

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6588019号
(P6588019)

(45) 発行日 令和1年10月9日(2019.10.9)

(24) 登録日 令和1年9月20日(2019.9.20)

| | |
|---------------|---------------|
| (51) Int.Cl. | F 1 |
| A 6 1 K 38/36 | (2006.01) |
| A 6 1 K 38/07 | (2006.01) |
| A 6 1 K 38/08 | (2019.01) |
| A 6 1 P 7/04 | (2006.01) |
| A 6 1 K 9/08 | (2006.01) |
| | A 6 1 K 38/36 |
| | A 6 1 K 38/07 |
| | A 6 1 K 38/08 |
| | A 6 1 P 7/04 |
| | A 6 1 K 9/08 |

請求項の数 16 (全 21 頁) 最終頁に続く

| | |
|--------------------|-------------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2016-542749 (P2016-542749) |
| (86) (22) 出願日 | 平成26年12月4日 (2014.12.4) |
| (65) 公表番号 | 特表2017-502045 (P2017-502045A) |
| (43) 公表日 | 平成29年1月19日 (2017.1.19) |
| (86) 國際出願番号 | PCT/IL2014/000063 |
| (87) 國際公開番号 | W02015/097688 |
| (87) 國際公開日 | 平成27年7月2日 (2015.7.2) |
| 審査請求日 | 平成29年11月13日 (2017.11.13) |
| (31) 優先権主張番号 | 230151 |
| (32) 優先日 | 平成25年12月24日 (2013.12.24) |
| (33) 優先権主張国・地域又は機関 | イスラエル(IL) |
| (31) 優先権主張番号 | 61/920,646 |
| (32) 優先日 | 平成25年12月24日 (2013.12.24) |
| (33) 優先権主張国・地域又は機関 | 米国(US) |

(73) 特許権者 511203455
 オムリックス・バイオファーマシューティ
 カルズ・リミテッド
 Omrix Biopharmaceut
 icals Ltd.
 イスラエル国、7610601 レホボッ
 ト、ピーオー・ボックス 619、ワイツ
 マン・サイエンス・パーク、ビルディング
 14

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】重合阻害剤を含む一成分型フィブリン糊

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1 ~ 1 3 % (重量体積パーセント) の濃度のフィブリンモノマー、及び G P R P ペプチドを含む液体シーラント製剤であつて、前記 G P R P ペプチドが、前記フィブリンモノマーに対して 3 8 9 倍モル以上の量で前記液体シーラント製剤中に存在し、また、前記液体シーラント製剤が、約 2 0 、 2 1 、 2 2 、 2 3 、 2 4 及び 2 5 からなる群から選択される周囲温度にて、少なくとも 1 4 日間安定している、液体シーラント製剤。

【請求項 2】

前記 G P R P ペプチドが、前記フィブリンモノマーに対して約 3 8 9 ~ 4 6 0 倍モル過剰の量で存在する、請求項 1 に記載の液体シーラント製剤。

10

【請求項 3】

トロンビンを実質的に含まない、請求項 1 又は 2 に記載の液体シーラント製剤。

【請求項 4】

トロンビン活性化因子 X I I I を更に含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の液体シーラント製剤。

【請求項 5】

カルシウムキレート剤を更に含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の液体シーラント製剤。

【請求項 6】

前記カルシウムキレート剤が、クエン酸イオンである、請求項 5 に記載の液体シーラント製剤。

20

ト製剤。

【請求項 7】

前記クエン酸イオンが、クエン酸ナトリウムにより提供される、請求項6に記載の液体シーラント製剤。

【請求項 8】

約 1 mM ~ 約 50 mM のクエン酸ナトリウムを含む、請求項7に記載の液体シーラント製剤。

【請求項 9】

前記液体シーラント製剤が、中性 pH を有する、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の液体シーラント製剤。

10

【請求項 10】

止血、封止、癒合及び / 又は手術にて使用するための、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の液体シーラント製剤。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の液体シーラント製剤を含む容器。

【請求項 12】

請求項11に記載の容器、及び、任意に、使用説明書を含む、キット。

【請求項 13】

1 ~ 13 % (重量体積パーセント) の濃度のフィブリンモノマー、及び G P R P ペプチドを含む、液体シーラント製剤の製造方法であって、前記 G P R P ペプチドが、前記フィブリンモノマーに対して約3 8 9 倍モル以上量で前記液体シーラント製剤中に存在し、かつ、前記液体シーラント製剤が、約 20 、 21 、 22 、 23 、 24 及び 25 からなる群から選択される周囲温度にて、少なくとも 14 日間安定しており、前記製造方法が、

20

- a) 前記フィブリンモノマーを含む成分を提供すること、
- b) 前記 G P R P ペプチド又はその塩を提供すること、並びに
- c) 前記液体シーラント製剤を得るために、a) 及び b) を混合すること、を含む、方法。

【請求項 14】

フィブリノーゲン水溶液をトロンビン又はトロンビン様の酵素に接触させることにより、提供される前記フィブリンモノマーが得られる、請求項13に記載の方法。

30

【請求項 15】

前記成分がトロンビン活性化因子 X I I I を含む、請求項13又は14に記載の方法。

【請求項 16】

前記成分がカルシウムキレート剤を含む、請求項13又は14に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(配列表)

本出願は、E F S - ウェブを介して A S C I I フォーマットで本出願に付随して提出される配列表を含み、その全体は、参照文献として本願に援用されるものである。 2013 年 12 月 22 日に作成された前記 A S C I I コピーは、「配列表 (sequencing listing) 」というファイル名で、サイズは 8 キロバイトである。

40

【0002】

(発明の分野)

本明細書で提供されるのは、单一成分液体シーラント製剤、その調製方法、並びに、とりわけ止血、封止、癒合及び / 又は外科手術のための使用方法である。特に、フィブリンモノマー及び G P R P ペプチドを含む液体シーラント製剤が、本明細書にて開示される。本製剤は、安定性及び長い貯蔵寿命を示し、かつペプチドの追従阻害、中和、希釈及び / 又は除去に有用である。

【背景技術】

50

【0003】

フィブリン糊としても知られているフィブリンシーラントは、数十年にわたって診療所において使用されてきた（例えば、Table 1. J Pharm Pharmaceut Sci, 2012年, 15頁: 124~140項、Dickneite, G et al. Thrombosis Res, 2003年, 112頁: 73~82項を参照のこと）。フィブリンシーラントは、それらの本質的な不安定性故に冷凍保存されるフィブリノーゲンを含む成分及びトロンビンを含む成分の、2つの液体成分からなる場合が多い。時折、フィブリンシーラント生成物は、2つの凍結乾燥した成分からなり、注射器又はその他の注射外筒器具による使用及び送出に先立って直ちに復元を必要とする。凍結乾燥配合物は、通常は安定しているが、フィブリノーゲン成分は復元が困難である。2つの成分溶液を混合する際に、トロンビンはフィブリノーゲンを開裂させ、従って後者からフィブリンポリマーを生成することを可能にする。

10

【0004】

フィブリンシーラントの凝固は、フィブリノーゲン、トロンビン及び第XIII因子が関与する酵素反応により形成される。フィブリノーゲンは、血液凝固基質の前駆体タンパク質である。それは、340,000ダルトンまでの分子量を有し、ジスルフィド結合によって一緒に結合される、3つの対の異なるポリペプチド鎖A、B、及びからなる。フィブリノーゲンは、2つの同一のD末端球状ドメイン及び1つの中央E球状ドメインが、高次コイル-螺旋体によって結合した三節構造を有する。トロンビンは、トロンビンの濃度によって決まる速度での酵素作用により、フィブリノーゲンをフィブリンモノマーに変換する。

20

【0005】

血液凝固系の酵素である第XIII因子は、典型的には糊配合物中に存在し、トロンビンにより活性化される場合又はカルシウムの存在下で架橋して、フィブリン凝固を安定させる。このプロセスは、通常の血液凝固の過程の多くを迂回し、その最終段階を模倣するものである。一部の製造者は、フィブリン糊製剤に抗タンパク質分解剤を添加する（例えば、国際公開特許第93/05822号に記載される）か、あるいは、フィブリン溶解を停止又は遅らせるために特にプラスミノーゲンを除去することを行っている（例えば、米国特許第5,792,835号及び米国特許第7,125,569号に記載される）。

30

【0006】

背景技術としては、Laudano及びDoolittleらの(PNAS 75(7): 3085~9)並びに米国特許第5,219,328号、第5,318,524号、第8,367,802号、第5,750,657号、第6,262,236号、第6,268,483号、第6,500,427号、第5,723,579号、第5,478,810号、第5,607,858号、第6,908,899号並びに第8,513,380号が挙げられる。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

使用に先立ったフィブリンシーラントの調製は、多くの時間を要し、また手間がかかる。実用化されているシーラントは2つの成分、フィブリノーゲンを含む成分及びトロンビンを含む成分からなり、典型的には、乾燥粉末又は個々の冷凍液として供給される。粉末の復元工程は、フィブリノーゲン成分の制限された溶解性故に多くの時間を要し、また多くの場合加熱を必要とする。一度復元又は解凍されると、成分は即時使用のために2つの別々の注射器へと移される。扱いにくい取り扱いを必要とする、及び/又は短い貯蔵寿命を有する単一成分系シーラントが知られている。

40

【0008】

本明細書で提供されるのは、既知のシーラント生成物製剤、製造方法及び/又は使用方法の欠点を克服する、単一成分系、フィブリンモノマー及びGPRPペプチド又はその他の可逆性フィブリン重合ブロック剤、製造方法及び使用方法を含む安定したシーラント製

50

剤である。

【0009】

可逆性フィブリン重合ブロック剤は、サイズが約一(1)kD未満の剤であり得る。幾つかの実施形態では、剤は低分子及び/又は単離ペプチド、その誘導体又はその塩であり、フィブリンモノマーに可逆的に結合してフィブリン重合を阻止するか遅らせることが可能である。幾つかの実施形態では、可逆性フィブリン重合ブロック剤は、低化学分子又は単離ペプチドを含む。可逆性フィブリン重合ブロック剤は、フィブリンモノマーに対する低親和性結合剤であってよく、フィブリン重合において非永久的効果を有してよい。従つて、典型的には、希釈及び/又は低分子交換が重合を開始させる。本明細書のブロック剤は、pHを酸性のpHまで低めることにより作用しない。

10

【0010】

一態様では、1~13% (重量体積パーセント) の濃度のフィブリンモノマー、並びにGPRPペプチド及び/又はその他の可逆性フィブリン重合ブロック剤を含み、前記ブロック剤及び/又は前記GPRPペプチドが、フィブリンモノマーに対して約100モル過剰を超えるか又は約340モル過剰を超える量中に存在し、約20、21、22、23、24及び25からなる群から選択される周囲温度にて少なくとも14日間安定している、液体シーラント製剤が提供される。

【0011】

一実施形態では、液体製剤は、約20、21、22、23、24及び25からなる群から選択される周囲温度にて、90日間まで安定している。

20

【0012】

一実施形態では、液体製剤は、約20、21、22、23、24及び25からなる群から選択される周囲温度にて、14日間の範囲で一時期、及び90日間まで安定している。

【0013】

一実施形態では、GPRPペプチドは、フィブリンモノマーに対して、約100~約460を超えるか又は100~約340を超えるか、あるいは約340~約460倍モル過剰を超える量中に存在する。

【0014】

本発明で使用する場合の用語「フィブリンモノマー」は、多数のフィブリン単位を有するフィブリンモノマー、二量体及びオリゴマーを含み、これにより、フィブリンは可溶性形状で、約20、21、22、23、24及び25からなる群から選択される周囲温度にて水溶液中に保持される。

30

【0015】

一実施形態では、オリゴマーは10までのフィブリン単位を含有する。

【0016】

本発明で使用する場合の用語「フィブリンポリマー」は、約20、21、22、23、24及び25からなる群から選択される周囲温度にて、水溶液中のフィブリンの溶解度を制限する多数のフィブリン単位を有する、複数個のフィブリン単位を含む。

【0017】

40

一実施形態では、ポリマーは10を超えるフィブリン単位を含有する。

【0018】

「周囲温度」とは、フィブリン製剤の周囲環境における温度のことである。

【0019】

一実施形態では、製剤は、例えば2~8又は凍結のような低温度で保存される場合に、より長い期間安定している。解凍後、約20~25の周囲温度を有する位置に製剤を移動させることができ、また少なくとも14日間その温度で安定性を維持する。製剤は更に、これら以外の温度、具体的には上に開示する温度にて安定してよい。

【0020】

各種実施形態では、フィブリンモノマーは1~4% (重量体積パーセント) 又は3.5

50

~ 13 % (重量体積パーセント) の濃度で存在する。

【 0 0 2 1 】

幾つかの実施形態では、製剤は更に製薬上許容できるキャリアを含む。

【 0 0 2 2 】

「製薬上許容されるキャリア」なる用語は、ヒト又は他の動物における使用に適した任意の希釈剤又は溶媒のことを指す。

【 0 0 2 3 】

幾つかの実施形態では、製剤は追加のトロンビンを実質的に含まない。「実質的に含まない」とは、トロンビンが製剤のミリリットル (U / m l) あたり約一 (1) I U 未満であることを意味する。

10

【 0 0 2 4 】

幾つかの実施形態では、G P R P ペプチドは、G l y - P r o - A r g - P r o のテトラペプチドアミノ酸配列を含むペプチド、その誘導体又はその塩を含む。

【 0 0 2 5 】

幾つかの実施形態では、G P R P ペプチドは、配列番号 1 に記述されているアミノ酸配列を有するテトラペプチド、又はその誘導体あるいはその塩である。

【 0 0 2 6 】

幾つかの実施形態では、G P R P ペプチドは、配列番号 1 に記述されているアミノ酸配列からなるテトラペプチド、又はその誘導体あるいはその塩である。

20

【 0 0 2 7 】

各種実施形態では、用語「G P R P ペプチド」は、配列番号 1 ~ 配列番号 4 2 (配列番号 1 、配列番号 2 、配列番号 3 、配列番号 4 、配列番号 5 、配列番号 6 、配列番号 7 、配列番号 8 、配列番号 9 、配列番号 1 0 、配列番号 1 1 、配列番号 1 2 、配列番号 1 3 、配列番号 1 4 、配列番号 1 5 、配列番号 1 6 、配列番号 1 7 、配列番号 1 8 、配列番号 1 9 、配列番号 2 0 、配列番号 2 1 、配列番号 2 2 、配列番号 2 3 、配列番号 2 4 、配列番号 2 5 、配列番号 2 6 、配列番号 2 7 、配列番号 2 8 、配列番号 2 9 、配列番号 3 0 、配列番号 3 1 、配列番号 3 2 、配列番号 3 3 、配列番号 3 4 、配列番号 3 5 、配列番号 3 6 、配列番号 3 7 、配列番号 3 8 、配列番号 3 9 、配列番号 4 0 、配列番号 4 1 、及び配列番号 4 2) から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドからなる群から選択されるペプチド、又はその誘導体若しくはその塩を含む。

30

【 0 0 2 8 】

各種実施形態では、G P R P ペプチドは、配列番号 1 ~ 配列番号 4 2 から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドからなる群又はその誘導体若しくはその塩から選択される。

【 0 0 2 9 】

各種実施形態では、G P R P ペプチドは、配列番号 1 ~ 配列番号 4 2 から選択されるアミノ酸配列から構成されるペプチドからなる群又はその誘導体若しくはその塩から選択される。

【 0 0 3 0 】

幾つかの実施形態では、G P R P ペプチドは G P R P ペプチドアミドである。

40

【 0 0 3 1 】

幾つかの実施形態では、製剤は更にトロンビン活性化第 X I I I 因子を含む。製剤は、カルシウムキレート剤を更に含んでもよい。カルシウムキレート剤は、クエン酸イオン、シュウ酸塩イオン、E D T A 、E G T A 又はこのようなカルシウムキレート剤の組み合わせであってよい。各種実施形態では、カルシウムキレート剤は、例えば、クエン酸ナトリウムとして提供されるようなクエン酸イオンである。クエン酸ナトリウムは、約 1 m M ~ 約 5 0 m M の濃度で製剤中に存在してよい。製剤は、E D T A 及び / 又は E G T A 、例えば約 0 . 1 ~ 約 2 . 5 m M の E D T A 及び / 又は E G T A を含んでよい。

【 0 0 3 2 】

幾つかの実施形態では、製剤は中性 p H 、例えば約 6 ~ 8 の p H 、約 6 . 5 ~ 7 . 5 の p H 、又は約 6 . 7 ~ 7 . 2 の p H を有する。

50

【0033】

幾つかの実施形態では、製剤は緩衝剤を含有する。典型的には、緩衝剤はpHにおけるラジカル転位を妨げる成分である。一実施形態では、緩衝剤は、クエン酸ナトリウム、シユウ酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、グリシン、アルギニン及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。

【0034】

製剤は、止血、癒合、封止及び/又は外科手術、例えば組織封止、創傷治癒、硬膜治癒、縫合糸代用又は吻合において使用されてよい。

【0035】

別の態様では、本明細書で提供するのは、本明細書にて開示する液体シーラント製剤を保持する容器である。幾つかの実施形態では、容器は製剤を含むアンプル、バイアル瓶又はプレフィルド注射器である。幾つかの実施形態では、製剤又は製剤の個々の構成成分は凍結乾燥される。本明細書で提供するのは、冷凍乾燥から復元する際に本明細書にて開示する液体シーラント製剤を提供する、凍結乾燥した製剤を保持する容器である。

10

【0036】

別の態様では、本明細書で提供するのは、本明細書にて開示する液体シーラント製剤を含む容器及び任意に低分子交換機構又はG除去機構を含むキット（並びに所望により、使用説明書）である。

【0037】

低分子交換機構は、フィブリン重合を許容する、低分子で前平衡化済みの樹脂を含有するいずれのモジュールであり得る。製剤中の低分子は、低分子が許容する前記重合のために交換される。

20

【0038】

典型的には、低分子交換は、少なくとも1つの低分子と少なくとも1つの別の低分子との交換である。カラム内の樹脂は、最終製剤及び/又はフィブリン重合を可能にする分子において所望される1つ以上の低分子（複数を含む）により前平衡される。樹脂溶球は、典型的には多孔質であり、この孔は、交換されるこれら分子の分子量の範囲である。

【0039】

一実施形態では、フィブリンモノマー及びGPRPペプチドを含む液体製剤は、多孔質樹脂を充填したカラムを通過する。製剤中のフィブリンモノマーは、樹脂の孔を貫通するには大き過ぎ、またカラムを素早く通過する。機構により結合することなく、低分子、例えば溶液中のGPRPペプチドは樹脂の孔に入り、また再度出ることが可能であるが故に、より曲がりくねった経路を移動し、従って樹脂を貫通するそれらの移動速度を非常に遅める。理論に束縛されるものではないが、樹脂が前平衡されている場合の低分子は、有意な発走を有し、従って樹脂をタンパク質（例えばフィブリンモノマー）と共に流出させる。従って、緩衝剤、塩及びその他の低分子は、この工程において交換される。

30

【0040】

製剤適用の前及び/又はその最中の一実施形態では、GPRPをフィブリンモノマーに対して希釈し、かつGPRPは比率1~60などの100以下の比率、例えば3、4、11、11.3、17、22.7、23、34、45、56.7、又は57である。

40

【0041】

幾つかの実施形態では、器具中における製剤又は製剤の個々の構成成分は凍結乾燥される。従って、キットは、粉末又は液体としてのフィブリンモノマーを含む容器と、粉末又は液体としてのGPRPペプチドを含む容器と、また所望により中性pHの水、酢酸緩衝剤、又はグリシン緩衝剤、あるいはアルギニン緩衝剤、若しくは中性pHのクエン酸緩衝剤などの、冷凍乾燥から復元した液体を含む容器、を含む。一実施形態では、乾燥フィブリンモノマー及びGPRPペプチド粉末は、同一の容器内にて提供される。

【0042】

容器内又は器具内の製剤は、製薬上許容できるキャリアを更に含んでよい。

【0043】

50

更に別の態様では、

- a) 本明細書にて開示する液体シーラント製剤を提供すること、及び
- b) 表面でのフィブリン重合を促進する条件下にて、製剤を表面に適用すること、を含む、表面におけるシーラントの調製方法が提供される。

【0044】

幾つかの実施形態では、表面は、出血している又は出血していない被験体の器官／組織である。被験体としては、ヒトを含む哺乳類動物が挙げられ、ヒト患者であってよい。幾つかの実施形態では、ヒト患者は外科患者である。

【0045】

「表面」とは、シーラント又は糊を形成することが所望される、位置又は場所である。
表面は、シーラントの使用に依存している。シーラントは、例えば、止血、組織固定、グラフト固定、創傷治癒及び吻合に使用してよい。本明細書にて開示する製剤、方法、及び器具は、組織及び器官のグラフト固定、止血の提供を含む血管手術における外科手術創傷の封止、並びに動脈、胃腸管及び気管の吻合などの吻合のために、内部的及び外部的に使用可能である。

【0046】

表面は、裸眼視力で見ることができる皮膚の外面、及び生体の内部解剖学的構造の一部である内部身体部分の表面であり得る。外面としては、顔、喉、頭皮、胸部、背部、耳部、頸部、手部、肘、臀部、膝の皮膚、及びその他の皮膚部位が挙げられるが、これらに限定されない。内部身体部分の例としては、外部環境に晒される体腔又は解剖学的孔、又は鼻孔、唇、耳部、子宮、膣及び卵巣を含む生殖器領域、肺、肛門、脾臓、肝臓、及び心筋などの内部器官が挙げられるが、これらに限定されない。表面は、出血性又は非出血性部位であってよい。表面はまた、作用面であり得る。

【0047】

幾つかの実施形態では、前記条件は、G P R P ペプチドの除去、遮断、中和及び／又は希釈を含む。製剤を直接表面に適用することにより、G P R P ペプチドを除去するか又は希釈してよい。あるいは、製剤を低分子交換機構に通過させることにより、G P R P ペプチドを除去するか又は希釈してよい。また、表面への適用に先立って又は適用中に、製剤をサイズ排除及び／又は親和力系機構に通過させることにより除去又は希釈してよい。除去又は希釈のその他の選択肢としては、G P R P 相補成分の機構への追加が挙げられる。
機構における相補成分は、本質的に親和性の方法である。

【0048】

あるいは、又は加えて、製剤中のG P R P は、ペプチド、例えばG P R P ペプチドの相補成分又はG P R P を置換してフィブリンに結合させることができ可能な抗体を添加することにより、中和及び／又は遮断され得る。

【0049】

更なる別の態様では、本明細書にて開示した、治療に有効な量の液体シーラント製剤を被験者に適用することを含む、被験者の必要に応じた癒合、封止及び／又は失血の減少方法が提供される。製剤は、フィブリン重合を促進する条件下にて被験者に適用される。幾つかの実施形態では、前記条件は、G P R P ペプチドの除去、遮断、中和及び／又は希釈を含む。

【0050】

用語「治療的有効量」とは、疾患、障害、又は状態を予防、改善、及び／又は治療する上で必要とされる用量のことを意味する。有効用量は、被験者の年齢及び体重、疾患又は状態及びその重症度、並びに当業者によって認識され得る他の要因に応じて変えることができる。

【0051】

別の態様では、癒合、封止、失血の減少及び／又は外科手術にて使用するための、本明細書にて開示する液体シーラント製剤が提供される。

【0052】

10

20

30

40

50

更に別の態様では、本明細書で提供するのは、本明細書にて開示する液体シーラント製剤の製造方法であって、

- a) フィブリンモノマーを含む成分を提供すること、
- b) G P R P ペプチド又はその他の可逆性フィブリン重合ブロック剤、その誘導体又はその塩、

c) フィブリンモノマーに対して、モル過剰が 100 倍を超える又は少なくとも 340 倍を超える量の G P R P を含む液体シーラント製剤を得るために、a) 及び b) を混合すること、またフィブリンモノマー濃度が 1 ~ 13 % (重量体積パーセント) であること、を含む方法である。

【 0053 】

10

ある種の実施形態にて、約 100 ~ 約 460 を超えるか、又は 100 ~ 約 340 を超えるか、あるいは約 340 ~ 約 460 倍の、フィブリンモノマーに対するモル過剰比率である。

【 0054 】

用語「混合する」とは、任意の順序で、任意の組み合わせ及び / 又は副組み合わせで成分を混合することを意味する。

【 0055 】

更に、本方法により入手可能な液体シーラント製剤が提供される。

【 0056 】

20

フィブリノーゲンをフィブリンへ開裂することが可能な条件下にて、フィブリノーゲンを含む水溶液をトロンビンに接触させることにより、フィブリンモノマーを得てもよい。このような実施形態では、フィブリンモノマーの調製は、フィブリン重合が阻害される条件下、例えば G P R P 又はその他の可逆性フィブリン重合ブロック剤が存在する条件下である。一実施形態では、フィブリンは、重合を阻害する条件下 (例えば温度を下げる) 及び後から G P R P ペプチドが添加される条件下にてフィブリノーゲンから得られる。

【 0057 】

トロンビンは、溶液中に遊離しているか、溶球に固定されてもよい。

【 0058 】

30

トロンビンが溶球に固定される場合、例えば溶球が群形状又は列状で、フィブリノーゲン成分が溶球を通過 / 接触し、得られた製剤 / 成分はトロンビンの残留物量を含んでよい。幾つかの実施形態では、製剤はトロンビンを実質的に含まず、例えば、有しても約一 (1) I U / m l 未満である。

【 0059 】

幾つかの実施形態では、製剤 / 成分はトロンビン活性化第 X I I I 因子を含む。

【 0060 】

あるいは、フィブリノーゲンをフィブリンへ開裂することが可能な条件下にて、フィブリノーゲンを含む水溶液をトロンビン様の酵素に接触させることにより、製剤中のフィブリンモノマーを得てもよい。このような酵素の例は、フィブリノペプチド A (F p A) を開裂するバトロキソビンのような蛇毒酵素である。このような実施形態では、フィブリンモノマーの調製は、フィブリン重合が阻害される条件下、例えば G P R P 又はその他の可逆性フィブリン重合ブロック剤が存在する条件下である。

40

【 0061 】

幾つかの実施形態では、フィブリンモノマー成分 / 製剤は、更にカルシウムキレート剤を含む。

【 0062 】

幾つかの実施形態では、製造方法は、乾燥製剤を提供する乾燥工程を含む。

【 0063 】

G P R P ペプチド及び / 又はフィブリンモノマーを含む成分は、粉末及び / 又は液体の形状であり得る。

【 0064 】

50

更に、本明細書で提供された方法を使用して製造される、シーラント製剤が提供される。

【0065】

フィブリノーゲンは、初期血液組成物から調製可能である。血液組成物は、全血液、又は血液の一部、すなわち、血漿のような全血液の生成物であり得る。フィブリノーゲンは、自己由来、プール血漿を含むヒト、又は非ヒト源であり得る。フィブリノーゲンは、組換え法により調製されるか、又は化学修飾され得ることもまた可能である。

【0066】

本発明の一実施形態では、フィブリノーゲン溶液は、血漿由来のタンパク質溶液である生物学的活性成分（BAC）を含み、トラネキサム酸等の抗線維素溶解剤及び／若しくはアルギニン、リシン、これらの製薬的に許容できる塩などの安定剤、又はこれらの混合物を更に含む。BACは、クリオプレシピテート、特に濃縮クリオプレシピテート由来であり得る。

10

【0067】

「クリオプレシピテート」なる用語は、全血より調製した凍結血漿から得られる血液成分のことを指す。クリオプレシピテートは、凍結した血漿を低温、通常は0～4℃の温度で解凍すると、フィブリノーゲン及び第XIII因子を含む沈殿物が形成されることで得られる。沈殿物は、例えば、遠心分離によって収集し、120mMの塩化ナトリウム、1mMの塩化カルシウム、10mMのクエン酸三ナトリウム、120mMのグリシン、95mMのアルギニン塩酸塩を含む緩衝液等の好適な緩衝剤に溶解することができる。BACの溶液は、例えば、米国特許第6,121,232号及び国際特許公開第9833533号に記載されるように、例えば、第VIII因子、フィブロネクチン、ヴァン・ヴィレブランド因子（vWF）、ビトロネクチン等の追加の因子を含むことができる。BAC組成物は、トラネキサム酸及びアルギニン塩酸塩等の安定剤を含む。BAC溶液中のトラネキサム酸の量は、約80～約110mg/mlであり得る。

20

【0068】

別の実施形態では、BAC組成物中のプラスミノーゲン及びプラスミンの濃度を、例えば、米国特許第7,125,569号、欧州特許第1,390,485号及び国際特許公開第02095019号に記載されている様な方法を用いて、15μg/ml以下、例えば5μg/ml以下のプラスミノーゲンにまで低下させる。本発明の別の実施形態では、BAC組成物のプラスミノーゲン及びプラスミンの濃度を低下させた場合、組成物はトラネキサム酸又はアプロチニンを含有しない。

30

【0069】

フィブリノーゲン溶液は、BAC2成分（EVICEL（登録商標）より）、又は、ヒト血漿から生成される、精製した組換えフィブリノーゲン若しくはクリオプレシピテートなどの、任意のその他のフィブリノーゲン含有溶液であってよい。

【0070】

一実施形態では、製剤は完全に溶解した溶液であり、その溶質及び溶媒が、例えば液相などの一方の相のみを構成する溶液である。

40

【0071】

これらの、及びその他の態様並びに本発明の実施形態は、本発明及び図についての以下の詳細な説明への言及の際に、明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0072】

【図1】フィブリン重合時間における、一定のフィブリン濃度での、GPRPペプチド濃縮の効果を示すグラフである。

【図2A】GPRPペプチド及びフィブリンを含む液体製剤を示す。

【図2B】GPRPペプチドの除去後に生じたフィブリン重合を示す。本実施形態では、製剤を低分子交換機構にさらすことにより、GPRPペプチドを除去した。

【発明を実施するための形態】

50

【0073】

本開示は、部分的に、特定の濃度のフィブリンモノマー及びG P R Pペプチドを含む安定したシーラント製剤を見出すことに基づく。

【0074】

本明細書で提供されるのは、現在利用可能なシーラント製剤の欠陥を克服する、特定のモル比でフィブリンモノマー及びG P R Pペプチドを含む液体シーラント製剤である。本明細書で更に提供されるのは、製剤の製造方法及び使用方法である。

【0075】

本明細書で提供されるのは、a) フィブリンモノマー、及びb) G P R Pペプチド又はその他の可逆性フィブリン重合プロック剤を含む、液体シーラント製剤である。フィブリンモノマーは、約1%～約13%の濃度（体積あたりの重量（w/v））で存在する。一実施形態では、G P R Pペプチドは、G l y - P r o - A r g - P r o (G P R P : 配列番号1)のアミノ酸配列、その誘導体又はその塩を有し、かつフィブリンモノマーに対して100倍モル過剰を超える量、フィブリンモノマーに対して約340倍モル過剰以上の量又は約340～約460倍モル過剰以上の量にて存在する。

10

【0076】

別の実施形態では、G P R Pペプチドは、G l y - P r o - A r g - P r o (配列番号1)又はG l y - P r o - A r g - V a l (配列番号23)のアミノ酸配列を含む。

【0077】

各種実施形態では、G P R Pペプチドは、配列番号2～配列番号42から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドからなる群から選択される。

20

【0078】

安定性は、最小の自然重合、又は自然重合の非存在、若しくは製剤における凝固を観察することによって決定することができるが、例えばそれは、製剤が自然重合を示さないか自然重合を有さない、あるいはG P R Pペプチドの存在下で14日間まで凝固せず、かつG P R Pを除去、希釈、遮断及び/又は中和する際に、その凝固活性レベルが100以下のモル過剰で保持されることを観察することによって決定することができる。凝固活性レベル又はシーラントを形成する製剤の能力を、生体外及び/又は生体内で、当該技術分野において既知の方法を使用して決定することができる。安定性は更に、最小のフィブリンポリマーの存在、フィブリンポリマーの非存在、又は貯蔵準備のできた液体製剤の凝固を測定及び観察することによって決定することができる。

30

【0079】

使用する際、例えば使用目的に従って濃度を希釈することにより、G P R Pの作用を減らすことができる。止血においては、1分未満の凝固時間を得るための利点となるであろう。一実施形態では、製剤中のG P R P濃度を100倍以下のモル過剰又は34倍以下のモル過剰まで希釈する。

【0080】

グラフト固定においては、約15分の凝固時間を得るための利点となるであろう。一実施形態では、製剤中のG P R P濃度を100倍以下のモル過剰又は56倍以下のモル過剰まで希釈する。

40

【0081】

液体シーラント製剤に関する場合、用語「安定」と「安定性」とは、液体シーラント製剤を表面に適用する前に、当該製剤中においてフィブリン重合/フィブリン凝固が非存在であることを意味する。本明細書にて開示した製剤は、上記のように少なくとも14(十四)日間、周囲温度にて安定している。

【0082】

フィブリン重合又は凝固は、例えば、斜平面(又は落下試験モデル)における移動距離を測定すること、若しくは当該技術分野において既知である、他の任意の方法により測定することができる。完全な重合は、例えば反転の際に、液体製剤の流れの停止により評価することができる。Stat 4凝固分析器 Stago Diagnostics又は

50

同様の凝固計を使用して、迅速な重合を測定することができる。

【0083】

例えは2～8で1年を越える長期保管のために、フィブリンモノマー及びG P R Pペプチドを含む製剤は、滅菌バイアル瓶、アンプル、又はその他の容器へと分取されてよく、続いて密閉される。一実施形態では、注射器を用いてシールにわたって製剤の除去を可能にするシールが使用される。容器は、薬剤又は医療装置分野の標準的技法に従ってラベル付けすることができる。

【0084】

使用者により使用方法が決定される（例えは、医師、看護士、病院助手などの医学的施術者）、即ち、個々の患者の必要及び出血又は状態の重症度に従って使用方法が決定されるにもかかわらず、使用する際、容器から直接液体シーラント製剤を適用することができる、低分子交換機構を通過させるかG P R P除去機構（例えは、G P R P相補成分を有する親和性機構）を通すことができる。

10

【0085】

本明細書において使用するとき、不定冠詞「a」及び「a n」は、文脈が明確にそうでない旨を表さない限り、「少なくとも1つの」又は「1つ以上の」を意味する。

【0086】

本発明で使用する場合、用語「含む（comprising）」、「含む（including）」、「有する」、及びその文法的变形は、記載される特徴、工程、又は構成要素を特定するものとして理解されるが、1つ以上の追加的特徴、工程、構成要素、又はこれらの群の追加を排除するものではない。

20

【0087】

用語「約」が数的値に先行する場合、用語「約」は+/-10%を示すことを目的としている。

【0088】

本発明で使用する場合、用語「ペプチド」とは、約4～約50の逐次的アミノ酸の分離化合物、又はアミノ酸類似体を意味するよう広く使用される。ペプチドの定義に含まれるものとしては、例えは、1つ以上のアミノ酸類似体（例えは、合成アミノ酸、ペプトイド等を含む）、置換結合を伴うペプチド、ペプチド塩、並びに自然発生及び非自然発生（例えは合成的）両方の、当該技術分野において既知のその他の変異を含有するペプチドである。従って、合成ペプチド、環化ペプチド、分枝鎖ペプチドなどが定義に含まれる。

30

【0089】

用語「ペプチド」は、1つ以上の置換、付加及び/又は欠損を有する本発明のアミノ酸配列の誘導体を更に含み、1つ以上の非自然発生アミノ酸を含む。好ましくは、誘導体は、基準配列に対して少なくとも約50%の同一性、好ましくは少なくとも約70%の同一性、より好ましくは少なくとも約75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の、本明細書に記載される基準配列に対する配列同一性を示す。ペプチド誘導体としては、例えは、可逆的にフィブリン重合を阻害するなどの所望の作用をペプチドが保持する限り、欠損、付加又は置換（一般に、本質的に同類である）などの自然配列に対する変異を挙げることができる。

40

【0090】

変異は、部位特異的突然変異誘発を通して慎重になされてよい、又はP C R遺伝子増幅によってタンパク質若しくはエラーを生成する、合成若しくは宿主の突然変異などのように偶発的になされてよい。更に、本明細書で包含するのは、薬剤として許容されるペプチドの塩、及びこのようないかの、その誘導体である。

【0091】

可逆的阻害剤はフィブリンモノマーに対する阻害剤（例えは、G P R Pペプチド）の低親和性に関連し、かつフィブリン重合又はフィブリン凝固に恒久的な作用を有さない。従って、典型的には、希釀、除去及び/又は低分子交換は、阻害作用を取り除く。

50

【0092】

用語「可逆性フィブリン重合阻害剤」は、用語「可逆性フィブリン重合ブロック剤」と本明細書で互換性がある。

【0093】

「G P R P ペプチド」により、配列番号1、具体的にはG l y - P r o - A r g - P r o配列に記述されている4以上の逐次的アミノ酸配列のペプチドが意味される。G P R P ペプチドは、四量体(G P R P、配列番号1)、その誘導体又はその類似体を含んでよい。G P R P ペプチドは、延びが4~12のアミノ酸残基、又は4~8、好ましくは延びが4、5、6、7若しくは8のアミノ酸であってよい。

【0094】

理論に束縛されるものではないが、G P R P ペプチドはフィブリンモノマーに結合することができ、それによってフィブリンモノマーの対合及び重合を阻止する。G P R P ペプチドは、例えば、米国特許番号第5,478,810及び第5,607,858に参考として組み込まれ開示されている、Gがグリシンアミノ酸、PがL-プロリンアミノ酸、RがL-アルギニンアミノ酸、Xがプロリン以外のタンパク質を構成するアミノ酸又はプロリンを含むジペプチド、Nが窒素、並びにR₁及びR₂が同一又は異なる水素又は4個までの炭素原子を有する低アルキル鎖である、式G P R P - X - N(R₁ R₂)を有するG P R P ペプチドアミド(C-末端におけるアミド)を含んでよい。その他のG P R P ペプチドとしては、アミノ酸配列G P R P(配列番号1)、G P R V(配列番号2)、又はG H R P(配列番号3)を有するペプチドなどの、米国特許番号第8,513,380に開示されている「フィブリンノブペプチド」と称するペプチドが挙げられる。G P R P ペプチドは、Xが任意のアミノ酸である、アミノ酸配列G P R P X(配列番号32)、G P R V X(配列番号33)、G P R P X X(配列番号34)、G P R V X X(配列番号35)、G P R P X X X(配列番号36)、G P R V X X X(配列番号37)、G P R P X X X X(配列番号38)、G P R V X X X X(配列番号39)、又はG P R X X X X(配列番号40)を有することができる。

【0095】

ペプチドはまた、例えば、その後にその他の剤と化学反応してC-末端複合体を生成することを可能にする、システイン又はリジンなどのC-末端アミノ酸も有することができる。従って、幾つかの実施形態では、ペプチドのC-末端アミノ酸はシステインである。従って、幾つかの実施形態では、ペプチドのC-末端アミノ酸はリジンである。例えば、G P R P ペプチドは、アミノ酸配列G P R P A A C(配列番号25)、G P R P F P A C(配列番号26)、G P R P P E R C(配列番号27)、G P R V V E R C(配列番号28)、G P R V V A A C(配列番号29)、又はG P S P A A C(配列番号30)を有することができる。

【0096】

配列番号1~42に記述されているペプチド配列のいずれかは、例えば、上述の参考特許に開示されるようなペプチドアミドであってよい。

【0097】

アミノ酸及びペプチド配列は、通常、表Aで以下に示すように略記される。

【0098】

10

20

30

40

【表1】

表A：略語、系統名及び一般のアミノ酸製剤式

| 名称 | 記号／略称 | 系統名 | 製剤 |
|----------|-------|------|-------------------------------|
| | 3ltr | 1ltr | |
| アラニン | Ala | A | 2-アミノプロパン酸 |
| アルギニン | Arg | R | 2-アミノ-5-グアニジノペンタン酸 |
| アスパラギン | Asn | N | 2-アミノ-3-カルバモイルプロパン酸 |
| アスパラギン酸 | Asp | D | 2-アミノブタン二酸 |
| システイン | Cys | C | 2-アミノ-3-メルカブトプロパン酸 |
| グルタミン | Gln | Q | 2-アミノ-4-カルバモイルブタン酸 |
| グルタミン酸 | Glu | E | 2-アミノペンタン二酸 |
| グリシン | Gly | G | アミノエタン酸 |
| ヒスチジン | His | H | 2-アミノ-3-(1H-イミダゾール-4-イル)プロパン酸 |
| イソロイシン | Ile | I | 2-アミノ-3-メチルペンタン |
| ロイシン | Leu | L | 2-アミノ-4-メチルペンタン酸 |
| リシン | Lys | K | 2, 6-ジアミノヘキサン酸 |
| メチオニン | Met | M | 2-アミノ-4-(メチルチオ)ブタン |
| フェニルアラニン | Phe | F | 2-アミノ-3-フェニルプロパン酸 |
| プロリン | Pro | P | ピロリジン-2-カルボン酸 |
| セリン | Ser | S | 2-アミノ-3-ヒドロキシプロパン酸 |
| トレオニン | Thr | T | 2-アミノ-3-ヒドロキシブタン酸 |
| トリプトファン | Trp | W | 2-アミノ-3-(1H-インドール-3-イル)プロパン酸 |
| チロシン | Tyr | Y | 2-アミノ-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロパン酸 |
| バリン | Val | V | 2-アミノ-3-メチルブタン酸 |

【0099】

一実施形態では、当技術分野において既知の通り、アミノ酸類似体配列が使用され、それによって、単離ペプチド中の少なくとも1つのアミノ酸が類似体又はバイオシミラーアミノ酸（同類置換）で置換される。アミノ酸は、L型でも、D型でもよく、又はそれらの誘導体（例えば、疑似アミノ酸、官能基化アミノ酸（例えば、フッ化アミノ酸等）、ベータアミノ酸、ガンマアミノ酸等）であってもよい。

【0100】

当業者は、本明細書にて開示したペプチドが、ペプチド模倣物質を含むペプチド誘導体として合成されてよいことを理解するであろう。ペプチド模倣物質又は「ペプチドミメティック」は、本質的には完全なペプチド性ではないが、にもかかわらず構造的に基づく際にペプチドの生物活性を模倣する分子である。このようなペプチドミメティックは、非自然発生アミノ酸を含有するペプチド様の分子を含む。ペプチドミメティックは1つ以上のアミノ酸類似体を含むことができ、かつ、例えば、レトロ-インバーソ修飾（Retro-inverso modification）、還元型アミド結合、メチレンチオエーテル結合又はメチレンスルホキシド結合、メチレンエーテル結合、エチレン結合、チオアミド結合、トランスオレフィン結合又はフルオロオレフィン結合、1, 5-二置換テトラゾール環、イミド結合、ケト

10

20

30

40

50

メチレン又はフルオロケトメチレン結合、又は別のアミド同配体などの、アミド結合同配体を含有するペプチド様の分子であることができる。用語は更に、1つ以上のN-置換グリシン残基(ペプトイド)を含む分子及びその他の合成アミノ酸又はペプチドを含む。(例えば、米国特許番号第5,831,005号、第5,877,278号、及び第5,977,301号、Nguyenら(2000年)のChem Biol. 7(7)、463~473、及びSimonら(1992年)の米国科学アカデミー紀要89(20)、9367~9371の、ペプチドの説明を参照されたい。)当業者は、これらの、またその他のペプチドミメティックが、本発明で使用する場合の「ペプチドミメティック」の意味に包含されると理解する。

【0101】

10

ペプチドのアミノ酸配列は、配列左手側に出現するN-末端のアミノ基(NH₂)及びその右手側に出現するC-末端のカルボキシル基(COOH)を伴い、従来の表記法に従って記載される。

【0102】

本明細書にて開示したペプチドは、従来の塩形成反応により、生理学的に許容できる塩を形成し得る。このような塩としては、塩酸、硫酸及びリン酸などの無機酸を伴う塩、乳酸、酒石酸、マレイン酸、フマル酸、シュウ酸、リンゴ酸、クエン酸、オレイン酸及びパルミチン酸などの無機酸を伴う塩、ナトリウム、カリウム、カルシウム及びアルミニウムなどのアルカリ金属水酸化物及び炭酸塩並びにアルカリ土類金属水酸化物及び炭酸塩を伴う塩、及びトリエチルアミン、ベンジルアミン、ジエタノールアミン、t-ブチルアミン、ジシクロヘキシルアミン及びアルギニンなどのアミンを伴う塩を挙げることができる。

20

【0103】

鎖間及び鎖内の二硫化結合を形成してよく、またこのような二硫化結合の形成から生じたペプチドの形成は、本発明により包含される。

【0104】

一実施形態では、本明細書にて開示したペプチドは化学的に合成される。他の実施形態では、本明細書にて開示したペプチドは、原核細胞又は真核細胞における組換えDNAの発現により、生体内又は生体外にて生成される。

【0105】

30

幾つかの実施形態では、GPRPペプチドは、フィブリン及びフィブリノーゲン鎖のC-末端領域に可逆的に結合する。優先的な相互作用は、各ペプチドの特定のアミノ酸残基及び/又はモチーフ間の相互作用を、必ずしも必要としないことを理解すべきである。

【0106】

用語「トロンビンを実質的に含まない」又は「トロンビンを含まない」とは、製剤ミリリットル(ml)あたり約1(ー)単位以下のトロンビンを有する成分又は製剤に関する。

【0107】

用語「有効量」とは、例えば、負傷した表面を覆い、出血を減らし、癒合を高め、好ましくない状態を改善するためのシーラントの形成に必要な、本明細書にて開示した成分又は製剤の量に関する。

40

【0108】

「製薬上許容できる」又は「薬理学上許容できる」キャリア、溶剤、希釈剤、添加剤、及び賦形剤は、一般に、本明細書にて開示する組成物の活性成分と反応しない、不活性で無害の、固体又は液体の充填剤、希釈剤又は被包性材料に関する。許容できる添加剤としては制限なく、生理食塩水、酢酸又はアセテート、及び塩化ナトリウムイオン、マンニトール、アルブミン、及びこれらの組み合わせが挙げられる。

【0109】

本明細書にて開示したペプチドは、合成(例えば、個々のアミノ酸からペプチドを化学的に合成すること)及び組換え方法(例えば、ペプチドをコードするDNAを合成すること及びDNAを使用して組換えペプチドを生成すること)を含むがこれらに限定されない

50

、当該技術分野において既知の方法に従って合成される。

【0110】

ペプチドの化学的合成：本明細書にて開示したペプチド及びペプチドをコードするDNAを、当該技術分野において既知の方法によって化学的に合成してよい。好適なペプチドの合成方法が、Stuart及びYoungら(1984)による「Solid Phase Peptide Synthesis, Methods Enzymol, Second Edition, Pierce Chemical Company, 289, Academic Press, Inc., NY(1997)に記載されている。例えば、固相合成法又は液相合成法を使用してよい。固相合成法は、通常、適切な保護基を用いてアミノ基を保護することにより実施される。例えば、Boc(tert-ブトキシカルボニル)若しくはFmoc(9-フルオレニルメチルオキシカルボニル)の一方、又はその組み合わせを使用してよい。一実施例では、本明細書にて開示するペプチドを以下の工程により合成する。1)生成されるペプチドのC-末端に対応するアミノ酸残基を、反応溶媒に対して不溶性の固相物質にアミノ酸のa-COOH基を介して結合させるか、このような固相物質を購入する。2)a-COOH基以外の対応するアミノ酸又はペプチド断片のa-アミノ基などの、その他の官能基を保護した後に、対応するアミノ酸又はペプチドの断片を、ペプチドのN-末端に向かう方向にて、工程1)のアミノ酸と縮合結合させる。3)a-アミノ基などのペプチド結合を形成するアミノ基の保護基を、結合したアミノ酸又はペプチド断片から除去する。4)所望のペプチドに対応するペプチド鎖を形成するために、工程2)及び3)を繰り返してペプチド鎖を伸長させる。5)生成したペプチド鎖を固相物質から分離して、保護官能基から保護基を除去する。及び6)ペプチドを精製し、それにより所望のペプチドを得る。

【0111】

溶剤及び縮合剤と同様に、固相物質は当該技術分野において既知である。

【0112】

化学的合成及びDNAの発現：組換えペプチドを発現させるために、本明細書にて開示したペプチドをコードするDNAを、多種多様なクローニング及び発現ベクターにおける多種多様な宿主細胞への挿入に統一して複製又は使用してよい。宿主は、原核性又は真核性であってよい。DNAは、化学的に合成されてよい。好適なDNAの合成方法及びクローニングベクター(例えば、哺乳類細胞、昆虫細胞又は植物細胞、バクテリア、細菌ウイルス及び酵母菌にて使用)が入手可能である。融合タンパク質の形態にて発現させることができる組換えペプチドは、当該技術分野において既知の方法により精製される。

【0113】

上記の例は、本発明の特定の実施形態を示すものであるが、それらは、本発明の範囲を限定するものではなく、本発明の完全な記述に寄与するものとして解釈されるべきである。

【実施例】

【0114】

実施例1：フィブリン重合時間におけるGPRPペプチド濃縮の効果

ペプチドの存在及びフィブリンモノマー重合速度におけるその濃縮の効果を評価するために、GPRPペプチドフィブリンモノマーの混合物を培養し、また凝固が形成されるまでの時間を測定した。

【0115】

GPRPペプチドの混合物：下記の通りフィブリンモノマーを調製した。

GPRPペプチド(Gly-Pro-Arg-Pro, Sigmaより特注製造、ペプチドを冷凍乾燥形状にて供給して(250mg)、100mMのトリ-クエン酸ナトリウム二水和物中に溶解させ、pH=7で1MのGPRPを生成)を、フィブリノーゲン溶液(EVICLE(登録商標)フィブリンシーラントにおけるようなBAC2溶液)に添加した。溶液中のペプチド終濃度が、下表1に記載されている。使用したフィブリノーゲン

10

20

30

40

50

終濃度は1%、1.5%、3%、3.5%である。7%の凝固可能なフィブリノーゲンを含有するB A C 2溶液 [E V I C E L (登録商標) のフィブリノーゲン成分]を、20mMの酢酸ナトリウム (Naアセテート) 緩衝剤に希釈させ、pH 7.0にて一覧表に記載されている終濃度を得た。

【0116】

フィブリンを形成するために、(E V I C E L (登録商標) フィブリンシーラントにおける様な)トロンビンを、終濃度10IU/m1又は100IU/m1にてフィブリノーゲン溶液に添加し、次に凝固までの時間を記録した。チューブを反転させた時の流れの停止により、凝固を評価した。

【0117】

表1は、フィブリン及びペプチド終濃度あたりの、凝固時間の概要を提供する。

【0118】

フィブリノーゲン濃度に相当するとして、フィブリンモノマー濃度を推定した。

【0119】

【表2】

表1：フィブリン及びペプチド濃度の関数としての凝固時間

| 短期実験 | | |
|---------------|------------|---------------|
| 1%フィブリンモノマー | | |
| GPRP濃度 | 凝固時間 | 倍(GPRP:フィブリン) |
| 0.1mM | 即時 | 3.4 |
| 1mM | <5分 | 34 |
| 5mM | 4時間 | 170 |
| 10mM | 7~8日 | 340 |
| 3%フィブリンモノマー | | |
| GPRP濃度 | 凝固時間 | 倍(GPRP:フィブリン) |
| 0.1mM | 5秒 | 1.1 |
| 0.2mM | 7秒 | 2.3 |
| 0.5mM | 11秒 | 5.7 |
| 1mM | 13秒 | 11.3 |
| 1.5mM | 22秒 | 17 |
| 2mM | 28秒 | 22.7 |
| 3mM | 2.5分 | 34 |
| 4mM | 8分 | 45 |
| 5mM | 15分 | 56.7 |
| 長期実験 | | |
| 1.5%フィブリンモノマー | | |
| GPRP濃度 | 凝固時間 | 倍(GPRP:フィブリン) |
| 20mM | 凝固なし(>2週間) | 453 |
| 3.5%フィブリンモノマー | | |
| GPRP濃度 | 凝固時間 | 倍(GPRP:フィブリン) |
| 40mM | 凝固なし(>2週間) | 389 |

【0120】

短期実験の結果：

一般に、GPRPペプチドの濃度が低められたので、フィブリンモノマーは次第により

10

20

30

40

50

高速で重合した。例えば、1%フィブリンで0.1 mMのGPRP (GPRP:フィブリンが~3.4:1モル比)ではフィブリン凝固が直ちに形成され、1%フィブリンで1mMのGPRP (~34:1モル比)では凝固は5分未満で形成された。1%フィブリンで5 mMのGPRP (~170:1)では、溶液は液体で4時間安定であり、1%フィブリンで10 mMのGPRP (~340:1)では、溶液は液体でおよそ7~8日で安定であり、その後、重合化して個体を形成する、ということはなかった。

【0121】

長期実験の結果：

1.5%のフィブリン濃度で20 mMのGPRP (~453:1)、又は3.5%フィブリンで40 mMのGPRP (~389:1)では溶液は安定し、かつ2週間後であっても室温で凝固を形成しなかった。

10

【0122】

これらの実験は、340:1のモル比 (GPRP:フィブリン) は、好都合なことに、約7~8日間の溶液の安定化という結果をもたらしたことを示す。

【0123】

同様の結果が、使用される2つのトロンビン濃度にも観察された。

【0124】

理論に束縛されるものではないが、この結果は、大部分又は全てのフィブリノーゲンがトロンビンにより開裂し、また凝固時間における差が、フィブリンに対するGPRP濃度に関係したことを示している。

20

【0125】

重合時間とGPRPとの間の関係：フィブリンモル比もまた、図1に示す。

【0126】

この実験では、一定(3%)のフィブリン濃度及びGPRPの量を増加させること(0.1 mM、0.2 mM、0.5 mM、1 mM、1.5 mM、2 mM、3 mM、4 mM、及び5 mM)が、重合を遅らせるために使用された。これらの全て(最大で57:1の比率を有する)は、フィブリンモノマーの長期間の安定化に必要な最小比率を下回る。GPRP:フィブリン溶液を上述の如く調製した(GPRPペプチドをフィブリノーゲン溶液中に添加すること及びトロンビンをGPRP:フィブリノーゲン混合物中へ添加することによる)。次に、凝固までの時間を上述のように記録した。

30

【0127】

図1は、フィブリン重合速度とフィブリンに対するGPRPペプチドのモル比との間に、対数相関関係があることを示す。

【0128】

これは、溶液中のGPRPペプチドの濃度を調節することによって、フィブリン凝固形成速度を制御することができ、また少量によるにもかかわらずGPRPペプチドの希釈がフィブリン重合速度に影響を及ぼすことを示している。

【0129】

なお、定義された相関関係は、幾つかの実施形態において、適用後の最終GPRPペプチド濃度の制御により重合速度を制御する(例えば低分子交換機構を介して)ことを可能にする。

40

【0130】

実施例2：低分子交換機構を使用した、フィブリン及びGPRPを含む溶液からのフィブリン凝固形成

以下の実施例は、低分子交換機構を使用して、溶液からGPRPペプチドを希釈又は除去することにより、フィブリン凝固形成の反応開始及び/又は加速が得られることを示すことを目的とする。

【0131】

混合物は約3.8%のフィブリン濃度を含有し、またGPRPペプチド41 mMのGPRPペプチド濃度(モル比~366:1)を上述の如く調製した(GPRPペプチドを、

50

3. 8 %のフィブリノーゲン溶液に添加すること、及びフィブリノーゲンをフィブリンへと開裂するためにトロンビンを添加することによる）。このモル比は、製剤の安定性を維持するのに十分であることが判明した。

【0132】

市販の低分子交換装置（G E P D - 1 0 スピンカラム、製品コード：1 7 - 0 8 5 1 - 0 1、G E ヘルスケア（GE Healthcare））を、装置が備える標準スピンドル順に従って使用して、G P R P：フィブリンモノマー製剤からG P R Pペプチドを除去／希釈した。p H 7 . 0 の酢酸ナトリウム2 0 m M、塩化カルシウム2 5 m Mを含む緩衝剤で、交換装置を前平衡した。溶液2 . 5 m l に緩衝剤交換処置を施して、緩衝剤交換混合物を含有するチューブを反転させることによりフィブリン凝固形成を評価した。

10

【0133】

低分子交換製剤が素早く凝固したのに対して（図2 B）、緩衝剤交換処置を施していない溶液は液体形状を維持した（図2 A）。

【0134】

本明細書で様々な実施形態について記載したが、それらの実施形態の多くの修正形態及び変形形態を実施することができる。また、各材料が特定の構成要素に関して開示されているが、他の材料が使用されてもよい。以上の説明及び以下の「特許請求の範囲」は、このような改変及び変形をすべて有効範囲とするものである。

【0135】

本明細書に参照により組み込まれると説明されている任意の特許、刊行物、又は他の開示材料は、全体的又は部分的に、組み込まれる材料が本開示で説明される既存の定義、主張、又は他の開示材料と矛盾しない程度においてのみ、本明細書に組み込まれる。このように、また必要な範囲で、本明細書に明瞭に記載されている開示は、参照により本明細書に組み込まれる任意の矛盾する内容に取って代わるものとする。

20

【0136】

本出願のいずれの参照文献の引用又は指定も、このような文献が本発明の先行技術として利用可能であることを認めるものと、解釈されるべきではない。

【0137】

表題の一部は、本明細書の理解を容易にするために本明細書で使用され、また必要に応じて限定解釈されるべきではない。

30

【0138】

〔実施の態様〕

(1) 1 ~ 1 3 %（重量体積パーセント）の濃度のフィブリンモノマー、及びG P R Pペプチド又はその他の可逆性フィブリン重合プロック剤を含む液体シーラント製剤であつて、前記プロック剤又はG P R Pが、前記フィブリンモノマーに対して1 0 0 倍モル過剰を超える量で前記製剤中に存在し、また、前記液体製剤が、約2 0 、2 1 、2 2 、2 3 、2 4 及び2 5 からなる群から選択される周囲温度にて、少なくとも1 4 日間安定している、液体シーラント製剤。

(2) 前記G P R Pペプチドが、前記フィブリンモノマーに対して約3 4 0 倍モル過剰を超える量で存在する、実施態様1に記載の製剤。

40

(3) 前記G P R Pペプチドが、前記フィブリンモノマーに対して約3 4 0 ~ 4 6 0 倍モル過剰の量で存在する、実施態様1に記載の製剤。

(4) 前記製剤が、付加トロンビンを実質的に含まない、実施態様1 ~ 3 のいずれかに記載の製剤。

(5) トロンビン活性化因子X I I I を更に含む、実施態様1 ~ 4 のいずれかに記載の製剤。

【0139】

(6) カルシウムキレート剤を更に含む、実施態様1 ~ 4 のいずれかに記載の製剤。

(7) 前記カルシウムキレート剤が、クエン酸イオンである、実施態様6に記載の製剤。

。

50

(8) 前記クエン酸イオンが、クエン酸ナトリウムにより提供される、実施態様7に記載の製剤。

(9) 約1 mM～約50 mMのクエン酸ナトリウムを含む、実施態様8に記載の製剤。

(10) 前記製剤が、中性pHを有する、実施態様1～9のいずれかに記載の製剤。

【0140】

(11) 止血、封止、癒合及び/又は手術にて使用するための、実施態様1～10のいずれかに記載の製剤。

(12) 実施態様1～10のいずれかに記載の製剤を含む容器。

(13) 実施態様12に記載の容器、及び、任意に、使用説明書を含む、キット。

(14) 表面におけるシーラントの調製方法であって、

実施態様1～10のいずれかに記載の製剤を提供すること、及び、前記表面でのフィブリン重合を促進する条件下にて、前記製剤を前記表面に適用することを含む、方法。

(15) 前記条件が、前記GPRPペプチドの除去、遮断、中和及び/又は希釈を含む、実施態様14に記載の方法。

【0141】

(16) 1～13% (重量体積パーセント)の濃度のフィブリンモノマー、及びGPRPペプチド又はその他の可逆性フィブリン重合プロック剤を含む、液体シーラント製剤の製造方法であって、前記プロック剤が、前記フィブリンモノマーに対して約100倍モル過剰を超える量で前記製剤中に存在し、かつ、前記液体製剤が、約20、21、22、23、24及び25からなる群から選択される周囲温度にて、少なくとも14日間安定しており、前記方法が、

- a) フィブリンモノマーを含む成分を提供すること、
- b) GPRPペプチド又はその他の可逆性フィブリン重合プロック剤、その誘導体又はその塩を提供すること、並びに
- c) 前記液体シーラント製剤を得るために、a)及びb)を混合すること、を含む、方法。

(17) フィブリノーゲンの開裂を可能にする条件下で、フィブリノーゲン水溶液をトロンビン又はトロンビン様の酵素に接触させることにより、提供される前記フィブリンモノマーが得られる、実施態様16に記載の方法。

(18) 前記フィブリンモノマー成分がトロンビン活性化因子XIIIを含む、実施態様16又は17に記載の方法。

(19) 前記フィブリンモノマー成分がカルシウムキレート剤を含む、実施態様16又は17に記載の方法。

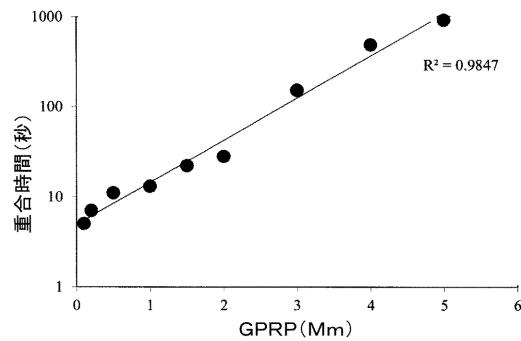
(20) 実施態様16～19のいずれかに記載の方法に従って得ることが可能な製剤。

【0142】

(21) 実施態様1～10のいずれか又は実施態様20に記載の有効量の製剤を、被験者に適用することを含む、必要とする被検者における、癒合、封止及び/又は失血の減少方法。

(22) 1～13% (重量体積パーセント)の濃度のフィブリンモノマー、及びGPRPペプチドを含む液体シーラント製剤であって、GPRPが、前記フィブリンモノマーに対して340倍モル過剰を超える量で前記製剤中に存在し、かつ、前記液体製剤が、約20、21、22、23、24及び25からなる群から選択される周囲温度にて、少なくとも14日間安定している、液体シーラント製剤。

【図 1】



【図 2 B】



FIGURE 2B

【図 2 A】

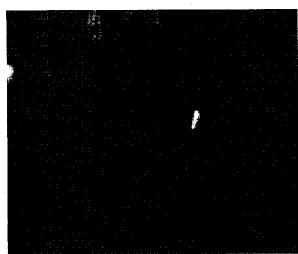


FIGURE 2A

【配列表】

0006588019000001.app

フロントページの続き

| | |
|-------------------------|---------------------|
| (51)Int.Cl. | F I |
| A 6 1 K 47/12 (2006.01) | A 6 1 K 47/12 |
| A 6 1 L 27/36 (2006.01) | A 6 1 L 27/36 1 0 0 |
| C 0 7 K 5/103 (2006.01) | C 0 7 K 5/103 Z N A |

(73)特許権者 512080321

エシコン・インコーポレイテッド
 E t h i c o n , I n c .
 アメリカ合衆国、0 8 8 7 6 ニュージャージー州、サマービル、ユース・ルート 22、ピ-
 ・オー・ボックス 151
 P . O . B o x 1 5 1 , U . S . R o u t e 2 2 , S o m e r v i l l e , N J
 0 8 8 7 6 , U n i t e d S t a t e s o f A m e r i c a

(74)代理人 100088605

弁理士 加藤 公延

(74)代理人 100130384

弁理士 大島 孝文

(72)発明者 ピルペル・ヤイル

イスラエル国、7 6 3 6 0 1 5 レホボット、デレチ・ヤブネ・ストリート 2 1 / 4

(72)発明者 デアングリス・アシュリー

アメリカ合衆国、0 8 5 5 8 ニュージャージー州、スキルマン、フェアビュー・ロード 5 5

(72)発明者 ゼルデブ・ユーリ

イスラエル国、7 6 2 8 8 0 3 レホボット、アイゼンバーグ・ストリート 2 9 / 8

(72)発明者 ドロン・シバン

イスラエル国、7 9 8 6 4 0 0 モシャブ・アルゴット、ハメヤスディム・ストリート 2 5

(72)発明者 ヌル・イスラエル

イスラエル国、7 9 8 6 0 0 0 モシャブ・ティモリム、ハウス・ナンバー 2 7 7

審査官 六笠 紀子

(56)参考文献 特開平0 6 - 1 9 9 6 8 5 (J P , A)

特表2 0 1 0 - 5 1 0 7 9 3 (J P , A)

特表2 0 1 7 - 5 1 4 5 5 4 (J P , A)

特表2 0 0 5 - 5 0 8 9 2 5 (J P , A)

特開2 0 0 4 - 0 7 5 6 8 2 (J P , A)

特開平1 0 - 1 9 2 2 8 4 (J P , A)

特表平0 5 - 5 0 4 9 5 0 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

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

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

W P I

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

C a p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)