

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2015 年 7 月 2 日(02.07.2015)



(10) 国際公開番号
WO 2015/098515 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 38/00 (2006.01) *A61L 15/16* (2006.01)
A61K 9/06 (2006.01) *A61P 7/04* (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/082653
- (22) 国際出願日: 2014 年 12 月 10 日(10.12.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2013-271430 2013 年 12 月 27 日(27.12.2013) JP
特願 2014-225283 2014 年 11 月 5 日(05.11.2014) JP
- (71) 出願人: 株式会社メニコン(MENICON CO., LTD.)
[JP/JP]; 〒4600006 愛知県名古屋市中区葵 3 丁目
2 1 番 1 9 号 Aichi (JP).
- (72) 発明者: 永井 祐介(NAGAI, Yusuke); 〒4870032 愛
知県春日井市高森台五丁目 1 番地 1 〇 株式会
社メニコン内 Aichi (JP). 横井 秀典(YOKOI,
Hidenori); 〒4870032 愛知県春日井市高森台五丁
目 1 番地 1 〇 株式会社メニコン内 Aichi (JP).
菅沼 雄也(SUGANUMA, Yuya); 〒4870032 愛知県
春日井市高森台五丁目 1 番地 1 〇 株式会社メ
ニコン内 Aichi (JP).
- (74) 代理人: 靱井 孝文(MOMII, Takafumi); 〒5300004
大阪府大阪市北区堂島浜 1 丁目 4 番 4 号 アク
ア堂島東館 7 階 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN,
IR, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS,
LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY,
MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,
MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユー
ラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨー
ロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

(54) Title: HEMOSTATIC MATERIAL

(54) 発明の名称: 止血材

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a gel-like hemostatic material which is produced using a self-assembling peptide and has higher strength compared with the conventional hemostatic materials. A hemostatic material which comprises a gel made from an aqueous solution containing a self-assembling peptide, wherein the storage modulus of the gel is 350 to 3000 Pa at 37°C as measured using a rotary rheometer.

(57) 要約: 自己組織化ペプチドを用いたゲル状止血材であって、従来よりも高強度な止血材を提供すること。自己組織化ペプチドを含む水溶液から形成されたゲルからなる止血材であって、該ゲルの 37°C における回転式レオメーターによって測定される貯蔵弾性率が、350 Pa ~ 3000 Pa である、止血材。



WO 2015/098515 A1

明 細 書

発明の名称：止血材

技術分野

[0001] 本発明は、自己組織化ペプチドを含む止血材に関する。

背景技術

[0002] 従来、手術等に用いられる止血材としては、シート状や2液混合型の液状または粘性液体状のものが多く用いられてきた。しかしながら、シート状の止血材は白色不透明であることが多く、出血点や止血の完了を目視で直接確認することが不可能であった。また、2液混合型のものは、混合後すぐに粘着性が非常に高くなるため、直ちに使用しなければならない、また、最初の止血で全量を使い切らなかった場合に、残りをを用いて2回目の止血を行おうとしても、粘着性が増大しているために容器から出すことができない等、使用の面で問題があった。さらに、従来の止血材の多くは動物由来の材料を含むことから、感染の危険性が指摘されてきた。

[0003] これに対し、非動物由来の材料である自己組織化ペプチドを含む1液型で使用可能な止血材が提案されている（特許文献1）。当該止血材は、代表的には、処置対象である生物学的組織上に配置されることにより、自己組織化ペプチドが自己組織化してゲルとなり、止血機能を発揮する（特許文献1 0040段落、0051段落等）。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特表2008-539257号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] しかしながら、自己組織化ペプチドを用いたゲル状止血材の使用においては、力学的強度が不十分であるために、動脈性の出血等の激しい出血に対してゲルが部分的に押し流されてしまったり、崩壊してしまったりして、十分

な止血機能が得られない場合があった。そのため、自己組織化ペプチドを用いたゲル状止血材が非生物由来の材料であることや、1液型で使用できるといったメリットを最大限に生かすことができていなかった。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明の止血材は、自己組織化ペプチドと水とを含み、該自己組織化ペプチドの自己組織化によって形成されたゲルからなる止血材であって、該ゲルの37℃における回転式レオメーターによって測定される貯蔵弾性率が、350Pa～3000Paである。

1つの実施形態において、上記自己組織化ペプチドの濃度が、1.0重量%～3.0重量%である

1つの実施形態において、上記止血材のpHが、5～8である。

1つの実施形態において、上記止血材の可視光透過率が80%以上である。

1つの実施形態において、上記自己組織化ペプチドを構成するアミノ酸残基のpH7.0における電荷の総和が、-3～-1または+1～+3である。

1つの実施形態において、上記止血材は、0.03重量%～0.5重量%の濃度でさらに強酸と塩基との塩を含む。

発明の効果

[0007] 本発明によれば、従来よりも高強度な350Pa～3000Paの貯蔵弾性率を有する自己組織化ペプチドゲルからなる止血材が提供される。このような貯蔵弾性率を達成する方法は特に限定されないが、例えば、所定の攪拌装置の使用や、塩を添加することによって達成され得る。

図面の簡単な説明

[0008] [図1] IR測定結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0009] [A. 止血材]

本発明の止血材は、自己組織化ペプチドと水とを含み、該自己組織化ペプチドの自己組織化によって形成されたゲル（以下、「自己組織化ペプチドゲル」と称する）からなる。本明細書において、ゲルとは、粘性的な性質と弾性的な性質とを併せ持つ粘弾性物質を意味する。具体的には、動的粘弾性測定を行なって、貯蔵弾性率 G' および損失弾性率 G'' を測定したときに、「 $G' > G''$ 」となる物質をゲルということができる。

[0010] 本発明の止血材は、回転式レオメーターを用いた動的粘弾性測定における 37°C での貯蔵弾性率 (G') が、 $350\text{ Pa} \sim 3000\text{ Pa}$ であり、好ましくは $400\text{ Pa} \sim 2500\text{ Pa}$ 、より好ましくは $450\text{ Pa} \sim 2200\text{ Pa}$ 、さらに好ましくは $500\text{ Pa} \sim 1900\text{ Pa}$ 、さらにより好ましくは $550\text{ Pa} \sim 1600\text{ Pa}$ である。貯蔵弾性率が 350 Pa 未満であると、血流によってゲルが部分的に押し流されたり、破壊されてしまい、止血機能が十分に発揮されない場合や形状安定性が小さいために、単純に、出血部位からずり落ちる場合がある。一方、貯蔵弾性率が 3000 Pa を超えると、シリンジ等の容器からの取り出しが困難である場合や出血部位の形状に沿って密着できない場合がある。なお、本明細書でいう貯蔵弾性率は、周波数変化測定を行ったときの角振動数が 1 ラジアン/秒 であるときの値を意味する。

[0011] 本発明の止血材は、好ましくは $5 \sim 8$ 、より好ましくは $5.5 \sim 7.5$ 、さらに好ましくは $6 \sim 7$ の pH を有する。 pH が当該範囲内であると、加熱時における自己組織化ペプチドの加水分解を回避し得るので、高圧蒸気滅菌などの加熱を伴う滅菌処理に供され得る。また、細胞障害性を低減することができる。さらには、自己組織化ペプチド間に本来意図される分子間相互作用を生じさせることができる。

[0012] 本発明の止血材は、光路長 10 mm のセル中、 $380\text{ nm} \sim 780\text{ nm}$ の吸光度で測定した可視光透過率が、好ましくは 80% 以上であり、より好ましくは 85% 以上であり、さらに好ましくは 90% 以上である。可視光透過率が当該範囲内であると、出血部位を確認しながら止血材を適用することや止血の完了を視認することが容易である。

[0013] 本発明の止血材は、好ましくは $200 \text{ mosm/kg} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 以上、より好ましくは $230 \text{ mosm/kg} \cdot \text{H}_2\text{O} \sim 400 \text{ mosm/kg} \cdot \text{H}_2\text{O}$ の浸透圧を有する。浸透圧が当該範囲内であると、細胞障害性を低減することができる。

[0014] [A-1. 自己組織化ペプチド]

自己組織化ペプチドとしては、水溶液中においてペプチド分子同士の相互作用を介して自発的に集合してゲルを形成し得る任意の適切なペプチドが用いられ得る。ペプチド分子同士の相互作用としては、例えば、水素結合、イオン間相互作用、ファンデルワールス力等の静電的相互作用および疎水性相互作用が挙げられる。

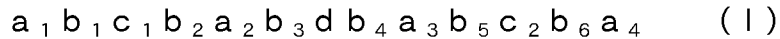
[0015] 自己組織化ペプチドを構成するアミノ酸は、L-アミノ酸であってもよく、D-アミノ酸であってもよい。好ましくはL-アミノ酸である。また、天然アミノ酸であってもよく、非天然アミノ酸であってもよい。低価格で入手可能であり、ペプチド合成が容易であることから、好ましくは天然アミノ酸である。

[0016] 自己組織化ペプチドを構成するアミノ酸残基の $\text{pH} 7.0$ における電荷の総和は、好ましくは、 $-3 \sim -1$ または $+1 \sim +3$ であり、より好ましくは、 -3 、 -2 、 $+2$ または $+3$ である。このように、中性領域において自己組織化ペプチドに含まれるアミノ酸残基の側鎖に由来するプラス電荷とマイナス電荷とが相殺されないことにより、ゲル形成に適した静電的引力及び斥力のバランスが保たれ、その結果として、中性領域で透明かつ安定なゲルを形成し得るからである。なお、本明細書において、「中性領域」とは、 $6.0 \sim 8.5$ 、好ましくは $6.5 \sim 8.0$ 、より好ましくは 7.0 の領域をいう。

[0017] 各 pH における上記自己組織化ペプチドの電荷は、例えば、レーニンジャー (Lehninger) [Biochimie, 1979] の方法に従って算出され得る。レーニンジャーの方法は、例えば、EMBL WWW Gateway to Isoelectric Point Service

eのウェブサイト (<http://www.embl-heidelberg.de/cgi/pi-wrapper.pl>) 上で利用可能なプログラムにより行われ得る。

[0018] 本発明に好ましく使用され得る自己組織化ペプチドの具体例としては、下記の式(1)のアミノ酸配列からなるペプチドが挙げられる。



(上記アミノ酸配列中、 $a_1 \sim a_4$ は、塩基性アミノ酸残基であり； $b_1 \sim b_6$ は、非電荷極性アミノ酸残基および／または疎水性アミノ酸残基であり、ただし、そのうちの少なくとも5個は、疎水性アミノ酸残基であり； c_1 および c_2 は、酸性アミノ酸残基であり； d は、疎水性アミノ酸残基である。)

[0019] 上記アミノ酸配列中、 $a_1 \sim a_4$ は、塩基性アミノ酸残基である。塩基性アミノ酸は、好ましくはアルギニン、リシン、またはヒスチジンであり、より好ましくはアルギニンまたはリシンである。これらのアミノ酸は、塩基性が強いからである。 $a_1 \sim a_4$ は、同一のアミノ酸残基であってもよく、異なるアミノ酸残基であってもよい。

[0020] 上記アミノ酸配列中、 $b_1 \sim b_6$ は、非電荷極性アミノ酸残基および／または疎水性アミノ酸残基であり、そのうちの少なくとも5個は、疎水性アミノ酸残基である。疎水性アミノ酸は、好ましくはアラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、グリシン、またはプロリンである。非電荷極性アミノ酸は、好ましくはチロシン、セリン、トレオニン、アスパラギン、グルタミン、またはシステインである。これらのアミノ酸は、入手が容易だからである。

[0021] 好ましくは、 b_3 および b_4 は、それぞれ独立して任意の適切な疎水性アミノ酸残基であり、さらに好ましくはロイシン残基、アラニン残基、バリン残基、またはイソロイシン残基であり、特に好ましくはロイシン残基またはアラニン残基である。

[0022] 好ましくは、 $b_1 \sim b_6$ はすべて疎水性アミノ酸残基である。自己組織化ペプチドが好適に β シート構造を形成し、自己組織化し得るからである。より

好ましくは、 $b_1 \sim b_6$ は、それぞれ独立してロイシン残基、アラニン残基、バリン残基、またはイソロイシン残基であり、さらに好ましくはロイシン残基またはアラニン残基である。好ましい実施形態においては、 $b_1 \sim b_6$ のうちの4個以上がロイシン残基であり、より好ましくはそのうちの5個以上がロイシン残基であり、さらに好ましくは全てがロイシン残基である。

[0023] 上記アミノ酸配列中、 c_1 および c_2 は、酸性アミノ酸残基である。酸性アミノ酸は、好ましくはアスパラギン酸またはグルタミン酸である。これらのアミノ酸は、入手が容易だからである。 c_1 および c_2 は、同一のアミノ酸残基であってもよく、異なるアミノ酸残基であってもよい。

[0024] 上記アミノ酸配列中、 d は、疎水性アミノ酸残基である。 d は、好ましくはアラニン残基、バリン残基、ロイシン残基、またはイソロイシン残基である。

[0025] 1つの好ましい実施形態においては、 b_3 、 d 、 b_4 の連続する3つのアミノ酸残基のうち2つがロイシン残基であり、残りがアラニン残基である。この場合、 b_3 、 d 、 b_4 のいずれがアラニン残基であってもよい。また、別の好ましい実施形態においては、 b_3 、 d 、 b_4 の連続する3つのアミノ酸残基がすべてロイシン残基である。

[0026] 式(1)のアミノ酸配列の好ましい具体例を以下に例示する。

$n - R L D L R L A L R L D L R - c$ (配列番号1)

$n - R L D L R L L L R L D L R - c$ (配列番号2)

$n - R A D L R L A L R L D L R - c$ (配列番号3)

$n - R L D L R L A L R L D A R - c$ (配列番号4)

$n - R A D L R L L L R L D L R - c$ (配列番号5)

$n - R A D L R L L L R L D A R - c$ (配列番号6)

$n - R L D L R A L L R L D L R - c$ (配列番号7)

$n - R L D L R L L A R L D L R - c$ (配列番号8)

[0027] 本発明に好ましく使用され得る別の自己組織化ペプチドとしては、WO 2007/000979に記載のペプチドが挙げられる。なかでも、以下に例

示するアミノ酸配列からなる自己組織化ペプチドが好ましい。

- n-RASARADARASARADA-c (配列番号9)
n-RANARADARANARADA-c (配列番号10)
n-RAAARADARAAARADA-c (配列番号11)
n-RASARADARADARASA-c (配列番号12)
n-RADARASARASARADA-c (配列番号13)
n-RASARASARASARADA-c (配列番号14)
n-RASARADARASA-c (配列番号15)
n-KASAKAEAKASAKAEA-c (配列番号16)
n-SAEAKAEASAEAKAEA-c (配列番号17)
n-KLSLKLDLKL SL-c (配列番号18)
n-KLALKLDLKLAL-c (配列番号19)

[0028] 上記自己組織化ペプチドは、任意の適切な製造方法によって製造され得る。例えば、Fmoc法等の固相法又は液相等の化学合成方法、遺伝子組換え発現等の分子生物学的方法が挙げられる。なお、自己組織化ペプチドは、精製の過程で任意の適切な塩の形態とされ得るが、本発明においては、塩形態の自己組織化ペプチドを用いることもできる。ただし、本発明において、塩形態の自己組織化ペプチドは、A-3項に記載の塩には含まれないものとする。

[0029] 上記自己組織化ペプチドは、目的等に応じて任意の適切な修飾が施されていてもよい。修飾が行われる部位は、特に限定されず、例えば、自己組織化ペプチドのN末端アミノ基、C末端カルボキシル基、またはその両方が挙げられる。

[0030] 上記修飾としては、修飾後のペプチドが自己組織化能を有する範囲において任意の適切な修飾が選択され得る。例えば、N末端アミノ基のアセチル化、C末端カルボキシル基のアミド化等の保護基の導入；アルキル化、エステル化、またはハロゲン化等の官能基の導入；水素添加；単糖、二糖、オリゴ糖、または多糖等の糖化合物の導入；脂肪酸、リン脂質、または糖脂質等の

脂質化合物の導入；アミノ酸またはタンパク質の導入；DNAの導入；その他生理活性を有する化合物等の導入が挙げられる。修飾は1種のみ行われてもよく、2種以上を組み合わせてもよい。例えば、上記自己組織化ペプチドのC末端に所望のアミノ酸を導入した付加ペプチドのN末端をアセチル化し、C末端をアミド化してもよい。

[0031] アミノ酸またはタンパク質が導入される場合、導入されるアミノ酸の数は、好ましくは1～180であり、より好ましくは1～50、さらに好ましくは1～30、特に好ましくは1～10、最も好ましくは1～5である。導入するアミノ酸残基数が180を超えると、自己組織化能が損なわれる場合がある。

[0032] 本発明の止血材における自己組織化ペプチドの濃度は、所望の貯蔵弾性率等に応じて適切に設定され得る。自己組織化ペプチドの濃度は、好ましくは1.0重量%～3.0重量%、より好ましくは1.05重量%～2.8重量%、さらに好ましくは1.1重量%～2.5重量%、さらにより好ましくは1.15重量%～2.0重量%、さらにより好ましくは1.2重量%～1.8重量%である。本発明においてはゲルを製造する方法に特に限定はないが、後述するように、たとえば、所定の攪拌装置の使用および／または塩を添加する方法により、3.0重量%以下の自己組織化ペプチド濃度であっても350Pa以上の貯蔵弾性率を有する止血材（実質的には、自己組織化ペプチドゲル）が得られ得る。

[0033] [A-2. 水]

水としては、イオン交換水、蒸留水等の精製された水が好ましく用いられ得る。

[0034] 本発明の止血材の含水率（%）（＝止血材中の水の重量／止血材の総重量×100）は、例えば85%～99%、好ましくは86%～98%、より好ましくは87%～95%である。

[0035] [A-3. 塩]

本発明の止血材は、貯蔵弾性率を調整するために塩をさらに含み得る。具

体的には、所定の濃度の塩を含むことにより、単純に塩を含まない場合と比較すると、止血材（実質的には、自己組織化ペプチドゲル）の貯蔵弾性率が増加し、所望の貯蔵弾性率を獲得し得る。このような効果が奏される理由は定かではないが、以下のように推測される。すなわち、プラスに帯電したペプチドの場合、塩が水溶液中で解離することによりマイナス電荷を有するアニオンが生じ、該アニオンが正電荷アミノ酸にカウンターイオンとして結合することで、プラス電荷を遮蔽するようになる。その結果、ペプチド間の斥力の過剰分が減殺されて、ナノファイバー同士の結合がより強固になるためにゲルの貯蔵弾性率が350Pa～3000Paの範囲内に調整可能となると推測される。

[0036] 本発明において、貯蔵弾性率を調整するために使用される塩は、強酸（例えば、酸解離指数pKが3以下のもの）と塩基との塩である。塩基は強塩基であってもよく、弱塩基であってもよい。止血材のpHに影響を与えない観点からは、好ましくは強酸と強塩基とからなる中性塩が用いられる。貯蔵弾性率を調整するために使用可能な塩の好ましい具体例としては、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム等の塩酸塩、硫酸ナトリウム、硫酸マグネシウム等の硫酸塩が挙げられる。塩は、単独で用いられてもよく、二種以上を組み合わせ用いられてもよい。

[0037] 本発明の止血材における塩の濃度は、好ましくは0.03重量%～0.5重量%、より好ましくは0.04重量%～0.4重量%、さらに好ましくは0.05重量%～0.3重量%である。塩濃度が0.5重量%を超えると、自己組織化ペプチドの電荷が塩由来のイオンによって相殺されてしまい、自己組織化能が低下する結果、ゲルが所望の貯蔵弾性率を有しない、または、透明性が低下する等の場合がある。塩濃度が0.03重量%未満であると、貯蔵弾性率の増加効果が得られない場合がある。

[0038] [A-4. 添加物]

本発明の止血材は、必要に応じて任意の適切な添加物をさらに含み得る。例えば、本発明の止血材は、好ましくはpH調整剤を含む。

- [0039] pH調整剤としては、塩酸、クエン酸、酢酸等の酸；水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等の塩基；炭酸水素ナトリウム、炭酸ナトリウム等の弱酸と強塩基との塩が挙げられる。
- [0040] pH調整剤の添加量は、所望のpHに応じて適切に設定され得る。本発明において、pH調整剤は、自己組織化ペプチド水溶液を中和して自己組織化ペプチド間に本来意図される分子間相互作用を生じさせるために添加されるものである。よって、pH調整剤として強酸と塩基との塩を用いる場合であっても、上記好適範囲外であった自己組織化ペプチド水溶液のpHを好適範囲内に調整するために添加される塩はpH調整剤であって、貯蔵弾性率の調整の役割を担うものとは考えない。
- [0041] 本発明の止血材が含み得る他の添加物としては、例えば、緩衝剤；等張化剤；アミノ酸類；ビタミン類；アルコール類；薬物等が挙げられる。これらの他の添加物は、単独で用いられてもよく、二種以上を組み合わせ用いられてもよい。
- [0042] 緩衝剤としては、リン酸、リン酸ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、リン酸カリウム、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウムなどのリン酸塩；ホウ酸、ホウ砂、ホウ酸ナトリウム、ホウ酸カリウムなどのホウ酸塩；クエン酸ナトリウム、クエン酸二ナトリウムなどのクエン酸塩；酢酸ナトリウム、酢酸カリウムなどの酢酸塩、T r i s、H E P E S等が挙げられる。
- [0043] 等張化剤としては、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム等の塩化物；グルコース、フルクトース、ガラクトース等の単糖；スクロース、トレハロース、マルトース、ラクトース等の二糖；マンニトール、ソルビトール等の糖アルコール；等が挙げられる。
- [0044] 上記他の添加物の添加量は、その目的等に応じて任意の適切な値に設定され得る。他の添加物として強酸と塩基との塩を用いる場合、当該塩もゲルの貯蔵弾性率の増加要因となるため、A-3項に記載の貯蔵弾性率を調整するために使用する塩に該当する。よって、それら、強酸と塩基との塩を用いる

場合には、当該塩濃度（二種以上の塩を用いる場合はその合計濃度）が0.03重量%～0.5重量%となるように添加量を調整することが好ましく、より好ましくは0.04重量%～0.4重量%、さらに好ましくは0.05重量%～0.3重量%となるように調整される。

[0045] [B. 止血材の製造方法]

本発明の止血材の製造方法は、代表的には、自己組織化ペプチドと水と任意に塩および／または添加物とを混合して自己組織化ペプチド水溶液を得ること（混合工程）、および、得られた水溶液を静置することにより自己組織化ペプチドを自己組織化させて自己組織化ペプチドゲルを得ること（ゲル化工程）を含む。必要に応じて、混合工程の後であってゲル化工程の前に、自己組織化ペプチド水溶液を脱泡および／または脱気すること（脱泡工程）をさらに含み得る。

[0046] 混合工程においては、任意の適切な混合方法が用いられ得る。例えば、超音波照射を用いた混合方法、遠心力を用いた混合方法、機械的攪拌を用いた混合方法が挙げられる。混合手段として自転公転攪拌装置を用いることにより、上記所望の貯蔵弾性率が好適に達成され得る。

[0047] 混合工程においては、2種以上の異なる混合方法を組み合わせて用いてもよい。また、同じ混合方法による混合を2回以上繰り返してもよい。

[0048] ゲル化工程において、自己組織化ペプチド水溶液を静置する時間は、通常1分以上、好ましくは3分以上、より好ましくは5分以上である。静置する際の温度は、通常4～50℃、好ましくは15～45℃である。

[0049] 脱泡工程においては、超音波脱気、真空減圧脱気、遠心脱気等の任意の適切な脱泡方法が用いられ得る。二種以上の脱泡方法を組み合わせて行ってもよい。

[0050] 本発明の止血材の製造方法は、必要に応じて任意の適切な他の工程を含み得る。当該他の工程としては、ろ過等の精製工程、高圧蒸気滅菌、放射線滅菌、乾熱滅菌等の滅菌工程、包装容器への分注工程等が挙げられる。

[0051] [C. 止血材の使用方法]

本発明の止血材は、止血材単独で出血部位に適用されてもよく、任意の適切な支持体（例えば、透明フィルム）に塗布されて止血フィルムとして出血部位に貼付されてもよい。止血材単独で出血部位に適用する方法としては、シリンジ内に配置された止血材をプランジャで押し出して出血部位に配置する方法、チューブや袋などの容器内に配置された止血材をヘラ等の塗布用の器具に移してから出血部位に塗布する方法等が挙げられる。本発明の止血材は、出血部位を圧迫して止血し得る十分な貯蔵弾性率を維持しつつ、出血部位の形状に沿って密着し得る柔軟性を有するので、止血性に優れる。

[0052] 出血の程度にも依るが、本発明の止血材は、例えば、出血部位に配置されてから20秒以内、好ましくは15秒以内、より好ましくは10秒以内に止血を完了することができる。

実施例

[0053] 以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、本発明はこれら実施例によって限定されるものではない。

[0054] [貯蔵弾性率]

動的粘弾性測定装置である回転式レオメーター（TA instruments社製、製品名「ADVANCED RHEOMETER AR 1000」）を用いて、止血材の貯蔵弾性率 G' を測定した。具体的には、以下のとおりである。まず、試料に接触させるためのジオメトリー（アルミニウム製コーン、直径20mm、コーン角 1° 、ギャップ $24\mu\text{m}$ ）と試料台を一定の温度に保つための恒温槽とをレオメーターに取り付けた。次いで、温度： 37°C 、トルク： $1\mu\text{N}\cdot\text{m}$ 、周波数： $0.5\text{rad/s}\sim 100\text{rad/s}$ の測定条件下、以下の測定手順で1つの試料について3回測定し、 1rad/s のときの値の平均値を貯蔵弾性率 G' とした。

（1）ピペットを用いて $55\mu\text{L}$ の試料をレオメーターの試料台に配置する。

（2）ジオメトリーを試料台から $24\mu\text{m}$ のギャップまで移動させ、試料と接触させる。

(3) ジオメトリーをわずかに動かし、試料となじませる。

(4) ジオメトリーの動きを止めてから15秒後(この15秒の間に、試料からの溶媒の揮発を防止するためのソルベントトラップを取り付ける)に、測定を開始する。

[0055] [pH]

pHは、ポータブルpHメーター(堀場製作所社製、製品番号「B-712」)を用いて測定した。

[0056] [外観]

得られた止血材の外観を目視で観察し、以下の基準で評価した。

良好：気泡および白濁が認められず、透明である。

不良：気泡および／または白濁が認められる。

[0057] [実施例1]

表1に示す組成の自己組織化ペプチドゲルを調製し、止血材1とした。具体的な手順は以下のとおりである。すなわち、自己組織化ペプチド(SPG-178：N末端がアセチル化され、C末端がアミド化された配列番号1のペプチド)およびトレハロース・二水和物を容器に秤り入れた。次いで、該容器に水を投入し、蓋をした。該容器を自転公転攪拌装置(株式会社シンキー製、製品番号「ARE-310」)にセットし、攪拌した。

[0058] 得られた混合液に100mM Na_2CO_3 水溶液を添加してpHを調整した後、自転公転攪拌装置(株式会社シンキー製、製品番号「ARE-310」)にて攪拌した。

[0059] 得られた溶液を自転公転攪拌装置(株式会社シンキー製、製品番号「ARE-310」)にて脱泡および脱気して自己組織化ペプチド水溶液を得た。

[0060] 得られた自己組織化ペプチド水溶液を5gずつシリンジに分注した。次いで、シリンジに打栓し、プランジャを装着して、滅菌バッグに入れ、121℃で20分オートクレーブした。オートクレーブ後の自己組織化ペプチド水溶液を常温まで自然冷却し、自己組織化ペプチドゲルを得た。

[0061] [実施例2]

表 1 に示す組成の自己組織化ペプチドゲルを調製し、止血材 2 とした。具体的な手順は以下のとおりである。すなわち、自己組織化ペプチド（SPG-178）および塩化ナトリウムを秤量し、遠沈管に投入した。次いで、水を投入し、超音波型ホモジナイザー（Sonic & Material, Inc. 社製、製品番号「Vibra-Cell VC-505」）を用いて 500W の出力で 5 分処理して混合した。

[0062] 得られた混合液を 3000 rpm で 5 分遠心分離して脱泡し、さらにアスピレーターを用いて減圧脱気した。脱気後、混合液に 50 mM Na_2CO_3 水溶液を添加して pH を調整した後、超音波型ホモジナイザー（Sonic & Material, Inc. 社製、製品番号「Vibra-Cell VC-505」）を用いて 500W の出力で 5 分処理して混合した。アスピレーターを用いて混合液を減圧脱気し、これにより、自己組織化ペプチド水溶液を得た。

[0063] 得られた自己組織化ペプチド水溶液を 5 g ずつシリンジに分注した。次いで、シリンジに打栓し、プランジャを装着して、滅菌バッグに入れ、121℃で 20 分オートクレーブした。オートクレーブ後の自己組織化ペプチド水溶液を常温まで自然冷却し、自己組織化ペプチドゲルを得た。

[0064] [実施例 3]

自己組織化ペプチドと塩化ナトリウムに加えてスクロースも遠沈管に投入したこと以外は実施例 2 と同様の手順で表 1 に示す組成の自己組織化ペプチドゲルを調製し、止血材 3 とした。

[0065] [実施例 4]

自己組織化ペプチドとして、SPG-220（N 末端がアセチル化され、C 末端がアミド化された配列番号 18 のペプチド）を用いたこと以外は実施例 1 と同様の手順で表 1 に示す組成の自己組織化ペプチドゲルを調製し、止血材 4 とした。

[0066] [比較例 1]

塩化ナトリウムを用いずに、自己組織化ペプチドとスクロースとを遠沈管

に投入したこと以外は実施例 2 と同様の手順で表 1 に示す組成の自己組織化ペプチドゲルを調製し、止血材 C 1 とした。

[0067] [比較例 2]

実施例 2 と同様の手順で表 1 に示す組成の自己組織化ペプチドゲルを調製し、止血材 C 2 とした。

[0068] [比較例 3]

塩化ナトリウムを用いなかったこと以外は実施例 2 と同様の手順で表 1 に示す組成の自己組織化ペプチドゲルを調製し、止血材 C 3 とした。

[0069] 実施例および比較例で得られた止血材の組成および特性を表 1 に示す。

[表1]

	混合手段	組成						pH	貯蔵弾性率 (Pa)	外観
		自己組織化ペプチド		塩		等張化剤(塩を除く)				
		種類	濃度 (w/w%)	種類	濃度 (w/w%)	種類	濃度 (w/w%)			
実施例1	手段1※ ¹	SPG-178	1.5	—	—	トリアルコース・二水和物	9.2	7.1	551	良好
実施例2	手段2※ ²	SPG-178	1.0	NaCl	0.15	—	—	7.0	383	良好
実施例3	手段2※ ²	SPG-178	1.5	NaCl	0.225	スクロース	7.5	7.8	946	良好
実施例4	手段1※ ¹	SPG-220	1.5	—	—	トリアルコース・二水和物	7.9	7.4	619	良好
比較例1	手段2※ ²	SPG-178	1.5	—	—	スクロース	10	6.6	253	良好
比較例2	手段2※ ²	SPG-178	1.5	NaCl	0.9	—	—	7.6	—※ ³	不良(白濁)
比較例3	手段2※ ²	SPG-178	1.0	—	—	—	—	7.0	28	良好

※1 自転公転ミキサー

※2:超音波ホモジナイザー

※3:脆く、崩壊し易いために測定不可であった。

[0070] 上記のとおり、所定の攪拌装置を用いることにより、あるいは、所定の濃度で塩を添加することにより、実施例の止血材は全て、350Pa以上の貯蔵弾性率を有している。一方、同じ自己組織化ペプチド濃度を有する比較例

の止血材では、貯蔵弾性率が低すぎたり、外観に白濁の不良が生じたりしている。

[0071] [試験例 1]

実施例 1 で得られた止血材 1 を用いて止血効果を評価した。具体的には、モルモットの肝臓をメスで 5 mm 程度切開し、切開口に実施例 1 で得られた自己組織化ペプチドゲルを配置した。その結果、止血材を出血部位に配置してから 10 秒以内に止血が完了した。なお、止血材が透明であったために、出血部位を確認しながらその上に止血材を容易に配置することができた。また、出血部位に配置された止血材を介して目視で止血の完了を確認することができた。

[0072] [参考例 1]

自転公転攪拌装置または超音波ホモジナイザーを用いて、表 2 に記載の組成の自己組織化ペプチド水溶液を調製し、該水溶液から自己組織化ペプチドゲルを形成させた。自転公転攪拌装置および超音波ホモジナイザーを用いた自己組織化ペプチド水溶液およびゲルの調製方法および条件はそれぞれ、実施例 1 および実施例 2 と同様とした。得られた自己組織化ペプチドゲルに関して、HATR サンプリングアクセサリーとセレン化亜鉛結晶からなるトラフプレートを設置したフーリエ変換赤外分光光度計（パーキンエルマー社製、製品名「Spectrum One」）を用いて全反射吸収法にて以下の条件で IR 測定を行った。IR 測定結果のグラフを図 1 に示す。

< IR 測定条件 >

scan number : 32 回

波数の範囲 : 400 ~ 4000 cm^{-1}

分解能 : 4 cm^{-1}

OPD velocity : 0.2 cm/sec

測定温度 : 室温

セレン化亜鉛結晶への赤外線入射角 : 45°

[0073]

[表2]

組成[w/w%]		pH	混合方法
SPG-178	トリロ-ス・二水和物		
1.5	8.5	6.2	手段2 ^{※2}
1.5	7.6	7.3	手段1 ^{※1}

※1: 自転公転ミキサー

※2: 超音波ホモジナイザー

[0074] 図1に示すグラフにおいて、 $1600 \sim 1500 \text{ cm}^{-1}$ のピークはペプチド間で水素結合したアミド基由来であり、ゲル内における β シート構造の含有量に対応する。よって、図1のグラフからは、自転公転攪拌装置を用いて調製されたゲルの方が、 β シート構造がより発達した構造を有することがわかる。 β シート構造の発達は、ナノファイバーの形成およびその三次元網目構造への発展に有利であることから、この結果は、上記所定の攪拌装置を用いた混合方法が自己組織化ペプチドゲルの貯蔵弾性率の増加に寄与していることを示唆するものである。

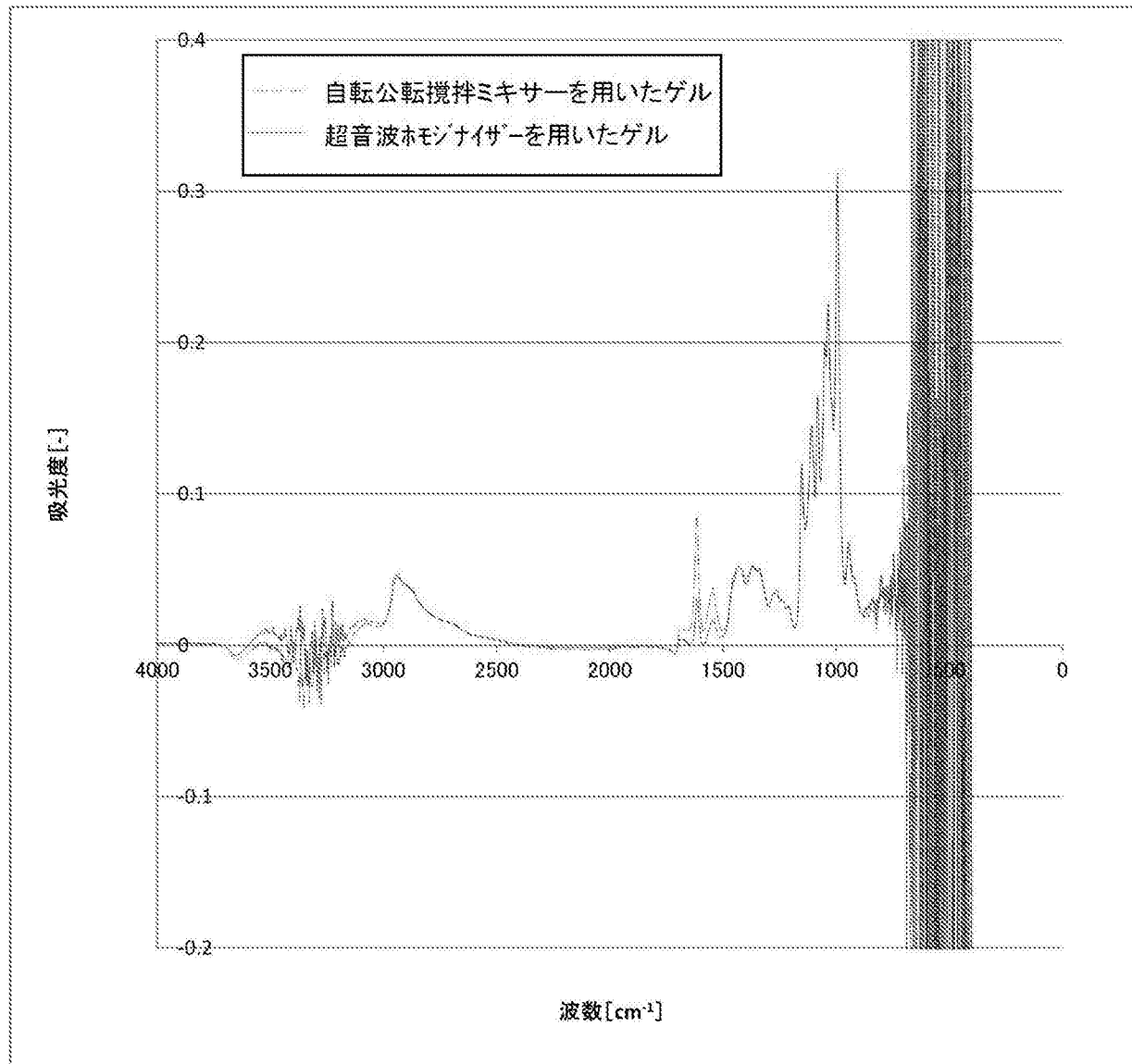
産業上の利用可能性

[0075] 本発明の止血材は、医療の分野において好適に利用され得る。

請求の範囲

- [請求項1] 自己組織化ペプチドと水とを含み、該自己組織化ペプチドの自己組織化によって形成されたゲルからなる止血材であって、
該ゲルの37℃における回転式レオメーターによって測定される貯蔵弾性率が、350Pa～3000Paである、止血材。
- [請求項2] 前記自己組織化ペプチドの濃度が、1.0重量%～3.0重量%である、請求項1に記載の止血材。
- [請求項3] pHが、5～8である、請求項1または2に記載の止血材。
- [請求項4] 可視光透過率が80%以上である、請求項1から3のいずれかに記載の止血材。
- [請求項5] 前記自己組織化ペプチドを構成するアミノ酸残基のpH7.0における電荷の総和が、-3～-1または+1～+3である、請求項1から4のいずれかに記載の止血材。
- [請求項6] 0.03重量%～0.5重量%の濃度でさらに強酸と塩基との塩を含む、請求項1から5のいずれかに記載の止血材。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/082653

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K38/00(2006.01)i, A61K9/06(2006.01)i, A61K47/02(2006.01)i, A61L15/16(2006.01)i, A61P7/04(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K38/00, A61K9/06, A61K47/02, A61L15/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2007/000979 A1 (Menicon Co., Ltd.), 04 January 2007 (04.01.2007), claims; tables 8, 9 & US 2010/0016548 A1 & JP 4766528 B	1-6
Y	JP 2012-131757 A (Okayama University), 12 July 2012 (12.07.2012), paragraphs [0003], [0005] (Family: none)	1-6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
09 March 2015 (09.03.15)

Date of mailing of the international search report
17 March 2015 (17.03.15)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/082653

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2008-539257 A (Massachusetts Institute of Technology), 13 November 2008 (13.11.2008), claims; paragraph [0036] & US 2007/0203062 A1 & US 2009/0111734 A1 & EP 01879606 A1 & WO 2006/116524 A1 & CA 002609656 A & CN 101267831 A & KR 10-2008-0007380 A & AU 2006241123 A & IL 000186779 D & DK 001879606 T & ES 002427565 T & HK 001112847 A	1-6
Y	Luo,Z.,et al., "Fabrication of self-assembling D-form peptide nanofiber scaffold d-EAK16 for rapid hemostasis", Biomaterials, 2011.03, Vol.32, No.8, P.2013-2020, page 2017, left column to right column, paragraph of '3.4.1. Agglutinating activity in vitro', page 2018, left column, paragraph of '3.4.3. Rheological tests of chiral pairs of peptides', fig. 4A, 5A, 5B	1-6
Y	Song,H.,et al., "Hemostatic Efficacy of Biological Self-Assembling Peptide Nanofibers in a Rat Kidney Model", Macromol. Biosci., 2010.01, Vol.10, No.1, P.33-39, Abstract, page 36, left column, line 29 to the last line, fig. 2, table 2	1-6
P,X	Komatsu,S.,et al., "The Neutral Self-Assembling Peptide Hydrogel SPG-178 as a Topical Hemostatic Agent", [online], 2014.07.21, PLoS ONE, Vol.9, No.7, P.1-8, [retrieval date 2015.03.05], Internet <URL:http://journals.plos.org/prosone/article?id=10.1371/journal.pone.0102778> Abstract, Figure 5	1-6
A	WO 2010/041636 A1 (3-D Matrix, Ltd.), 15 April 2010 (15.04.2010), claims; example 9; fig. 10 & US 2011/0201541 A1 & US 2014/0038909 A1 & EP 02345433 A1 & CN 102170919 A & KR 10-2011-0083648 A & RU 2011118341 A & SG 000194405 A	1-6

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. A61K38/00(2006.01)i, A61K9/06(2006.01)i, A61K47/02(2006.01)i, A61L15/16(2006.01)i, A61P7/04(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. A61K38/00, A61K9/06, A61K47/02, A61L15/16

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 5 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 5 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 5 年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

C Aplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2007/000979 A1（株式会社メニコン） 2007.01.04, 【請求の範囲】、表 8, 9 & US 2010/0016548 A1 & JP 4766528 B	1-6
Y	JP 2012-131757 A（国立大学法人 岡山大学） 2012.07.12, 段落【0003】、【0005】 （ファミリーなし）	1-6

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 9 . 0 3 . 2 0 1 5

国際調査報告の発送日

1 7 . 0 3 . 2 0 1 5

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官（権限のある職員）

中尾 忍

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 3 9

4 U

3 9 5 5

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2008-539257 A (マサチューセッツ・インスティテュート・オブ・テクノロジー) 2008.11.13, 【特許請求の範囲】、段落【0036】 & US 2007/0203062 A1 & US 2009/0111734 A1 & EP 01879606 A1 & WO 2006/116524 A1 & CA 002609656 A & CN 101267831 A & KR 10-2008-0007380 A & AU 2006241123 A & IL 000186779 D & DK 001879606 T & ES 002427565 T & HK 001112847 A	1-6
Y	Luo, Z., et al., "Fabrication of self-assembling D-form peptide nanofiber scaffold d-EAK16 for rapid hemostasis", Biomaterials, 2011.03, Vol.32, No.8, P.2013-2020 第2017頁左欄～同頁右欄『3.4.1. Agglutinating activity in vitro』の項、第2018頁左欄『3.4.3. Rheological tests of chiral pairs of peptides』の項、Fig. 4A, 5A, 5B	1-6
Y	Song, H., et al., "Hemostatic Efficacy of Biological Self-Assembling Peptide Nanofibers in a Rat Kidney Model", Macromol. Bio sci., 2010.01, Vol.10, No.1, P.33-39 Abstract、第36頁左欄第29行～同欄最終行、Figure 2、Table 2	1-6
P, X	Komatsu, S., et al., "The Neutral Self-Assembling Peptide Hydrogel SPG-178 as a Topical Hemostatic Agent", [online], 2014.07.21, PLoS ONE, Vol.9, No.7, P.1-8, [検索日 2015.03.05], インターネット <URL : http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0102778 > Abstract、Figure 5	1-6
A	WO 2010/041636 A1 (株式会社スリー・ディー・マトリックス) 2010.04.15, 請求の範囲、実施例9、図10 & US 2011/0201541 A1 & US 2014/0038909 A1 & EP 02345433 A1 & CN 102170919 A & KR 10-2011-0083648 A & RU 2011118341 A & SG 000194405 A	1-6