

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 746 300**

51 Int. Cl.:

A61K 38/48	(2006.01)
A61K 9/70	(2006.01)
A61K 38/00	(2006.01)
A61L 15/44	(2006.01)
A61K 47/30	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.05.2013 PCT/JP2013/063868**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.11.2013 WO13172468**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2013 E 13791568 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2019 EP 2851085**

54 Título: **Composición de proteína esterilizada mediante radiación**

30 Prioridad:

14.05.2012 JP 2012110390
14.05.2012 JP 2012110765
01.03.2013 JP 2013040593

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.03.2020

73 Titular/es:

TEIJIN LIMITED (33.3%)
2-4, Nakanoshima 3-chome, Kita-Ku
Osaka-shi, Osaka 530-0005, JP;
TEIJIN PHARMA LIMITED (33.3%) y
KM BIOLOGICS CO., LTD. (33.3%)

72 Inventor/es:

KAGEYAMA, YUKAKO;
FUJINAGA, KENTARO;
YAMAGUCHI, AYUKO;
HONDA, SUSUMU;
SATAKE, MAKOTO;
KANEKO, HIROAKI y
ISHIWARI, AYUMI

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 746 300 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCION

Composición de proteína esterilizada mediante radiación

5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a una composición estéril de una proteína que conserva su función ya que está contenida en un poliéster alifático.

10 ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

15 Las proteínas naturales y sintéticas son cada vez más importantes como medicamentos. Cuando se usan para aplicaciones médicas, sus productos deben esterilizarse. Como medio de esterilización, se conocen la esterilización por calor en un autoclave, la esterilización con radiación ionizante como un rayo y o un haz de electrones, la esterilización por gas con un gas de óxido de etileno, la esterilización por plasma con peróxido de hidrógeno, y la esterilización por separado usando un esterilizante químico que comprende una formulación o un filtro de glutaraldehído. Sin embargo, las actividades de proteínas como las proteínas bioactivas se reducen por esterilización con calor o radiación. La esterilización con óxido de etileno tiene posibilidades de que pueda producirse un subproducto por una reacción química y que un gas residual altamente tóxico pueda afectar adversamente al cuerpo humano. La esterilización con un esterilizante químico tiene el problema de que se debe tener en cuenta la resistencia a un esterilizante de una proteína y los cambios en el pH, la intensidad de los iones y la temperatura. Luego, para fabricar productos farmacéuticos y médicos que contengan o inmovilicen una proteína, sus procesos de producción deben realizarse completamente en condiciones estériles y se requiere una enorme cantidad de costos de producción.

25 Aunque una solución que contiene una proteína se someta a esterilización separada con un filtro, es difícil aplicar esta esterilización separada a una composición que contiene partículas grandes o una composición sólida o semisólida.

30 La EP0437095 enseña que un producto de celulosa oxidada neutralizada combinado con heparina o un fragmento de heparina (nORC) puede esterilizarse mediante irradiación con rayos gamma. Sin embargo, este documento no enseña la esterilización de ORC o n-ORC a la que está unida una proteína.

35 La EP0562864 divulga una sustancia para el cuidado de heridas compuesta que contiene una matriz de esponja de colágeno, un segundo polímero bioabsorbible como una fibra dispersa de celulosa regenerada oxidada (ORC) y un agente activo como un péptido. Este documento enseña que el agente activo puede estar contenido en la matriz, el polímero bioabsorbible o ambos y que la sustancia de esponja compuesta puede esterilizarse mientras está envasada.

40 La US5730933 divulga un método para esterilizar péptidos biológicamente activos con rayos gamma o irradiación con haz de electrones sin la pérdida de la actividad biológica del péptido. Este método es una tecnología que comprende los pasos de formar una mezcla de péptido biológicamente activo y una proteína extraña como gelatina, congelar o liofilizar esta mezcla e irradiarla. Este documento enseña que la existencia de la proteína extraña estabiliza el péptido y previene la reducción de la actividad del péptido.

45 La WO2000/033893 divulga un complejo de péptido terapéutico y un polisacárido seleccionado del grupo que consiste de celulosa regenerada oxidada, celulosa regenerada oxidada neutralizada, y mezclas de las mismas. Este documento enseña que cuando se formula el péptido junto con una cantidad eficaz del polisacárido antes de la esterilización con radiación ionizante, la actividad biológica del agente terapéutico peptídico no se pierde y se estabiliza si el péptido se esteriliza con radiación ionizante.

50 Sin embargo, estos documentos no sugieren que el cambio estructural, como la agregación y desactivación de una proteína que se produce durante la esterilización con radiación ionizante, pueda suprimirse por un poliéster alifático.

55 Por otra parte, la JP-A 2011-47089 divulga un proceso para producir una nanofibra que contiene enzimas que tiene una actividad enzimática excelente. En este proceso, una solución de hilado que contiene una enzima y un polímero disuelto en un solvente no acuoso se hila mediante un método de hilado electrostático para formar una nanofibra de zimógeno que luego se imparte con agua y se seca. Sin embargo, este documento no dice nada sobre la esterilización de la nanofibra que contiene enzimas.

60

DIVULGACIÓN DE LA INVENCION

65 La presente invención se define por las reivindicaciones. Es un objeto de la presente invención proporcionar una composición estéril que retenga la estructura y función de una proteína.

Los inventores de la presente invención realizaron estudios intensivos para resolver el problema anterior y descubrieron que, sorprendentemente, cuando una proteína está contenida en un poliéster alifático, el cambio estructural y el deterioro funcional de la proteína provocados por la esterilización con radiación y cualquiera o ambos del cambio anterior y el deterioro anterior provocado por el almacenamiento después de la esterilización con radiación pueden suprimirse. La presente invención se realizó en base a este descubrimiento.

Es decir, la presente invención es una composición estéril que comprende una proteína y un poliéster alifático que contiene la proteína y se esteriliza con radiación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1 muestra cada una de las actividades de trombina obtenidas midiendo los cuerpos moldeados de fibra tipo lámina que contienen trombina de la presente invención obtenidos en los Ejemplos 1 y 2, la película que contiene trombina de la presente invención obtenida en el Ejemplo 3, la partícula que contiene trombina de Ejemplo Comparativo 1 y el cuerpo moldeado de fibra tipo lámina que contiene trombina comparativo obtenido en el Ejemplo Comparativo 2 como las tasas de retención (%) de un valor después de la esterilización y un valor después de 1 mes de almacenamiento después de la esterilización en base a un valor inicial antes de la esterilización; y

La Fig. 2 muestra las cantidades de agregados de fibrinógeno obtenidos midiendo el cuerpo moldeado de fibra tipo lámina que contiene fibrinógeno de la presente invención obtenido en el Ejemplo 4 y la partícula que contiene fibrinógeno del Ejemplo Comparativo 3 cuando no se irradian, después de que se esterilizan (OM) y después de 1 mes de almacenamiento después de la esterilización (1M).

MEJOR MODO PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

La presente invención es una composición estéril que comprende una proteína y un poliéster alifático que contiene la proteína y se esteriliza con radiación.

La proteína usada en la presente invención no está particularmente limitada. Los ejemplos preferidos de la proteína incluyen proteínas hemostáticas tipificadas por fibrinógeno y trombina, enzimas tipificadas por asparaginasa, catalasa, superóxido dismutasa y lipasa, proteínas transportadoras tipificadas por hemoglobina, albúmina sérica y lipoproteínas de baja densidad, proteínas musculares tipificadas por actina y miosina, proteínas de defensa tipificadas por anticuerpos y complementos, proteínas de toxinas tipificadas por toxina diftérica, toxina botulínica y veneno de serpiente, hormonas de proteínas tipificadas por insulina, factores de crecimiento y citoquinas, proteínas de almacenamiento tipificadas por ovoalbúmina y ferritina, proteínas estructurales tipificadas por colágeno y queratina, y factores de crecimiento tipificados por factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), factor de crecimiento transformante (TGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), eritropoyetina (EPO), trombopoyetina (TPO), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF o FGF2) y factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). De estos, se prefieren particularmente enzimas, proteínas de transporte, proteínas musculares, proteínas de defensa, proteínas de toxinas, hormonas de proteínas, proteínas de almacenamiento, proteínas estructurales y factores de crecimiento. factor de crecimiento de fibroblastos básicos (bFGF o FGF2) y factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). De estos, se prefieren particularmente enzimas, proteínas de transporte, proteínas musculares, proteínas de defensa, proteínas de toxinas, hormonas de proteínas, proteínas de almacenamiento, proteínas estructurales y factores de crecimiento.

La proteína usada en la presente invención puede ser de origen animal o fabricada por una técnica de recombinación genética. Si es de origen animal, es preferiblemente de origen humano. La proteína fabricada por técnica de recombinación genética puede ser una variante obtenida reemplazando la secuencia de aminoácidos por otra secuencia de aminoácidos si la bioactividad esencial es la misma. También pueden usarse proteínas obtenidas modificando estas proteínas y mezclas de las mismas.

A la proteína usada en la presente invención, se le pueden añadir aditivos que son farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos preferidos de los aditivos incluyen el factor de coagulación sanguínea XIII, albúmina, isoleucina, glicina, arginina, ácido glutámico, fenilalanina, histidina, surfactantes, cloruro de sodio, alcoholes de azúcares (como glicerol, manitol, etc.), trehalosa, citrato de sodio, aprotinina, y cloruro de calcio. Se usa por lo menos uno seleccionado del grupo de estos.

La proteína usada en la presente invención o una mezcla de la proteína y los aditivos puede dispersarse en un poliéster alifático como moléculas, pero preferiblemente como partículas formadas mediante la agregación de las moléculas (pueden ser referidas como "partículas de proteínas", incluyendo las partículas mezcladas con los aditivos).

El poliéster alifático usado en la presente invención es preferiblemente un polímero bioabsorbible o biodegradable. Los ejemplos del polímero bioabsorbible incluyen ácido poliláctico, ácido poliglicólico, copolímero de ácido poliláctico-ácido poliglicólico, policaprolactona, copolímero de ácido poliláctico-policaprolactona, ácido poliglicerol sebácico, ácido polihidroxi alcanico, succinato de polibutileno y derivados de los mismos.

De estos, se prefieren el ácido poliglicólico, el ácido poliláctico, la policaprolactona, copolímeros de los mismos y mezclas de los mismos, y los más preferidos son el ácido poliláctico y el copolímero de ácido poliláctico-ácido glicólico. Por ejemplo, puede usarse un estereocomplejo de ácido poli-L-láctico y ácido poli-D-láctico.

El peso molecular del poliéster alifático usado en la presente invención es de 1×10^3 a 5×10^6 , preferiblemente de 1×10^4 a 1×10^6 , mucho más preferiblemente de 5×10^4 a 5×10^5 . La estructura terminal del polímero y un catalizador para polimerizar el polímero pueden seleccionarse arbitrariamente.

En la composición estéril de la presente invención, puede usarse otro polímero u otro compuesto en combinación siempre que el objeto de la presente invención no se vea afectado. Ejemplos de estos incluyen copolímeros, mezclas de polímeros y mezclas de compuestos.

El poliéster alifático usado en la presente invención tiene preferiblemente una pureza alta. Especialmente, los contenidos de aditivos y plastificante contenidos en el poliéster alifático y residuos como el catalizador residual, los monómeros residuales y el solvente residual usados para el moldeo y el post-procesamiento son preferiblemente lo más bajos posible. Especialmente cuando la composición se usa con propósitos médicos, es necesario reducir estos contenidos a valores por debajo de los estándares de seguridad.

En la presente invención, la expresión "que contiene la proteína" significa que por lo menos parte de la proteína se introduce en el interior del poliéster alifático. Este estado se distingue del estado de un complejo liofilizado en el que la proteína existe sobre la superficie de la composición o en los vacíos de la composición.

La forma de la composición estéril de la presente invención está en forma de fibra, película, lámina, cuerpo con forma de placa, cuerpo con forma de tubo, cuerpo lineal, cuerpo con forma de varilla, material acolchado, espuma o cuerpo poroso. El método de moldeo para producir un producto moldeado no está particularmente limitado si es un método en el que se suprimen el cambio estructural y la reducción de la actividad de la proteína. Por ejemplo, pueden emplearse técnicas de moldeo adecuadas como moldeo por extrusión, moldeo por inyección, moldeo por calandra, moldeo por compresión, moldeo por soplado, conformado al vacío, moldeo de polvo, moldeo por fundición, y fundición. La composición estéril de la presente invención es adecuada para la producción de fibras y películas, y puede emplearse cualquiera de las técnicas de moldeo que se han empleado para la producción de fibras o películas de plástico. Por ejemplo, pueden usarse técnicas de moldeo por extrusión como moldeo por extrusión por inflado y moldeo por extrusión en troquel T, y pueden usarse técnicas de calandrado y fundición. El moldeo anterior puede ser moldeo por fusión o moldeo por solución, de los cuales se prefiere el moldeo por solución para facilitar la dispersión de la proteína para prevenir el deterioro funcional de la proteína.

La forma de fibra como se usa en la presente se refiere a un cuerpo moldeado en 3D formado por laminación, tejido, punto u otra técnica de una o una pluralidad de fibras. La forma de la fibra es, por ejemplo, una tela no tejida. Además, un tubo y una malla obtenidos procesando la tela no tejida se incluyen en la forma de fibra.

El diámetro medio de fibra de la composición estéril que tiene una forma de fibra de la presente invención es, por ejemplo, de 0,01 a 50 μm y puede determinarse adecuadamente por un experto en la técnica de acuerdo con el uso pretendido.

La composición estéril que tiene una forma de fibra de la presente invención puede estar en forma de una fibra larga. La fibra larga es una fibra formada sin añadir el paso de cortar una fibra en el curso de la transición del hilado al procesamiento de un cuerpo moldeado de fibra. Puede formarse mediante métodos de electrohilado, unión de hilados y soplado en fusión. De estos, se prefiere el método de electrohilado.

El método de electrohilado es un método en el que se obtiene un cuerpo moldeado de fibra en un electrodo aplicando un alto voltaje a una solución que contiene un polímero. El proceso comprende los pasos de preparar una solución de hilado que contiene un polímero, aplicar un voltaje alto a la solución, lanzar a chorro la solución, formar un cuerpo moldeado de fibra evaporando el solvente de la solución lanzada a chorro, eliminar la carga del cuerpo moldeado de fibra formado como un paso opcional, y acumular el cuerpo de fibra moldeada por la pérdida de carga.

Posteriormente se proporciona una descripción del proceso para producir una composición estéril que tiene una forma de fibra o una forma de tela no tejida a partir de la invención, tomando como ejemplo el método de electrohilado.

Se explicará el paso de preparar una solución de hilado en el método de electrohilado. Aunque la solución

de hilado en la presente invención no está particularmente limitada, puede usarse una emulsión que contiene una solución de solvente orgánico de un poliéster alifático y una solución acuosa de una proteína, una suspensión que contiene una solución de solvente orgánico de un poliéster alifático y partículas de proteína, o una solución de solvente orgánico que contiene un poliéster alifático y una proteína como la solución de hilado. De estas, se prefiere una suspensión que contiene una solución de solvente orgánico de un poliéster alifático y partículas de proteína.

La concentración del poliéster alifático en la solución de poliéster alifático es preferiblemente del 1 al 30% en peso. Cuando la concentración del poliéster alifático es inferior al 1% en peso, es desventajosamente difícil formar un cuerpo moldeado de fibra. Cuando la concentración es superior al 30% en peso, el diámetro de fibra del cuerpo moldeado de fibra obtenido se vuelve desventajosamente grande. La concentración del poliéster alifático contenido en la solución de solvente orgánico es más preferiblemente del 2 al 20% en peso.

El solvente para el poliéster alifático no está particularmente limitado si puede disolver el poliéster alifático, se evapora en el paso de hilado y puede formar una fibra. Solo puede usarse un solvente o una combinación de dos o más solventes. Los ejemplos del solvente incluyen cloroformo, 2-propanol, tolueno, benceno, alcohol bencílico, diclorometano, tetracloruro de carbono, ciclohexano, ciclohexanona, tricloroetano, metiletilcetona, acetato de etilo y mezclas de los mismos. Para formar una emulsión, puede contener un solvente como acetona, etanol, metanol, tetrahidrofurano, 1,4-dioxano, 1-propanol, fenol, piridina, ácido acético, ácido fórmico, hexafluoro-2-propanol, hexafluoroacetona, N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, acetonitrilo, N-metil-2-pirrolidinona, N-metilmorfolina-N-óxido o 1,3-dioxolano. De estos, se usa preferiblemente diclorometano o etanol desde el punto de vista de facilidad de manejo y propiedades físicas.

La proteína en la presente invención puede añadirse y mezclarse con una solución de solvente orgánico de un poliéster alifático en forma sólida, líquida o en solución.

En la presente invención, cuando se usa como solución de hilado la emulsión que contiene una solución de solvente orgánico de un poliéster alifático y una solución acuosa de una proteína, el solvente acuoso para la proteína no está particularmente limitado si puede disolver la proteína, forma una emulsión con la solución de solvente orgánico de un poliéster alifático, se evapora en el paso de hilado y puede formar una fibra. Por ejemplo, pueden usarse soluciones salinas fisiológicas y soluciones tampón. Además, se puede añadir un estabilizador para la proteína y aditivos. De estos, se usa preferiblemente una solución tampón de ácido fosfórico o solución salina fisiológica.

La concentración de la proteína en la solución acuosa de la proteína usada en la presente invención no está particularmente limitada y puede determinarse adecuadamente de acuerdo con las propiedades características de la proteína. Es, por ejemplo, del 0,5 al 50% en peso.

Para preparar una emulsión a partir de una solución de solvente orgánico de un poliéster alifático y una solución acuosa de una proteína, la proporción de mezcla de estas soluciones no está particularmente limitada si forman una emulsión estable. Por ejemplo, la (solución acuosa de proteína)/(solución de solvente orgánico del poliéster alifático) (proporción en volumen) es 1/100 a 1/2. Cuando este valor es mayor que 1/2, la emulsión se vuelve desventajosamente inestable.

Aunque el método de preparación de una emulsión mezclando entre sí una solución de solvente orgánico de un poliéster alifático y una solución acuosa de una proteína no está particularmente limitado, pueden usarse ondas ultravioletas o medios de agitación. Como los medios de agitación, pueden usarse medios de agitación de alta velocidad como un homogeneizador o medios de agitación como una moledora o un molino de bolas. De estos, se prefiere la dispersión con ondas ultrasónicas.

También, la solución de hilado puede prepararse añadiendo un poliéster alifático después de que se forme una emulsión a partir de un solvente orgánico y una solución acuosa de una proteína.

En la presente invención, cuando se usa una suspensión que contiene una solución de solvente orgánico de un poliéster alifático y una proteína como solución de hilado, los tamaños de las partículas de proteína no están particularmente limitados, pero son preferiblemente de 0,01 a 100 μm . Es técnicamente difícil fabricar partículas de proteína que tengan un tamaño de partícula menor que 0,01 μm , y cuando el tamaño de partícula es mayor que 100 μm , la dispersabilidad se degrada y la composición estéril se vuelve desventajosamente quebradiza.

Aunque el método para preparar una suspensión mezclando entre sí una solución de solvente orgánico de un poliéster alifático y partículas de proteínas no está particularmente limitado, pueden usarse ondas ultravioletas o medios de agitación. Como medios de agitación, pueden usarse medios de agitación de alta velocidad como un homogeneizador o medios de agitación como una moledora o un molino de bolas. De estos, se prefiere la dispersión con ondas ultrasónicas.

Además, la solución de hilado puede prepararse añadiendo un poliéster alifático después de que se forme

una suspensión a partir de un solvente orgánico y partículas de proteína.

Antes de la preparación de la suspensión, las partículas de proteína pueden ser microfabricadas. Para la microfabricación, hay molienda seca y molienda húmeda, ambas de las cuales pueden emplearse y también pueden combinarse en la presente invención.

La molienda seca puede realizarse moliendo con un molino de bolas, un molino planetario o un molino oscilante, golpeando en un mortero con una mano de mortero, o moliendo con un pulverizador tipo agitación media, molino de chorro o molino de piedra.

Por otra parte, la molienda húmeda se realiza agitando con un agitador o amasador que tiene una alta fuerza de cizallamiento mientras que las partículas de proteína se dispersan en un medio de dispersión adecuado, o usando un molino de bolas o molino de perlas mientras que las partículas de proteína se dispersan en un medio. Además, también pueden usarse partículas de proteína producidas por un secador de pulverización.

El método de esterilización usado en la presente invención es la esterilización por radiación. Los ejemplos de la radiación en uso incluyen rayos alfa, rayos beta, rayos gamma, rayos de neutrones, haces de electrones y rayos X. De estos, se prefieren los rayos gamma y los haces de electrones, y los más preferidos son los haces de electrones. Aunque el método de esterilización no está particularmente limitado, la dosis de radiación es de 10 a 80 kGy, preferiblemente de 20 a 30 kGy. Aunque la condición de temperatura no está particularmente limitada, es de -80 a 40° C, preferiblemente de -80 a 30° C.

La radiación, como rayos alfa, positrones, rayos gamma, rayos de neutrones, haces de electrones o rayos X, desprende un electrón de las moléculas o átomos que constituyen una sustancia cuando se aplica a la sustancia. Tras esto se rompe un enlace molecular, y se produce un radical altamente reactivo y reacciona químicamente con una sustancia circundante en segundo lugar.

Es bien sabido que una proteína tiende a perder su función (actividad) tras la exposición a la radiación. Se considera que esto se debe a la destrucción de "una estructura de alto orden" que es una fuente de desarrollo de una función por la ruptura de un enlace molecular por exposición. Además, como se muestra en los Ejemplos Comparativos de la especificación de la presente solicitud, la destrucción o desactivación estructural de una proteína también se produce por almacenamiento después de la exposición a la radiación. Sin embargo, la destrucción estructural y el deterioro funcional de la proteína contenida en el poliéster alifático en la presente invención se suprimen incluso cuando la proteína está expuesta a la radiación, y también se suprimen la destrucción estructural y el deterioro funcional por almacenamiento después de la exposición. Esto significa que la estructura de alto orden de la proteína se conserva en la composición, lo que es un efecto común independientemente del tipo de proteína. No se considera que debido al espesor del poliéster alifático a través del cual se transmite la radiación este efecto se deba a la selección, y el mecanismo de control no es conocido.

El poliéster alifático que contiene la proteína antes de la esterilización por radiación en la presente invención puede contener además un captador de electrones/iones, un agente de transferencia de energía, un captador de radicales, un antioxidante y un plastificante. Los ejemplos del captador de electrones/iones incluyen N,N'-tetrametilfenilendiamina, difenilendiamina, pireno y quinona. Los ejemplos del agente de transferencia de energía incluyen acenafteno. Los ejemplos del captador de radicales incluyen mercaptanos, octahidrofenantreno, monoalquil difenil éteres, tocoferol, ácido cítrico, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, hidroquinona t-butilo, galato de propilo y derivados de ácido ascórbico. Los ejemplos del antioxidante incluyen BHT, triésteres de fosfito, agentes de antienviejecimiento fenólicos y sales orgánicas de tioácido. Se prefieren los aditivos que generalmente se aceptan como seguros para su uso en alimentos y productos farmacéuticos. La cantidad de aditivo, que no está particularmente limitada es, por ejemplo, del 0,01 al 10% en peso basado en el poliéster alifático en la composición estéril.

El poliéster alifático que contiene la proteína en el paso de esterilización preferiblemente no contiene agua. El contenido de agua del poliéster alifático es preferiblemente no más del 10% en peso, más preferiblemente no más del 4% en peso, mucho más preferiblemente sustancialmente el 0% en peso.

El poliéster alifático que contiene la proteína puede envolverse en un material de envasado para ser esterilizado con radiación. Como material de envasado, se usa preferiblemente un material que tenga altas propiedades de barrera al gas, como el aluminio. El poliéster alifático puede sellarse herméticamente y envasarse junto con un desoxidante o desecante o mientras se llena un gas inerte en el envase después de la desgasificación, o pueden combinarse entre sí ambos métodos. Como desoxidante y desecante, se prefieren los que no dañan el cuerpo humano y no se desactivan tras la exposición a la radiación.

La composición estéril de la presente invención puede usarse como un material médico que requiere la función y la esterilidad de una proteína.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proporcionan con el propósito de ilustrar adicionalmente la presente invención, pero de ninguna manera deben considerarse limitativos.

5

1. Medición de la actividad de la trombina.

Se añadieron 20 μ l de una muestra, 60 μ l de tris-HCl 50 mM (pH 8,5) + tampón NaCl 50 mM y 20 μ l de PLURONIC F-68 al 0.1% al tubo 2008 de FALCON Corporation para incubar a 37° C durante 3 minutos. Se usó α -trombina purificada derivada de plasma humano (adquirida de Haematologic Technologies, Inc.: HCT-0020) diluida con el tampón anterior a 5, 2,5, 1,25, 0,625 y 0,3125 U/ml como estándar. Se añadieron 100 μ l del sustrato cromogénico del equipo de prueba S-2238 (1 mM: Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.) y se mezclaron con la solución de la reacción obtenida bajo agitación para llevar a cabo una reacción a 37° C durante 5 minutos, y se añadieron 800 μ l de una solución de ácido cítrico 0,1 M para terminar la reacción. Se transfirieron 200 μ l de la solución de reacción a placas de 96 pocillos para medir OD405/650.

15

El siguiente método se usó para medir la actividad de la trombina en los Ejemplos y en los Ejemplos Comparativos, excepto en los Ejemplos 5 a 7 y el Ejemplo Comparativo 4. Se añadieron 20 μ l de una muestra y 80 μ l de una solución diluida para medir la actividad (F-68 al 0,01%, 50 mmol/l de NaCl, 50 mmol/l de Tris-HCl, pH 8,4) al tubo de poliestireno de BD para incubar a 37° C durante 3 minutos. Se usó trombina recombinante (JPU Thrombin Standard 400 U/ml o WHO/US Thrombin Standard 110 UI/ml) diluida con el tampón anterior a 4, 2, 1, 0,5 y 0,25 U/ml en el caso de JPU y a 6, 3, 1,5, 0,75 y 0,375 IU/ml en el caso de IU como estándar. Se añadieron 100 μ l del sustrato cromogénico del equipo de prueba S-2238 (1 mM: Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.) y se mezclaron con la solución de la reacción obtenida bajo agitación para llevar a cabo una reacción a 37° C durante 7 minutos, y luego se añadieron 800 μ l de una solución de ácido cítrico 0,1 M para terminar la reacción. Se transfirieron 200 μ l de la solución de reacción a placas de 96 pocillos para medir OD405/650.

20

25

2. Medición de la cantidad de agregado de fibrinógeno.

Después de que la lámina se cortase a un diámetro de 1 cm, se extrajo el fibrinógeno con una solución de dilución para medir la cantidad de su agregado mediante cromatografía líquida de alta velocidad.

30

<condiciones de prueba>

35

Detector: fotómetro de absorción ultravioleta (longitud de onda de medición: 280 m)
 Columna: Bio Sep-SEC-s4000 (7,8 x 300 mm, Phenomenex) Temperatura de la columna: 25° C
 Temperatura del muestreador: 6° C
 Fase de transferencia: 0,5 mol/l Arg-HCl/50 mmol/l tampón de ácido fosfórico
 Caudal: 1 ml/min
 Tiempo de análisis: 20 min.

40

3. Espesor

Se midieron los espesores de 15 cuerpos moldeados con una fuerza de medición de 0,01 N por medio de una unidad de medición digimática de alta resolución ((LITEMATIC VL-50 de Mitutoyo Corporation) para calcular el valor medio como el espesor del cuerpo moldeado. Esta medición se llevó a cabo con una fuerza de medición mínima que podría usarse por la unidad de medición.

45

4. Peso

50

El cuerpo moldeado se cortó a un tamaño de 50 mm x 100 m para medir su peso para calcular el peso del cuerpo moldeado.

5. Densidad aparente

55

La densidad aparente del cuerpo moldeado se calculó a partir del espesor de las mediciones y el valor de peso anteriores.

6. Medición de la trombina ELISA.

60

Se inmovilizaron 5 μ g/ml de un anticuerpo de trombina antihumano (N° SAHT-AP de Affinity Biologicals Inc.) en una placa ELISA (NUNC 468667). Después de lavarlo con PBS que contenía Tween 20 al 0,05%, se añadió Block Ace (UK-B80 de DS Pharma Biomedical Co., Ltd.) a cada pocillo para llevar a cabo el enmascaramiento. Después de lavar con PBS que contenía Tween 20 al 0,05%, se añadió un cuerpo de prueba. Se usó trombina humana (HCT-0020 de Haetologic Technologies, Inc.) como estándar para formar una curva de calibración. Después

65

de lavar con PBS que contenía Tween 20 al 0,05%, se añadieron 0,1 µg/ml de un anticuerpo de trombina antihumano marcado con HRP (N° SAHT-HRP de Affinity Biologicals Inc.). Después de una reacción, el producto de la reacción se lavó con PBS que contenía Tween 20 al 0,05%, se añadió un reactivo TMB (DaKo S1599), y la mezcla resultante se dejó durante 10 minutos para desarrollar el color. Se añadió H₂SO₄ 1N para detener el desarrollo de color y para medir OD450-650 nm con un lector de microplacas.

7. Medición de las actividades enzimáticas de lipasa y β-glucosidasa.

(1) Medición de la tasa de extracción.

El cuerpo moldeado se cortó a un tamaño de 2 cm x 2 cm y se sumergió en 1 ml de solución salina fisiológica durante 3 minutos o 3 horas para eluir una enzima inmovilizada. Este proceso se llevó a cabo en tres cuerpos moldeados para medir sus cambios de peso para obtener el valor medio de la tasa de extracción calculada a partir de la siguiente ecuación. El peso teórico de la enzima inmovilizada se calculó a partir del peso de la composición y el % en peso del polvo de enzima cargada.

Tasa de extracción = pérdida de peso (mg)/peso teórico (mg) de enzima inmovilizada

(2) Medición de la actividad enzimática.

Se utilizó un kit de prueba de lipasa fluorométrica continua (fabricado por PROGEN BIOTECHNIK GMBH) para medir la actividad de la lipasa. La tasa de recuperación de la actividad se calculó a partir de la siguiente ecuación. La cantidad de la enzima activa se calculó en términos de concentración a partir del valor de la actividad. El peso teórico de la enzima inmovilizada por área unitaria se calculó a partir del % en peso del polvo de enzima cargada y el peso de la composición.

Tasa de recuperación de la actividad (%) = {cantidad de enzima activa (mg/cm²)/peso teórico de la enzima inmovilizada por área unitaria (mg/cm²) × tasa de extracción} × 100

Se usó medición de fluorescencia usando Tokyogreen (marca registrada, lo mismo se aplicará en lo sucesivo)-βGlu (de Sekisui Medical Co., Ltd.) para medir la actividad de la β-glucosidasa. La tasa de recuperación de la actividad se calculó a partir de la siguiente ecuación. El peso teórico de la enzima inmovilizada se calculó a partir del % en peso del polvo de enzima cargada y el peso de la composición.

Tasa de recuperación de la actividad (%) = {cantidad de enzima activa (mg) /peso teórico de la enzima inmovilizada (mg) × tasa de extracción} × 100

La tasa de retención de la actividad se calculó a partir de la siguiente ecuación.

Tasa de retención de la actividad (%) = {tasa de recuperación de la actividad después de la esterilización (%) /tasa de recuperación de la actividad antes de la esterilización (%)} × 100

Ejemplo 1

Después de dispersar las partículas que contenían trombina (preparadas liofilizando una solución acuosa que contenía 1 mg/ml de trombina recombinante, cloruro de sodio, citrato de sodio, cloruro de calcio y manitol y que tenía un pH de 7) en etanol, se añadió diclorometano a la dispersión resultante, y se disolvió un copolímero de ácido poliglicólico-ácido poliláctico (Purasorb PDLG5010 de PURAC) en la dispersión hasta una concentración del 10% en peso para preparar una solución de hilado con una proporción de partículas que contienen trombina/ copolímero de ácido poliglicólico-ácido poliláctico de 100 (1,69 como trombina)/100 (p/p). El hilado se llevó a cabo mediante un método de electrohilado para obtener un cuerpo moldeado de fibra tipo lámina. El cuerpo moldeado fibra obtenido tenía un espesor de 131 µm, un peso de 1,44 mg/cm² y una densidad aparente de 111 mg/cm³. La lámina obtenida se cortó a un diámetro de 1 cm y la proteína se extrajo con 200 µl de solución salina fisiológica para medir su actividad. Como resultado, el valor de medición de la actividad fue de 26,7 U/cm². La lámina obtenida se esterilizó por exposición a un haz de electrones de 20 kGy y se mantuvo a 40° C y 75% de HR durante 1 mes para medir la actividad de la trombina. Cuando la actividad de la trombina antes de la esterilización fue del 100%, la tasa de retención de la actividad de la trombina justo después de la exposición al haz de electrones fue del 79%. La tasa de retención de la actividad después de 1 mes fue del 78%, y no se observó ninguna reducción en la actividad de la trombina durante el almacenamiento.

Ejemplo 2

Después de que las partículas que contenían trombina (preparada liofilizando una solución acuosa que contenía 1 mg/ml de trombina recombinante, cloruro de sodio, citrato de sodio, cloruro de calcio y manitol y que tenía un pH de 7) y Quinizarin Green SS (de Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) se dispersasen en etanol, se añadió

diclorometano a la dispersión resultante, y se disolvió un copolímero de ácido poliglicólico-ácido poliláctico (Purasorb PDLG5010 de PURAC) en la dispersión a una concentración del 10% en peso para preparar una solución de hilado que tenía una proporción de partícula que contiene trombina/copolímero de ácido poliglicólico/ácido poliláctico de 100 (1,69 como trombina)/100 (p/p). El hilado se llevó a cabo mediante el método de electrohilado para obtener un cuerpo moldeado de fibra tipo lámina. La lámina obtenida que contenía el cuerpo de fibra moldeada (espesor medio: 129 μm , peso: 1.49 mg/cm^2 , densidad aparente: 124 mg/cm^3) se cortó a un diámetro de 1 cm, y la proteína se extrajo con 200 μl de solución salina fisiológica para medir la actividad de la trombina. Como resultado, el valor de la medición de la actividad fue de 40,2 UI/ cm^2 . La lámina obtenida se esterilizó por exposición a un haz de electrones de 30 kGy y se mantuvo a 40° C y 75% de HR durante 1 mes para medir la actividad de la trombina. Cuando la actividad de la trombina antes de la esterilización fue del 100%, la tasa de retención de la actividad de la trombina inmediatamente después de la exposición a un haz de electrones fue del 70%. La tasa de retención de la actividad después de 1 mes fue del 74%, y no se observó ninguna reducción en la actividad de la trombina durante el almacenamiento.

15 Ejemplo 3

Después de dispersar las partículas que contenían trombina (preparadas liofilizando una solución acuosa que contenía 1 mg/ml de trombina recombinante, cloruro de sodio, citrato de sodio, cloruro de calcio y manitol y que tenían un pH de 7) en etanol, se añadió diclorometano a la dispersión resultante, y se disolvió un copolímero de ácido poliglicólico-ácido poliláctico (Purasorb PDLG5010 de PURAC) en la dispersión a una concentración del 10% en peso para preparar una solución de dopado que tenía una proporción de partículas que contienen trombina/copolímero de ácido poliglicólico-ácido poliláctico de 100 (1,69 como trombina)/100 (p/p). La solución de dopado obtenida se usó para formar una película por un método de fundición. El intervalo de recubrimiento fue de 127 μm , y la velocidad de recubrimiento fue de 30,1 mm/seg. La lámina obtenida tenía un espesor de 58 μm , un peso de 2,9 mg/cm^2 y una densidad aparente de 504 mg/cm^3 . La lámina obtenida se cortó a un diámetro de 1 cm y la proteína se extrajo con 200 μl de solución salina fisiológica para medir la actividad de la trombina. Como resultado, el valor de medición de la actividad fue de 71,1 UI/ cm^2 . La lámina obtenida se esterilizó por exposición a un haz de electrones de 30 kGy y se mantuvo a 40° C y 75% de HR durante 1 mes para medir la actividad de la trombina. Cuando la actividad de la trombina antes de la esterilización fue del 100%, la tasa de retención de la actividad de la trombina justo después de la exposición a un haz de electrones fue del 75,7%. La tasa de retención de la actividad después de 1 mes fue del 82%, y no se observó ninguna reducción en la actividad de la trombina durante el almacenamiento.

Ejemplo 4

Después de que las partículas que contenían fibrinógeno (preparadas liofilizando una solución acuosa que contenía 10 mg/ml de fibrinógeno recombinante, arginina, cloruro de sodio y manitol y que tenían un pH de 8,5) se dispersaron en etanol, se añadió diclorometano a la dispersión resultante, y se disolvió un copolímero de ácido poliglicólico-ácido-poliláctico (Purasorb PDLG5010 de PURAC) en la dispersión a una concentración del 10% en peso para preparar una solución de hilado que tenía una proporción de partículas que contienen trombina/copolímero de ácido poliglicólico-ácido poliláctico de 100 (50,85 como fibrinógeno)/100 (p/p). El hilado se llevó a cabo mediante el método de electrohilado para obtener un cuerpo moldeado de fibra tipo lámina. El cuerpo moldeado de fibra obtenido tenía un espesor de 131 μm , un peso de 1,44 mg/cm^2 y una densidad aparente de 110 mg/cm^3 . La lámina obtenida se cortó a un diámetro de 1 cm y el fibrinógeno se extrajo con una solución de dilución para medir la cantidad de su agregado mediante cromatografía de alta velocidad. Como resultado, la cantidad de agregado fue del 9,79%. La lámina obtenida se esterilizó mediante exposición a un haz de electrones de 30 kGy y se mantuvo a 40° C y 75% de HR durante 1 mes para medir la cantidad del agregado. La cantidad del agregado justo después de la exposición a un haz de electrones fue del 18,81%. El peso del agregado al cabo de 1 mes fue del 24,14%.

50 Ejemplo Comparativo 1

Después de que se aplicase un haz de electrones de 30 kGy a partículas que contienen trombina (preparada liofilizando una solución acuosa que contiene 1 mg/ml de trombina recombinante, cloruro de sodio, citrato de sodio, cloruro de calcio y manitol y que tiene un pH de 7) para esterilizarlas, las partículas que contienen trombina se mantuvieron a 40° C y 75% de HR durante 1 mes para medir la actividad de la trombina. La actividad de la trombina antes de la exposición fue de 404,73 U/vial. Cuando la actividad de la trombina antes de la esterilización fue del 100%, la tasa de retención de la actividad de la trombina justo después de la exposición a un haz de electrones fue del 51,8%. La tasa de retención de la actividad después de 1 mes fue del 17,9%, y durante el almacenamiento se observó una reducción en la actividad de la trombina.

60 Ejemplo Comparativo 2

Después de que las partículas que contenían trombina (preparadas liofilizando una solución acuosa que contenía 1 mg/ml de trombina recombinante, cloruro de sodio, citrato de sodio, cloruro de calcio y manitol y que tenían un pH de 7) se dispersasen en 2-propanol, hidroxipropilcelulosa (2,0-2,9 mPa·s, fabricados por Nippon Soda

Co., Ltd.) en la dispersión resultante a una concentración del 13% en peso para preparar una solución de dopado que tenía una proporción de partículas que contienen trombina/hidroxipropilcelulosa de 100/100 (p/p), se llevó a cabo el hilado mediante el método de electrohilado para obtener un cuerpo moldeado de fibra tipo lámina. El cuerpo moldeado de fibra obtenido tenía un espesor de 204 μm , un peso de 2,08 mg/cm^2 y una densidad aparente de 101 mg/cm^3 . La lámina obtenida se cortó a un diámetro de 1 cm y la proteína se extrajo con 200 μl de solución salina fisiológica para medir su actividad. Como resultado, el valor de medición de la actividad fue de 110,3 UI/cm^2 . La lámina obtenida se esterilizó por exposición a un haz de electrones de 30 kGy y se mantuvo a 40° C y 75% de HR durante 1 mes para medir la actividad de la trombina. Cuando la actividad de la trombina antes de la esterilización fue del 100%, la tasa de retención de la actividad de la trombina justo después de la exposición a un haz de electrones fue del 68,4%. La tasa de retención de la actividad después de 1 mes fue del 54,9% y se observó una reducción en la actividad de la trombina durante el almacenamiento.

Ejemplo Comparativo 3

Después de que se aplicase un haz de electrones de 30 kGy a partículas que contenían fibrinógeno (preparadas mediante liofilización de una solución acuosa que contiene 10 mg/ml de fibrinógeno recombinante, arginina, cloruro de sodio y manitol y que tenía un pH de 8,5) para esterilizarlas, las partículas que contenían trombina se mantuvieron a 40° C y 75% de HR durante 1 mes para medir la cantidad de un agregado de fibrinógeno. La cantidad del agregado antes de la exposición fue del 6,97%. La cantidad del agregado justo después de la exposición a un haz de electrones fue del 18,51%. La cantidad del agregado al cabo de 1 mes fue del 54,72%.

Los resultados (las tasas de retención de la actividad de la trombina (Th) después de la esterilización y después del almacenamiento después de la esterilización en base al valor antes de la esterilización) de los Ejemplos 1 a 3 y los Ejemplos comparativos 1 y 2 se muestran en la Figura 1.

Se entiende que cuando la proteína está contenida en el poliéster alifático, el cambio estructural y el deterioro funcional de la proteína provocado por la esterilización por radiación se suprimen en comparación con un caso en el que solo se usan partículas que contienen proteínas (Ejemplo Comparativo 1) y además que el cambio y el deterioro provocado por el almacenamiento después de la esterilización por radiación se suprimen en comparación con un caso en el que no se usa el poliéster alifático sino una celulosa (hidroxipropilcelulosa) (Ejemplo Comparativo 2).

Los resultados (la cantidad del agregado de fibrinógeno después de la esterilización y después del almacenamiento después de la esterilización) del Ejemplo 4 y del Ejemplo Comparativo 3 se muestran en la Fig. 2.

Se entiende que cuando la proteína está contenida en el poliéster alifático (Ejemplo 4), el cambio estructural de la proteína provocado por el almacenamiento después de la esterilización por radiación se suprime en comparación con un caso en el que solo se usan partículas que contienen proteínas (Ejemplo Comparativo 3).

Ejemplo 5

Después de que las partículas que contenían trombina (Bolheal, (marca registrada, lo mismo se aplicará en lo sucesivo), el adhesivo tisular: Vial 3) se dispersasen en etanol, se añadió diclorometano a la dispersión resultante y se disolvió ácido poliláctico (PL18 de Purac Biomaterials) en la dispersión a una concentración del 10% en peso para preparar una solución de hilado que tenía una proporción de partículas que contienen trombina/ácido poliláctico de 40 (0,45 como trombina)/100 (p/p). El hilado se llevó a cabo mediante el método de electrohilado para obtener un cuerpo moldeado de fibra tipo lámina. La lámina obtenida se esterilizó con un haz de electrones de 20 kGy. La lámina obtenida se cortó a un tamaño de 2 cm x 2 cm, y la proteína se extrajo con 1 ml de solución salina fisiológica para medir su actividad y ELISA. Como resultado, el valor de medición de la actividad fue de 5.0 U/cm^2 , y el valor de medición ELISA fue de 3,4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Cuando se realizaron mediciones de actividad y ELISA en una lámina no esterilizada del mismo modo, el valor de medición de actividad fue de 7,5 U/cm^2 y el valor de medición de ELISA fue 4.35 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Es decir, la tasa de retención de la actividad de la lámina esterilizada fue del 73% de la de la lámina no esterilizada.

Ejemplo 6

Después de que las partículas que contenían trombina (adhesivo de tejido Bolheal: Vial 3) se dispersasen en etanol, se añadió diclorometano a la dispersión resultante y se disolvió ácido poliláctico (PL18 de Purac Biomaterials) en la dispersión a una concentración del 10% en peso para preparar una solución de hilado que tenía una proporción de partículas que contienen trombina/ácido poliláctico de 70 (0,78 como trombina)/100 (p/p). El hilado se llevó a cabo mediante el método de electrohilado para obtener un cuerpo moldeado de fibra tipo lámina. La lámina obtenida se esterilizó con un haz de electrones de 20 kGy. La lámina obtenida se cortó a un tamaño de 2 cm x 2 cm, y la proteína se extrajo con 1 ml de solución salina fisiológica para medir su actividad y ELISA. Como resultado, el valor de medición de la actividad fue 9,575 U/cm^2 , y el valor de medición ELISA fue de 7.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Cuando se realizaron mediciones de actividad y ELISA en una lámina no esterilizada del mismo modo, el valor de

medición de actividad fue de 11,15 U/cm² y el valor de medición de ELISA fue de 7,2 µg/cm². Es decir, la tasa de retención de la actividad de la lámina esterilizada fue del 86% de la de la lámina no esterilizada.

Ejemplo 7

5 Después de que se dispersasen los polvos liofilizados de trombina (adhesivo de tejido Bolheal: Vial 3) en etanol, se añadió diclorometano a la dispersión resultante y se disolvió ácido poliláctico (PL18 de Purac Biomaterials) en la dispersión a una concentración del 10% en peso para preparar una solución de hilado que tenía una proporción de polvo de trombina liofilizada/ácido poliláctico de 100 (1,1 como trombina)/100 (p/p). El hilado se llevó a cabo mediante el método de electrohilado a una temperatura de 22° C y una humedad de no más del 26% para obtener un cuerpo moldeado de fibra tipo lámina. El diámetro interior de una boquilla de chorro era de 0,8 mm, el voltaje era de 15 kV, el caudal de la solución de hilado era de 3,0 ml/h, y la distancia desde la boquilla de chorro hasta una placa plana era de 25 cm. La lámina obtenida se esterilizó con un haz de electrones de 20 kGy. La lámina obtenida se cortó a un tamaño de 2 cm x 2 cm, y la proteína se extrajo con 1 ml de solución salina fisiológica para medir su actividad y ELISA. Como resultado, el valor de medición de la actividad fue de 15 U/cm², y el valor de medición ELISA fue de 11 g/cm². Cuando se realizaron mediciones de actividad y ELISA en una lamina no esterilizada del mismo modo, el valor de medición de actividad fue de 23 U/cm² y el valor de medición de ELISA fue de 16 µg/cm². Es decir, la tasa de retención de la actividad de la lámina esterilizada fue del 64% de la de la lámina no esterilizada.

20 Ejemplo Comparativo 4

Se esterizaron partículas que contenían trombina (Bolheal) con un haz de electrones de 20 kGy. La proteína se extrajo con 1 ml de solución salina fisiológica para medir su actividad y ELISA. Como resultado, el valor de medición de la actividad fue de 22,5 U/cm² y el valor de medición de ELISA fue de 11,5 µg/cm². Cuando se realizaron mediciones de actividad y ELISA en partículas que contenían trombina no esterilizadas del mismo modo, el valor de medición de la actividad fue de 68,5 U/cm² y el valor de medición de ELISA fue de 41,5 µg/cm². Es decir, la tasa de retención de la actividad de la lámina esterilizada fue del 32% de la de la lámina no esterilizada.

30 Ejemplo 8

Después de que se dispersasen polvos de lipasa (derivados del páncreas de cerdo, fabricados por Wako Pure Chemical Industries, Ltd., lo mismo se aplica en lo sucesivo) en etanol, se añadió diclorometano a la dispersión resultante, se disolvió un copolímero de ácido poliláctico-ácido glicólico (PDLG5010 de Purac Biomaterials) en la dispersión a una concentración del 10% en peso para preparar una solución de hilado que tenía una proporción de polvo de lipasa/copolímero ácido poliláctico-ácido glicólico de 50/100 (p/p). El hilado se llevó a cabo mediante el método de electrohilado a una temperatura de 27° C y una humedad de no más del 25% para obtener un cuerpo moldeado de fibra tipo lámina. El diámetro interior de una boquilla de chorro era de 0,9 mm, el voltaje era de 15 kV, el caudal de la solución de hilado era de 4,0 ml/h, y la distancia desde la boquilla de chorro hasta una placa plana era de 25 cm. La tasa de extracción de lipasa de la lámina obtenida fue del 79%. La lámina obtenida se esterilizó con un haz de electrones de 20 kGy. La lámina esterilizada obtenida se cortó a un tamaño de 1 cm x 1 cm, y la lipasa se extrajo con 1 ml de un tampón de lipasa contenido en un kit para medir su actividad. Como resultado, la tasa de recuperación de la actividad fue del 100%.

45 Ejemplo 9

Se añadió diclorometano a los polvos de lipasa, y se disolvió un copolímero de ácido poliláctico-ácido glicólico (PDLG5010 de Purac Biomaterials) en la mezcla resultante a una concentración del 10% en peso para preparar una solución de hilado con una proporción de polvo de lipasa/ácido poliláctico de 50/100 (p/p). El hilado se llevó a cabo mediante el método de electrohilado a una temperatura de 26° C y una humedad de no más del 25% para obtener un cuerpo moldeado de fibra tipo lámina. El diámetro interior de una boquilla de chorro era de 0,8 mm, el voltaje era de 15 kV, el caudal de la solución de hilado era de 4,0 ml/h, y la distancia desde la boquilla de chorro hasta una placa plana era de 25 cm. La tasa de extracción de lipasa de la lámina obtenida fue del 63%. La lámina obtenida se esterilizó con un haz de electrones de 20 kGy. La lámina esterilizada obtenida se cortó a un tamaño de 1 cm x 1 cm, y la lipasa se extrajo con 1 ml de un tampón de lipasa contenido en un kit para medir su actividad. Como resultado, la tasa de recuperación de la actividad fue del 92%.

Ejemplo 10

Después de que se dispersasen polvos de β-glucosidasa (derivados de almendra, fabricados por Oriental Yeast Co., Ltd, lo mismo se aplicará en lo sucesivo) en etanol, se añadió diclorometano a la dispersión resultante, y se disolvió un copolímero de ácido poliláctico-ácido glicólico (PDLG5010 de Purac Biomaterials) en la dispersión a una concentración del 10% en peso para preparar una solución de hilado que tenía una proporción de polvo de β-glucosidasa/copolímero de ácido poliláctico-ácido glicólico de 38/62 (p/p). El hilado se llevó a cabo mediante el método de electrohilado a una temperatura de 27° C y una humedad de no más del 25% para obtener un cuerpo moldeado de fibra tipo lámina. El diámetro interior de una boquilla de chorro era de 0,9 mm, el voltaje era de 15 kV,

el caudal de la solución de hilado era de 4,0 ml/h, y la distancia desde la boquilla de chorro hasta una placa plana era de 25 cm. Después de que la lámina obtenida se cortase a un tamaño de 2 cm x 2 cm, se esterilizó con un haz de electrones de 20 kGy. La β -glucosidasa se extrajo con 1 ml de solución salina fisiológica para medir su actividad con Tokyogreen- β Glu. Como resultado, la tasa de recuperación de la actividad fue del 92%. Cuando la medición de la actividad se realizó en una hoja no esterilizada del mismo modo, la tasa de recuperación de la actividad fue del 94%. Se entendió de lo anterior que la tasa de retención de la actividad del cuerpo moldeado en fibra esterilizada era del 98% de la del cuerpo moldeado en fibra no esterilizada y que la β -glucosidasa no se desactivaba por la esterilización con haz de electrones.

10 Ejemplo 11

Después de que se dispersasen polvos de β -glucosidasa en etanol, se añadió diclorometano a la dispersión resultante, y se disolvió un copolímero de ácido poliláctico-caprolactona (PLCA8812 de Taki Chemical Co., Ltd.) en la dispersión a una concentración del 10% en peso para preparar una solución de hilado que tenía una proporción de polvo de β -glucosidasa /copolímero de ácido poliláctico-caprolactona de 38/62 (p/p). El hilado se llevó a cabo mediante el método de electrohilado a una temperatura de 27° C y una humedad de no más del 25% para obtener un cuerpo moldeado de fibra tipo lámina. El diámetro interior de una boquilla de chorro era de 0,9 mm, el voltaje era de 15 kV, el caudal de la solución de hilado era de 3,0 ml/h, y la distancia desde la boquilla de chorro hasta una placa plana era de 25 cm. Después de que se cortase la lámina obtenida a un tamaño de 2 cm x 2 cm, se esterilizó con un haz de electrones de 20 kGy. La β -glucosidasa se extrajo con 1 ml de solución salina fisiológica para medir su actividad con Tokyogreen- β Glu. Como resultado, la tasa de recuperación de la actividad fue del 81%. Cuando la medición de la actividad se realizó en una lamina no esterilizada del mismo modo, la tasa de recuperación de la actividad fue del 80%. Se entendió de lo anterior que la tasa de retención de la actividad del cuerpo moldeado en fibra esterilizada era del 101% de la del cuerpo moldeado en fibra no esterilizada y que la β -glucosidasa no se desactivaba por la esterilización por haz de electrones.

Ejemplo 12

Después de que se dispersasen polvos de β -glucosidasa en etanol, se añadió diclorometano a la dispersión resultante, y se disolvió ácido poliláctico (PL18 de Purac Biomaterials) en la dispersión a una concentración del 11% en peso para preparar una solución de hilado con una proporción de polvo de β -glucosidasa/ácido poliláctico de 38/62 (p/p). El hilado se llevó a cabo mediante el método de electrohilado a una temperatura de 27° C y una humedad de no más del 25% para obtener un cuerpo moldeado de fibra tipo lámina. El diámetro interior de una boquilla de chorro era de 0,9 mm, el voltaje era de 15 kV, el caudal de la solución de hilado era de 3,0 ml/h, y la distancia desde la boquilla de chorro hasta una placa plana era de 25 cm. Después de que la lámina obtenida se cortase a un tamaño de 2 cm x 2 cm, se esterilizó con un haz de electrones de 20 kGy. La β -glucosidasa se extrajo con 1 ml de solución salina fisiológica para medir su actividad con Tokyogreen- β Glu. Como resultado, la tasa de recuperación de la actividad fue del 62%. Cuando la medición de la actividad se realizó en una lámina no esterilizada del mismo modo, la tasa de recuperación de la actividad fue del 71%. Se entendió de lo anterior que la tasa de retención de la actividad del cuerpo moldeado en fibra esterilizada era del 87% de la del cuerpo moldeado en fibra no esterilizada y que la β -glucosidasa no se desactivaba por la esterilización por haz de electrones.

Ejemplo Comparativo 5

Los polvos de lipasa se esterizaron con un haz de electrones de 20 kGy. Se añadió 1 ml de un tampón de lipasa a 1 mg de los polvos para medir la actividad de la lipasa. Como resultado, la tasa de recuperación de la actividad fue del 74%.

Ejemplo Comparativo 6

Los polvos de β -glucosidasa se esterizaron con un haz de electrones de 20 kGy. Se disolvieron 2 mg de los polvos en 1 ml de solución salina fisiológica para medir la actividad de la β -glucosidasa con Tokyogreen- β Glu. Como resultado, la tasa de retención de la actividad fue del 81%.

55 Efecto de la Invención.

La composición estéril de la presente invención retiene la estructura y la función de una proteína aunque se esterilice.

60 Viabilidad Industrial

La composición estéril de la presente invención se usa en la industria manufacturera de productos médicos que requieren la función y la esterilidad de una proteína.

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición estéril que comprende una proteína y un poliéster alifático que contiene la proteína y se esteriliza con radiación;
en donde por lo menos parte de la proteína se introduce en el interior del poliéster alifático; y dicha composición estéril está en forma de fibra, película, lámina, cuerpo con forma de placa, cuerpo con forma de tubo, cuerpo lineal, cuerpo con forma de varilla, material acolchado, espuma o cuerpo poroso.
- 10 2. La composición estéril de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la proteína se dispersa como partículas en el poliéster alifático directamente o como una mezcla con aditivos que son farmacéuticamente aceptables.
- 15 3. La composición estéril de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que la proteína se selecciona del grupo que consiste de proteínas hemostáticas, enzimas, proteínas de transporte, proteínas musculares, proteínas de defensa, proteínas de toxinas, hormonas de proteínas, proteínas de almacenamiento, proteínas estructurales, factores de crecimiento y mezclas de los mismos.
- 20 4. La composición estéril de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que la proteína es una proteína hemostática.
5. La composición estéril de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el poliéster alifático se selecciona del grupo que consiste de ácido poliglicólico, ácido poliláctico, policaprolactona, copolímeros de los mismos y mezclas de los mismos.
- 25 6. La composición estéril de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que está en forma de fibra.
7. La composición estéril de acuerdo con la reivindicación 6, que se produce mediante un método de electrohilado.
- 30 8. La composición estéril de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que está en forma de película.
9. La composición estéril de acuerdo con la reivindicación 8, que se produce mediante un método de fundición.
- 35 10. La composición estéril de acuerdo con la reivindicación 1, que se prepara mediante un método que comprende un paso de evaporación de un solvente de una suspensión que contiene un poliéster alifático, el solvente orgánico y las partículas de proteína; en donde la proteína se dispersa como partículas en el poliéster alifático directamente o como una mezcla con aditivos que son farmacéuticamente aceptables.
- 40 11. La composición estéril de acuerdo con la reivindicación 10, en la que la proteína se selecciona del grupo que consiste de proteínas hemostáticas, enzimas, proteínas de transporte, proteínas musculares, proteínas de defensa, proteínas de toxinas, hormonas de proteínas, proteínas de almacenamiento, proteínas estructurales, factores de crecimiento y mezclas de las mismas.
- 45 12. La composición estéril de acuerdo con la reivindicación 10, en la que la proteína es una proteína hemostática.
13. La composición estéril de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en la que el poliéster alifático se selecciona del grupo que consiste de ácido poliglicólico, ácido poliláctico, policaprolactona, copolímeros de los mismos y mezclas de los mismos.
- 50 14. La composición estéril de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, que está en forma de fibra.

50

55

60

65

Fig. 1

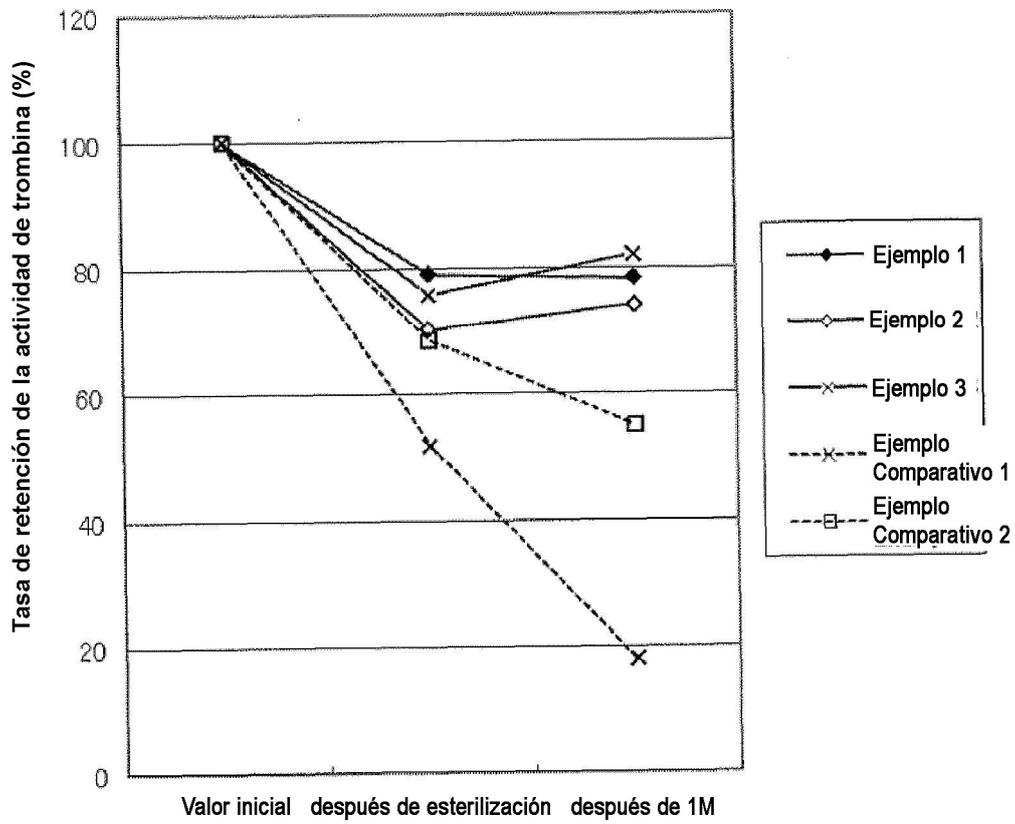


Fig. 2

