

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6038164号
(P6038164)

(45) 発行日 平成28年12月7日 (2016. 12. 7)

(24) 登録日 平成28年11月11日 (2016. 11. 11)

(51) Int. Cl. F I
A 6 1 K 38/17 (2006. 01)
A 6 1 P 7/04 (2006. 01)
A 6 1 K 9/06 (2006. 01)
A 6 1 K 47/42 (2006. 01)
A 6 1 K 38/48 (2006. 01)

F I
 A 6 1 K 37/12
 A 6 1 P 7/04
 A 6 1 K 9/06
 A 6 1 K 47/42
 A 6 1 K 37/547

請求項の数 16 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-537608 (P2014-537608)
 (86) (22) 出願日 平成24年10月25日 (2012. 10. 25)
 (65) 公表番号 特表2014-530889 (P2014-530889A)
 (43) 公表日 平成26年11月20日 (2014. 11. 20)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2012/071136
 (87) 国際公開番号 WO2013/060770
 (87) 国際公開日 平成25年5月2日 (2013. 5. 2)
 審査請求日 平成27年8月6日 (2015. 8. 6)
 (31) 優先権主張番号 61/552, 270
 (32) 優先日 平成23年10月27日 (2011. 10. 27)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 591013229
 バクスター・インターナショナル・インコ
 ーポレイテッド
 BAXTER INTERNATIONAL
 L INCORPORATED
 アメリカ合衆国 60015 イリノイ州
 、ディアフィールド、ワン・バクスター・
 パークウェイ (番地なし)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 止血組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

止血における使用に適した粒状形態の架橋ゼラチンを含む止血組成物であって、ここで該組成物は、15.0～19.5% (w/w) 架橋ゼラチンを含むペースト形態において存在し、該組成物は、押し出し増強剤を含み、該押し出し増強剤は、0.5～5.0% (w/w) の量のアルブミンである、止血組成物。

【請求項 2】

前記押し出し増強剤は、1.0～5.0% (w/w) の量のアルブミンである、請求項 1 に記載の止血組成物。

【請求項 3】

前記架橋ゼラチンは、グルタルアルデヒド架橋ゼラチンもしくはゲニピン架橋ゼラチンである、請求項 1 または 2 に記載の止血組成物。

【請求項 4】

前記架橋ゼラチンは、タイプ B ゼラチンである、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の止血組成物。

【請求項 5】

前記架橋ゼラチンは、顆粒状材料として存在する、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の止血組成物。

【請求項 6】

前記架橋ゼラチンは、100～1000 μm の粒子サイズを有する、請求項 1～5 のい

れか 1 項に記載の止血組成物。

【請求項 7】

前記組成物は、10 ~ 1000 I.U. トロンビン / ml のトロンビンを含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の止血組成物。

【請求項 8】

創傷、出血、損傷した組織、出血している組織および／もしくは骨欠損からなる群より選択される傷害の処置における使用のための、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の止血組成物。

【請求項 9】

創傷、出血、損傷した組織および／もしくは出血している組織からなる群より選択される傷害を処置するための、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の止血組成物であって、該組成物が傷害の部位に投与されることを特徴とする、組成物。

10

【請求項 10】

創傷、出血、損傷した組織および／もしくは出血している組織からなる群より選択される傷害の処置のための架橋ゼラチンの流動性ペーストを作成するためのキットであって、該キットは、

a) 15.0 ~ 19.5 % (w/w) 架橋ゼラチンを含む流動性ペーストに再構成されることになっている粒状形態にある架橋ゼラチンを含む乾燥止血組成物、および

b) 該止血組成物の再構成のための薬学的に受容可能な希釈剤、
を含み、

20

ここで該組成物もしくは該希釈剤のいずれかは、該再構成されたペーストにおいて 0.5 ~ 5.0 % (w/w) のアルブミン濃度をもたらし量において、アルブミンを含む、キット。

【請求項 11】

前記薬学的に受容可能な希釈剤は、バッファーもしくはバッファー系を pH 3.0 ~ 10.0 において含む、請求項 10 に記載のキット。

【請求項 12】

前記薬学的に受容可能な希釈剤は、10 ~ 1000 I.U. トロンビン / ml のトロンビンを含む、請求項 10 または 11 に記載のキット。

30

【請求項 13】

前記薬学的に受容可能な希釈剤は、NaCl、CaCl₂ および酢酸ナトリウムからなる群より選択される物質を含む、請求項 10 ~ 12 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の止血組成物のすぐに使用できる形態を提供するための方法であって、ここで該止血組成物は、第 1 のシリンジ中に提供され、再構成のための希釈剤は、第 2 のシリンジ中に提供され、該第 1 のシリンジと該第 2 のシリンジとは、互いに接続されており、該希釈剤は、該第 1 のシリンジの中に導かれて、該止血組成物の流動性形態を生じ；そして必要に応じて、該止血組成物の該流動性形態を該第 2 のシリンジへと少なくとも 1 回もどす、方法。

【請求項 15】

40

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の止血組成物であって、ここで該止血組成物は、第 1 のシリンジ中に提供され、再構成のための希釈剤は、第 2 のシリンジ中に提供され、該第 1 のシリンジと該第 2 のシリンジとは、互いに接続されており、該希釈剤は、該第 1 のシリンジの中に導かれて、該止血組成物の流動性形態を生じ；そして必要に応じて、該止血組成物の該流動性形態が該第 2 のシリンジへと少なくとも 1 回もどされる、止血組成物。

【請求項 16】

前記止血組成物の前記流動性形態は、50 % (w/w) より多くが 100 ~ 1000 μm のサイズである粒子を含む、請求項 14 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【 0 0 0 1 】

(発明の分野)

本発明は、止血組成物およびこのような組成物を作製するためのプロセスに関する。

【 背景技術 】

【 0 0 0 2 】

発明の背景

生体適合性であり、生分解性であり、乾燥した安定な顆粒状材料を含む乾燥した貯蔵安定形態にある止血組成物は、例えば、W O 9 8 / 0 0 8 5 5 0 A もしくは W O 2 0 0 3 / 0 0 7 8 4 5 A により公知である。これら製品は、止血のために当該分野で成功裏に適用されてきた。F l o s e a l (登 録 商 標) は、トロンビン含有溶液中で膨潤されて流動性ペーストを形成する顆粒状ゼラチンマトリクスからなる非常に有効な止血剤の例である。

10

【 0 0 0 3 】

このような製品は、ヒトに適用されなければならないので、品質、貯蔵安定性ならびに最終製品およびその成分の無菌性に関して最高の安全性基準を提供することが必要である。さらに、製造および取り扱い、可能な限り便利にかつ効率的に行われるべきである。

【 0 0 0 4 】

この分野における成功した製品 (上記で言及した F l o s e a l (登 録 商 標) 製品) は、再構成された凍結乾燥トロンビン溶液と組み合わせて使用されるゼラチンマトリクスを利用する。上記ゼラチンマトリクスは、ゼラチンおよびトロンビンの流動性の顆粒形態 (ゼラチン含有量は、約 1 1 ~ 1 4 . 5 %) として適用される。より低いゼラチン含有量は、上記製品を処置部位に保持しておくことが困難であることに起因して (特に、血流量が多い条件下では) 、性能が低下した流れやすい製品を生じる。より高いゼラチン粒子濃度は、より高い流動抵抗に起因して、通常の投与手段 (例えば、シリンジもしくはカテーテル) による送達が困難な製品をもたらす。上記組成物に可塑剤 (例えば、ポリエチレングリコール、ソルビトール、グリセロールなど) を含めることが示唆されており (E P 0 9 2 7 0 5 3 B 1) 、押し出し力を減少させ得るが、これら材料を含めることは、性能を必ずしも改善しない。

20

【 0 0 0 5 】

本発明の目的は、先行技術に従う F l o s e a l のようなゼラチン製品と比較して、改善された接着特性および止血特性を有する、架橋ゼラチンに基づく止血組成物およびこのような止血組成物を作製するための方法を提供することである。上記組成物はまた、便利かつ使用可能な様式において、すなわち、内視鏡手術および顕微手術において使用可能な流動性ペーストとして提供されるべきである。上記製品は、4 0 N 以下、好ましくは、3 5 N 未満、特に好ましくは、2 0 N 未満の押し出し力を有しなければならない。上記製品は、好ましくは、「使用準備のできた」止血組成物 (これは、再構成工程に何ら時間をかけずに、傷害に直接適用され得る) の便利な提供を可能にする製品形式において提供されるべきである。

30

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 6 】

40

【 特許文献 1 】 国際公開第 9 8 / 0 0 8 5 5 0 号

【 特許文献 2 】 国際公開第 2 0 0 3 / 0 0 7 8 4 5 号

【 発明の概要 】

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 7 】

(発明の要旨)

従って、本発明は、止血における使用に適した粒状形態にある架橋ゼラチンを含む止血組成物を提供し、ここで上記組成物は、1 5 . 0 ~ 1 9 . 5 % (w / w) 架橋ゼラチン、好ましくは、1 6 . 0 ~ 1 9 . 5 % (w / w) 、1 6 . 5 ~ 1 9 . 5 % (w / w) 、1 7 . 0 ~ 1 8 . 5 % (w / w) もしくは 1 7 . 5 ~ 1 8 . 5 % (w / w) 、より好ましく

50

は、16.5～19.0% (w/w) もしくは16.8～17.8% (w/w)、特に好ましくは、16.5～17.5% (w/w) を含むペースト形態において存在し、上記組成物は、押し出し増強剤、特に、アルブミンを含む。

【0008】

本発明はまた、創傷、出血、損傷した組織および/もしくは出血している組織からなる群より選択される傷害を処置するためのこの止血組成物の使用であって、このような止血組成物を投与することを含む使用、ならびにこのような止血組成物をこのような傷害の処置のためのものとするキットに関する。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目1)

止血における使用に適した粒状形態の架橋ゼラチンを含む止血組成物であって、ここで該組成物は、15.0～19.5% (w/w) 架橋ゼラチン、好ましくは、16.0～19.5% (w/w)、16.5～19.5% (w/w)、17.0～18.5% (w/w) もしくは17.5～18.5% (w/w)、より好ましくは、16.5～19.0% (w/w) もしくは16.8～17.8% (w/w)、特に好ましくは、16.5～17.5% (w/w) を含むペースト形態において存在し、該組成物は、押し出し増強剤を含む、止血組成物。

(項目2)

前記押し出し増強剤は、0.5～5.0% (w/w)、好ましくは、1.0～5.0% (w/w)、好ましくは、2.0～4.5% (w/w)、より好ましくは、1.5～5.0% (w/w)、特に好ましくは、約1.5% (w/w) の量のアルブミンである、項目1に記載の止血組成物。

(項目3)

前記架橋ゼラチンは、グルタルアルデヒド架橋ゼラチンもしくはゲニピン架橋ゼラチンである、項目1～2に記載の止血組成物。

(項目4)

前記架橋ゼラチンは、タイプBゼラチンである、項目1～3のいずれか1項に記載の止血組成物。

(項目5)

前記架橋ゼラチンは、顆粒状材料として存在する、項目1～4のいずれか1項に記載の止血組成物。

(項目6)

前記架橋ゼラチンは、100～1000 μm、好ましくは、200～800 μm、最も好ましくは、350～550 μmの粒子サイズを有する、項目1～5のいずれか1項に記載の止血組成物。

(項目7)

前記組成物は、トロンビン、好ましくは、10～1000 I.U. トロンビン/ml、特に、250～700 I.U. トロンビン/mlを含む、項目1～6のいずれか1項に記載の止血組成物。

(項目8)

創傷、出血、損傷した組織、出血している組織および/もしくは骨欠損からなる群より選択される傷害の処置における使用のための、項目1～7のいずれか1項に記載の止血組成物。

(項目9)

創傷、出血、損傷した組織および/もしくは出血している組織からなる群より選択される傷害を処置する方法であって、該方法は、項目1～7のいずれか1項に記載の止血組成物を傷害の部位に投与する工程を包含する、方法。

(項目10)

創傷、出血、損傷した組織および/もしくは出血している組織からなる群より選択される傷害の処置のための架橋ゼラチンの流動性ペーストを作成するためのキットであって、該

10

20

30

40

50

キットは、

a) 15.0 ~ 19.5 % (w/w) 架橋ゼラチン、好ましくは、16.0 ~ 19.5 % (w/w)、16.5 ~ 19.5 % (w/w)、17.0 ~ 18.5 % (w/w) もしくは 17.5 ~ 18.5 % (w/w)、より好ましくは、16.5 ~ 19.0 % (w/w) もしくは 16.8 ~ 17.8 % (w/w)、特に好ましくは、16.5 ~ 17.5 % (w/w) を含む流動性ペーストに再構成されることになっている粒状形態にある架橋ゼラチンを含む乾燥止血組成物、および

b) 該止血組成物の再構成のための薬学的に受容可能な希釈剤、
を含み、

ここで該組成物もしくは該希釈剤のいずれかは、該再構成されたペーストにおいて 0.5 ~ 5.0 % (w/w)、好ましくは、1.0 ~ 5.0 % (w/w)、好ましくは、2.0 ~ 4.5 % (w/w)、より好ましくは、1.5 ~ 5.0 % (w/w)、特に好ましくは、約 1.5 % (w/w) のアルブミン濃度をもたらす量において、アルブミンを含む、
キット。

10

(項目 11)

前記薬学的に受容可能な希釈剤は、バッファーもしくはバッファー系を好ましくは、pH 3.0 ~ 10.0 において含む、項目 10 に記載のキット。

(項目 12)

前記薬学的に受容可能な希釈剤は、トロンビン、好ましくは、10 ~ 1000 I.U. トロンビン/ml、特に、250 ~ 700 I.U. トロンビン/ml を含む、項目 10 または 11 に記載のキット。

20

(項目 13)

前記薬学的に受容可能な希釈剤は、NaCl、CaCl₂、および酢酸ナトリウムからなる群より選択される物質を含む、項目 10 ~ 12 のいずれか 1 項に記載のキット。

(項目 14)

項目 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の止血組成物のすぐに使用できる形態を提供するための方法であって、ここで該止血組成物は、第 1 のシリンジ中に提供され、再構成のための希釈剤は、第 2 のシリンジ中に提供され、該第 1 のシリンジと該第 2 のシリンジとは、互いに接続されており、流体は、該第 1 のシリンジの中に導かれて、該止血組成物の流動性形態を生じ；そして必要に応じて、該止血組成物の該流動性形態を該第 2 のシリンジへと少なくとも 1 回もどす、方法。

30

(項目 15)

前記止血組成物の前記流動性形態は、50 % (w/w) より多くが 100 ~ 1000 μm のサイズであり、好ましくは、80 % (w/w) より多くが 100 ~ 1000 μm のサイズである粒子を含む、項目 14 に記載の方法。

【発明を実施するための形態】

【0009】

(発明の具体的実施形態の説明)

本発明は、止血における使用に適した粒状形態にある架橋ゼラチンを含む止血組成物を提供し、ここで上記組成物は、15.0 ~ 19.5 % (w/w) 架橋ゼラチン (= 最終組成物の重量あたりの乾燥架橋ゼラチンの重量)、好ましくは、16.0 ~ 19.5 % (w/w)、16.5 ~ 19.5 % (w/w)、17.0 ~ 18.5 % (w/w) もしくは 17.5 ~ 18.5 % (w/w)、より好ましくは、16.5 ~ 19.0 % (w/w) もしくは 16.8 ~ 17.8 % (w/w)、特に好ましくは、16.5 ~ 17.5 % (w/w) を含むペースト形態において存在し、上記組成物は、押し出し増強剤を含む。

40

【0010】

押し出し増強剤 (例えば、適切な量のアルブミン) の提供が、より高いゼラチン濃度の使用を可能にすること、およびより高いゼラチン濃度の使用が、このような製品の止血特性を改善することは、本発明の過程から驚くべきことに見いだされた。これは、以前には示唆されなかった効果である。さらに、架橋ゼラチンのより高い濃度が、(先行技術にお

50

いて公知の結果（例えば、WO 2 0 0 8 / 0 7 6 4 0 7 A 2 の図 4 ）とは対照的に）より良好な接着特性を生じることが、驚くべきことであった。

【 0 0 1 1 】

本発明に従うペースト中のより高いゼラチン濃度に起因する好ましい特性を可能にするために、適切な量の押し出し増強剤を提供することが必要である。その量は、押し出し効果を得るために（すなわち、上記止血組成物が（例えば、顕微手術において）適用されるように、15～19.5% 架橋ゼラチンの量に対してすら流動性ペーストを可能にするために）十分高いものとされる；他方で、その量は、上記止血組成物の負の機能的特性（例えば、創傷への接着もしくは止血性能）を妨げる程度に低いものとする。例えば、上記押し出し増強剤がアルブミン（これは、具体的に好ましく、特にヒト血清アルブミンが好ましい）である場合、それは、0.5～5.0%（w/w）（＝最終組成物の重量あたりの押し出し増強剤の重量）、好ましくは、1.0～5.0%（w/w）、好ましくは、2.0～4.5%（w/w）、より好ましくは、1.5～5.0%（w/w）、特に好ましくは、約1.5%（w/w）の量において提供されなければならない。

10

【 0 0 1 2 】

本発明に従う押し出し増強剤の別の好ましいクラスは、リン脂質（例えば、ホスファチジルコリンおよびホスファチジルセリン）、またはレシチンもしくは大豆油のような複雑な混合物である。

【 0 0 1 3 】

別の好ましい実施形態において、本発明は、止血における使用に適した粒状形態にある架橋ゼラチンを含む止血組成物を提供し、ここで上記組成物は、16.0～19.5%（w/w）、好ましくは、16.5～19.5%（w/w）、17.0～18.5%（w/w）もしくは17.5～18.5%（w/w）、より好ましくは、16.5～19.0%（w/w）もしくは16.8～17.8%（w/w）、特に好ましくは、16.5～17.5%（w/w）を含むペースト形態において存在し、上記組成物は、押し出し増強剤を含む。好ましくは、上記押し出し増強剤は、ヒト血清アルブミンである。

20

【 0 0 1 4 】

別の好ましい実施形態において、本発明は、止血における使用に適した粒状形態にある架橋ゼラチンを含む止血組成物を提供し、ここで上記組成物は、15.0～19.5%（w/w） 架橋ゼラチン、好ましくは、16.0～19.5%（w/w）、16.5～19.5%（w/w）、17.0～18.5%（w/w）もしくは17.5～18.5%（w/w）、より好ましくは、16.5～19.0%（w/w）もしくは16.8～17.8%（w/w）、特に、16.5～17.5%（w/w）を含むペースト形態において存在し、上記組成物は、0.8%（w/w）より高い濃度、好ましくは、約3.3%（w/w）において押し出し増強剤を含む。好ましくは、上記押し出し増強剤は、例えば、上記で言及した濃度のヒト血清アルブミンである。

30

【 0 0 1 5 】

本発明に従う止血組成物（特に、押し出し増強剤としてアルブミンを使用するもの）は、より少ない量の架橋ゼラチン（13～14.5%）を使用する組成物を超える具体的利点を有する。特に、それらは、増強されたインビボ効力を有する。より高いゼラチン粒子濃度を有する処方物が、ヒト全血を使用するエキソビボ試験法および前臨床動物実験の両方において、より大きな止血性能を生じることが、本発明の過程の中で予測外に明らかになった。本発明に従う製品は、短縮した手術近置時間（surgical approximation time）および止血までのより速い時間を可能にする。

40

【 0 0 1 6 】

本発明に従う組成物は、40N以下、好ましくは、35N未満、特に好ましくは、20N未満の平均押し出し力（実施例1に記載される試験法を使用する）を有する。

【 0 0 1 7 】

本発明の好ましい実施形態によれば、上記止血組成物は、グルタルアルデヒド架橋ゼラチンもしくはゲニピン（（1R, 2R, 6S）-2-ヒドロキシ-9-（ヒドロキシメチ

50

ル) - 3 - オキサピシクロ[4.3.0]ノナ - 4, 8 - ジエン - 5 - カルボン酸メチル) 架橋ゼラチン、好ましくは、タイプBゼラチン、より好ましくは、獣の皮(hide)由来のタイプBゼラチンを含む。

【0018】

好ましくは、上記架橋ゼラチンは、顆粒状材料として存在する。

【0019】

本発明に従う止血組成物は、好ましくは、ゼラチンポリマー（これは、特に、タイプBゼラチンポリマーである）を含む。タイプBゼラチンは、止血剤における使用のために具体的に有利であることが証明された。なぜなら、塩基処理は、適切な特性のゼラチンを生成し、そしてウイルス感染症もしくは人畜共通感染症のリスクを軽減するにあたって非常に有効であるからである。具体的に好ましいゼラチン調製物は、若いウシの真皮を2N NaOHで約1時間にわたって室温において処理し、pH7~8へと中和し、70℃へと加熱することによって、調製され得る。次いで、上記真皮は、ゼラチンへと十分溶解される（溶液中で3~10%（w/w）、好ましくは、7~10%（w/w）ゼラチンで）。この溶液は、キャスト(cast)され得、乾燥され得、ゼラチンタイプB粉末を提供するために粉碎され得る。

10

【0020】

好ましくは、上記ゼラチンは、ブルーム強度200~400を有する（特に、ブルーム強度200~400を有するタイプBゼラチン）。ブルーム法(Bloom)は、ゼラチンの強度を測定するための試験である。上記試験は、プローブ（通常は、直径0.5インチである）がゲルの表面を、それを壊さずに4mmへこませる(deflect)のに必要とされる重量(g単位)を決定する。その結果は、ブルーム（等級(grade)）で表される。ゼラチンでブルーム試験を行うために、6.67%ゼラチン溶液を、試験する前に10℃において17~18時間にわたって保持する。

20

【0021】

本発明に従う止血組成物は、好ましくは、粒状形態にある架橋ゼラチンを、特に、顆粒状材料として含む。この顆粒状材料は、流体（すなわち、希釈剤）に曝されたときに迅速に膨潤し得、この膨潤した形態において、出血している部位に適用され得る流動性ペーストに寄与し得る。好ましい実施形態によれば、上記架橋ゼラチンは、乾燥架橋ゼラチンから提供される。この乾燥架橋ゼラチン粉末は、薬学的に受容可能な希釈剤と接触させられた場合に、迅速に再水和するように調製され得る。上記ゼラチン顆粒（特に、ゼラチン粉末の形態にある）は、好ましくは、W098/08550AおよびW02003/007845Aに記載されるように、比較的大きな粒子（断片もしくはサブユニットともいわれる）を含む。好ましい（メジアン）粒子サイズは、10~1,000μm、好ましくは、200~800μmの範囲であるが、この好ましい範囲外の粒子サイズは、多くの状況において使用が見いだされ得る。

30

【0022】

通常、上記ゼラチン粒子は、10~1000μm、好ましくは、50~700μm、200~700μm、300~550μm、特に好ましくは、350~550μm（メジアンサイズ）の平均粒子直径（「平均粒子直径」は、レーザー回折法によって測定される場合のメジアンサイズである；「メジアンサイズ」（もしくは質量メジアン粒子直径(mass median particle diameter)）は、度数分布を半分に分ける粒子直径である；所定の調製物の粒子のうちの50%がより大きな直径を有し、上記粒子のうちの50%がより小さな直径を有する）を有する。用語粉末および顆粒状（もしくは粒状化）が、材料の別個のクラスを区別するためにときおり使用されるものの、粉末は、顆粒状材料の特別なサブクラスとして本明細書で定義される。特に、粉末とは、より細かい粒サイズを有し、従って、流動時に塊を形成する傾向がより高い顆粒状材料をいう。顆粒は、湿っている場合を除いて、塊を形成する傾向がない、より粗い顆粒状材料を含む。

40

【0023】

50

止血における使用に適した粒状形態にある本発明の架橋ゼラチンは、寸法として等方性もしくは非等方性の形態を含み得る。例えば、本発明に従うキット中の架橋ゼラチンは、顆粒もしくは繊維であり得；不連続構造体において、例えば、粉末形態において存在し得る。

【0024】

上記乾燥ゼラチン組成物は、液体吸収性である。例えば、液体（例えば、水性の溶液もしくは懸濁物（特に、緩衝液もしくは血液）と接触した際に、上記架橋ゼラチンは、上記液体を取り込み、水和の程度に依存して、ある程度の膨潤度を示す。上記材料は、好ましくは、例えば、約50%～約500%、通常は、約50%～約250%の範囲のサブユニットの個々の粒子の直径もしくは幅における名目上の増加に対応する、重量で少なくとも400%、好ましくは、約500%～約2000%、特に、約500%～約1300%の水もしくは水性緩衝液を吸収する。例えば、上記（乾燥）顆粒状粒子が0.01mm～1.5mm、特に、0.05mm～1mmの好ましいサイズ範囲を有する場合、完全に水和した組成物（例えば、創傷に施した後もしくは水性緩衝溶液と接触させた後）は、0.05mm～3mm、特に、0.25mm～1.5mmのサイズ範囲を有し得る。

【0025】

上記乾燥組成物はまた、水性の再水和媒体（＝薬学的に受容可能な希釈剤（再構成媒体ともいわれる））に曝された場合、顕著な「平衡膨潤（equilibrium swelling）」を示す。好ましくは、上記膨潤は、その意図される使用に依存して、400%～1300%、好ましくは、400%～1000%、より好ましくは、500%～1100%、特に好ましくは、500%～900%の範囲にある。このような平衡膨潤は、例えば、（架橋されたポリマーに関して）架橋の程度（これは、続いて、架橋条件（例えば、架橋剤の曝露の持続時間、架橋剤の濃度、架橋温度など）を変化させることによって達成される）を変化させることによって、制御され得る。種々の平衡膨潤値を有する材料は、異なる適用において異なって機能する。架橋および平衡膨潤を制御する能力は、本発明の組成物が種々の使用のために最適化されることを可能にする。平衡膨潤に加えて、標的部位に送達する直前に上記材料の水和を制御することもまた、重要である。水和および平衡膨潤は、当然のことながら、密接に関連している。0%水和を有する材料は、非膨潤である。100%水和を有する材料は、その平衡含水量（equilibrium water content）にある。0%～100%の水和は、最小量と最大量との間での膨潤に対応する。「平衡膨潤」は、ゼラチンヒドロゲル粉末の乾燥重量を、完全に水和し、よって完全に膨潤したときのその重量から差し引くことによって決定され得る。次いで、その差を上記乾燥重量で除算し、100を乗算すると、膨潤の尺度が与えられる。上記乾燥重量は、上記材料を、上昇した温度に、実質的に全ての残留水分を除去するに十分な時間にわたって（例えば、120において2時間）曝した後に測定されるべきである。上記材料の平衡水和は、上記乾燥材料を薬学的に受容可能な希釈剤（例えば、食塩水）中に、上記水分含有量が一定になるのに十分な期間にわたって（代表的には、室温において18～24時間にわたって）浸漬することによって達成され得る。

【0026】

上記架橋ゼラチンは、フィルムとして提供され得、上記フィルムは、次いで、顆粒状材料を形成するために粉砕され得る。顆粒状材料に含まれる粒子の大部分（例えば、90% w/wより多い）は、好ましくは、10～1,000μm、好ましくは、50～700μm、200～700μm、300～550μm、特に好ましくは、350～550μmの粒子サイズを有する。

【0027】

好ましくは、上記止血組成物の流動性形態は、50%（w/w）より多くが100～1000μmのサイズを有し、好ましくは、80%（w/w）より多くが100～1000μmのサイズを有する、粒子を含む。

【0028】

架橋に適したゼラチン材料の例は、とりわけ、EP1803417B1の実施例1およ

10

20

30

40

50

び2、ならびにUS 6,066,325 AおよびUS 6,063,061 Aの実施例14に記載される。ゼラチンはまた、加工処理補助物質 (processing aid) (例えば、PVP、PEGおよび/もしくはデキストラン (再水和補助物質として)) とともに使用され得る。

【0029】

本発明の1つの特定の局面において、組成物は、20% (w/w) 以下の水分含有量を有する架橋ゼラチン粉末を含み、ここで上記粉末は、上記粉末が上記再水和補助物質なしで調製した類似粉末の再水和率より少なくとも5%高い水性再水和率を有するように、再水和補助物質の存在下で架橋された。上記「再水和率」は、EP 1803417 B1によれば、1グラム (乾燥重量ベース) の上記粉末によって30秒以内に吸収される水性溶液の量 (代表的には、0.9% (w/w) 食塩水の量) (g/gとして表される) を意味すると定義されている。上記再水和率は、上記架橋ゼラチンと食塩水溶液とを30秒間混合し、その湿ったゼラチンを減圧下でフィルター膜に置いて、その自由な水性溶液 (free aqueous solution) を除去することによって測定される。次いで、上記フィルター上に保持された湿ったゼラチンの重量を記録し、それを乾燥させ (例えば、120 °Cにおいて2時間)、次に、上記ゼラチンの乾燥重量を記録し、乾燥ゼラチン1gあたりで吸収された溶液の重量を計算する。

10

【0030】

本発明の好ましい組成物は、少なくとも3g/g、好ましくは、少なくとも3.5g/g、およびしばしば、3.75g/g以上の再水和率を有する。再水和補助物質なしで調製した類似粉末の再水和率は、代表的には、3未満であり、再水和率におけるパーセンテージの増加は、通常、少なくとも5%であり、好ましくは、少なくとも10%であり、より好ましくは、少なくとも25%以上である。

20

【0031】

架橋は、任意の適切な架橋剤で行われ得る (例えば、WO 98/08550 AおよびWO 2003/007845 Aに記載される、グルタルアルデヒドなど)。架橋はまた、非毒性架橋剤 (例えば、ゲニピンなど) で行われ得る。

【0032】

製造コストは、グルタルアルデヒド架橋ゼラチン製品より本発明に従うゲニピン架橋ゼラチン製品の方が低い。なぜなら、試薬、エネルギー、および時間コストがより低いからである。ゲニピン架橋ゼラチン反応は、中性pHにおいて室温で16時間以下にわたって水の中で行われ得る。上記製品は、エタノールおよび/もしくは水洗浄 (これは、より安価であるのみならず、より重要なことには、操作者にとっても安全である) によってきれいにされ得る。

30

【0033】

上記方法は、好ましくは、架橋工程の前に乾燥形態で存在するときのゼラチンに適用される。

【0034】

本発明に従う好ましいゲニピンタイプ架橋剤は、当然のことながら、ゲニピン ((1R, 2R, 6S) - 2 - ヒドロキシ - 9 - (ヒドロキシメチル) - 3 - オキサビシクロ[4.3.0]ノナ - 4, 8 - ジエン - 5 - カルボン酸メチル) である; しかし、イリドイドタイプもしくはセコイリドイドタイプの他の架橋剤もまた、使用され得る (例えば、オレウロペイン)。架橋のためのゲニピンの好ましい濃度は、0.5 ~ 20 mM、好ましくは、1 ~ 15 mM、特に、2 ~ 10 mMの範囲にある。

40

【0035】

本発明の好ましい実施形態によれば、上記ゲニピン架橋ゼラチンは、酸化剤 (例えば、漂白剤、tBu - ヒドロペルオキシドなど) でのクエンチ/酸化工程、好ましくは、過炭酸ナトリウム、次亜塩素酸ナトリウム、塩素水もしくは過酸化水素 (H₂O₂) での処置に供される。特に好ましいのは、過炭酸ナトリウムもしくはH₂O₂での処理であり、最も好ましいのは、過炭酸塩での処理である。

50

【0036】

好ましい H_2O_2 濃度は、0.5～20% (w/w)、特に、1～15% (w/w)、より好ましくは、約5% (w/w)である。特に好ましい実施形態において、上記ゲニピン濃度は、5～10mMであり、ゼラチンとゲニピンとの反応時間は、3～10時間、特に、6時間であり、上記 H_2O_2 濃度は、3～5% (w/w)であり、上記ゲニピン架橋ゼラチンと H_2O_2 との反応時間は、約20時間である。

【0037】

好ましい過炭酸塩濃度は、1～10% (w/w)、特に、1～5% (w/w)、より好ましくは、1～4% (w/w)である。特に好ましい実施形態において、上記ゲニピン濃度は、5～10mM (特に、約8nM)であり、ゼラチンとゲニピンとの反応時間は、3～10時間 (特に、約5時間)であり、上記過炭酸塩濃度は、1～10% (w/w)、特に好ましくは、1～4% w/wであり、上記ゲニピン架橋ゼラチンと過炭酸塩との反応時間は、1～20時間、好ましくは、1～5時間 (例えば、1時間、2時間もしくは3時間)である。

10

【0038】

クエンチはまた、抗酸化剤 (例えば、アスコルビン酸ナトリウム) の存在下で、もしくは反応環境の酸化電位を制御する (例えば、クエンチおよび/もしくはゲニピン反応を不活性雰囲気 (例えば、窒素もしくはアルゴン) 中で行う) ことによって、行われ得る。

【0039】

好ましい架橋反応条件としては、水性溶液中、好ましくは、リン酸緩衝化食塩水 (PBS) / エタノール緩衝液中、特に、pH 4～12、好ましくは、5.0～10.0、特に、6～8において、または脱イオン水中、もしくは0～50%の水混和性有機溶媒を含み得る他の水性緩衝液中での実行が挙げられる。PBS緩衝液は、生理学的pHのリン酸緩衝液中に生理学的量のNaClおよびKClを含む。PBS緩衝液の一例は、137mM NaCl、2.7mM KCl、10mM $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 、1.76mM KH_2PO_4 (pH=7.4)を含む。PBS緩衝液の別の例は、137mM NaCl、2.7mM KCl、4.3mM Na_2HPO_4 および1.4mM KH_2PO_4 (pH=7.5)からなる。

20

【0040】

上記反応はまた、最大50%までの水混和性有機溶媒および/もしくは加工処理補助物質 (例えば、PEG、PVP、マンニトール、過炭酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、アスコルビン酸ナトリウムなど) を含む水性緩衝液中で行われ得る。

30

【0041】

好ましくは、上記架橋工程は、4～45℃、好ましくは、15～45℃、特に、20～40℃の温度で行われる。

【0042】

上記架橋工程の後に、クエンチ工程が行われ得、特に、アミノ基含有クエンチャー (好ましくは、アミノ酸、特に、グリシン) を用いて行われ得る。上記クエンチャーを用いると、なお未反応のゲニピンタイプ架橋剤が (例えば、過剰の上記クエンチャーとの反応によって) 不活化されて、さらなる架橋が妨げられる。クエンチはまた、溶液のpHを8～14へと上昇させることによって、またはアミノ基、チオール基、もしくはヒドロキシル基を含む求核化合物、そしてまた、pH上昇と求核化合物の使用との組み合わせを使用することによって、行われ得る。本発明に従うゲニピン-ゼラチン架橋反応の後のクエンチ工程は、所望の物理的性能 (例えば、膨潤およびTEG (これらは、上記の止血活性の重要な決定因子であり、一般のゲニピン架橋単独を超える)) を付与するために積極的に指示され得る。

40

【0043】

上記架橋ゼラチンは、好ましくは、上記架橋工程の後に、好ましくは、メタノール、エタノールもしくは水によって、特に、脱イオン水によって洗浄される。別の好ましい洗浄工程は、最大50% (v/v) までの水混和性有機溶媒および/もしくは1種以上の加工

50

処理補助物質を含む水性緩衝液を適用する。

【0044】

好ましい実施形態によれば、上記架橋ゼラチンは乾燥される。このような乾燥状態において、上記止血組成物は、上昇した温度（例えば、20 より高い、30 より高いもしくはさらには40 より高い）においてすら長期間にわたって貯蔵安定性である。好ましい乾燥条件は、15%未満（w/w）、好ましくは、10%未満、より好ましくは、5%未満、特に、1%未満の水分含有量を有するように乾燥させた架橋された生体適合性ポリマーを含む。別の好ましい実施形態において、上記製品は、水和した状態もしくは湿潤状態（ここで、その水和している溶液は、生体適合性の緩衝液もしくは溶液であり得る）で供給され得る。Glu-Gel製品は、周りの組織によってカムフラージュされる傾向を有する。なぜなら、そのわずかに黄色い色は、周りの組織に溶け込むからである。このことは、所望の適用の視覚的評価を不確定にする。本発明に従うゲニピン架橋ゼラチン製品は、架橋反応条件の程度、ならびにその後の加工処理および仕上げ工程に基づいて、淡黄色から暗青色もしくは暗緑色の変色しやすい色を呈する。この色合わせができることおよび最終製品の色において所望の色を得られることは、創傷部位における適切な製品適用の視覚的しるしを医師に与えるという追加の利点を有する。なぜならこの色は、この製品によって潜在的にカムフラージュされるどころか、この製品を周りの組織から区別するからである。これは、本発明の別の新規な特徴である。他方で、上記色は、最終製品に関するニーズに依存して、非着色製品を得るために除かれ得る。

10

【0045】

好ましい実施形態において、ゲニピンタイプ架橋剤（例えば、ゲニピン）で架橋された上記生体適合性ポリマー（例えば、ゼラチン）は、（例えば、本願の実施例3において記載されるような蛍光測定によって）示され得るように、均質に（均一に）架橋されたポリマーである。特に好ましい実施形態において、生体適合性ポリマー（例えば、ゼラチン）は、粒状形態において、均質にゲニピン架橋された生体適合性ポリマー（例えば、ゼラチン）として存在する。

20

【0046】

賦形剤（例えば、滑沢剤（例えば、ヒアルロン酸））が存在する本発明に従う止血組成物が好ましい。

【0047】

本発明の別の実施形態において、賦形剤（例えば、滑沢剤（例えば、ヒアルロン酸））は、排除される。

30

【0048】

上記薬学的に受容可能な希釈剤は、好ましくは、水性溶液であり、NaCl、CaCl₂ および酢酸ナトリウムからなる群より選択される物質を含み得る。例えば、薬学的に受容可能な希釈剤は、注射用水、および（互いに無関係に）50~200mM NaCl（好ましくは、150mM）、10~80mM CaCl₂（好ましくは、40mM）および1~50mM 酢酸ナトリウム（好ましくは、20mM）を含む。別の実施形態において、上記薬学的に受容可能な希釈剤は、35g/l未満のマニトール（好ましくは、25g/l未満、より好ましくは、10g/l未満）を含み、特に好ましくは、上記薬学的に受容可能な希釈剤は、マニトールを本質的に含まない。

40

【0049】

好ましい実施形態によれば、上記薬学的に受容可能な希釈剤は、トロンビン、好ましくは、10~1000 IU、トロンビン/ml、特に、250~700 IU、トロンビン/mlを含む。好ましくは、この使用準備のできた形態にある止血組成物は、10~100,000国際単位（IU）、より好ましくは、100~10,000 IU、特に、500~5,000 IUの、トロンビンを含む。トロンビン（または任意の他の凝固誘導剤（例えば、へび毒、血小板活性化因子、トロンビンレセプター活性化ペプチドおよびフィブリノゲン沈澱因子）は、ヒトにおける使用に適した（すなわち、薬学的に受容可能な）任意のトロンビン調製物から誘導され得る。適切なトロンビン

50

供給源としては、ヒトおよびウシの血液、血漿もしくは血清（他の動物供給源のトロンピンは、有害な免疫反応が予測されなければ、適用され得る）、組換え起源のトロンピン（例えば、ヒト組換えトロンピン）が挙げられ、自己のヒトトロンピンは、いくつかの適用に関して好ましいものであり得る。

【0050】

上記薬学的に受容可能な希釈剤は、上記使用準備のできた組成物における所望の終濃度を達成するための量において使用される。上記トロンピン調製物は、他の有用な成分（例えば、イオン、緩衝液、賦形剤、安定化剤など）を含み得る。好ましくは、上記トロンピン調製物は、上記押し出し増強剤としてヒトアルブミンを含む。好ましい塩は、NaCl および/もしくはCaCl₂であり、ともに、トロンピンについて適用される通常の量および濃度（例えば、0.5～1.5% NaCl（例えば、0.9%）および/もしくは20～80mM CaCl₂（例えば、40mM））において使用される。

10

【0051】

さらなる実施形態において、上記希釈剤はまた、上記再構成される乾燥組成物のpHを（好ましくは、pH 3.0～10.0、より好ましくは、6.4～7.5、特に、pH 6.9～7.1において）緩衝化するように、バッファーもしくはバッファー系を含み得る。

【0052】

架橋ゼラチン、希釈剤および押し出し増強剤の適切な量の確立は、上述の必要条件に従うキットにおいて行われ得る：例えば、a) 0.736～0.995gの乾燥架橋ゼラチン（最終製品において15.0～19.5%（w/w）に相当）を有するバイアルが提供され得、そしてb) 60～240mgのアルブミン、および必要に応じて、500 I.U./mlの濃度のトロンピンおよび/もしくは40mM CaCl₂を有する4ml希釈剤が入った第2のバイアル。あるいは、アルブミンは、凍結乾燥形態において、上記キットの乾燥ゼラチン成分a)に添加され得る。例えば、a) 0.573～0.775gのその乾燥架橋ゼラチン（最終製品において15.0～19.5%（w/w）に相当）を有するバイアルについては、48～192mgのアルブミンが提供され得、そしてb) 3.2ml 希釈剤、および必要に応じて、500 I.U./mlの濃度のトロンピンおよび/もしくは40mM CaCl₂を有する第2のバイアル。

20

【0053】

本発明に従うキットの架橋ゼラチン成分は、好ましくは、上記架橋ゼラチンが乾燥形態において存在する乾燥組成物として提供される。

30

【0054】

本発明に従う実質的に乾燥した架橋ゼラチン組成物は、匹敵する入手可能な製品（例えば、FloSeal（登録商標）（FloSealは、例えば、乾燥製品として約8～12%の水分を有する）の水分含有量にほぼ相当し得る残留水分含有量を有する。

【0055】

本発明に従うキットにおける止血における使用に適した粒状形態にある乾燥架橋ゼラチンは、好ましくは、乾燥形態にあるゼラチンであり、特にここで、上記粉末粒子は、10～1000μm、好ましくは、50～700μm、200～700μm、300～550μm、特に好ましくは、350～550μmのメジアン粒子サイズを有する。本発明に従う「架橋ゼラチンの乾燥顆粒状調製物」は、原則として、例えば、WO98/08550Aにより公知である。好ましくは、上記架橋ゼラチンは、生体適合性で、生分解性の乾燥し、安定な顆粒状材料である。

40

【0056】

別の局面によれば、本発明は、創傷、出血、損傷した組織、出血している組織および/もしくは骨欠損からなる群より選択される傷害の処置における使用のための、本発明に従う止血組成物に関する。

【0057】

本発明の別の局面は、本発明に従う止血組成物を傷害部位に投与する工程を包含する、

50

創傷、出血、損傷した組織および／もしくは出血している組織からなる群より選択される傷害を処置する方法である。

【 0 0 5 8 】

別の局面によれば、本発明はまた、本発明に従う止血組成物を、患者の身体における標的部位に送達するための方法を提供し、上記方法は、本発明に従うプロセスによって生成された止血組成物を、上記標的部位に送達する工程を包含する。上記乾燥組成物もまた、上記標的部位に直接適用され得る（および必要に応じて、必要であれば、上記標的部位において希釈剤と接触させられ得る）ものの、ペースト形態にある本発明に従う止血組成物を得るように、上記乾燥止血組成物と薬学的に受容可能な希釈剤とを上記標的部位に投与する前に接触させることが好ましい。

10

【 0 0 5 9 】

このような方法において、創傷、出血、損傷した組織および／もしくは出血している組織からなる群より選択される傷害の処置のために架橋ゼラチンの流動性ペーストを作製するためのキットが適用され得、このキットは、以下：

a) 15.0 ~ 19.5 % (w/w) 架橋ゼラチン (= 最終組成物の重量に対する乾燥ゼラチンの重量)、好ましくは、16.0 ~ 19.5 % (w/w)、16.5 ~ 19.5 % (w/w)、17.0 ~ 18.5 % (w/w) もしくは 17.5 ~ 18.5 % (w/w)、より好ましくは、16.5 ~ 19.0 % (w/w) もしくは 16.8 ~ 17.8 % (w/w)、特に好ましくは、16.5 ~ 17.5 % (w/w) の架橋ゼラチンを含む流動性ペーストへと再構成されることになっている、粒状形態にある架橋ゼラチンを含む乾燥止血組成物、ならびに

20

b) 上記止血組成物の再構成のための薬学的に受容可能な希釈剤を含み、

ここで上記組成物もしくは上記希釈剤のいずれかは、適切な量、例えば、(アルブミンに関しては) 0.5 ~ 5.0 % (w/w) (= 最終組成物の重量あたりの押し出し増強剤の重量)、好ましくは、1.0 ~ 5.0 % (w/w)、好ましくは、2.0 ~ 4.5 % (w/w)、より好ましくは、1.5 ~ 5.0 % (w/w)、特に好ましくは、約 1.5 % (w/w) の再構成ペーストにおけるアルブミン濃度をもたらず量において、押し出し増強剤、特に、アルブミンを含む。

【 0 0 6 0 】

30

このようなキットの好ましいさらなる成分は、(上記止血組成物が乾燥形態で含まれる場合には特に) 上記止血組成物の再構成のための希釈剤 (= 再水和媒体) である。上記キットのさらなる構成要素は、シリンジ、カテーテル、ブラシなどのような投与手段(上記組成物が投与手段の中に既に提供されていない場合)または医療的(外科的)実務における使用に必要な他の構成要素(例えば、代替りの針もしくはカテーテル、余分のバイアルもしくはさらなる創傷被覆手段)であり得る。好ましくは、本発明に従うキットは、上記乾燥しかつ安定な止血組成物を収容するシリンジおよび上記希釈剤を含む(または上記希釈剤を別の希釈剤容器から取り込むために提供される)シリンジを含む。

【 0 0 6 1 】

好ましい実施形態において、上記薬学的に受容可能な希釈剤は、別個の容器中に提供される。これは、好ましくは、シリンジであり得る。次いで、上記シリンジ中の希釈剤は、本発明に従う乾燥止血組成物の再構成のための最終容器に容易に適用され得る。上記最終容器もシリンジである場合、両方のシリンジが、バックの中に一緒に完成され得る。従って、本発明に従う乾燥止血組成物をシリンジ(上記シリンジは、上記乾燥しかつ安定な止血組成物を再構成するための薬学的に受容可能な希釈剤を有する希釈剤シリンジとともに完成される)の中に提供することは、好ましい。

40

【 0 0 6 2 】

好ましい実施形態によれば、上記最終容器は、滅菌照射に曝される前に上記ポリマーの改変を阻害するために有効な安定化剤(好ましくは、アスコルビン酸、アスコルビン酸ナトリウム、アスコルビン酸の他の塩)、または抗酸化剤のある量をさらに含む。

50

【 0 0 6 3 】

このような薬学的に受容可能な希釈剤を用いると、本発明の止血組成物の使用準備のできた形態が提供され得、これは、次いで、上記患者に直接適用され得る。よって、本発明に従う止血組成物の使用準備のできた形態を提供するための方法もまた提供され、ここで上記止血組成物は、第1のシリンジ中に提供され、再構成のための希釈剤は、第2のシリンジ中に提供され、上記第1のシリンジと第2のシリンジとは互いに接続されており、流体は、上記止血組成物の流動性形態を生じるために上記第1のシリンジの中にもたらされる；そして必要に応じて、上記止血組成物の流動性形態は、上記第2のシリンジへと少なくとも1回戻される。好ましくは、上記使用準備のできた調製物は、ヒドロゲルとして提示されるかもしくは提供される。この種の製品は、原則として、さらに異なる形式において当該分野で公知である。従って、本発明に従う止血組成物の使用準備のできた形態を提供するための方法（ここで上記止血組成物は、第1のシリンジ中に提供され、再構成のための希釈剤は、第2のシリンジ中に提供され、上記第1のシリンジと上記第2のシリンジとは互いに接続されており、上記希釈剤は、上記止血組成物の流動性形態を生じるために上記第1のシリンジの中にもたらされる；そして必要に応じて、上記止血組成物の流動性形態は、上記第2のシリンジへと少なくとも1回戻される）は、本発明の好ましい実施形態である。このプロセス（「噴出」（swooshing）ともいわれる）は、本発明に従う組成物の適切な使用準備のできた形態を提供する。この形態は、短時間内でも、例えば、手術の間の緊急事態において、容易にかつ効率的に作製され得る。このような方法によって提供される上記止血組成物のこの流動性形態は、創傷、出血、損傷した組織、出血している組織および／もしくは骨欠損からなる群より選択される傷害の処置における使用に特に適している。

10

20

【 0 0 6 4 】

安定性が理由で、このような製品（ならびに本発明に従う製品）は、通常、最終容器中で乾燥形態において提供され、薬学的に受容可能な希釈剤（＝再水和媒体）の添加を必要として、使用直前に上記使用準備のできた形態（これは、通常、（ヒドロ）ゲル、懸濁物もしくは溶液の形態にある）にされる。

【 0 0 6 5 】

別の局面によれば、本発明は、本発明に従う止血組成物の使用準備のできた形態を提供するための方法に関し、ここで上記止血組成物は、第1のシリンジ中に提供され、再構成のための希釈剤は、第2のシリンジ中に提供され、上記第1のシリンジと上記第2のシリンジとは互いに接続されており、流体は、上記止血組成物の流動性形態を生じるために上記第1のシリンジの中にもたらされ；そして必要に応じて、上記止血組成物の流動性形態は、上記第2のシリンジへと少なくとも1回戻される。

30

【 0 0 6 6 】

好ましくは、本発明に従う止血組成物の流動性形態は、サイズが $100 \sim 1000 \mu\text{m}$ の $50\% (w/w)$ より多くの粒子、好ましくは、サイズが $100 \sim 1000 \mu\text{m}$ の $80\% (w/w)$ より多くの粒子を含む。

【 0 0 6 7 】

本発明に従う生体適合性止血架橋ポリマーは、（創傷に一旦適用されると）血流のバリアを形成し得る効率的なマトリクスを形成する。具体的には、上記止血ポリマーの膨潤特性は、上記ポリマーを出血および再出血プロセスに対する有効な機械的バリアにし得る。

40

【 0 0 6 8 】

本発明の組成物は、本発明の組成物の接着特性をさらに増強する親水性ポリマー成分（「反応性親水性成分」もしくは「親水性（ポリマー）架橋剤」ともいわれる）をさらに含み得る。本発明に従う止血組成物のこの親水性ポリマー成分は、上記止血組成物が患者に（例えば、患者の創傷に、もしくは上記患者が止血活性の必要な状態にある別の場所に）一旦適用されると、その反応性基と反応し得る親水性架橋剤として作用する。従って、上記親水性ポリマー成分の反応性基が、上記患者に適用されるときに反応性であることは、本発明にとって重要である。従って、本発明に従う止血組成物が一旦創傷に適用された後

50

に反応すべき上記ポリマー成分の反応性基が、製造プロセスの間に保持されるように、本発明に従う止血組成物を製造することは、必要である。

【0069】

反応性基が加水分解可能である親水性ポリマー架橋剤に関しては、水もしくは水性液体との早まった接触は、上記患者への上記止血組成物の投与の前に、特に、製造の間には、防止されなければならない。しかし、製造の間の上記親水性ポリマー成分の加工処理は、上記反応性基の反応が阻害される条件においては（例えば、低pHにおいては）、水性媒体中でも可能であり得る。上記親水性ポリマー成分が溶融され得る場合、上記溶融される親水性ポリマー成分は、架橋ゼラチンのマトリクス上にスプレーされ得るかもしくはプリントされ得る。上記親水性ポリマー成分の乾燥形態（例えば、粉末）と、上記架橋ゼラチンの乾燥形態とを混合することもまた、可能である。必要であれば、次に、上記架橋ゼラチンに上記まき散らされた親水性ポリマー成分を溶融して、上記止血組成物の恒久的な被覆を達成するために、温度の上昇が適用され得る。あるいは、これら親水性ポリマー成分は、不活性有機溶媒（上記親水性ポリマー成分の反応性基に対して不活性）の中へと取り込まれ得、上記架橋ゼラチンのマトリクス上へともたらされる。このような有機溶媒の例は、無水エタノール、無水アセトンもしくは無水ジクロロメタン（これらは、例えば、親水性ポリマー成分（例えば、NHS-エステル置換されたPEG）に関して不活性である）である。あるいは、求核性基もまた、付加され得る（例えば、PEG-SH）。

10

【0070】

好ましい実施形態において、上記親水性ポリマー成分は、単一の親水性ポリマー成分であり、ポリアルキレンオキシドポリマー、好ましくは、PEG含有ポリマーである。この反応性ポリマーの反応性基は、好ましくは、求電子性基である。

20

【0071】

上記反応性親水性成分は、多求電子性（multi-electrophilic）ポリアルキレンオキシドポリマー（例えば、多求電子性PEG）であり得る。上記反応性親水性成分は、2個以上の求電子性基を含み得る（好ましくは、スクシンイミジルエステル（-CON(COCH₂)₂）、アルデヒド（-CHO）およびイソシアネート（-N=C=O）から選択される2個以上の反応性基を含むPEG、例えば、WO2008/016983 A（その全体において本明細書中に参考として援用される）に開示されるとおりの成分）。

30

【0072】

本発明に従う親水性ポリマー架橋剤の好ましい求電子性基は、タンパク質のアミノ基、カルボキシ基、チオール基およびヒドロキシ基、またはこれらの混合物に反応性の基である。

【0073】

好ましいアミノ基特異的反応性基は、カルボジイミド、イソシアネート、もしくはTHPP（-[トリス（ヒドロキシメチル）ホスフィノ]プロピオン酸）の存在下でのNHSエステル基、イミドエステル基、アルデヒド基、カルボキシ基であり、特に好ましいのは、ペンタエリスリトールポリ（エチレングリコール）エーテルテトラスクシンイミジルグルタレート（=ペンタエリスリトールテトラキス[1-1'-オキソ-5'-スクシンイミジルペンタノエート-2-ポリ-オキソエチレングリコール]エーテル（=MW 10,000を有するNHS-PEG）である。

40

【0074】

好ましいカルボキシ基特異的反応性基は、カルボジイミドの存在下でのアミノ基である。

【0075】

好ましいチオール基特異的反応性基は、マレイミドもしくはハロアセチルである。

【0076】

好ましいヒドロキシ基特異的反応性基は、イソシアネート基である。

【0077】

50

上記親水性架橋剤の反応性基は、同一（ホモ官能性）であってもよいし、異なって（ヘテロ官能性）いてもよい。上記親水性ポリマー成分は、2個の反応性基（ホモ二官能性もしくはヘテロ二官能性）またはより多く（ホモ/ヘテロ三官能性またはそれより多く）を有し得る。

【0078】

具体的実施形態において、上記材料は、合成ポリマー（好ましくは、PEGを含む）である。上記ポリマーは、架橋および組織への接着に適した活性側鎖を含むPEGの誘導体であり得る。

【0079】

上記反応性基によって、上記親水性反応性ポリマーは、血液タンパク質および同様に組織表面タンパク質を架橋する能力を有する。上記架橋ゼラチンへの架橋もまた、可能である。

10

【0080】

上記多求電子性ポリアルキレンオキシドは、2個以上のスクシンイミジル基を含み得る。上記多求電子性ポリアルキレンオキシドは、2個以上のマレイミジル基を含み得る。

【0081】

好ましくは、上記多求電子性ポリアルキレンオキシドは、ポリエチレングリコールもしくはその誘導体である。

【0082】

最も好ましい実施形態において、上記親水性ポリマー成分は、ペンタエリスリトールポリ（エチレングリコール）エーテルテトラスクシンイミジルグルタレート（ $=\text{COH102}$ 、同様に、ペンタエリスリトールテトラキス[1-1'-オキソ-5'-スクシンイミジルペンタノエート-2-ポリ-オキソエチレングリコール]エーテル）である。

20

【0083】

上記親水性ポリマー成分は、親水性架橋剤である。好ましい実施形態によれば、この架橋剤は、架橋するための2個より多くの反応性基（「アーム」）、例えば、架橋のための反応性基を有する、3個、4個、5個、6個、7個、8個、もしくはより多くのアームを有する。例えば、 NHS-PEG-NHS は、本発明に従う有効な親水性架橋剤である。しかし、いくつかの実施形態に関しては、4アームのポリマー（例えば、4アーム-p-NP-PEG）は、より好ましい可能性がある；同じ理論的解釈に基づけば、8アームのポリマー（例えば、8アーム-NHS-PEG）は、多反応性架橋が有益である実施形態に関してより好ましい可能性がさらにある。さらに、上記親水性架橋剤は、ポリマー（すなわち、共有結合的化学結合によって代表的には繋がれている反復構造単位からなる大きな分子（高分子））である。上記親水性ポリマー成分は、少なくとも1000Daの分子量（本発明に従う止血組成物において架橋剤として適切に働くように）を有するべきである；好ましくは、本発明に従う架橋ポリマーは、少なくとも5000Da、特に、少なくとも8000Daの分子量を有する。

30

【0084】

いくつかの親水性架橋剤については、（例えば、投与部位における）塩基性の反応条件の存在は、機能的性能のために（例えば、上記投与部位におけるより素早い架橋反応のために）好ましいかもしくは必要である。例えば、炭酸イオンもしくは炭酸水素イオン（例えば、7.6以上、好ましくは、8.0以上、特に、8.3以上のpHを有する緩衝液として）は、本発明に従う止血組成物の改善された性能を可能にするように、または止血および/もしくは創傷接着材料としての効率的な使用を可能にするように、上記投与部位において（例えば、緩衝溶液として、またはこのような緩衝液に浸漬させたファブリックもしくはパッドとして）さらに提供され得る。

40

【0085】

本発明に従う組成物中の上記親水性ポリマー成分（これは、言及されるように、架橋剤として作用する）の反応性は、上記組成物中で保持される。このことは、上記架橋剤の反応性基が、上記止血組成物と未だ反応しておらず、水によって加水分解されていない（ま

50

たは少なくとも本発明の組成物の止血機能性に対して負の結果を有する有意な量にない)ことを意味する。これは、上記架橋剤の反応性基と、上記止血ポリマーもしくは水との反応をもたらさない方法において、架橋ゼラチンと上記親水性架橋剤とを合わせることによって達成され得る。通常、これは、水性条件(もしくは湿潤)、特に、(架橋剤が酸性条件下で反応性でなければ)酸性条件の存在なしの湿潤の削除を含む。このことは、反応性止血材料の提供を可能にする。

【0086】

本発明に従う止血組成物における親水性ポリマー成分に対する上記架橋ゼラチンの好ましい比は、0.1~50%(w/w)、好ましくは、5~40%(w/w)である。

【0087】

さらなる成分は、本発明に従う止血組成物中に存在し得る。好ましい実施形態によれば、本発明に従う止血組成物は、抗線維素溶解剤、凝血促進剤、血小板活性化因子、抗生物質、血管収縮薬、色素、増殖因子、骨形態形成タンパク質および鎮痛剤からなる群より選択される物質をさらに含み得る。

【0088】

本発明はまた、本発明に従う止血組成物を含む、完成した(finished)最終容器に言及する。この完成した容器は、本発明に従う止血組成物を、無菌の、貯蔵安定な、かつ売買可能な形態において含む。上記最終容器は、薬学的に投与可能な化合物を収容するために(および貯蔵するために)適した任意の容器であり得る。シリンジ、バイアル、チューブなどが使用され得る;しかし、本発明に従う止血組成物をシリンジ中に提供することが、特に好ましい。シリンジは、医療実務におけるシリンジの取り扱い上の利点から、先行技術において開示されるとおりの止血組成物のための好ましい投与手段でもあった。そういうことから、上記組成物は、好ましくは、上記シリンジの特定の針を介して、もしくは適切なカテーテルを介して、(再構成後に)適用され得る。上記再構成された止血組成物(これは、好ましくは、ヒドロゲルを形成するように再構成される)はまた、種々の他の手段によって、例えば、スパチュラ、ブラシ、スプレーによって、または加圧によって手動で、あるいは任意の他の従来技術によって適用され得る。上記再構成された止血組成物を内視鏡(腹腔鏡)手段によって患者に投与することは、具体的に好ましい。通常、本発明に従う再構成された止血組成物は、上記再構成された組成物をオリフィス、開口部、針、チューブ、もしくは他の経路を通して押し出して材料のビーズ、層、もしくは類似の部分形成し得るシリンジもしくは類似のアプリーケーターを使用して、適用される。上記組成物の機械的破壊は、上記シリンジもしくは他のアプリーケーターにおけるオリフィス(代表的には、0.01mm~5.0mm、好ましくは、0.5mm~2.5mmの範囲にあるサイズを有する)を通した押し出しによって、行われ得る。しかし、好ましくは、上記止血組成物は、所望の粒子サイズを有する乾燥形態から最初に調製される(これは、(特に、水和によって)再構成されると、必須のサイズのサブユニット(例えば、ヒドロゲルサブユニット)を生じる)か、または最終押し出しもしくは他の適用工程の前に、部分的もしくは全体的に、必須のサイズへと機械的に破壊する。これら機械的構成要素が、ヒト使用のための安全性要件を満たすために(内部も外部も)無菌形態において提供されなければならないことは、当然のことながら明らかである。

【0089】

本発明に従う止血組成物は、好ましくは、40N以下(例えば、30Nより低いもしくは20Nより低い、好ましくは、15~30Nの範囲)の押し出し力で、実施例1に記載されるように、容器から患者へとそのペースト状の形態において適用される。

【0090】

本発明に別の局面は、本発明に従う止血組成物を接触させる工程を包含する、使用準備のできた止血組成物を提供するための方法に関する。

【0091】

本発明は、以下の実施例および図面においてさらに記載されるが、本発明は、それらに限定されない。

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0092】

【図1】図1は、17.5% (w/w) 架橋ゼラチンと上記トロンビン成分中の種々の濃度のヒト血清アルブミンを含むグルタルアルデヒド架橋ゼラチンペーストの平均押し出し力 (35 mmの距離において計算される、圧縮速度 250 mm/分において上記シリンジから製品を押し出すために必要とされる押し出し力；全製品は、30分間にわたって室温においてインキュベートされ、押し出し力測定の直前に迅速に噴出する)を示す。x軸は、上記トロンビン成分中のヒト血清アルブミン濃度を[g/l]で示す。y軸は、平均押し出し力を[N]で示す。

【図2】図2は、ヒト血清アルブミンの濃度に依存した、17.5% (w/w) 架橋ゼラチンを含む架橋ゼラチンペーストの粘稠度を示す。

【図3】図3は、17.5% (w/w) ゼラチンと上記トロンビン成分中の種々の濃度のヒト血清アルブミンを含むゲニピン架橋ゼラチンペーストの平均押し出し力を示す。x軸は、上記トロンビン成分中のヒト血清アルブミン濃度を[g/l]で示す。y軸は、平均押し出し力を[N]で示す。

【図4】図4は、試験物品適用後の出血重篤度の評価および近似を示す。

【図5】図5～8は、異なる調製物のブタ肝臓パンチ生検モデルにおける止血効力を示す。x軸は、適用後の時間を[秒]で示す。y軸は、止血の成功 (図5において「出血なし」、ならびに図6において「出血なし」もしくは「にじんでいる」と定義される)の%を示す。図5および図6において、記号は以下を意味する：———上記トロンビン溶液中に50 g/l ヒト血清アルブミンを有するグルタルアルデヒド架橋ゼラチン (n=8)。-----上記トロンビン溶液中に75 g/l ヒト血清アルブミンを有するグルタルアルデヒド架橋ゼラチン (n=8)。図7および8において、記号は以下を意味する：———約17.5% (w/w) グルタルアルデヒド架橋ゼラチン。-----約14.5% (w/w) グルタルアルデヒド架橋ゼラチン。・・・・・・約17.5% (w/w) グルタルアルデヒド架橋ゼラチン+トロンビン溶液中2.5% PEG10.000。

【図6】図5～8は、異なる調製物のブタ肝臓パンチ生検モデルにおける止血効力を示す。x軸は、適用後の時間を[秒]で示す。y軸は、止血の成功 (図5において「出血なし」、ならびに図6において「出血なし」もしくは「にじんでいる」と定義される)の%を示す。図5および図6において、記号は以下を意味する：———上記トロンビン溶液中に50 g/l ヒト血清アルブミンを有するグルタルアルデヒド架橋ゼラチン (n=8)。-----上記トロンビン溶液中に75 g/l ヒト血清アルブミンを有するグルタルアルデヒド架橋ゼラチン (n=8)。図7および8において、記号は以下を意味する：———約17.5% (w/w) グルタルアルデヒド架橋ゼラチン。-----約14.5% (w/w) グルタルアルデヒド架橋ゼラチン。・・・・・・約17.5% (w/w) グルタルアルデヒド架橋ゼラチン+トロンビン溶液中2.5% PEG10.000。

【図7】図5～8は、異なる調製物のブタ肝臓パンチ生検モデルにおける止血効力を示す。x軸は、適用後の時間を[秒]で示す。y軸は、止血の成功 (図5において「出血なし」、ならびに図6において「出血なし」もしくは「にじんでいる」と定義される)の%を示す。図5および図6において、記号は以下を意味する：———上記トロンビン溶液中に50 g/l ヒト血清アルブミンを有するグルタルアルデヒド架橋ゼラチン (n=8)。-----上記トロンビン溶液中に75 g/l ヒト血清アルブミンを有するグルタルアルデヒド架橋ゼラチン (n=8)。図7および8において、記号は以下を意味する：———約17.5% (w/w) グルタルアルデヒド架橋ゼラチン。-----約14.5% (w/w) グルタルアルデヒド架橋ゼラチン。・・・・・・約17.5% (w/w) グルタルアルデヒド架橋ゼラチン+トロンビン溶液中2.5% PEG10.000。

【図8】図5～8は、異なる調製物のブタ肝臓パンチ生検モデルにおける止血効力を示す

。x 軸は、適用後の時間を[秒]で示す。y 軸は、止血の成功(図5において「出血なし」、ならびに図6において「出血なし」もしくは「にじんでいる」と定義される)の%を示す。図5および図6において、記号は以下を意味する：———上記トロンビン溶液中に50g/l ヒト血清アルブミンを有するグルタルアルデヒド架橋ゼラチン(n=8)。-----上記トロンビン溶液中に75g/l ヒト血清アルブミンを有するグルタルアルデヒド架橋ゼラチン(n=8)。図7および8において、記号は以下を意味する：———約17.5%(w/w) グルタルアルデヒド架橋ゼラチン。-----約14.5%(w/w) グルタルアルデヒド架橋ゼラチン。・・・・・・約17.5%(w/w) グルタルアルデヒド架橋ゼラチン+トロンビン溶液中2.5% PEG10.000。

10

【実施例】

【0093】

実施例1：押し出し力(EF)の決定：

【0094】

横梁速度(cross-beam speed) 250mm/分において作動する100N荷重セルを備えたInstronモデル5544機械式テスターを使用して、上記製品をシリンジから押し出すために必要とされる押し出し力を測定した。必要な押し出し力は、上記製品のほぼ全てを上記シリンジから押し出すためにシリンジプランジャーが動く距離に相当する完全な横梁移動(displacement)(34mmのへこみ(deflection))の間に測定した。これら力から、平均押し出し力を以下のように計算した：

20

【数1】

総エネルギー(mJ) = 平均力(N)

最大へこみ(mm)

【0095】

この試験のためのサンプルを、以下のように調製した：オスルアーロックシステム(アダプターが取り付けられる内側のノズル管腔直径は、2.54mmの寸法である)付き5ml標準シリンジ(内径12.2mmを有する円筒形本体を有する)を、上記固体サンプルの0.704g乾燥重量(約12%という残留水分を考慮に入れて、約0.8g)で満たす。40mM 塩化カルシウム中に500IU/ml トロンビンおよび0mg/ml、5mg/ml、15mg/ml、25mg/ml、50mg/mlもしくは75mg/mlのいずれかのヒト血清アルブミンを含むトロンビン溶液3.2mlを希釈液として使用した。上記希釈液および上記固体成分を、上記希釈液を保持するシリンジ(メスルアーロックシステム付きの標準5mlシリンジ)および上記乾燥成分を保持するシリンジを繋ぎ、上記内容物を少なくとも10回出し入れする(この混合技術は、「噴出」といわれる)ことによって混合した。その後、上記サンプルを、測定前に、30分間にわたって室温においてインキュベートした。インキュベーション後、各サンプルを2回「再噴出」し、上記製品を保持するシリンジ(上記のように乾燥成分を予め保持したシリンジ)を、可撓性アプリケーション(メスルアーコネクターシステム、2本のワイヤを保持し、全長141.5mmを有するチューブ内径2.29mm)に繋いだ。上記シリンジを上記アプリケーションへと組み立て、Instron設定へと配置し、試験を開始した。

30

40

【0096】

上記シリンジおよび上記アプリケーションは、Flo Seal Hemostatic Matrix製品の部品としてBaxterから市販されている。

【0097】

Flo Sealにおいての場合のグルタルアルデヒド架橋ゼラチンの結果を図1に示し、以下に記載される場合のゲニピン架橋ゼラチンの結果を図3に示し、対応する表1および表2としてもまた示す。

【0098】

50

アルブミンの濃度に依存した 17.5% (w/w) 架橋ゼラチンを含む架橋ゼラチンペーストの粘稠度を、図 2 に示す (0 g/l、25 g/l、50 g/l および 75 g/l のヒト血清アルブミンを上記トロンピン成分中に提供した)。

【0099】

【表 1】

表 1:

トロンピン成分中の c(アルブミン) [g/l]	押し出し力[N]	標準偏差
0	40	2.4
5	38	1.5
15	30	2.6
25	25	2.2
50	19	1.5
60	19	1.0

10

【0100】

【表 2】

表 2:

トロンピン成分中の c(アルブミン) g/l	押し出し力[N]	標準偏差
0	54	1.9
15	29	3.6
50	17	2.2

20

【0101】

ゲニピン架橋ゼラチンの調製:

【0102】

ウシ由来コラーゲンを、アルカリ処理を介して加工処理し、その後、脱イオン処理水 (deionized process water) (DIW) ですすいで、残留する塩を除去した。ゼラチンを加熱処理によって抽出し、シート状に乾燥させた。上記シートを粉砕して粉末にし、この粉末は、ゲニピンを架橋剤として使用して加工処理されることになっていた。

30

【0103】

1 kg のゼラチン顆粒を、DIW 中の 10 mM ゲニピン溶液 20 l に添加した。上記反応を、中性 pH (7.2) において、ジャケット付き温度制御タンクの中で、23 で行った。混合を 6 時間にわたって行い、メッシュ内に上記固体を保持して上記溶液を排出し、DIW で徹底的にすすいで、残っているゲニピンを洗い流した。上記材料を、5% H₂O₂ 溶液中で 20 時間にわたって再懸濁した。上記材料を DIW で徹底的にすすいで、H₂O₂ を除去した。上記固体を、減圧下で、フィルターペーパー上で予備乾燥させ、次いで、2.5 日間にわたってオープン乾燥させた。上記乾燥マトリクスを粉砕して粉末にし、個々のプラスチックシリンジへと満たし、その後、ガンマ線照射した。

40

【0104】

実施例 2: 止血効率の決定

【0105】

材料および方法:

動物モデル

このモデルに関して、正中線開腹を行い、続いて、外科的切開からの出血を止めるために電気焼灼を行う。肝臓を露出させ、葉を単離する。10 mm 直径のパンチ生検を使用して、コア組織を取り出した一連の 2 つの非全層損傷 (non-full thickness

50

ss lesion) (深さ約5mm)を作る。10秒間にわたって各損傷からの流れ出た血液を予め秤量したガーゼで集めることを含め、予備処置評価をこの損傷に対して行う。

【0106】

試験物品を無作為化し、サンプル処置に対して盲検化した外科医に提示する。約1.0mlの割り当てられた試験物品を、損傷に局所的に適用する。食塩水で湿らせたガーゼを使用して、上記試験物品を彼らの指定された損傷に近置する一助とし、タイマーをスタートさせる。上記食塩水で湿らせた近置ガーゼを、30秒後に除去する。

【0107】

出血の程度を、図3における描写のように、上記試験物品を彼らの指定された損傷に適用した30秒、60秒、90秒、120秒、300秒、および600秒後に評価する(出血スコア:0:出血なし(製品は血液で飽和された);1:にじみ出ている(製品から血液が出ているが、血液の滴りはない);2:非常に軽度(上記製品上に血液の滴);3:軽度(血液の滴が流れ落ちている);4:中程度(少量の血液が流れ落ちている);5:重度(多量の血液が流れ落ちている))。 10

【0108】

血液で飽和されているが、活発な出血がない製品を、「0」(ゼロ)としてスコア付ける。食塩水を使用して、300秒の評価後に上記病変から過剰な試験物品を洗浄する。上記手順を反復し、複数の肝葉において行う。1人の外科医が作り、処置し、観察評価を行う。 20

【0109】

試験物品合成

ブタ肝臓モデルにおけるインビボ評価のための試験物品を、架橋ゼラチン(25g/lもしくは50g/lのヒト血清アルブミンをトロンビン溶液(さらなる2.5%PEGありもしくはなし)中に有する14.5%および17.5%の濃度において)のペーストを調製することによって作製した。

【0110】

結果を図5~8に示す。これら図は、17.5%ゼラチンでの改善された性能および可塑剤(PEG)の存在下で有効性が低いことを示す。

【0111】

実施例3:

【0112】

ゼラチンサンプルを、2つの重要な例外(a couple key exceptions)を含めて、FloSealのパッケージ挿入物に従って処方した。第1に、塩化ナトリウムを塩化カルシウムの代わりに使用し、上記ゼラチンを、100%の代わりに125%固体において処方した。上記ゼラチン/トロンビン処方物を、25分間にわたって静置し、次いで、この調製物のうちの1mlを廃棄した。材料のうちの他方の1mlを、局所的止血システム(THS)に適用した。上記THS装置を、乏血小板血漿(platelet poor plasma)で予めプライミング(prime)した。 40

【0113】

上記THSは、出血している創傷を模倣するように設計された装置である。上記人工創傷は、シリコン基材中の円筒形の孔である。上記シリコン円筒の表面を、フィブリノゲンの層で被覆した。シリンジポンプは凝固液(全血、血漿など)(この場合は、乏血小板血漿)を排出した一方で、背圧(back pressure)を記録した。この実験において、上記血漿は、固定速度0.25ml/分において、上記円筒形創傷の底面中心にある小さな孔を通して流した。過剰な血漿を、止血マトリクスを適用する直前に、ガーゼで吸い取らせた。血漿が流れ続けた場合、1mlの上記止血マトリクスを上記円筒形創傷に適用した。これを、湿ったガーゼで直ぐに覆い、固定圧をかけた。30秒後に重しを外したところ、血漿は8~10分間にわたって流れ続けたが、この時点でその流れは止まり、血餅が湿潤チャンバの脇で凝固し、それはそこで2時間より長くにわたってとどまっ 50

ていた。上記2時間の終わりに、上記血餅を8のビブラトームの上に置き、ここで約500 μm 厚のスラブを、上記血餅から切り出した。これら切片を、PBS緩衝液へと浸漬した。上記スラブを、使用しないときは5 冷蔵庫の中で貯蔵した。上記スラブをカバースリップの上に置き、NIS - Elements Advanced Research v3.22.00 Build 710ソフトウェアを走らせたNikon A1R共焦点顕微鏡で画像化した。顕微鏡写真を集めるために、平面蛍光10 \times 対物レンズを、488nmのレーザー励起光および500~550nmの集光ウインドウとともに使用した。透過光画像を、透過光検出器を使用して同時に集めた。これら画像化パラメーターを用いて、上記ソフトウェアによって行われる自動化スティッチング(stitching)を使用して、サンプルの巨視的マップを作った。上記サンプルのより小さな領域もまた、光学スライス厚5.125 μm で画像の3D zスタックを集めることによって特徴付けた。複合共焦点マップを使用して、表面に位置し、切片にされたゼラチン顆粒を同定した。これは、原子間力顕微鏡(AFM)における弾性測定の位置決めに重要であった。上記血餅スラブを、Veeco Multimode AFMに載せた。そのマルチモードに、Nanoscope VコントローラーおよびJ V圧電式スキャナーを備え付けた。その力の測定を、4.5 μm ポリスチレンスフェアを支持するNovascan AFMカンチレバーで行った。上記カンチレバーの力の定数は、熱的同調法(thermal tune method)によって0.779 N/mであると決定された。上記カンチレバーを、上記ゼラチン顆粒の中心の上に配置し、次いで、16 \times 16アレイの力測定を行った。各力曲線は、上記ポリスチレンスフェアと触れて上記ゼラチン顆粒を前進させること、および上記カンチレバーのへこみが予め設定したトリガー値(trigger value) 2ボルトに達するまで(この時点で、上記ゼラチンを、上記トリガー位置から1.00ミクロンの距離に引っ込めた)、上記顆粒を前進させ続けることを含んだ。

【0114】

考察

上記蛍光データは、グルタルアルデヒド架橋ゼラチンが均質に架橋されていないことを示す。代わりに、架橋密度は、上記顆粒の縁部周辺でより高いようであり、上記顆粒の中心部は、上記縁部より架橋が顕著に少ない。対照的に、上記ゲニピン架橋ゼラチンは、顆粒全体を通じて均一に(均質に)架橋されたようである。蛍光強度に対する実質的エッジ効果はない。上記ゲニピン架橋物質およびグルタルアルデヒド架橋材料の蛍光強度は、架橋剤自体に帰する潜在的蛍光差が原因で、直接比較できない。しかし、上記AFMで測定した弾性率測定値は、上記ゲニピン架橋ゼラチンが上記グルタルアルデヒド架橋ゼラチンより硬いことを示す。上記グルタルアルデヒド架橋ゼラチンは、より軟らかい(より可撓性)ようである。

【図 1】

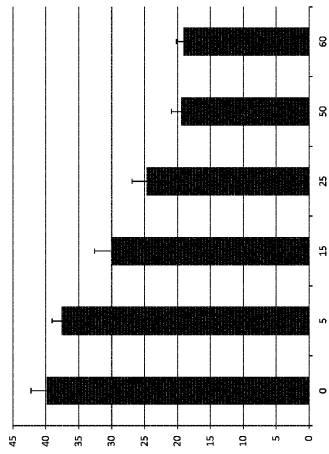


Fig. 1

【図 2】

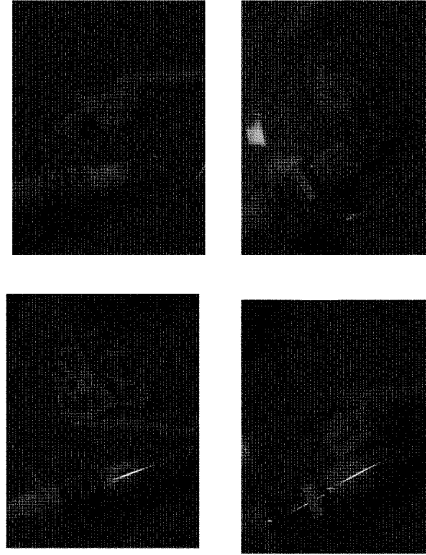


Fig. 2

【図 3】

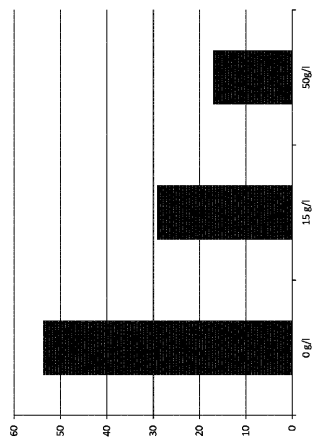


Fig. 3

【図 5】

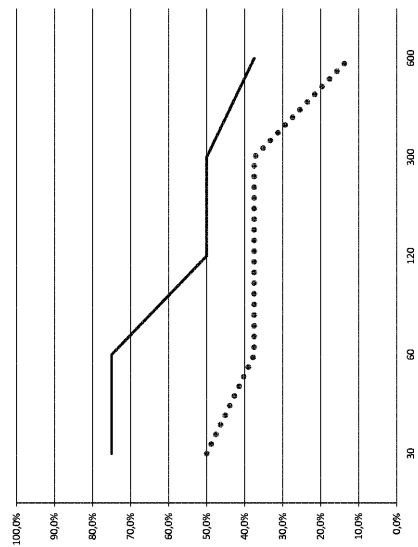


Fig. 5

【図 6】

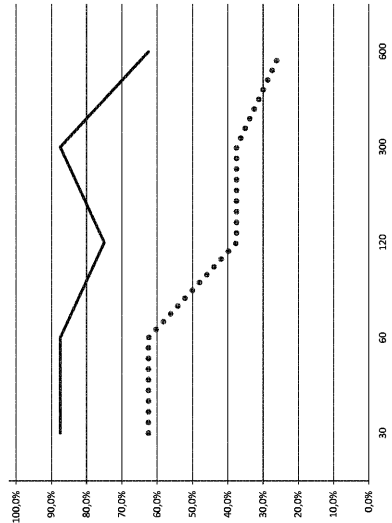


Fig. 6

【図 7】

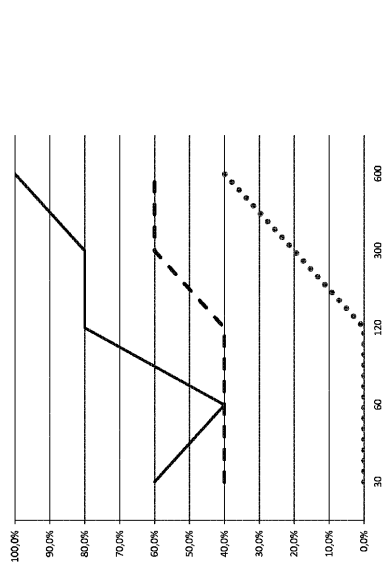


Fig. 7

【図 8】

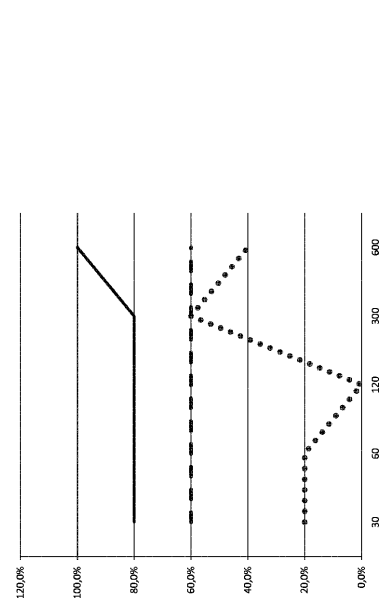


Fig. 8

【図 4】

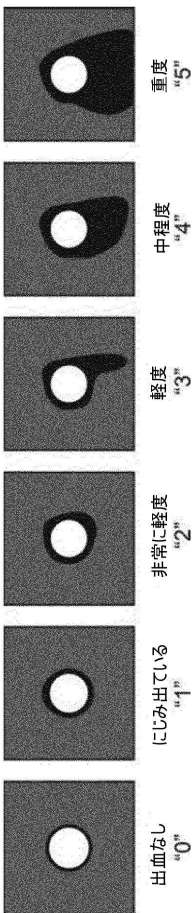


Fig. 4

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P 17/02	(2006.01)	A 6 1 P 17/02
A 6 1 K 47/12	(2006.01)	A 6 1 K 47/12
A 6 1 K 47/02	(2006.01)	A 6 1 K 47/02

(73)特許権者 501453189

バクスター・ヘルスケア・ソシエテ・アノニム

Baxter Healthcare SA

スイス国 8152 グラットパーク (オブフィコン), サーガウアーシュトラッセ 130

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 マッコイ, ジル

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94087, サニーベール, サンダーバード アベニュー
1380

(72)発明者 ドワイヤー, ジョセフ エフ.

アメリカ合衆国 イリノイ 60030, グレイズレイク, リッチフィールド コート 21
1

(72)発明者 ヤン, ジビン

アメリカ合衆国 イリノイ 60089, バッファロー グローブ, ジョーダン テラス 2
111

審査官 高橋 樹理

(56)参考文献 特表2007-501784(JP,A)

特表2007-501785(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 38/17

A 6 1 K 9/06

A 6 1 K 38/48

A 6 1 K 47/02

A 6 1 K 47/12

A 6 1 K 47/42

A 6 1 P 7/04

A 6 1 P 17/02