした。タイマーは最後の試料を加えた後に開始した。
- 4－ 200 μ Lの1×洗浄緩衝液による手作業の洗浄ステップを5回実施した。毎回プレートを反転させ、内容物をデカントした（吸水性のペーパータオル上で14回軽く叩くことにより液体を完全に除去した）
- 5－ 各ウェルに50 μ Lの量の1×ビオチン化プラスミノゲン抗体を加え、1時間インキュベートした。
- 6－ マイクロプレートを上記に記載されるとおり洗浄した。
- 7－ 各ウェルに50 μ Lの量の1×SPコンジュゲートを加え、30分間インキュベートした。マイクロプレートリーダーをオンにし、予めプログラムをセットアップした。
- 8－ マイクロプレートを上記に記載されるとおり洗浄した。
- 9－ 各ウェルにつき50 μ Lの量の発色基質を加え、約12分間又は最適な青色濃度が生じるまでインキュベートした（プレートを穏やかに叩いて十分な混合を確実にし、及びピペット先端でウェル内の気泡をつぶす）
- 10－ 各ウェルに50 μ Lの量の停止液を加えた。色が青色から黄色に変化した。
- 11－ 直ちにマイクロプレートリーダーにおいて450 nmの波長で吸光度を読み取った。以下の結果が観察された。

20

30

40

【0445】**・ PLG濃度：**

検量線結果^{*}を表4にまとめ、及び図2に示す。

【0446】

50

【表 4】

表4: 450nmにおける標準物質のOD

試料	O.D	ブランク調整後データ	O.D 平均値	濃度
STD1	0.071	0.001	0	0
	0.07	-0.001		
STD2	0.227	0.157	0.1455	1.25
	0.204	0.134		
STD3	0.366	0.296	0.2805	2.5
	0.335	0.265		
STD4	0.607	0.537	0.5105	5
	0.554	0.484		
STD5	1.031	0.961	0.934	10
	0.977	0.907		
STD6	1.664	1.594	1.533	20
	1.542	1.472		
STD7	2.173	2.103	2.0995	40
	2.167	2.096		
STD8	2.481	2.411	2.5075	80
	2.674	2.604		

【 0 4 4 7 】

表 5 に示す式が得られた。それに応じて、試料の濃度及び枯渇パーセンテージを計算した。表 6 に示す。

【 0 4 4 8 】

【表 5】

表5: 検量線から得られた式

曲線名	曲線式	A	B	C	D	R2
検量線	$Y = (A-D)/(1+(X/C)^B) + D$	0.0158	1.17	19.6	3	1

【 0 4 4 9 】

10

20

30

40

50

【表 6】

表6. 試料のPLG濃度

試料	O.D.	ブランク 調整後データ	O.D.平均値	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	%枯渇
ブランク	0.062	-0.002	0	0	
	0.066	0.002			
コンジュゲート1	0.148	0.084	0.0825	14.1	92.4%
	0.145	0.081			
コンジュゲート2	0.164	0.1	0.0975	17.14	90.8%
	0.159	0.095			
コンジュゲート4	0.662	0.598	0.594	114.22	38.75%
	0.654	0.59			
未枯渇 47E血漿	0.952	0.888	0.9	186.5	
	0.985	0.921			

【0450】

未枯渇血漿中のPLG濃度はヒト血漿中のプラスミノゲン濃度の正常範囲（153.1～174.9 $\mu\text{g/ml}$ 、キット取扱説明書による）と比べて僅かに高いように見える。プラスミノゲンレベルはTXA Superflow回復後ビーズとのインキュベーション後に92%超が枯渇し、YA2-2ビーズとのインキュベーション後に90%超、及びTXAコンジュゲートECHアガロースビーズとのインキュベーション後に38%の枯渇であった。回復後はTXA Superflowビーズ及びY2-2ビーズ（TXAコンジュゲートグリオキサルアガロースビーズ）は血漿からのプラスミノゲン除去に高い効率を示したが、TXAコンジュゲートECHアガロースビーズは低い効率を示した。

【0451】

実施例3

新規コンジュゲートGEビーズ、Sterogene Superflowビーズの活性の判定

材料：

- ・ 血漿：MDA Blood Bankから健常供血者の血漿を入手した（付録1を参照）
- ・ ビーズ：

1－ 「TXAコンジュゲートGEビーズ」－pH6.5、7.5、8.5。合成プロトコルについては実施例1を参照のこと。

2－ 「Sterogene回復後TXA Superflowビーズ」 [コンジュゲートー1]

- ・ 方法#1：ビーズをブタ実験に使用し、回復させた。器具：

1－ シェーカー：KRS-3016（MRC）

2－ ELISAリーダー：800TS（BioTek）。

- ・ 実験は非無菌環境で行った。

【0452】

プラスミノゲン枯渇

1. a. Sterogene TXA Superflowビーズは既に20%エタノール及び70%樹脂中にあった。1mlの量のビーズを15mlチューブに移した。

b. 既に20%エタノール及び70%樹脂中にあるTXAコンジュゲートGEビーズの各反応物1ml

2. チューブに水を充填した。

3. RTにおいて300×gで2分間遠心する

4. 上清を取り除いた。
 5. 3回繰り返す
 6. ビーズを結合緩衝液に懸濁した*：
 - a - 10 mMクエン酸ナトリウム PH = 7.16
 - b - 120 mM塩化ナトリウム
 7. 第3節のとおり遠心する
 8. 上清を取り除いた。
 9. 2回繰り返す
 10. ビーズに1 mlの27 K血漿を加えた。
 11. チューブを穏やかに反転させることにより十分に混合し、室温で2時間インキュベートした（プレートシェーカー 80 rpmにおいて振盪するため）。
 12. 第3節のとおり遠心し、上清を新しいチューブに移したー血漿枯渇プラスミノーゲン
 13. ELISAアッセイを用いて血漿枯渇を試験した。
 14. 残りの血漿（未枯渇及び枯渇済み）は-20℃でインキュベートした。
- 【0453】

PLG検出

キットAb108893ヒトプラスミノーゲンELISAキット（abacam（登録商標））を製造者の指示に従い使用した。

【0454】

プレートは以下のとおり調製した（1：20，000血漿希釈）。

【0455】

【表7】

表7: プレート調製

	1	2
A	ブランク	コンジュゲート1ビーズ (方法#1)
B	↓	↓
C	反応液1、PH=6.5	コンジュゲート1ビーズ (方法#2)
D	↓	↓
E	反応液1、PH=7.5	未枯渇27K
F	↓	↓
G	反応液1、PH=8.5	
H	↓	

【0456】

試薬調製：

試薬は全て、使用前に室温（18～25℃）に平衡化させる。使用直前に新鮮な試薬。

1×Diluent M：2 mlの10×Diluent M濃縮物を18 mlの試薬グレード水と1：10希釈した。穏やかに且つ十分に混合する。

1×洗浄緩衝液：4 mlの20×洗浄緩衝液濃縮物を76 mlの試薬グレード水と1：20希釈した。穏やかに且つ十分に混合する。

1×ビオチン化プラスミノーゲン検出抗体：50×ビオチン化プラスミノーゲン抗体バイアルをスピンして底の内容物を収集した。18 μlの50×ストックビオチン化プラスミ

ノーゲン抗体を $882\ \mu\text{L}$ の $1\times\text{Diluent M}$ に加える。穏やかに且つ十分に混合する。

$1\times\text{SP}$ コンジュゲート： $100\times$ ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼコンジュゲート（ SP コンジュゲート）を短時間スピンドウンし、 $9\ \mu\text{L}$ のコンジュゲートを $891\ \mu\text{L}$ の $1\times\text{Diluent M}$ と $1:100$ 希釈した。

実施例 2 に詳述するとおり標準物質を調製した。検量線結果を表 4 にまとめ、及び図 2 に示す。表 5 に示す式が得られた。

【0457】

試料調製：

試料を $1\times\text{Diluent M}$ と段階希釈で $1:20,000$ 希釈した：

a - $1:100$ 血漿 = $5\ \mu\text{L}$ の血漿 + $495\ \mu\text{L}$ $1\times\text{Diluent M}$

b - $1:20,000$ 血漿 = $5\ \mu\text{L}$ の希釈血漿 + $995\ \mu\text{L}$ $1\times\text{Diluent M}$

【0458】

アッセイ手順：

12 - 全ての試薬、ワーキング標準物質及び試料は、指示どおり調製した。試薬は使用前に室温に平衡化した。アッセイは室温（ $18\sim25^\circ\text{C}$ ）で実施した。

13 - 余分なマイクロプレートストリップはプレートフレームから取り外し、中に乾燥剤が入ったフォイル袋に直ちに戻した。水蒸気への曝露を最小限に抑えるためポーチをしっかりと密閉し直し、減圧デシケータに保存した。

14 - 各ウェルにつき $50\ \mu\text{L}$ のプラスミノゲン標準物質又は試料を加えた。ウェルをシールテープで覆い、1時間インキュベートした。タイマーは最後の試料を加えた後に開始した。

15 - $200\ \mu\text{L}$ の $1\times$ 洗浄緩衝液による手作業での 5 回の洗浄。毎回プレートを反転させ、内容物をデカントした（プレートを吸水性のペーパータオル上で 4 回軽く叩く（tapping）ことにより液体を完全に取り除く）。

16 - 各ウェルに $50\ \mu\text{L}$ の $1\times$ ビオチン化プラスミノゲン抗体を加え、1時間インキュベートした。

17 - マイクロプレートを上記に記載されるとおり洗浄。

18 - 各ウェルに $50\ \mu\text{L}$ の $1\times\text{SP}$ コンジュゲートを加え、30分間インキュベートした。マイクロプレートリーダーをオンにし、予めプログラムをセットアップした。

19 - マイクロプレートを上記に記載されるとおり洗浄。

20 - 各ウェルにつき $50\ \mu\text{L}$ の発色基質を加え、約 12 分間又は最適な青色濃度が生じるまでインキュベートした（プレートを穏やかに叩いて十分な混合を確実にし、及びピペット先端でウェル内の気泡をつぶす）。

21 - 各ウェルに $50\ \mu\text{L}$ の停止液を加えた。色が青色から黄色に変化した。

22 - 直ちにマイクロプレートリーダーにおいて $450\ \text{nm}$ の波長で吸光度を読み取った。

【0459】

・ PLG 濃度：

表 5 に詳述される式により試料の濃度及び枯渇パーセンテージを計算した。表 8 に示す。

【0460】

10

20

30

40

50

【表 8】

試料	O.D	ブランク 調整後データ	O.D平均値	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	%枯渇
ブランク	0.081	-0.002	0	0	
	0.084	0.002			
反応液1、 PH=6.5	0.472	0.389	0.389	76.5	63.73%
	0.472	0.389			
反応液2、 PH=7.5	0.486	0.403	0.408	80.12	62.02%
	0.495	0.412			
反応液3、 PH=8.5	0.573	0.49	0.477	73.86	54%
	0.56	0.464			
コンジュゲート1	0.15	0.067	0.0615	13.58	93.56%
	0.138	0.056			
未枯渇 27K血漿	1.059	0.976	0.98	210.96	
	1.067	0.984			

表8: 試料中のPLG濃度

【0461】

未枯渇血漿中のPLG濃度はヒト血漿中のプラスミノゲン濃度の正常範囲より僅かに高いように見える。方法#1を用いて回復させたTXA Superflowビーズとの血漿のインキュベーション後に約24%、方法#2を用いて回復させたビーズとのインキュベーション後には93%超のプラスミノゲンが枯渇した。従って、24%の枯渇のビーズは再び回復させなければならず、93%のビーズはブタ実験に再び使用することができる。PH=6.5又はPH=7.5で合成したTXAコンジュゲートGEビーズは60%超のPLG枯渇を示したが、PH=8.5で合成したものは54%の枯渇を示した。この実験は、反応がPH=6.5でより効率的であることを実証している。今後の実験は、一晩行うか、又は異なるリガンド濃度の反応液で行う。

【0462】

実施例4

ClearPlasmaによる血漿ろ過

- ・ TXA superflow、コンジュゲート1

フィルタ調製:

- 1-フィルタに25mlの樹脂を充填した。
- 2-100mlの70%エタノールをフィルタに流し、30分間インキュベートした。
- 3-70%エタノールで2回洗浄した。
- 4-20%エタノールで3回洗浄した
- 5-4℃で保存した。

【0463】

樹脂活性化:

樹脂をDDWで3回、及び結合緩衝液) 10mMクエン酸ナトリウム+120mM塩化

ナトリウム)で2回洗浄した。

【0464】

血漿ろ過：

ヒト血漿バッグをフィルタに接続し、1時間にわたって全容積(200ml)をフィルタに通して受容バッグに入れた。

【0465】

結果は以下の表9に示す。

【0466】

【表9】

表9. 試料中の枯渇パーセント

試料	OD	ブランク 調整後OD	OD平均値	濃度 (μg/ml)	%枯渇
枯渇血漿	0.293	0.19	0.185	29.22	81.56%
	0.282	0.179			
未処理 血漿	0.868	0.889	0.78	158.52	
	0.765	0.796			

【0467】

表9に示されるとおり、血漿をろ過すると、プラスミノゲンが有効に枯渇した。

【0468】

・ ClearPlasma (商標) 装置 TXAコンジュゲートビーズ及び／又はシクロヘキサンカルボン酸アガロースビーズ=コンジュゲート1。

材料：

－血漿：健常供血者からの血漿は、Magen David Adorn (MDA) 血液バンクから入手した

－ClearPlasma (商標) 装置：3mlパスツールピペットを使用してカートリッジにコンジュゲートシクロヘキサンカルボン酸=コンジュゲート2アガロースビーズを充填した；この樹脂を150mlの生理食塩水で洗浄し、2～8℃で保存した。

－器具：ELISAリーダー：800TS (BioTek)

【0469】

ルアーロックを使用して250mlの量の血漿を装置に接続し、装置に2滴／秒の速度で約30分間流した。枯渇させた血漿は滅菌キャップに収集した。未処理血漿及び枯渇済み血漿からの試料を分析用に取り、残りを－20℃で凍結した。E-80PMG－ヒトプラスミノゲンELISAキット、ロット番号9 (ICL, Inc.) を用いてプラスミノゲン濃度を決定した。

【0470】

【表 10】

表10: 試料中の枯渇パーセント

試料	濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	枯渇 %
未処理血漿 (対照)	172.646	96%
プラスミノゲン枯渇 血漿	7.07	

10

【0471】

上述のClearPlasma（商標）装置によるろ過後に、血漿から96%超のPEGが除去されたように見える。

【0472】

実施例 5

ClearPlasmaを使用することによるクリオプレシピテートからのプラスミノゲンレベルの枯渇におけるClear Plasma有効性の判定

20

クリオプレシピテートは、一般には出血及び詳細には大量出血の治療に用いられる重要な血液製剤である。従って、ClearPlasma装置がクリオプレシピテートからプラスミノゲンを枯渇させる能力を判定した。

【0473】

材料：

a. ClearPlasma：プラスチックフィルタ（Pentracor Inc.）、TXAコンジュゲートSuperflow樹脂（Sterogene；ロット：1608:88）、流量調整弁付き延長ライン（Qosina；ロット：159299）、採血バッグ（Fresenius；ロット：FA17H30126）。

b. 備品：

i. シェーカー：カタログ番号KRS-3016；製造番号：SH30000003；製造者：MRC。

30

ii. ELISAリーダー：カタログ番号800TS；製造番号：1709201B；製造者：Bio Tek

iii. 遠心機：カタログ番号Z383K；製造番号：31030005；製造者：HERMLE.a.

c. クリオプレシピテート：クリオプレシピテートは、Hadassah血液バンクから入手した（付録1にクリオプレシピテートの詳細）。（Y 2002 18 170007 O Rh陽性）

【0474】

この実験は、実験手順の記載に従って行った。データは、ClearPlasmaを通じたクリオプレシピテート単位（29ml）のシングルパスにより、凝固因子には何ら効果を及ぼすことなく、クリオプレシピテートのプラスミノゲン濃度が155.87から2.7 $\mu\text{g/ml}$ へと減少し、即ち約98%の減少であったことを示す（図3を参照）。従ってClearPlasma装置は、クリオプレシピテートからプラスミノゲンを枯渇させるための使用に好適である。クリオプレシピテートからプラスミノゲンを枯渇させると、出血病態の治療能力が向上した新規製剤が提供される。

40

【0475】

実施例 6

インビボでの活性プラスミノゲン濃度の判定

簡潔に言えば、健常ボランティアから新鮮血を採取した。50 μl のtPA（6 μM ）又は通常生理食塩水（NS）を1.8mlの新鮮血に加え、Hemochron 401機器を使用して凝固時間を決定した。並行実験では、50 μl のtPA（6 μM ）又はNSを1.8

50

ml プラスミノージェンフリー血漿に加えた。

【0476】

本明細書に開示される主題のコンジュゲートの効果を判定するため、2つのパラメータを評価した。凝固時間、及び全凝血塊溶解時間。

【0477】

凝固時間

凝固時間は活性プラスミノージェン濃度に反比例した。

【0478】

対照血液では、凝固時間は 113 ± 27 秒 ($n = 7$) であり、ここで tPA と共に処理した血液では、これは 255 ± 41 秒 ($n = 8$) であった。プラスミノージェン枯渇血液では、tPA の非存在下での凝固時間は 110 ± 16 ($n = 6$) であり、ここで tPA の存在下ではこれは 118 ± 18 ($n = 7$) であった。

【0479】

全凝血塊溶解時間

単純な観察によって、及び凝血塊を含むチューブを機械に再挿入することにより、凝血塊の存在を決定した。

【0480】

14 ± 5 、2分後 ($n = 6$)、tPA で処理した対照血液からは凝血塊が消失した。対照的に、NS で処理した対照血液では、完全な凝血塊形成後2時間の時点で凝血塊はインタクトであった。

【0481】

tPA 含有又は不含のプラスミノージェン枯渇血液では、完全な凝血塊形成後2時間の時点で凝血塊はインタクトであった。これらの結果は、本明細書に開示される主題のコンジュゲートの有効性を明確に実証している。

【0482】

実施例7

肝裂傷ブタモデルにおける血漿アフェレーシスの有効性の評価

この研究は、ClearPlasma (商標) の使用及び通常血漿と比較したときプラスミノージェンが減少した血漿の有益性を調べることを目標とした。本研究は、Biotechfarm Ltd. (イスラエル) で実施された。

【0483】

目的

目的は、ブタ肝裂傷モデルにおいて失血に対する PDP 投与の有効性を評価することであった。

【0484】

研究エンドポイント

4cm の肝裂傷後30分で失血を測定し、以下に提示するグレード評価スキームにより判定した。

【0485】

【表11】

表11: ブタ肝裂傷モデルにおける出血グレード評価スキーム

カテゴリ	最小限の出血	中等度の出血	大量の出血
失血量	0 ~ 100 ml	100 ~ 300 ml	X > 300 ml

【0486】

研究期間

各ブタにつき8 ~ 9時間

【0487】

研究デザイン

14匹の雌の飼育ブタを4群に割り付けた（対照、通常の血漿、ClearPlasma（商標）及びTXA）

【0488】

各群を以下のとおり治療した。

【0489】

対照群1：

1. 全身麻酔の導入
2. 90分間にわたる血漿採取
3. 血漿採取の終了後30分における肝裂傷の導入
4. 肝裂傷の導入後30分における腹壁及び皮膚の縫合

10

【0490】

対照群2：

1. 全身麻酔の導入
2. 血漿採取の終了後30分における肝裂傷の導入
3. 肝裂傷の導入後30分における腹壁及び皮膚の縫合

【0491】

対照群3：

1. 全身麻酔の導入
2. TXAによる治療
3. 血漿採取の終了後30分における肝裂傷の導入
4. 肝裂傷の導入後30分における腹壁及び皮膚の縫合

20

【0492】

試験群：

1. 全身麻酔の導入
2. 90分間にわたる血漿採取－ClearPlasma（商標）によるろ過（試験装置群）
3. 血漿採取の終了後30分における肝裂傷の導入
4. 肝裂傷の導入後30分における腹壁及び皮膚の縫合

【0493】

30

40

50

【表 1 2】

表12: 動物の割付け(ブタ肝裂傷研究)

実験番号	動物番号	治療
1	143	通常の血漿
	144	PDP
2	145	通常の血漿
	146	PDP
	147	TXA
3	152	PDP
	153	TXA
	156	通常の血漿
4	155	PDP
	157	通常の血漿
5	169	通常の血漿
	170	TXA
	172	PDP
	173	対照

通常の血漿 = 新鮮凍結血漿(FFP); PDP(プラスミノーゲン枯渇血漿) = ClearPlasma™によってプラスミノーゲンが除去されたFFP; TXA = トラネキサム酸

【 0 4 9 4】

研究手順

1. 麻酔の導入前にブプレノルフィンを投与した。
2. 麻酔 - 動物をケタミン、キシラジン及びアトロピンで鎮静させ、次に気管内チューブを挿管した；酸素中のイソフルランで麻酔を維持した。
3. 血管アクセスのためアクセス可能な耳静脈にカテーテルを留置した。
4. 血漿採取適用のため各頸静脈に中心静脈カニューレ（CVC）を導入した。
5. 血漿を90分の間採取した。その後、ClearPlasma（商標）有り又は無しでの血漿輸血を実施した。
6. 血漿採取の30分後、以下のとおり肝裂傷モデルを導入した：
 - － ブタを仰臥位に置いた。
 - － 腹部領域の刈毛及びスクラブ洗浄を実施した。
 - － 正中切開を設けた。
 - － 肝右葉を露出させて体外に出し、十分な作業域を確保した後、生理食塩水でリンスした。
 - － 4 cm（長さ）、1 cm間隔及び0.5 cm深さの格子パターンの裂傷を設けた（肝臓片を秤量した）。
7. 乾燥したスポンジとモデル導入後の血の付いたスポンジとの重量差を決定することにより、失血を測定した。重量差は、グラム単位の失血として表した。
8. 適用可能な場合、止血までの時間（TTH）を測定した。
9. 裂傷の導入から30分後、腹壁及び皮膚を縫合した。

【 0 4 9 5】

生理学的パラメータのモニタリング

血漿採取適用前（ベースライン）、採取適用の直後、肝裂傷の導入直前、出血中及び皮膚

縫合直後：

- － 食道温度、
- － 平均動脈圧、
- － 心拍数、
- － 酸素飽和度、
- － 活性化凝固時間、
- － C B C 用血液試料、
- － プロトロンビン時間（P T）及び部分トロンボプラスチン時間（P T T）を含めた、血液学、生化学及び凝固パラメータ。

血漿採取適用前（ベースライン）、肝裂傷の導入後 3 0 分（縫合直前）及び研究終了時（縫合後 5 時間）：

- － 臨床徴候の詳細：麻酔からの回復後

血漿アフエレーシス適用前：

- － 体重

【0 4 9 6】

支持療法

回復中、動物は皮膚を温めるブランケットに置いた。

【0 4 9 7】

安楽死

動物は縫合後 5 時間で犠牲にした。注記：肝裂傷の導入から 6 0 分後（即ち、縫合直前）に出血が続く 2 匹の動物は、人道的見地から安楽死させた。

【0 4 9 8】

臨床観察方法

行動的属性としては、限定はされないが、以下が挙げられる：

- 1．血液、尿及び糞便の排出、尿の変色（該当する場合）、下痢、糞便がないこと（便秘）。
- 2．病気又は傷害の徴候、嗜眠、嘔吐、唾液分泌過剰、姿勢異常、疼痛、跛行、不快感、動こうとしないこと又は動けないこと。
- 3．神経学的重症度スコア（N S S）
- 4．臨床観察に基づき必要な場合は常に、更なる評価を実施した。

【0 4 9 9】

備品

Haemonetics MCS（登録商標）+、シリンジ、針及び手術用ガラス備品、血圧計、酸素計。装置又は非経口注射アセンブリの洗浄及びリンス用の希釈剤及び溶液は全て、それらの無菌性、パiroジェンフリー及び汚染からの保護が確実となる方法で処理した。

【0 5 0 0】

結果

全ての実験において、ブタはHaemonetics MCS（登録商標）+システムを使用した血漿採取を受けた。図 4 に記載されるとおり、全血を採取し、遠心し、直ちに赤血球をブタに返血し、及び最高 7 0 0 m l の血漿を採取し、ClearPlasma（商標）を使用してろ過するか（試験群について）、又はろ過しなかった（対照群について）。ブタは麻酔下に置き、及び静脈からの血液を採取して血漿アフエレーシスシステムに導入した。次に赤血球を動物に返血し、試験群動物ではClearPlasma（商標）によって血漿をろ過し、動物に返血した。各ブタから得られた詳細な結果を表 1 3 に詳述する。

【0 5 0 1】

10

20

30

40

50

【表 1 3】

表13: プタ肝裂傷実験のパラメータ詳細。

実験番号	ブタ 番号 (♀)	体重 (kg)	治療	抗凝固薬 クエン酸塩 デキストロース 溶液配合 (ml)	血液 採取 (ml)	血漿 採取 (ml)	出血 時間 (分)	出血量 (g/ml)	肝臓 切断 サイズ (g)
1	143	38.8	通常の 血漿	189	2186	613	30	406	12
	144	39.1	PDP	185	2431	684	23	150	20
2	145	41.7	通常の 血漿	195	2205	312	30	436	22
	146	40.6	PDP	195	2238	700	30	180	20
	147	40.2	TXA(1g ブースト 及び35mg /時間の 維持)	0	0	0	12	138	18
3	152	39.4	PDP	203	2577	702	30	430	26
	153	37.4	TXA (1gr ブースト 及び35mg /時間の 維持)	0	0	0	21	206	28
	156	36	通常の 血漿	202	1300	350	30	530	32
4	155	35.4	PDP	157	2093	750	18	226	20
	157	37.6	通常の 血漿	167	2581	700	28.5	498	22
5	169	40	通常の 血漿	201	1976	415	18	226	26

【 0 5 0 2】

10

20

30

40

50

【表 1 4】

	170	40	TXA (1gr ブースト 及び35mg /時間の 維持)	0	0	0	23	158	18
	172	40	PDP	202	2500	650	15	108	24
	173	40	対照 (未治療)	0	0	0	22	146	26

略語: trea. (治療)、amou. (量)、bleed. (出血)、Bl. (血液)、Hi (高い)、liv. (肝臓)、gr. (グラム)、
exp. (実験)、We. (重量)、anticoag. (抗凝固薬)、sol. (溶液、form (配合)、coll. (採取)、dura. (時間)、
si. (サイズ)。

通常の血漿 = 新鮮凍結血漿(FFP); PDP (プラスミノージェン枯渇血漿) = ClearPlasma™によって
プラスミノージェンが除去されたFFP; TXA =トラネキサム酸

【0 5 0 3】

実験 1: ブタ 1 4 4 からの血漿はClearPlasma (商標) を使用してろ過し、ブタ 1 4 4
に返血した。ブタ 1 4 3 からの血漿はモックろ過後にブタ 1 4 3 に輸血した。次に 4 c m
肝臓切断を実施し、血液量及び出血時間を記録した。この実験は、プラスミノージェンレベ
ルを枯渇させると出血量が減少することを示している。対照ブタでは肝臓切断サイズがよ
り小さかったことはあるにしても、出血は P D P を受けたブタの方が多かった。加えて、
臨床判定が向上し、対照ブタの脈拍は、P D P を受けたブタと比較したときより高く、不
安定であった。

【0 5 0 4】

実験 2: 通常の血漿及び T X A と比較したときの P D P の効果。3 匹のブタを以下のと
おり試験した: ブタ 1 4 5 は通常の血漿で治療し、ブタ 1 4 6 はプラスミノージェン枯渇血
漿で治療し、及びブタ 1 4 7 はトラネキサム酸 (T X A) で治療した。結果は、通常の血
漿と比較したとき P D P が出血量を減少させることを実証している。加えて、通常の血漿
と比較したとき T X A との間で出血量に僅かな差があった。

【0 5 0 5】

実験 3: 通常の血漿及び T X A と比較したときの P D P の効果。結果は、通常の血漿と
比較したとき P D P が出血量を減少させることを実証している。

【0 5 0 6】

実験 4: 通常の血漿及び T X A と比較したときの P D P の効果。結果は、通常の血漿と
比較したとき P D P が出血量を減少させることを実証している。

【0 5 0 7】

実験 5: P D P を投与したブタにおける肝臓切断後の出血の減少。材料及び方法の節に
記載されるとおりブタを麻酔し、血漿を採取した。ブタを通常の血漿、P D P、T X A 1
6 m g / k g で治療するか、又は未治療とした。次に、材料及び方法の節に記載されると
おり、メスを使用して 4 c m 肝臓切断を行った。結果は、通常の血漿と比較したとき P D
P が出血量を減少させることを実証している。

【0508】

図5は、肝裂傷後30分の間に見られたとおりの失血量を示す。図5を見ると分かるとおり、ClearPlasmaを使用すると、通常の血漿の投与を受けたブタとの比較で出血量が約50%超減少する。

【0509】

プラスミノゲン及びtPAなどの線溶タンパク質活性の低下を検証するため、トロンボエラストグラフィー（TEG）を実施した（図6A～図6Lを参照）。（TEG）は、血液凝固効率を試験する方法である。ブタに番号を付した：169番－対照、172番－血漿アフエーシス及びプラスミノゲン枯渇；173番－血漿アフエーシスのみ。図6Jを見ると分かるとおり、ブタ172番においてのみ、tPA投与後に線溶反応がなかった。この結果は、プラスミノゲン及びtPAなどの線溶タンパク質の有意な減少を実証している。

10

【0510】

結論として、全ての実験でClearPlasma（商標）の使用により、通常の血漿輸血を受けたブタと比較したとき臨床アウトカムが有意に改善し、ブタが失う血液の量が減少した。

【0511】

実施例8

ブタ肝裂傷モデルにおけるクレキサン治療下の動物の失血に対するプラスミノゲン枯渇血漿の投与の安全性評価

本研究は、Biotechfarm Ltd.（イスラエル）で実施された。

20

【0512】

目的

ブタ肝裂傷モデルにおける失血に対するプラスミノゲン枯渇血漿の投与の安全性評価。抗凝固薬による治療下の動物におけるプラスミノゲン枯渇の効果を調べる。血液希釈剤療法（クレキサン）を受けている患者において血栓塞栓性合併症の発症リスクがないことを提供すること。

【0513】

研究エンドポイント

4CM肝裂傷後30分で失血を測定した。

【0514】

30

研究デザイン

本研究では、クレキサン治療下の動物において線溶タンパク質が減少した血漿と通常の血漿とを比較することにより、PDPによる治療が深部静脈血栓症（DVT）の発症につながらないことを確認した。

種及び性別：飼育雌ブタ、試験開始時40～50kg

群の数：4群（3つの対照群及び1つの試験装置群）

群サイズ：対照群についてn=5匹（雌）；試験装置群についてn=5匹（雌）

動物の総数：20匹

【0515】

群及び投与の構成：

40

対照群1：1. 未治療の対照：全身麻酔の導入 2. 90分間にわたる血漿採取。3. 血漿採取の終了後30分における肝裂傷の導入 4. 肝裂傷の導入後30分における腹壁及び皮膚の縫合。

【0516】

対照群2：1. 4000単位のクレキサン：手術の10時間前にブタに4000単位のクレキサンを注射した。2. 全身麻酔の導入 3. 血漿採取の終了後30分における肝裂傷の導入 4. 肝裂傷の導入後30分における腹壁及び皮膚の縫合。

【0517】

対照群3：1. 新鮮血漿及び4000単位のクレキサン：手術の10時間前にブタに4000単位のクレキサンを注射した。2. 全身麻酔の導入 3. TXAによる治療 4. 血

50

漿採取の終了後30分における肝裂傷の導入 5. 肝裂傷の導入後30分における腹壁及び皮膚の縫合。

【0518】

試験群：1. プラスミノゲン枯渇血漿及び4000単位のクレキサン：手術の10時間前にブタに4000単位のクレキサンを注射した。2. 全身麻酔の導入 3. 90分間にわたる血漿採取—ClearPlasma（商標）によるろ過（試験装置群）。4. 血漿採取の終了後30分における肝裂傷の導入。5. 肝裂傷の導入後30分における腹壁及び皮膚の縫合

【0519】

研究手順

PDP又は通常の血漿による治療の10時間前に、クレキサン（Clexane（登録商標））シリンジ、プレフィルドシリンジ中の注射用4,000IU（40mg）／0.4mL溶液をブタに静脈内（IV）注射した。鎮痛：ブプレノルフィン；麻酔：動物をケタミン、キシラジン及びアトロピンで鎮静させ、次に気管内チューブを挿管し、酸素中のイソフルランによって麻酔を維持した。

【0520】

アクセス可能な耳静脈に血管アクセス用のカテーテルを留置した。血漿採取適用のため各頸静脈に中心静脈カニューレ（CVC）を導入した。

【0521】

90分の期間中に採取される血漿。この血漿をClearPlasma（商標）による処理後又は処理なしで輸血した。

【0522】

血漿採取の適用から30分後、以下のとおり肝裂傷を導入した：

- ブタを仰臥位に置いた、
- 腹部領域の刈毛及びスクラブ洗浄、
- 正中切開を設けた、
- 肝右葉を露出させて体外に出し、十分な作業域を確保し、生理食塩水でリンスした、
- 4cm（長さ）、1cm間隔及び0.5cm深さの格子パターンの裂傷を設け、肝臓片を秤量した、

モデル導入後に乾燥したスポンジと血の付いたスポンジとの重量差を決定することにより、失血を測定した。重量差はグラム単位の失血として表した。該当する場合、止血までの時間（TTH）を測定した。

裂傷の導入から30分後、腹部を縫合し、次に皮膚を縫合した。

【0523】

生理学的パラメータのモニタリング：

血漿採取適用前：

ベースライン、採取適用直後、肝裂傷の導入直前、出血中及び皮膚の縫合直後
食道温度、平均動脈圧、心拍数、酸素飽和度、活性化凝固時間 CBCに関する血液試料
プロトロンビン時間（PT）及び部分トロンボプラスチン時間（PTT）を含めた、血液学、生化学及び凝固パラメータ：血漿採取適用前—ベースライン、肝裂傷導入後30分（縫合直前）及び研究終了時、縫合後5時間

臨床徴候の詳細：麻酔からの回復後

体重：1回、血漿アフエレーシス適用前

【0524】

支持療法：麻酔の導入前にブプレノルフィンを投与した。回復中、動物は皮膚を温めるブランケットに置いた。

【0525】

終末調査：動物は縫合後5時間で犠牲にした。注記：肝裂傷の導入後（即ち、縫合直前）60分を超える持続的出血のある動物はいずれも、人道的見地から安楽死させた

【0526】

研究期間：各ブタにつき8～9時間

10

20

30

40

50

【0527】

臨床観察方法：行動的属性としては、限定はされないが、以下が挙げられる：1．血液、尿及び糞便の排出、尿の変色（該当する場合）、下痢、糞便がないこと（便秘）。2．病気又は傷害の徴候、嗜眠、嘔吐、唾液分泌過剰、姿勢異常、疼痛、跛行、不快感、動こうとしないこと又は動けないこと。3．神経学的重症度スコア（NSS）4．臨床観察に基づき必要な場合は常に、更なる評価を実施した。

【0528】

機器：Haemonetics MCS（登録商標）+、シリンジ、針及び手術用ガラス備品、血圧計、酸素計。装置又は非経口注射アセンブリの洗浄及びリンス用の希釈剤及び溶液は全て、それらの無菌性及びパイロジェンフリーが確実となる方法で処理した。全ての試液が汚染から保護されることを確実にする。

10

【0529】

全ての実験において、ブタはHaemonetics MCS（登録商標）+システムを使用した血漿採取を受けた。図5に記載されるとおり、全血を採取し、遠心し、直ちに赤血球をブタに返血し、及び最高700mlの血漿を採取してろ過するか、又はClearPlasma（商標）を使用しなかった。ブタは麻酔下に置き、静脈からの血液を採取して血漿アフェレーシスシステムに導入した。これに続き、赤血球を動物に返血し、ClearPlasma（商標）によって血漿をろ過し、最後に動物に返血した。

【0530】

結果：

20

【0531】

30

40

50

【表 15】

表14: プタ38番及び171番の安全性評価結果

プタ 番号 (♀)	体重 /KG	治療	抗凝固薬 クエン酸塩 デキストロース 溶液配合(ml)	血液 採取 (ml)	血漿採取 (ml)	出血 時間 (分)	出血量 (gr./ml)	肝臓 切断 サイズ、 gr.	臨床 イベント
38	42	新鮮血漿 及び 4000 単位の クレキサン	295	2562	676	25	178	16	高血圧
171	45	プラス ミノーゲン 枯渴血漿 及び 4000 単位の クレキサン	282	2811	690	36	144	16	正常

略語: trea. (治療)、amou. (量)、bleed. (出血)、Bl. (血液)、Hi (高い)、Nor. (正常)、eve. (イベント)、liv. (肝臓)、gr. (グラム)、We. (重量)、anticoag. (抗凝固薬)、sol. (溶液)、form(配合)、coll. (採取)、si. (サイズ)、T(時間)、clin. (臨床)。

【 0 5 3 2 】

10

20

30

40

50

【表 1 6】

表15: プタ202番、204番、203番及び208番の安全性評価結果

プタ 番号 (♀)	体重 /KG	治療	抗凝固薬 クエン酸塩 デキストロース (extrose) 溶液配合(ml)	血液 採取 (ml)	血漿 採取 (ml)	出血 時間 (分)	出血量 (gr./ml)	肝臓 切断 サイズ、 gr.	臨床 イベント
202	41	対照 (未治療)	0	0	0	26	138	22	正常
204	42	4000単位の クレキサン	0	0	0	30	300	18	高血圧
203	40	新鮮血漿 及び 4000単位の クレキサン	307	2441	710	30	544	20	ほぼ 死亡
208	42	プラス ミノゲン 枯渇血漿 及び 4000単位の クレキサン	320	2534	729	26	148	20	正常

略語: trea. (治療)、anticoag. (抗凝固薬)、num. (番号)、form. (配合)、coll. (採取)、T. (時間)、
bleed. (出血)、Bl. (血液)、Hi (高い)、Nor. (正常)、clin. (臨床)、press. (圧力)、gr. (グラム)、sol. (溶液)、
si. (サイズ)、plas. (血漿)、liv. (肝臓)、eve. (イベント)、dia. (死亡)、alm. (ほぼ)。

【 0 5 3 3 】

10

20

30

40

50

【表 17】

表16: プタ223番、222番、224番及び220番の安全性評価結果

プタ 番号 (♀)	体重 /KG	治療	抗凝固薬 クエン酸塩 デキストロース 溶液配合 (ml)	血液採取 (ml)	血漿 採取 (ml)	出血時間 (分)	出血量 (gr./ml)	肝臓 切断 サイズ (gr.)	臨床 イベント
223	24	対照 (未治療)	0	0	0	25	80	18	正常
222	43	4000 単位の クレキサン	0	0	0	28	194	18	正常
224	45	新鮮 血漿 及び 4000 単位の クレキサン	160	1926	530	25	594	18	ほぼ 死亡 高圧 及び 血圧
220	44	プラス ミノーゲン 枯渇血漿 及び 4000 単位の クレキサン	167	2106	550	21	94	22	正常

略語: trea. (治療)、anticoag. (抗凝固薬)、num. (番号)、form. (配合)、coll. (採取された)、T. (時間)、bleed. (出血)、Bl. (血液)、Hi (高い)、Nor. (正常)、clin. (臨床)、eve. (イベント)、press. (圧力)、gr. (グラム)、plasm (血漿)、plas (プラスミノーゲン)、dep. (枯渇した)、clx. (クレキサン)、un-treat (未治療)、sol. (溶液)、si. (サイズ)、plas. (血漿)、liv. (肝臓)、eve. (イベント)、dea. (死亡)、alm. (ほぼ)。

【0534】

予想どおり、動物をクレキサンで治療すると、溢血 (extraverted blood) の量が 187 c c から 274 c c へと大幅に増加した。データはまた、動物の 1 単位の新鮮血漿 (F P) を投与すると、出血が 274 c c から 596 c c へと増加したことも示している。更に、その F P からプラスミノーゲンを枯渇させると、596 c c から 128.7 c c へと出血規模が低下した。

【0535】

死後データは、P D P で治療した動物が血栓性又は血栓塞栓性イベントを生じないことを示している。P D P で治療した動物の肺、心臓又は脾臓に凝血塊は認められなかった。

血栓塞栓性イベントがないことに関する結論は、PDPで治療された動物にD-ダイマーがないことによって更に裏付けられる。

【0536】

このデータは、クレキサンによる治療下の動物であってもプラスミノゲン枯渇血漿が有効な抗出血治療であることを示している。このデータはまた、クレキサンによる治療下の動物であってもプラスミノゲンPDPが有効であることも示している。従って、抗凝固薬による治療下にあつて緊急手術を受ける必要のある患者において、PDPは良好な解決法となり得る。このデータはまた、PDPによる治療下の患者を出血が増加するリスクなしにクレキサンで治療し得ることも示唆している；かかる結論は、術後期にDVTを防止又は治療するため抗凝固薬で治療する必要がある患者に適切である。このデータはまた、患者をクレキサンとPDPとによって同時治療し、それにより出血イベントと血栓イベントとを同時に防止可能であることも示している。

【0537】

実施例9

FFPと比較したプラスミノゲン枯渇血漿（PDP）インビトロ特性

プラスミノゲン枯渇血漿（PDP）及び新鮮凍結血漿（FFP）の凝固パラメータを実験手順に従い計算し、表17に詳述するとおり比較した。215mLの容積の新鮮凍結血漿（FFP）をClearPlasmaに流した（表17においてPDPと表示される；未処理血漿に関するFFPと対照となす）。PDP中最大80%のPLGが枯渇したように見える。

【0538】

【表18】

表17: FFPと比較したPDPの凝固パラメータ。

パラメータ	単位		FFP	PDP	P値
プラスミノゲン	μg/mL		155.41	33.06	P<0.01
PTT	秒		34.82	32.56	N/S
フィブリノーゲン	mg/dl		360.2	317.8	N/S

【0539】

実験は全てトリプリケートで行った。統計量はスチューデントt検定（両側分布等分散）を用いて計算した。

【0540】

加えて、特定の血液成分に関する複数の試験を実施して、処理済み及び未処理血漿の凝固及び生化学的状態を決定した（栄養素及びタンパク質含量（content）の検査）。この試験は、Bnay-zionの血液学及び生化学研究所において実施された。結果を表18に示す。FFPとPDPとの間に生化学的パラメータの有意な差はなく、従ってClearPlasmaは栄養素及び／又はレベルタンパク質含量に影響を及ぼさなかったように見える。

【0541】

10

20

30

40

50

【表 19】

表18: FFPと比較したPDPの生化学的パラメータ。

パラメータ	単位	FFP	PDP	P値
グルコース	mg/dL	384.00	341.80	N/S
アルカリ ホスファターゼ	U/L	51.20	46.4	N/S
アラニン トランスアミナーゼ	U/L	10.80	10.40	N/S
アミラーゼ	U/L	54.00	48.60	N/S
アスパラギン酸 トランスアミナーゼ	U/L	16.60	15.40	N/S
γグルタミル トランス フェラーゼ	U/L	9.40	9.60	N/S
乳酸 デヒドロゲナーゼ	U/L	290.20	254.00	N/S
ナトリウム	mmol/L	168.6	162.8	N/S
塩化物	mmol/L	73.06	74.68	N/S
全タンパク質	g/dL	6.37	5.89	N/S
グロブリン	g/dL	2.33	2.30	N/S
尿素	mg/del	22.80	19.80	N/S

【0542】

実験は全てトリプリケートで行った。統計量はスチューデントt検定（両側分布等分散）を用いて計算した

【0543】

凝血塊に加え、実験手順の節に詳述するとおり、P P D及びF F Dの両方における溶解をトロンボエラストグラフィー（T E G）によってモニタした。結果を図7に示す。P D Pはヒト血漿中の線溶活性を消失させたように見える。

【0544】

実施例10

マウス安全性実験－尾出血アッセイにおける抗線溶技術の判定

本研究はBiocell Ltd.（イスラエル）において実施された。

【0545】

目的

この実験の目的は、マウスにおけるプラスミノーゲン不含血漿の静脈内注射の安全性を調べることである。

【0546】

研究エンドポイント

血液マーカー（血球数、生化学）及び臨床観察（皮膚、毛、眼／粘膜の検査、神経系、身体活動及び一般行動）によってプラスミノゲン枯渇血漿の安全性を判定した。これらのパラメータは、注射前、注射後48時間及び注射後7日に測定した。

【0547】

動物

12匹の動物

種／系統：マウス：C57ブラック

性別／匹数／年齢：雄10～12週齢

供給元：Harlan Laboratories、イスラエル

【0548】

倫理委員会

本研究は、「イスラエル動物実験委員会（Israel Board for Animal Experiments）」による承認後に、「イスラエル動物福祉法（Israel Animal Welfare Act）」に準拠して実施した。

【0549】

研究デザイン

この実験では、各マウスに治療のうちの1つの200 μ lを注射した。

1. 健常な12週齢C57ブラックマウスをケタミンとキシラジンとの混合物（それぞれ100及び10mg/kg）で麻酔し、その体重を測定した。

2. マウスを3つの異なる群（各群4匹のマウス）に無作為に分け、200 μ lの以下を注射した：

1. 生理食塩水－群1

2. 通常の血漿－群2

3. プラスミノゲン不含血漿－群3（C57ブラックマウス由来の、ClearPlasma（商標）によってろ過した血漿）。

3. 注射の48時間後、各群から2匹のマウスを犠牲にし、この注射の安全性を判定した；採血のためEDTA K3チューブに血液を採取し、血液検査に回した（4℃）。

4. 7日後、各群から2匹のマウスを犠牲にし、この注射の安全性を判定した；採血のためEDTA K3チューブに血液を採取し、血液検査に回した（4℃）。

5. 血球数（CBC）、LDH、AGT、ALT及び完全生化学分析に関してマウス血液を検査した。

【0550】

生理学的マーカーは、プラスミノゲン枯渇血漿の静脈内注射がマウス生理学に影響を及ぼさなかったことを実証している。全血球計算（CBC）、血液生化学、体重、形態学的外観及び動物行動を調べ、全ての群で正常であることが分かった。従って、この実験の結果によれば、プラスミノゲン枯渇血漿の使用は安全であるように見える。

【0551】

マウスにおける出血試験

プラスミノゲン枯渇もまたマウスにおいて実施した：C57ブラックマウス由来の血漿をClearPlasmaに供した（対照血漿は処理しなかった）。次にプラスミノゲンレベルをEliza [キット：ab198511-Plasminogen Total (PLG) マウスELISAキット] によって判定しており、97%のプラスミノゲンの枯渇を示す（以下の表に示すとおり）。

【0552】

10

20

30

40

50

【表 2 0】

表19:

- 試料中のPLG濃度:

	希釈係数	O.D	平均値	ブランクなし	*濃度 ($\mu\text{g/ml}$)
処理済み血漿	10^4	0.249	0.238	0.0365	4.1
	10^4	0.227			
未処理血漿	10^4	1.044	0.937	0.7355	118
	10^4	0.83			

10

【0 5 5 3】

マウスにおける尾切断後の出血試験は、実験手順の節に記載される手順に従い実施した。この非 G L P 研究は、ClearPlasma（商標）装置の使用及び通常の血漿と比較したときの、プラスミノージェンが減少した血漿の有益性を調べることを目標とした。本研究はBiocell Ltd.（イスラエル）において実施された。

【0 5 5 4】

目的

20

P D P がマウスの出血速度に及ぼす効果を試験すること。

【0 5 5 5】

研究エンドポイント

以下の標準的なグレード評価スキームを用いて失われた血液の量をグレード評価した：

【0 5 5 6】

【表 2 1】

表20: 尾出血アッセイモデルにおける出血グレード評価スキーム

カテゴリ	最小限の出血	中等度の出血	大量の出血
失血量	0～1 ml	1～3 ml	X>3 ml

30

【0 5 5 7】

簡潔に言えば、マウスに生理食塩水又は未処理血漿（F F P）又はプラスミノージェンを欠いている血漿（処理済み血漿又は P D P）を注射した。動物を腹臥位に置いた。尾の遠位 1 0 mm 部分をメスで切断した。この尾は、水浴で 3 7 °C に予め温めた等張生理食塩水が入った 5 0 m L チューブに直ちに浸した。尾の向きは垂直とし、先端を体の水平面の約 2 c m 下に位置させた。各動物を 2 0 分間モニタした（出血が止まった場合であっても、可能性のある再出血イベントを検出するため）。

40

【0 5 5 8】

出血時間

参加マウスの尾を 7 mm のところで切り取り、出血が止まるまでの時間を測定した。この試験は、反復毎に各治療群から 1 匹のマウスとして 3 群で行った。結果は、2 番を除くこの試験の反復全てにおいて、P D P マウスが最も短い出血時間であったことを示している。

【0 5 5 9】

出血量

マウスの尾を 7 mm のところで切り取り、出血が止まるまでの時間を測定した。この試

50

験は、反復毎に各治療群から1匹のマウスとして3群で行った。血液を採取し、遠心し、定規を使用してサイズを測定した。結果は、2番を除くこの試験の反復全てにおいて、PDPマウスが最も少ない出血量であったことを示している（図8を参照）。

【0560】

出血試験後24時間における血液細胞ペレットサイズ

出血試験からの血液細胞ペレットを遠心し、上清を吸引した。次に定規を用いてペレットサイズを測定した。統計量は、一元配置ANOVAの後に事後LSD/SHELF ($p < 0.05$ を有意と見なす)を用いて計算した。図9は、各マウスからのペレットサイズ結果を示す。図10は、ペレットサイズ測定値の統計的分析を要約する。PDPはマウスにおいて出血を40%超減少させるように見える。これらの結果は、PDP (ClearPlasma (商標)) が、それで治療されたマウスにおいて、対照群と比較したとき出血時間及び失血量を減らすことを実証している。

10

【0561】

実施例11

ClearPlasmaはブタにおいてプラスミノゲン及びtPAタンパク質の両方のレベルを低下させる

雌ブタが麻酔下でHaemonetics mcs+システムを用いた血漿アフエーシスを受けた。2群のブタ：対照群及び試験群を調べた。試験群では、ブタの血漿をClearPlasmaでろ過した。両群に同様の手順を行い、即ち、ろ過した血液の量：700ml、抗凝固薬による治療 [抗凝固薬クエン酸塩デキストロース溶液配合a]、時間：約100分及び2500の量の血液を進めた (ml)：約700の血漿が採取された。これらの手順後、血漿を動物に返血した。

20

【0562】

プラスミノゲン枯渇 (ELISAキット：ab108893ヒトプラスミノゲン、実験手順の節に詳述するとおり) 及びtPA枯渇 (野生型tPAサンドイッチELISA # Technozym T-PA AG EDTA Elisa Kit 96 TC12007) に関して各群の血漿試料を分析した。図11A～図11Bに示すとおり、ClearPlasmaでろ過した血漿の試料はプラスミノゲン及びtPAの両方が枯渇したように見える。

【0563】

実施例12

血漿pH及び伝導率

目的

PDPと供血血漿とのpH及び伝導率を比較すること。

【0564】

材料

血漿：健常供血者からの血漿

最終滅菌したClearPlasma (商標) 装置

器具：pH計、導電率計

【0565】

ヒト血漿が入ったバッグをClearPlasma (商標) 装置に接続し、1時間にわたって全容積 (200ml) を装置に通して受容バッグに入れた。PDP及び血漿のpH及び伝導率を測定した。表21に詳述するとおり、血漿をClearPlasma (商標) 装置で処理した後に、pH値及び伝導率値の僅かな変化が認められた。

40

【0566】

50

【表 2 2】

表21: 処理済み及び未処理血漿のpH及び伝導率の比較

血漿	工程	pH	伝導率(μS/cm)
血漿	ろ過前	7.86	13.14
	ろ過後	7.88	12.44

【0 5 6 7】

10

実施例 1 3

安全性関連分析

・ 血液適合性

最終滅菌したClearPlasma（商標）装置（ポリカーボネートハウジングに入った多糖ポリマーの粒子）はインビトロ溶血試験：全血ヘモグロビン濃度測定（シアンメトヘモグロビン法）で試験されている。この試験はEnvigo（イスラエル）によって実施された。本研究は、OECD優良試験所基準（GLP）原則（1997年に改訂されたとおり）、ENV/MC/CHEM（98）17に準拠して行った。

【0 5 6 8】

20

インビトロ溶血試験はシアンメトヘモグロビン法を用いて全血ヘモグロビン濃度を測定する。3匹のウサギからのプール血液を陰性対照（ガラスバイアル、バッチ：16491）及び陽性対照（ニトリル検査グローブ、バッチ：41010104）並びに供試品（ClearPlasma（商標））と共にインキュベートした。37±1℃で3時間インキュベートした後、血漿中のヘモグロビン含有量を測定し、溶血を決定した。

【0 5 6 9】

陰性対照（ガラスバイアル、バッチ：16491）の%溶血は-0.5%であり、従ってグレードは非溶血性と評価された。

【0 5 7 0】

陽性対照（ニトリル検査グローブ、バッチ：41010104）の%溶血は91.1%であり、従ってグレードは溶血性と評価された。

30

【0 5 7 1】

陰性及び陽性対照が適合判定基準を満たしたため、従ってこの試験の妥当性が確認された。

【0 5 7 2】

供試品ClearPlasma（商標）（バッチ番号：18-0001）の%溶血指標は-0.3%及び-0.1%であったとともに、非溶血性で見なされる。

【0 5 7 3】

この研究の条件下では、ヘモグロビン含有量の計算値によれば、供試品ClearPlasma（商標）（バッチ番号：18-0001）のパートA及びパートBは非溶血性で見なされる。

【0 5 7 4】

40

・ 材料媒介性発熱原性試験

この研究の目的は、プラスミノゲン枯渇血漿の材料媒介性発熱原性の検出に関する一般的な情報を提供することであった。

【0 5 7 5】

この試験はAmerican Preclinical Services, LLC（MN, USA）によって行われた。

【0 5 7 6】

本研究は、

・ 米国薬局方（USP）<151>発熱性物質試験規制基準（Pyrogen Test Regulatory Standards）、

・ ISO 10993-11：2017医療機器の生物学的評価（Biological Evaluati

50

on of Medical Devices) 第 1 1 部：全身毒性試験 (Tests for Systemic Toxicity) に準拠して行った。

【0577】

合計 3 匹の動物を使用した。各動物について注射前の 30 分以内にベースライン対照体温を確定した。被験物質 (プラスミノゲン枯渇血漿、ロット番号 001) を $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ に温め、各動物の外側耳静脈に $10\text{ mL} / \text{kg}$ で 10 分以内に静脈内注射した。各動物の体温を注射後 1～3 時間の間に 30 分間隔で記録した。この研究の結果に基づくと、被験物質はウサギにおいて材料媒介性発熱原性のエビデンスを示さなかった。

【0578】

・ 細菌性エンドトキシン試験

この研究の目的は、最終滅菌 ClearPlasma (商標) 装置及びビーズで調製した水抽出物中の細菌性エンドトキシン (発熱物質) の濃度を推定することであった。

【0579】

この試験は Milouda & Migal Laboratories (イスラエル) によって行われた。

【0580】

装置及びビーズは別々に試験した。

【0581】

ビーズのない装置を、1 試料につき 50 mL LAL 試薬水と共に 1 時間インキュベートした。LAL 試薬水は試験前に 37°C に加熱してあった。次にカイネティック比濁 LAL 試験法を用いて試料からの抽出物を細菌性エンドトキシンに関して試験した。

【0582】

2 つの試験した試料の結果は、 $0.00860\text{ EU} / \text{mL}$ 及び $0.01380\text{ EU} / \text{mL}$ であった。

【0583】

次に、3 バイアルの 30 % エタノール中ビーズを以下のとおり試験した：各試料を LAL 試薬水で 1 : 10 希釈し、 $15 \sim 30^{\circ}\text{C}$ で 1 時間インキュベートした。試料を $5,000\text{ RPM}$ で 10 分間遠心した。カイネティック比濁 LAL 試験法を用いて上清 (希釈度 1 : 10) を細菌性エンドトキシンに関して試験した。結果は、各試験について $< 0.05\text{ EU} / \text{mL}$ であった。

【0584】

〔装置+ビーズ〕についての最大限の要約結果は、USP < 161 > によって確立された限界値 ($20\text{ EU} / \text{装置}$) 以下であった：

$[0.01380\text{ EU} / \text{mL} \times 50\text{ mL}] + [< 0.05\text{ EU} / \text{mL} \times 27\text{ mL} \text{ (装置を充填するため)}] = 0.69\text{ EU} / \text{装置} + [< 1.35]\text{ EU} / \text{装置} = < 2.04\text{ EU} / \text{装置}$

【0585】

LAL 試験は出荷試験の一環として製品バッチ毎に行われる。

【0586】

以下の方法クレームにおいて、クレームステップを指示して用いられる英数字及びローマ数字は便宜上提供されるに過ぎず、いかなる特定のステップ実施順序も含意しない。

【0587】

最後に、語句「～を含んでいる (comprising)」は、添付の特許請求の範囲全体を通じて使用されるとき、「～を含むが、限定はされない」を意味すると解釈されるべきであることに留意しなければならない。

【0588】

本明細書に開示される主題に係る例が示され、開示されているが、本明細書に開示される主題の趣旨から逸脱することなくそれらに多くの変更を行い得ることが理解されるであろう。

【0589】

実施例 14

10

20

30

40

50

急性上部消化管出血を有する患者におけるClearPlasma（商標）の有効性及び安全性を判定する臨床試験

無作為化二重盲検対照試験を行い、急性上部消化管出血を呈する患者におけるClearPlasma（商標）装置によって過したPDPの安全性及び有効性を判定する。これは非劣性研究である。主要アウトカムは安全性：血栓塞栓性イベント（静脈又は動脈）である。本研究は、以下のパラメータを判定することを目標とした：

- 1) 血漿輸血後の総失血量〔時間フレーム：術後最初の48時間〕。失血は、輸血されたRBC血液単位〔時間フレーム：2週間〕、輸血された血漿単位〔時間フレーム：2週間〕、ヘモグロビン降下ベースラインとの比較、輸血された血小板単位〔時間フレーム：2週間〕及び2週間のフォローアップの間における再出血エピソードによって判定する；
- 2) 入院期間〔時間フレーム：2週間のフォローアップの間〕；
- 3) 血漿輸血に関連する死亡率。

【0590】

本研究は、数カ所の施設（多施設）において第1／2相で総実施期間12ヵ月（各患者の研究実施期間は2週間である）にわたって行われる。本研究は2アームを含む：

- a) 250～500mlのPDPの輸血、+必要に応じて通常の血漿；
- b) 通常の血漿の輸血。

【0591】

患者集団は、下血／胃洗浄液中の血液の存在／吐血によって診断される急性上部消化管出血（UGIB）を有する患者に関する。標本サイズは30例の患者（各群15例）である。標本サイズの計算は、同様の適応疾患及び臨床計画における医学論文のレビューに基づき、記述的分析を伴う。

【0592】

患者は、組入れ基準及び除外基準の評価によって研究への適格性に関してスクリーニングする。スクリーニング手順には、人口統計学的データ、病歴、理学的検査及びバイタルサインの収集が含まれる。

【0593】

本研究に組み入れるには、患者は年齢18歳以上であり、医師の診断を受けた急性上部消化管出血（24時間未満）を有し、書面によるインフォームドコンセントを提出しなければならない。インフォームドコンセントのプロセスは、ISO 14155：2011の推奨に従う。

【0594】

以下のパラメータにより患者は本研究から除外される：妊娠、前月における血漿注入の投与、既知の腎不全クレアチニンクリアランス30ml／分未満、直近3ヵ月における動脈又は静脈血栓症、血漿に対するアレルギー反応歴、別の臨床試験への参加、及びワルファリン、アピキサバン、リバーロキサバン、ダビガトラン、低分子量ヘパリンなどの抗凝固薬治療。

【0595】

ビジット／評価スケジュールは、ベースライン、輸血の8～12時間後（血液試料を含む）、翌朝（2日目）、72時間後及び14日後である。ベースライン判定は、血圧、脈拍、血液検査であって、全CBC、PT、INR、PTT、生化学を含むものを含む。治療スケジュールは一回限りの輸血であり、フォローアップスケジュールは、輸血後12時間、24時間、72時間及び2週間である。

【0596】

ClearPlasma（商標）の投与はABO血液型適合性に基づかなければならない。緊急時には、ClearPlasma（商標）血液型ABを万能血漿と見なすことができる。ClearPlasma（商標）は、フィルタを備えた注入セットを用いて解凍後に静脈内注入によって投与されなければならない。注入全体を通じて無菌法が用いられなければならない。

【0597】

予想される有害作用は、アレルギー反応及び発熱である。患者は、治療の変更を余儀な

10

20

30

40

50

くさせる重篤有害事象の発生、同意の撤回、又は治験責任医師の判断を受けて離脱することができる。

【0598】

本研究のデータは、臨床研究データの系統的な取込み、レビュー、管理、保存、分析及び報告が可能となるように米国連邦規則集に従い症例報告書（CRF）に記録される。

【0599】

以下の研究サイトがモニタリングされる：

- a) 研究の開始前（即ち、研究開始ビジット）；
- b) 最初の患者登録及びc r fの記入が済んだ後の研究初期；
- c) 研究経過中に10～15人の患者が登録された後；
- d) 最後の患者が登録された後（即ち、研究終了ビジット）。

10

【0600】

CRF報告の不備、データ品質の不足又は過剰な数の患者の離脱又は偏りに起因して、更なるオンサイトモニタリングビジットが行われることもある。

【0601】

本研究は治験依頼者又はその被指名人による監査、並びに適切な規制当局による調査を受けることもある。治験責任医師は研究関連記録の監査又は調査に同意しなければならず、データ保護及び医療上の機密性を十分に考慮した上で原資料を直接取り扱うことを許可しなければならない。

【0602】

20

研究データは、最終的に承認されたプロトコルに従い全ての変数を含めてCRFに取り込まれる。データは、ICH-GCP（医薬品の臨床試験の実施基準（Good Clinical Practices））、ISO 14155：2011 ヒトを対象とする医療機器の臨床試験－医薬品の臨床試験の実施基準（Clinical investigation of medical devices for human subjects - Good Clinical Practice）、及び米国連邦規則集第21編第11部の要求事項などのFDA規格に従い収集、記入、整理、及び報告される。

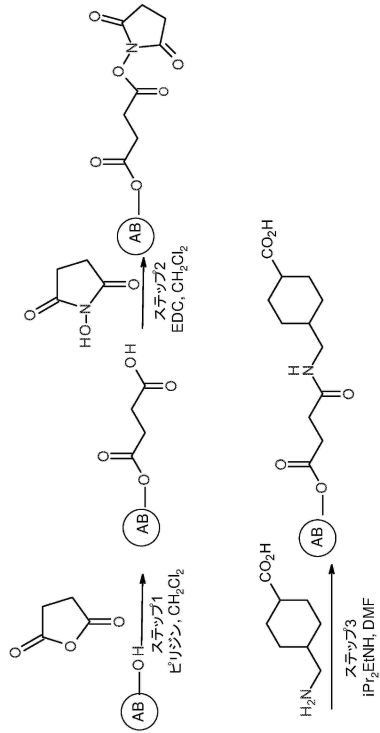
30

40

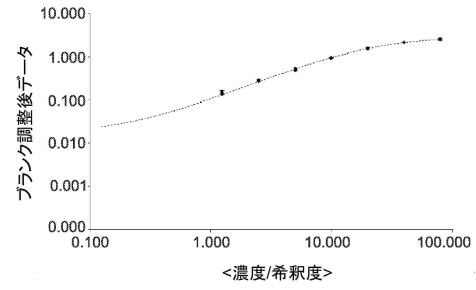
50

【図面】

【図 1】



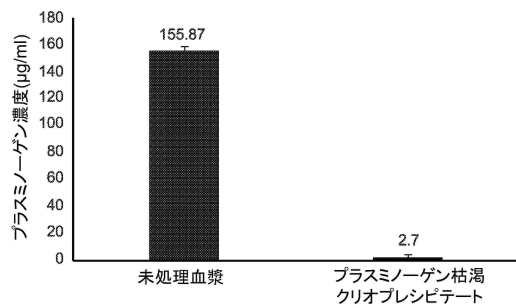
【図 2】



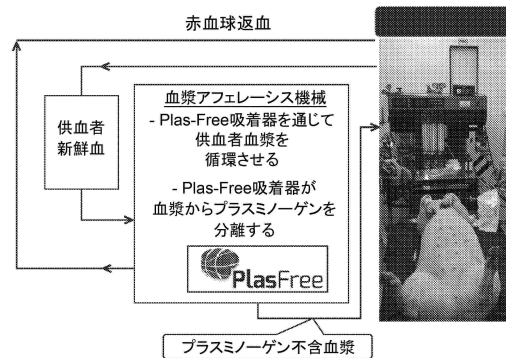
10

20

【図 3】



【図 4】

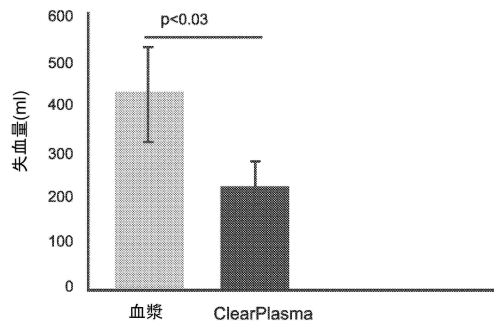


30

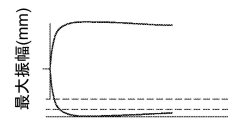
40

50

【図 5】



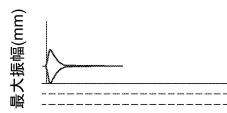
【図 6 A】



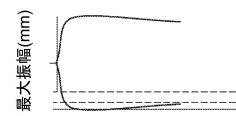
10

20

【図 6 B】



【図 6 C】

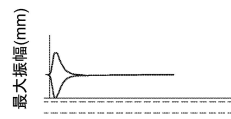


30

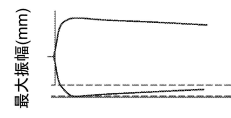
40

50

【図 6 D】

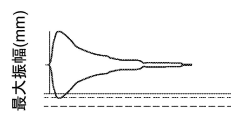


【図 6 E】

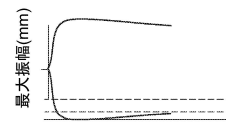


10

【図 6 F】



【図 6 G】



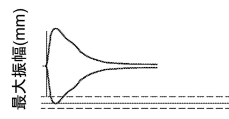
20

30

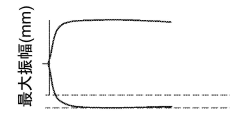
40

50

【図 6 H】

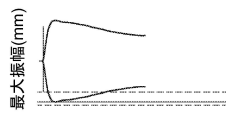


【図 6 I】

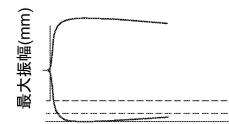


10

【図 6 J】



【図 6 K】



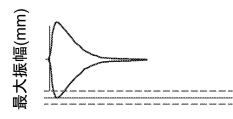
20

30

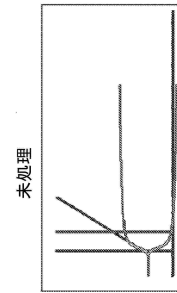
40

50

【図 6 L】



【図 7 A】



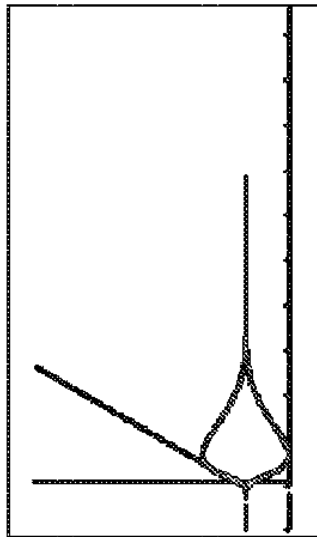
10

20

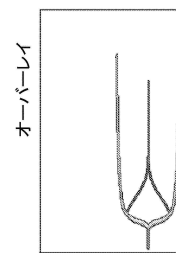
【図 7 B】

Fig. 7B

+ WT t-PA



【図 7 C】



30

40

50

【図 7 D】

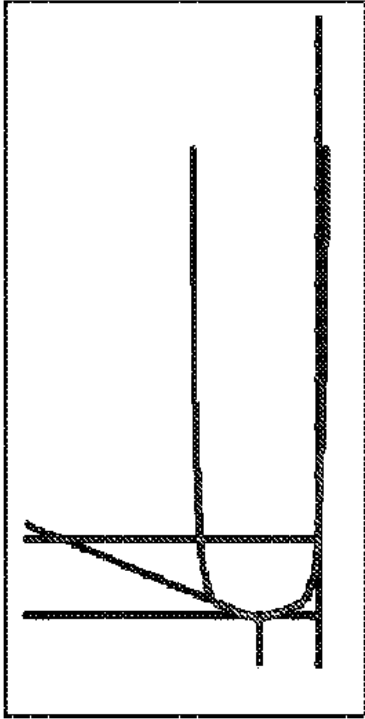


Fig. 7D

【図 7 E】

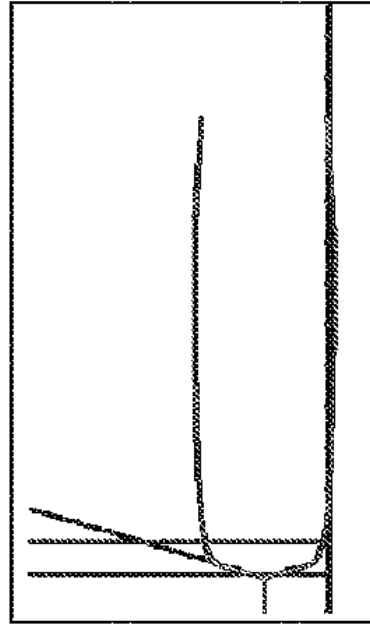


Fig. 7E

【図 7 F】

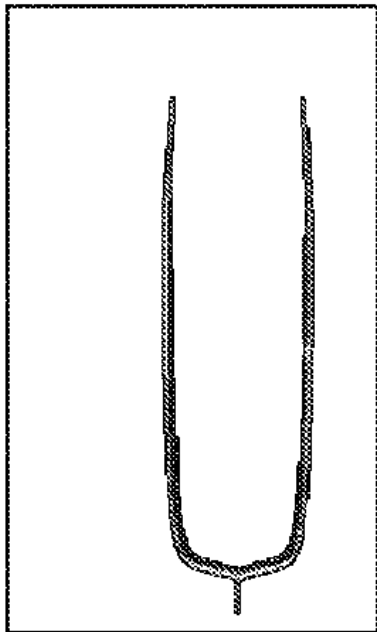
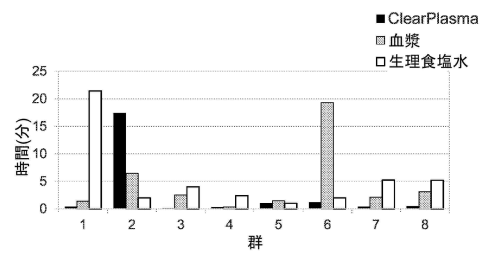


Fig. 7F

【図 8】



10

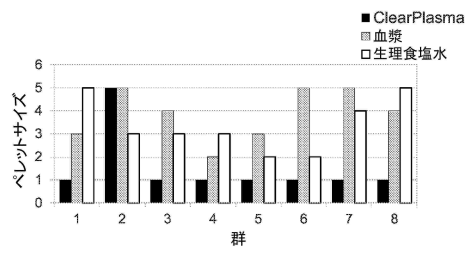
20

30

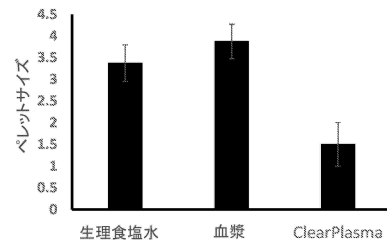
40

50

【図 9】



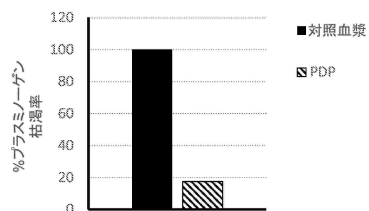
【図 10】



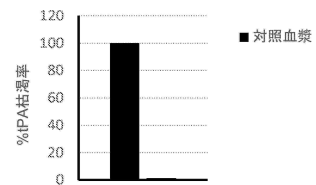
10

20

【図 11 A】



【図 11 B】



30

40

50

【図 12】

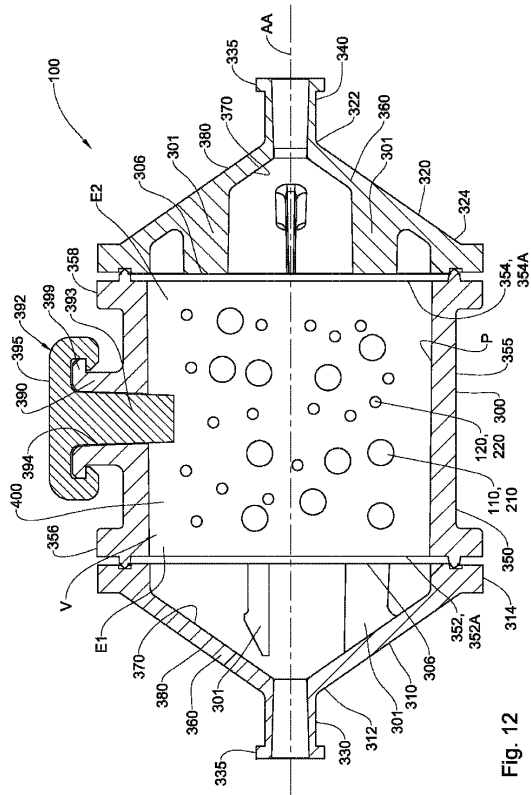


Fig. 12

【図 12 A】

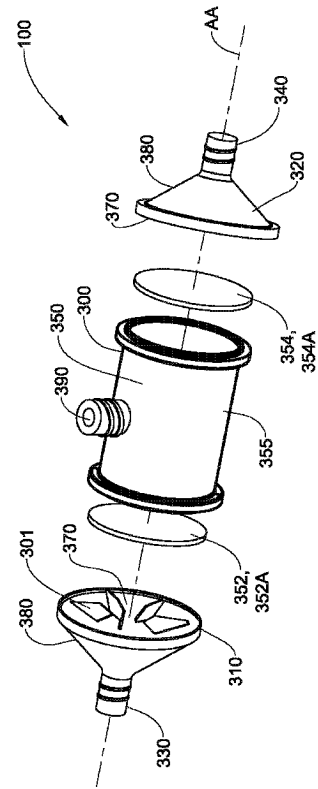


Fig. 12A

【図 12 B】

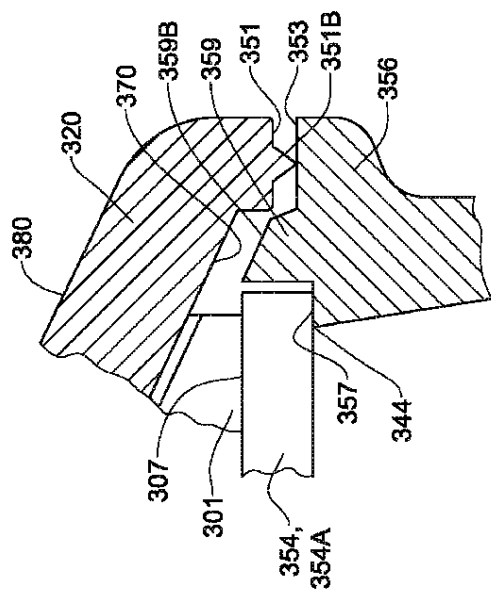


Fig. 12B

【図 13 A】

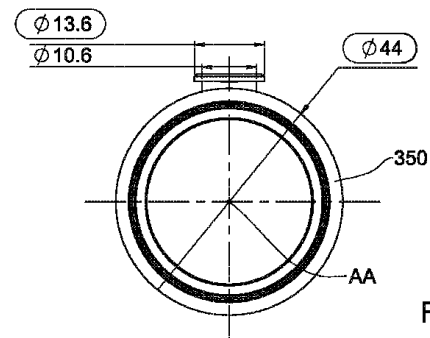
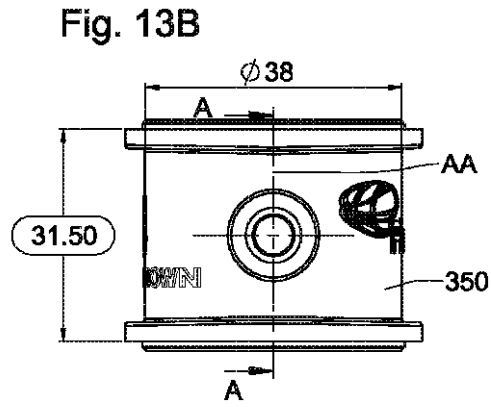
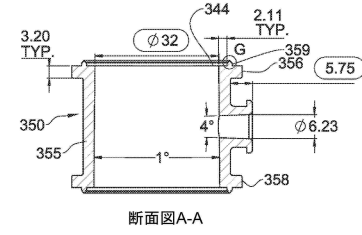


Fig. 13A

【図 1 3 B】

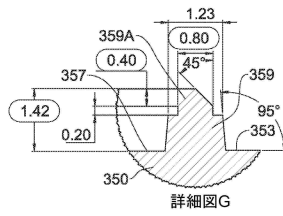


【図 1 3 C】

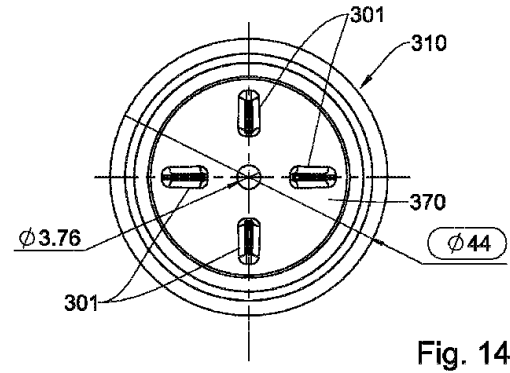


10

【図 1 3 D】



【図 1 4 A】



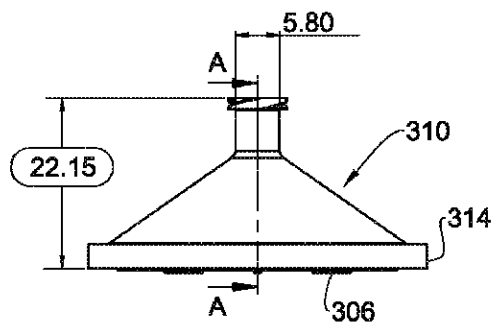
20

30

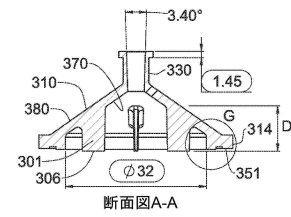
40

50

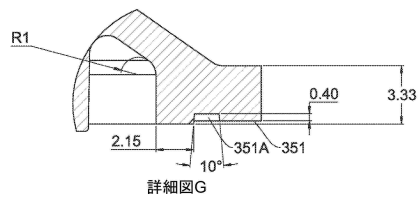
【図 14 B】



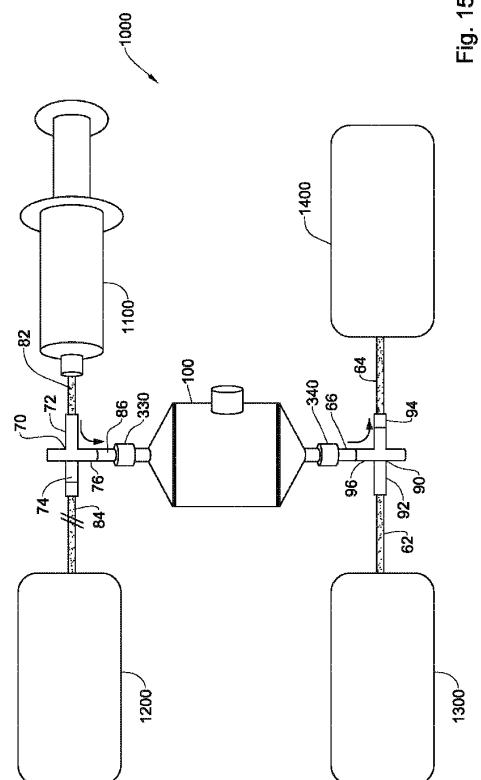
【図 14 C】



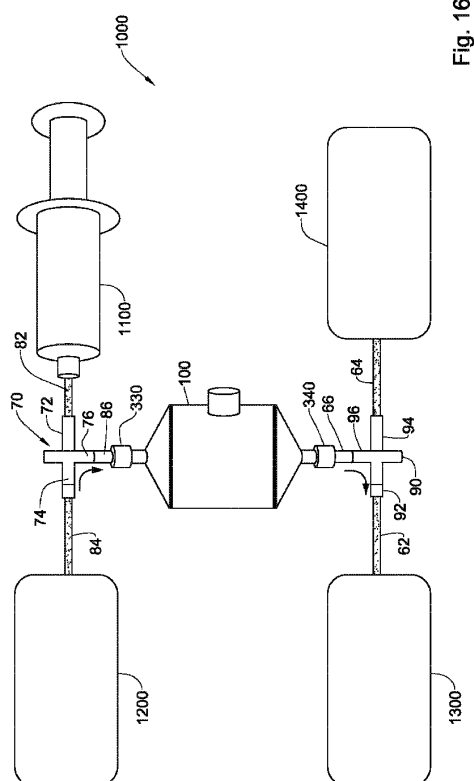
【図 14 D】



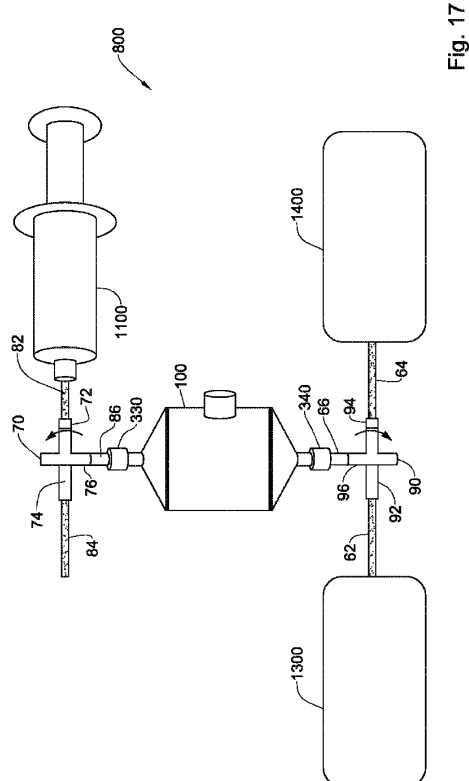
【図 15】



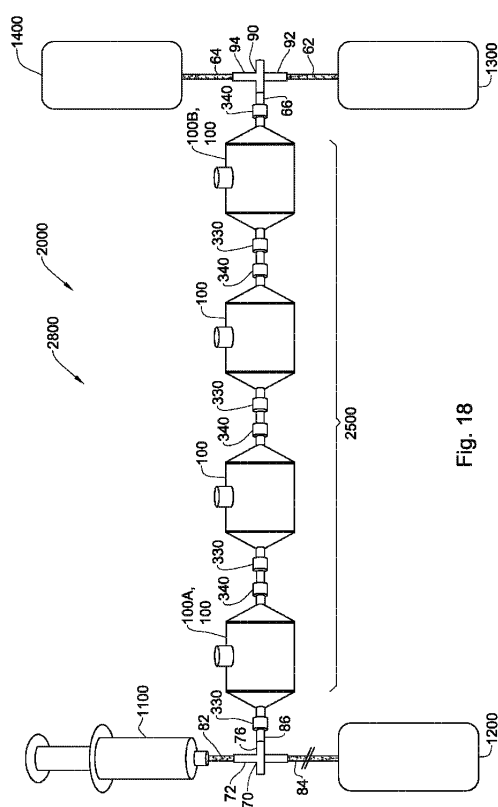
【図 16】



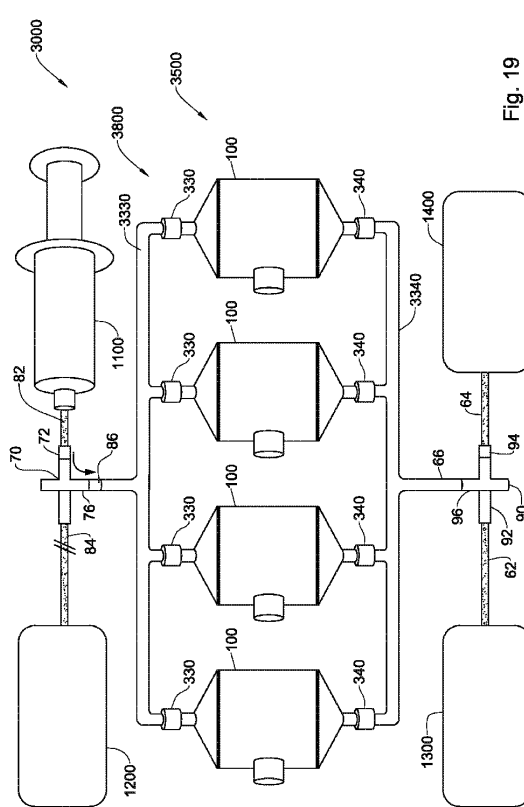
【圖 17】



【図 18】



【図 19】



【配列表】
0007645637000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 M	1/38 (2006.01)	A 6 1 M	1/38	
A 6 1 P	7/04 (2006.01)	A 6 1 P	7/04	
C 1 2 M	1/00 (2006.01)	C 1 2 M	1/00	Z
C 1 2 N	9/68 (2006.01)	C 1 2 N	9/68	
G 0 1 N	33/68 (2006.01)	G 0 1 N	33/68	Z N A

イスラエル国, ディー. エヌ. シムシヨン 9 9 7 6 1 0 0, ネーヴェ シャローム 3 1

(72)発明者 ドバシ, ジーブ

イスラエル国, キリヤット オノ 5 5 5 2 0 0, ハクファー ストリート 4

審査官 大瀧 真理

(56)参考文献

特表 2 0 0 4 - 5 2 8 8 5 3 (J P, A)
特開 2 0 0 6 - 1 6 0 7 3 1 (J P, A)
特表 2 0 1 3 - 5 2 3 4 1 1 (J P, A)
特開 2 0 0 7 - 1 3 1 6 6 8 (J P, A)
米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 0 0 5 9 4 7 (U S, A 1)
特開平 0 6 - 0 7 2 8 9 5 (J P, A)
国際公開第 2 0 1 8 / 0 2 5 8 0 9 (W O, A 1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - G 0 1 N 3 3 / 9 8
A 6 1 K 3 5 / 1 4
A 6 1 K 3 5 / 1 6
A 6 1 M 1 / 3 6
A 6 1 M 1 / 3 8
A 6 1 M 1 / 0 2
A 6 1 P 7 / 0 4
C 1 2 M 1 / 0 0
C 1 2 N 9 / 6 8