



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년05월07일

(11) 등록번호 10-1975624

(24) 등록일자 2019년04월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/38 (2006.01) A61K 38/48 (2006.01)

A61K 47/42 (2017.01) A61L 24/10 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-7013752

(22) 출원일자(국제) 2012년10월25일

심사청구일자 2017년08월29일

(85) 번역문제출일자 2014년05월22일

(65) 공개번호 10-2014-0082841

(43) 공개일자 2014년07월02일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2012/071136

(87) 국제공개번호 WO 2013/060770

국제공개일자 2013년05월02일

(30) 우선권주장

61/552,270 2011년10월27일 미국(US)

(56) 선행기술조사문현

JP2007501784 A\*

US06066325 A\*

WO2003007845 A1\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문현

(73) 특허권자

백스터 인터내셔널 인코포레이티드

미국 일리노이주 60015 디어필드 원 백스터 파크  
웨이

백스터 헬쓰케어 에스에이

스위스 8152 글라트파르크 (오프피콘) 투르가우  
에르슈트라쎄 130

(72) 발명자

맥코이 질

미국 94087 캘리포니아주 서니베일 선더버드 애비  
뉴 1380

드와이어 조셉 에프

미국 60030 일리노이주 그레이슬레이크 리치필드  
코트 211

양 지평

미국 60089 일리노이주 베팔로 그로브 조든 테라  
스 2111

(74) 대리인

양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 14 항

심사관 : 이예리

(54) 발명의 명칭 지혈 조성물

### (57) 요 약

발명은 지혈에 사용하기 적합한 입상 형태의 가교된 젤라틴을 포함하는 지혈 조성물을 공개하며, 여기서 조성물은 15.0 내지 19.5 % (w/w), 바람직하게는 16.0 내지 19.5 % (w/w), 16.5 내지 19.5 % (w/w), 17.0 내지 18.5 % (w/w) 또는 17.5 내지 18.5 % (w/w), 보다 바람직하게는 16.5 내지 19.0 % (w/w) 또는 16.8 내지 17.8 % (w/w), 특히 바람직하게는 16.5 내지 17.5 % (w/w)을 함유한 페이스트 형태로 존재하며, 여기서 조성물은 압출 개선제를 포함한다.

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

15.0 내지 19.5 % (w/w)의 가교된 젤라틴, 또는 16.0 내지 19.5 % (w/w), 16.5 내지 19.5 % (w/w), 17.0 내지 18.5 % (w/w), 17.5 내지 18.5 % (w/w), 16.5 내지 19.0 % (w/w), 16.8 내지 17.8 % (w/w), 또는 16.5 내지 17.5 % (w/w)을 함유한 페이스트 형태로 존재하며 압출 개선제를 포함하고, 압출 개선제는 0.5 내지 5.0 % (w/w)의 양의 알부민인, 지혈에 사용하기 적합한 입상 형태의 가교된 젤라틴을 포함하는 지혈 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 압출 개선제가 1.0 내지 5.0 % (w/w), 2.0 내지 4.5 % (w/w), 1.5 내지 5.0 % (w/w), 또는 1.5 % (w/w)의 양의 알부민인 지혈 조성물.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 가교된 젤라틴이 글루타르알데히드-가교된 젤라틴 또는 제니핀-가교된 젤라틴인 지혈 조성물.

#### 청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 가교된 젤라틴이 B 형 젤라틴인 지혈 조성물.

#### 청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 가교된 젤라틴이 과립 물질로 제공되는 지혈 조성물.

#### 청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 가교된 젤라틴이 100 내지 1000  $\mu\text{m}$ , 200 내지 800  $\mu\text{m}$ , 또는 350 내지 550  $\mu\text{m}$ 의 입자 크기를 가지는 지혈 조성물.

#### 청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물이 트롬빈, 10 내지 1000 I.U. 트롬빈/ml, 또는 250 내지 700 I.U. 트롬빈/ml을 함유하는 지혈 조성물.

#### 청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 상처, 출혈, 손상된 조직, 출혈 조직 및/또는 골 결손으로 구성된 군에서 선택되는 상해의 치료에 사용하기 위한 지혈 조성물.

#### 청구항 9

삭제

#### 청구항 10

a) 15.0 내지 19.5 % (w/w) 가교된 젤라틴, 또는 16.0 내지 19.5 % (w/w), 16.5 내지 19.5 % (w/w), 17.0 내지 18.5 % (w/w), 17.5 내지 18.5 % (w/w), 16.5 내지 19.0 % (w/w), 16.8 내지 17.8 % (w/w), 또는 16.5 내지 17.5 % (w/w)을 함유하는 유동성 페이스트로 재구성되는 입상 형태의 가교된 젤라틴을 포함하는 건조 지혈 조성물, 및

b) 건조 지혈 조성물의 재구성을 위한 제약상 허용되는 희석제

를 포함하고,

건조 지혈 조성물 또는 제약상 허용되는 희석제 중 하나가 0.5 내지 5.0 % (w/w) 사이, 1.0 내지 5.0 % (w/w), 2.0 내지 4.5 % (w/w), 1.5 내지 5.0 % (w/w), 또는 1.5 % (w/w)의 재구성된 페이스트 내 알부민 농도로 유도

하는 양으로 일부만을 포함하는,

상처, 출혈, 손상된 조직 및/또는 출혈 조직으로 구성된 군에서 선택되는 상해의 치료를 위한 가교된 젤라틴의 유동성 페이스트를 제작하는 키트.

#### 청구항 11

제10항에 있어서, 상기 제약상 허용되는 희석제가 3.0 내지 10.0의 pH에서 완충액 또는 완충 시스템을 포함하는 키트.

#### 청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서, 상기 제약상 허용되는 희석제가 트롬빈, 10 내지 1000 I.U. 트롬빈/ml, 또는 250 내지 700 I.U. 트롬빈/ml을 포함하는 키트.

#### 청구항 13

제10항 또는 제11항에 있어서, 상기 제약상 허용되는 희석제가 NaCl, CaCl<sub>2</sub> 및 아세트산 나트륨으로 구성된 군에서 선택되는 물질을 함유하는 키트.

#### 청구항 14

지혈 조성물이 제1 주사기에 제공되며, 재구성을 위한 희석제가 제2 주사기에 제공되며, 제1 및 제2 주사기가 서로 연결되고, 유체가 제1 주사기 내로 전해져 유동성 형태의 지혈 조성물을 생산하며; 선택적으로 유동성 형태의 지혈 조성물을 한 번 이상 제2 주사기로 되돌리는, 제1항 또는 제2항에 따른 지혈 조성물의 사용 준비된 형태 제공 방법.

#### 청구항 15

제14항에 있어서, 상기 유동성 형태의 지혈 조성물이 100 내지 1000  $\mu\text{m}$  크기를 가진 50 % (w/w) 초과, 또는 100 내지 1000  $\mu\text{m}$  크기를 가진 80 % (w/w) 초과인 입자를 함유하는 방법.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 지혈 조성물 및 이러한 조성물의 제조 방법에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0002] 생체적합성, 생분해성의 건조 안정한 과립 물질을 포함하는 건조 보관-안정성 형태의 지혈 조성물은 예컨대, W098/008550A 또는 W02003/007845A에 공지되어 있다. 이러한 제품은 지혈을 위하여 당 업계에서 성공적으로 이용되어 왔다. 플로실<sup>®</sup>(Floseal<sup>®</sup>)은 트롬빈-함유 용액 중에 팽윤되어 유동성 페이스트를 형성하는 과립 젤라틴 매트릭스로 구성된 매우 효과적인 지혈제의 예이다.

[0003] 이러한 제품은 인간에 적용되어야 하기 때문에, 최종 제품 및 그의 성분의 품질, 보관-안정성 및 무균성을 위한 최고의 안전 기준을 제공하는 것이 필요하다. 또한, 제조 및 취급은 가능한 한 편리하고 효율적으로 행해져야 한다.

[0004] 이 분야에서 성공적인 제품(상기 언급한 플로실<sup>®</sup> 제품)은 재구성된 동결건조 트롬빈 용액과 함께 사용되는 젤라틴 매트릭스를 활용한다. 젤라틴 매트릭스는 젤라틴 및 약 11 내지 14.5 %의 젤라틴 함량을 가진 트롬빈의 유동성 과립 형태로 적용된다. 보다 낮은 젤라틴 함량은 특히 고 혈류의 상태하의, 치료 부위에서 제품이 잔존하도록 하는데 있어서의 어려움으로 인해 약화된 성능을 가진 맑은 제품을 유발한다. 보다 높은 젤라틴 입자 농도는 유동에 대한 보다 높은 저항성으로 인해, 주사기 또는 카테터 등의 보통의 투여 수단에 의해 전달되는 것이 어려운 제품을 유도한다. 조성물 내 가소제 예컨대, 폴리에틸렌 글리콜, 소르비톨, 글리세롤 등의 포함이 제안(EP0927053B1)되어 왔고, 압출력을 약화시킬 수 있으나, 이러한 물질의 포함이 필연적으로 성능을 향상시키는 것은 아니다.

[0005] 본 발명의 목적은 당 업계에 따른 플로실 등의 젤라틴 제품과 비교하여 항상된 부착 및 지혈 성질을 가진 가교된 젤라틴에 기반한 지혈 조성물 및 이러한 지혈 조성물의 제조 방법을 제공하는 것이다. 조성물은 또한 편리하고 유용한 방식으로 즉, 내시경 수술 및 혈관 수술에서 유용한 유동성 페이스트로서 제공되어야 한다. 제품은 40 N 이하, 바람직하게는 35 N 미만, 특히 바람직하게는 20 N 미만의 압출력을 가져야 한다. 제품은 바람직하게는 시간을 소모하는 재구성 단계 없이도 상해에 직접 적용될 수 있는, "사용-준비된" 지혈 조성물의 편리한 제공이 가능한 제품 형식으로 제공되어야 한다.

### 발명의 내용

[0006] <발명 요약>

[0007] 따라서, 본 발명은 지혈에 사용하기 적합한 입상 형태의 가교된 젤라틴을 포함하는 지혈 조성물을 제공하며, 여기서 조성물은 15.0 내지 19.5 % (w/w)의 가교된 젤라틴, 바람직하게는 16.0 내지 19.5 % (w/w), 16.5 내지 19.5 % (w/w), 17.0 내지 18.5 % (w/w) 또는 17.5 내지 18.5 % (w/w), 보다 바람직하게는 16.5 내지 19.0 % (w/w) 또는 16.8 내지 17.8 % (w/w), 특히 바람직하게는 16.5 내지 17.5 % (w/w)를 함유한 페이스트 형태로 존재하며, 여기서 조성물은 압출 개선제, 특히 알부민을 포함한다.

[0008] 발명은 또한 이러한 지혈 조성물의 투여를 포함하는 상처, 출혈, 손상된 조직 및/또는 출혈 조직으로 구성된 균에서 선택되는 상해를 치료하는 이 지혈 조성물의 용도 및 이러한 상해의 치료를 위한 이러한 지혈 조성물의 제작 키트를 언급한다.

[0009] <발명의 구체적인 실시태양의 설명>

[0010] 본 발명은 지혈에 사용하기 적합한 입상 형태의 가교된 젤라틴을 포함하는 지혈 조성물을 제공하며, 여기서 조성물은 15.0 내지 19.5 % (w/w)의 가교된 젤라틴(= 최종 조성물의 중량당 건조 가교된 젤라틴의 중량), 바람직하게는 16.0 내지 19.5 % (w/w), 16.5 내지 19.5 % (w/w), 17.0 내지 18.5 % (w/w) 또는 17.5 내지 18.5 % (w/w), 보다 바람직하게는 16.5 내지 19.0 % (w/w) 또는 16.8 내지 17.8 % (w/w), 특히 바람직하게는 16.5 내지 17.5 % (w/w)를 함유한 페이스트 형태로 존재하며, 여기서 조성물은 압출 개선제를 포함한다.

[0011] 적절한 양의 알부민 등의 압출 개선제의 제공은 보다 높은 젤라틴 농도의 사용을 가능하게 하며, 보다 높은 젤라틴 농도의 사용은 이러한 제품의 지혈 성질을 향상시킨다는 것이 본 발명의 전개 내에서 놀랍게도 발견되었다. 이는 이전에 제안되지 않은 효과이다. 게다가, 보다 높은 농도의 가교된 젤라틴이 양호한 부착 성질(당 업계에 공지된 결과와 대조하여(예컨대, WO2008/076407A2의 도 4))을 유발한다는 것이 놀라웠다.

[0012] 본 발명에 따른 페이스트에서 보다 높은 젤라틴 농도로 인해 바람직한 성질을 가능하게 하기 위해, 적절한 양의 압출 개선제를 제공하는 것이 필요하다. 양은 압출 효과를 얻도록 즉, 심지어 15 내지 19.5 %의 가교 결합된 젤라틴의 양에 대해 유동성 페이스트를 가능하게 하여 지혈 조성물이 예컨대, 혈관 수술에서 적용될 수 있도록 충분히 높아야 하며; 다른 한편, 양은 지혈 조성물의 부정적인 기능 성질 예컨대, 상처 또는 지혈 성능에 부착을 방지할 만큼 낮아야 한다. 예컨대, 압출 개선제가 알부민(구체적으로 바람직하게는, 특히 인간 혈청 알부민)인 경우에, 0.5 내지 5.0 % (w/w)(= 최종 조성물의 중량당 압출 개선제의 중량) 사이, 바람직하게는 1.0 내지 5.0 % (w/w), 바람직하게는 2.0 내지 4.5 % (w/w), 보다 바람직하게 1.5 내지 5.0 % (w/w), 특히 바람직하게 약 1.5 % (w/w)의 양으로 제공되어야 한다.

[0013] 본 발명에 따른 압출 개선제의 또 다른 선호되는 부류는 포스파티딜콜린 및 -세린 등의 인지질, 또는 레시틴 또는 대두유 등의 복합 혼합물이다.

[0014] 또 다른 실시태양에서, 본 발명은 지혈에 사용하기 적합한 입상 형태의 가교된 젤라틴을 포함하는 지혈 조성물을 제공하며, 여기서 조성물은 16.0 내지 19.5 % (w/w), 바람직하게는 16.5 내지 19.5 % (w/w), 17.0 내지 18.5 % (w/w) 또는 17.5 내지 18.5 % (w/w), 보다 바람직하게는 16.5 내지 19.0 % (w/w) 또는 16.8 내지 17.8 % (w/w), 특히 바람직하게는 16.5 내지 17.5 % (w/w)을 함유한 페이스트 형태로 존재하며, 여기서 조성물은 압출 개선제를 포함한다. 바람직하게는 압출 개선제는 인간 혈청 알부민이다.

[0015] 또 다른 바람직한 실시태양에서, 본 발명은 지혈에 사용하기 적합한 입상 형태의 가교된 젤라틴을 포함하는 지혈 조성물을 제공하며, 여기서 조성물은 15.0 내지 19.5 % (w/w)의 가교된 젤라틴, 바람직하게는 16.0 내지 19.5 % (w/w), 16.5 내지 19.5 % (w/w), 17.0 내지 18.5 % (w/w) 또는 17.5 내지 18.5 % (w/w), 보다 바람직하게는 16.5 내지 19.0 % (w/w) 또는 16.8 내지 17.8 % (w/w), 특히 16.5 내지 17.5 % (w/w)을 함유한 페이스트 형태로 존재하며, 여기서 조성물은 0.8 % (w/w) 초과, 바람직하게는 약 3.3 % (w/w)의 농도의 압출 개선제를 포

함한다. 바람직하게는 압출 개선제는 예컨대, 상기한 농도에서 인간 혈청 알부민이다.

[0016] 본 발명에 따른 지혈 조성물, 특히 압출 개선제로서 알부민을 사용하는 것은 보다 낮은 양의 가교된 젤라틴(13 내지 14.5 %)을 사용한 조성물에 비해 구체적인 이점을 가지며, 특히 이들은 개선된 생체 내 효험을 가진다. 보다 높은 젤라틴 입자 농도를 가진 제형이 인간 전혈을 사용하는 생체 외 시험 방법 및 임상-전의 동물 실험 모두에서 보다 좋은 지혈 성능을 유발한다는 것이 본 발명의 전개 내에서 예상치 않게 밝혀졌다. 본 발명에 따른 제품은 감소된 수술 근사 시간 및 보다 빨라진 지혈 시간을 가능하게 한다.

[0017] 본 발명에 따른 조성물은 40 N 이하, 바람직하게는 35 N 미만, 특히 바람직하게는 20 N 미만의 평균 압출력(실시예 1에서 기술된 시험 방법을 사용)을 가진다.

[0018] 본 발명의 바람직한 실시태양에 따르면, 지혈 조성물은 글루타르알데히드-가교된 젤라틴 또는 제니핀(메틸(1R,2R,6S)-2-히드록시-9-(히드록시메틸)-3-옥사비시클로[4.3.0]노나-4,8-디엔-5-카르복실레이트)-가교된 젤라틴, 바람직하게는 B 형 젤라틴, 보다 바람직하게는 수피 기원의 B 형 젤라틴을 포함한다.

[0019] 바람직하게는, 가교된 젤라틴은 과립 물질로서 존재한다.

[0020] 본 발명에 따른 지혈 조성물은 바람직하게는 특히 B 형 젤라틴 중합체인 젤라틴 중합체를 포함한다. 염기 처리가 적절한 성질의 젤라틴 발생 및 바이러스성 및 동물성 감염의 위험 경감에서 매우 효과적이기 때문에 B 형 젤라틴이 지혈제로의 사용에 명확하게 유리하다는 것이 입증되었다. 특히 바람직한 젤라틴 제제는 상온에서 약 1 시간 동안 2 N NaOH를 가진 어린 소의 진피를 처리하고, pH 7-8로 중화시키고 70 °C로 가열하여 제조될 수 있다. 그런 다음 진피는 용액 중 3-10 % (w/w), 바람직하게는 7-10 % (w/w) 젤라틴을 가진 젤라틴에 완전히 용해된다. 이 용액은 캐스트되어 건조되고 갈려서 B 형 젤라틴 분말로 제공될 수 있다.

[0021] 바람직하게는, 젤라틴은 200 내지 400의 블룸(Bloom) 강도, 특히 200 내지 400의 블룸 강도를 가지는 B 형 젤라틴을 가진다. 블룸은 젤라틴의 강도를 측정하는 시험이다. 시험은 탐침(보통 0.5 인치의 직경을 가짐)에 의해 4 mm의 젤 표면을 깨짐 없이 굽히는데 요구되는 중량(g)을 결정한다. 결과는 블룸(등급)으로 표현된다. 젤라틴에 대해서 블룸 시험을 수행하기 위해, 시험되기에 앞서 6.67 % 젤라틴 용액이 10 °C에서 17-18 시간 동안 유지된다.

[0022] 본 발명에 따른 지혈 조성물은 바람직하게는 특히 과립 물질로서 입상 형태의 가교된 젤라틴을 함유한다. 이 과립 물질은 유체(즉, 희석제)에 노출된 때 신속하게 팽윤할 수 있으며, 이 팽창된 형태에서 출혈 부위에 적용될 수 있는 유동성 페이스트에 기여할 수 있다. 바람직한 실시태양에 따르면, 가교된 젤라틴은 건조 가교된 젤라틴으로부터 제공된다. 이 건조 가교된 젤라틴 분말은 제약상 허용되는 희석제에 접촉되는 경우에 신속하게 재-수화하도록 제조될 수 있다. 특히 젤라틴 분말 형태의 젤라틴 과립은 바람직하게는 WO98/08550A 및 WO2003/007845A에서 기술된 대로, 조각 또는 하위-단위로 또한 언급되는 상대적으로 큰 입자를 포함한다. 바람직한(중간) 입자 크기는 10 내지 1,000  $\mu\text{m}$  사이, 바람직하게는 200 내지 800  $\mu\text{m}$  사이 범위일 것이나, 이 바람직한 범위 밖의 입자 크기도 다수의 상황에서 사용되는 것을 발견할 수 있다.

[0023] 보통, 젤라틴 입자는 10 내지 1000  $\mu\text{m}$  사이, 바람직하게는 50 내지 700  $\mu\text{m}$  사이, 200 내지 700  $\mu\text{m}$  사이, 300 내지 550  $\mu\text{m}$  사이, 특히 바람직하게는 350 내지 550  $\mu\text{m}$  사이(중간 크기)의 평균 입자 직경("평균 입자 직경"은 레이저 회절분석에 의해 측정된 것과 같은 중간 크기이며; "중간 크기" (또는 질량 중간 입자 직경)는 빈도 분포를 반으로 나눈 입자 직경이고; 주어진 제제의 입자의 50 퍼센트가 더 큰 직경을 갖고, 입자의 50 퍼센트가 더 작은 직경을 갖는다)을 갖는다. 별개 부류의 물질을 구별하기 위하여 용어 분말 및 과립(또는 입상물)이 때때로 사용되긴 하지만, 본 명세서에서 분말은 과립 물질의 특별한 하위-부류로서 정의된다. 특히, 분말은 더욱 미세한 알갱이 크기를 갖고, 따라서 유동 시에 덩어리를 더 형성하는 경향을 갖는 과립 물질로 언급된다. 과립은 습윤 시를 제외하고는 덩어리를 형성하는 경향이 없는 거친 과립 물질을 포함한다.

[0024] 지혈에 사용하기 적합한 입상 형태의 본 가교된 젤라틴은 공간적 등방성 또는 비-등방성 형태를 포함할 수 있다. 예컨대, 본 발명에 따른 키트 내 가교된 젤라틴은 과립 또는 섬유일 수 있고; 불연속 구조로, 예컨대 분말 형태로 존재할 수 있다.

[0025] 건조 젤라틴 조성물은 액체 흡수성이다. 예컨대, 액체, 예컨대 수성 용액 또는 혼탁액(특히 완충액 또는 혼액)과의 접촉 시에, 가교된 젤라틴은 액체를 흡수하고 수화 정도에 의존하여 팽윤도를 나타낼 것이다. 물질은 바람직하게는 400 중량% 이상부터, 바람직하게는 약 500 중량% 내지 약 2000 중량%, 특히 약 500 중량% 내지 약 1300 중량% 사이의 물 또는 수성 완충액을 흡수하고, 이는 예컨대, 대략 50 % 내지 대략 500 %, 보통 대략 50 % 내지 대략 250 %의 범위로 하위단위의 개개 입자의 직경 또는 폭의 명목 증가에 상응한다. 예컨대, (건조) 과

립 입자가 0.01 mm 내지 1.5 mm, 특히 0.05 mm 내지 1 mm의 바람직한 크기 범위를 가지는 경우, 완전히 수화된 조성물(예컨대, 상처 위에 투여된 후 또는 수성 완충 용액과의 접촉 후)은 0.05 mm 내지 3 mm, 특히 0.25 mm 내지 1.5 mm의 크기 범위를 가질 수 있다.

[0026] 건조 조성물은 또한 수성 재-수화 매질(= 제약상 허용되는 희석제, 또한 재구성 매질로 언급됨)에 노출될 때 유의한 "평형상태 팽윤"을 나타낼 것이다. 바람직하게는, 팽윤은 그의 의도된 용도에 의존하여, 400 % 내지 1300 %, 바람직하게는 400 % 내지 1000 %, 보다 바람직하게는 500 % 내지 1100 %, 특히 바람직하게는 500 % 내지 900 % 사이의 범위에 있을 것이다. 이러한 평형상태 팽윤은 예컨대, (가교된 중합체의 경우) 가교 정도를 변화시킴으로써 조절될 수 있고, 이것은 다시 가교 상태, 예컨대 가교제의 노출 지속시간, 가교제의 농도, 가교 온도 등을 변화시킴으로써 성취된다. 상이한 평형상태 팽윤값을 가진 물질은 상이한 적용에서 상이하게 수행한다. 가교 및 평형상태 팽윤을 조절하는 능력은 본 발명의 조성물이 다양한 용도를 위해 최적화되는 것을 가능하게 한다. 평형상태 팽윤에 덧붙여, 표적 부위로의 전달 쪽전에 물질의 수화를 조절하는 것이 또한 중요하다. 물론, 수화 및 평형상태 팽윤은 긴밀하게 연결된다. 수화 0 %의 물질은 비-팽윤될 것이다. 수화 100 %의 물질은 그의 평형상태 수분 함량일 것이다. 0 % 내지 100 % 사이의 수화는 최소 및 최대량 사이의 팽윤에 상응할 것이다. "평형상태 팽윤"은 완전히 수화되고 이에 따라 완전히 팽윤될 때의 그의 중량으로부터 젤라틴 히드로겔 분말의 건조 중량을 뺏으로써 측정될 수 있다. 그런 다음 차이를 건조 중량으로 나누고 100을 곱하여 팽윤 도수를 얻는다. 건조 중량은 물질을 실질적으로 모든 잔류 수분을 제거하기에 충분한 시간 동안 승온에, 예컨대 2 시간 동안 120 °C에 노출시킨 후에 측정해야 한다. 건조 물질은 제약상 허용되는 희석제, 예컨대 수성 염수에 수분 함량이 일정해지기에 충분한 시간 동안, 전형적으로 상온에서 18 내지 24 시간 동안 침지시킴으로써 물질의 평형상태 수화를 성취할 수 있다.

[0027] 가교된 젤라틴은 분쇄되어 과립 물질을 형성할 수 있는 막으로서 제공될 수 있다. 과립 물질에 함유된 대부분의 입자(예컨대, 90 % w/w 초과)는 바람직하게는 10 내지 1,000  $\mu\text{m}$ , 바람직하게는 50 내지 700  $\mu\text{m}$ , 200 내지 700  $\mu\text{m}$ , 300 내지 550  $\mu\text{m}$ , 특히 바람직하게는 350 내지 550  $\mu\text{m}$ 의 입자 크기를 가진다.

[0028] 바람직하게는, 지혈 조성물의 유동성 형태는 100 내지 1000  $\mu\text{m}$ 의 크기를 가진 50 % (w/w) 초과, 바람직하게는 100 내지 1000  $\mu\text{m}$ 의 크기를 가지는 80 % (w/w) 초과의 입자를 함유한다.

[0029] 가교에 적합한 젤라틴 물질의 예는 즉, EP1803417B1의 실시예 1과 2 및 US6,066,325A와 US6,063,061A의 실시예 14에 기술된다. 젤라틴은 또한 PVP, PEG 및/또는 덱스트란(dextran)(재-수화 보조제로서) 등의 가공 조제와 사용될 수 있다.

[0030] 본 발명의 일 특정 측면에서, 조성물은 20 % (w/w) 이하의 함수율을 가진 가교된 젤라틴 분말을 포함할 것이며, 여기서 분말은 재-수화 보조제의 존재하에서 가교되어, 분말은 재-수화 보조제 없이 제조된 유사한 분말의 재-수화 속도보다 5 % 이상 높은 수성 재-수화 속도를 가진다. "재-수화 속도"는 EP1803417B1에 따르면 전형적으로 g/g로 표현되는, 30 초 내에 분말 1 그램(건조 중량 기반)에 의해 흡수되는 수용액 0.9 % (w/w) 염수의 양을 의미하는 것으로 정의된다. 수화 속도는 가교된 젤라틴을 염수 용액과 30 초 동안 혼합하고 진공하에서 필터막 위에 젖은 젤라틴을 배치하여 자유 수용액을 제거함으로써 측정된다. 그런 다음 필터 위에 잔류한 젖은 젤라틴의 중량을 기록하여, 이를 건조하고(예컨대, 120 °C에서 2 시간), 그런 다음 젤라틴의 건조 중량을 기록하여 건조 젤라틴의 그램당 흡수된 용액의 중량을 계산한다.

[0031] 본 발명의 바람직한 조성물은 3 g/g 이상, 바람직하게는 3.5 g/g 이상 및 종종 3.75 g/g 이상의 재-수화 속도를 가질 것이다. 재수화 보조제 없이 제조된 유사한 분말의 재-수화 속도는 전형적으로 3 미만이며, 재-수화 속도에서의 퍼센트 증가는 일반적으로 5 % 이상, 바람직하게는 10 % 이상 및 보다 바람직하게는 25 % 이상일 것이다.

[0032] 가교는 임의의 적합한 가교제, 예컨대 WO98/08550A 및 WO2003/007845A에서 기술된, 예컨대, 글루타르알데히드로 행해질 수 있다. 가교는 또한 제니핀 등과 같은 비-독성 가교제와 수행될 수 있다.

[0033] 생산 비용은 시약, 에너지 및 시간 비용이 낮기 때문에, 글루타르알데히드 가교된 것보다 본 발명에 따른 제니핀 가교된 젤라틴 제품에서 보다 낮다. 제니핀 가교된 젤라틴 반응은 ≤ 16 시간 동안 상온에서 중성 pH의 수중에서 수행될 수 있다. 제품은 저렴할 뿐만 아니라, 보다 중요하게 작업자에게 보다 안전한 에탄올 및/또는 물 세척에 의해 세정될 수 있다.

[0034] 방법은 바람직하게는 가교 단계 전에 건조 형태로 존재하는 젤라틴에 적용된다.

[0035] 물론, 본 발명에 따른 바람직한 제니핀-형 가교제는 제니핀(메틸 (1R,2R,6S)-2-히드록시-9-(히드록시메틸)-3-옥

사비시클로[4.3.0]노나-4,8-디엔-5-카르복실레이트)이며; 그러나, 또한 이리도이드- 또는 세코이리도이드-형의 다른 가교체 예컨대, 올레우로페인이 사용될 수 있다. 가교를 위한 제니핀의 바람직한 농도는 0.5 내지 20 mM, 바람직하게는 1 내지 15 mM, 특히 2 내지 10 mM의 범위에 있다.

[0036] 본 발명의 바람직한 실시태양에 따르면, 제니핀 가교된 젤라틴은 표백제, tBu-히드로퍼옥시드 등의 산화제와 켄칭/산화 단계, 바람직하게는 과탄산 나트륨, 차아염소산 나트륨, 염소수 또는 과산화수소( $H_2O_2$ )로의 처리를 받으며, 특히 선호되는 것은 과탄산 나트륨 또는  $H_2O_2$ 로의 처리, 가장 바람직한 것은 과탄산염으로의 처리이다.

[0037] 바람직한  $H_2O_2$  농도는 0.5 내지 20 % (w/w), 특히 1 내지 15 % (w/w), 보다 바람직하게는 약 5 % (w/w)이다. 특히 바람직한 실시태양에서 제니핀 농도는 5 내지 10 mM 사이이며, 제니핀과 젤라틴의 반응 시간은 3 내지 10 시간 사이, 특히 6 시간이며,  $H_2O_2$  농도는 3 내지 5 % (w/w)이며  $H_2O_2$ 와 제니핀 가교된 젤라틴의 반응 시간은 약 20 시간이다.

[0038] 바람직한 과탄산염 농도는 1 내지 10 % (w/w) 사이, 특히 1 내지 5 % (w/w), 보다 바람직하게는 1 내지 4 % (w/w)이다. 특히 바람직한 실시태양에서 제니핀 농도는 5 내지 10 mM 사이(특히 약 8 mM), 제니핀과 젤라틴의 반응 시간은 3 내지 10 시간 사이(특히 약 5 시간)이며, 과탄산염 농도는 1 내지 10 % (w/w) 사이, 특히 바람직하게는 1 내지 4 % (w/w) 사이, 제니핀 가교된 젤라틴과 과탄산염의 반응 시간은 1 내지 20 시간 사이, 바람직하게는 1 내지 5 시간 사이(예컨대, 1, 2 또는 3 시간)이다. 켄칭은 또한 아스코르브산 나트륨 등의 항산화제의 존재에서 또는 질소 또는 아르곤 등의 불활성 대기 중의 제니핀 반응 및/또는 켄칭을 수행하는 등의 반응 환경의 산화 포텐셜을 제어하면서 수행될 수 있다.

[0039] 바람직한 가교 반응 상태는 수용액 중, 바람직하게는 인산완충염수(PBS)/에탄올 완충액 중, 특히 pH 4 내지 12, 바람직하게는 5.0 내지 10.0, 특히 6 내지 8에서, 또는 0 내지 50 % 사이의 수흔화성 유기 용매를 함유할 수 있는 탈이온수 또는 다른 수성 완충액 중에서의 수행을 포함한다. PBS 완충액은 생리학적 pH에서 인산염 완충액 중 NaCl 또는 KCl의 생리학적 양을 함유한다. PBS 완충액의 예는 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM  $Na_2HPO_4$  ·  $2H_2O$ , 1.76 mM  $KH_2PO_4$  (pH = 7.4)를 함유한다. PBS 완충액의 또 다른 예는 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM  $Na_2HPO_4$  및 1.4 mM  $KH_2PO_4$  (pH = 7.5)로 구성된다.

[0040] 반응은 또한 50 % 까지의 수흔화성 유기 용매 및/또는 PEG, PVP, 만니톨, 과탄산 나트륨, 젖산 나트륨, 구연산 나트륨, 아스코르브산 나트륨 등의 가공 조제를 함유한 수성 완충액 중에서 수행될 수 있다.

[0041] 바람직하게는, 가교 단계에는 4 °C 내지 45 °C, 바람직하게는 15 내지 45 °C, 특히 20 내지 40 °C의 온도에서 수행된다.

[0042] 가교 단계는 특히 아미노-기 함유 켄처, 바람직하게는 아미노산, 특히 글리신과의 켄칭 단계가 뒤따를 수 있다. 켄처를 이용하여, 아직 미반응된 제니핀-형 가교체를 비활성화시켜 (예컨대, 과량의 켄처와의 반응에 의해) 추가 가교를 방지한다. 켄칭은 또한 용액의 pH를 8 내지 14로 증가시킴으로써 또는 아미노, 티올 또는 헤드록실기를 함유한 친핵성 화합물 및 또한 친핵성 화합물의 사용과 pH 증가의 조합을 사용함으로써 수행될 수 있다. 본 발명에 따른 제니핀-젤라틴 가교 반응 이후 켄칭 단계는 능동적으로 바람직한 물리적 성능 예컨대 팽윤 및 일반적인 제니핀-가교 단독에 더하여 지혈 활성의 중요한 결정 요인인 TEG를 부여하는 것에 관할 수 있다.

[0043] 가교된 젤라틴은 바람직하게는 가교 단계 이후, 바람직하게는 메탄올, 에탄올 또는 물에 의해, 특히 탈이온수에 의해 세척된다. 또 다른 바람직한 세척 단계는 50 % (v/v)까지의 수흔화성 유기 용매 및/또는 하나 이상의 가공 조제를 함유한 수성 완충액을 적용한다.

[0044] 바람직한 실시태양에 따르면, 가교된 젤라틴은 건조된다. 이러한 건조 상태에서, 지혈 조성물은 심지어 승온 (예컨대, 20 °C 초과, 30 °C 초과 또는 심지어 40 °C 초과)에서 장시간 동안 보관-안정성이다. 바람직한 건조 상태는 15 % (w/w) 미만, 바람직하게는 10 % 미만, 보다 바람직하게는 5 % 미만, 특히 1 % 미만의 함수율을 가지도록 건조된 가교된 생체적합성 중합체를 포함한다. 또 다른 바람직한 실시태양에서 제품은 수화 용액이 생체적합성 완충액 또는 용액일 수 있는, 수화된 또는 젖은 상태에서 공급될 수 있다. 글루-겔(Glu-Gel) 제품은 그 내에서 약간의 노랑색 블렌드로 인해, 주변 조직에 의해 위장되는 경향을 가진다. 이는 바람직한 적용의 외관 평가를 문제있게 만든다. 본 발명에 따른 제니핀 가교된 젤라틴 제품은 가교 반응 조건 및 이후 가공 및 마무리처리 단계의 정도에 기반하여 연노랑색 내지 진청색 또는 녹색 사이의 가변적 색을 나타낸다. 이 색 조정력 및 최종 제품 색에서 바람직한 색을 얻을 수 있는 능력은, 이 색은 위장되는 가능성 대신에 주변 조직으로부

터 이를 구별하기 때문에, 상처 부위에서 적절한 제품 적용의 외관 지시를 내과의사에게 제공하는 추가 이점을 가진다. 이는 본 발명의 또 다른 신규한 특징이다. 다른 한편, 최종 제품에 관한 요구에 의존하여, 색이 제거되어 비-착색 제품을 얻을 수 있다.

[0045] 바람직한 실시태양에서 제니핀-형 가교제, 예컨대 제니핀과 가교된 생체적합성 중합체, 예컨대 젤라틴은 예컨대, 본 출원의 실시예 3에서 기술되는 대로 형광 측정에 의해 나타내질 수 있는 균일하게(균질하게) 가교된 중합체이다. 특히 바람직한 실시태양에서 젤라틴 등의 생체적합성 중합체는 입상 형태로 젤라틴 등의 균일하게 제니핀 가교된 생체적합성 중합체로서 존재한다.

[0046] 윤활제, 예컨대 히알루론산 등의 부형제가 존재하는 본 발명에 따른 지혈 조성물이 바람직하다. 본 발명의 또 다른 실시태양에서 윤활제, 예컨대 히알루론산 등의 부형제가 제외된다.

[0047] 제약상 허용되는 희석제는 바람직하게 수용액이며  $\text{NaCl}$ ,  $\text{CaCl}_2$  및 아세트산 나트륨으로 구성된 군에서 선택된 물질을 함유할 수 있다. 예컨대, 제약상 허용되는 희석제는 주사용수, 및 - 서로 독립적으로 - 50 내지 200 mM의  $\text{NaCl}$  (바람직하게는 150 mM), 10 내지 80 mM  $\text{CaCl}_2$  (바람직하게는 40 mM) 및 1 내지 50 mM 아세트산 나트륨 (바람직하게는 20 mM)을 포함한다. 또 다른 실시태양에서 제약상 허용되는 희석제는 35 g/1 미만의 만니톨, 바람직하게는 25 g/1 미만, 보다 바람직하게는 10 g/1 미만을 함유하며, 특히 바람직하게는 제약상 허용되는 희석제는 만니톨을 필수적으로 함유하지 않는다.

[0048] 바람직한 실시태양에 따르면, 제약상 허용되는 희석제는 트롬빈, 바람직하게는 10 내지 1000 I.U. 트롬빈/ml, 특히 250 내지 700 I.U. 트롬빈/ml을 포함한다. 바람직하게는, 이러한 사용 준비된 형태의 지혈 조성물은 10 내지 100,000 국제 단위 (I.U.)의 트롬빈, 보다 바람직하게는 100 내지 10,000 I.U., 특히 500 내지 5,000 I.U.를 함유한다. 트롬빈 (또는 뱀독, 혈소판 활성화제, 트롬빈 수용체 활성화 웨티드 및 피브리노겐 침전제 등의 임의의 다른 응고 유도제)은 인간에 사용하기 적합한 (즉, 제약상 허용되는) 임의의 트롬빈 제제로부터 유도될 수 있다. 트롬빈의 적합한 공급원은 인간 및 소 피, 혈장 또는 혈청 (면역 거부 반응이 예상되지 않는 경우 다른 동물 공급원의 트롬빈이 적용될 수 있다)을 포함하며, 재조합 기원의 트롬빈 (예컨대, 인간 재조합 트롬빈) 및 자가조직 인간 트롬빈이 몇몇 적용에 바람직할 수 있다.

[0049] 제약상 허용되는 희석제는 사용-준비된 조성물에서 바람직한 최종-농도를 성취할 수 있는 양으로 사용된다. 트롬빈 제제는 기타 유용한 성분, 예컨대 이온, 완충액, 부형제, 안정화제 등을 함유할 수 있다. 바람직하게는, 트롬빈 제제는 압출 개선제로 인간 알부민을 함유한다. 바람직한 염은  $\text{NaCl}$  및/또는  $\text{CaCl}_2$ 이며, 양쪽은 모두 트롬빈을 위해 적용되는 일반적인 양 및 농도로 사용된다 (예컨대, 0.5 내지 1.5 %  $\text{NaCl}$  (예컨대, 0.9 %) 및/또는 20 내지 80 mM  $\text{CaCl}_2$  (예컨대, 40 mM)). 추가 실시태양에서, 희석제는 또한 재구성된 건조 조성물의 pH, 바람직하게는 3.0 내지 10.0의 pH에서, 보다 바람직하게는 6.4 내지 7.5, 특히 6.9 내지 7.1의 pH에서 완충하도록 완충액 또는 완충 시스템을 포함할 수 있다.

[0050] 가교된 젤라틴, 희석제 및 압출 개선제의 적절한 양의 수립은 전술한 전제조건에 따라 키트에서 행해질 수 있다: 예컨대 a) 0.736 내지 0.995 g의 건조 가교된 젤라틴 (최종 제품 내의 15.0 내지 19.5 % (w/w)에 상응) 이 든 바이알 및, b) 60 내지 240 mg 알부민 및 선택적으로 500 I.U./ml 농도에서 트롬빈 및/또는 40 mM  $\text{CaCl}_2$  를 가진 4 ml의 희석제가 든 제2 바이알이 제공될 수 있다. 다른 제2 바이알은 동결건조된 형태로 키트의 건조 젤라틴 성분 a)으로 첨가될 수 있다. 예컨대, a) 0.573 내지 0.775 g의 건조 가교된 젤라틴 (최종 제품 내의 15.0 내지 19.5 % (w/w)에 상응) 이의 48 내지 192 mg 알부민이 든 바이알 및 b) 3.2 ml의 희석제 및 선택적으로 500 I.U./ml 농도에서 트롬빈 및/또는 40 mM  $\text{CaCl}_2$ 를 가진 제2 바이알이 제공될 수 있다.

[0051] 본 발명에 따른 키트의 가교된 젤라틴 성분은 바람직하게는 건조 조성물로 제공되며, 여기서 가교된 젤라틴은 건조 형태로 존재한다.

[0052] 본 발명에 따른 실질적으로 건조 가교된 젤라틴 조성물은 플로실<sup>®</sup> (예컨대, 건조 제품으로 대략 8-12 % 습기를 가진 플로실)등의 비교가능한 이용가능한 제품의 함수량에 대략 상응할 수 있는 잔여 함수량을 가진다.

[0053] 본 발명에 따른 키트에서 지혈에 사용하기 적합한 입상 형태의 건조 가교된 젤라틴은 바람직하게는 분말 형태의 젤라틴이며, 특히 여기서 분말 입자는 10 내지 1000  $\mu\text{m}$ , 바람직하게는 50 내지 700  $\mu\text{m}$ , 200 내지 700  $\mu\text{m}$ , 300 내지 550  $\mu\text{m}$ , 특히 바람직하게는 350 내지 550  $\mu\text{m}$ 의 중간 입자 크기를 가진다. 본 발명에 따른 "가교된 젤라틴"의 건조 과립 제제"는 이론상으로, 예컨대, WO98/08550A에 공지되어 있다. 바람직하게는, 가교된 젤라틴은 생

체적합성, 생분해성 건조 안정성 과립 물질이다.

[0054] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 본 발명은 상처, 출혈, 손상된 조직, 출혈 조직 및/또는 콜 결손으로 구성된 군에서 선택되는 상해의 치료에서 사용하기 위한 본 발명에 따른 지혈 조성물에 관한 것이다.

[0055] 본 발명의 또 다른 측면은 본 발명에 따른 지혈 조성물을 상해 부위에 투여하는 것을 포함하는, 상처, 출혈, 손상된 조직 및/또는 출혈 조직으로 구성된 군에서 선택되는 상해의 치료 방법에 관한 것이다.

[0056] 또 다른 측면에 따르면, 본 발명은 또한 본 발명에 따른 지혈 조성물을 환자 신체 내의 표적 부위로 전달하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 본 발명에 따른 방법에 의해 제조되는 지혈 조성물을 표적 부위에 전달하는 것을 포함한다. 비록 또한 건조 조성물이 표적 부위에 직접 적용될 수 있지만은(및, 선택적으로 필요하다면, 표적 부위에서 희석제에 접촉), 본 발명에 따른 지혈 조성물을 페이스트 형태로 얻기 위해서, 표적 부위에 투여하기 전에 제약상 허용되는 희석제와 건조 지혈 조성물을 접촉하는 것이 바람직하다.

[0057] 이러한 방법에서, 상처, 출혈, 손상된 조직 및/또는 출혈 조직으로 구성된 군에서 선택되는 상해의 치료를 위한 가교된 젤라틴의 유동성 페이스트를 제작하는 키트가 적용될 수 있으며, 이 키트는 a) 15.0 내지 19.5 % (w/w) 가교된 젤라틴 (= 최종 조성물의 중량에 대한 건조 젤라틴의 중량), 바람직하게는 16.0 내지 19.5 % (w/w), 16.5 내지 19.5 % (w/w), 17.0 내지 18.5 % (w/w) 또는 17.5 내지 18.5 % (w/w), 보다 바람직하게는 16.5 내지 19.0 % (w/w), 또는 16.8 내지 17.8 % (w/w), 특히 바람직하게는 16.5 내지 17.5 % (w/w) 가교된 젤라틴을 함유하는 유동성 페이스트로 재구성되도록 입상 형태로 가교된 젤라틴을 포함하는 건조 지혈 조성물 및 b) 조성물 또는 희석제 중 하나가 압출 개선제, 특히 알부민을 적합한 양으로 예컨대 (알부민의 경우), 0.5 내지 5.0 % (w/w) (= 최종 조성물의 중량당 압출 개선제의 중량) 사이, 바람직하게는 1.0 내지 5.0 % (w/w), 바람직하게는 2.0 내지 4.5 % (w/w), 보다 바람직하게는 1.5 내지 5.0 % (w/w), 특히 바람직하게는 약 1.5 % (w/w)의 재구성된 페이스트 내 알부민 농도를 유도하는 양으로 포함하는, 지혈 조성물의 재구성을 위해 제약상 허용되는 희석제를 포함한다.

[0058] 이러한 키트의 바람직한 추가 성분 -구체적으로 지혈 조성물이 건조 형태로 함유되는 경우 - 지혈 조성물의 재구성을 위한 희석제(= 재-수화 매질)이다. 키트의 추가 성분은 주사기, 카테터, 브러쉬 등 (조성물이 이미 투여 수단에 제공되지 않은 경우)의 투여 수단 또는 대체 바늘 또는 카테터, 추가 바이알 또는 추가 상처 덮개 수단 등의 의료 (수술) 시술에서 사용하기 위해 필요한 기타 성분일 수 있다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 키트는 건조하고 안정한 지혈 조성물을 수용하는 주사기 및 희석제를 함유하는 주사기 (또는 또 다른 희석제 용기로부터 희석제를 흡수하기 위해 제공됨)를 포함한다.

[0059] 바람직한 실시태양에서, 제약상 허용되는 희석제는 별도의 용기에 제공된다. 이는 바람직하게 주사기일 수 있다. 주사기 내의 희석제는 그런 다음 본 발명에 따른 건조 지혈 조성물의 재구성을 위한 최종 용기에 쉽게 적용될 수 있다. 최종 용기가 또한 주사기인 경우, 양 주사기는 함께 팩으로 마감될 수 있다. 따라서, 상기 건조하고 안정한 지혈 조성물을 재구성하기 위한 제약상 허용되는 희석제와 희석제 주사기로 마감되는 주사기 내에 본 발명에 따른 건조 지혈 조성물을 제공하는 것이 바람직하다.

[0060] 바람직한 실시태양에 따르면, 최종 용기는 무균 방사에 노출될 때, 중합체의 변형을 억제하는데 효과적인 안정화제, 바람직하게는 아스코르브산, 아스코르브산 나트륨, 아스코르브산의 기타 염 또는 항산화제를 추가로 함유한다.

[0061] 이러한 제약상 허용되는 희석제와 함께, 사용 준비된 형태의 본 지혈 조성물은 그런 다음 환자에게 직접 적용될 수 있는 것으로 제공될 수 있다. 따라서, 또한 본 발명에 따른 사용 준비된 형태의 지혈 조성을 제공 방법이 제공되며, 여기서 지혈 조성물은 제1 주사기에 제공되며, 재구성을 위한 희석제는 제2 주사기에 제공되며, 제1 및 제2 주사기가 서로 연결되어 있고, 유체가 제1 주사기로 보내져 유동성 형태의 지혈 조성을 생산하고; 선택적으로 유동성 형태의 지혈 조성을 한 번 이상 제2 주사기로 되돌려 보낸다. 바람직하게는 사용-준비된 제제가 히드로겔로서 존재하거나 제공된다. 이 종류의 제품은 이론상으로 다른 형식으로 당 업계에 공지되어 있다. 따라서, 지혈 조성물이 제1 주사기에 제공되며, 재구성을 위한 희석제가 제2 주사기에 제공되며, 제1 및 제2 주사기가 서로 연결되어 있고, 희석제가 제1 주사기로 보내져 유동성 형태의 지혈 조성을 생산하고; 선택적으로 유동성 형태의 지혈 조성을 한 번 이상 제2 주사기로 되돌려 보내는 본 발명에 따른 사용-준비된 형태의 지혈 조성을 제공 방법이 본 발명의 바람직한 실시태양이다. 이 방법 (또한 "분출(swooshing)"로 언급)은 단시간 내에, 예컨대 수술 동안에 위급 상황에서 쉽고 효율적으로 제조될 수 있는 본 발명에 따른 조성물의 적절한 사용 준비된 형태를 제공한다. 이러한 방법에 의해 제공된 지혈 조성물의 유동성 형태는 상처, 출혈, 손

상된 조직, 출혈 조직 및/또는 골 결손으로 구성된 군에서 선택되는 상해의 치료에서 사용하기 특히 적합하다.

[0062] 안정성 이유를 위해, 이러한 제품 (뿐만 아니라 본 발명에 따른 제품)이 일반적으로 최종 용기 내에 건조 형태로 제공되어 사용 직전에 사용-준비된 형태(일반적으로 (히드로)겔, 혼탁액 또는 용액의 형태)로 보내져, 제약 상 허용되는 희석액 (= 재-수화 매질)의 첨가를 필요하게 한다.

[0063] 또 다른 측면에 따르면, 본 발명은 지혈 조성물이 제1 주사기에 제공되며, 재구성을 위한 희석제가 제2 주사기로 제공되며, 제1 및 제2 주사기가 서로 연결되어 있고, 유체가 제1 주사기로 보내져 유동성 형태의 지혈 조성물을 생산하고; 선택적으로 유동성 형태의 지혈 조성물을 한 번 이상 제2 주사기로 되돌려 보내는 본 발명에 따른 지혈 조성물의 사용 준비된 형태의 제공 방법에 관한 것이다.

[0064] 바람직하게는, 본 발명에 따른 지혈 조성물의 유동성 형태는 100 내지 1000  $\mu\text{m}$  크기를 가진 50 % (w/w) 초과 입자, 바람직하게는 100 내지 1000  $\mu\text{m}$ 의 크기를 가진 80 % (w/w) 초과 입자를 함유한다.

[0065] 본 발명에 따른 생체적합성 지혈 가교된 중합체는 - 일단 상처에 적용되면 -혈액 유동에 대한 차단층을 형성할 수 있는 효율적인 매트릭스를 형성한다. 구체적으로 지혈 중합체의 팽윤 성질은 이것을 출혈 및 재출혈 과정에 대해 효과적인 기계적 차단층으로 만들 수 있다.

[0066] 본 조성물은 본 조성물의 부착 성질을 추가로 개선시키는 친수성 중합체 성분 (또한 "반응성 친수성 성분" 또는 "친수성 (중합체) 가교제"로 언급됨)을 추가적으로 함유할 수 있다. 본 발명에 따른 지혈 조성물의 이 친수성 중합체 성분은 일단 지혈 조성물이 환자에게 (예컨대, 환자의 상처에 또는 지혈 활성이 필요한 환자의 또 다른 부위에) 적용되면 그의 반응성 기와 반응할 수 있는 친수성 가교제로서 활동한다. 따라서, 친수성 중합체 성분의 반응성 기가 환자에게 적용될 때 반응성인 것이 본 발명을 위해 중요하다. 따라서, 일단 상처에 적용되면 반응해야 하는 중합체 성분의 반응성 기가 제조 처리 동안에 유지되도록 본 발명에 따른 지혈 조성물을 제조하는 것이 필요하다.

[0067] 그의 반응성 기가 가수분해성인 친수성 중합체 가교제를 위해, 지혈 조성물을 환자에게 투여하기 전에, 특히 제조 동안에 물 또는 수성 액체와의 조기 접촉을 방지해야 한다. 그러나, 제조 동안의 친수성 중합체 성분의 처리가 반응성 기의 반응이 억제되는 조건 (예컨대, 낮은 pH)의 수성 매질 중에서 또한 가능할 수 있다. 친수성 중합체 성분이 용융될 수 있는 경우, 용융된 친수성 중합체 성분은 가교된 젤라틴의 매트릭스 상에 분무하거나 인쇄될 수 있다. 또한 친수성 중합체 성분의 건조 형태 (예컨대, 분말)를 가교된 젤라틴의 건조 형태와 혼합하는 것이 가능하다. 필요하다면, 그런 다음 지혈 조성물의 영구적인 코팅을 성취하기 위해 가교된 젤라틴에 살포된 친수성 중합체 성분을 용융시키기 위한 온도 상승을 적용할 수 있다. 다르게는, 이러한 친수성 중합체 성분이 불활성 유기 용매 (친수성 중합체 성분의 반응성 기에 대해 불활성)로 흡수될 수 있고 가교된 젤라틴의 매트릭스 상으로 보내질 수 있다. 이러한 유기 용매의 예는 무수 에탄올, 무수 아세톤 또는 무수 디클로로메탄 (예컨대, NHS-에스테르 치환된 PEG 등의 친수성 중합체 성분에 불활성)이다. 다르게는, 친핵성 기가 또한 첨가될 수 있다 (예컨대, PEG-SH).

[0068] 바람직한 실시태양에서 친수성 중합체 성분은 단독 친수성 중합체 성분이며 폴리알킬렌 옥시드 중합체, 바람직하게는 PEG 포함 중합체이다. 이 반응성 중합체의 반응성 기는 바람직하게는 친전자성 기이다.

[0069] 반응성 친수성 성분은 다중-친전자 폴리알킬렌 옥시드 중합체, 예컨대 다중-친전자성 PEG일 수 있다. 반응성 친수성 성분은 둘 이상의 친전자성 기, 바람직하게는 숙신이미딜에스테르(-CON(COCH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), 알데히드(-CHO) 및 이소시아네이트(-N=C=O)로부터 선택되는 둘 이상의 반응성 기를 포함하는 PEG, 예컨대 WO2008/016983A(그 전문이 본 명세서에 참조로서 포함됨)에 개시된 성분을 포함할 수 있다.

[0070] 본 발명에 따른 친수성 중합체 가교제의 바람직한 친전자성 기는 단백질의 아미노-, 카르복시-, 티올- 및 히드록시 기, 또는 그의 혼합물에 반응성인 기이다.

[0071] 바람직한 아미노 기- 특이적 반응성 기는 카르보디이미드, 이소시아네이트 또는 THPP (베타-[트리스(히드록시메틸)포스피노]프로피온 산)의 존재 하에서 NHS-에스테르 기, 이미도에스테르 기, 알데히드-기, 카르복시-기이고, 웬타에리트리톨폴리(에틸렌글리콜)에테르 테트라숙신이미딜 글루타레이트 (= 웬타에리트리톨 테트라키스[1-1'-옥소-5'-숙신이미딜웬타노에이트-2-폴리-옥소에틸렌글리콜]에테르 (= MW 10,000을 갖는 NHS-PEG))가 특히 바람직하다.

[0072] 바람직한 카르복시-기 특이적 반응성 기는 카르보디이미드의 존재 하에 아미노-기이다.

[0073] 바람직한 티올 기-특이적 반응성 기는 말레이미드 또는 할로아세틸이다.

[0074] 바람직한 히드록시 기-특이적 반응성 기는 이소시아네이트 기이다. 친수성 가교체 상의 반응성 기는 동일 (호모-관능성(homo-functional))하거나 또는 상이 (헤테로-관능성(hetero-functional))할 수 있다. 친수성 중합체 성분은 2개의 반응성 기 (호모-이관능성 또는 헤테로-이관능성) 또는 이를 초과하여 (호모/헤테로-삼관능성 또는 이를 초과하여) 가질 수 있다.

[0075] 특별한 실시양태에서, 물질은 바람직하게는 PEG를 포함하는 합성 중합체이다. 중합체는 가교 및 조직에의 부착을 위해 적합한 활성 측쇄 기를 포함한 PEG의 유도체일 수 있다.

[0076] 반응성 기에 의하여 친수성 반응성 중합체가 혈액 단백질 및 또한 조직 표면 단백질을 가교하는 능력을 갖는다. 가교된 젤라틴으로의 가교가 또한 가능하다.

[0077] 다중-친전자성 폴리알킬렌 옥시드는 둘 이상의 숙신이미딜 기를 포함할 수 있다. 다중-친전자성 폴리알킬렌 옥시드는 둘 이상의 말레이미딜 기를 포함할 수 있다.

[0078] 바람직하게는, 다중-친전자성 폴리알킬렌 옥시드는 폴리에틸렌 글리콜 또는 그의 유도체이다.

[0079] 가장 바람직한 실시양태에서, 친수성 중합체 성분은 펜타에리트리톨폴리(에틸렌글리콜)에테르 테트라숙신이미딜 글루타레이트 (=COH102, 또한 펜타에리트리톨 테트라키스[1-1'-옥소-5'-숙신이미딜펜타노에이트-2-폴리-옥소에틸렌글리콜]에테르)이다.

[0080] 친수성 중합체 성분은 친수성 가교체이다. 바람직한 실시양태에 따르면, 이 가교체는 가교를 위해 2 개 초과의 반응성 기 ("아암(arm)"), 예컨대 가교를 위한 반응성 기를 가진 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 그 초과의 아암을 갖는다. 예컨대, NHS-PEG-NHS는 본 발명에 따른 효과적인 친수성 가교체이다. 그러나, 일부 실시태양의 경우, 4-아암 중합체 (예컨대, 4-아암-p-NP-PEG)가 보다 바람직할 수도 있고; 동일한 원리를 기초로 하여, 다-반응성 가교가 유리한 실시태양의 경우에는 8-아암 중합체 (예, 8-아암-NHS-PEG)가 심지어 더욱 바람직할 수도 있다. 또한, 친수성 가교체는 중합체, 즉 전형적으로 공유 화학 결합에 의해 연결되는 반복 구조 단위로 구성된 큰 분자 (거대분자)이다. 친수성 중합체 성분은 1000 Da 이상의 분자량을 가져야 하고 (본 발명에 따른 지혈 조성물에서 가교체로서 적절히 작용하도록); 바람직하게는 본 발명에 따른 가교 중합체는 5000 Da 이상, 특히 8000 Da 이상의 분자량을 가진다.

[0081] 일부 친수성 가교체의 경우, 기능적 성능을 위해 (예컨대, 투여 부위에서의 보다 빠른 가교 반응을 위해) 염기성 반응 조건의 존재 (예컨대, 투여 부위에서)가 바람직하거나 필요하다. 예컨대, 본 발명에 따른 지혈 조성물의 향상된 성능이 가능하도록 또는 지혈 및/또는 상처 부착 물질로서 효율적인 사용이 가능하도록 하기 위하여, 카르보네이트 또는 바이카르보네이트 이온 (예컨대, pH 7.6 이상, 바람직하게는 8.0 이상, 특히 8.3 이상의 완충액으로서)이 투여 부위에 추가로 제공될 수도 있다 (예컨대, 완충 용액으로서 또는 이러한 완충액이 침지된 직물 또는 패드로서).

[0082] 본 발명에 따른 조성물에서 친수성 중합체 성분 (언급된 바와 같이, 가교체로서 작용)의 반응성이 조성물에서 유지된다. 이는, 가교체의 반응성 기가 지혈 조성물과 아직 반응되지 않고 물에 의해 가수분해되지 않음 (또는 본 조성물의 지혈 기능에 대해 부정적인 결과를 가지는 적어도 유의한 양이 아님)을 의미한다. 이는 가교체의 반응성 기와 지혈 중합체 또는 물과의 반응을 유도하지 않는 방식으로 가교된 젤라틴과 친수성 가교체를 조합함으로써 성취될 수 있다. 일반적으로, 이는 수성 조건 (또는 습윤), 특히 (가교체가 산성 조건 하에서 반응성이 아닌 경우) 산성 조건의 존재 없이 습윤하는 것을 생략하는 것을 포함한다. 이는 반응성 지혈 물질의 제공을 가능하게 한다.

[0083] 본 발명에 따른 지혈 조성물에서 가교된 젤라틴 대 친수성 중합체 성분의 바람직한 비율은 0.1 내지 50 % (w/w) 사이, 바람직하게는 5 내지 40 % (w/w) 사이이다.

[0084] 추가 성분이 본 발명에 따른 지혈 조성물에 존재할 수 있다. 바람직한 실시태양에 따르면, 본 발명에 따른 지혈 조성물은 항섬유소용해제(antifibrinolytic), 전구응고제(procoagulant), 혈소판 활성제, 항생제, 혈관수축제, 염료, 성장 인자, 골 형성 단백질 및 진통제로 구성된 군에서 선택되는 물질을 추가로 포함할 수 있다.

[0085] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 지혈 조성물을 함유하는 완성된 최종 용기를 언급한다. 이 완성된 용기는 무균, 보관-안정성이고 시판가능한 형태에서 본 발명에 따른 지혈 조성물을 함유한다. 최종 용기는 제약상 투여가능한 화합물을 수용 (및 보관)하기 위해 적합한 임의의 용기일 수 있다. 주사기, 바이알, 관 등이 사용될 수 있다; 그러나, 주사기 내에 본 발명에 따른 지혈 조성물을 제공하는 것이 특히 바람직하다. 의료 시술에서

주사기의 취급상 이점 때문에도 선행 기술에 개시된 것과 같이 주사기가 지혈 조성물을 위한 바람직한 투여 수단이었다. 이어서 조성물을 주사기의 특정한 바늘을 통해 또는 적합한 카테터를 통해 바람직하게 적용할 수도 있다 (재구성 후에). 재구성된 지혈 조성물 (바람직하게는 히드로겔을 형성하기 위해 재구성됨)은 다양한 기타 수단에 의해, 예컨대 스파츌라, 브러쉬, 스프레이에 의해, 압력에 의해 수동으로 또는 임의의 기타 통상적인 기술에 의해 적용될 수도 있다. 재구성된 지혈 조성물을 현미경 (복강경) 수단에 의해 환자에게 투여하는 것이 특히 바람직하다. 일반적으로, 본 발명에 따른 재구성된 지혈 조성물은, 비드, 층 또는 물질의 유사한 부분을 형성하기 위해 구멍, 개구부, 바늘, 관 또는 기타 통로를 통해 재구성된 조성물을 압출할 수 있는 주사기 또는 유사한 적용장치를 사용하여 적용될 것이다. 전형적으로 0.01 mm 내지 5.0 mm 사이, 바람직하게는 0.5 mm 내지 2.5 mm 범위의 크기를 가지는, 주사기 또는 기타 적용장치에 있는 구멍을 통한 압출에 의하여 조성물의 기계적 파괴가 수행될 수 있다. 그러나, 바람직하게는, 지혈 조성물을 (특히 수화에 의한 재구성 시에, 필수 크기의 하위단위 (예, 히드로겔 하위단위)를 생성하는) 바람직한 입자 크기를 가진 건조 형태로부터 초기에 제조하거나, 또는 최종 압출 또는 기타 적용 단계에 앞서서 필수 크기로 일부 또는 전부 기계적으로 파괴시킬 것이다. 물론, 인간 사용을 위한 안전성 요건을 충족하기 위하여, 이러한 기계적 성분이 무균 형태 (내부 및 외부에서)로 제공되어야 하는 것은 명백하다.

[0086] 본 발명에 따른 지혈 조성물은 바람직하게 40 N 이하, 예컨대, 30 N 미만 또는 20 N 미만, 바람직하게는 15 내지 30 N의 범위에의 압출력을 이용하여, 실시예 1에서 기술되듯이 용기로부터 환자에게 그의 페이스트 형태로 제공된다.

[0087] 발명의 또 다른 측면은 본 발명에 따른 지혈 조성물과의 접촉을 포함하는 사용-준비된 지혈 조성물의 제공 방법에 관한 것이다.

### 도면의 간단한 설명

[0088] 발명은 하기 실시예 및 도면에서 추가로 기술되나, 이에 제한되지 않는다.

도 1은 트롬빈 성분 중 인간 혈청 알부민의 다양한 농도를 가진 17.5 % (w/w) 가교된 젤라틴을 함유한 글루타르 알데히드 가교된 젤라틴 페이스트의 평균 압출력 (압출력은 제품을 250 mm/분의 압축 속도에서 주사기 밖으로 밀어내기 위해 요구되며, 35 mm 거리에서 계산되며; 모든 제품은 상온에서 30분 동안 인큐베이팅되며 압출력 측정 바로 전에 짧게 빨리 재-분출된다)을 나타낸다. x-축은 트롬빈 성분 중 인간 혈청 알부민 농도를 [g/1]로 나타내며, y-축은 평균 압출력을 [N]으로 나타낸다.

도 2는 인간 혈청 알부민의 농도에 의존하여 17.5 % (w/w) 가교된 젤라틴을 함유한 가교된 젤라틴 페이스트의 컨시스턴시를 나타낸다.

도 3은 트롬빈 성분 중 인간 혈청 알부민의 다양한 농도를 가진 17.5 % (w/w) 젤라틴을 함유한 제니핀 가교된 젤라틴 페이스트의 평균 압출력을 나타낸다. x-축은 트롬빈 성분 중 인간 혈청 알부민 농도를 [g/1]로 나타내며, y-축은 평균 압출력을 [N]으로 나타낸다.

도 4는 시험 물품 적용 및 근사 후의 출혈 심각성의 평가를 나타낸다.

도 5 내지 8은 상이한 제제의 돼지 간 편치-생검 모델에서 지혈 효율성을 나타낸다. x-축은 적용 후 시간을 [초]로 나타내며, y-축은 지혈 성공 퍼센트를 나타낸다 (도 5의 "출혈 없음" 및 도 6의 "출혈 없음" 또는 "스며듦"으로 정의된다).

도 5 및 6에서 부호는 다음을 의미한다:

\_\_\_\_\_ 트롬빈 용액 (n=8) 중 50 g/1 인간 혈청 알부민을 가진 글루타르알데히드 가교된 젤라틴

----- 트롬빈 용액 (n=8) 중 75 g/1 인간 혈청 알부민을 가진 글루타르알데히드 가교된 젤라틴

도 7 및 8에서 부호는 다음을 의미한다:

\_\_\_\_\_ ≈ 17.5 % (w/w) 글루타르알데히드 가교된 젤라틴

----- ≈ 14.5 % (w/w) 글루타르알데히드 가교된 젤라틴

..... ≈ 17.5 % (w/w) 글루타르알데히드 가교된 젤라틴 더하기 트롬빈 용액 중 2.5 % PEG 10,000

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0089]

실시예 1: 압출력 (EF)의 측정

[0090]

250 mm/분의 크로스-빔 속도에서 작동하는 100 N 로드 셀이 장착된 인스트론(Instron) 모델 5544 기계적 시험기를 사용하여 제품을 주사기로부터 압출하는데 요구되는 압출력을 측정하였다. 거의 전체 제품을 주사기 밖으로 압출하기 위해서 주사기 플런저가 움직이는 거리에 상응하는 완전한 크로스-빔 이동 (34 mm 편차) 동안 필요한 압축력을 측정하였다. 이러한 힘으로부터 다음과 같이 평균 압출력을 계산하였다:

[0091]

$$\text{총 에너지 (mJ)} = \text{평균 힘 (N)} \times \text{최대 편차 (mm)}$$

[0092]

[0093]

이 시험용 시료를 다음과 같이 제조하였다: 웅형 루어(male luer) 잠금 시스템 (어댑터가 부착되는 내부 노즐 내강 직경은 2.54 mm로 측정)을 가진 5 ml 표준 주사기 (12.2 mm의 내부 직경을 가진 원통형 바디를 가짐)를 고체 시료의 0.704 g 건조 질량 (약 12 %의 잔여 습기를 고려하여 약 0.8 g)으로 채운다. 희석제로서 40 mM 염화 칼슘 중 500 IU/ml 트롬빈을 함유한 트롬빈 용액 3.2 ml 및 인간 혈청 일부민 0, 5, 15, 25, 50 또는 75 mg/ml 을 사용하였다. 희석제와 고체 성분을 희석제를 수용한 주사기 (자형 루어 잠금 시스템을 가진 표준 5 ml 주사기) 및 건조 성분을 수용한 주사기에 연결하고 성분을 10 번 이상 왔다갔다 밀어서 (이 혼합 기술을 "분출(swooshing)"이라 함) 혼합하였다. 그 후에 시료를 측정 전에 상온에서 30 분 동안 인큐베이팅하였다. 인큐베이팅 후에 각 시료는 두 번 "재-분출"하였고 제품을 수용한 주사기 (상기 언급한 대로 이전에 건조 성분을 수용한 주사기)를 가단성있는 적용장치 (자웅 루어 연결 시스템, 두 와이어를 수용하며 총 길이 141.5 mm를 가지는 직경 2.29 mm의 내부관)에 연결하였다. 주사기는 적용장치와 조립하여 인스트론 셋업 내로 배치하고 시험을 시작하였다. 주사기와 적용장치는 박스터(Baxter)로부터 플로실 지헬 메트릭스 제품의 일부로서 시판되었다.

[0094]

플로실 내 글루타르알데히드 가교된 젤라틴의 결과는 도 1에 묘사되며 이하 기술되는 가교된 젤라틴의 결과는 도 3에 묘사되며 또한 상응하는 표 1 및 표 2에 나타난다. 일부민 농도에 의존하여 17.5 % (w/w) 가교된 젤라틴을 함유한 가교된 젤라틴 페이스트의 컨시스턴시는 도 2에 나타난다 (0, 25, 50 및 75 g/l 인간 혈청 일부민이 트롬빈 성분에 제공됨).

표 1

트롬빈 성분 중 c(알부민) [g/l]	압출력 [N]	표준 편차
0	40	2.4
5	38	1.5
15	30	2.6
25	25	2.2
50	19	1.5
60	19	1.0

표 2

트롬빈 성분 중 c(알부민) g/l	압출력 [N]	표준 편차
0	54	1.9
15	29	3.6
50	17	2.2

[0097]

제니핀 가교된 젤라틴의 제조:

[0098]

소 유래 콜라겐을 알칼리 처리를 통해 처리하고 그 후에 탈이온처리수 (DIW)로 행궈서 잔여 염을 제거한다. 젤라틴을 열 처리에 의해 추출하여 시트 내에 건조시켰다. 가교제로서 제니핀을 사용하여 가공하게 되는 분말로 시트를 분쇄하였다. 1 kg의 젤라틴 과립을 DIW 중 10 mM 제니핀 용액 201에 첨가하였다. 반응은 23 °C에서 자켓된 온도 제어 탱크 내에서 중성 pH (7.2)에서 수행하였다. 혼합은 6 시간 동안 수행하였고 용액을 빼내어, 고체를 메쉬 내에 보유시키며 DIW로 행구어 잔여 제니핀을 씻어냈다. 물질은 5 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액 중에서 20 시간 동안 재-현탁하였다. 물질을 DIW로 행구어 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 씻어냈다. 고체를 진공 하에서 거름 종이 상에 예비-건조시키

고 그런 다음 2.5일 동안 오븐 건조하였다. 건조된 매트릭스를 분말로 분쇄하여서 감마선 조사에 노출 전에 각 플라스틱 주사기 내를 채웠다.

[0099] 실시예 2: 지혈 효율성의 측정

[0100] 물질 및 방법:

[0101] 동물 모델

[0102] 이 모델을 위해, 중심선 개복을 수행한 후 수술 절개로부터 출혈을 멈추기 위해 전기소작한다. 간이 노출되며 엽이 고립된다. 10 mm 직경 편치 생검을 사용하여 코어 조직이 제거된 채, 대략 5 mm 깊이, 가득 차지 않은 두께 병변, 2 시리즈를 생성한다. 사전-무게 젠 거즈를 가지고, 10 초 동안 각 병변으로부터 흐르는 혈액을 수집하는 것을 포함하는 사전-처리 평가를 병변 상에서 행한다.

[0103] 시험 물품은 시료 처리를 보지 못하는 외과의에게 임의로 선택되어 제공된다. 대략 1.0 ml의 할당된 시험 물품이 병변에 국소적으로 적용된다. 식염수 거즈를 사용하여 시험 물품이 그의 지정된 병변에 근접하는 것을 돋고 타이머를 시작한다. 식염수 거즈는 30 초 후에 제거한다.

[0104] 출혈도는 30, 60, 90, 120, 300 및 600 초에서 평가한다. 시험 물품이 그의 지정된 병변에 적용된 후 도 3에서 묘사된다 (출혈도: 0: 출혈 없음 (혈액으로 포화된 제품); 1: 스며듦 (제품 외부로 출혈하나 혈액 방울은 없음); 2: 매우 약간 (제품상의 혈액 방울); 3: 약간 (혈액 방울이 아래로 흐름); 4: 보통 (소량의 혈액이 아래로 흐름); 5: 심각 (대량의 혈액이 아래로 흐름)).

[0105] 혈액으로 포화되나 활성 출혈은 없는 제품은 "0"(영)으로 매겨진다. 식염수를 사용하여 300 초 평가 후 병변으로부터 떨어진 초과 시험 물품을 세척한다. 과정은 반복되며 다중 간접에서 수행한다. 1인의 외과의가 관찰 평가를 생성하고 처리하며 수행한다.

[0106] 시험 물품 합성

[0107] 돼지-간 모델에서 생체 내 평가를 위한 시험 물품은 가교된 젤라틴 페이스트 (트롬빈 용액 (추가적인 2.5 % PEG 가 있거나 또는 없이) 25 또는 50 g/1 인간 혈청 알부민을 가진 14.5 % 및 17.5 % 농도에서)를 제조하여 만들어 진다.

[0108] 결과는 17.5 % 젤라틴을 가진 향상된 성능 및 가소제 (PEG)의 존재하에서 보다 낮은 효율성을 보이는 도 5 내지 8에서 묘사된다.

[0109] 실시예 3:

[0110] 젤라틴 시료는 커플 키 예외를 가진 플로실을 위한 패키지 삽입에 따라 제형화하였다. 우선, 염화 나트륨을 염화 칼슘 대신에 사용하고 젤라틴을 100 % 대신에 125 % 고체에서 제형화하였다. 젤라틴/트롬빈 제형은 25 분 동안 정지시킨 다음 1 ml의 제제를 벼렸다. 다른 1 ml의 물질을 국부 지혈 시스템 (THS)에 적용하였다. THS 장치는 혈소판 부족 혈장으로 이전에 준비하였다.

[0111] THS는 출혈 상처를 모의시험하도록 지정된 장치이다. 인공 상처는 실리콘 기판 내의 원통형 구멍이다. 실리콘 원통의 표면은 피브리노겐 층으로 코팅하였다. 배압을 기록하면서, 주사기 펌프는 이 경우 혈소판 부족 혈장에서 응고 유체 (전혈, 혈장 등)을 배출하였다. 이 실험에서 혈장은 원통형 상처의 바닥 중심에서 작은 구멍을 통해 0.25 ml/분의 고정 속도에서 흘렀다. 과량의 혈장은 지혈 매트릭스의 적용 직전에 이미 거즈로 적셔졌다. 혈장이 유동을 계속하는 동안, 1 ml의 지혈 매트릭스를 원통형 상처에 적용하였다. 이는 즉시 젖은 거즈로 덮었고 고정 압력을 적용하였다. 30 초 후 웨이트를 제거하고 혈장은 8-10 분 동안 유동을 계속하였고, 이때, 유동이 멈추며 응고가 2 시간 초과 동안 머무르는 습기 챔버의 한쪽에 놓인다. 두 시간 후에, 응고는 8 °C 바이브라토 상에 장착하고, 여기서 대략 500 μm 두께 슬랩이 응고로부터 절개되었다. 이러한 절편을 PBS 완충액에 침지하였다. 슬랩은 사용하지 않을 때 5 °C 냉장고에서 보관하였다. 슬랩을 커버슬립 상에 놓고 NIS-엘리먼츠 어드밴스드 리서치 v3.22.00 빌드 710 (NIS-Elements Advanced Research v3.22.00 Build 710) 소프트웨어를 작동하여 니콘(Nikon) A1R 공초점 현미경으로 이미지화하였다. 현미경 사진을 수집하기 위해, 488 nm의 레이저 여기 광 및 500-550 nm로부터 방출 수집 창과 함께 플랜 끌루어 10x(plan fluor 10x) 대물렌즈를 사용하였다. 투과된 광 이미지는 투과광 검출기를 사용하여 즉각적으로 수집하였다. 이러한 이미징 지표를 이용하여, 소프트웨어에 의해 수행된 자동화된 스티칭을 사용하여 시료의 거시도(macroscopic maps)를 만들었다. 시료의 보다 작은 영역은 또한 5.125 μm의 광학 슬라이스 두께를 가진 3D z-스택 이미지를 수집하여 특성화하였다. 복합 공

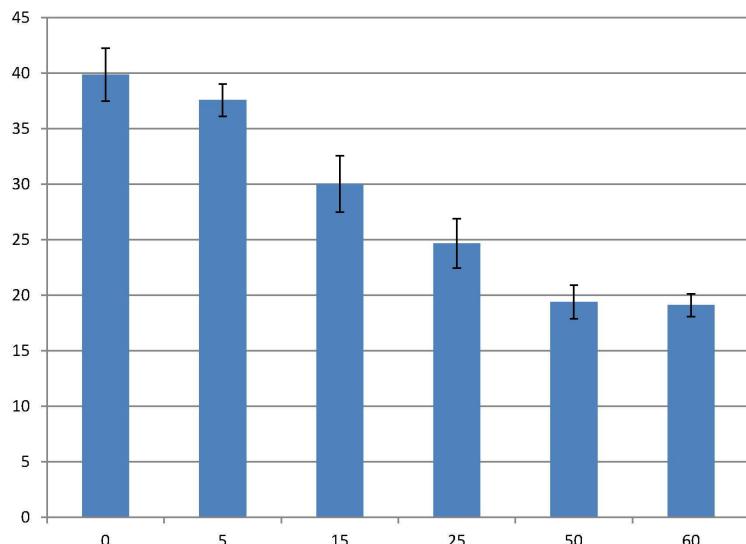
초첨도는 절단된 후에 표면에 위치되는 젤라틴 과립을 식별하기 위하여 사용하였다. 이는 원자힘 현미경 (AFM)에서 탄성 측정의 배치에 중요하다. 응고 슬랩을 비코(Veeco) 다중모드 AFM에 고정하였다. 다중모드는 나노스코프 V 제어기 및 JV 압전 스캐너를 구비하였다.  $4.5 \mu\text{m}$  폴리스티렌 구를 지지하는 노바스캔 AFM 캔틸레버 (Novascan AFM cantilever)를 이용하여 힘 측정을 행하였다. 캔틸레버 힘 상수는 열적 조정법에 의해  $0.779 \text{ N/m}$ 로 측정되었다. 젤라틴 과립 중심 위에 캔틸레버를 놓고, 그런 다음 힘 측정의 16x16 어레이를 행하였다. 각 힘 곡선은 폴리스티렌 구와의 접촉으로 젤라틴 과립을 이동시키는 것 및 젤라틴이 트리거 위치로부터 1.00 마이크로미터 거리 떨어지는, 캔틸레버 굽힘이 2 볼트의 사전설정된 트리거값에 도달할 때까지 과립을 이동시키는 것을 계속하는 것에 관련된다.

#### [0112] <논의>

[0113] 형광 테이터는 글루타르알데히드 가교된 젤라틴이 균질하게 가교되지 않는다는 것을 나타낸다. 대신에, 가교 밀도는 과립의 가장자리 주변에서 보다 높은 것 같으며, 과립의 중심부는 가장자리보다 유의하게 덜 가교되었다. 대조적으로, 제니핀 가교된 젤라틴은 과립 주변에 균질하게 (균일하게) 가교된 것으로 나타난다. 형광 강도에 실질적인 가장자리 효과는 없다. 제니핀 및 글루타르알데히드 가교된 물질의 형광 밀도는, 가교제 자체에 속하는 포텐셜 형광 차이로 인해 직접 비교될 수 없다. 그러나 AFM 측정된 탄성 모듈러스 측정은 제니핀 가교된 젤라틴이 보다 연하게(보다 유연하게) 보이는, 글루타르알데히드 가교된 젤라틴보다 더 강경하다는 것을 나타낸다.

#### 도면

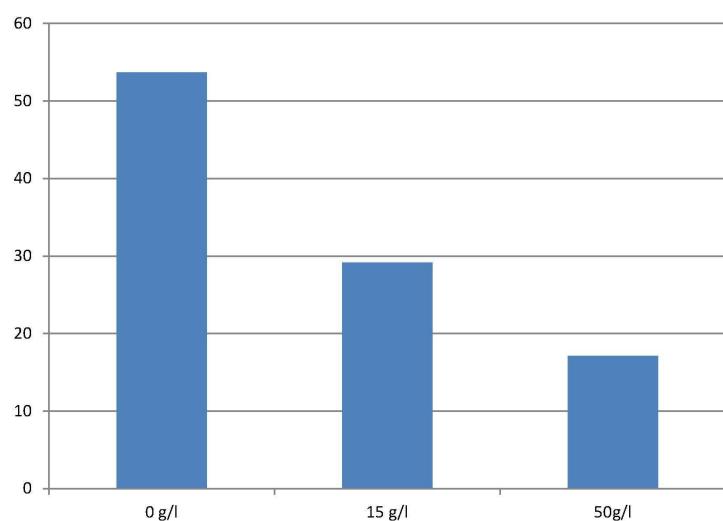
##### 도면1



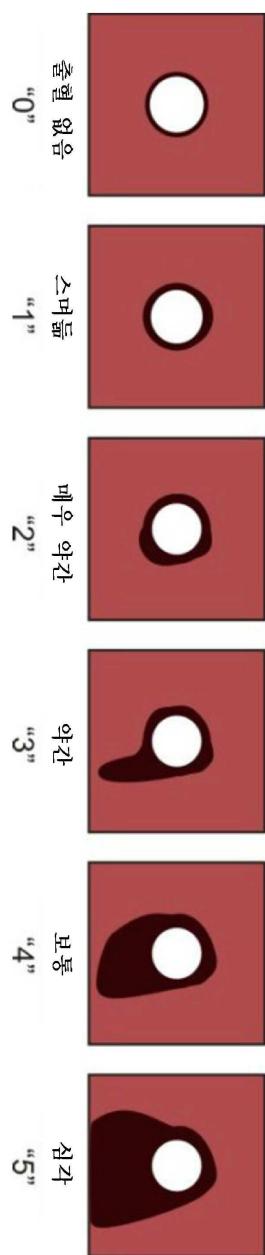
도면2



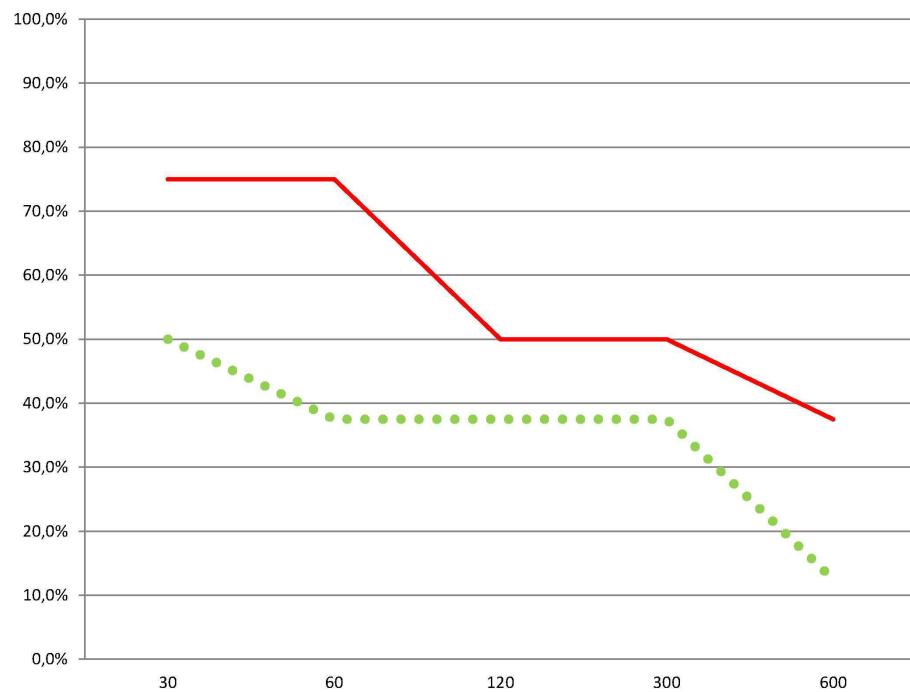
도면3



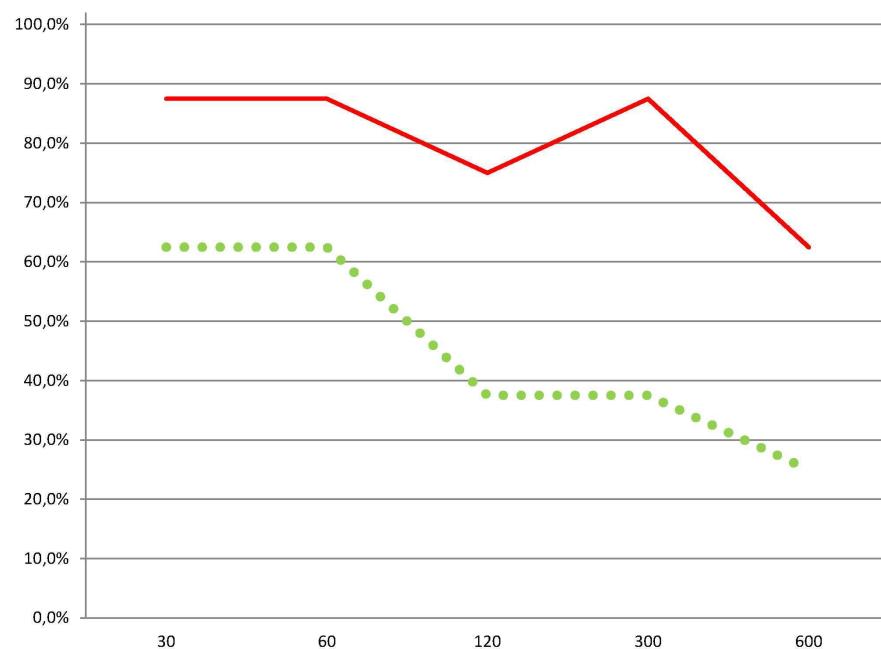
도면4



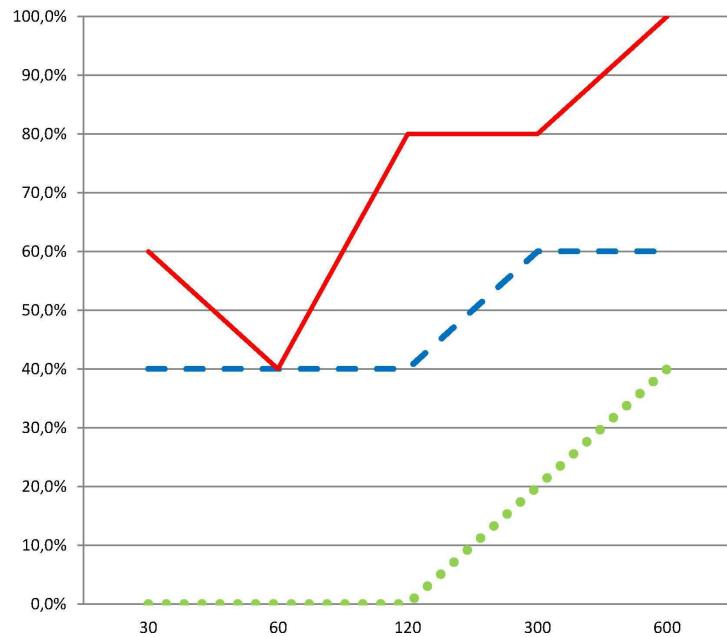
도면5



도면6



도면7



도면8

