



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105435211 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 30

(21) 申请号 201510945741. 1 *A61L 31/04*(2006. 01)
(22) 申请日 2009. 10. 06 *A61L 31/14*(2006. 01)
(30) 优先权数据 *A61K 31/7004*(2006. 01)
2008-259860 2008. 10. 06 JP *A61K 31/7016*(2006. 01)
2008-316133 2008. 12. 11 JP
(62) 分案原申请数据
200980139684. 0 2009. 10. 06
(71) 申请人 三维肽胶株式会社
地址 日本东京都
(72) 发明人 高村健太郎 五条理志 小林智
(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事
务所(普通合伙) 11277
代理人 刘新宇 李茂家
(51) Int. Cl.
A61K 38/16(2006. 01)
A61K 38/08(2006. 01)
A61K 38/10(2006. 01)
A61P 7/04(2006. 01)

权利要求书1页 说明书19页 附图12页

(54) 发明名称
组织闭塞剂

(57) 摘要

本发明涉及组织闭塞剂。本发明提供一种人工合成的肽组织闭塞剂,其为能够适用于包括人在内的大型哺乳动物的生物体吸收性的肽组织闭塞剂,无需担心病毒等的感染性。一种组织闭塞剂,其为含有肽的组织闭塞剂,该肽为亲水性氨基酸和疏水性氨基酸交替结合的具有 8 ~ 200 个氨基酸残基的两亲性的肽,并且该肽为在生理 pH 和 / 或阳离子的存在下在水溶液中显示为 β 结构的自组装肽。

1. 一种组织闭塞剂,其包含肽的水溶液,所述肽的氨基酸序列如序列号2所示,包含异亮氨酸、谷氨酸、异亮氨酸和赖氨酸的重复序列,所述重复序列长度为13个氨基酸且由IEIKIEIKIEIKI组成。

2. 根据权利要求1所述的组织闭塞剂,其进一步含有低分子药剂。

3. 根据权利要求2所述的组织闭塞剂,其中,所述低分子药剂选自由葡萄糖、白糖、精制白糖、乳糖、麦芽糖、海藻糖、葡聚糖、碘、氯化溶菌酶、愈创蓝油烃、托可维A酸、聚乙烯吡咯酮碘、前列地尔 α -环糊精包合物、茴香醇、水杨酸异戊酯、 α, α -二甲基苯乙醇、白檀醇、新洋茉莉醛、磺胺嘧啶银、双丁酰环磷腺苷钠、前列地尔 α -环糊精包合物、硫酸庆大霉素、盐酸四环素、夫西地酸钠、莫匹罗星钙水合物和苯甲酸异戊酯组成的组。

4. 一种添加抗凝固剂从而凝固能力降低的用于治疗血液的出血的止血剂,所述止血剂含有权利要求1~3中任一项所述的组织闭塞剂。

5. 一种通过应用到实质器官的出血创面来治疗血液的出血的止血剂,所述止血剂含有权利要求1~3中任一项所述的组织闭塞剂。

6. 一种用于治疗动脉性出血和静脉性出血的止血剂,所述止血剂含有权利要求1~3中任一项所述的组织闭塞剂。

7. 一种防止胆汁从胆囊或胆管漏出的制剂,所述制剂含有权利要求1~3中任一项所述的组织闭塞剂。

8. 一种防止肺部的出血或肺部的空气漏出的制剂,所述制剂含有权利要求1~3中任一项所述的组织闭塞剂。

9. 一种内镜下粘膜剥离术中用于注入粘膜组织而使切除部分隆起的注入剂,其含有权利要求1~3中任一项所述的组织闭塞剂。

10. 一种防止切除部分的出血和体液漏出的制剂,其含有权利要求1~3中任一项所述的组织闭塞剂,所述切除部分为:将向粘膜组织注入液体而隆起的粘膜组织部分切除的方法中的切除部分。

11. 一种能够以经导管的方式适用于对内镜下粘膜剥离术中的切除部的出血进行止血的止血剂,其含有权利要求1~3中任一项所述的组织闭塞剂。

12. 一种动静脉闭塞术中的动静脉闭塞剂或静脉曲张硬化疗法中的静脉曲张硬化剂,其含有权利要求1~3中任一项所述的组织闭塞剂。

13. 根据权利要求12所述的动静脉闭塞术中的动静脉闭塞剂或静脉曲张硬化疗法中的静脉曲张硬化剂,其进一步含有抗癌剂和/或造影剂。

组织闭塞剂

[0001] 本申请是中国专利申请200980139684.0的分案申请,原申请的申请日为2009年10月06日,发明名称为组织闭塞剂。

技术领域

[0002] 本发明涉及一种组织闭塞剂,其特征在于,其含有自组装肽水凝胶。

背景技术

[0003] 用于防止生物体的组织损伤所产生的体液(血液、组织液等)漏出的组织闭塞在手术等临床方面具有重要的意义。有效抑制损伤部的体液漏出关系到患者手术中的生命维持、手术后的生活质量(QOL)的提高。

[0004] 作为临床上止血被重视的原因,列举如下。

[0005] 1.失血是死亡的重要原因之一,失血的原因包括严重的外伤、动脉瘤、食道或胃中的溃疡、以及食道静脉曲张的破裂等。特别是,在无法紧急接受止血治疗的情况下,死亡的可能性升高。

[0006] 2.手术时的出血是手术中重要的担心之一,出血会导致全身性感染症或器官功能障碍。而且,出血不仅会妨碍手术视野,流出的血液的除去还会引起手术的延迟。

[0007] 3.即使在进行微创手术(腹腔镜手术等)的情况下,出血也是问题,还存在无法充分抑制出血而不得不变更为外科手术(incisive surgery)的情况。

[0008] 作为现有的止血方法,列举如下。

[0009] 1.直接压迫出血部的血管的方法(压迫止血)。该止血法的缺点在于需要消耗时间和劳力,需要预先维持压力,而且可能会使患者产生血肿。

[0010] 2.作为其他基于物理手段的止血方法,包括:夹紧、夹住出血部附近的方法;在出血部放置塞子或海绵等物质的方法。这些止血法的缺点在于,在许多微血管均出血时操作非常困难。

[0011] 3.利用热使血液凝固、对出血的血管进行烧灼的方法(电烙)。该方法的缺点在于会使周围组织热损伤,对患者的侵袭(invasion)较大;需要医疗用器具,要求专业性(除医疗机构以外不能使用)。

[0012] 作为现有的止血材料,列举如下。

[0013] 1.海藻酸

[0014] 2.明胶海绵

[0015] 3.胶原纤维

[0016] 4.纤维蛋白糊。

[0017] 上述材料中,胶原纤维和纤维蛋白糊作为有效的止血材料经常被用于临床中,但它们的缺点可以列举如下:(1)明胶和胶原纤维是动物性胶原,纤维蛋白糊是使用了血液制剂和来自于牛的凝血酶的动物来源的制品,因此存在引发感染的危险性;(2)由于非透明,因而会妨碍手术。

[0018] 有时还有在手术中人为地使患者的血液凝固能力降低的肝素血状态。在使用人工心肺的手术中,为了抑制血液凝固而使用肝素。对于生物体而言人工心肺装置是异物,若使血液直接流入人工心肺装置,则血液会立即凝固,导致回路堵塞,因此要在进行体外循环之前将肝素投与至血液中。

[0019] 胶原纤维、纤维蛋白糊是利用生物体的血液凝固系统进行止血,因此在肝素血状态下,止血效果降低。若止血效果降低,则出血量增多,容易需要输血,而且体外循环终止后的完全止血也需要较长时间。因此,需要一种即使在肝素血状态下性能也不降低的、不利用血液凝固作用的止血材料。

[0020] 血管缝合不仅在心脏、血管系统手术中必要,在一般的腹腔内手术时也是必要的。由于手术后血管缝合部有少量的血液漏出,因此需要一种能持续抑制血液漏出的止血材料。

[0021] 胆汁瘘、胰液瘘是指由于胆管系统手术、胰腺炎或胰脏手术等而导致胆汁、胰液漏出,从而对其他内脏器官造成不良影响的症状。目前,能够有效抑制胆汁或胰液的漏出、且能够临床使用的物质尚且未知,需要一种安全且有效防止胆汁瘘、胰液瘘的方法。

[0022] 对于肺,已知由于肺泡囊肿破裂的自发性气胸、肋骨骨折或导管穿刺等外伤性气胸等导致空气漏出的病状。根据症状的情况,有时只能等待自然治愈,作为治疗气胸的手段,在患部仅将上层与肺组织粘着从而闭塞囊肿洞的方法被认为是简便且安全性高的方法之一。

[0023] 由于内窥镜技术的发达,逐渐开发出在内窥镜下切除病变部位的技术。特别是已经确立了利用内窥镜切除包括食道、胃或肠在内的消化道的息肉或早期癌症(认为未发生淋巴结转移的浅表型癌症)等的病变部位的手术法。在内镜下粘膜剥离术中,通常向包含病变部的粘膜下层注入高渗盐水等而使病变部隆起,一边抓住待切除部分一边利用电烙等切除包含病变部的组织。

[0024] 在该技术中,为了使病变部与固有肌层分离而向粘膜下层注入高渗盐水等溶液,但存在盐水等粘性低的溶液在手术中无法维持病变部的隆起的问题,需要一种在手术中能够维持患部的隆起的注入液。

[0025] 另外虽然利用导管投与凝血酶等血管收缩剂从而抑制病变部切除部的出血这种抑制出血的方法已被使用,但尚未确立能够完全阻止出血的有效的方法,同时还要求一种能够迅速阻止切除后的出血的方法。

[0026] 由于导管疗法的发展,确立了以下手术方法:通过堵塞流入肿瘤或肌瘤等受血流控制的病变部的动脉,从而使肿瘤或肌瘤等死灭。具体地说,可以举出肝动脉闭塞术、子宫动脉闭塞术、脑动脉闭塞术等。

[0027] 在该技术中,为了使动脉闭塞,需要注入从异种动物提取的胶原或乙烯-乙醇等液体,但担心感染的危险性或生物毒性。因此,需要开发出一种不存在感染的危险性、且生物毒性低的注入液。

[0028] 另外,还要求注入液中能够添加抗癌剂或造影剂。

[0029] 自组装肽具有以下特性:根据其氨基酸序列,形成许多肽分子有规则地排列的自我缔合体。近年来,由于其物理、化学、生物性质,自组装肽作为新型材料受到关注。

[0030] 自组装肽具有带电荷的亲水性氨基酸与电中性的疏水性氨基酸交替排列、正电荷

与负电荷交替分布的结构,在生理pH和盐浓度下为 β 结构。

[0031] 作为亲水性氨基酸,可以使用选自天冬氨酸、谷氨酸中的酸性氨基酸,和选自精氨酸、赖氨酸、组氨酸、鸟氨酸中的碱性氨基酸。作为疏水性氨基酸,可以使用丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、丝氨酸、苏氨酸、甘氨酸。

[0032] 该肽的自组装在以下的条件下产生。

[0033] (1)肽分子在水溶液中采取 β 结构,从而带有电荷的亲水性氨基酸和电中性的疏水性氨基酸不均匀分布于肽分子的2面。

[0034] (2)在采取 β 结构时,与相邻分子形成互补的电分布。

[0035] (3)在采取 β 结构时,与相邻分子形成充分的疏水键。

[0036] (4)通过1价的无机盐,氨基酸侧链的电荷被屏蔽。

[0037] (5)在肽的等电点附近,分子变为静电中性。

[0038] 当上述条件齐备时,认为通过以下机制进行自组装。

[0039] (1)通过肽分子的交替分布的正电荷和负电荷,分子之间相互吸引而接近。

[0040] (2)在相邻分子的中性氨基酸侧链间形成疏水键。

[0041] (3)通过正负电分布,相邻分子之间的相对的配置被调整,分子间的缔合力增强。

[0042] (4)分子聚集体缓缓伸长,形成纳米纤维。

[0043] 据报道,纳米纤维是粗10nm~20nm左右的极细纤维,其以网状聚集,宏观上呈现凝胶状。

[0044] 凝胶的网状结构在纤维尺寸和孔径等方面与天然的细胞外基质(ECM)非常类似,其作为细胞培养的支撑物(scaffold)的利用正在被研究。

[0045] 该肽水凝胶具有生物降解性,分解产物不会对组织造成不良影响,生物体吸收性高,因此适于细胞的植活、增殖。

[0046] 自组装肽为基于固相合成法的化学合成品,无需担心来自动物的感染症等,近年来由于十分担忧疯牛病等来自动物的病毒或其他未知的感染症,因此其作为胶原等的替代品进一步受到关注。

[0047] 专利文献1示出了自组装肽在止血中的应用,但在实施例引用的论文的肝脏切开部中的止血录像中,确认到血液从切开部末端持续性漏出,无法进行所报道的完全止血。止血不完全的理由推测是由于自组装肽凝胶与组织的粘着不充分。因此,为了使自组装肽的止血效果达到能够临床应用的水平,需要进一步的改良。

[0048] 专利文献1:国际公开第2006-116524号小册子

发明内容

[0049] 发明要解决的问题

[0050] 本发明的目的在于提供一种自组装肽组织闭塞剂及其使用方法,该自组装肽组织闭塞剂能够有效闭塞包括人在内的大型哺乳动物的组织的损伤部,且无需担心病毒等的感染性。

[0051] 用于解决问题的方案

[0052] 本发明人通过将用作细胞培养的支撑物的自组装肽水凝胶适用于组织闭塞中,发现表现出与现有的组织闭塞剂同等或在其之上的组织闭塞效果,从而完成了本发明。另外

存在以下课题：单纯将肽水溶液适用于体液漏出部，无法获得充分的组织闭塞效果。因此，深入研究的结果发现，通过从体液漏出部除去多余体液，能够得到充分的组织闭塞效果和生物体安全性，由此完成了本发明。

[0053] 即，本发明涉及一种组织闭塞剂，其为含有肽的组织闭塞剂，该肽为亲水性氨基酸和疏水性氨基酸交替结合的具有8~200个氨基酸残基的两亲性的肽，并且该肽为在生理pH和/或阳离子的存在下在水溶液中显示为 β 结构的自组装肽。

[0054] 在所述组织闭塞剂中，所述肽优选具有下述序列的重复序列：由精氨酸、丙氨酸、天冬氨酸和丙氨酸组成的序列，由异亮氨酸、谷氨酸、异亮氨酸、和赖氨酸组成的序列，或由赖氨酸、亮氨酸、天冬氨酸和亮氨酸组成的序列，更优选为由序列号1、序列号2、或序列号3所述的氨基酸序列组成的自组装肽。

[0055] 为了防止溶血、炎症、感染症，所述组织闭塞剂优选进一步含有低分子药剂。

[0056] 所述低分子药剂优选选自由葡萄糖、白糖、精制白糖、乳糖、麦芽糖、海藻糖、葡聚糖、碘、氯化溶菌酶、愈创蓝油炔(dimethylisopropylazulene)、托可维A酸(tretinoin tocoferil)、聚乙烯吡咯酮碘、前列地尔 α -环糊精包合物(alprostadiil alfadex)、茴香醇、水杨酸异戊酯、 α , α -二甲基苯乙醇、白檀醇(bacdanol)、新洋茉莉醛、磺胺嘧啶银(sulfazin silver)、双丁酰环磷腺苷钠、前列地尔 α -环糊精包合物、硫酸庆大霉素、盐酸四环素、夫西地酸钠、莫匹罗星钙水合物和苯甲酸异戊酯组成的组。

[0057] 本发明还涉及一种添加抗凝固剂从而凝固能力降低的血液的出血止血剂；实质器官的出血创面的止血剂；动脉性出血和静脉性出血的止血剂；防止胆汁从胆囊或胆管漏出的制剂；防止肺部的出血或肺部的空气漏出的制剂；内镜下粘膜剥离术中能够以经导管的方式适用的止血剂和用于注入粘膜组织而使切除部分隆起的注入剂；一种防止切除部分的出血和体液漏出的制剂，所述切除部分为：将向粘膜组织注入液体而隆起的粘膜组织部分切除的方法中的切除部分；或者动静脉闭塞术中的动静脉闭塞剂或静脉曲张硬化疗法中的静脉曲张硬化剂，上述物质均含有上述组织闭塞剂。该动静脉闭塞剂或静脉曲张硬化剂中还可以添加抗癌剂和/或造影剂。

[0058] 发明的效果

[0059] 本发明的组织闭塞剂，除了其主要成分即自组装肽发挥作为闭塞剂的作用以外，还能够成为迁移细胞(migrating cells)的支撑物，与单纯的闭塞相比，能够在手术后带来更高的治愈效果。另外，在从体液漏出部除去多余体液的情况下(例如在已经止血的状态下适用于止血部的情况)，本发明的组织闭塞剂与组织的粘着性提高，能够得到充分的组织闭塞效果和生物体安全性。

[0060] 另外，由于作为本发明的组织闭塞剂的主要成分的自组装肽能够通过合成制造，因此与现有的来自生物体的材料相比，不存在病毒等的感染的危险，而且其自身为生物体吸收性，也无需担心炎症等。

附图说明

[0061] 图1为腹部大动脉注射针穿孔模型中的1%肽水溶液与3%肽水溶液的止血效果的比较。(a)大动脉穿刺后的出血的确认，在血管周围确认到出血(箭头前端部；1%肽水溶液处理组)，(b)肽水溶液的涂布(1%肽水溶液处理组)，(c)打开止血钳后，由于再出血产生的

血液而难以确认血管(箭头前端部;1%肽水溶液处理组),(d)大动脉穿刺后的出血的确认,在血管周围确认到出血(箭头前端部;3%肽水溶液处理组),(e)肽水溶液的涂布(3%肽水溶液处理组),(f)用生理盐水清洗后,能够在照片中央部确认到完全止血的血管(箭头前端部;3%肽水溶液处理组)。

[0062] 图2为肝脏部分切除模型中的1%肽水溶液与3%肽水溶液的止血效果的比较。(a)肝脏切除后的出血的确认(1%肽水溶液处理组),(b)肽水溶液的涂布(1%肽水溶液处理组),(c)用生理盐水清洗后,没有确认到切断面的出血(箭头前端部;1%肽水溶液处理组),(d)肝脏切除后的出血的确认(3%肽水溶液处理组),(e)肽水溶液的涂布(3%肽水溶液处理组),(f)用生理盐水清洗后,确认到切断面的出血(箭头前端部;3%肽水溶液处理组)。

[0063] 图3为利用肽水溶液止血的肝脏与对照组(生理盐水)的肝脏的切断面的病理组织学的比较。(a)血管内组织图(肽水溶液处置组),(b)血管内组织图(生理盐水处置组),(c)血管内组织图(肽水溶液处置组),(d)血管内组织图(肽水溶液处置组),(e)血管内组织图(肽水溶液处置组),(f)血管内组织图(肽水溶液处置组)。

[0064] 图4为血液凝固能力降低的兔的腹部大动脉注射针穿孔模型中的3%肽水溶液的止血效果。(a)大动脉穿刺前的样子,(b)大动脉穿刺后,在血管周围确认到出血(箭头前端部),(c)肽水溶液的涂布,(d)打开止血钳后,在血管周围没有确认到(b)那样的出血(箭头前端部)。

[0065] 图5为腹部大动脉注射针穿孔模型中的含白糖的3%肽水溶液的止血效果。(a)大动脉穿刺前的样子,(b)大动脉穿刺后,在血管周围确认到出血(箭头前端部),(c)肽水溶液的涂布,(d)打开止血钳后,在血管周围没有确认到(b)那样的出血(箭头前端部)。

[0066] 图6为肺漏模型(lung leakage model)中的含白糖的3%肽水溶液与生理盐水的止血效果和肺漏闭塞效果的比较。(a)肺的出血确认(箭头前端部;含白糖的3%肽水溶液处理组),(b)肽水溶液的涂布(箭头前端部;含白糖的3%肽水溶液处理组),(c)为了确认漏气而将损伤部浸渍于生理盐水中,结果均未确认到空气漏出和出血(箭头前端部;含白糖的3%肽水溶液处理组),(d)肺的出血的确认(箭头前端部;生理盐水处理组),(e)生理盐水的涂布(箭头前端部;生理盐水处理组),(f)为了确认漏气而浸渍于生理盐水中,因此没有明显的出血,但确认到持续的出血(箭头前端部;生理盐水处理组)。

[0067] 图7为胆管壁穿孔模型中的3%肽水溶液的胆管壁闭塞效果。(a)胆管穿刺前的样子,(b)胆管穿刺后的胆汁漏出确认(箭头前端部),(c)肽水溶液的涂布(箭头前端部),(d)用生理盐水清洗后,没有确认到像(b)那样胆汁漏到胆管周围(箭头前端部)。

[0068] 图8为膀胱内肿瘤中的3%肽水溶液所引起的粘膜隆起形成和止血效果。(a)肽水溶液注入前,(b)肽水溶液注入后的患部的隆起确认,(c)利用电烙切除肿瘤中,在切除部没有确认到出血,(d)利用电烙切除肿瘤后,在切除部没有确认到出血。

[0069] 图9为胃粘膜切开模型中的2%肽水溶液的止血效果。(a)肝脏切开后的出血的确认(箭头前端部),(b)2%肽水溶液的涂布(箭头前端部),(c)用生理盐水清洗后,没有确认到从切开部的出血(箭头前端部)。

[0070] 图10为肝脏横切模型中的1%肽水溶液的止血效果。(a)肝脏切开后的出血的确认(箭头前端部),(b)1%IEIK9肽水溶液的涂布(箭头前端部),(c)用生理盐水清洗后,确认到切开部出血(箭头前端部),(d)肝脏切开后的出血的确认(箭头前端部),(e)1%IEIK13肽水

溶液的涂布(箭头前端部),(f)用生理盐水清洗后,没有确认到切开部出血(箭头前端部),(g)肝脏切开后的出血的确认(箭头前端部),(h)1%KLD肽水溶液的涂布(箭头前端部),(i)用生理盐水清洗后,没有确认到切开部出血(箭头前端部)。

[0071] 图11为胆汁引起的1.5%肽水溶液的自组装的确认。(a)自组装前的1.5%PuraMatrix肽水溶液,(b)胆汁涂布后的1.5%PuraMatrix肽水溶液,(c)除去胆汁,确认自组装,(d)给予物理冲击而破坏自组装凝胶,(e)自组装前的1%IEIK9肽水溶液,(f)胆汁涂布后的1%IEIK9肽水溶液,(g)除去胆汁后,基本上无法确认自组装,(h)给予物理冲击而破坏自组装凝胶,(i)自组装前的1%IEIK13肽水溶液,(j)胆汁涂布后的1%IEIK13肽水溶液,(k)除去胆汁,确认自组装,(l)给予物理冲击而破坏自组装凝胶,(m)自组装前的1%KLD肽水溶液,(n)胆汁涂布后的1%KLD肽水溶液,(o)除去胆汁,确认自组装,(p)给予物理冲击而破坏自组装凝胶。

[0072] 图12为3%肽水溶液产生的门静脉栓塞效果的确认。(a)、(b)确认门静脉的栓塞(箭头前端部)。

[0073] 图13为含碘帕醇的肽水溶液的自组装的确认。(a)自组装前的含碘帕醇的3%肽水溶液,(b)涂布细胞培养用培养基后的含碘帕醇的3%肽水溶液,(c)除去细胞培养用培养基,确认自组装,(d)自组装前的含碘帕醇的0.0468%肽水溶液,(e)涂布细胞培养用培养基后的含碘帕醇的0.0468%肽水溶液,(f)除去细胞培养用培养基,确认自组装。

[0074] 图14为含碘帕醇的3%肽水溶液的通过导管后的自组装的确认(箭头前端部)。

具体实施方式

[0075] 以下,对本发明的组织闭塞剂进行详细说明。

[0076] 本发明的组织闭塞剂的主要成分是自组装肽,所述自组装肽为亲水性氨基酸和疏水性氨基酸交替结合的具有8~200个氨基酸残基的两亲性的肽,并且该自组装肽在生理pH和/或阳离子的存在下在水溶液中显示为 β 结构。

[0077] 本发明中,生理pH为pH6~pH8,优选为pH6.5~pH7.5,进一步优选为pH7.3~pH7.5。另外,本发明中,阳离子例如为5mM~5M的钠离子或钾离子。

[0078] 本发明中使用的自组装肽例如能够用以下4个通式表示。

[0079] $((XY)_1-(ZY)_m)_n$ (I)

[0080] $((YX)_1-(YZ)_m)_n$ (II)

[0081] $((ZY)_1-(XY)_m)_n$ (III)

[0082] $((YZ)_1-(YX)_m)_n$ (IV)

[0083] (式(I)~(IV)中,X表示酸性氨基酸,Y表示疏水性氨基酸,Z表示碱性氨基酸,1、m和n均为整数($n \times (1+m) < 200$))。

[0084] 另外,其N末端可以进行乙酰化,C末端可以进行酰胺化。

[0085] 这里,作为亲水性氨基酸,可以使用选自天冬氨酸、谷氨酸中的酸性氨基酸,和选自精氨酸、赖氨酸、组氨酸、鸟氨酸中的碱性氨基酸。作为疏水性氨基酸,可以使用丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、丝氨酸、苏氨酸或甘氨酸。

[0086] 在这些自组装肽中,可以优选使用具有精氨酸、丙氨酸、天冬氨酸和丙氨酸(RADA)的重复序列的自组装肽,这样的肽的序列用 $Ac-(RADA)_p-CONH_2$ ($p=2\sim 50$)表示。另外还可以

优选使用具有异亮氨酸、谷氨酸、异亮氨酸和赖氨酸(IEIK)的重复序列的自组装肽,这样的肽的序列用Ac-(IEIK)_pI-CONH₂(p=2~50)表示。进而还可以优选使用具有赖氨酸、亮氨酸、天冬氨酸和亮氨酸(KLDL)的重复序列的自组装肽,这样的肽的序列用Ac-(KLDL)_p-CONH₂(p=2~50)表示。这些自组装肽能够由8~200个氨基酸残基数构成,其中优选为8~32个残基的自组装肽,进一步优选残基数为12~16的自组装肽。

[0087] 作为本发明中的自组装肽的优选的具体例子,可以举出具有(Ac-(RADA)₄-CONH₂)序列(序列号:1)的肽RAD16-I、具有(Ac-(IEIK)₃I-CONH₂)序列(序列号:2)的肽IEIK13、具有(Ac-(KLDL)₃-CONH₂)序列(序列号:3)的肽KLD,关于RAD16-I,其1%水溶液已经由3D-Matrix Co.,Ltd.以PuraMatrix(注册商标)产品化。除了1%的具有(Ac-(RADA)₄-CONH₂)序列(序列号:1)的肽之外,PuraMatrix(注册商标)还含有氢离子、氯化物离子。

[0088] PuraMatrix(注册商标)、IEIK13和KLD为12~16个氨基酸残基的长约5nm的寡肽,其溶液在酸性pH条件下显示为液体状态,但通过变化为中性pH而产生肽的自组装,形成直径约10nm的纳米纤维,结果肽溶液凝胶化。

[0089] PuraMatrix(注册商标)为具有作为亲水性氨基酸的带正电荷的精氨酸和带负电荷的天冬氨酸、与作为疏水性氨基酸的丙氨酸残基交替重复的氨基酸序列的两亲性肽,IEIK13为具有作为亲水性氨基酸的带正电荷的赖氨酸和带负电荷的谷氨酸、与作为疏水性氨基酸的异亮氨酸残基交替重复的氨基酸序列的两亲性肽,另外KLD为具有作为亲水性氨基酸的带正电荷的赖氨酸和带负电荷的天冬氨酸、与作为疏水性氨基酸的亮氨酸残基交替重复的氨基酸序列的两亲性肽,肽的自组装起因于构成肽的氨基酸所产生的肽分子间的氢键和疏水键。

[0090] 本发明中使用的自组装肽中,纳米纤维的平均直径为10~20nm,平均孔径为5~200nm。该数值范围与天然的细胞外基质胶原的尺寸大致相同。

[0091] 本发明中使用的自组装肽的自组装条件可以列举生理条件的pH和盐浓度。特别是,1价的碱金属离子的存在非常重要。即,生物体内大量存在的钠离子和钾离子有助于促进凝胶化。一旦产生凝胶化,则即使使用通常的蛋白质的变性条件例如高温、酸、碱、蛋白水解酶、尿素、盐酸胍等变性剂,凝胶也不分解。

[0092] PuraMatrix(注册商标)等自组装肽为不具有明显的生理活性基序的肽序列,因此无需担心有损细胞的本来功能。生理活性基序与转录等许多细胞内现象的控制有关,若生理活性基序存在,则通过识别该基序的酶,细胞质内或细胞表面的蛋白质被磷酸化。若肽组织闭塞剂中存在生理活性基序,则能够活化或抑制各种功能蛋白的转录活性。不具有生理活性基序的PuraMatrix(注册商标)等自组装肽不存在这样的担心。

[0093] 本发明中使用的自组装肽通过化学合成而制造,因此不含起因于来自动物的细胞外基质的未知成分。该性质表明无需担心以BSE为首的感染,作为医疗用途具有很高的安全性。

[0094] 有报道指出,由天然氨基酸组成的自组装肽由于具有良好的生物体适应性和生物体内分解性,因此例如将PuraMatrix(注册商标)注入小鼠的心肌时,细胞浸润于注入的PuraMatrix(注册商标),形成了正常组织。分解时间根据注入场所等条件而异,在注入后约2~8周纤维被分解并排出。

[0095] 本发明的组织闭塞剂中还进一步混合低分子药剂。作为这样的低分子药剂,

没有特别限定,可以举出葡萄糖、白糖、精制白糖、乳糖、麦芽糖、海藻糖、葡聚糖、碘、氯化溶菌酶、愈创蓝油烃、托可维A酸、聚乙烯吡咯酮碘、前列地尔 α -环糊精包合物、茴香醇、水杨酸异戊酯、 α, α -二甲基苯乙醇、白檀醇、新洋茉莉醛、磺胺嘧啶银、双丁酰环磷腺苷钠、前列地尔 α -环糊精包合物、硫酸庆大霉素、盐酸四环素、夫西地酸钠、莫匹罗星钙水合物和苯甲酸异戊酯。

[0096] 本发明的组织闭塞剂,能够通过添加糖而从低渗至等渗来改善溶液的渗透压且组织闭塞效果不会降低,能够进一步提高生物体安全性。

[0097] 作为本发明的组织闭塞剂的形态,可以列举粉末、溶液、凝胶等。由于自组装肽因溶液的pH和盐浓度的变化而产生凝胶化,因此能够作为在应用时使其与生物体接触从而凝胶化的液剂流通。

[0098] 作为临床使用中的形态,包括:提前将含有自组装肽等成分的药液填充至带有筒体的注射器或移液器中(预填充式注射器形态等);或者,利用从注射器或移液器尖的开口部补给成分的装置(抽吸装置或阀)向注射器或移液器尖供给药液并从放出部应用于患部的方法。注射器、移液器有时也由2个以上构成。

[0099] 通过将成分用作支架或导管等器具的涂层,能够抑制体液漏出。

[0100] 另外,也可以在本领域中常用的纱布、绷带等支撑体或衬里上固定成分。另外还可以将海绵浸泡在成分中而使用。

[0101] 除此之外,可以制作填充了成分粉末或溶液的喷雾式喷雾器。利用这种喷雾器喷雾到患部时,通过与生物体的接触,pH和盐浓度上升,产生凝胶化,与以凝胶状态操作相比能够适用于各种各样的部位或状态。

[0102] 以下,通过实施例更详细地说明本发明的组织闭塞剂,但只要本发明不脱离其主旨和适用范围则不限于这些实施例。

[0103] 实施例1

[0104] 兔腹部大动脉和门静脉主干注射针穿孔模型中的1%肽水溶液和3%肽水溶液的止血效果

[0105] 在止血钳止血下制作兔腹部大动脉、门静脉主干的注射针穿孔模型,对1%肽水溶液和3%肽水溶液的止血效果进行评价。

[0106] <材料>

[0107] • 肽水溶液

[0108] 1. 1%肽水溶液(肽序列:Ac-(RADA)₄-NH₂,CPC Scientific,Inc公司制造;浓度:重量/体积)

[0109] 2. 3%肽水溶液(肽序列:Ac-(RADA)₄-NH₂,CPC Scientific,Inc公司制造;浓度:重量/体积)

[0110] • 动物

[0111] 日本白兔(3.0-4.0kg,Japan White,普通,由Funabashi Farm Co.,Ltd.购入)。如下饲养:在以室温25℃、湿度65%、照明时间12小时(7:00-19:00)进行控制的饲养室内给食饲养用颗粒(JA Higashinohon Kumiai Shiryō),通过给水瓶自由给水。断食仅为试验当天早上,给水是自由的。

[0112] <方法>

[0113] • 对于兔,以3mg/kg皮下内投与Celactar 2%注射液(在100mL中含有2.0g赛拉嗪,Bayer Ltd.制造)后,以10mg/kg静脉内投与氯胺酮(在1mL中含有50mg氯胺酮,Fuji Chemical Industries,Ltd.制造),从而使其麻醉。

[0114] • 通过正中切开对兔进行剖腹。露出约10cm的腹部大动脉、门静脉主干,将各血管从周围组织剥离,利用23G注射针(Terumo Corp.制造)对腹部大动脉进行血管穿刺,利用26G注射针(Terumo Corp.制造)对门静脉主干进行血管穿刺。

[0115] • 确认出血后,利用止血钳对末梢侧和中枢侧进行止血钳止血,通过生理盐水、纱布除去出血的血液后,立即用肽水溶液进行处置。

[0116] • 处置后1~2分钟后开次打开血流,通过肉眼确认从穿刺部是否有出血。

[0117] <结果>

[0118] 图1中,示出了肽水溶液对于本实施例的血管出血的止血效果的例子。如表1所示,可确认:在腹部大动脉穿孔模型中,3%肽水溶液的2例中的2例均为完全止血。但是,对于1%肽水溶液,2例中均在解除止血钳止血后确认到喷出性的出血,未能止血。另外,在门静脉主干穿孔模型中,同样地可确认:3%肽水溶液的2例中的2例均为完全止血效果,但1%肽水溶液确认到持续性的静脉性出血。

[0119] 表1

[0120]

No.	肽水溶液	穿刺部位	处置时间	结果	所见
1	3%	腹部大动脉	1:00	○	完全止血
2	3%	腹部大动脉	1:00	○	完全止血
3	1%	腹部大动脉	2:00	×	取下止血钳后,喷出性的出血
4	1%	腹部大动脉	2:00	×	取下止血钳后,喷出性的出血
5	3%	门静脉主干	2:00	○	完全止血
6	3%	门静脉主干	1:00	○	完全止血
7	1%	门静脉主干	2:00	×	取下止血钳后,持续性的出血

[0121] 实施例2

[0122] 兔肝脏切除模型中的1%肽水溶液和3%肽水溶液的止血效果

[0123] 制作兔肝脏部分切除出血模型,评价1%肽水溶液和3%肽水溶液的止血效果。

[0124] <材料>

[0125] • 肽水溶液

[0126] 1. 1%肽水溶液(肽序列:Ac-(RADA)₄-NH₂,CPC Scientific,Inc公司制造)

[0127] 2. 3%肽水溶液(肽序列:Ac-(RADA)₄-NH₂,CPC Scientific,Inc公司制造)

[0128] • 动物

[0129] 日本白兔(3.0-4.0kg,Japan White,普通,由Funabashi Farm Co.,Ltd.购入)。如下饲养:在以室温25℃、湿度65%、照明时间12小时(7:00-19:00)进行控制的饲养室内给食饲养用颗粒(JA Higashinohon Kumiai Shiryou),通过给水瓶自由给水。断食仅为试验当天早上,给水是自由的。

[0130] <方法>

[0131] • 对于兔,以3mg/kg皮下内投与Celactar 2%注射液(在100mL中含有2.0g赛拉

嗉, Bayer Ltd. 制造)后,以10mg/kg静脉内投与氯胺酮(在1mL中含有50mg氯胺酮, Fuji Chemical Industries, Ltd. 制造),从而使其麻醉。

[0132] • 通过正中切开对兔进行剖腹,用手术刀将肝脏左叶或右叶从边缘锋利地切除横约5cm×纵约3cm大小,制作肝切面。

[0133] • 确认切面的喷出性出血后,对包括动脉、门静脉、静脉在内的肝实质用手进行压迫止血,立即截断血流,通过生理盐水、纱布除去出血的血液后,用肽水溶液处置制作的肝切面。

[0134] • 处置后1~2分钟后再次打开血流,用生理盐水除去凝胶化的肽水溶液,通过肉眼确认肝切面是否有出血。

[0135] • 利用20%福尔马林固定观察到止血效果的肝切面,通过HE染色进行病理组织学评价。

[0136] <结果>

[0137] 图2中,示出了肽水溶液对于本实施例的肝切面的出血的止血效果的例子。如表2所示,可确认:1%肽水溶液的情况下,2例中的2例均为完全止血效果,但3%肽水溶液的情况下,4例中仅1例为完全止血效果。另外在病理组织切片观察中,确认到凝胶化的肽水溶液紧贴于肝切面组织所产生的血管浅部的血管闭塞(图3)。

[0138] 表2

[0139]

No	浓度	处置时间	结果	所见
1	3%	2:00	×	主动脉出血不止
2	3%	2:00	○	完全止血
3	3%	1:00	△	确认到渗出那样的出血
4	3%	2:00	×	主动脉出血不止
5	1%	2:00	○	完全止血
6	1%	2:00	○	完全止血

[0140] 实施例3

[0141] 血液凝固能力降低的兔的腹部大动脉注射针穿孔模型中的肽水溶液的止血效果

[0142] 对于投与了抗凝固剂(肝素)的兔,利用腹部大动脉注射针穿刺模型评价肽水溶液的止血效果。

[0143] <材料>

[0144] • 肽水溶液

[0145] 3%肽水溶液(肽序列:Ac-(RADA)₄-NH₂, CPC Scientific, Inc公司制造)

[0146] • 动物

[0147] 日本白兔(3.0-4.0kg, Japan White, 普通, 由Funabashi Farm Co., Ltd. 购入)。如

下饲养:在以室温25℃、湿度65%、照明时间12小时(7:00-19:00)进行控制的饲养室内给食饲养用颗粒(JA Higashinohon Kumiai Shiryou),通过给水瓶自由给水。断食仅为试验当天早上,给水是自由的。

[0148] <方法>

[0149] • 对于兔,以3mg/kg皮下内投与Celactar 2%注射液(在100mL中含有2.0g赛拉嗪,Bayer Ltd.制造)后,以10mg/kg静脉内投与氯胺酮(在1mL中含有50mg氯胺酮,Fuji Chemical Industries,Ltd.制造),从而使其麻醉。

[0150] • 由下腔静脉投与1000单位肝素(Novo-Heparin for injection,持田制药,5千单位),人为地降低血液凝固能力。

[0151] • 通过正中切开对兔进行剖腹。露出约10cm的腹部大动脉,将血管从周围组织剥离,利用26G、25G、23G注射针(Terumo Corp.制造)进行血管穿刺。

[0152] • 确认出血后,利用止血钳对末梢侧和中枢侧进行止血钳止血,通过生理盐水、纱布除去出血的血液后,立即用肽水溶液进行处置。

[0153] • 处置后1~2分钟后开次打开血流,通过肉眼确认是否有出血。

[0154] <结果>

[0155] 图4中,示出了肽水溶液对于本实施例的血液凝固能力降低的兔的腹部大动脉出血的止血效果的例子。如表3所示,在26G、25G、23G的注射针穿孔模型中在3%肽水溶液的情况下确认到完全止血。

[0156] 表3

[0157]

No	注射针(G)	处置时间	结果	所见
1	23G	1:00	○	完全止血
2	25G	1:00	○	完全止血
3	25G	1:00	○	完全止血
4	26G	2:00	○	完全止血

[0158] 实施例4

[0159] 兔腹部大动脉、门静脉主干注射针穿孔模型中含糖的肽水溶液的止血效果

[0160] 利用腹部大动脉、门静脉主干的注射针穿孔模型评价含糖的肽水溶液的止血效果。

[0161] <材料>

[0162] • 肽水溶液

[0163] 1. 含白糖的肽水溶液(肽序列:Ac-(RADA)₄-NH₂,CPC Scientific,Inc公司制造,浓度2%和3%;白糖:和光纯药公司制造,浓度10%)

[0164] 2. 含葡萄糖的2%肽水溶液(肽序列:Ac-(RADA)₄-NH₂,CPC Scientific,Inc公司制造;葡萄糖:和光纯药公司制造,浓度5%)

[0165] 3. 含海藻糖的2%肽水溶液(肽序列:Ac-(RADA)₄-NH₂,CPC Scientific,Inc公司制造;海藻糖:和光纯药公司制造,浓度5%)

[0166] 4. 3%肽水溶液(肽序列:Ac-(RADA)₄-NH₂,CPC Scientific,Inc公司制造)

[0167] 5. 2%肽水溶液(肽序列:Ac-(RADA)₄-NH₂,CPC Scientific,Inc公司制造)

[0168] • 动物

[0169] 日本白兔(3.0-4.0kg,Japan White,普通,由Funabashi Farm Co.,Ltd.购入)。如下饲养:在以室温25℃、湿度65%、照明时间12小时(7:00-19:00)进行控制的饲养室内给食饲养用颗粒(JA Higashinohon Kumiai Shiryou),通过给水瓶自由给水。断食仅为试验当天早上,给水是自由的。

[0170] <方法>

[0171] • 对于兔,以3mg/kg皮下内投与Celactar 2%注射液(在100mL中含有2.0g赛拉嗪,Bayer Ltd.制造)后,以10mg/kg静脉内投与氯胺酮(在1mL中含有50mg氯胺酮,Fuji Chemical Industries,Ltd.制造),从而使其麻醉。

[0172] • 通过正中切开对兔进行剖腹。露出约10cm的腹部大动脉、门静脉主干,将各血管从周围组织剥离,对于腹部大动脉利用26G、25G、23G注射针(Terumo Corp.制造)进行血管穿刺,对于门静脉主干利用26G注射针(Terumo Corp.制造)进行血管穿刺。

[0173] • 确认出血后,利用止血钳对末梢侧和中枢侧进行止血钳止血,通过生理盐水、纱布除去出血的血液后,立即用肽水溶液进行处置。

[0174] • 处置后1~2分钟后开次打开血流,通过肉眼确认是否有出血。

[0175] <结果>

[0176] 图5中,示出了本实施例中的含糖的肽水溶液的止血效果的例子。如表4所示,在腹部大动脉23G、25G、26G注射针穿孔模型中,3%肽水溶液和含白糖的3%肽水溶液的止血效果相同。

[0177] 如表5所示,在门静脉主干26G注射针穿孔模型中,2%肽水溶液、含白糖的2%肽水溶液、含葡萄糖的2%肽水溶液、含海藻糖的2%肽水溶液的止血效果相同。

[0178] 表4

[0179]

No.	肽水溶液	穿刺部位	注射针尺寸 (G)	处置时间	结果	所见
1	3%	腹部大动脉	23	1:00	○	完全止血
2	3%	腹部大动脉	23	1:00	○	完全止血
3	3%	腹部大动脉	25	1:00	○	完全止血
4	3%	腹部大动脉	25	1:00	○	完全止血
5	3%	腹部大动脉	25	1:00	○	完全止血
6	3%	腹部大动脉	26	2:00	○	完全止血
7	含白糖的 3%	腹部大动脉	23	2:00	○	完全止血
8	含白糖的 3%	腹部大动脉	23	1:00	○	完全止血
9	含白糖的 3%	腹部大动脉	23	2:00	○	完全止血
10	含白糖的 3%	腹部大动脉	23	2:00	×	喷出性出血
11	含白糖的 3%	腹部大动脉	25	2:00	○	完全止血
12	含白糖的 3%	腹部大动脉	26	1:00	○	完全止血
13	含白糖的 3%	腹部大动脉	26	1:00	○	完全止血
14	含白糖的 3%	腹部大动脉	26	2:00	○	完全止血
15	含白糖的 3%	腹部大动脉	26	2:00	○	完全止血
16	含白糖的 3%	腹部大动脉	26	2:00	○	完全止血

[0180] 表5

[0181]

No.	肽水溶液	穿刺部位	注射针尺寸 (G)	处置时间	结果	所见
1	2%	门静脉主干	26G	2:00	○	完全止血
2	2%	门静脉主干	26G	2:00	○	完全止血
3	含葡萄糖的 2%	门静脉主干	26G	2:00	○	完全止血
4	含葡萄糖的 2%	门静脉主干	26G	2:00	○	完全止血
5	含葡萄糖的 2%	门静脉主干	26G	2:00	×	持续性出血
6	含白糖的 2%	门静脉主干	26G	2:00	○	完全止血
7	含海藻糖的 2%	门静脉主干	26G	2:00	○	完全止血

[0182] 实施例5

[0183] 兔肺漏模型中的含白糖的肽水溶液的肺漏封闭效果

[0184] 制作兔肺漏模型,比较含白糖的3%肽水溶液和生理盐水的肺漏封闭效果。

[0185] <材料>

[0186] • 肽水溶液

[0187] 1. 含白糖的3%肽水溶液(肽序列:Ac-(RADA)₄-NH₂,CPC Scientific,Inc公司制造;白糖:和光纯药公司制造,浓度10%)

[0188] 2. 生理盐水(株式会社大塚制药工厂制)

[0189] • 动物

[0190] 日本白兔(3.0-4.0kg,Japan White,普通,由Funabashi Farm Co.,Ltd.购入)。如下饲养:在以室温25℃、湿度65%、照明时间12小时(7:00-19:00)进行控制的饲养室内给食饲养用颗粒(JA Higashinihon Kumiai Shiryou),通过给水瓶自由给水。断食仅为试验当天早上,给水是自由的。

[0191] <方法>

[0192] • 对于兔,以3mg/kg皮下内投与Celactar 2%注射液(在100mL中含有2.0g赛拉嗪,Bayer Ltd.制造)后,以10mg/kg静脉内投与氯胺酮(在1mL中含有50mg氯胺酮,Fuji Chemical Industries,Ltd.制造),从而使其麻醉。

[0193] • 在利用人工呼吸器的辅助呼吸下将兔开胸。露出肺,用镊子较钝地损伤肺,制作伴有出血的肺漏。

[0194] • 通过生理盐水、纱布除去出血的血液后,用含白糖的3%肽水溶液、生理盐水处置出血面。

[0195] • 处置后约30秒后,通过肉眼在生理盐水中确认肺漏处是否存在出血和漏气。

[0196] <结果>

[0197] 图6示出了本实施例中的含白糖的肽水溶液所产生的肺漏封闭效果。如表6所示,在含白糖的3%肽水溶液的情况下确认到完全止血和肺漏封闭,但在生理盐水的情况下确

认到肺漏处持续性出血和漏气。

[0198] 表6

[0199]

溶液	处置时间	结果	备注
含白糖的3%	0:30	○	完全止血。肺漏处不漏气
生理盐水	-	×	肺漏处持续性出血和漏气

[0200] 实施例6

[0201] 兔胆管注射针穿孔模型中的肽水溶液的胆管壁闭塞效果

[0202] 制作兔注射针胆管穿孔模型,评价肽水溶液的胆管壁闭塞效果。

[0203] <材料>

[0204] • 肽水溶液

[0205] 3%肽水溶液(肽序列:Ac-(RADA)₄-NH₂,CPC Scientific,Inc公司制造)

[0206] • 动物

[0207] 日本白兔(3.0-4.0kg,Japan White,普通,由Funabashi Farm Co.,Ltd.购入)。如下饲养:在以室温25℃、湿度65%、照明时间12小时(7:00-19:00)进行控制的饲养室内给食饲养用颗粒(JA Higashinohon Kumiai Shiryou),通过给水瓶自由给水。断食仅为试验当天早上,给水是自由的。

[0208] <方法>

[0209] • 对于兔,以3mg/kg皮下内投与Celactar 2%注射液(在100mL中含有2.0g赛拉嗪,Bayer Ltd.制造)后,以10mg/kg静脉内投与氯胺酮(在1mL中含有50mg氯胺酮,Fuji Chemical Industries,Ltd.制造),从而使其麻醉。

[0210] • 通过正中切开对兔进行剖腹。露出约10cm的胆管,将其从周围组织剥离,利用26G注射针进行胆管穿刺。

[0211] • 使胆汁流出,确认胆汁流出不止后,用止血钳截断胆汁流。

[0212] • 通过生理盐水、纱布除去漏出的胆汁后,用3%肽水溶液处置。

[0213] • 处置后2分钟后取下截断胆汁流的止血钳,通过肉眼确认穿孔部位是否有胆汁流出。

[0214] <结果>

[0215] 图7中,示出了本实施例中的肽水溶液所产生的胆管壁闭塞效果。如表7所示,在3%肽水溶液的情况下确认到完全的胆管壁闭塞效果。

[0216] 表7

[0217]

No.	注射针尺寸 (G)	截断时间	结果	所见
1	26G	2:00	○	肽水溶液因胆汁而凝胶化,胆管穿孔部完全闭塞

[0218] 实施例7

[0219] 狗膀胱内肿瘤摘除术中肽水溶液所产生的切除部的隆起维持效果和止血效果

[0220] 在狗膀胱内肿瘤摘除术中,向膀胱粘膜下注入肽水溶液,对肽水溶液所产生的切除部的隆起维持效果和止血效果进行评价。

[0221] <材料>

[0222] • 肽水溶液

[0223] 3%肽水溶液(肽序列:Ac-(RADA)₄-NH₂,CPC Scientific,Inc公司制造)

[0224] • 动物

[0225] 狗(雄性)

[0226] <方法>

[0227] 在全身麻醉管理下,按照以下步骤实施狗膀胱内肿瘤摘除术。

[0228] • 通过电烙(Erbe,Inc.制造)切开下腹部后,使用电烙切开膀胱,使膀胱内的肿瘤露出(从膀胱粘膜隆起的基部的直径为0.5cm左右的带蒂肿瘤)。

[0229] • 将3%肽水溶液分四次、每次0.5mL注入肿瘤基部周围的粘膜下,确认粘膜上的肿瘤隆起。

[0230] • 使肿瘤隆起后,通过电烙切除肿瘤。

[0231] • 从注入肽水溶液至肿瘤切除完成为止的时间为约2分钟。

[0232] <结果>

[0233] 如图8所示,通过将肽水溶液注入膀胱粘膜下而使肿瘤隆起,在切除中也能够维持隆起状态。另外,肿瘤切除中和切除后没有确认到出血。

[0234] 实施例8

[0235] 兔胃粘膜切开模型中的2%肽水溶液的止血效果

[0236] 制作兔胃粘膜切开出血模型,评价2%肽水溶液的止血效果。

[0237] <材料>

[0238] • 肽水溶液

[0239] 1. 2%肽水溶液(肽序列:Ac-(RADA)₄-NH₂,CPC Scientific,Inc公司制造)

[0240] • 动物

[0241] 日本白兔(3.0-4.0kg,Japan White,普通,由Funabashi Farm Co.,Ltd.购入)。如下饲养:在以室温25℃、湿度65%、照明时间12小时(7:00-19:00)进行控制的饲养室内给食饲养用颗粒(JA Higashinohon Kumiai Shiryou),通过给水瓶自由给水。断食仅为试验当天早上,给水是自由的。

[0242] <方法>

[0243] • 对于兔,以3mg/kg皮下内投与Celactar 2%注射液(在100mL中含有2.0g赛拉嗪,Bayer Ltd.制造)后,以10mg/kg静脉内投与氯胺酮(在1mL中含有50mg氯胺酮,Fuji Chemical Industries,Ltd.制造),从而使其麻醉。

[0244] • 通过正中切开对兔进行剖腹,切开胃后,露出胃粘膜,用手术刀锋利地切开约1cm,制作出血创伤。

[0245] • 确认到切开创伤的渗出性出血后,用纱布尽可能地除去血液,然后用肽水溶液处置所制作的胃粘膜切开创伤。

[0246] • 处置后1分钟后,用生理盐水除去凝胶化的肽水溶液,通过肉眼确认胃粘膜切开创伤是否有出血。

[0247] <结果>

[0248] 图9中,示出了肽水溶液对于本实施例的胃粘膜切开创伤的出血的止血效果的例子。在涂布肽水溶液后没有确认到出血。

[0249] 实施例9

[0250] 兔肝脏横切模型中的1%肽水溶液的止血效果

[0251] 制作兔肝脏横切出血模型,评价1%肽水溶液的止血效果。

[0252] <材料>

[0253] • 肽水溶液

[0254] 1. 1%肽水溶液(肽序列:IEIK9(序列号4),CPC Scientific,Inc公司制造)

[0255] 2. 1%肽水溶液(肽序列:IEIK13,CPC Scientific,Inc公司制造)

[0256] 3. 1%肽水溶液(肽序列:KLD,CPC Scientific,Inc公司制造)

[0257] • 动物

[0258] 日本白兔(3.0-4.0kg,Japan White,普通,由Funabashi Farm Co.,Ltd.购入)。如下饲养:在以室温25℃、湿度65%、照明时间12小时(7:00-19:00)进行控制的饲养室内给食饲养用颗粒(JA Higashinohon Kumiai Shiryou),通过给水瓶自由给水。断食仅为试验当天早上,给水是自由的。

[0259] <方法>

[0260] • 对于兔,以3mg/kg皮下内投与Celactar 2%注射液(在100mL中含有2.0g赛拉嗪,Bayer Ltd.制造)后,以10mg/kg静脉内投与氯胺酮(在1mL中含有50mg氯胺酮,Fuji Chemical Industries,Ltd.制造),从而使其麻醉。

[0261] • 通过正中切开对兔进行剖腹,用手术刀将肝脏左叶锋利地横切约1cm,制作出血创伤。

[0262] • 确认到切开创伤的渗出性出血后,用纱布尽可能地除去血液,然后用肽水溶液处置所制作的肝切开创伤。

[0263] • 处置后1分钟后,用生理盐水除去凝胶化的肽水溶液,通过肉眼确认肝切开创伤是否有出血。

[0264] <结果>

[0265] 图10中,示出了肽水溶液对于本实施例的肝切开创伤的出血的止血效果的例子。在出血创面使IEIK9肽水溶液为上层时,完全没有产生凝胶化,没有确认到止血效果,但IEIK13肽水溶液和KLD肽水溶液在涂布后产生凝胶化,没有确认到出血。

[0266] 实施例10

[0267] 兔胆汁所引起的肽水溶液的自组装的确认

[0268] 通过各种肽水溶液对兔胆汁所引起的肽水溶液的自组装进行评价。

[0269] <材料>

[0270] • 肽水溶液

[0271] 1. 1.5%肽水溶液(肽序列:Ac-(RADA)₄-NH₂,CPC Scientific,Inc公司制造)

[0272] 2. 1%肽水溶液(肽序列:IEIK9,CPC Scientific,Inc公司制造)

[0273] 3. 1%肽水溶液(肽序列:IEIK13,CPC Scientific,Inc公司制造)

[0274] 4. 1%肽水溶液(肽序列:KLD,CPC Scientific,Inc公司制造)

[0275] • 动物

[0276] 日本白兔(3.0-4.0kg, Japan White, 普通, 由Funabashi Farm Co., Ltd. 购入)。如下饲养: 在以室温25°C、湿度65%、照明时间12小时(7:00-19:00)进行控制的饲养室内给食饲养用颗粒(JA Higashinohon Kumiai Shiryou), 通过给水瓶自由给水。断食仅为试验当天早上, 给水是自由的。

[0277] <方法>

[0278] • 对于兔, 以3mg/kg皮下内投与Celactar 2%注射液(在100mL中含有2.0g赛拉嗪, Bayer Ltd. 制造)后, 以10mg/kg静脉内投与氯胺酮(在1mL中含有50mg氯胺酮, Fuji Chemical Industries, Ltd. 制造), 从而使其麻醉。

[0279] • 通过正中切开对兔进行剖腹, 利用23G注射针(Terumo Corp. 制造)由胆囊采集胆汁。

[0280] • 制作自组装前的各肽水溶液的液滴(直径约5-8mm左右), 以覆盖该肽水溶液的方式, 使采集的胆汁缓慢地从上方流下。

[0281] • 约30秒后除去胆汁, 确认自组装后, 利用23G注射针以物理方式将自组装凝胶破碎。

[0282] <结果>

[0283] 图11中, 示出了本实施例的各肽水溶液由于胆汁而引起的自组装的例子。在除IEIK9之外的所有的肽水溶液中确认到胆汁所引起的自组装。

[0284] 实施例11

[0285] 大鼠门静脉栓塞术中的3%肽水溶液的血管栓塞效果的确认

[0286] 由大鼠门静脉注入3%肽水溶液, 评价血管栓塞效果。

[0287] <材料>

[0288] • 3%肽水溶液(肽序列: Ac-(RADA)₄-NH₂, CPC Scientific, Inc公司制造)

[0289] • 动物

[0290] 将SD大鼠(250g, 雄性, 由Japan SLC, Inc. 购入)在以温度22±3°C、湿度50±20%、换气次数10~15次/小时、照明时间为人工照明12小时(8:00~20:00)的条件进行控制的饲养室内饲养, 使用金属制给食器使其自由摄取固态饲料、CRF-1(Oriental Yeast Co., Ltd.), 使用自动给水装置使其自由摄取自来水。

[0291] <方法>

[0292] • 利用二乙醚(Kishida Chemical Co., Ltd. 制造)使大鼠吸入麻醉。

[0293] • 通过正中切开对大鼠进行剖腹, 露出门静脉。

[0294] • 通过26G注射针(Terumo Corp. 制造)由门静脉主干注入4mL肽水溶液, 立即用肽水溶液对穿刺部位的出血进行止血。

[0295] • 注入后, 在5分钟后摘出肝脏, 立即用10%福尔马林(和光纯药工业株式会社制造)固定。

[0296] • 固定一周后, 对组织进行苏木精-伊红(HE)染色。

[0297] <结果>

[0298] 如图12所示, 确认到肽水溶液所产生的门静脉栓塞。

[0299] 实施例12

- [0300] 溶解有碘帕醇的肽水溶液的自组装的确认
- [0301] 对溶解有碘帕醇的肽水溶液的自组装能力进行评价。
- [0302] <材料>
- [0303] • 肽水溶液
- [0304] 3%肽水溶液(肽序列:Ac-(RADA)₄-NH₂,CPC Scientific,Inc公司制造)
- [0305] • 细胞培养用培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium,GIBCO公司制造)
- [0306] • 碘帕醇(和光纯药工业株式会社制造)
- [0307] <方法>
- [0308] • 对于1ml的3%肽水溶液,溶解306.2mg碘帕醇。
- [0309] • 用MilliQ水稀释含碘帕醇的3%肽水溶液,制作0.0468%肽水溶液。对100μl的3%含碘帕醇的肽水溶液和0.0468%含碘帕醇的肽水溶液,以每次50μl、分6次添加300μl的细胞培养用培养基,并使培养基包围和接触3%含碘帕醇的肽水溶液和0.0468%含碘帕醇的肽水溶液。添加培养基后15分钟,除去周围的培养基,目视确认凝胶化。
- [0310] <结果>
- [0311] 如图13所示,确认到含碘帕醇的肽水溶液的自组装。
- [0312] 实施例13
- [0313] 含碘帕醇的3%肽水溶液通过微导管后的自组装的确认
- [0314] 对溶解有碘帕醇的3%肽水溶液的自组装能力进行评价。
- [0315] <材料>
- [0316] • 肽水溶液
- [0317] 3%肽水溶液(肽序列:Ac-(RADA)₄-NH₂,CPC Scientific,Inc公司制造)
- [0318] • 细胞培养用培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium,GIBCO公司制造)
- [0319] • 碘帕醇(和光纯药工业株式会社制造)
- [0320] • 微导管(2.4Fr,150/20,Boston Scientific公司制造)
- [0321] <方法>
- [0322] • 对于1ml的3%肽水溶液,溶解306.2mg碘帕醇。
- [0323] • 以经微导管的方式将含碘帕醇的3%肽水溶液排出到细胞培养用培养基中。
- [0324] <结果>
- [0325] 如图14所示,确认到含碘帕醇的3%肽水溶液的自组装。

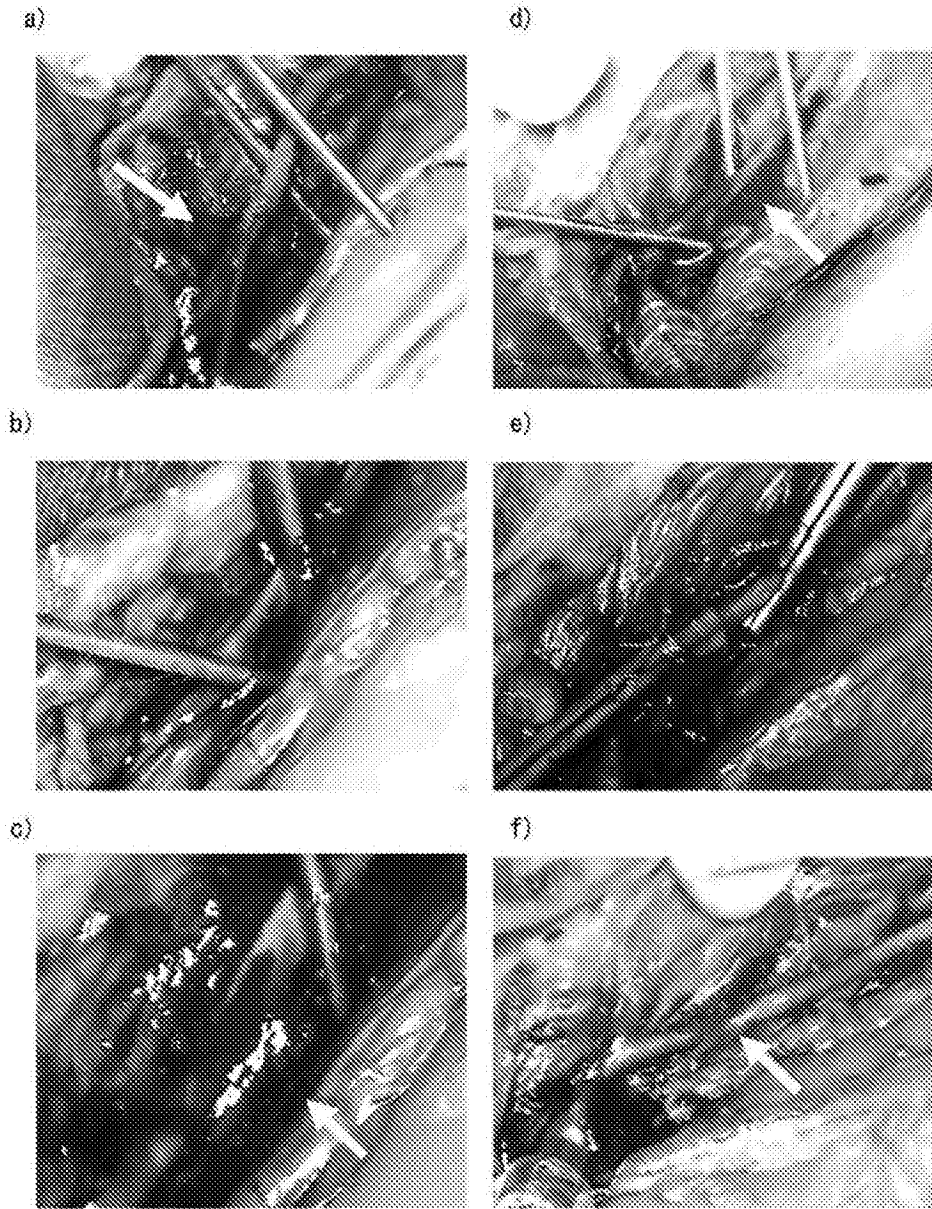


图1

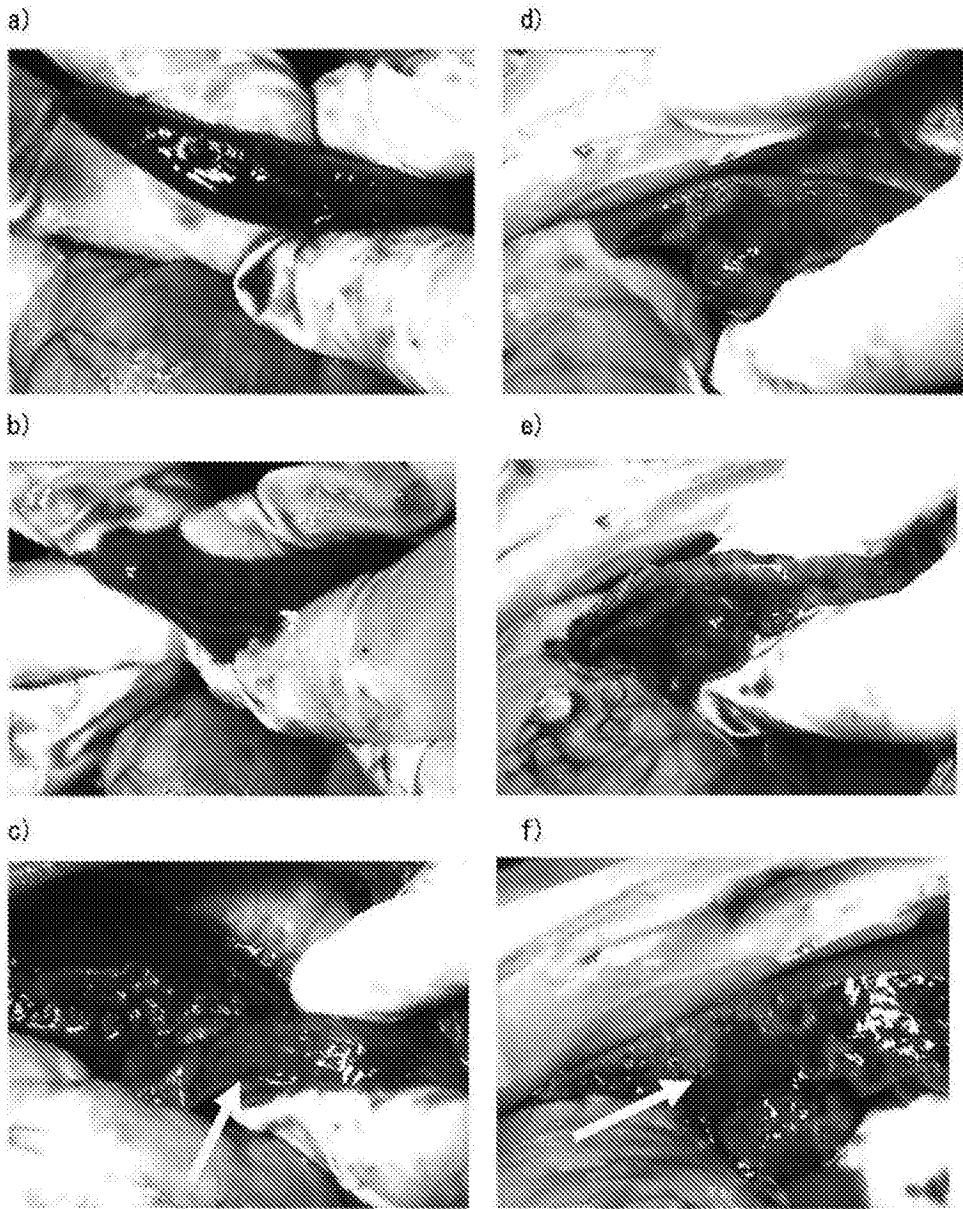


图2

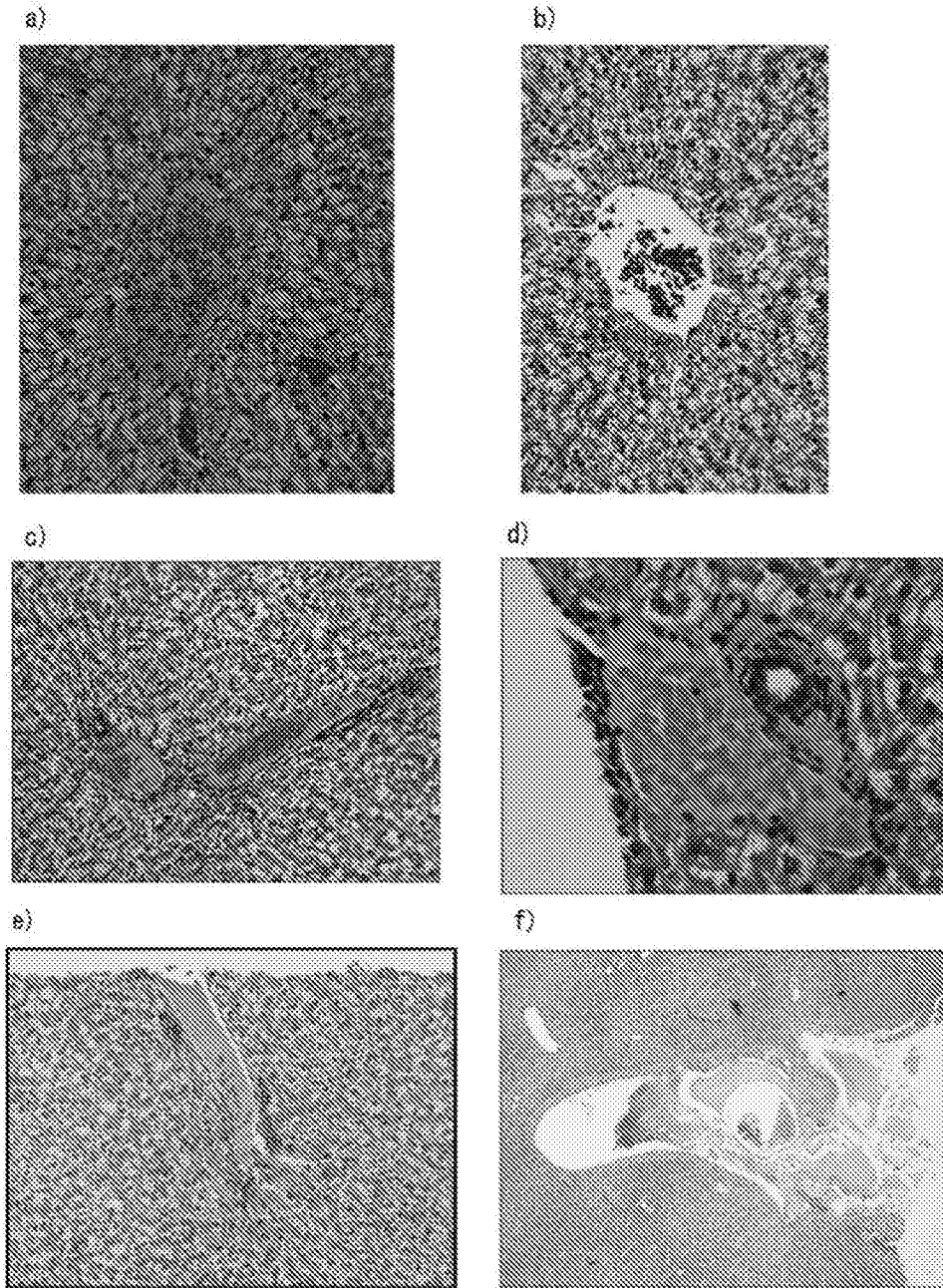


图3

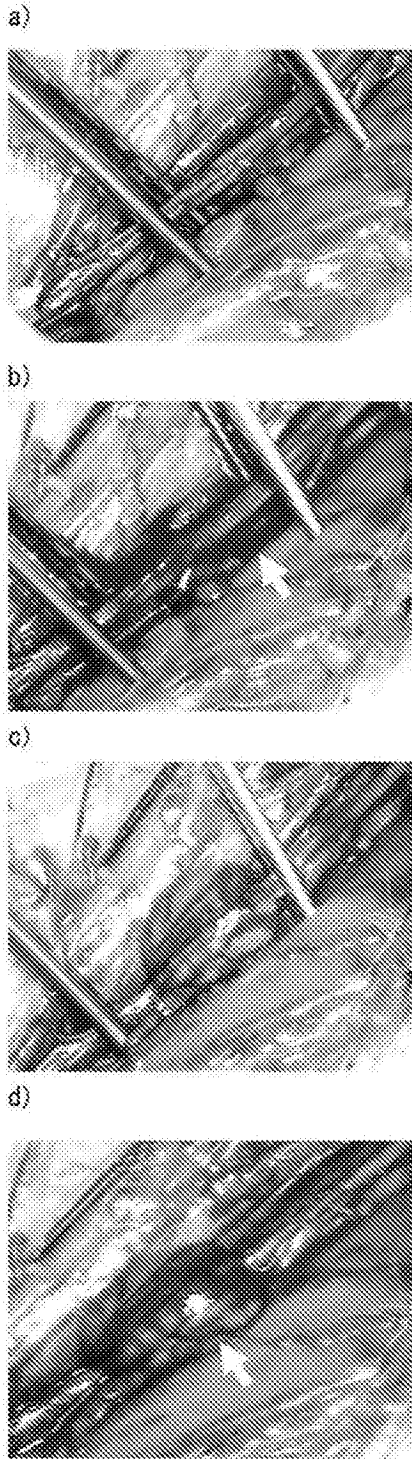


图4

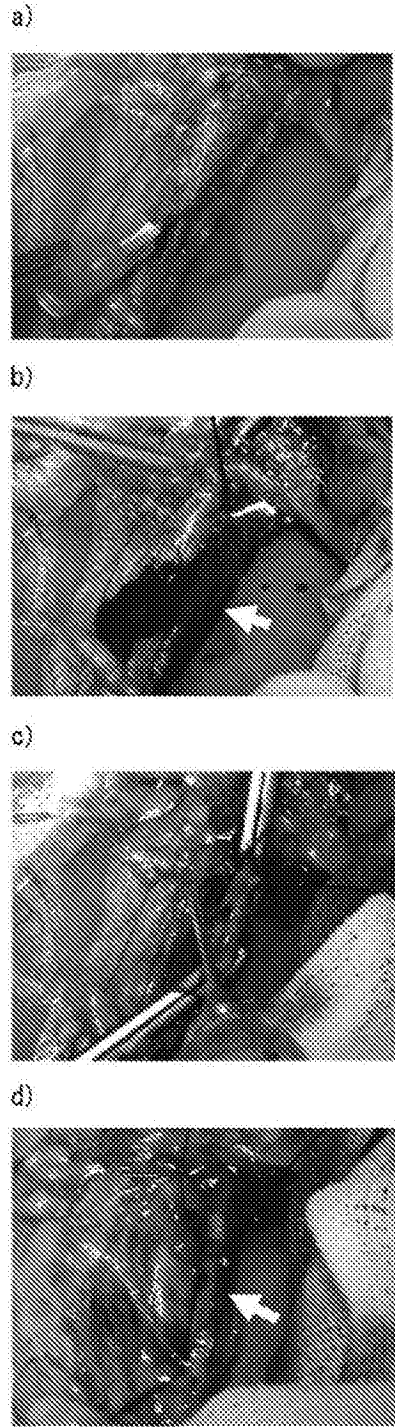


图5

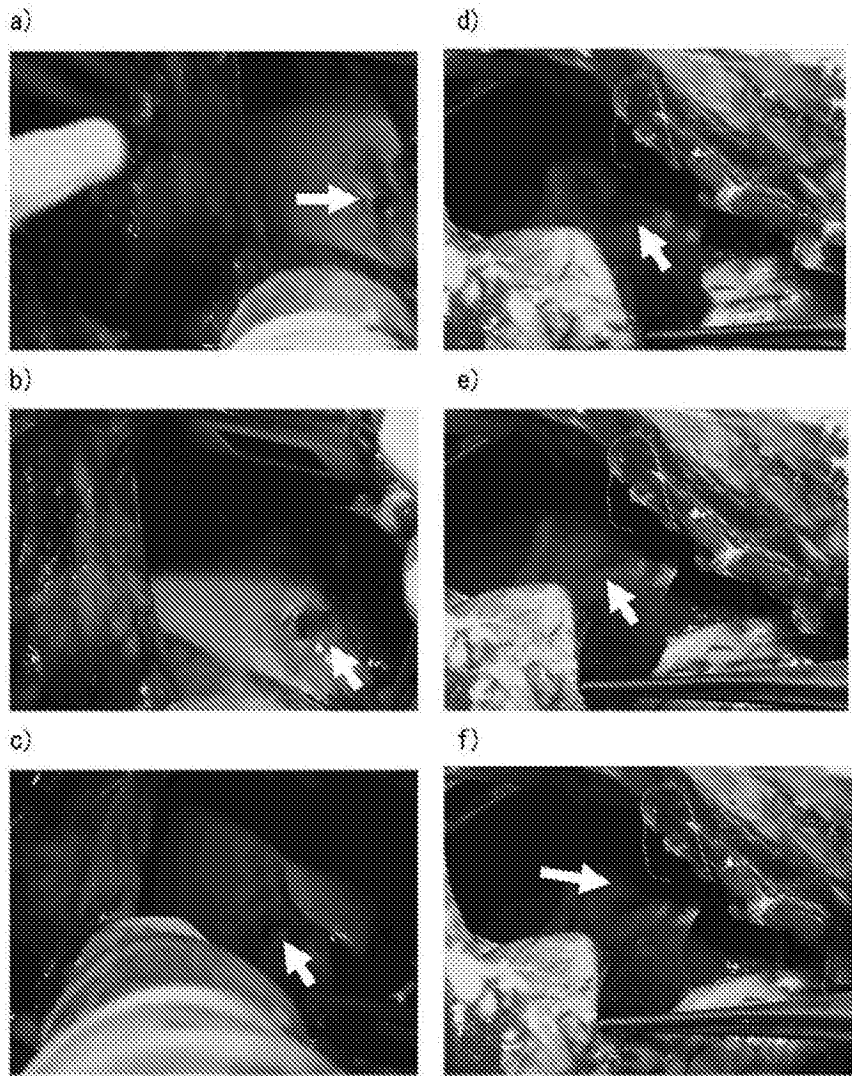


图6

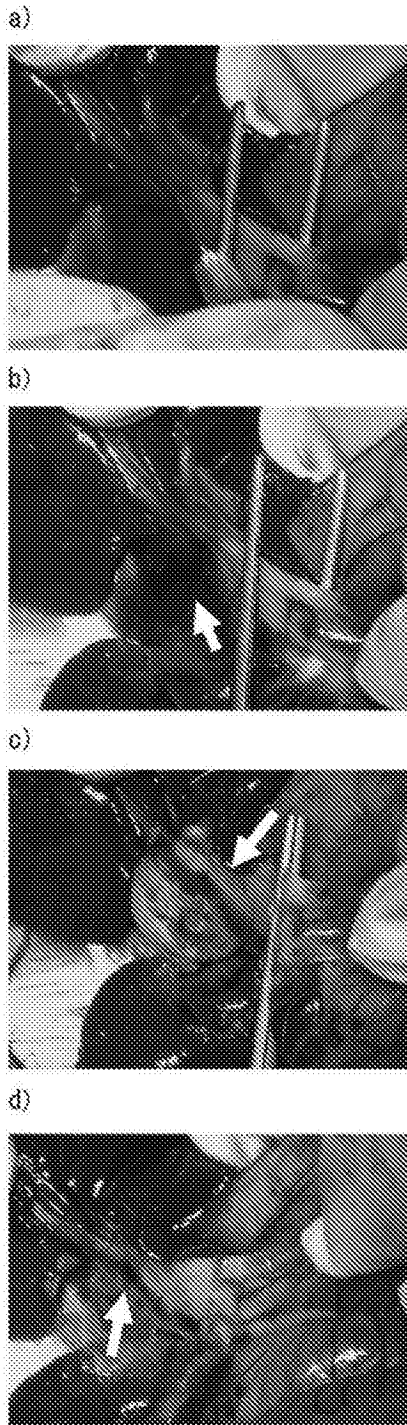


图7

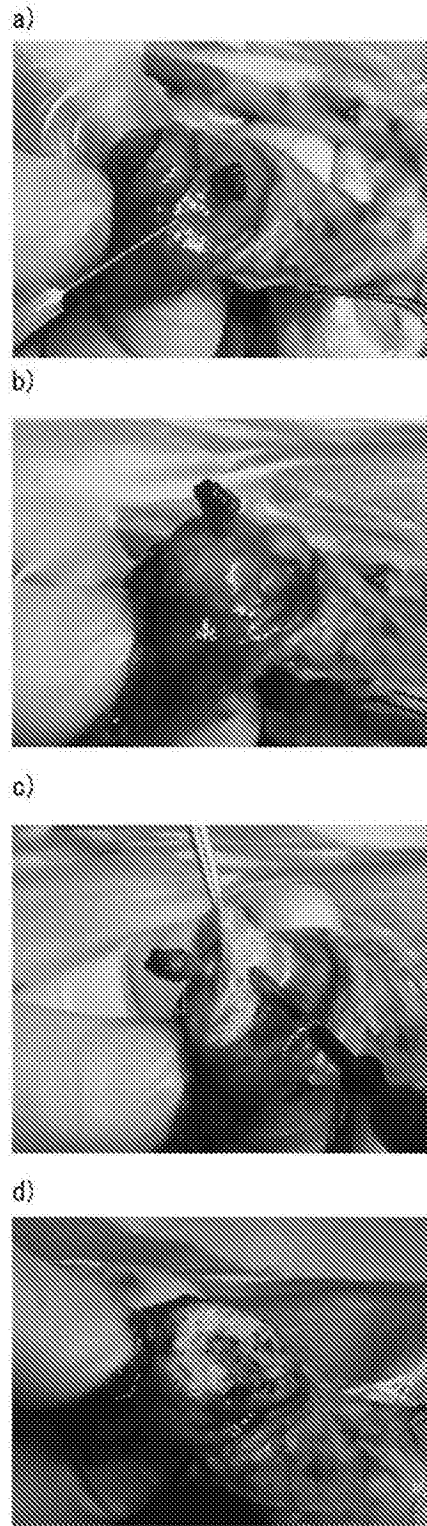


图8

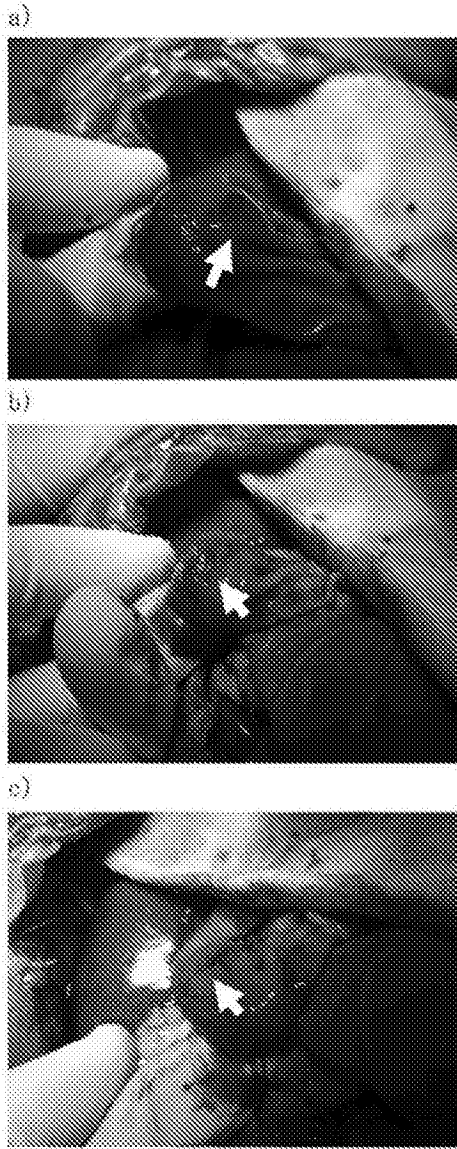


图9

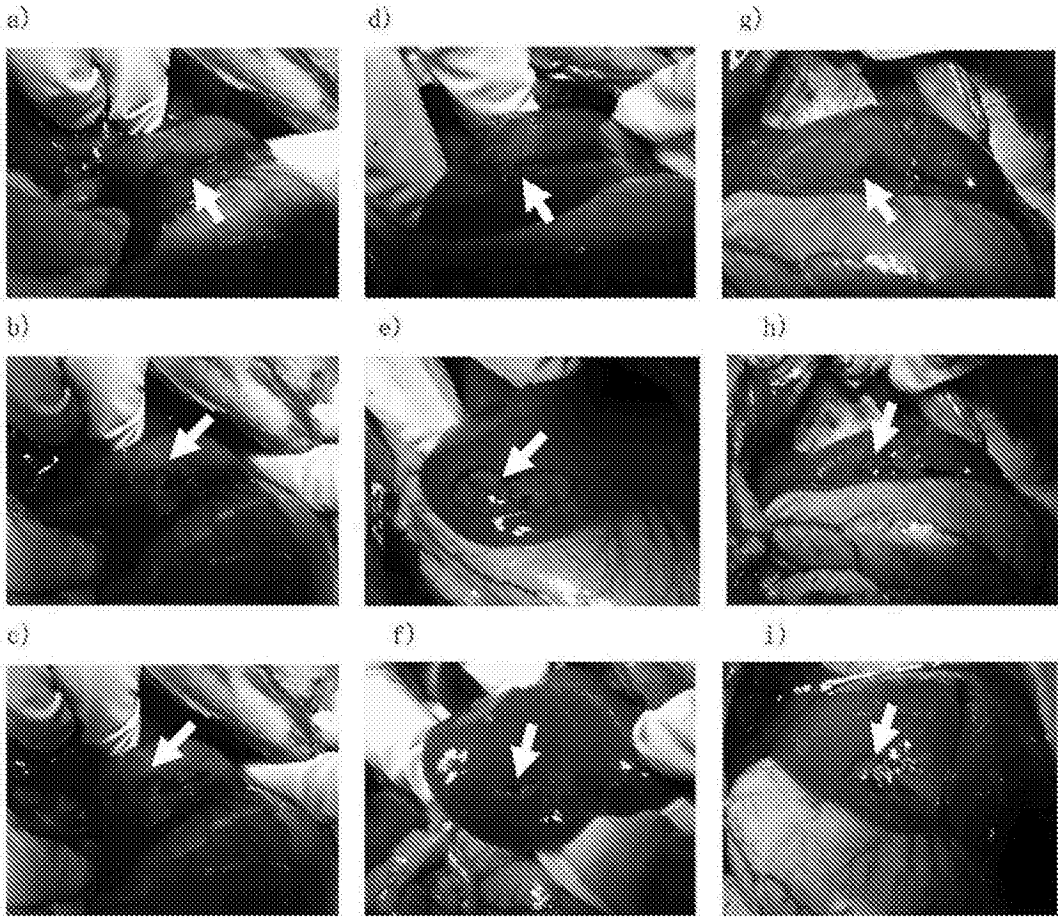


图10

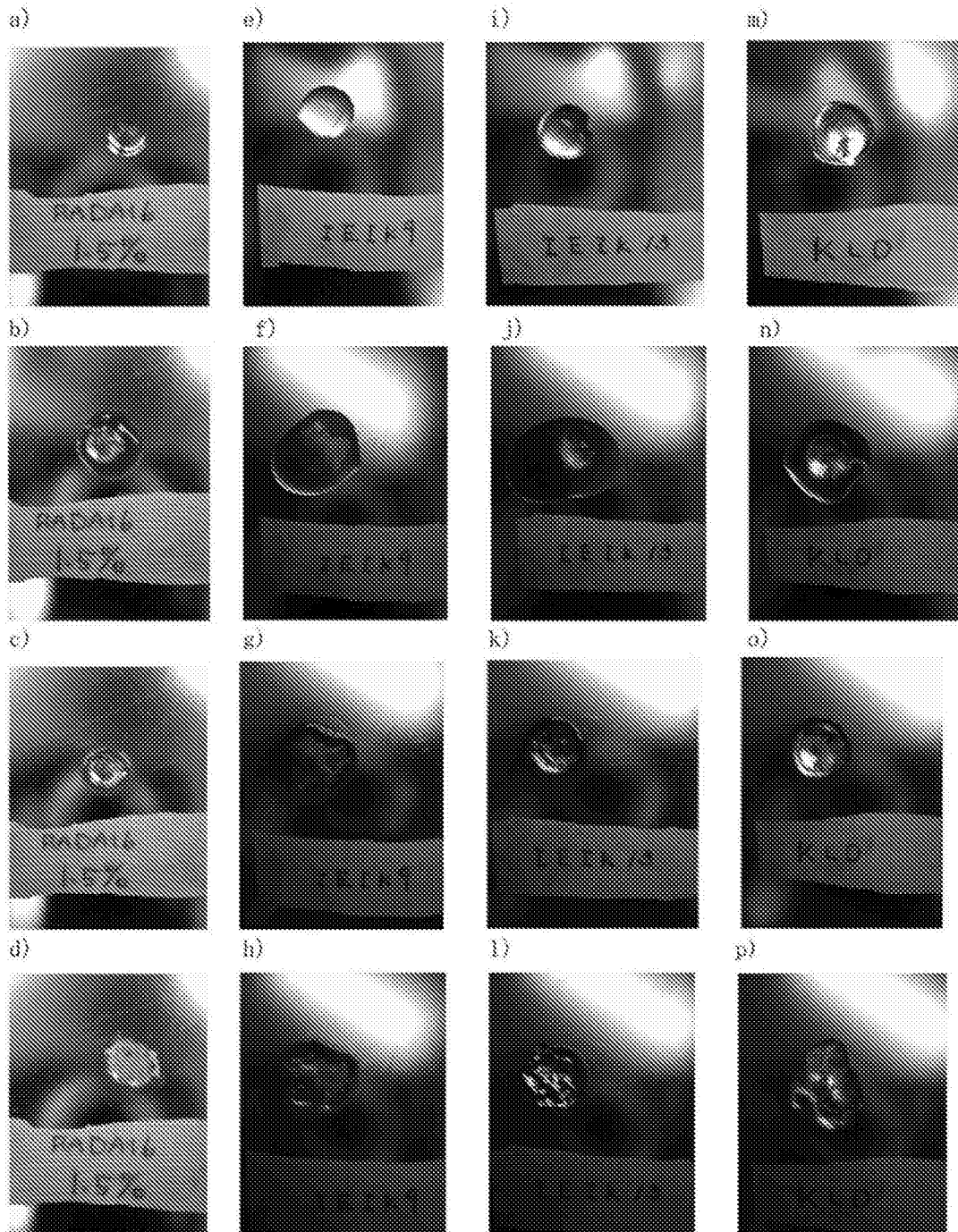
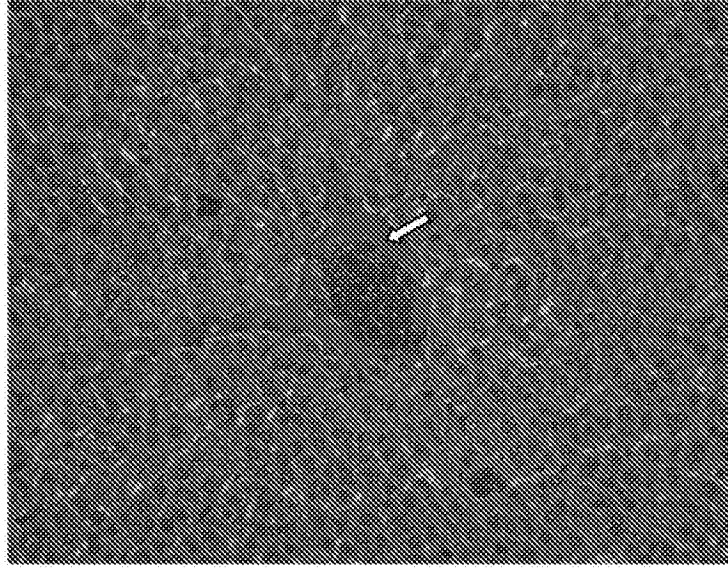


图11

a)



b)

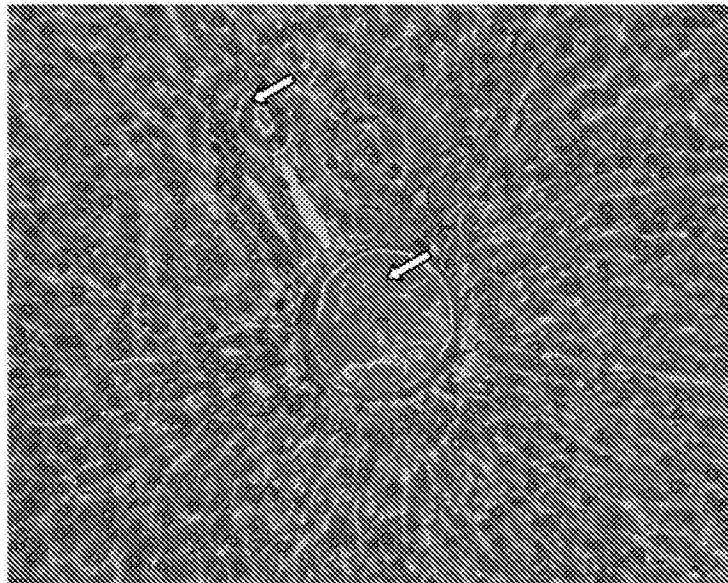


图12

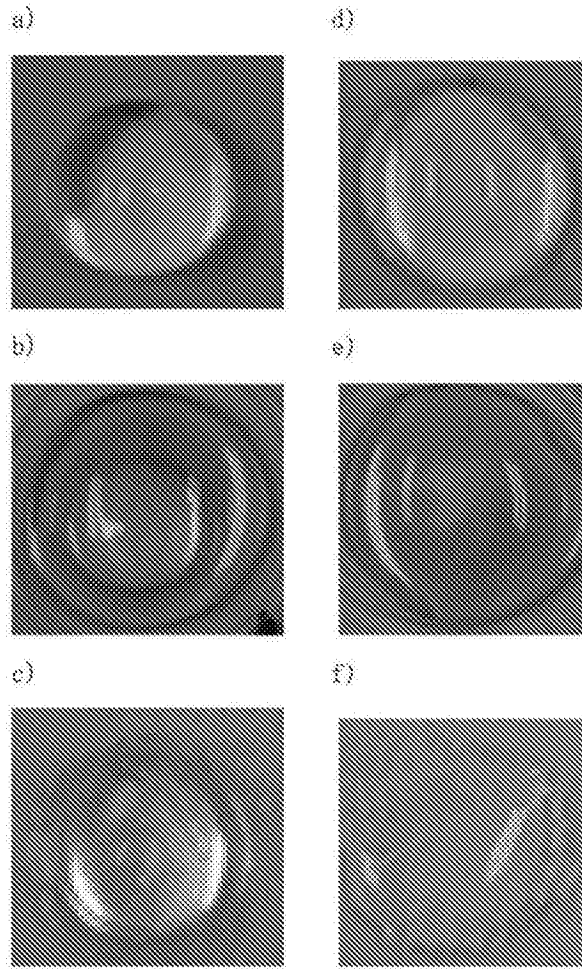


图13

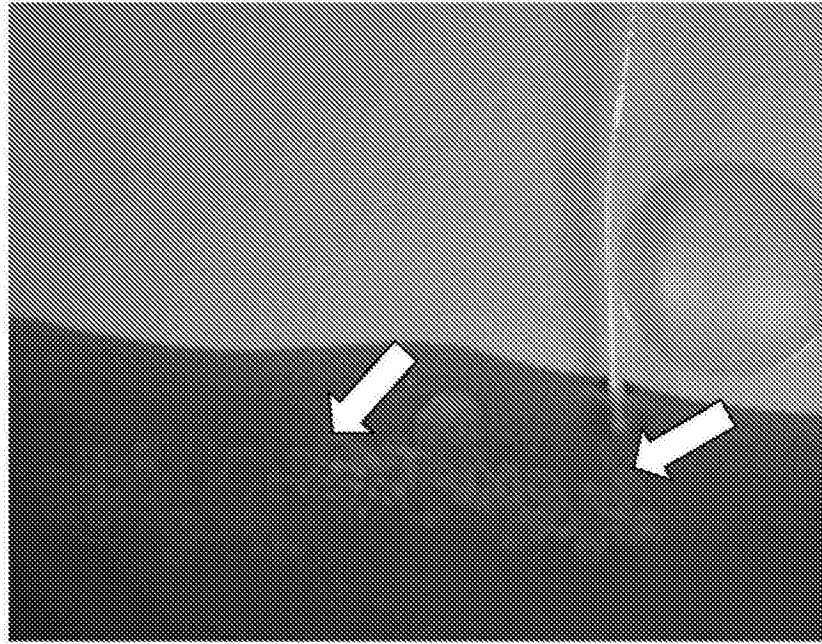


图14