

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5868592号  
(P5868592)

(45) 発行日 平成28年2月24日 (2016. 2. 24)

(24) 登録日 平成28年1月15日 (2016. 1. 15)

(51) Int. Cl.	F I	
A 6 1 K 38/00 (2006. 01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 9/06 (2006. 01)	A 6 1 K 9/06	
A 6 1 K 9/08 (2006. 01)	A 6 1 K 9/08	
A 6 1 K 9/14 (2006. 01)	A 6 1 K 9/14	
A 6 1 K 9/70 (2006. 01)	A 6 1 K 9/70	4 0 1
請求項の数 33 (全 33 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2010-504088 (P2010-504088)	(73) 特許権者	507189574
(86) (22) 出願日	平成20年4月17日 (2008. 4. 17)		ウェイク・フォレスト・ユニヴァーシティ
(65) 公表番号	特表2010-524943 (P2010-524943A)		・ヘルス・サイエンス
(43) 公表日	平成22年7月22日 (2010. 7. 22)		アメリカ合衆国ノースカロライナ州271
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/004984		01, ウィンストン-セイラム, テクノロ
(87) 国際公開番号	W02008/130607		ジー・ウェイ 391, スウィート 19
(87) 国際公開日	平成20年10月30日 (2008. 10. 30)	(74) 代理人	100099623
審査請求日	平成23年4月12日 (2011. 4. 12)		弁理士 奥山 尚一
審査番号	不服2013-23088 (P2013-23088/J1)	(74) 代理人	100096769
審査請求日	平成25年11月26日 (2013. 11. 26)		弁理士 有原 幸一
(31) 優先権主張番号	60/912, 265	(74) 代理人	100107319
(32) 優先日	平成19年4月17日 (2007. 4. 17)		弁理士 松島 鉄男
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100114591
			弁理士 河村 英文
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 ケラチンバイオマテリアルを含有する創傷治癒組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

創傷の治療法を実施するためのヒドロゲル含有組成物であって、前記ヒドロゲルが、ケラトースを含み、

前記ケラトースは、少なくとも80質量%の塩基性 ケラトースまたは酸性 ケラトースを含み、前記塩基性または酸性 ケラトースは平均分子量が30kDa~200kDaである、組成物。

【請求項 2】

前記ヒドロゲルが、ケラトースから本質的になる請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記ヒドロゲルが、ケラチンをさらに含む請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記組成物が、鎮痛薬、抗菌剤、および付加的な創傷治癒剤からなる群から選択される少なくとも1種類の付加的な有効成分をさらに含む請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記組成物が、前記ケラトースを含むヒドロゲルおよび付加的な有効成分から本質的になり、前記付加的な有効成分が抗菌剤である請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 6】

前記付加的な有効成分が、バシトラシン、硫酸ポリミキシン B、ネオマイシン、硫酸ポリミキシン B およびバシトラシンの混合物、ネオマイシン、バシトラシンおよび硫酸ポリ

ミキシシンBの混合物、ポビドンヨード、スルファジアジン銀、酢酸マフェニド、ナイスタチン、ニトロフラゾンならびにゲンタマイシンからなる群から選択される抗菌剤である請求項4または5に記載の組成物。

【請求項7】

前記創傷が、熱傷、擦過傷、裂傷、切開、褥瘡、穿刺創、貫通創、銃創および圧挫損傷からなる群から選択される請求項1～6のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項8】

前記ヒドロゲルが、ケラトースから本質的になる請求項2に記載の組成物。

【請求項9】

前記ヒドロゲルが、酸性ケラトースから本質的になる請求項8に記載の組成物。

10

【請求項10】

前記ヒドロゲルが、塩基性ケラトースから本質的になる請求項8に記載の組成物。

【請求項11】

前記ケラトースが、ヒドロゲルとして再構成するために粉末形態で、水性担体中に提供される請求項1～10のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項12】

前記組成物が、軟膏またはクリームとして提供される請求項1～10のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項13】

前記組成物が、局所適用される請求項1～12のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項14】

前記ヒドロゲルが、前記組成物を前記被験体の体内に注射することにより適用される請求項1～12のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項15】

前記組成物が、創傷変化を阻害するため、創傷閉鎖を促進するため、または創傷変化を阻害し、かつ創傷閉鎖を促進するために有効な量で、前記創傷に適用される請求項1～14のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項16】

前記創傷が、熱傷創である請求項15に記載の組成物。

【請求項17】

前記酸性ケラトースが、酸性および塩基性ケラトースを含む混合物をイオン交換クロマトグラフィーにより分画するプロセスによって製造される請求項9に記載の組成物。

30

【請求項18】

固体の、生理学的に許容される支持体と、  
前記支持体上のケラチン誘導体を含む組成物を含み、  
前記ケラチン誘導体が、少なくとも80重量%の酸性ケラトースであり、前記ケラトースの平均分子量が30kDa～200kDaである外科用または救急医療用補助具。

【請求項19】

前記支持体が、スポンジ、パッキング、創傷被覆材、縫合糸、織物、および補綴材からなる群から選択される請求項18に記載の外科用または救急医療用補助具。

40

【請求項20】

前記外科用または救急医療用補助具が滅菌され、かつ、前記外科用または救急医療用補助具が、滅菌容器に包装されている請求項18または19に記載の外科用または救急医療用補助具。

【請求項21】

前記ケラチン誘導体が、少なくとも80重量%の酸性ケラトースである請求項18～20のいずれか一項に記載の外科用または救急医療用補助具。

【請求項22】

前記ケラチン誘導体が、酸性ケラトースから本質的になる請求項21に記載の外科用または救急医療用補助具。

50

## 【請求項 23】

前記酸性 ケラトースが、酸性および塩基性 ケラトースを含む混合物をイオン交換クロマトグラフィーにより分画するプロセスによって製造される請求項 22 記載の外科用または救急医療用補助具。

## 【請求項 24】

a) ケラチン誘導体を含む、創傷の治療法を実施するための組成物、および

b) 容器

を含むキットであって、前記容器の中に前記ケラチン誘導体が滅菌形態で包装され、前記ケラチン誘導体が、少なくとも 80 重量%の酸性 ケラトースであり、前記ケラトースの平均分子量が 10 kDa ~ 200 kDa であるキット。

10

## 【請求項 25】

前記ケラチン誘導体が、水和形態または脱水形態で提供される請求項 24 に記載のキット。

## 【請求項 26】

前記容器が箔容器を含む請求項 24 または 25 に記載のキット。

## 【請求項 27】

前記容器が真空包装されている請求項 24 ~ 26 のいずれか一項に記載のキット。

## 【請求項 28】

前記ケラチン誘導体が単一の単位用量を含む請求項 24 ~ 27 のいずれか一項に記載のキット。

20

## 【請求項 29】

前記ケラチン誘導体が、0.5 ~ 200 グラムの脱水ケラトースを含む請求項 24 ~ 28 のいずれか一項に記載のキット。

## 【請求項 30】

前記ケラチン誘導体が、0.5 ~ 200 ミリリットルの水和ケラトースを含む請求項 24 ~ 28 のいずれか一項に記載のキット。

## 【請求項 31】

生理学的に許容される支持体をさらに含む請求項 24 ~ 30 のいずれか一項に記載のキット。

## 【請求項 32】

前記支持体が滅菌され、かつ前記支持体が前記容器に滅菌形態で包装されている請求項 31 に記載のキット。

30

## 【請求項 33】

前記支持体が、スポンジ、パッキング、創傷被覆材、縫合糸、織物、および補綴材からなる群から選択される請求項 31 または 32 に記載のキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

## [関連出願]

本出願は、2007年4月17日出願の米国特許仮出願第60/912,265号に対する優先権を主張する。その開示は、参照によりその全文が本明細書に組み込まれる。

40

## 【0002】

## [政府支援]

本発明は、米国陸軍の契約番号W81XWH-04-1-0105のもと、政府支援を受けて行われた。米国政府は本発明に一定の権利を有する。

## 【0003】

## [発明の分野]

本発明は、ケラチンバイオマテリアルおよび生物医学的用途におけるその使用に関する

。

## 【背景技術】

50

## 【0004】

ケラチンを医学で使用することを記した最古の文書は、李時珍 (Li Shi-Zhen) という名の中国人植物学者による (本草綱目 (Ben Cao Gang Mu)。本草学 (Materia Medica)、李時珍 (Li Shi-Zhen) (1518 - 1593) 著による中国の薬草の辞典)。38年間の間、李は本草綱目として知られる一群の800冊の書物を執筆した。これらの書物は彼の死から3年後の1596年に出版された。これらの巻に記載された11,000を超える処方の中には、血余炭 (Xue Yu Tan) として公知であり、Crinis Carbonisatusとしても公知の、熱分解した人毛の灰を粉碎したもものからなる物質がある。血余炭 (Xue Yu Tan) について述べられた適応は、創傷治癒および血液凝固の促進であった。

10

## 【0005】

タンパク質がまだアルブミノイドと呼ばれていた1800年代初頭 (アルブミンはその当時よく知られたタンパク質であった)、多くの異なる種類のタンパク質が発見された。1849年ごろ、動物の角および蹄などの硬組織を構成する物質を記述するために、文献に「ケラチン」という語が出現した (ケラチンは、角を意味するギリシャ語「kera」に由来する)。この新しいタンパク質は、他のタンパク質のように挙動しないので、科学者たちの興味をそそった。例えば、タンパク質を溶解するために用いられる通常の方法がケラチンには効かなかった。燃焼および粉碎などの方法がしばらくの間知られていたが、多くの科学者および発明者たちは、より良い製品を作るために毛および角を溶解することに、より大きな関心をもった。

20

## 【0006】

1905年から1935年までの数年間に、酸化および還元化学を用いてケラチンを抽出する多数の方法が開発された (Breinl F and Baudisch O, Z physiol Chem 1907; 52: 158 - 69; Neuberg C, 米国特許第926,999号、1909年7月6日; Lissizin T, Biochem Bull 1915; 4: 18 - 23; Zdenko S, Z physiol Chem 1924; 136: 160 - 72; Lissizin T, Z physiol Chem 1928; 173: 309 - 11)。1920年代後期までに、毛、角および蹄の構造を分解するための多くの技術が開発されたが、科学者は、これらの精製タンパク質の一部の挙動に困惑した。程なく、科学者たちは、多くの異なる形態のケラチンがこれらの抽出物中に存在すること、および、毛髪繊維は単純なタンパク質鎖でなく複雑な構造であるに違いない、という結論に達した。1934年、主として異なる分子量を有することにより区別された、異なる種類のケラチンを記載した重要な研究論文が発表された (Goddard DR and Michaelis L, J Biol Chem 1934; 106: 605 - 14)。この将来性のある論文は、多くの異なるケラチン同族体が存在すること、および、それぞれが毛包の構造および機能において異なる役割を果たすことを示した。

30

## 【0007】

英国のリーズ大学および羊毛工業研究所 (Wool Industries Research Association) での以前の研究は、羊毛およびその他の繊維が、外側のキューティクルと中心の皮質で構成されていることを示した。この情報に基づいて、CSIROの科学者らは、羊毛の構造および組成に関する最も基本的な研究の多くを行った。酸化および還元化学法と併せて、X線回折および電子顕微鏡法を用いて、CSIROは、毛髪繊維の最初の完全な図を作成した (Rivett, D.E. et al., 「Keratin and Wool Research», The Lennox Legacy, CSIRO Publishing; Collingwood, VIC, Australia; 1996)。

40

## 【0008】

1965年、CSIROの科学者W. Gordon Crewtherとその同僚は、ケラチンの化学に関する決定的な文章を発表した (Crewther WG et al

50

., The Chemistry of Keratins. Anfinsen C. B. Jr. et al., editors. Advances in Protein Chemistry 1965. Academic Press. New York: 191-346)。 「Advances in Protein Chemistry」中のこのチャプターには、640を超える公表されたケラチンに関する研究への参照が含まれていた。科学者たちが、毛髪繊維からケラチンを抽出し、それらを精製および特性付けする方法を知るやいなや、ケラチンを用いて製造するこのできる派生材料の数は、指数関数的に増大した。1970年からの10年の間に、世界中で抽出ケラチンを粉末、フィルム、ゲル、コーティング、繊維および泡沫にする方法が、いくつかの研究グループにより開発および発表された(Anker CA, 米国特許第3,642,498号, 1972年2月15日; Kawano Y and Okamoto S, Kagaku To Seibutsu 1975; 13(5): 291-223; Okamoto S, Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi 1977; 24(1): 40-50)。これらの方法はすべて、数十年前に開発された酸化および還元化学を利用していた。

10

#### 【0009】

1982年、日本の科学者が、血液凝固を排除する方法として移植血管へのケラチンコーティングの使用を説明する最初の研究(Noishiki Y. et al., Kobunshi Ronbunshu 1982; 39(4): 221-7)、ならびにケラチンの生体適合性に関する実験(Ito H. et al., Kobunshi Ronbunshu 1982; 39(4): 249-56)を発表した。その後間もなく、1985年に、英国出身の2名の研究者が、新しいバイオマテリアル開発のための構成単位としてケラチンを使用する見通しを考察する総説を発表した(Jarman T and Light J, World Biotech Rep 1985; 1: 505-12)。1992年、ケラチンに基づくバイオマテリアルの宿主の開発および試験が、フランス人学士Isabelle Valherieの博士論文の主題であった(Valherie I and Gagnieu C. 「Chemical modifications of keratins: Preparation of biomaterials and study of their physical, physicochemical and biological properties」。 Doctoral thesis. Inst Natl Sci Appl Lyon, France 1992)。その後間もなく、日本の科学者らは、バイオマテリアル開発の最前線でケラチンがとり得る卓越した位置に関する解説書を1993年に発表した(様々な執筆者, Kogyo Zairyo 1993; 41(15) Special issue 2: 106-9)。

20

30

#### 【0010】

これらを総合すると、前述の発表された研究の内容は、ケラチンの特有の化学的、物理的および生物学的特性を例証するものである。しかし、特に創傷の治療のための、生物医学的用途での使用のために最適なケラチン調製品は、依然として大きな必要性がある。

#### 【発明の概要】

40

#### 【0011】

本発明の態様は、ケラチン誘導体(例えば、ケラトース、ケラテイン、またはそれらの組合せ)および所望により少なくとも1種類の付加的な有効成分(例えば、鎮痛薬、抗菌剤、付加的な創傷治療剤など)を含む医薬組成物である。

#### 【0012】

本発明のもう一つの態様は、ケラチン誘導体を、創傷を治療するために有効な量で創傷に適用することを含む、治療を必要とする被験体において創傷(例えば、熱傷、擦過傷、裂傷、切開、褥瘡、穿刺創、貫通創、銃創、圧挫損傷など)を治療するための方法である。一部の実施形態では、該正に帯電した組成物は、ケラトース、ケラテイン、またはそれらの組合せを含むか、それらからなるか、またはそれらから本質的になる。

50

## 【0013】

一部の実施形態では、ケラチン誘導体は、ケラトース、ケラトース、酸性ケラトース、塩基性ケラトース、酸性ケラトース、塩基性ケラトース、ケラテイン、ケラテイン、酸性ケラテイン、塩基性ケラテイン、酸性ケラテイン、塩基性ケラテイン、またはその組合せを含むか、それらからなるか、またはそれらから本質的になる。

## 【0014】

一部の実施形態では、ケラチン誘導体は、創傷変化(wound conversion)を阻害するため、創傷閉鎖を促進するため、またはその両方のために効果的な量で創傷に適用される。一部の実施形態では、ケラチン誘導体は局所適用される。一部の実施形態では、ケラチン誘導体は被験体の身体への注射により適用される。

10

## 【0015】

本発明のさらなる態様は、ケラチン誘導体を、熱傷創を治療するために有効な量で創傷に適用することを含む、治療を必要とする被験体において熱傷創を治療するための方法である。一部の実施形態では、該正に帯電した組成物ケラトース、ケラテイン、またはそれらの組合せを含むか、それらからなるか、またはそれらから本質的になる。

## 【0016】

一部の実施形態では、ケラチン誘導体は、ケラトース、ケラトース、酸性ケラトース、塩基性ケラトース、酸性ケラトース、塩基性ケラトース、ケラテイン、ケラテイン、酸性ケラテイン、塩基性ケラテイン、酸性ケラテイン、塩基性ケラテイン、またはその組合せを含むか、それらからなるか、またはそれらから本質的になる。

20

## 【0017】

一部の実施形態では、ケラチン誘導体は、創傷変化を阻害するため、創傷閉鎖を促進するため、またはその両方のために効果的な量で創傷に適用される。一部の実施形態では、ケラチン誘導体は局所適用される。一部の実施形態では、ケラチン誘導体は被験体の身体への注射により適用される。

## 【0018】

本発明のもう一つの態様は、固体の、生理学的に許容される支持体、および支持体上のケラチン誘導体を含む、外科用または救急医療用補助具(surgical or paramedical aid)である。一部の実施形態では、ケラチン誘導体は、ケラトース、ケラトース、酸性ケラトース、塩基性ケラトース、酸性ケラトース、塩基性ケラトース、ケラテイン、ケラテイン、酸性ケラテイン、塩基性ケラテイン、酸性ケラテイン、塩基性ケラテイン、またはその組合せを含むか、それらからなるか、またはそれらから本質的になる。

30

## 【0019】

本発明のなおさらなる態様は、ケラチン誘導体、および、該ケラチン誘導体が滅菌状態でその中に包装されている容器を含む、キットである。一部の実施形態では、ケラチン誘導体は、ケラトース、ケラトース、酸性ケラトース、塩基性ケラトース、酸性ケラトース、塩基性ケラトース、ケラテイン、ケラテイン、酸性ケラテイン、塩基性ケラテイン、酸性ケラテイン、塩基性ケラテイン、またはその組合せを含むか、それらからなるか、またはそれらから本質的になる。

40

## 【0020】

本発明のもう一つの態様は、本明細書に記載されるような治療方法を行うための組成物または薬物を調製するための、または本明細書に記載されるような製品を製造するための、本明細書に記載されるようなケラチン誘導体の使用である。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0021】

【図1】皮膚成分の細胞増殖を示すグラフである。可溶性ケラチンバイオマテリアルで処理したケラチノサイト(a)および線維芽細胞(b)は、媒体単独で処理した細胞よりも

50

より即座に増殖する。

【図2】化学熱傷創面積の経時的变化を示すグラフである。フェノールで処理して化学熱傷を誘導したマウスは、創傷部位の不動態化を経験し、正常な過程の創傷の増大が起こらない。

【図3】ブタにおける熱傷創面積を示すグラフである。創傷面積をデジタル画像解析により決定し、0日の値に正規化した。ケラチンゲルで処理した創傷は最初の数日間、認め得るほど面積を増加させず、対照よりも速く治癒した。

【図4】カプラン・マイヤー生存率グラフを示す図である。時間是对数目盛り上の分に表される。対照群の全ての動物が60分以内に死亡した。ケラチン群の一匹の動物およびHemCon（登録商標）止血用包帯群の一匹を、動物飼育スタッフの助言の下に犠牲にした。全般的に、ケラチンがその他の群よりも優れ、QuickClot（登録商標）止血剤およびHemCon（登録商標）止血用包帯群では2匹が死亡したのに比較して、1匹しか死亡しなかった。

10

【図5】流した血液を示すグラフである。失血量を体重に対して正規化し、体重に対する百分率として表す。ケラチンおよびQuickClot（登録商標）止血剤群は、対照およびHemCon（登録商標）止血用包帯群よりも失血が有意に（\*）少なかった。

【図6】平均動脈圧（MAP）を表すグラフである。血圧は初期圧力に対する百分率で表される。陰性対照群およびQuickClot（登録商標）止血剤群は、初期MAPの40%への圧力の急落を示した。ケラチンまたはHemCon（登録商標）止血用包帯で処置した動物は、MAPを初期圧力の80%前後で安定化させることができた。これらの差は、対照群と比較して、統計的に差はなかった。

20

【図7】ショック指数（SI）を示すグラフである。修正ショック指数は、心拍数をMAPで除算することにより算出した。この指数を臨床で用いてショックの重症度を評価する。値が低いほど良好である。ケラチン群の動物は、全試験期間にわたって代償性の（compensated）低い値を示したが、一方QuickClot（登録商標）止血剤群およびHemCon（登録商標）止血用包帯群は陰性対照と同様の値を有した。群間に統計的有意性はなかった。

【図8】組織学的評価を表す図である。ヘマトキシリンおよびエオシンで染色した代表的な組織切片、50倍。A）陰性対照群は、広く中空の類洞とともに乏しい灌流の徴候を示す。その表面には有効な血塊はない。B）QuickClot（登録商標）止血剤処置した試料の表面は、壊死（矢印）および凝固の領域を示す。最小限の細胞浸潤および組織の再生だけが見える。何も無い白い領域は、除去されたQuickClot（登録商標）止血剤顆粒に相当する。C）HemCon（登録商標）止血用包帯処置した動物の組織試料は、低レベルの細胞浸潤のある、付着した凝固血の斑状の領域を示した。D）ケラチンで処理した動物の肝臓試料は、損傷面に付着したケラチンバイオマテリアルの厚い層を示す。高い細胞活性およびケラチン間の空間における初期の顆粒状組織（大きい矢印）の形成を含む、優れた生体適合性の徴候がある。さらに、ケラチンバイオマテリアルと肝細胞の高レベルの直接接触がある（小さな矢印）。

30

【図9】ケラチン処置群（高倍率）を表す図である。A）ケラチンゲルの空間内での初期の肉芽様組織の形成、200倍。B）バイオマテリアルと組織の統合、および初期の細胞浸潤を示す、ケラチンゲルと肝臓組織の界面、400倍。

40

【発明を実施するための形態】

【0022】

引用された全ての米国特許参照文献の開示は、それらが本明細書中の開示に一致する程度まで、参照により本明細書に組み込まれる。

【0023】

抽出ケラチン溶液がミクロン規模で自発的に自己組織化する能力は、1986年および1987年の2つの論文において発表された(Thomas H. et al., Int J Biol Macromol 1986; 8: 258-64; van de Loecht M, Melliland Textilberichte 1987; 10: 7

50

80 - 6)。この現象は毛髪ケラチンが得られる高度に制御された上部構造を考えると、驚くことではない。正確に処理されると、この自己組織化能力を保存して、細胞浸潤をもたらすサイズ規模で整然とした構築物を作り出すために用いることができる。ケラチンが（例えば、酸または塩基で）加水分解されると、その分子量は減少し、それらは自己組織化能力を失う。従って、加水分解を最小限にする処理条件が好ましい。

#### 【0024】

自己組織化する能力は、2つの理由で組織工学スキャフォールドに特に有用な特徴である。第一に、自己組織化は、再現可能な構築物、次元、および気孔率を有する高度に規則的な構造をもたらす。第二に、これらの構築物が良性条件下で自発的に形を成すという事実により、マトリックスが形成されるときに細胞の組み込みが可能となる。これら2つの特色は、天然の細胞外マトリックス（ECM）の模倣を試みるいずれのシステムにとっても極めて重要である。

10

#### 【0025】

細胞認識も、ECMを模倣しようとするバイオマテリアルの重要な特徴である。かかる認識は、構成成分ECMタンパク質によって提示される特異的アミノ酸モチーフとの細胞表面インテグリンの結合によって促進される。主なタンパク質としては、コラーゲンおよびフィブロネクチンが挙げられ、これらの両方が、細胞結合に関して広範に研究されている。両方のタンパク質は、幅広い種類の細胞種による結合を支持する幾つかの領域を含む。広く知られているアルギニン - グリシン - アスパラギン酸（RGD）モチーフに加えて、フィブロネクチン上の「X」 - アスパラギン酸 - 「Y」モチーフもインテグリン 4 1によって認識される（この際、Xは、グリシン、ロイシンまたはグルタミン酸に相当し、Yは、セリンまたはバリンに相当する）ことが示されている。

20

#### 【0026】

人毛から誘導されるケラチンバイオマテリアルは、これらの同じ結合モチーフを含む。NCBIタンパク質データベースを検索すると、71の別個の特有の人毛ケラチンタンパク質の配列が明らかとなった。このうち、55が、高分子量、低硫黄、ヘリカルファミリーに由来する。このタンパク質グループは、多くの場合、 $\alpha$  - ケラチンと呼ばれ、人毛繊維への韌性の付与を担う。これらの $\beta$  - ケラチンは、40 kDaより大きい分子量、および4.8モルパーセントの平均システイン（タンパク質結合の分子間および分子内に関与する主なアミノ酸）含有率を有する。さらに、これらの $\beta$  - ケラチンタンパク質のアミノ酸配列の分析により、78%が少なくとも1つのフィブロネクチン様インテグリン受容体結合モチーフを含み、25%が、少なくとも2以上を含むことが示された。2つの最近の論文は、加工ケラチン泡沫への優れた細胞接着を実証することによって、これらの結合部位がケラチンバイオマテリアルの表面に存在する可能性が高いことを強調している（Tachibana A. et al., J Biotech 2002; 93: 165 - 70; Tachibana A. et al., Biomaterials 2005; 26(3): 297 - 302）。

30

#### 【0027】

本開示のケラチン調製品と同じように利用することのできる天然ポリマーのその他の例としては、限定されるものではないが、コラーゲン、ゼラチン、フィブロネクチン、ピトロネクチン、ラミニン、フィブリン、ムチン、エラスチン、ナイドジェン（エンタクチン）、プロテオグリカンなどが挙げられる（例えば、Katsuen et al. に対する米国特許第5,691,203号を参照）。

40

#### 【0028】

人毛抽出物の生物活性に関する学説の中には、人毛ケラチン（「HHK」）は、それら自体が生物活性であるという説がある。70種類を超える人毛ケラチンが公知であり、そのcDNA由来配列が公表されている。しかし、HHKの完全な補完物（complement）は不明であり、100を超えるという推定値が提案されている（Gillespie JM, The structural proteins of hair: isolation characterization, and regulation

50

of biosynthesis. Goldsmith LA (editor), Biochemistry and physiology of the skin (1983), Oxford University Press. New York; 475-510)。全種類のHHKの中には、創傷拘縮および細胞移動に与与することが証明された、少数のHHKがある (Martin, P, Science 1997; 276: 75-81)。特に、ケラチンK-6およびK-16は、創傷治癒中に表皮で発現され、毛包の外毛根鞘においても見出される (Bowden PE, Molecular Aspects of Dermatology (1993), John Wiley & Sons, Inc., Chichester: 19-54)。人毛の抽出物中のこれらのHHKが存在すること、およびそれらをその後創傷床へ直接投与することは、そうでなければ長期にわたる長い分化、遊走および増殖プロセスを「ショートカットする」か、または何らかの生化学物質の欠乏を解消し、その結果、組織修復および再生プロセスを促進する原因となり得る。

#### 【0029】

骨形成因子-4 (BMP-4) などの増殖因子および形質転換増殖因子- (TGF-) スーパーファミリーのその他のメンバーが発育中の毛包に存在することは10年以上前から知られている (Jones CM et al., Development 1991; 111: 531-42; Lyons KM et al., Development 1990; 109: 833-44; Blessings M. et al., Genes and Develop 1993; 7: 204-15)。実際、30を超える増殖因子およびサイトカインが、循環する毛包の成長に与与する (Hardy MH, Trends Genet 1992; 8(2): 55-61; Stenn KS et al., J Dermatol Sci 1994; 7S: S109-24; Rogers GE, Int J Dev Biol 2004; 48(2-3): 163-70)。これらの分子の多くは、多様な組織の再生に中心的な役割を有する。サイトカインが毛包のバルジ領域にある幹細胞に結合すると、多数の増殖因子が人毛内に同伴する (entrained with) 可能性が高い (Panteleyev AA et al., J Cell Sci 2001; 114: 3419-31)。これらの増殖因子は、末端を切断した人毛からケラチンとともに抽出されると予測される。この知見は、先例のないものではない。それというのも、様々な組織の抽出物に多くの異なる種類の増殖因子が存在すること、およびその活性は化学抽出の後でさえも維持されることが既に示されているためである。これらのような知見は、多数の増殖因子が末端を切断した人毛中に存在する可能性があり、ケラチンはとりわけこれらの増殖因子の非常に有効な送達マトリックスとして作用する可能性があることの証拠が増していることを示す。

#### 【0030】

ケラチンは、脊椎動物の毛、皮膚およびその他の組織に見出されるタンパク質の1ファミリーである。毛は、容易に入手でき、かつ高価でない数少ないヒト組織の1つであるので、特有のヒトケラチン源である。その他のケラチン源は、本発明に許容される原料ではあるが (例えば、羊毛、毛皮、角、蹄、くちばし、羽、うろこなど)、ヒト被験体での使用には、その生体適合性の故に人毛が好ましい。

#### 【0031】

ケラチンは、当分野で公表された方法を用いて、酸化または還元により、人毛繊維から抽出することができる (例えば、Crewther WG et al. The chemistry of keratins, in Advances in Protein Chemistry 1965; 20: 191-346を参照)。これらの方法は一般に、酸化または還元のいずれかによってケラチンの架橋構造を破壊する二段階法を用いる。これらの反応では、システインアミノ酸残基のジスルフィド結合が切断されて、ケラチンを可溶性にさせる (スキーム1)。そのキューティクルは基本的にこの処理による影響を受けないので、大部分のケラチンは、キューティクルの保護構造の中に捕捉されたままである。これらのケラチンを抽出するために、変性溶液を使用する第二段階を用いる必

10

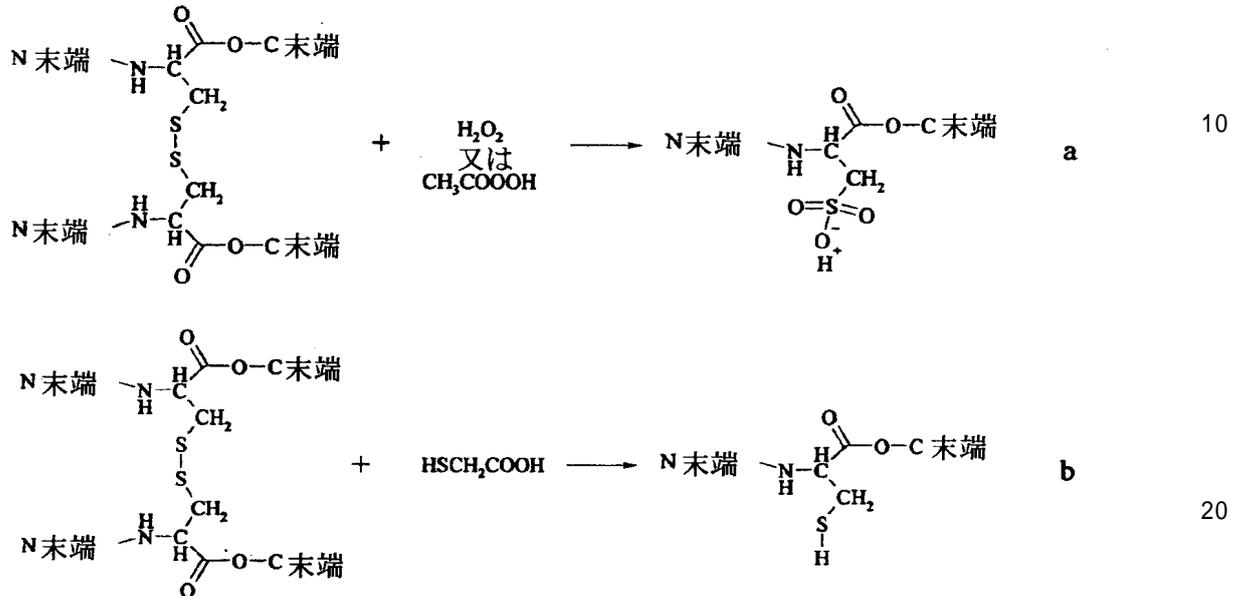
20

30

40

50

要がある。あるいは、還元反応の場合には、これらの段階を組み合わせてもよい。当分野で公知の変性溶液としては、尿素、遷移金属水酸化物、界面活性剤溶液、およびそれらの組合せが挙げられる。好ましい方法は、0.1～1.0 Mの濃度のトリスの水溶液、および0.1～1.0 Mの間の尿素溶液を、それぞれ酸化反応および還元反応に使用する。  
【化1】



スキーム1. ケラチンにおけるジスルフィド架橋の (a) 酸化および (b) 還元の全体図。これらの反応は、シスチン残基の硫黄-硫黄結合を切断し、それにより上部構造を破壊し、ケラチンを反応媒質に可溶性にする。結果として得られる画分は、ケラトース (a) およびケラテイン (b) である。

【0032】

酸化処理を用いる場合、得られるケラチンは「ケラトース」と呼ばれる。還元処理を用いる場合、得られるケラチンは「ケラテイン」と呼ばれる (スキーム1を参照)。

30

【0033】

ケラチンの粗抽出物は、酸化還元状態にかかわらず、例えば等電沈殿により、さらに「  
」および「  
」画分に精製することができる。高分子量ケラチン、すなわち「  
ケラチン」、(ヘリックス状)は、毛包の微小繊維領域に由来すると考えられ、一般に、分子量は約40～85キロダルトンの範囲である。低分子量ケラチン、すなわち「  
ケラチン」、(球状)、は、毛包の細胞外マトリックス領域に由来すると考えられ、一般に、分子量は約10～15キロダルトンの範囲である。(Crewther WG et al. The chemistry of keratins, in Advances in Protein Chemistry 1965; 20: 191-346を参照)。

【0034】

40

ケラチンおよびケラチンは特有の特性を有するにもかかわらず、ケラチンとケラチンの両方のサブファミリーの特性はさらに高度な精製手段によってしか明らかにすることができない。例えば、ケラチンは、「酸性」タンパク質画分および「塩基性」タンパク質画分に分画することができる。好ましい分画方法は、イオン交換クロマトグラフィーである。これらの画分は、特有の特性、例えば、血液細胞の凝集へのそれらの異なる効果を有する (下の表1を参照。さらに米国特許出願公開第2006/0051732号を参照)。

【0035】

本明細書において「ケラチン誘導體」とは、単独で、あるいはその他のケラチン誘導體またはその他の成分と組み合わせた、ケラチン画分、その誘導體または混合物をさし、そ

50

れには、限定されるものではないが、ケラトース、ケラトース、ケラテイン、ケラテイン、メタケラチン、ケラチン中間径フィラメント、およびそれらの組合せ（本開示を考慮して当業者に明らかなその変形とともに、別段の指定がなければその酸性および塩基性成分を含む）が含まれる。一部の実施形態では、ケラチン誘導体は、ケラチンの特定の画分または細画分を含むか、それらからなるか、またはそれらから本質的になる。誘導体は、少なくとも80、90、95もしくは99重量パーセント（またはそれ以上）の該画分または細画分を含むか、それらからなるか、またはそれらから本質的になってよい。

## 【0036】

一部の実施形態では、ケラチン誘導体は、酸性ケラトースを含むか、それらからなるか、またはそれらから本質的になる。

10

## 【0037】

一部の実施形態では、ケラチン誘導体は、ケラトースを含むか、それらからなるか、またはそれらから本質的になり、該ケラトースは、少なくとも80、90、95もしくは99重量パーセント（またはそれ以上）の酸性ケラトースを含むか、それらからなるか、またはそれらから本質的になり、かつ、該ケラトースは、多くて20、10、5または1重量%（またはそれ未満）の塩基性ケラトースを含むか、それらからなるか、またはそれらから本質的になる。

## 【0038】

一部の実施形態では、ケラチン誘導体は、塩基性ケラトースを含むか、それらからなるか、またはそれらから本質的になる。

20

## 【0039】

一部の実施形態では、ケラチン誘導体は、ケラトースを含むか、それらからなるか、またはそれらから本質的になり、該ケラトースは、少なくとも80、90、95もしくは99重量パーセント（またはそれ以上）の塩基性ケラトースを含むか、それらからなるか、またはそれらから本質的になり、かつ、該ケラトースは、多くて20、10、5または1重量%（またはそれ未満）の酸性ケラトースを含むか、それらからなるか、またはそれらから本質的になる。

## 【0040】

一部の実施形態では、ケラチン誘導体は、酸性ケラテインを含むか、それらからなるか、またはそれらから本質的になる。

30

## 【0041】

一部の実施形態では、ケラチン誘導体は、ケラテインを含むか、それらからなるか、またはそれらから本質的になり、該ケラテインは、少なくとも80、90、95もしくは99重量パーセント（またはそれ以上）の酸性ケラテインを含むか、それらからなるか、またはそれらから本質的になり、かつ、該ケラテインは、多くて20、10、5または1重量%（またはそれ未満）の塩基性ケラテインを含むか、それらからなるか、またはそれらから本質的になる。

## 【0042】

一部の実施形態では、ケラチン誘導体は、塩基性ケラテインを含むか、それらからなるか、またはそれらから本質的になる。

40

## 【0043】

一部の実施形態では、ケラチン誘導体は、ケラテインを含むか、それらからなるか、またはそれらから本質的になり、該ケラテインは、少なくとも80、90、95もしくは99重量パーセント（またはそれ以上）の塩基性ケラテインを含むか、それらからなるか、またはそれらから本質的になり、かつ、該ケラテインは、多くて20、10、5または1重量%（またはそれ未満）の酸性ケラテインを含むか、それらからなるか、またはそれらから本質的になる。

## 【0044】

一部の実施形態では、ケラチン誘導体は、未分画の + - ケラテインを含むか、それらからなるか、またはそれらから本質的になる。一部の実施形態では、ケラチン誘導体は

50

、酸性 + - ケラチンを含むか、それらからなるか、またはそれらから本質的になる。一部の実施形態では、ケラチン誘導体は、塩基性 + - ケラチンを含むか、それらからなるか、またはそれらから本質的になる。

【 0 0 4 5 】

一部の実施形態では、ケラチン誘導体は、未分画の + - ケラトースを含むか、それらからなるか、またはそれらから本質的になる。一部の実施形態では、ケラチン誘導体は、酸性 + - ケラトースを含むか、それらからなるか、またはそれらから本質的になる。一部の実施形態では、ケラチン誘導体は、塩基性 + - ケラトースを含むか、それらからなるか、またはそれらから本質的になる。

【 0 0 4 6 】

一部の実施形態では、ケラチン誘導体は、未分画の - ケラトース（例えば、キューテイクルに由来）を含むか、それらからなるか、またはそれらから本質的になる。一部の実施形態では、ケラチン誘導体は、塩基性 - ケラトースを含むか、それらからなるか、またはそれらから本質的になる。一部の実施形態では、ケラチン誘導体は、酸性 - ケラトースを含むか、それらからなるか、またはそれらから本質的になる。

【 0 0 4 7 】

塩基性 ケラトースは、好ましくは塩基性 ケラトースを酸性および塩基性 ケラトースを含む混合物から、例えば、イオン交換クロマトグラフィーで分離することにより製造され、所望によりこの塩基性 ケラトースは 10 ~ 100 または 200 キロダルトンの平均分子量を有する。より好ましくは、平均分子量は 30 または 40 ~ 90 または 100 キロダルトンである。所望により、しかし好ましくはこの方法は、該塩基性 - ケラトースを、所望により微量金属と錯体を形成するキレート化剤の存在下、変性溶液および/または緩衝液に再溶解する段階、そして次に、塩基性 ケラトースを変性溶液から再沈殿させる段階をさらに含む。組成物が、好ましくは多くて 5、2、1、または 0.1 重量%またはそれ未満の酸性 ケラトースを含むことは、当然理解される。

【 0 0 4 8 】

酸性 ケラトースは、好ましくは前述の技法とは逆の技法、つまり、酸性 ケラトースを酸性および塩基性 ケラトースの混合物から、例えばイオン交換クロマトグラフィーにより分離および維持することにより製造され、所望により上記酸性 ケラトースは 10 ~ 100 または 200 キロダルトンの平均分子量を有する。より好ましくは、平均分子量は 30 または 40 ~ 90 または 100 キロダルトンである。所望により、しかし好ましくはこの方法は、上記酸性 - ケラトースを、所望により微量金属と錯体を形成するキレート化剤の存在下、変性溶液および/または緩衝液に再溶解する段階、そして次に、塩基性 ケラトースを変性溶液から再沈殿させる段階をさらに含む。組成物が、好ましくは多くて 5、2、1、または 0.1 重量%またはそれ未満の塩基性 ケラトースを含むことは、当然理解される。

【 0 0 4 9 】

その他のケラトースの塩基性および酸性画分は、塩基性および酸性 ケラトースについて上に記載されるような同様の方法で調製することができる。

【 0 0 5 0 】

塩基性 ケラチンは、好ましくは塩基性 ケラチンを酸性および塩基性 ケラチンの混合物から、例えばイオン交換クロマトグラフィーで分離することにより製造され、所望により、この塩基性 ケラチンは 10 ~ 100 または 200 キロダルトンの平均分子量を有する。所望により、しかし好ましくはこの方法は、該塩基性 - ケラチンを、所望により微量金属と錯体を形成するキレート化剤の存在下、変性溶液および/または緩衝液に再溶解する段階、そして次に、塩基性 ケラチンを変性溶液から再沈殿させる段階をさらに含む。組成物が、好ましくは多くて 5、2、1、または 0.1 重量%またはそれ未満の酸性 ケラチンを含むことは、当然理解される。

【 0 0 5 1 】

酸性 ケラチンは、好ましくは前述の技法とは逆の技法、つまり、酸性 ケラチン

10

20

30

40

50

を酸性および塩基性酸性 ケラチンの混合物から、例えばイオン交換クロマトグラフィーにより分離および維持することにより製造され、所望によりこの酸性 ケラチンは10～100または200キログルトンの平均分子量を有する。より好ましくは、平均分子量は30または40～90または100キログルトンである。所望により、しかし好ましくはこの方法は、上記酸性 - ケラチンを、所望により微量金属と錯体を形成するキレート化剤の存在下、変性溶液および/または緩衝液)に再溶解する段階、そして次に、塩基性 ケラチンを変性溶液から再沈殿させる段階をさらに含む。組成物が、好ましくは多くて5、2、1、または0.1重量%またはそれ未満の塩基性 ケラチンを含むことは、当然理解される。

【0052】

その他のケラチンの塩基性および酸性画分は、塩基性および酸性 ケラチンについて上に記載されるような同様の方法で調製することができる。

【0053】

ケラチン材料は、限定されるものではないが、羊毛および人毛を含む、任意の適した源から得られる。一実施形態では、ケラチンは、理髪店および美容院から入手した、末端を切断した人毛から得られる。材料は温水および中性洗剤で洗浄し、乾燥させ、さらに非極性有機溶媒(一般にヘキサンまたはエーテル)で抽出して使用前に残留油を除去する。

【0054】

ケラトース。ケラトース画分は任意の適した技法により得られる。一実施形態では、それらはアレクサンダーと共同研究者らの方法を用いて得られる(P. Alexander et al., Biochem. J., 46, 27-32 (1950))。基本的に、10パーセント未満の濃度の過酢酸の水溶液と毛とを室温にて24時間反応させる。溶液を濾過し、- ケラトース画分を約4のpHまで無機酸を添加することにより沈殿させる。

- ケラトースを濾過により分離し、付加的な酸で洗浄し、それに続いてアルコールで脱水し、次いでフリーズドライさせる。純度の増加は、ケラトースを変性溶液、例えば7M尿素、水酸化アンモニウム水溶液、または20mMトリス塩基緩衝液(例えば、Trizma(登録商標)塩基)に再溶解し、再沈殿させ、再溶解し、脱イオン水に対して透析し、そして、pH4にて再沈殿させることにより実現することができる。

【0055】

ケラトースを製造するための好ましい方法は、過酸化水素、過酢酸、または過ギ酸での酸化によるものである。最も好ましい酸化剤は、過酢酸である。好ましい濃度範囲は、1～10重量/容量パーセント(w/v%)であり、最も好ましいのは約2w/v%である。当業者であれば、濃度をわずかに変更して様々な程度の酸化をもたらすことができ、同時に反応時間、温度および液体対固体比の変更を行ってもよいことを認識する。また、過ギ酸は、過酢酸と比較して、ペプチド結合の切断が最小限であるという利点をもたらすことも、Crewther et al.により考察されている。しかし、過酢酸はコストと利用可能性の点で利点をもたらす。好ましい酸化温度は、0～100度の間の摂氏温度( )である。最も好ましい酸化温度は37 である。好ましい酸化時間は、0.5～24時間の間である。最も好ましい酸化時間は12時間である。好ましい液体対固体比は、5～100:1である。最も好ましい比は20:1である。酸化の後、多量の蒸留水を用いて毛をすすぎ、残留酸化剤を取り除く。

【0056】

ケラトースは、変性剤の水溶液を用いて酸化した毛から抽出することができる。タンパク質変性剤は当分野で周知であるが、好ましい溶液としては、尿素、遷移金属水酸化物(例えば水酸化ナトリウムおよび水酸化カリウム)、水酸化アンモニウム、およびトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(トリス塩基)が挙げられる。好ましい溶液は、0.01～1Mの濃度範囲のTrizma(登録商標)塩基(トリス塩基のブランド)である。最も好ましい濃度は0.1Mである。当業者であれば、濃度をわずかに変更して様々な程度の酸化をもたらすことができ、同時に反応時間、温度および液体対固体比の変更を行ってもよいことを認識する。好ましい抽出温度は、0～100度の間の摂氏温度である。最

10

20

30

40

50

も好ましい抽出温度は、37 である。好ましい抽出時間は、0.5 ~ 24 時間の間である。最も好ましい抽出時間は、3 時間である。好ましい液体対固体比は、5 ~ 100 : 1 である。最も好ましい比は、40 : 1 である。トリス塩基または脱イオン (DI) 水の希釈溶液を用いて続いて抽出し、さらなる収量を得ることができる。抽出後、遠心分離および/または濾過により残留固体を溶液から除去する。

【0057】

粗抽出物は、まずその溶液を pH 7.0 ~ 7.4 の間に中和することにより単離することができる。最も好ましい pH は、7.4 である。残留変性剤は、DI 水に対する透析により除去する。透析保持液を濃縮した後、凍結乾燥または噴霧乾燥して、 $\alpha$ -および  $\beta$ -ケラトースの両方の乾燥粉末混合物を得る。

10

あるいは、溶液の pH が約 4.2 に達するまで酸を 1 滴ずつ添加することにより、 $\alpha$ -ケラトースを抽出溶液から単離する。好ましい酸としては、硫酸、塩酸、および酢酸が挙げられる。最も好ましい酸は濃塩酸である。画分の沈殿は pH 6.0 前後で始まり、約 4.2 になるまで続く。分別沈殿を利用して異なる等電性をもつ異なる範囲のタンパク質を単離することができる。固体  $\alpha$ -ケラトースは、遠心分離または濾過により回収することができる。

【0058】

ケラトースは、変性溶液に固体を再溶解することによりさらに精製することができる。抽出に利用したのと同じ変性溶液を用いてよいが、好ましい変性溶液はトリス塩基である。エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を加えて、毛の中に見出された微量金属を錯 20  
 化させ、除去することができる。好ましい変性溶液は、20 mM トリス塩基と 20 mM EDTA または DI 水と 20 mM EDTA である。微量金属の存在が意図される用途に有害でない場合、EDTA を除外してもよい。約 4.2 の最終 pH まで塩酸を 1 滴ずつ添加することにより、 $\alpha$ -ケラトースをこの溶液から再沈殿させる。固体の単離は、遠心分離または濾過による。このプロセスを数回繰り返して、 $\alpha$ -ケラトースをさらに精製してもよい。

【0059】

ケラトース画分は、pH 4 で溶液中に残り、これを、アルコールなどの水混和性有機溶媒に添加し、続いて濾過することにより単離し、付加的なアルコールで脱水し、フリーズドライさせる。純度の増加は、ケラトースを変性溶液、例えば 7 M 尿素、水酸化アンモ 30  
 ニウム水溶液、または 20 mM トリス塩基緩衝液に再溶解し、無機酸の添加により pH を 4 に低下させ、生じる固体を除去し、上清を中和し、アルコールでタンパク質を再沈殿させ、再溶解し、脱イオン水に対して透析し、そして、アルコールに添加することにより再沈殿させることによって実現することができる。これらの段階で消費されるアルコールの量は、最初に蒸留によってケラトース溶液を濃縮することにより、最小限にすることができる。

【0060】

ケラトースの除去後、典型的な抽出溶液からの  $\alpha$ -ケラトースの濃度は約 1 ~ 2 % である。ケラトース画分は、水混和性非溶媒に添加することにより単離することができる。沈殿を生じさせるために、過剰な水を蒸発させることにより  $\alpha$ -ケラトース溶液を濃縮し 40  
 てよい。この溶液は、90 % の水を除去することにより、約 10 ~ 20 % に濃縮することができる。これは、真空蒸留を用いて、または流下膜式蒸発によって行うことができる。濃縮後、 $\alpha$ -ケラトース溶液を、過剰な冷非溶媒に 1 滴ずつ添加する。適した非溶媒としては、エタノール、メタノール、アセトンなどが挙げられる。最も好ましい非溶媒は、エタノールである。最も好ましい方法は、 $\alpha$ -ケラトース溶液を約 10 w/v % タンパク質に濃縮し、それを 8 倍過剰の冷エタノールに 1 滴ずつ添加する方法である。沈殿した  $\alpha$ -ケラトースは、遠心分離または濾過によって単離し、乾燥させてよい。適した乾燥のための方法としては、フリーズドライ (凍結乾燥)、空気乾燥、真空乾燥、または噴霧乾燥が挙げられる。最も好ましい方法は、フリーズドライである。

【0061】

50

ケラテイン。ケラテイン画分は、Bradbury and Chapmanによる方法(J. Bradbury et al., Aust. J. Biol. Sci. 17, 960-72 (1964))およびGoddard and Michaelisによる方法(D. Goddard et al., J. Biol. Chem. 106, 605-14 (1934))の組合せを用いて得ることができる。基本的に、過剰な加水分解を避け、第2段階で皮質のジスルフィド結合を効率よく還元するために毛繊維のキューティクルを超音波によって除去する。毛をジクロロ酢酸の溶液に入れ、超音波プローブでの処理に供した。この方法のさらなる改良により、80%ジクロロ酢酸、固体対液体比1:16、および180ワットの超音波出力を用いる条件が最適であることが示されている(H. Ando et al., Sen'i Gakkaishi 31(3), T81-85 (1975))。固体断片を濾過により溶液から除去し、すすぎ、空気乾燥させ、その後篩いにかけて、取り除いたキューティクル細胞から毛繊維を単離する。

10

## 【0062】

一部の実施形態では、キューティクルの超音波除去の後、剥皮された繊維とメルカプトエタノールの反応により - および ケラテインを得る。具体的には、低加水分解法を酸性pHで用いる(E. Thompson et al., Aust. J. Biol. Sci. 15, 757-68 (1962))。典型的な反応では、0.02M酢酸緩衝液および0.001M界面活性剤を含有する脱酸素水中に少量の水酸化カリウムを添加することによって既にpH5に調整された4Mメルカプトエタノールで、24時間毛を抽出する。

## 【0063】

20

溶液を濾過し、約4のpHまで無機酸を添加することにより ケラテイン画分を沈殿させる。ケラテインを濾過により分離し、付加的な酸で洗浄し、それに続いてアルコールで脱水し、次いで真空乾燥させる。純度の増加は、ケラテインを変性溶液、例えば7M尿素、水酸化アンモニウム水溶液、または20mMトリス塩基緩衝液に再溶解し、再沈殿させ、再溶解し、脱イオン水に対して透析し、そして、pH4にて再沈殿させることにより実現することができる。

## 【0064】

ケラテイン画分は、pH4で溶液中に残り、これを、アルコールなどの水混和性有機溶媒に添加し、続いて濾過することにより単離し、付加的なアルコールで脱水し、真空乾燥させる。純度の増加は、ケラテインを変性溶液、例えば7M尿素、水酸化アンモニウム水溶液、または20mMトリス塩基緩衝液に再溶解し、無機酸の添加によりpHを4に低下させ、生じる固体を除去し、上清を中和し、アルコールでタンパク質を再沈殿させ、再溶解し、脱イオン水に対して透析し、そして、アルコールに添加することにより再沈殿させることによって実現することができる。これらの段階で消費されるアルコールの量は、最初に蒸留によってケラチン溶液を濃縮することにより、最小限にすることができる。

30

## 【0065】

代替法では、ケラテイン画分は、毛とチオグリコール酸ナトリウム水溶液を反応させることによって得られる。

## 【0066】

ケラテインの製造のための好ましい方法は、毛をチオグリコール酸またはメルカプトエタノールで還元することによる。最も好ましい還元剤は、チオグリコール酸(TGA)である。好ましい濃度は、1~10Mの範囲であり、約1.0Mが最も好ましい。当業者であれば、濃度をわずかに変更して様々な程度の還元をもたらすことができ、同時にpH、反応時間、温度および液体対固体比の変更を行ってもよいことを認識する。好ましいpHは、9~11の間である。最も好ましいpHは、10.2である。還元溶液のpHは、塩基を付加することにより変更される。好ましい塩基としては、遷移金属水酸化物、水酸化ナトリウム、および水酸化アンモニウムが挙げられる。最も好ましい塩基は、水酸化ナトリウムである。pH調整は、水中の水酸化ナトリウムの飽和溶液を還元剤溶液に1滴ずつ添加することによって達成される。好ましい還元温度は、0~100の間である。最も好ましい還元温度は37である。好ましい還元時間は、0.5~24時間である。最

40

50

も好ましい還元時間は12時間である。好ましい液体対固体比は、5～100：1である。最も好ましい比は、20：1である。前に説明した酸化反応とは異なり、還元は塩基性pHで行う。そういうわけで、ケラチンは還元媒質に高溶解性であり、抽出されると予期される。そのため、還元溶液をその後の抽出溶液と混合し、適宜に処理する。

#### 【0067】

還元ケラチンは、その対応する酸化物ほど親水性でない。そのため、還元毛繊維は、酸化した毛がそうなるように膨潤したり、割けて開いたりせず、その結果、比較的収率が低くなる。還元/抽出プロセスの動態に影響を及ぼすもう一つの因子は、ケラチンの相対溶解度である。水への相対溶解度順位は、溶解性の高いものから低いものまで、 $\alpha$ -ケラトース >  $\beta$ -ケラトース >  $\alpha$ -ケラテイン >  $\beta$ -ケラテインである。結果的に、還元毛繊維からの抽出収率はそれほど高くない。そういう状況であるので、その後の抽出は付加的な還元剤に変性剤溶液を加えて行う。その後の抽出に好ましい溶液としては、TGA + 尿素、TGA + トリス塩基、またはTGA + 水酸化ナトリウムが挙げられる。抽出後、ケラトースについて説明した手順を用いて、 $\alpha$ -および $\beta$ -ケラチンの粗画分を単離することができる。しかし、 $\alpha$ -および $\beta$ -ケラチンの沈殿は、酸素に暴露されるとそのシスチン架橋を再形成する。そのために、精製段階中に溶け難くなることを回避するために沈殿を瞬時に再溶解するか、酸素の不在下で沈殿させる。

#### 【0068】

残留還元剤および変性剤は、透析によって溶液から除去することができる。典型的な透析条件は、24～72時間、DI水に対して透析される、ケラチンの1～2%溶液である。当業者であれば、透析に加えて、その他の低分子量混入物質を除去するための方法が存在することを理解する(例えば、精密濾過法、クロマトグラフィー、および同類のもの)。トリス塩基の使用は、ケラチンの最初の可溶化にのみ必要である。ひとたび溶解すると、ケラチンは変性剤がなくとも溶液中で安定している。そのため、pHが中性またはそれを上回ったままである限り、ケラチンの沈殿を結果として生じることなく、変性剤を除去することができる。これらの精製溶液中のケラチンの終濃度は、水の添加/除去により調整することができる。

#### 【0069】

ケラチンの形態(すなわち、ケラトースまたはケラテイン)に関わらず、さらなる精製に向けてのいくつかの異なるアプローチをケラチン溶液に対して用いることができる。しかし、ケラチンの特有の溶解特性に役立つ技法を選択するように注意しなければならない。最も単純な分離法の1つは、等電沈殿法である。この方法では、溶液のpHを調整し、沈殿した材料を除去することにより、等電点の異なるタンパク質を単離することができる。ケラチンの場合、 $\alpha$ -形態と $\beta$ -形態の両方が、 $\text{pH} > 6.0$ で可溶性である。しかし、 $\text{pH}$ が6より下に低下すると、 $\alpha$ -ケラチンは沈殿し始める。所定のpHで沈殿を停止させ、遠心分離および/または濾過によりその沈殿を分離することによりケラチン画分を単離することができる。約4.2のpHでは、本質的にすべての $\alpha$ -ケラチンは沈殿している。これらの別個の画分を中性pHの水に再び溶解し、透析し、濃縮し、凍結乾燥または噴霧乾燥によって粉末にすることができる。しかし、ケラチン画分は、架橋を回避するために、酸素不在下または希釈液中で保存しなければならない。

#### 【0070】

ケラチンを分離するためのもう1つの一般的な方法は、クロマトグラフィーである。サイズ排除もしくはゲル濾過クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、等電点電気泳動、ゲル電気泳動、イオン交換クロマトグラフィーおよびイムノアフィニティークロマトグラフィーを含む、数種類のクロマトグラフィーを用いて、ケラチン溶液を分画することができる。これらの技法は当分野で周知であり、かつ、分子量、化学官能性、等電点、電荷または特異的抗体との相互作用の特徴によってタンパク質を含む化合物を分離することができ、かつ、単独で、または任意の組合せで、高度の分離および得られる純度をもたらすことができる。

#### 【0071】

10

20

30

40

50

好ましい精製方法は、イオン交換（I E x）クロマトグラフィーである。I E xクロマトグラフィーは、一般にはタンパク質、特にケラチンの両親媒性によるタンパク質分離に特に適している。溶液の出発pH、および保持する予定の所望画分によって、カチオン性I E xまたはアニオン性I E x（それぞれ、C I E xまたはA I E x）のいずれかの技術を用いることができる。例えば、6以上のpHでは、 $\alpha$ -ケラチンと $\beta$ -ケラチンの両方が可溶性であり、それらの等電点より上である。そのため、それらはアニオン性であり、アニオン交換樹脂に結合させることができる。しかし、ケラチンの細画分は、弱アニオン交換樹脂に結合せず、それどころか、かかる樹脂が充填されたカラムを通過することが見出された。A I E xクロマトグラフィーに好ましい溶液は、0～5重量/容量%の濃度の精製水中の、既に記載されるように単離された精製または分画ケラチンである。好ましい濃度は、0～4w/v%の間である。最も好ましい濃度は、約2w/v%である。A I E xカラムへの結合を促進するために、該溶液のイオン強度を最初は非常に低く保つことが好ましい。これは、最少の量の酸を用いてケラチンの精製水溶液をpH6～7の間に滴定することによって達成される。最も好ましいpHは6である。この溶液は、A I E xカラム、例えば、D E A E - S e p h a r o s e（登録商標）樹脂またはQ - S e p h a r o s e（登録商標）樹脂カラムに負荷することができる。好ましいカラム樹脂は、D E A E - S e p h a r o s e（登録商標）樹脂である。カラムを通過する溶液を回収し、既に記載されたようにさらに処理して、酸性ケラチン粉末の画分を単離することができる。

【0072】

一部の実施形態では、ケラチンを製造するためにA I E xカラムを使用することによってケラチンマトリックスの活性を強化し、それにより細胞接着を促進する。特定の理論に縛られることを望むものではないが、アニオンカラムを通過する画分、すなわち、酸性ケラチンは、細胞付着を促進すると想定される。

【0073】

もう一つの画分は、容易に結合し、当分野で公知の塩析技術を用いてカラムから洗い出すことができる。好ましい溶離媒質は、塩化ナトリウム溶液である。好ましい塩化ナトリウム濃度は、0.1～2Mの間である。最も好ましい濃度は、2Mである。この溶液のpHは、6～12の間であることが好ましい。最も好ましいpHは、12である。溶離プロセス中、安定なpHを維持するために、緩衝塩を添加してもよい。好ましい緩衝塩は、T r i z m a（登録商標）塩基である。当業者であれば、塩濃度およびpHをわずかに変更して様々な特性をもつケラチン画分の溶離をもたらすことができることを認識する。異なる画分を生じるために、異なる塩濃度およびpHを順次使用すること、または塩および/またはpH勾配を使用することも可能である。しかし、採用するアプローチに関わらず、カラム溶離剤を回収し、既に記載されたようにさらに処理して、塩基性ケラチン粉末の画分を単離することができる。

【0074】

C I E x技術を用いることにより、補完的な（c o m p l i m e n t a r y）手順も実行可能である。つまり、ケラチン溶液をカチオン交換樹脂、例えば、S P S e p h a r o s e（登録商標）樹脂（強カチオン性）またはC M S e p h a r o s e（登録商標）樹脂（弱カチオン性）に添加し、塩基性画分を通過させて回収することができる。保持された酸ケラチン画分は、既に記載されたように塩析によって単離することができる。

【0075】

メタケラチン。メタケラチンは、実質的に同じ手順を用いてケラチンの $\alpha$ 画分と $\beta$ 画分の両方から合成する。基本的に、ケラチンを変性溶液、例えば7M尿素、水酸化アンモニウム水溶液、または20mMトリス緩衝液に溶解する。純粋な酸素で溶液をバブリングして、システイン基の酸化カップリング反応を開始させる。S D S - P A G Eを用いて測定される分子量の増加により反応の進行をモニターする。2倍増または3倍増の分子量に達するまで反応溶液を酸素で継続的にバブリングする。無機酸の添加により、変性溶液のpHを中性に調整して、タンパク質の加水分解を回避してよい。

【0076】

10

20

30

40

50

ケラチン中間径フィラメント。人毛繊維のIFは、Thomasおよび共同研究者の方法を用いて得られる(H. Thomas et al., Int. J. Biol. Macromol. 8, 258-64 (1986))。これは本質的に、IFを適所に「接着する」のに役立つケラチンマトリックスを反応させて除去し、それによりIFを後に残す、化学エッチング法である。典型的な抽出プロセスでは、キューティクルの膨潤および基質タンパク質の亜硫酸分解は、0.2 M  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ 、8 M尿素中0.1 M  $\text{Na}_2\text{O}_6\text{S}_4$ 、およびpH9の0.1 Mトリス-HCl緩衝液を使用することにより達成される。抽出は室温にて24時間進行する。濃縮後、溶解したマトリックスケラチンおよびIFを、酢酸亜鉛溶液を約6のpHまで添加することにより沈殿させる。次に、0.05 M四ホウ酸塩溶液に対して透析することにより、IFをマトリックスケラチンから分離する。純度の増加は、透析した溶液を酢酸亜鉛で沈殿させ、IFをクエン酸ナトリウムに再溶解し、蒸留水に対して透析し、次いでサンプルをフリーズドライすることにより得ることができる。

10

## 【0077】

ケラチン調製品のさらなる考察は、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2006/0051732号(Van Dyke)に見出すことができる。

## 【0078】

組成物および製剤。乾燥粉末は、フリーズドライ(凍結乾燥)などの公知の技法に従って、上記のようなケラチン誘導体から形成することができる。一部の実施形態では、本発明の組成物は、該ケラチン誘導体が可溶化されている電解質溶液を含む組成物を製造するため、そのような乾燥粉末組成物形態と水溶液を混合して製造され得る。混合段階は任意の適した温度、一般に室温で実行されてよく、さらに、任意の適した技法、例えば攪拌、振盪、かき混ぜなどにより実行されてよい。電解質溶液の塩およびその他の構成成分(例えば、ケラチン誘導体と水を除く全ての成分)は、完全に乾燥粉末中に含まれていてもよいし、完全に水性組成物の中に含まれていてもよいし、または乾燥粉末と水性組成物の間に分布していてもよい。例えば、一部の実施形態では、電解質溶液の少なくとも一部の構成要素は乾燥粉末に含まれている。

20

## 【0079】

上に記載されるものなどのケラチン材料を含むマトリックスの形成は、当業者には明らかな、当分野で長く確立された技法またはその変形態態に従って行うことができる。一部の実施形態では、ケラチン調製物は乾燥され、使用前に再水和される。例えば、Lustig et al.に対する米国特許第2,413,983号、Schollkipf et al.に対する同第2,236,921号、およびAnkerに対する同第3,464,825号を参照されたい。好ましい実施形態では、マトリックス、またはヒドロゲルは、凍結乾燥材料の適した溶媒、例えば水またはリン酸緩衝生理食塩水(PBS)での再水和により形成される。ゲルは、例えば、Co60源を用いる線照射(800krad)により、滅菌することができる。ケラチンマトリックスを形成するその他の適した方法としては、限定されるものではないが、米国特許第6,270,793号(Van Dyke et al.)、同第6,274,155号(Van Dyke et al.)、同第6,316,598号(Van Dyke et al.)、同第6,461,628号(Blanchard et al.)、同第6,544,548号(Sillier-Jackson et al.)、および同第7,01,987号(Van Dyke)に見出されるものが挙げられる。

30

40

## 【0080】

一部の組成物実施形態では、ケラチン誘導体(特に および/または ケラテインならびに および/または ケラトース)は、約10~70または85または100キロダルトンの平均分子量を有する。その他のケラチン誘導体、特にメタケラチンは、それよりも大きい平均分子量、例えば、200または300キロダルトンまでを有し得る。一般に、ケラチン誘導体(この用語は、誘導体の組合せを含む)は、約0.1、0.5または1重量%から、3、4、5、または10重量%までの量で組成物に含めることができる。組成

50

物は、混合した場合、約1または1.5~4、8、10または20センチポイズの粘度を有することが好ましい。どのような濃度の粘度も、対ケラトースの比を変えることにより調節することができる。

#### 【0081】

ケラチン誘導体組成物または製剤は、増殖または治癒を促進する、疼痛の軽減をもたらす、細菌などの微生物の増殖を阻害する、血液凝固を促進または阻害する、細胞もしくは組織接着を促進または阻害するなどのために、所望により、1以上の有効成分、例えば1以上の増殖因子、鎮痛薬、抗菌剤、付加的な血液凝固薬などを（例えば、ケラチン誘導体（1または複数）を含む組成物の0.0000001~1または5重量%の範囲の量で）含んでよい。適した増殖因子の例としては、限定されるものではないが、神経成長因子、血管内皮増殖因子、フィブロネクチン、フィブリン、ラミニン、酸性および塩基性線維芽細胞増殖因子、テストステロン、ガングリオシドGM-1、カタラーゼ、インスリン様成長因子-I (IGF-I)、血小板由来増殖因子(PDGF)、神経成長因子ガレクチン-1、およびそれらの組合せが挙げられる。例えば、Hansson et al. に対する米国特許第6,506,727号およびHorie et al. に対する米国特許第6,890,531号を参照されたい。

#### 【0082】

本明細書において、「増殖因子」には、組織の再生、増殖および生存を促進する分子が含まれる。本発明の一部の実施形態で用いられる増殖因子は、ケラチン抽出物中に天然に見出されるものであってもよいし、あるいは、ケラチン抽出物に付加された、またはケラチンマトリックスを形成した、添加剤の形態であってもよい。増殖因子の例としては、限定されるものではないが、神経成長因子(NGF)およびその他のニューロトロフィン、血小板由来増殖因子(PDGF)、エリスロポエチン(EPO)、トロンプオエチン(TPO)、ミオスタチン(GDF-8)、増殖分化因子-9(GDF9)、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGFまたはFGF2)、上皮成長因子(EGF)、肝細胞増殖因子(HGF)、顆粒球-コロニー刺激因子(G-CSF)、および、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)が挙げられる。増殖因子の大きなファミリーを構成する、構造的かつ進化的に関連するタンパク質は多くあり、多数の増殖因子ファミリー、例えば、ニューロトロフィン(NGF、BDNF、および、NT3)がある。ニューロトロフィンは、とりわけ、神経組織の増殖および生存を促進する分子のファミリーである。ニューロトロフィンの例としては、限定されるものではないが、神経成長因子(NGF)、脳由来神経栄養因子(BDNF)、ニューロトロフィン3(NT-3)、および、ニューロトロフィン4(NT-4)が挙げられる。Johnson, Jr. et al. に対する米国特許第5,843,914号、Persson et al. に対する同第5,488,099号、Bardet et al. に対する同第5,438,121号、Collins et al. に対する同第5,235,043号、および、Burton et al. に対する同第6,005,081号を参照されたい。

#### 【0083】

例えば、増殖因子は、様々な組織の再生、増殖および生存を促進するために効果的な量でケラチンマトリックス組成物に加えることができる。増殖因子は、0.1ng/mL~1000ng/mLの範囲の濃度で提供される。より好ましくは、増殖因子は、1ng/mL~100ng/mL、最も好ましくは10ng/mL~100ng/mLの範囲の濃度で提供される。Ursioに対する米国特許第6,063,757号を参照されたい。

#### 【0084】

組成物は好ましくは無菌であり、かつ非発熱性である。組成物は、予成形され、適した容器、例えば柔軟なポリマー製のバッグもしくはボトル、または箔容器に無菌包装されて提供されてもよいし、あるいは、使用直前に混合するための、1つの容器中の滅菌乾燥粉末と、別の容器中の滅菌水溶液のキットとして提供されてもよい。予成形され、滅菌容器に包装されて提供される場合、組成物は、実質的な粘度の喪失（例えば、10または20パーセントを上回る）および/またはケラチン誘導体の実質的な沈殿（例えば、目視検査

10

20

30

40

50

で検出可能な沈降)の前に、好ましくは室温にて少なくとも4または6ヶ月(多くて2または3年あるいはそれ以上)の有効期間を有する。キットには単一の単位用量の活性ケラチン誘導体を含めてよい。単一の単位用量は、その意図する使用に応じて、0.1または0.5または1~100または200または300グラムのケラチン誘導体であってよく、またはそれよりも多くてもよい。

#### 【0085】

本開示のケラチン調製品と同様に利用することのできる天然ポリマーのその他の例としては、限定されるものではないが、コラーゲン、ゼラチン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン、フィブリン、ムチン、エラスチン、ナイドジェン(エンタクチン)、プロテオグリカンなどが挙げられる。(例えば、Katsuen et al.に対する米国特許第5,691,203号を参照)。

10

#### 【0086】

ケラチンバイオマテリアルを含有する、凝固組成物および出血を制御するための方法。本発明の一態様は、創傷出血に苦しむ被験体において出血を治療するための方法であり、ケラチン誘導体を出血を治療するために有効な量で創傷出血に適用することを含む。一部の実施形態では、ケラチン誘導体は、上に記載されるものなどのケラチン、ケラチン、ケラチン、酸性ケラチン、塩基性ケラチン、またはその組合せを含むか、それらからなるか、またはそれらから本質的になる。出血は、例えば、短時間の多量の大量出血を生じる重度の外傷に関連するものであってよく、それには、限定されるものではないが、外科手術、刺創および銃創などの穿通性外傷、自動車による外傷、ならびに大量出血の部位に近づく明確な手段があるまたはない、頭部、頸部、胸部および腹部の大量出血が含まれる。

20

#### 【0087】

多くの異なる組成物が、限定されるものではないが、ケラチン誘導体をはじめとする止血剤を含み得る。止血剤のその他の例としては、限定されるものではないが、フィブリンまたはフィブリノゲン、トロンピン、第XIII因子、カルシウム、キトサン(脱アセチル化したポリ-N-アセチルグルコサミン)、ゼオライト(ケイ素、アルミニウム、ナトリウム、マグネシウム、および石英の酸化物)、キチン(アセチル化ポリ-N-アセチルグルコサミン)、ウシ凝固因子、非ゼオライト鉱物(例えば、疎水性ポリマーおよびカリウム塩)、および植物源由来のモレキュラーシーブ材料(例えば、TraumaDEX(商標)、Arista(商標)AHなど、Medafor, Inc., Minneapolis, MN)を含むものが挙げられる。しかし、これらの止血剤が全て、あらゆる種類の出血の治療に勧められるとは限らず、当業者は本開示の組成物および方法で用いる止血剤を適宜選択しなくてはならないことに注意すべきである。例えば、ゼオライトは外用のみを対象とする。

30

#### 【0088】

本発明の一部の実施形態では、ケラチン誘導体を含有するゲルが使用される。これらの実施形態のゲルは組織に付着し、親水性である。一部の実施形態では、創傷の出血面の上に置くと、ゲルは、たとえ活動性の出血があっても、十分に付着して洗い落とすことができない。一部の実施形態では、ゲルは血液から液体を吸収し、さらに一層付着するようになる(例えば、投与後数分以内に)。血液を伴う一部の実施形態のゲルの接触は、おそらく血小板の活性化および/または凝固因子の濃度によって、血栓形成を引き起こし得る。また、特定の理論に縛られることを望むものではないが、一部の実施形態の付着ゲルは、創傷部位に物理的なシールを形成することができ、凝血によく似た、細胞浸潤および肉芽様組織形成のための多孔質スキャフォールドをもたらすと考えられる。

40

#### 【0089】

一部の実施形態では、ケラチン組成物は直接出血部位に適用される。一部の実施形態では、ケラチン組成物は、例えば、大量出血の部位への明確な接近手段がない場合に、被験体の身体に注射されて出血の内部部位を治療する。

#### 【0090】

50

ケラチンバイオマテリアルを含有する創傷治癒組成物および創傷治癒を促進する方法。本発明の態様は、創傷を治療するために有効な量で創傷にケラチン誘導体を局所適用することを含む、治療を必要とする被験体において、創傷（例えば、熱傷、擦過傷、裂傷、切開、褥瘡、穿刺創、貫通創、銃創、圧挫損傷など）を治療する方法である。一部の実施形態では、ケラチン誘導体は、上に記載されるものなどの、ケラトース、ケラトース、ケラトース、酸性ケラトース、酸性ケラトース、塩基性ケラトース、塩基性ケラトース、ケラテイン、ケラテイン、ケラテイン、酸性ケラテイン、酸性ケラテイン、塩基性ケラテイン、塩基性ケラテインなど、またはその組合せを含むか、それらからなるか、またはそれらから本質的になる。

#### 【0091】

ケラチン誘導体は、乾燥粉末製剤として局所適用することができ、または、一部の実施形態では、水性担体中で（例えば、ゲルの形態で）適用することができる。一部の実施形態では、ケラチン誘導体は、軟膏（乳濁液中の油の量が水の量を上回る油中水調製物）中に提供されてもよいし、クリーム（乳濁液中の水の量が油の量に等しいかそれを上回る水中油調製物）中に提供されてもよい。一部の実施形態では、ケラチン誘導体は、損傷の内部部位に達するように皮膚の下に注射される。

#### 【0092】

本明細書に記載される方法および組成物で処理される「被験体」（または「患者」）には、ヒト被験体と獣医学目的の動物被験体（特に、イヌ、ネコ、ウマ、サルなどのその他の哺乳類被験体）の両方が含まれる。ヒト被験体が特に好ましい。被験体は雄性であっても雌性であってもよく、新生児、乳児、年少児、青少年、成人、および高齢者被験体を含む、あらゆる年齢であってもよい。

#### 【0093】

本発明で治療することのできる創傷の例には、熱傷創が含まれる。熱創傷は、熱、化学物質、日光、電気、放射線などに起因する組織損傷である。熱に原因する熱傷（または温熱熱傷）が、最も一般的である。化学熱傷は温熱熱傷に似ている。熱傷創は皮膚に生じる傾向が最も多いが、その他の身体構造が罹患する可能性もある。例えば、重度の熱傷は脂肪、筋肉または骨まで浸潤する可能性がある。

#### 【0094】

創傷は、損傷の深さで特徴付けられることが多い。例えば、熱傷の程度は、損傷した組織の深さによって、I度、II度またはIII度として特徴付けられる。I度の熱傷では、皮膚の上層（表皮）のみが損傷している。II度の熱傷では、皮膚の中層（真皮）が損傷している。最後に、最も重度な種類のIII度の熱傷では、損傷は皮膚の内（脂肪）層に影響を及ぼすのに十分深い。同様に、皮膚の褥瘡は、ステージI（皮膚が赤く、損傷はない、徐圧しても紅斑が薄くならない）、ステージII（表皮が損傷され、多くの場合真皮への浸潤を伴う）、ステージIII（真皮の損傷）、およびステージIV（皮下組織が露出）として特徴づけられる。

#### 【0095】

褥瘡創傷では、圧迫によって生じる局所毛細血管の収縮の結果、罹患した皮膚に虚血が生じる。同様に、熱傷創は関連する毛細血管の血栓症に起因する虚血である。糖尿病性潰瘍が、灌流不全の創傷のもう一つの例である。血液が容易に利用できず正常な過程の創傷治癒に役立たないこれらの種類の創傷に関して、一部の実施形態では、創傷部位に物理的なシールを提供するためだけでなく、凝血によく似た、細胞浸潤および肉芽様組織形成のための多孔質スキャフォールドをもたらすために、ケラチン誘導体を含有する組成物が有用である。

#### 【0096】

創傷は、最初の侵襲の後に組織損傷範囲が大きくなるという点で、進化する損傷であり得る。例えば、熱傷創は、一般に、3つのゾーン、壊死のゾーン、損傷のゾーン、および充血のゾーン、に特徴付けられる、進化する損傷であり得る。壊死のゾーンは、外部からの侵襲（例えば、熱または化学的侵襲）を直接受ける範囲であり、不可逆的に損傷した組

10

20

30

40

50

織を含む。損傷のゾーンは、壊死のゾーンの末梢であって、壊死のゾーンの低位にある。組織は初めは生存可能であるが、脆弱である。典型的な熱傷では、壊死のゾーンの範囲は、損傷のゾーンの組織が損傷してゆくにつれて増加する。用語「創傷変化」は、損傷のゾーンが壊死のゾーンに達し、全体的な創傷の範囲が増加するプロセスを表す。例えば、Daynes et al. に対する米国特許第5,583,126号を参照されたい。充血のゾーンは、損傷のゾーンの末梢であって、損傷のゾーンの低位にある。それは細胞損傷は最小限であるが、血管が拡張している。

【0097】

特定の理論に縛られることを望むものではないが、本明細書に開示されるケラチン誘導体は、創傷変化に起因する創傷の増大を抑制する（例えば、治療を行う、かつ/または治療を行わない、組織損傷の重症度を観察することにより決定される経時的な損傷範囲により測定される）のみならず、創傷治癒を促進、かつ/または加速もする（例えば、測定された創傷範囲は治療とともに経時的により速い速度で減少する、創傷は治療によってより速い速度で治癒されたとみなされる、など）と考えられる。表在性創傷および中間層（partial-thickness）創傷に関する通常の治癒の経過は、軽度の収縮を伴うまたは伴わずに、創傷の表面の既存の基底細胞から上皮が再生することによる。深い創傷は、上皮の再生と収縮の組合せによって治癒する。収縮は創傷の範囲を小さくするのに役立ち、上皮は創傷の周縁部から生成する。

【0098】

一部の実施形態では、ケラチンバイオマテリアルは、線維芽細胞（例えば、皮膚線維芽細胞）および/またはケラチノサイト（例えば、上皮ケラチノサイト）の増殖を強化することによって創傷治癒を促進する際に有用である。例えば、Baetge et al. に対する米国特許第6,673,603号およびHerstein et al. に対する米国特許第5,840,309号を参照されたい。特定の理論に縛られることを望むものではないが、線維芽細胞および/またはケラチノサイトの増殖の強化は、ケラチン調製品の中に天然に見出される増殖因子により促進されると考えられる。

【0099】

一部の種類の創傷では、治療は出血の制御を含む。例として、擦過傷、裂傷、切開、貫通創、および圧挫損傷などは出血を伴う場合が多い。圧挫損傷は、例えば、開放創（すなわち、皮膚が裂け、組織が環境に露出している場合）、または閉鎖創（すなわち、皮膚は無傷であるが、その下にある組織が損傷している場合）を含み得る。

【0100】

擦過創は、皮膚の表皮が剥がれ落ちた表在性の創傷である。擦過創は、例えば、粗い表面の上に転落することにより引き起こされ得る。裂傷は一般に、例えば、硬組織（例えば、骨）の上にある軟組織（例えば、皮膚）への鈍い衝撃により引き起こされる、または、軟組織の断裂（例えば、出産に関連する裂傷）を伴う、不規則な創傷である。裂傷は一般に架橋を示し、そこでは結合組織および/または血管は、その下にある硬組織の表面に対して平らになっている。時には、鋭い物体により引き起こされる損傷も裂傷と呼ばれる。鋭い物体により引き起こされた損傷の場合、結合組織および血管が切断されるので、通常、架橋は存在しない。

【0101】

切開または切創は通常、清潔な鋭い刃の物体により引き起こされる。表在性の切開（表皮のみを伴う）は、一般に「切り傷（cut）」と呼ばれる。切開は、ナイフ、剃刀、ガラスの破片などにより引き起こされ得るか、または、外科手術またはその他の医療処置中にメスにより引き起こされ得る。貫通創は、身体に侵入する物体（例えば、ナイフ）により引き起こされる。穿刺創は、皮膚を穿通する物体、例えば針または釘により引き起こされる。銃創は、身体に入り、中を通り、時には通り抜ける弾丸により引き起こされる。

【0102】

創傷損傷は、感染のリスクを有する。一部の実施形態では、創傷治癒組成物には、抗菌剤が含まれる。局所適用することのできる抗菌剤の例としては、限定されるものではない

10

20

30

40

50

が、バシトラシン（例えば、400～500 U/gの軟膏）、硫酸ポリミキシンB（例えば、5,000または10,000 U/gの軟膏）、ネオマイシン（例えば、3.5 mg/gの軟膏）、Polysporin（登録商標）抗生物質（軟膏基剤中の硫酸ポリミキシンBおよびバシトラシンの混合）、Neosporin（登録商標）抗生物質（軟膏基剤中のネオマイシン、バシトラシンおよび硫酸ポリミキシンBの混合）、ポビドンヨード、スルファジアジン銀（例えば、1%のクリーム）、酢酸マフェニド（例えば、0.5%クリームとしての、局所用メチル化スルホンアミド化合物）、ナイスタチン（殺真菌薬）、ニトロフラゾン（例えば、0.2%）およびゲンタマイシン（例えば、0.1%のクリーム）が挙げられる。抗菌溶液としては、これに限定されるものではないが、酢酸（例えば、0.5%または0.25%）、次亜塩素酸ナトリウム（デーキン液、例えば、0.5%または0.25% NaOCl）、硝酸銀（例えば、0.5%）、およびグルコン酸クロルヘキシジン（例えば、0.5%）が挙げられる。一部の実施形態では、創傷治癒組成物には付加的な創傷治癒成分が含まれる。一部の抗菌剤は、殺菌剤または殺真菌薬などとしての効果とは別の機構によって、創傷治癒も促進すると考えられる。例えば、米国において最も慣用されている熱傷の局所治療薬である、スルファジアジン銀は、この二重効果を有するという証拠がある（Ward R S and Saffle Jr, Physical Therapy 1995; 75(6)526-38）。

#### 【0103】

一部の実施形態では、創傷治癒組成物には、疼痛緩和のための鎮痛薬または麻酔薬、界面活性剤、抗炎症薬などが含まれる。例えば、Millerに対する米国特許第6,562,326号を参照されたい。

#### 【0104】

本明細書に開示されるケラチン組成物は、出血の制御と創傷治癒の促進の両方において有用である。この組成物は開放創と閉鎖創の両方に有用である。閉鎖創の場合、ケラチンは、例えば、シリンジでの注射により、または加圧キャニスタから、創傷部位に適用することができる。鈍的外傷の場合、ケラチン組成物は、例えば、腹部内に皮膚を通じて内出血の部位へ注入することができる。しかし、当業者の理解するように、組織腫脹を考慮して過膨張および起こり得る組織および/または器官の損傷を避けるようにしなければならない。腫脹を軽減する方法、例えば低温（例えば、冷水、氷など）での治療および罹患部位の拳上も用いてよい。

#### 【0105】

創傷に適用されるケラチン材料の用量は、被っている特定の創傷、被験体の年齢および全体の状態、投与経路などによって決まり、既知の技法に従って最適化することができる。一部の実施形態では、投薬量は、その意図される使用に応じて、ケラチン誘導体の0.1または0.5または1から100または200または300グラム、またはそれ以上（例えば、粉末でまたは水性担体中で）である。一部の実施形態では、ケラチンは0.001～10 mg/mL、または0.01～5 mg/mLの濃度で提供される。一部の実施形態では、ケラチンは、0.1%～80%（w/v）、または1%～50%（w/v）、または5%～30%（w/v）の濃度で提供される。

#### 【0106】

一部の実施形態では、創傷は、ゲル、クリームまたは軟膏の形態のケラチン調製物の適用により治療される。創傷（The wound）はまた、ケラチン（および所望によりその他の添加剤）が一般にその粉末形態で水性担体（例えば、蒸留水または生理食塩水）に添加され、包帯材（例えば、ガーゼ）をその水性調製物に浸漬し、創傷の上に置く、「湿潤（wet-to-moist）」包帯法により治療されてもよい。水性調製物は包帯材が乾燥するのを防ぐために必要に応じて再適用されるべきである。あるいは、ケラチン調製物は、Blanchard et al.に対する米国特許第6,274,163号に記載されるようなシート状の創傷被覆材として形成されてもよい。さらなる実施形態では、ケラチン調製物は、スプレー用として製剤される（例えば、エアゾールポンプで創傷の上に噴霧されることのできる水性調製品などの溶液）。

10

20

30

40

50

## 【0107】

一部の実施形態では、創傷は、例えば、1日に数回、または必要に応じて本開示の組成物を再適用することにより治療される。細菌を除去するための清浄、および壊死組織片を除去するためのデブリードマンも治療の経過中に保証され得る。デブリードマンを補助するために、保湿クリームまたは軟膏を適用して創傷焼痂を軟化してよい。

## 【0108】

外科用または救急医療用補助具。本発明のもう一つの態様は、固体の生理学的に許容される支持体および該支持体上のケラチン誘導体を含む、外科用または救急医療用補助具である。「支持体」には、スポンジ、パッキング、創傷被覆材（例えばガーゼまたは包帯）、縫合糸、織物、および補綴材が含まれる。

10

## 【0109】

ケラチン誘導体を含むキット。本発明のもう一つの態様は、容器中のケラチン誘導体を含む、それからなる、またはそれから本質的になるキットである。ケラチン誘導体は、好ましくは滅菌形態で容器に包装されている。キットには、生理学的に許容される支持体、例えばスポンジ、パッキング、創傷被覆材（例えばガーゼまたは包帯）、縫合糸、織物、および補綴材が含まれてよい。

## 【0110】

本発明の実施形態は、以下の限定されない例においてさらに説明される。

## 【実施例1】

## 【0111】

ケラチン誘導体 / 画分

ケラトース画分は、Alexanderおよび共同研究者の方法に基づく方法を用いて得た。しかし、実質的にはこの方法を修正してペプチド結合の加水分解を最小限にした。要するに、地元の理髪店から収集した50グラムの清浄な乾燥した毛髪を、室温にて12時間、1000mLの、2w/v %過酢酸(PAA)水溶液と反応させた。500ミクロンの篩を用いて酸化した毛髪を回収し、多量のDI水ですすぎ、過剰な水を除去した。1000mLの100mM Trizma(登録商標)塩基を用いて、その酸化した毛繊維からケラトースを抽出した。3時間後、毛髪を篩により分離し、塩酸(HCl)を1滴ずつ添加することによりその液体を中和した。1000mLの0.1M Trizma(登録商標)塩基および1000mLのDI水をそれぞれ用いるその後の2回の抽出で、さらなるケラトースを残っている毛髪から抽出した。各回、毛髪を篩で分離し、その液体をHClで中和した。3回全部の抽出物を混合し、遠心分離し、濾過によって残留固形材料を除去した。混合した抽出物を、1kDa公称低分子量カットオフ膜を用いるDI水に対する接線流透析により精製した。溶液を濃縮し、凍結乾燥させて、粗ケラトース粉末を製造した。

20

30

## 【0112】

ケラチン画分は、Goddard and Michaelisにより記載される方法の修正法を用いて得た(J Biol Chem 1934; 106: 605-14)。要するに、毛髪を、37にて24時間、1M TGAの水溶液と反応させた。TGA溶液のpHは、飽和NaOH溶液を1滴ずつ添加することにより、pH10.2に調整しておいた。抽出溶液を濾過し、還元毛繊維を除去し、保持した。1000mLのpH10.2の100mM TGAで24時間、1000mLのpH10.2の10mM TGAで24時間、そしてpH10.2のDI水で24時間、順次抽出することにより、さらなるケラチンを繊維から抽出した。各々の抽出の後、溶液を遠心分離し、濾過し、透析系に付加した。最終的に、全ての抽出物を混合し、1kDaの公称低分子量カットオフ膜でDI水に対して透析した。溶液を濃縮し、pH7に滴定し、約5%の総タンパク質濃度で4にて保存した。あるいは、濃縮した溶液を凍結乾燥させ、窒素下で冷凍保存してもよい。

40

## 【0113】

分画の直前に、ケラトース試料を超純水に再溶解し、希HCl溶液を添加することによ

50

り pH 6 に滴定した。ケラチン試料も同様に希 HCl 溶液を注意深く添加することにより pH 6 に滴定した。試料を、DEAE-Sephrose (登録商標) (弱アニオン性) または Q-Sephrose (登録商標) (強アニオン性) 交換樹脂 (50~100 メッシュ、Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI) のいずれかを含む 200 mL フラッシュクロマトグラフィーカラムに、穏やかな圧力で負荷し、フロースルー (酸性ケラチン) を回収した。pH 6 の少量の 10 mM Trizma (登録商標) 塩基 (約 200 mL) を用いて試料を完全に洗浄した。pH 12 の 100 mM トリス塩基 + 2 M NaCl を含むカラムから塩基性ケラチンを溶出させた。各々の試料を別々に中和し、1 kDa の LMWCO を用いる接線流透析を用いて DI 水に対して透析し、回転蒸発によって濃縮し、フリーズドライした。

10

## 【0114】

既に記載されるように、 $\alpha$ -ケラトースのサンプルを製造し、DEAE-Sephrose (登録商標) IEX カラムで酸性および塩基性画分に分離し、PBS に溶解し、pH を 7.4 に調整した。これらの溶液を 5 重量パーセント濃度で調製し、その赤血球 (RBC) 凝集特性を、新鮮なヒト全血を用いて 1:1 比で混合することにより肉眼で見て評価した。20 分後に試料を採取し、光学顕微鏡により評価した。イオン交換クロマトグラフィーは、凝集現象の分離に非常に有効であった (データは示さず)。塩基性  $\alpha$ -ケラトースには、血液細胞との相互作用が本質的になく、一方、酸性  $\alpha$ -ケラトースは、過剰な凝集をもたらした。

20

## 【0115】

酸性および塩基性  $\alpha$ -ケラトース、未分画の  $\alpha$ -ケラチン、未分画の  $\alpha$ -ケラトースおよび  $\alpha$ -ケラトース (キューティクルから得たもの) の試料を、リン酸緩衝食塩水 (PBS) 中、約 4 w/v% および pH 7.4 にて調製した。試料を粘度および RBC 凝集について試験した。これらの結果を表 1 に示す。

## 【0116】

## 【表 1】

表 1. ケラチン溶液での粘度および RBC 凝集試験の結果。pH7.4 の PBS 中、液体製剤が約 4w/v% で調製され、ヒト全血を 1:1 の比で用いて試験した。		
試料説明	粘度(センチポアズ)	RBC 凝集*
酸性 $\alpha$ -ケラトース(1X AIEx)	5.65	3
酸性 $\alpha$ -ケラトース(2X AIEx)	19.7	5
塩基性 $\alpha$ -ケラトース	1.57	2
$\alpha$ + $\gamma$ -ケラトース (加水分解)	1.12	1
$\alpha$ + $\gamma$ -ケラチン (未分画)	1.59	2
*凝集の程度:1=なし、5=高		

30

## 【実施例 2】

## 【0117】

動物モデルにおける細胞増殖および創傷治癒

いくつかの生体内および生体外研究を行ってケラチンバイオマテリアルの生物活性を実証した。それには、人毛に由来するケラチンタンパク質を使用して、酸化および還元反応を用いて、以下の方法に従って、皮膚の三次構造を分解し、可溶性タンパク質を抽出することが含まれた。

## 【0118】

人毛に由来するケラチンバイオマテリアルは、皮膚成分細胞の増殖挙動を媒介した。細胞培養実験では、ある種のケラチンが線維芽細胞およびケラチノサイトに対して分裂促進性であった。ケラチンに基づくヒドロゲルは、マウスおよびブタモデルにおいて、それぞ

40

50

れ、化学熱傷および温熱熱傷を不動態化することができることが示された。

【0119】

ケラトース。清浄な乾燥した毛髪を小さな繊維に切断し、過酢酸で酸化させた。遊離タンパク質を、変性溶液を用いて抽出し、中和し、透析により精製し、濃縮し、凍結乾燥により単離した。ヒドロゲルを、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で再水和することにより形成した。

【0120】

ケラテイン。清浄な乾燥した毛髪を小さな繊維に切断し、チオグリコール酸で還元させた。遊離タンパク質を、変性溶液を用いて抽出し、透析し、中和し、濃縮した。濃縮の際、粘稠なヒドロゲルが空気に曝されて生じた。

【0121】

細胞増殖。ケラトース粉末 (未分画のケラトース、 + ) を、数種類の濃度の血清を含むまたは含まない媒質に溶かし、ヒト皮膚線維芽細胞およびケラチノサイトを培養するために用いた。細胞を血清含有培地で約 50% のコンフルエンスまで増殖させ、ケラチン含有溶液に暴露する前の 24 時間、血清を欠乏させた。ケラチン含有培地での 24 時間の培養の後、ミトコンドリア代謝アッセイを用いて (MTTアッセイ) 細胞増殖を評価した。ケラチノサイトおよび線維芽細胞を用いる細胞増殖アッセイは、ケラトース処理群に統計上有意な増加を示した (図 1)。

【0122】

創傷治癒。免疫適格マウスを脱毛し (de-haired)、フェノールを用いて両肩の間に化学熱傷を誘導した。創傷を 20 分後にケラチンヒドロゲルと密封包帯で処置した。使用したケラチンは未分画の ( + ) ケラトースであった。包帯は最大 10 日間、3 日おきに交換した。創傷のデジタル写真を撮影し、組織学検査のために創傷範囲を切除することができるように様々な時点で動物を犠牲にした。マウスにおける創傷治癒調査により、化学熱傷の興味深い不動態化が実証された。図 2 は、最初に創傷範囲が増大する、密封包帯だけで処置した創傷における創傷の進行の正常な過程を示す。これは、末梢組織の血管による支持が破壊され、その後、創傷の周縁部での壊死が続くことに起因する。この結果、創傷範囲の特徴的な増殖が起こる。しかし、ケラチン処置群では、損傷の発生時に創傷範囲が安定化する傾向があった。これは、罹患率、および / または、最初の血管の支持の喪失に対向する血管形成の迅速な誘導を制限する防御機構に起因すると考えられた。

【0123】

その後の大型動物実験において、ブタを清浄して剃毛し、加熱した真鍮製のブロックを用いて背側正中線に沿って一連の深い中間層熱傷 (partial thickness burn) を作り出した。創傷は最大 27 日間、3 日おきに処置した。用いたケラチンは、未分画の ( + ) ケラトースおよび未分画の ( + ) ケラテインであった。創傷のデジタル写真を撮影し、組織学検査のために創傷範囲を切除することができるように様々な時点で動物を犠牲にした。この大型動物実験において、対照群と比較して、ケラチン処置が創傷の増大を抑制し、治癒を加速するという、上に詳述されるマウス実験から得た以前の知見が確認された (図 3)。

【実施例 3】

【0124】

動物モデルにおける出血の制御

ケラチンゲルの止血可能性を中程度に検証する (challenging) 動物モデルにおいて評価した。ケラチンゲルは未分画のケラテイン ( + ) を含んだ。肝臓損傷は、肝臓のサイズも創傷のサイズも増大するため、解決の難しいことで有名である。このウサギモデルは、大量および致死性の出血の両方を作り出すことができる。制御された肝臓の切離を、処置されない場合 (陰性対照) であれば瀉血をもたらすが、慣習的な止血剤が適用されると (陽性対照) 被験動物の回復をもたらす、一貫した一組の条件を確立する手段として使用した。注目すべきは、この実験で陽性対照として用いた止血剤が局所創傷に適応され、同時に圧することを必要とすることである。止血剤は、この実験では圧迫せず

10

20

30

40

50

に適用された。これは、ケラチンゲルとともに使用されなかったときに圧迫によって加わる寄与が交絡することを避けるために行われた。

#### 【0125】

合計16匹のニュージーランドウサギ(平均3.7kg)をこの実験に使用した。動物は、左中心葉の約3分の1の切離からなる標準化された肝臓損傷を受け、次いで4つの群のうちの1群に無作為化された。4匹の動物は陰性対照としての役割をして処置を受けず、4匹の動物はQuickClot(登録商標)止血剤での処置を受け、4匹の動物は、HemCon(登録商標)止血用包帯で処置され、さらに、4匹の動物は、ケラチンゲルで処置された。蘇生液は与えられず、全ての動物は外科手術の間嚴重にモニターされた。1時間後、手術創が閉じられ、動物は収容施設に移された。全ての生存している動物は72時間後に犠牲になった。屠殺の時点で、肝臓組織は組織学的分析のために回収された。

10

#### 【0126】

外科手術および術後の処置。全ての手順は、規制および認定機関のガイドラインを包含する、ウェイク・フォレスト大学の実験動物委員会のガイドラインに従って行った。動物は外科手術の直前に秤量した。全ての動物を、ケタミン10mg/kgとキシラジン4mg/kgの組合せを用いて筋肉内注射を通じて鎮静させ、挿管し、手順の残りを2~3%イソフランで維持した。次に、動物を背臥位に置き、剃毛し、監視装置に接続した。全ての動物に、ECGリード、尾部のパルスオキシメーター・カフ、および温度モニター用の食道内プローブを接続した。無菌で準備を行い、覆い布をかけた後、腹部の切開を行って肝臓を露出させた。肝臓損傷の前に、動物の腹部大動脈を露出させ、データ取得のためのPowerLab(登録商標)(ADInstruments)システムに次々に接続されている、圧力トランスデューサ(Lab-stat, ADInstruments Pty. Ltd. Castle Hill, Australia)に接続された23ゲージ針を用いてカニューレ処置した。この手順の間、平均動脈圧(MAP)を継続的に記録した。全ての動物を数分間モニターして、肝臓損傷の前に安定した状態にあることを確かめた。肝臓の中葉は十分な大きさがあり接近が容易であるので、それを損傷用に用いた。

20

#### 【0127】

モデル開発中の予備データは、未処置のまま放置すると死に至るが、対照材料で処置すると動物を救出することのできる、一貫した肝臓損傷の断面積を作り出すことができたことを示した。2.0cm<sup>2</sup>の表面積のリングを用いて、リングを通して左中心葉を引き出し、リングに直接隣接して外科用の刃で切断することにより、一貫したサイズの損傷を肝臓に負わせた。MAP、温度、心拍数、O<sub>2</sub>飽和、および脱血血液を、この手順全体にわたって、30秒、5、15、30、45および60分の時点で記録した。脱血血液は、肝臓損傷の下に置かれた、事前に秤量した滅菌外科用ガーゼを用いて、各時点で測定した。加えて、耳静脈からCBC用の血液試料を採取した。

30

#### 【0128】

全ての動物の4つの実験群に無作為化した。陰性対照群は処置を全く施さず、損傷を負わせた後、分単位で死亡時刻を記録した。その他の実験群については、MAPが出発値の半分まで下がる限り、5分の時点で処置を投与した。標準化のため、適用した止血材料を測定または秤量した。ケラチンゲルは圧迫を必要としないため、結果を混乱させないようにその他の処置群のいずれにおいても圧迫を用いなかった。HemCon(登録商標)止血用包帯処置群では、4.5x2.5cm包帯片をこの手順全体にわたって肝臓の出血面の上に置き、閉鎖の前に除去した。QuickClot(登録商標)止血剤処置群では、動物1匹あたり2.5グラムのオートクレーブ滅菌材料を用いた。材料を出血面に広げ、閉鎖後も生存動物の体内に放置した。ケラチン処置群の場合、動物1匹あたり2mlのゲルを用いた。滅菌ケラチンゲルを、1mlシリンジによって出血面に適用した。

40

#### 【0129】

ケラチンも、動物の縫合後に適所に放置した。これらのパラメータは、創傷部位の完全な被覆に基づいて最初のモデル開発中に決定された。生存動物に関して、60分間モニターを継続し、その後その動物は最初の外傷から生き残り、出血が停止したとみなされた。

50

HemCon (登録商標) 止血用包帯で処置された動物は、製造業者に指示されるように腹腔内に放置することができなかつたので材料を除去しなければならなかつた。大動脈カニューレを取り外し、挿入部位での止血が確立された。大動脈出血は、剖検の時点でいずれの動物においても観察されなかつた。腹部の筋膜および皮膚を2層に縫合した。腹部の完全縫合後、動物に回復させる時間を与え、収容施設に移動させた。そこで動物を麻酔から完全に回復するまでは15分おきに、その後3日間は1日3回モニターした。CBC分析のために、毎日全ての生存動物から血液試料を採取した。72時間の時点で犠牲にする際、各々の動物の肝臓を組織評価のために回収した。

#### 【0130】

提示される全てのデータは平均値および対応する標準偏差として表される。統計分析のため、SPSS v. 11 (SPSS Inc., Chicago, IL) を用いた。異常値は、修正zスコア (絶対偏差の中央値) を用いて、+3.0より大きい (larger than) または -3.0より小さいzスコアを有するものと規定した。全ての時点のデータを一元配置分散分析 (ANOVA) により分析した。有意なF値が見出された場合、それらの群をフィッシャーの最小有意差検定 (LDS) によりさらに分析した。p < 0.05のは、有意と見なした。タイプIエラーの確率を、限定比較により最小化し、陰性対照対3処置群のみを行った。死亡動物 (すなわち、60分の手術時間終了前に失血した動物) の早期脱落によって生じた偏りを補うために、既知の病態エンドポイントへの多項式回帰を用いて、最初の60分間の値を推定した。一部の群で統計的関連性に達した失血パーセントグラフのデータ (図5) に関して、値は平均とそれらの対応する標準誤差として表される。

#### 【0131】

陰性対照動物 (すなわち、処置なし) は、予想通り、60分の手術時間内に失血した (31 ± 19分)。QuickClot (登録商標) 止血剤群の2匹の動物と、HemCon (登録商標) 止血用包帯群の1匹は、最初の60分の手術時間を生き延びられなかつた。また、HemCon (登録商標) 止血用包帯群において、獣医学スタッフのアドバイスに基づいて、1匹の動物を手術後24時間の時点で安楽死させた。この動物は、歩行することができず、飲食できなかつた。ケラチン群の1匹の動物も48時間の時点で犠牲にした。この動物は、そのケージの中を自由に動いていたが、飲食しなかつた。剖検時、これらの動物は、手術時間後にさらに出血した形跡を示さなかつた。無事に回復した他のすべての生存動物は、24時間以内にケージの中を自由に動き回って、72時間までに正常なCBCを有した (データは示さず)。生存データの概要を図4に示す。

#### 【0132】

平均動脈圧。平均動脈圧 (MAP) は、腹部大動脈の下部に配置した23ゲージ針を用いて記録した。針は、PE50チューブに接続され、それは次に、圧力記録用のPowerLabシステムに接続された圧力トランスデューサ (Lab-stat) に接続された。この手順の全過程中、または動物が死亡するまで、MAPを継続的にモニターした。MAPおよび心拍数の変化の有意性をさらに評価するために、ショック指数を用いた。ショック指数は、外傷患者を迅速に評価するための十分に確立された臨床採点システムである。心拍数をMAP (mmHg) で除算することにより、修正ショック係数を算出した。

#### 【0133】

腹部大動脈の平均動脈圧を60分間記録した。ケラチンおよびHemCon (登録商標) 止血用包帯群の動物は、75%の出発値で5分後に安定なMAPを達成することができた。QuickClot (登録商標) 止血剤および対照群は、MAPを安定させることができず、60分後に出発値の45%まで低下した (図6)。しかし、これらのデータは、群間の統計的有意性には達しなかつた。

#### 【0134】

失血の重症度についての予測スコア評点システムである、ショック指数 (SI) は、最初の60分を通して低い値を有するケラチン群に対して有益な結果を示した (図7)。QuickClot (登録商標) 止血剤の高い値は、最初の20分の観察中の2匹の早期死亡

10

20

30

40

50

に合致し、この尺度の予測的性質を裏付ける。傾向に注目したが、これらのデータは、本実験において統計的有意性には達しなかった。

#### 【0135】

温度、ECGおよび心拍数。手術室モニターに接続された食道プローブを用いて、中心温度を記録した。この手順全体にわたって動物の体温を継続的にモニターし、前述の時点で記録した。ECGおよび心拍数は、手術室モニターに接続された3つのリードシステムを用いてモニターし、全手順を通して維持した。フラットライン、または電気機械解離での不規則な電気活動を用いて死亡時間を定義した。

#### 【0136】

この実験に用いた肝臓損傷モデルは、有意で急速な失血を伴う重度の外傷を示した。肝切離は致命的損傷を生じ、一般に直径約1mmの1または2本の大血管および0.5~1.0mmの範囲の直径の数本を含んだ。損傷の重症度は、未処置のウサギ全てが、60分の手術時間内に失血するようなものであった。これらの動物はいずれも、血液量の喪失を心拍数の増加によって補償することができなかった。全ての動物が263bpmから、30分後には188bpmおよび1時間後には154bpmへの、匹敵する減少を示した。群間に統計上の有意差はなかった。しかし、ケラチン群は、補償および回復に向かう傾向を示し、30分~60分の手術時間の後半に心拍数が増加した。全ての動物の体温は、同様に低下し、最初の5分間に0.8、そして60分にわたって合計2.7の段階的降下であった。実験群間に統計上の有意差はなかった。

#### 【0137】

脱血血液。脱血血液は、事前に計量したガーゼの重量を減算した後の重量で測定した。各時点で重量を記録し、肝臓損傷の下に新しいガーゼを置いた。脱血血液は、各々の動物のもとの体重に対するパーセントとして表した。CBCは、HEMA Vet (登録商標) 多種血液検査システム (multi-species hematology system) (Model 950FS, Drew Scientific, Dallas, TX) を用いて、耳静脈より採取した試料から決定した。

#### 【0138】

止血不能の出血実験において予測されたように、全ての動物が大量出血の初期相に続いて、MAPの降下につれて出血速度の低い線形相を示した(図5)。ケラチンおよびQuickClot (登録商標) 止血剤群の陰性対照に対する比較は、30、45および60分の時点での失血量の有意な低下を示す(ケラチン対陰性対照に関するp値は、それぞれ、0.018、0.011および0.007であり、QuickClot (登録商標) 止血剤対陰性対照に関するp値は、それぞれ、0.009、0.005および0.004であった)。

#### 【0139】

予想されるように、動物の生存性は、たとえ離断した総表面積を制御したとしても動物ごとに一貫しない、損傷部位の脈管解剖学に依存すると思われる。単一の非常に大きな出血血管(>1mm)、または多数の大きな出血血管(1mサイズ範囲のもの、>2~3)が損傷範囲内に発生した場合、その動物が生存する可能性は、QuickClot (登録商標) 止血剤およびHemCon (登録商標) 止血バンテージ群ではごくわずかであった。特にQuickClot (登録商標) 止血剤群では、単一の非常に大きな出血血管または2~3本を越える大きな出血血管は、確実に致死性である。しかし、留意すべきは、製造業者の指示に従って、圧迫を伴って使用した場合、その他の実験は、QuickClot (登録商標) 止血剤およびHemCon (登録商標) 止血用包帯を用いてより良好な生存率を示していることである。同様に圧迫せずに用いたケラチンゲルでの処置の場合は全て、切断された血管のサイズに関わらず、動物は少なくとも24時間生存した。全ての試験群において少数の動物が用いられたが(n=4)、これらの結果は有望である。

#### 【0140】

ケラチン止血ゲルは、各々の結果判定法、特に脱血血液量、MAP、および(重要なことには)生存により、一貫してよく機能した。特に顕著な1つの結果はショック指数であ

10

20

30

40

50

った。出血の大部分の例では、心拍出量が増大して血圧の低下を補う。ひとたびこの機構が支配的になると、ショック指数の値は急速に増大し生存性が疑わしくなる。顕著なことに、ケラチン処置群のショック指数は、初期の効果的な止血に一致して、試験した全ての材料の最低のままであった。

#### 【0141】

組織学。損傷した肝臓表面を含む組織試料は、安楽死から1時間以内に各動物から取り出した。各々のサンプルをTissue-Tek(登録商標)O.C.T.Compound 4583(Sakura(登録商標))に入れ、液体窒素中で凍結させた。それらの凍結ブロックを、クリオスタット(Model CM1850, Leica Microsystems, Bannockburn, IL)を用いて、肝臓の離断部分を含むように8 $\mu$ m切片に切片化し、顕微鏡スライドの上に載せた。スライドを固定し、ヘマトキシリンおよびエオシン(H&E)で染色した。QuickClot(登録商標)止血剤切片とHemCon(登録商標)止血用包帯切片の両方に関して切断の点で技術的困難が生じた。脆弱なQuickClot(登録商標)止血剤は、水平な切片化を困難にし、切片に空隙を作った。HemCon(登録商標)止血用包帯は、腹部縫合前に取り外し、そのため、凝固した血液は部分的にしか見えなかった。デジタル画像を様々な倍率で撮って(Zeiss Axio Imager M1 Microscope, Carl Zeiss, Thornwood, NY)、止血剤と肝臓の損傷範囲の相互作用を観察した。100倍の倍率は組織の全体的な応答を示し、一方、200倍および400倍の倍率を用いて細胞応答を視覚化した。

10

20

#### 【0142】

離断した肝臓表面を、H&E染色切片の光学顕微鏡法によって調べた。陰性対照群は、組織応答または壊死のない明瞭な切断部を示した(図8A)。さらに、機能性凝固は観察されず、表面に付着した血栓もほとんどなかった。QuickClot(登録商標)止血剤試料は、血塊中のこの硬い粒状ゼオライトの存在に起因して加工が困難であった。組織像は、血塊と混ざった壊死組織を示した(図8B)。透明な範囲は、加工中に除去されたQuickClot(登録商標)止血剤粒子を表す。HemCon(登録商標)止血用包帯群は、凝血を含む一部の範囲および隣接する細胞の浸潤を示した(図8C)。HemCon(登録商標)止血用包帯は、60分後に除去したので、大部分の肝臓表面は、血塊の薄層しか有さなかった。ケラチン群は、損傷した肝臓表面に付着したバイオマテリアルの厚い層を示した(図8D)。細胞浸潤を伴う肉芽様組織が、ケラチンバイオマテリアルゲルの細孔内で形成された(図9)。

30

#### 【0143】

ケラチン止血ゲルは、組織に付着し、親水性であった。出血している肝臓表面に置くと、たとえ大量出血があっても、それは十分に付着して洗い落とすことができなかった。このゲルは、血液から液体を吸収し、投与後数分以内にさらに一層付着した。凝固および付着は、ほぼ接触と同時に起こった。興味深いことに、ケラチンゲルは、72時間までに創傷部位上に肉芽様組織の厚いシールを形成した。組織切片を検査すると、損傷から3日後、ゲルに浸潤している宿主細胞を見ることができた。これらの実験で用いたケラチンゲルは、2つの目的に役立つと考えられる。第一に、このゲルと全血の接触は、おそらく血小板活性化または凝固因子の濃縮により、血栓形成を引き起こす。第二に、この付着性ゲルは、創傷部位に物理的なシールを形成し、凝血によく似た、細胞浸潤および肉芽様組織形成のための多孔質スキャフォールドをもたらす。

40

#### 【0144】

前述の内容は本発明を例証するものであり、それを限定するものと解釈されるべきでない。本発明は添付の特許請求の範囲により規定され、特許請求の範囲の均等物もその中に含まれる。

【 図 1 】

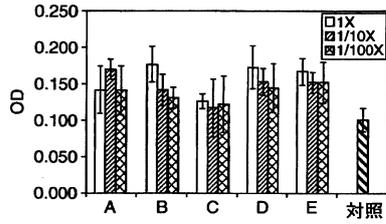


FIG. 1A

【 図 2 】

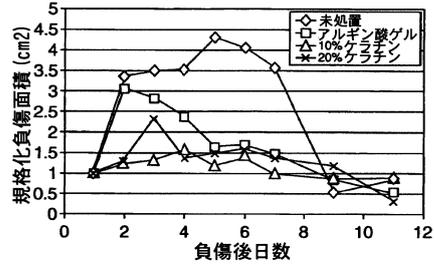


FIG. 2

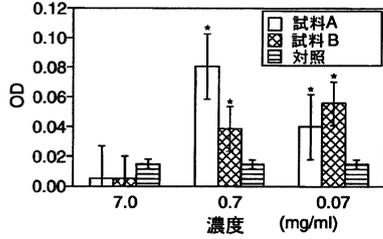


FIG. 1B

【 図 3 】

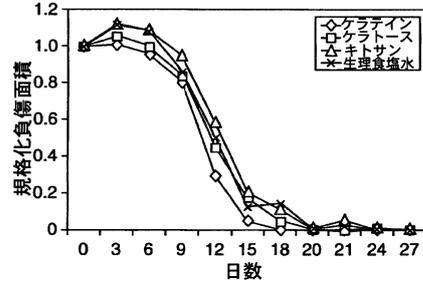


FIG. 3

【 図 4 】

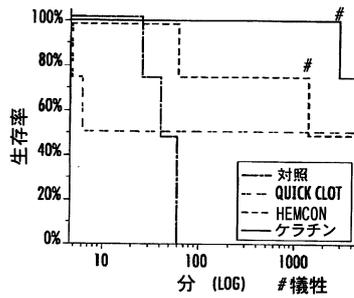


FIG. 4

【 図 6 】

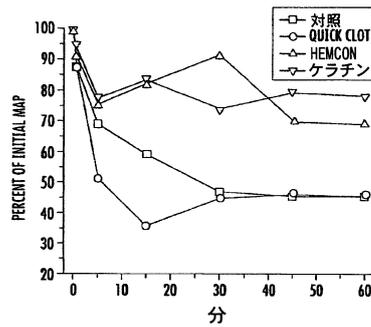


FIG. 6

【 図 5 】

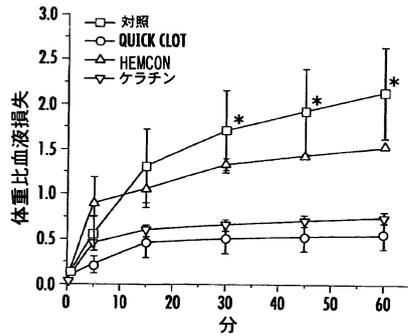


FIG. 5

【 図 7 】

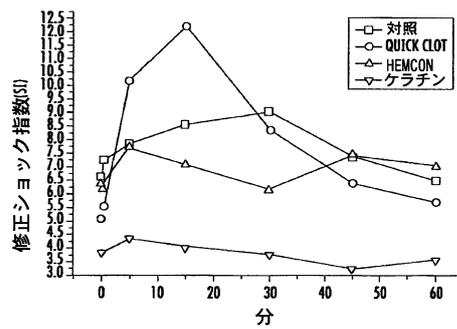
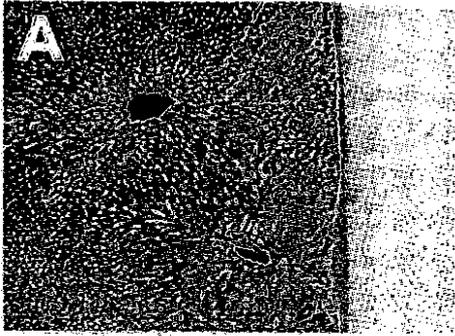
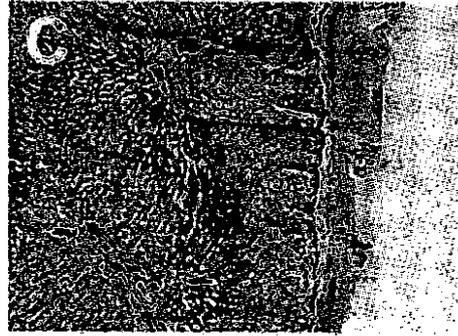


FIG. 7

【図 8 A】



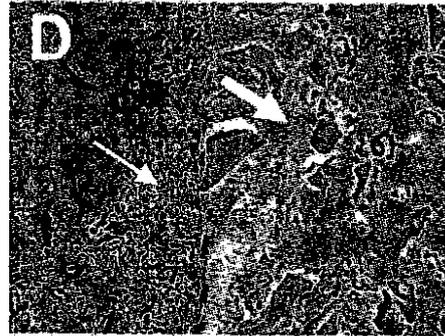
【図 8 C】



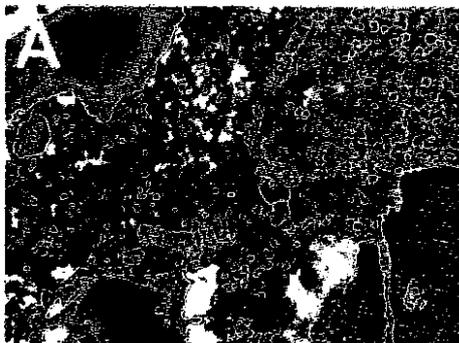
【図 8 B】



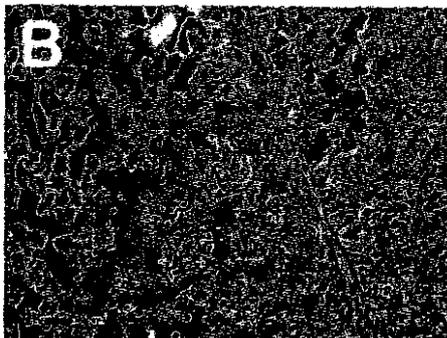
【図 8 D】



【図 9 A】



【図 9 B】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I	
A 6 1 L	15/44	(2006.01)	A 6 1 L	15/03
A 6 1 L	17/00	(2006.01)	A 6 1 L	17/00
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00
A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 P	17/02

(74)代理人 100161001

弁理士 渡辺 篤司

(72)発明者 ヴァン・ダイク, マーク・イー

アメリカ合衆国ノースカロライナ州27104, ウィンストン セイラム, グリーンハースト・ロード 1003

合議体

審判長 大宅 郁治

審判官 内藤 伸一

審判官 齋藤 恵

(56)参考文献 特表2005-528938(JP, A)  
特表2005-516072(JP, A)  
特開昭58-170721(JP, A)  
特開昭60-122568(JP, A)  
特表2003-516775(JP, A)  
欧州特許出願公開第454600(EP, A1)  
国際公開第01/19305(WO, A1)  
米国特許出願公開第2004/0076599(US, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K38/00-38/58

Caplus(STN), MEDLINE(STN), EMBASE(STN), BIOSIS  
(STN)