

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-511504

(P2005-511504A)

(43) 公表日 平成17年4月28日(2005.4.28)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 35/18	A 6 1 K 35/18	4 C O 8 7
A 6 1 K 35/14	A 6 1 K 35/14	C
A 6 1 P 7/00	A 6 1 K 35/14	Z
	A 6 1 P 7/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2003-526440 (P2003-526440)	(71) 出願人	501013592
(86) (22) 出願日	平成14年9月10日 (2002. 9. 10)		バイオピュア コーポレーション
(85) 翻訳文提出日	平成16年3月8日 (2004. 3. 8)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/028903		1 4 1 ケンブリッジ, ハーリー ストリ
(87) 国際公開番号	W02003/022312		ート 1 1
(87) 国際公開日	平成15年3月20日 (2003. 3. 20)	(74) 代理人	100095832
(31) 優先権主張番号	09/950, 270		弁理士 細田 芳徳
(32) 優先日	平成13年9月10日 (2001. 9. 10)	(72) 発明者	ペイジ, トーマス, シー.
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
			4 7 2 ウォータータウン, メイプルウッド
			ストリート 1 2 3
		(72) 発明者	ライト, ウィリアム, アール.
			アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 1
			7 6 0 ナティック, モヒーガン トレイ
			ル 3
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 貯蔵された赤血球による酸素輸送の改善方法

(57) 【要約】

患者の治療方法は、貯蔵された赤血球およびヘモグロビン溶液を患者に投与することを含む。貯蔵された赤血球およびヘモグロビン溶液は同時に患者に投与され得る。あるいはまた、ヘモグロビン溶液は、貯蔵された赤血球の投与前に患者に投与され得、または貯蔵された赤血球は、ヘモグロビン溶液の投与前に患者に投与され得る。本発明の組成物は、貯蔵された赤血球およびヘモグロビン溶液を含む。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

貯蔵された赤血球およびヘモグロビン溶液を患者に投与することを含む、患者の治療方法。

【請求項 2】

ヘモグロビン溶液が、貯蔵された赤血球を投与する前に投与される請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

貯蔵された赤血球が、ヘモグロビン溶液の投与の約36時間以内に投与される請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

貯蔵された赤血球が、ヘモグロビン溶液の投与の約24時間以内に投与される請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

貯蔵された赤血球が、ヘモグロビン溶液の投与の約8時間以内に投与される請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

貯蔵された赤血球が、ヘモグロビン溶液の投与と同時に、またはその前に投与される請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

ヘモグロビン溶液が、貯蔵された赤血球の投与の約8時間以内に投与される請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

ヘモグロビン溶液由来のヘモグロビンの、貯蔵された赤血球のヘモグロビンに対する比率が、重量で約 1 : 9 ~ 約 1 : 1 の範囲である請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

貯蔵された赤血球が約48時間より多く貯蔵されたものである請求項 1 記載の方法。

【請求項 10】

貯蔵された赤血球が約 7 日より多く貯蔵されたものである請求項 7 記載の方法。

【請求項 11】

貯蔵された赤血球が約35日より多く貯蔵されたものである請求項 7 記載の方法。

【請求項 12】

貯蔵された赤血球が約42日より多く貯蔵されたものである請求項 7 記載の方法。

【請求項 13】

貯蔵された赤血球のヘモグロビンが約15mmHg未満の P_{50} を有する請求項 1 記載の方法。

【請求項 14】

貯蔵された赤血球のヘモグロビンが約20mmHg未満の P_{50} を有する請求項 1 記載の方法。

【請求項 15】

貯蔵された赤血球のヘモグロビンが約25mmHg未満の P_{50} を有する請求項 1 記載の方法。

【請求項 16】

ヘモグロビン溶液由来のヘモグロビンが重合されている請求項 1 記載の方法。

【請求項 17】

ヘモグロビンがグルタルアルデヒドと重合されている請求項 16 記載の方法。

【請求項 18】

重合ヘモグロビン溶液が、

- a) 約15重量%未満のメトヘモグロビン含量、
 - b) 1 ミリリットル当たり約0.5エンドトキシン単位未満のエンドトキシン濃度、
 - c) 約500,000ダルトンより大きい分子量を有する重合ヘモグロビン約15重量%以下
 - d) 約65,000ダルトン以下の分子量を有する重合ヘモグロビン約10重量%以下
- を有する請求項 16 記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 19】

a) ヘモグロビン溶液を患者に投与すること；およびその後
b) 貯蔵された赤血球を投与すること
を含み、ここでヘモグロビン溶液が重合ヘモグロビンを含み、貯蔵された赤血球がより多くの間貯蔵されたものである、患者の治療方法。

【請求項 20】

貯蔵された赤血球が少なくとも約48時間貯蔵されたものである請求項 19 記載の方法。

【請求項 21】

ヘモグロビン溶液由来のヘモグロビンが少なくとも約25mmHgの P_{50} を有する請求項 19 記載の方法。

【請求項 22】

ヘモグロビン溶液由来のヘモグロビンがグルタルアルデヒドと重合されている請求項 19 記載の方法。

【請求項 23】

a) 貯蔵された赤血球を患者に投与すること；およびその後
b) ヘモグロビン溶液を患者に投与すること
を含み、ここでヘモグロビン溶液が重合ヘモグロビンを含み、患者の治療方法。

【請求項 24】

ヘモグロビン溶液が、貯蔵された赤血球の投与の約8時間以内に患者に投与される請求項 23 記載の方法。

【請求項 25】

貯蔵された赤血球が少なくとも約48時間貯蔵されたものである請求項 24 記載の方法。

【請求項 26】

ヘモグロビンが少なくとも約25mmHgの P_{50} を有する請求項 23 記載の方法。

【請求項 27】

ヘモグロビンがグルタルアルデヒドと重合されている請求項 23 記載の方法。

【請求項 28】

ヘモグロビン溶液および貯蔵された赤血球を含み、ここでヘモグロビン溶液が重合ヘモグロビンを含み、貯蔵された赤血球が約48時間より多く貯蔵されたものである組成物。

【請求項 29】

ヘモグロビンがグルタルアルデヒドと重合されている請求項 28 記載の組成物。

【請求項 30】

貯蔵された赤血球が約7日より多く貯蔵されたものである請求項 28 記載の組成物。

【請求項 31】

貯蔵された赤血球が約35日より多く貯蔵されたものである請求項 30 記載の組成物。

【請求項 32】

貯蔵された赤血球が約42日より多く貯蔵されたものである請求項 31 記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

関連出願

本出願は、2001年9月10日に提出された米国出願第09/950,270号の継続であり、その優先権を主張する。上記出願の全教示は、参照により本明細書に取り込まれる。

【0002】

発明の背景

貯蔵された血液は、経時的に多数の有害な生化学的変化（集合的に「貯蔵損傷」として知られる）を受ける。これらの変化としては、細胞の微凝集、溶血、小胞形成、減少した膜柔軟性、減少した安定性、および増加したヘモグロビン-酸素親和性が挙げられる。この変化は、貯蔵された血液または赤血球を含む血液製剤を患者に投与する全体的な利益を

10

20

30

40

50

低減し、患者に輸血した場合に有害な影響を引き起こしさえする。例えば、赤血球の微凝集形成の増加および膜柔軟性の損失は、微小循環血管の遮断を引き起こし、局所虚血および肺機能不全を引き起こし得る。

【 0 0 0 3 】

さらに、赤血球中の2,3-ジホスホグリセリン酸(2,3-DPG)の損失は、ヘモグロビン-O₂親和性の実質的増加を生じる。1週間より多く貯蔵した血液は、2,3-DPGレベルにおいて有意な減少を示す。2週間後、約40%の2,3-DPGのみが残っており、3週間では約10%のみが残っている。(S.P. Masouredis, Preservation and Clinical Use of Erythrocytes and Whole Blood, 164章, Hemology, 第3版、Williams, Beutler, ErslevおよびLichtman(編)、McGraw-Hill, NY, pp.1529-1549(1983))。2,3-DPGの損失は、P₅₀において付随した低下を生じる。例えば、保存液、クエン酸塩リン酸塩ブドウ糖(CPD)中における4週間の貯蔵後、パッケージされた赤血球(packed red cell)のP₅₀は、約15mmHgに低下する(Wellsら、Transfusion 21:709-714(1981))。赤血球からの酸素の放出は通常P₅₀に比例するので、貯蔵された赤血球の酸素を送達する能力もまた経時的に減少する。

【 0 0 0 4 】

貯蔵損傷は、対流性酸素送達および拡散性酸素送達を共に減少することにより酸素輸送において有害な変化を引き起こし得る。微凝集および柔軟性を欠く細胞は微細血管中にひっかかり、下流の組織への流れを遮断する。さらに、比較的高い酸素親和性を有するヘモグロビンを含む赤血球は、酸素を組織へ放出する能力が減少している。酸素に対して高い親和性を有する貯蔵された赤血球は、体内への輸血後、経時的に「復活(rejuvenate)」しうる。2,3-DPGのレベルは、4時間までに標準の30%~50%まで戻り、およそ24時間で標準レベルに戻るが、この速度は変化しうる(ValeriおよびHirsch, J. Lab. Clin. Med. 73:722-733(1969); BeutlerおよびWood, J. Lab. Clin. Med. 74:300-304(1969))。2,3-DPGの回復の速度は、患者の代謝状態に依存しうる。(O'BrienおよびWatkins, J. Thor. & Cardiovas. Surg. 40:611(1960))。皮肉にも、貯蔵された赤血球は、急な必要性を満たすために輸血されるが急性損傷を被る。

【 0 0 0 5 】

これらの細胞は、一定時間をかけて柔軟性を得て酸素親和性を減少しながら循環中に「復活する」一方、患者、とりわけ重病である患者に有害な影響を与えうる低下した酸素輸送の領域(window)がある。さらに、若い健康な患者は、貯蔵損傷を代償しうる一方；代償する能力が低下したかまたはその能力がない患者は、さらなる損傷の危険に置かれるか、または治療の効力が低下する。逆説的なことに、ある場合において酸素に対する高い親和性を有する赤血球の輸血のこの代償応答は、減少した局所酸素付加を引き起こし得る。(MarrickおよびSibbald, JAMA 269:3024-30(1993))。微小塞栓の生成はまた、貯蔵損傷の一部である。微小塞栓は、パッケージされた赤血球中で貯蔵期間に形成され、輸液の際に微小循環を妨害し、肺毛管内皮および肺胞上皮に対して損傷を引き起こすことが、知られている(Liuら、Ann. Thorac. Surg. 54:1196-1202(1992); Gayら、Trauma 19:80-84(1979))。

【 0 0 0 6 】

新鮮な赤血球は、大量輸血、幼児、高齢患者、ならびに心血管および肺系疾患を罹患している患者の輸血に対して推奨されている(Masouredis, S.P., Preservation and Clinical Use of Blood and Blood Components, Hemology, (Williams, W.J., Beutler, E., Erslev, A.J. および Lichtman, M.A. 編) McGraw-Hill, New York, pp.1529-1549; Sugarman, H.J. ら、Surg. Gynecol. Obstet., 131: 733-741(1970); Valeri, G.R. ら、Transfusion 20: 263-276(1980); Hess, W., Anaesthetist., 36: 455-467(1987))。しかしながら、新鮮な血球の入手可能性は、しばしば制限される。

【 0 0 0 7 】

それゆえに、貯蔵された赤血球の酸素輸送および送達効率を改善する産物および方法についての必要性が存在する。

【 0 0 0 8 】

発明の要旨

本発明は、貯蔵された赤血球およびヘモグロビン溶液を患者に投与することにより、患者を治療する方法に関する。

【0009】

1つの態様において、ヘモグロビン溶液が患者に投与され、その後貯蔵された赤血球溶液が投与され、ここで、ヘモグロビン溶液が重合ヘモグロビンを含有し、貯蔵された赤血球が約48時間より多く貯蔵されたものである。

【0010】

別の態様において、この方法は、貯蔵された赤血球を患者に投与し、その後、貯蔵された赤血球の投与の約8時間以内にヘモグロビン溶液を投与することを含み、ここで、ヘモグロビン溶液は重合ヘモグロビンを含有し、貯蔵された赤血球は約48時間より多く貯蔵されたものである。

【0011】

本発明はさらに、ヘモグロビン溶液および貯蔵された赤血球を含有してなり、ここで、貯蔵された赤血球が約48時間より多く貯蔵されたものである組成物に関する。

【0012】

本明細書に説明されるように、赤血球の貯蔵は、経時的に赤血球からの酸素放出の速度を減少するが、貯蔵された赤血球に加えてヘモグロビン溶液を投与することは、この効果を逆転し、貯蔵された赤血球に酸素送達潜在能力を復活させた。得られた混合物は、酸素放出において新鮮な赤血球のようふるまった。驚くべきことに、患者に投与される全ヘモグロビンのわずか約10パーセント(10%)がヘモグロビン溶液の形態である場合であってさえ、この効果が得られた。本明細書に記載される研究の結果、貯蔵された赤血球と共にヘモグロビン溶液を添加することは、新しく単離された赤血球の形態でのヘモグロビンの同じ総量の添加を超える酸素放出における実質的な増加を生じると考えられている。

【0013】

本発明の方法および組成物は、貯蔵された赤血球の酸素送達能力を、他の場合で(otherwise)可能であろうよりもより迅速に復活させうる。本発明は、重病、幼児、および高齢患者の治療に特に有用でありうる。さらに、本発明の方法のヘモグロビンおよび貯蔵された赤血球の添加は、より小さいヘモグロビン分子が障害物を通過して酸素を送達しうるために、微小塞栓の存在にもかかわらず、増加した組織酸素付加を生じる。本発明の方法および組成物は、貯蔵された赤血球の酸素輸送および送達効率を改善し、貯蔵された赤血球の有用な貯蔵期間を延ばしうる。

【0014】

発明の詳細な説明

本発明の方法は、貯蔵された赤血球およびヘモグロビン溶液を患者に投与することにより患者を治療することを含む。「貯蔵された赤血球」という用語は、野生型ヘモグロビンまたは赤血球と比較して有意に減少した P_{50} を有する赤血球を包含し、ここで野生型ヘモグロビンは少なくとも約25mmHgの P_{50} を有する。本明細書で規定される「 P_{50} 」は、ヘモグロビンの50%が酸素に結合されるとき酸素の分圧を意味する。1つの態様において、貯蔵された赤血球は天然または新鮮な血液であり得、自然に、遺伝子変化または疾患により、約25mmHgより有意に低い P_{50} を有する。低下した P_{50} を有する貯蔵された赤血球の例は、 P_{50} が約25mmHg以下、約15mmHg以下である血液である。貯蔵された赤血球は、健康な個体からの新鮮な単離血液と比較して低下したレベルの2,3-DPGを有し得、低下した P_{50} を生じる。

【0015】

本発明の1つの態様において、貯蔵された赤血球は、患者への投与前の少なくとも約48時間にドナーから単離されている。別の態様において、貯蔵された赤血球は、患者への投与前の少なくとも約7日間にドナーから単離されている。さらに別の態様において、貯蔵された赤血球は、少なくとも約35日間にドナーから単離されている。別の態様において、貯蔵された赤血球は、本発明の方法による患者への投与前の少なくとも約42日間にドナーから単離されている。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 6 】

貯蔵された赤血球は、保存血液でありうる。本明細書で規定される場合「保存血液」という用語は、貯蔵および続く輸血による使用のために処理された血液を意味する。血液を保存するための適切な方法は、周知である。血液を保存するための適切な物理的方法の例は、冷凍および凍結である。血液を保存するための適切な化学方法の例としては、酸性クエン酸塩ブドウ糖(ACD)またはクエン酸塩リン酸塩ブドウ糖(CPD)などの化合物の添加が挙げられる。さらに、血液溶液は、アデニン、ブドウ糖、マンニトールなどの成分、またはそれらの組み合わせで強化されうる。血液の保存方法のさらなる例は、Holmeらによる米国特許第5,487,971号明細書に見出され得、その教示は全体として参照により本明細書に組み込まれる。

10

【 0 0 1 7 】

別の態様において、貯蔵された赤血球は凍結赤血球に由来しうる。赤血球の凍結方法は、当該分野で周知である。かかる方法は、典型的には、液体窒素中などの低温での迅速な凍結および維持、またはグリセロールなどの凍結保存剤の存在下での凍結を含む。典型的には、凍結保存剤は輸血前に赤血球から除去される。

【 0 0 1 8 】

別の態様において、貯蔵された赤血球は、白血球の少なくとも約80%を除去するように処理されている。貯蔵された赤血球の適切な供給源の他の例としては、パッケージされた赤血球および洗浄された(washed)赤血球が挙げられる。

【 0 0 1 9 】

「ヘモグロビン溶液」は、本明細書で「ヘモグロビンベース酸素担体」または「HBOC」とも呼ばれ、ヘモグロビンの液体懸濁液(無細胞ヘモグロビン)を意味する。本発明の使用に適切なヘモグロビンは、ヒトおよび/または他の哺乳動物源(例えば、ウシ、ブタ、ヒツジまたはイヌ源)に由来する新しい、古いまたは旧式の血液に由来しうる。さらに、Bio/Technology, 12:55-59(1994)に記載されるトランスジェニックにより産生されたヘモグロビンなどのトランスジェニックにより産生されたヘモグロビン、およびNature, 356:258-260(1992)に記載される組換えにより産生されたヘモグロビンもまた、本明細書に記載されるヘモグロビン溶液における使用に適切である。

20

【 0 0 2 0 】

好ましくは、ヘモグロビンは、分子間および/または分子内架橋されている。任意に、または代替的に、ヘモグロビンは別の分子(例えばポリエチレングリコールまたはグルタルアルデヒド)に結合されうる。好ましいヘモグロビン溶液の例は、Rauschらによる米国特許第5,618,919号明細書; Rauschらによる米国特許第5,905,141号明細書; Rauschらによる米国特許第5,084,558号明細書; Rauschらによる米国特許第5,296,465号明細書; Rauschらによる米国特許第5,840,852号明細書; Rauschらによる米国特許第5,753,616号明細書; Lightらによる米国特許第5,895,810号明細書; Gawrylらによる米国特許第5,691,452号明細書; Wertzらによる米国特許第5,691,453号明細書; およびGawrylらによる5,808,011に記載されており、これらすべての教示は全体として参照により本明細書に取り込まれる。ヘモグロビンは、約25mmHgの P_{50} 、または25mmHgより大きい P_{50} を有しうる。特定の態様において、ヘモグロビンは、少なくとも約38mmHgの P_{50} を有する。

30

40

【 0 0 2 1 】

1つの態様において、ヘモグロビン溶液は、グルタルアルデヒドと重合されており、約15重量%未満のメトヘモグロビン含量、1ml当たり約0.5エンドトキシン単位未満のエンドトキシン濃度を有し、約500,000ダルトンより大きい分子量を有する重合ヘモグロビン約15重量%以下および約65,000ダルトン以下の分子量を有する重合ヘモグロビン約10重量%以下を有する。任意に、ヘモグロビン溶液は、1ml当たり約0.5エンドトキシン単位未満のエンドトキシン含量を有しうる。

【 0 0 2 2 】

1つの態様において、ヘモグロビン溶液由来のヘモグロビンの、貯蔵された赤血球由来のヘモグロビンに対する比率は、重量で約1:9~約1:1の範囲である。他の態様にお

50

いて、遊離ヘモグロビンの細胞会合ヘモグロビンに対する比率は、ヘモグロビン濃度で約 1 : 4 または約 2 : 3 である。

【0023】

貯蔵された赤血球およびヘモグロビン溶液は、任意の順序で患者に投与されうる。ヘモグロビン溶液および貯蔵された赤血球はまた、交互の様式で投与され得、ここで、1 回以上で、ヘモグロビン溶液の一定量が投与され、貯蔵された赤血球の一定量が続いて投与される。代替的には、貯蔵された赤血球が最初に投与されうる。1 つの態様において、本発明の方法は、ヘモグロビン溶液の投与の約 36 時間以内に貯蔵された赤血球を投与することを含む。代替的には、貯蔵された赤血球は、ヘモグロビン溶液の投与の約 24 時間以内、または 8 時間以内に投与される。さらに別の態様において、貯蔵された赤血球およびヘモグロビン溶液は同時に投与される。好ましくは、ヘモグロビン溶液は、貯蔵された赤血球が患者に投与される前に投与される。

10

【0024】

ヘモグロビン溶液および貯蔵された赤血球は、任意の適切なヘモグロビン濃度またはヘマトクリットで患者に投与されうる。例えば、ヘモグロビン溶液は約 10g/dL の濃度でありうる。別の態様において、ヘモグロビン溶液は 14g/dL の濃度である。貯蔵された赤血球は、例えば約 30 ~ 約 80 のヘマトクリットで提供されうる。

【0025】

ヘモグロビン溶液、貯蔵された赤血球またはその組み合わせが投与される適切な速度の例は、約 0.5ml / 分 ~ 約 100ml / 分の範囲である。1 つの態様において、ヘモグロビン溶液、貯蔵された赤血球またはその組み合わせは、約 2.5ml / 分などの低速で投与されうる。ヘモグロビン溶液が投与される適切な期間の例は、約 2.5 分から (for) 約 9 時間である。

20

【0026】

別の態様において、本発明は、ヘモグロビンおよび貯蔵された赤血球の組成物を含む。組成物は、ヘモグロビンまたは赤血球を貯蔵または保存するための任意の適切な容器に含まれうる。好ましくは、ヘモグロビンは重合されている。特に好ましい態様において、ヘモグロビンは、グルタルアルデヒドと重合されている。

【0027】

組成物の形成方法は、適切なヘモグロビン溶液と適切な貯蔵された赤血球とをあわせることを含む。適切なヘモグロビン溶液および適切な貯蔵された血液は、前記のものである。ヘモグロビンおよび貯蔵された赤血球が組み合わせられ、次いで直ちに本発明の方法により患者を治療するために使用されうるか、あるいは組み合わせられたヘモグロビンおよび赤血球は、後の使用のために貯蔵されうる。

30

【実施例】

【0028】

サンプルの調製

新鮮な赤血球 (Frbc) 懸濁液を、健常なドナーからヘパリン中に血液を抜き取る (0.1mL/10mL) ことにより調製し、4 に冷蔵し、遠心分離し、血漿および軟膜を除去した。細胞を 2 倍容量の等張リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、pH7.4 で再懸濁した。遠心分離および PBS での再懸濁を 3 サイクル実施して、残余レベルの血漿および軟膜物質を除去した。次いで、新鮮な赤血球を 30% ヘマトクリット (hct) に希釈し、使用まで 4 にて貯蔵した。48 時間 (2 日間) より長く使用しない場合、細胞を捨てた。

40

【0029】

貯蔵赤血球 (Srbc) は、本質的に Gulf Coast Blood Center, Houston, TX から購入したバックされた赤血球ユニットであった。4 ~ 5 週間の貯蔵期間後の標準的な臨床的に利用可能なユニットを血液銀行から得た。貯蔵細胞を、新鮮な赤血球について前記したように遠心分離および再懸濁を繰り返すことにより PBS pH7.4 で洗浄した。新鮮な赤血球とは異なり、最初の遠心分離後に溶血の徴候があった。認識できる溶血または細胞残屑がなくなるまで洗浄を繰り返した (6 回まで)。洗浄した貯蔵赤血球を 30% hct に希釈し、使用まで 4 にて貯蔵した。

50

【0030】

人工毛細管に使用する(図1)前に、サンプルをマイクロキャピラリー(microcapillary)ヘマトクリットチューブ内に引き抜いて、溶血を探し、ヘマトクリットを再検査した。赤血球ヘモグロビン P_{50} をHemox分析器(TCS Medical Products Co., New Hope, PA)を用いて測定した。

【0031】

本研究に使用したHBOCを、Biopure Corp., Cambridge, MAが提供した。HBOCは、グルタルアルデヒド-重合、超高純度ウシヘモグロビンを含む生理学的溶液から構成されていた。HBOCは38の P_{50} および約1.4のHill係数を有していた。HBOCのサンプルをヴァキュテーナー(vacutainer)内に供給し、使用まで室温にて貯蔵した。

10

【0032】

使用直前に、洗浄した貯蔵赤血球をHBOCと混合して、貯蔵赤血球/HBOC混合物を作製した。これらの混合物を「貯蔵赤血球/HBOC 1-1」および「貯蔵赤血球/HBOC 9-1」と呼ぶ。貯蔵赤血球/HBOC 1-1は、15%ヘマトクリットおよび5g/dlヘモグロビン溶液の最終組成に対応するように、等量(グラム)の赤血球ヘモグロビン(細胞として)と細胞のないヘモグロビン(HBOC)から構成されていた。貯蔵赤血球/HBOC 9-1は、27%ヘマトクリットおよび1g/dlヘモグロビン溶液の最終組成に対応するように、90%の赤血球ヘモグロビン(細胞として)と10%の細胞のないヘモグロビン(HBOC)から構成されていた。両サンプルは10g/dlの総ヘモグロビン濃度を有していた。

【0033】

20

実験系

実験装置は、例えば、Page, T.C.ら、「Oxygen Transport by Erythrocyte/Hemoglobin Solution Mixtures in an in Vitro Capillary as a Model of Hemoglobin-Based Oxygen Carrier Performance」、Microvasc. Res., 55:54-64(1998); Page, T.C.ら、「Prediction of Microcapillary Oxygen Transport by Erythrocyte/Hemoglobin Solution Mixtures」、Microvasc. Res., 56:113-126(1998); およびPage, T.C.ら、「Experimental and Mathematical Simulation of Oxygen Transport by Hemoglobin-Based Blood Substitute」、Blood Substitutes-Present and Future Perspectives, E Tsuchida(編)第11章, pp.135-145(1998)(これら全ての教示はその全体が本明細書に援用される)に記載されている。

30

【0034】

実験系

この系は、約25 μ mの直径を有する毛細管を画定するシリコーンゴム毛細管フィルムを含む。酸素に対するその高い透過性およびヘモグロビン酸素飽和の分光測定を可能にするのに十分な光学的な透明性からシリコーンゴムを選択した。毛細管フィルムを顕微鏡のステージに載せた。毛細管フィルムを各末端でカニユーレ挿入し、赤血球懸濁液、ヘモグロビン溶液、またはその混合物で灌流した。二重波長顕微分光測定法を使用して、毛細管に沿った種々の軸位置でサンプルの酸素飽和を測定した。既知の0%および100%酸素飽和での測定を毛細管に沿った各位置で行った。これらのキャリブレーションを使用して、実験測定値について酸素飽和度(fractional oxygen saturation)対毛細管に沿った位置を計算した。

40

【0035】

測定

酸素取り込み実験については、サンプルをトノメーター内で脱酸素し、次いで8 μ m Nucleoporeフィルターを介して供給リザーバに送った。サンプルが毛細管腔を通過して引かれている間、酸素化ガスを毛細管フィルムに吹き付けた。酸素放出実験においては、シリコーンゴムフィルムの表面を加湿窒素でおおいながら、空気平衡サンプルを毛細管を通して引いた。HBOC-301を含むサンプルを50%酸素で平衡にして、完全飽和(飽和度の計算に必要な)を達成した。一方、供給リザーバでは、サンプルが沈殿するのを防ぐために引き続き攪拌した。毛細管に沿った5つの異なる位置で4つの流速についてデータを取得した

50

。このデータを酸素飽和度に変換して、飽和度対見かけ滞留時間として示した。これらの計算がなされる方法は、使用した実験系に関する上記に示した参考文献に詳細に考察される。

【0036】

結果

貯蔵細胞は徹底的な洗浄を必要とし、壊れやすかった。観察した P_{50} は、Hemox Analyzer (TCS Medical Products, New Hope, PA)で測定した場合、 15 ± 1 mmHgであった。洗浄した貯蔵赤血球サンプルは、貯蔵24時間後に、著しい溶血を有しており、再洗浄しなればならなかった。

【0037】

酸素放出

貯蔵赤血球および新鮮な赤血球（それぞれSrbcおよびFrbc、または一般的にrbc）を用いた酸素輸送研究の結果を図1に示す。このデータを平均±標準偏差として表す。これらの所見を、数学的モデルにより予想した曲線（新鮮および貯蔵赤血球についてそれぞれ P_{50} が26mmHgと15mmHgである）と比較した。これらのサンプルのヘマトクリットは30%であった。Srbcからの酸素放出は、新鮮なヒト赤血球と比較して有意に減少していた。このモデル結果は、新鮮な赤血球についての放出データと一致したが、貯蔵赤血球からの放出は僅かに予測を下回った（under-predicted）。

【0038】

HBOCの量を増加しながら貯蔵細胞に添加する用量応答実験についての放出データのまとめを図2に示す。全てのサンプルを加湿空気で平衡にした。図1のSrbcおよびFrbcについてのデータ系列を透明性に適した曲線として示す。Srbc/HBOC 9-1サンプルの平衡飽和を計算すると0.98となり、一方、Srbc/HBOC 1-1の平衡酸素飽和は0.92と算出された。酸素放出における実質的な増加は、Srbc/HBOC 9-1サンプルにおいてさえ認められ、酸素放出の効率はHBOC濃度の割合（fractional）が高いほど増加する。貯蔵により生じる酸素輸送効率の損失は、少量のHBOCの添加で逆転する。

【0039】

全サンプル（ポイント）による酸素放出のまとめを、赤血球およびrbc/HBOC混合物に対する酸素輸送の確認された数学的モデル（曲線）と比較して図3に示す。図3に示し得るように、全てのSrbcおよびFrbc混合物について、HBOCの添加により酸素放出が増加することが観察された。Frbcを含有するサンプルは、Srbcを含有する各サンプルよりも酸素を放出（offload）した。このモデルは、FrbcおよびHBOCを含むFrbc混合物について予測的であり、Srbc/HBOC 1-1およびSrbc/HBOC 9-1については予測的ではなく、このモデルは、全ての滞留時間についての酸素放出は予測を下回った（under-estimated）。従って、酸素に対する親和性が有意に高いにもかかわらず、ヘモグロビンベース酸素キャリアと組み合わせる場合、貯蔵赤血球は、予測されたよりも有意に高い放出速度を示した。さらに、予測された挙動とは対照的に、貯蔵赤血球の酸素放出速度は、同じ量のヘモグロビンベース酸素キャリアと混合する場合、ほぼ新鮮な赤血球の酸素放出速度である。

【0040】

酸素取り込み

SrbcおよびFrbcによる酸素取り込みの結果を図4に示す。このデータ点を、理論的シミュレーション（曲線）と比較した。曲線を理論赤血球懸濁モデルにより作成した。新鮮な細胞について、 P_{50} は26mmHgに設定し、貯蔵細胞について、 P_{50} は15mmHgに設定した。貯蔵細胞による酸素取り込み（丸）は新鮮な細胞（三角）よりも速かった。同じ傾向が、数学的シミュレーションのデータで見られ得る。実験データは、新鮮な赤血球についての理論曲線と一致するが、貯蔵赤血球についての実験データは、短滞留時間において予測されたよりもずっと高い酸素取り込み速度を示した。この「バースト」効果は、通常、ヘモグロビン溶液に関連する。

【0041】

「バースト」効果は図5に見られ得る。Srbc/HBOC混合物を用いた用量応答実験の結果

10

20

30

40

50

を酸素取り込みについて図5にまとめる。4つのデータ系列(Srbc、Srbc/HBOC 1-1、Srbc/HBOC 9-1、およびFrbcを含む)を示す。Frbcデータ系列を比較のために示す。SrbcおよびSrbc/HBOC混合物による酸素取り込みは、Frbcサンプルよりも速かった。純粋な赤血球サンプルはHBOC含有サンプルよりも完全に飽和していた。これは、部分的にHBOC(室内空気で完全に飽和しない)の酸素親和性の減少に起因した。HBOC含有サンプルはまた、赤血球単独よりも緩徐に平衡飽和値に近づく。この挙動は以前に考察されている(Pageら(1998)前出)。rbc/HBOC 1-1およびrbc/HBOC 9-1についての平衡値はそれぞれ92および98%である。実験データ系列は、1.3秒の滞留時間までにこれらの飽和レベルに達しなかった。

【0042】

10

考察

本明細書に示すように、貯蔵赤血球のヘモグロビンが高い酸素親和性を有しているにもかかわらず、貯蔵赤血球にヘモグロビン溶液を添加する場合、ヘモグロビン溶液は酸素輸送を回復した。上記のように、貯蔵赤血球由来のヘモグロビン9重量部対ヘモグロビン溶液由来のヘモグロビン1重量部の比での貯蔵赤血球へのヘモグロビン溶液の添加は、貯蔵赤血球単独以上に酸素放出の増加を生じた。酸素放出が回復し、その結果、新鮮な単離血液より放出される酸素と比較して、少なくとも同じくらいの酸素が、貯蔵赤血球/ヘモグロビン溶液混合物により放出された(図2および3)。貯蔵赤血球由来のヘモグロビン1重量部対HBOC由来のヘモグロビン1重量部の比での貯蔵赤血球へのHBOCの添加は、9:1混合物と比較して、および新鮮な赤血球と比較して酸素放出において大きな増加を生じた(図2および3)この回復は、明らかに貯蔵赤血球における2-3,DPCレベルの回復なしに生じた。

20

【0043】

貯蔵赤血球サンプルおよび貯蔵赤血球/HBOC 9-1混合物の酸素放出は、数学的モデルで予測されたよりも高かった(図3)。赤血球懸濁液は、ほんの少量の高親和性細胞外ヘモグロビンの存在に非常に感受性であった。実験中任意の溶血は、細胞外高親和性ヘモグロビンの増加および酸素放出の同時増加が生じた。赤血球および貯蔵赤血球/HBOC 9-1混合物はこの現象に特に感受性であり、一方、貯蔵赤血球/HBOC 1-1混合物は細胞外ヘモグロビン濃度における小さな増加にはあまり感受性ではなかった。

【0044】

30

モデルシミュレーションと、貯蔵赤血球を用いた実験中に回収リザーバ内の遊離ヘモグロビンの観察を伴う実験データとの間の不一致は、細胞外ヘモグロビンのレベルの増加が溶血に起因することを示した。遊離ヘモグロビンが貯蔵臨床ユニットに存在し、溶血の起因となったが、臨床の設定では、遊離ヘモグロビンは身体により速やかに除去されるであろう。この理由のため、実験試験前に細胞を洗浄することにより溶血のレベルを減少させた。回収リザーバの遊離ヘモグロビンの存在により証明されるように、いくつかの溶血は実験中にまだ生じた。

【0045】

均等物

本発明の方法の特徴および他の詳細は、ここでは請求の範囲に特に記載され、示される。本発明の特定の態様が本発明の限定としてではなく例示として示されることが理解される。本発明の原理特徴は、本発明の範囲から逸脱せずに種々の態様において使用され得る。全ての部およびパーセンテージは他に明示されない限り重量基準である。

40

【図面の簡単な説明】

【0046】

【図1】図1は、貯蔵ヒト赤血球からの実際および予測酸素放出を新鮮な単離ヒト赤血球と比較した経時的な酸素放出のプロットであり、点は実験データを示し、曲線は理論的モデルからの出力を示す。

【図2】図2は、貯蔵赤血球および新鮮な赤血球へのヘモグロビンベース酸素キャリア(HBOC)の添加の酸素放出に対する効果についての用量応答のプロットである。

50

【図 3】図 3 は、単独および 2 つの異なる量のヘモグロビンベース酸素キャリアと組み合わせた新鮮赤血球および貯蔵赤血球のサンプルによる経時的な酸素放出のまとめである。

【図 4】図 4 は、貯蔵および新鮮な単離赤血球懸濁液についての酸素取り込みのプロットであり、点は実験データを示し、曲線は理論的シミュレーションを示す。

【図 5】図 5 は、単独およびヘモグロビンベース酸素キャリアと組み合わせた貯蔵赤血球、ならびに新鮮赤血球単独による酸素取り込みのプロットである。

【図 1】

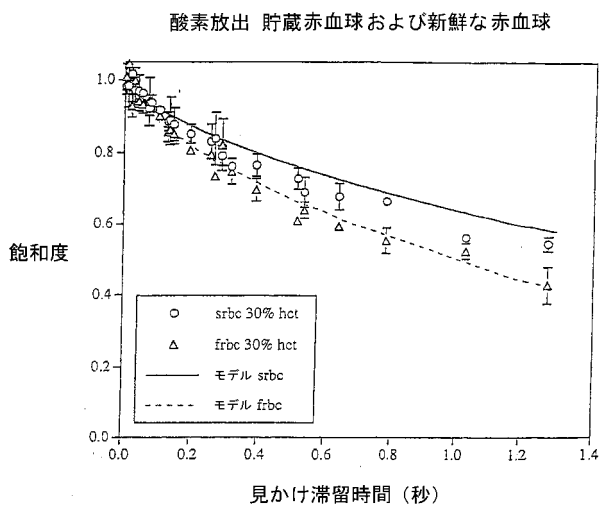


FIG. 1

【図 2】

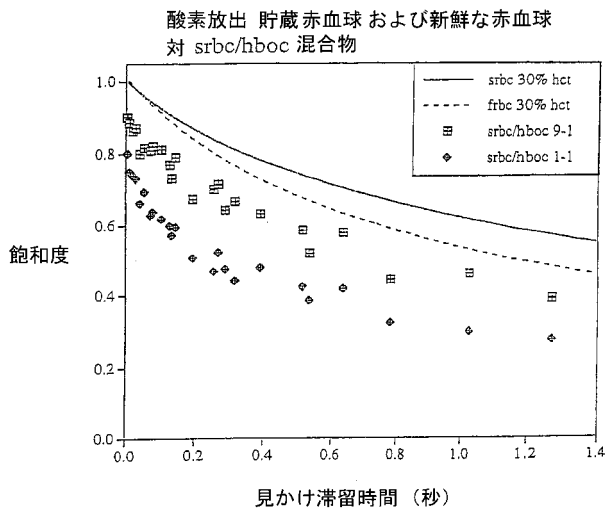


FIG. 2

【 図 3 】

srbc, frbc, および hboc 混合物についての
酸素放出データのまとめ

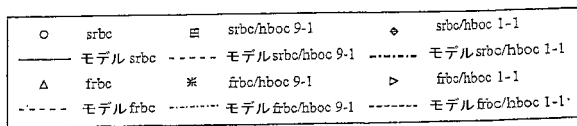
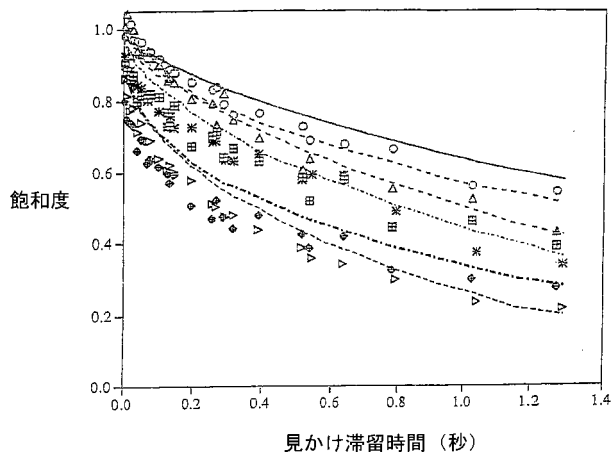


FIG. 3

【 図 4 】

酸素取り込みデータのまとめ
frbc および srbc vs モデル予測

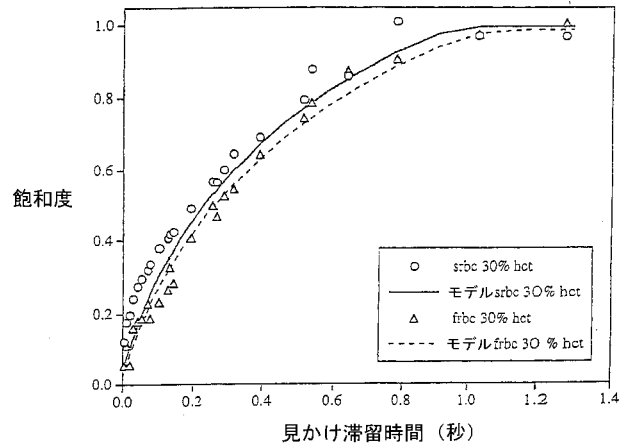


FIG. 4

【 図 5 】

酸素取り込みデータのまとめ
frbc/hboc についての用量応答

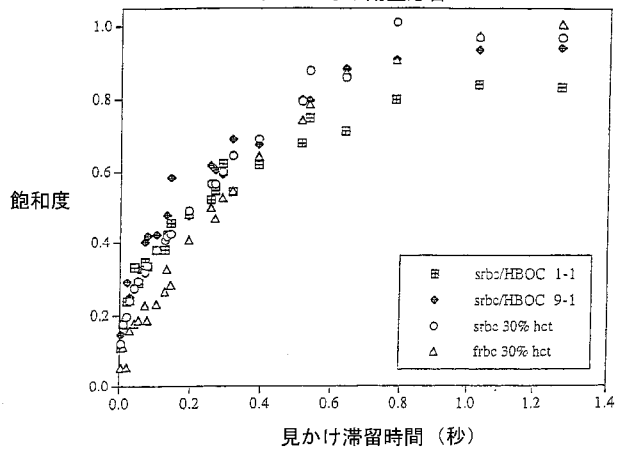


FIG. 5

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/28903																											
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A61K 49/00; A61M 37/00; A01N 1/02 US CL : 424/9.1; 604/4.1, 6.14; 435/2 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) U.S. : 424/9.1; 604/4.1, 6.14; 435/2 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet																													
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>US 5,865,784 A (FAITHFULL et al) 2 February 1999 (02.02.1999), column 3, lines 25-43; column 9, lines 46-52; column 10, lines 21-26, 30-40, 65-67; column 11, lines 1-2;</td> <td>1-7, 9-12</td> </tr> <tr> <td>---</td> <td></td> <td>-----</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>column 1, line 62-64.</td> <td>8, 13-27</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 5,618,919 A (RAUSCH et al) 8 April 1997 (04.08.1997), abstract; column 6, lines 37-38; column 21, line 59; column 56, lines 21-41.</td> <td>16-18, 21, 22, 26, 27</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>PAGE et al. Oxygen Transport by Erythrocyte/Hemoglobin Solution Mixtures in an in Vitro Capillary as a Model of Hemoglobin-Based Oxygen Carrier Performance.</td> <td>28, 29</td> </tr> <tr> <td>---</td> <td>Microvascular Research. 1998, Vol. 55, pages 54-64, especially page 55, column 2, lines 14-30. Fig. 2 and Fig. 8.</td> <td>-----</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>8, 16, 17, 21, 22, 26, 27, 30-32</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>UEHIRA et al. Oxygen Affinity Measurement of Preserved Blood. Vox Sanguinis 1996, Vol. 70, Suppl. 2, 24th Congress of the International Society of Blood transfusion, abstract 3/4B-27 P.</td> <td>13-15</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	US 5,865,784 A (FAITHFULL et al) 2 February 1999 (02.02.1999), column 3, lines 25-43; column 9, lines 46-52; column 10, lines 21-26, 30-40, 65-67; column 11, lines 1-2;	1-7, 9-12	---		-----	Y	column 1, line 62-64.	8, 13-27	Y	US 5,618,919 A (RAUSCH et al) 8 April 1997 (04.08.1997), abstract; column 6, lines 37-38; column 21, line 59; column 56, lines 21-41.	16-18, 21, 22, 26, 27	X	PAGE et al. Oxygen Transport by Erythrocyte/Hemoglobin Solution Mixtures in an in Vitro Capillary as a Model of Hemoglobin-Based Oxygen Carrier Performance.	28, 29	---	Microvascular Research. 1998, Vol. 55, pages 54-64, especially page 55, column 2, lines 14-30. Fig. 2 and Fig. 8.	-----	Y		8, 16, 17, 21, 22, 26, 27, 30-32	Y	UEHIRA et al. Oxygen Affinity Measurement of Preserved Blood. Vox Sanguinis 1996, Vol. 70, Suppl. 2, 24th Congress of the International Society of Blood transfusion, abstract 3/4B-27 P.	13-15
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																											
X	US 5,865,784 A (FAITHFULL et al) 2 February 1999 (02.02.1999), column 3, lines 25-43; column 9, lines 46-52; column 10, lines 21-26, 30-40, 65-67; column 11, lines 1-2;	1-7, 9-12																											
---		-----																											
Y	column 1, line 62-64.	8, 13-27																											
Y	US 5,618,919 A (RAUSCH et al) 8 April 1997 (04.08.1997), abstract; column 6, lines 37-38; column 21, line 59; column 56, lines 21-41.	16-18, 21, 22, 26, 27																											
X	PAGE et al. Oxygen Transport by Erythrocyte/Hemoglobin Solution Mixtures in an in Vitro Capillary as a Model of Hemoglobin-Based Oxygen Carrier Performance.	28, 29																											
---	Microvascular Research. 1998, Vol. 55, pages 54-64, especially page 55, column 2, lines 14-30. Fig. 2 and Fig. 8.	-----																											
Y		8, 16, 17, 21, 22, 26, 27, 30-32																											
Y	UEHIRA et al. Oxygen Affinity Measurement of Preserved Blood. Vox Sanguinis 1996, Vol. 70, Suppl. 2, 24th Congress of the International Society of Blood transfusion, abstract 3/4B-27 P.	13-15																											
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.																													
* Special categories of cited documents: <table border="1"> <tbody> <tr> <td>"A"</td> <td>document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"T"</td> <td>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</td> </tr> <tr> <td>"E"</td> <td>earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"X"</td> <td>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</td> </tr> <tr> <td>"L"</td> <td>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)</td> <td>"Y"</td> <td>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</td> </tr> <tr> <td>"O"</td> <td>document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&"</td> <td>document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P"</td> <td>document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>			"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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	"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)	"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	"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family	"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed									
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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																										
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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																										
"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)	"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																										
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family																										
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																												
Date of the actual completion of the international search 15 November 2002 (15.11.2002)		Date of mailing of the international search report 04 DEC 2002																											
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Tatiana D. Roberts for Vera Kiremova Telephone No. (703) 308-0196																											

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/28903

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/28903

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

Group I claim(s) 1-18, drawn to a first method of administration of red blood cells and hemoglobin solution.

Group II claim(s) 19-22 drawn to a second method of administration of red blood cells and hemoglobin solution.

Group III claim(s) 23-27 drawn to a third method of administration of red blood cells and hemoglobin solution.

Group IV, claim(s) 28-32, drawn to a composition comprising polymerized hemoglobin solution and stored red blood cells.

The inventions listed as Groups I-IV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Claims of the Groups I-IV are drawn to more than one of permissible combination of categories such as a product and a method of using said product. The method of Groups I, II and III encompass different sequences of administering therapeutical compositions and/or different protocols of administration of hemoglobin solution and red blood cells. The administration methods of Groups II and III as claimed require compositions comprising separate preparations of hemoglobin solution and red blood cells and, thus, the administration methods of Groups II and III are different from the Group I method which requires administration of a composition comprising both hemoglobin solution and red blood cell preparation as claimed.

Further, a composition comprising a mixture of polymerized hemoglobin and stored red blood cells and compositions comprising separate preparations of red blood cells and hemoglobin solutions are known in the prior art. For example: see abstract of Fig. 2 of the reference by Page et al. {Pages et al. "Oxygen transport by erythrocyte/hemoglobin solution mixtures in an in vitro capillary as a model of hemoglobin-based oxygen carrier performance". Microvascular Research. 55, 54-64 (1998)}. Therefore, the claimed composition does not avoid the prior art and, thus, the inventive link is broken.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

WEST USPT, DWPI, STN CAPLUS, MEDLINE

search terms: hemodilution, polymerized hemoglobin, stored red blood cells

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ジェイコブズ, エドワード, イー., ジュニア

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02420 レキシントン, メリアム ストリート 20

Fターム(参考) 4C087 AA01 AA02 DA10 DA17 DA28 MA02 MA16 MA66 NA04 ZA51