



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 112014028443-1 B1**



**(22) Data do Depósito:** 13/05/2013

**(45) Data de Concessão:** 19/01/2021

---

**(54) Título:** COMPOSIÇÃO ESTÉRIL ESTERILIZADA COM RADIAÇÃO

**(51) Int.Cl.:** A61K 38/48; A61K 9/70; A61K 38/00; A61L 15/44; A61P 7/04.

**(30) Prioridade Unionista:** 01/03/2013 JP 2013-040593; 14/05/2012 JP 2012-110390; 14/05/2012 JP 2012-110765.

**(73) Titular(es):** TEIJIN LIMITED; TEIJIN PHARMA LIMITED.

**(72) Inventor(es):** YUKAKO KAGEYAMA; KENTARO FUJINAGA; AYUKO YAMAGUCHI; SUSUMU HONDA; MAKOTO SATAKE; HIROAKI KANEKO; AYUMI ISHIWARI.

**(86) Pedido PCT:** PCT JP2013063868 de 13/05/2013

**(87) Publicação PCT:** WO 2013/172468 de 21/11/2013

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 14/11/2014

**(57) Resumo:** COMPOSIÇÃO ESTÉRIL. É descrita uma composição estéril que compreende uma proteína e um poliéster alifático contendo a proteína e que é esterilizada com radiação. Nesta composição estéril, a estrutura e função (atividade) da proteína são retidas.

## COMPOSIÇÃO ESTÉRIL ESTERILIZADA COM RADIAÇÃO

### CAMPO TÉCNICO

[001] A presente invenção refere-se a uma composição estéril de uma proteína que retém sua função uma vez que ela esteja contida em um poliéster alifático.

### FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] Proteínas naturais e sintéticas têm se tornado cada vez mais importantes como medicamentos. Quando elas são usadas para aplicações médicas, seus produtos devem ser esterilizados. Como meio de esterilização, são conhecidas esterilização a quente em uma autoclave, esterilização com radiação ionizante, tal como um feixe de raios- $\gamma$  ou de elétron, esterilização com gás com um gás óxido de etileno, esterilização com plasma com peróxido de hidrogênio, e esterilização separada usando um esterilizante químico compreendendo uma formulação de glutaraldeído ou um filtro. Entretanto, as atividades das proteínas, tais como proteínas bioativas, são reduzidas por esterilização com calor ou radiação. Esterilização com óxido de etileno tem possibilidades que pode ser produzido um subproduto por uma reação química e que um gás residual altamente tóxico pode afetar adversamente o corpo humano. Esterilização com um esterilizante químico tem um problema de que a resistência a um esterilizante de uma proteína e mudanças no pH, intensidade iônica e temperatura devem ser levados em consideração. Então, para fabricação de produtos farmacêuticos e produtos médicos contendo ou imobilizando uma proteína, seus processos de produção devem ser completamente feitos em condições estéreis e é exigido um valor exorbitante de custo produção.

[003] Embora uma solução contendo uma proteína seja submetida a esterilização separada com um filtro, é difícil aplicar esta esterilização separada a uma composição contendo partículas grandes ou uma composição sólida ou semissólida.

[004] EP0437095 preceitua que um produto de celulose oxidado neutralizado combinado com heparina ou um fragmento de heparina (nORC) pode ser esterilizado por irradiação de raios gama. Entretanto, este documento deixa de preceituar a esterilização de ORC ou n-ORC ao qual uma proteína é ligada.

[005] EP0562864 descreve uma substância de cuidado de ferida de compósito contendo uma matriz de esponja de colágeno, um segundo polímero bioabsorvível, tais como uma fibra dispersa em celulose regenerada oxidada (ORC) e um agente ativo, tal como peptídeo. Este documento preceitua que o agente ativo pode estar contido na matriz, no polímero bioabsorvível ou em ambos deles, e que a substância de esponja mista pode ser esterilizada ao mesmo tempo em que é embalada.

[006] US5730933 descreve um método de esterilizar peptídeo biologicamente ativo com irradiação com raios gama ou de feixe de elétron sem a perda da atividade biológica do peptídeo. Este método é uma tecnologia que compreende as etapas de formar uma mistura de peptídeo biologicamente ativo e uma proteína estranha, tal como gelatina, congelar ou liofilizar esta mistura, e irradiá-la. Este documento preceitua que a existência da proteína estranha estabiliza o peptídeo e evita a redução da atividade do peptídeo.

[007] WO2000/033893 descreve um complexo de peptídeo terapêutico e um polissacarídeo selecionado do grupo que consiste em celulose regenerada oxidada, celulose regenerada oxidada neutralizada e misturas destas. Este documento preceitua que quando o peptídeo é formulado junto com uma quantidade efetiva do polissacarídeo antes da esterilização com radiação ionizante, a atividade biológica do agente terapêutico de peptídeo não é perdida e é estabilizada se o peptídeo for esterilizado com radiação ionizante.

[008] Entretanto, estes documentos não sugerem que a mudança estrutural, tais como agregação e desativação de uma proteína, que ocorre

durante a esterilização com radiação ionizante, pode ser suprimida por um poliéster alifático.

[009] Nesse ínterim, JP-A 2011-47089 descreve um processo para produzir uma nanofibra contendo enzima com excelente atividade enzimática. Neste processo, uma solução centrífuga contendo uma enzima e um polímero dissolvido em um solvente não aquoso é centrifugado por um método de centrifugação eletrostática para formar uma nanofibra zimogênica que é então conferida com água e seca. Entretanto, este documento não diz nada a respeito da esterilização da nanofibra contendo enzima.

#### DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[0010] É um objetivo da presente invenção fornecer uma composição estéril que retém a estrutura e função de uma proteína.

[0011] Foram conduzidos estudos intensivos para resolver o problema apresentado e observaram que, surpreendentemente, quando uma proteína está contida em um poliéster alifático, a mudança estrutural e deterioração funcional da proteína, causadas por esterilização com radiação, e tanto uma ou ambas das mudanças anteriores e a deterioração anterior, causada pelo armazenamento depois da esterilização com radiação, podem ser suprimidas. A presente invenção foi realizada com base nesta verificação.

[0012] Isto é, a presente invenção é uma composição estéril que compreende uma proteína e um poliéster alifático contendo a proteína e é esterilizada com radiação.

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0013] A Fig. 1 mostra cada uma das atividades de trombina obtidas medindo os corpos moldados de fibra tipo lâmina contendo trombina da presente invenção obtidos nos exemplos 1 e 2, a película contendo trombina da presente invenção obtida no exemplo 3, a partícula contendo trombina do exemplo comparativo 1 e o corpo moldado de fibra tipo lâmina contendo trombina comparativo obtido no exemplo comparativo 2 como as taxas de

retenção (%) de um valor depois da esterilização e um valor depois de 1 mês de armazenamento depois da esterilização com base em um valor inicial antes da esterilização; e

[0014] A Fig. 2 mostra as quantidades de agregados de fibrinogênio obtidas medindo o corpo moldado de fibra tipo lâmina contendo fibrinogênio da presente invenção obtido no exemplo 4 e a partícula contendo fibrinogênio do exemplo comparativo 3 quando eles não são irradiados, depois que eles são esterilizados (0M) e depois de 1 mês de armazenamento depois da esterilização (1M).

#### MELHOR MODO PARA REALIZAR A INVENÇÃO

[0015] A presente invenção é uma composição estéril que compreende uma proteína e um poliéster alifático contendo a proteína e é esterilizada com radiação.

[0016] A proteína usada na presente invenção não é particularmente limitada. Exemplos preferidos da proteína incluem proteínas homostáticas tipificadas por fibrinogênio e trombina, enzimas tipificadas por asparaginase, catalase, superóxido dismutase e lipase, proteínas de transporte tipificadas por hemoglobina, albumina sérica e lipoproteína de baixa densidade, proteínas musculares tipificadas por actina e miosina, proteínas de defesa tipificadas por anticorpos e complementos, proteínas de toxina tipificadas por toxina da difteria, toxina botulínica e veneno de cobras, hormônios de proteína tipificadas por insulina, fatores de crescimento e citocina, proteínas de armazenamento tipificadas por ovalbumina e ferritina, proteínas estruturais tipificadas por colágeno e queratina, e fatores de crescimento tipificados por fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento tipo insulina (IGF), fator de crescimento transformante (TGF), fator de crescimento do nervo (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de estimulação de colônia de granulócito (G-CSF), fator de estimulação de colônia de macrócito

granulócito (GM-CSF), fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), eritropoietina (EPO), trombopoietina (TPO), fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF ou FGF2) e fator de crescimento de hepatócito (HGF). Destes, enzimas, proteínas de transporte, proteínas musculares, proteínas de defesa, proteínas de toxina, hormônios de proteína, proteínas de armazenamento, proteínas estruturais e fatores de crescimento são particularmente preferidos.

[0017] A proteína usada na presente invenção pode ser de origem animal ou fabricada por uma técnica de recombinação genética. Se não for de origem animal, ela é preferivelmente de origem humana. A proteína fabricada pela técnica de recombinação genética pode ser uma variante obtida substituindo a sequência de aminoácidos em uma outra sequência de aminoácidos, se a bioatividade essencial for a mesma. Proteínas obtidas modificando estas proteínas, e misturas destas, também podem ser usadas.

[0018] À proteína usada na presente invenção, aditivos que são farmacologicamente aceitáveis podem ser adicionados. Exemplos preferidos dos aditivos incluem fator de coagulação do sangue XIII, albumina, isoleucina, glicina, arginina, ácido glutâmico, fenilalanina, histidina, agentes tensoativos, cloreto de sódio, álcoois de açúcar (tais como glicerol, manitol, etc.), trealose, citrato de sódio, aprotinina e cloreto de cálcio. Pelo menos um selecionado do grupo destes é usado.

[0019] A proteína usada na presente invenção, ou uma mistura da proteína e aditivos, pode ser dispersa em um poliéster alifático como moléculas, mas preferivelmente como partículas formadas pela agregação das moléculas (pode ser referido como “partículas de proteína” incluindo partículas mistas com os aditivos).

[0020] O poliéster alifático usado na presente invenção é preferivelmente um polímero bioabsorvível ou biodegradável. Exemplos do polímero bioabsorvível incluem ácido polilático, ácido poliglicólico,

copolímero de ácido polilático-ácido poliglicólico, policaprolactona, copolímero de ácido polilático-policaprolactona, ácido poliglicerol sebácico, ácido poli-idróxi alcanóico, succinato de polibutileno e derivados destes.

[0021] Destes, ácido poliglicólico, ácido polilático, policaprolactona, copolímeros destes e misturas destes são preferidos, e copolímero de ácido polilático e ácido polilático-ácido glicólico são acima de tudo preferidos. Por exemplo, um estereocomplexo de ácido poli-L-lático e ácido poli-D-lático podem ser usados.

[0022] O peso molecular do poliéster alifático usado na presente invenção é  $1 \times 10^3$  a  $5 \times 10^6$ , preferivelmente  $1 \times 10^4$  a  $1 \times 10^6$ , muito mais preferivelmente  $5 \times 10^4$  a  $5 \times 10^5$ . A estrutura terminal do polímero e um catalisador para polimerizar o polímero podem ser arbitrariamente selecionados.

[0023] Na composição estéril da presente invenção, um outro polímero ou um outro composto pode ser usado em combinação, desde que o objetivo da presente invenção não seja prejudicado. Exemplos destes incluem copolímeros, misturas de polímero e misturas de compostos.

[0024] O poliéster alifático usado na presente invenção preferivelmente tem alta pureza. Especialmente, os teores dos aditivos e plastificante contidos no poliéster alifático e resíduos, tais como catalisador residual, monômeros residuais e solvente residual, usados para moldagem e pós-processamento são preferivelmente os mais baixos possíveis. Especialmente quando a composição é usada para propósitos médicos, é necessário reduzir estes teores a valores abaixo dos padrões de segurança.

[0025] Na presente invenção, a expressão “contendo a proteína” significa que pelo menos parte da proteína entra no poliéster alifático. Este estado é distinguido do estado de um complexo liofilizado no qual a proteína é existente na superfície da composição ou nos vazios da composição.

[0026] A forma da composição estéril da presente invenção não é

particularmente limitada e a composição pode ser na forma de uma fibra, película, lâmina, corpo tipo placa, corpo tipo tubo, corpo linear, corpo tipo bastão, material de costura, corpo espumoso e poroso. O método de moldagem para produzir um produto moldado não é particularmente limitado se ele for um método no qual a mudança estrutural e a redução da atividade da proteína são suprimidas. Por exemplo, técnicas de moldagem adequadas, tais como moldagem por extrusão, moldagem por injeção, moldagem por calandra, moldagem por compressão, moldagem por sopro, formação a vácuo, moldagem de pó, moldagem por fundição e fundição podem ser empregadas. A composição estéril da presente invenção é adequada para a produção de fibras e películas, e qualquer uma das técnicas de moldagem que foram empregadas a produção de fibras ou películas de plástico podem ser empregadas. Por exemplo, técnicas de moldagem por extrusão, tais como moldagem por extrusão com inflagem e moldagem por extrusão em matriz T, e técnicas de calandra ou fundição podem ser usadas. A moldagem anterior pode ser moldagem líquida ou moldagem em solução, fora das quais moldagem de solução é preferida de maneira a facilitar a dispersão da proteína, de maneira a prevenir a deterioração funcional da proteína.

[0027] A forma da fibra da forma aqui usada refere-se a um corpo moldado em 3-D pela técnica de laminação, tecelagem, malharia ou uma outra técnica de uma ou uma pluralidade de fibras. A forma da fibra é, por exemplo, um pano não tecido. Ainda, um tubo e uma malha obtidos pelo processamento do pano não tecido são incluídos na forma da fibra.

[0028] O diâmetro da fibra médio da composição estéril com uma forma da fibra da presente invenção é, por exemplo, 0,01 a 50  $\mu\text{m}$  e pode ser adequadamente determinado por um versado na tecnologia de acordo com o uso pretendido.

[0029] A composição estéril com uma forma da fibra da presente invenção pode ser na forma de uma fibra longa. A fibra longa é uma fibra

formada sem adicionar a etapa de cortar uma fibra no curso da transição de centrifugação para o processamento de um corpo moldado de fibra. Ela pode ser formada por eletrocentrifugação, métodos fiação e extrusão de microfibras com sopro de ar quente. Destes, o método de eletrocentrifugação é preferido.

[0030] O método de eletrocentrifugação é um método no qual um corpo moldado de fibra é obtido em um eletrodo aplicando uma alta tensão a uma solução contendo um polímero. O processo compreende as etapas de preparar uma solução de centrifugação contendo um polímero, aplicar uma alta tensão à solução, jatear a solução, formar um corpo moldado de fibra evaporando o solvente da solução jateada, eliminar a carga do corpo moldado de fibra formado como uma etapa opcional, e acumular o corpo moldado de fibra pela perda de carga.

[0031] Uma descrição é subsequentemente dada do processo para produzir uma composição estéril com uma forma da fibra ou uma forma de pano não tecido fora da invenção, com o método de eletrocentrifugação como um exemplo.

[0032] A etapa de preparar uma solução de centrifugação no método de eletrocentrifugação será explicada. Embora a solução de centrifugação na presente invenção não seja particularmente limitada, uma emulsão contendo uma solução de solvente orgânico de um poliéster alifático e uma solução aquosa de uma proteína, uma suspensão contendo uma solução de solvente orgânico de um poliéster alifático e partículas de proteína, ou uma solução de solvente orgânico contendo um poliéster alifático e uma proteína pode ser usada como a solução de centrifugação. Destes, uma suspensão contendo uma solução de solvente orgânico de um poliéster alifático e partículas de proteína é preferida.

[0033] A concentração do poliéster alifático na solução de poliéster alifático é preferivelmente 1 a 30% em peso. Quando a concentração do poliéster alifático é menor que 1% em peso, é difícil formar um corpo

moldado de fibra desvantajosamente. Quando a concentração é maior que 30% em peso, o diâmetro da fibra do corpo moldado de fibra obtido fica desvantajosamente grande. A concentração do poliéster alifático contido na solução de solvente orgânico é mais preferivelmente 2 a 20% em peso.

[0034] O solvente para o poliéster alifático não é particularmente limitado se ele puder dissolver o poliéster alifático, evaporar na etapa de centrifugação e puder formar uma fibra. Somente um solvente ou uma combinação de dois ou mais solventes pode ser usada. Exemplos do solvente incluem clorofórmio, 2-propanol, tolueno, benzeno, álcool benzílico, diclorometano, tetracloreto de carbono, cicloexano, cicloexanona, tricloroetano, metil etil cetona, acetato de etila e misturas destes. Para formar uma emulsão, um solvente, tais como acetona, etanol, metanol, tetraidrofurano, 1,4-dioxano, 1-propanol, fenol, piridina, ácido acético, ácido fórmico, hexafluor-2-propanol, hexafluoracetona, N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, acetonitrila, N-metil-2-pirrolidinona, N-metilmorfolina-N-óxido ou 1,3-dioxolano podem estar contidos. Destes, diclorometano ou etanol é preferivelmente usado dos pontos de vista de facilidade de manuseio e propriedades físicas.

[0035] A proteína na presente invenção pode ser adicionada e misturada com uma solução de solvente orgânico de um poliéster alifático em uma forma sólida, líquida ou de solução.

[0036] Na presente invenção, quando a emulsão contendo uma solução de solvente orgânico de um poliéster alifático e uma solução aquosa de uma proteína é usada como a solução de centrifugação, o solvente aquoso para a proteína não é particularmente limitado, se ele puder dissolver a proteína, formar uma emulsão com a solução de solvente orgânico de um poliéster alifático, evaporar na etapa de centrifugação e puder formar uma fibra. Por exemplo, salina fisiológica e soluções tampão podem ser usadas. Ainda, um estabilizante para a proteína e aditivos podem ser usados. Destes,

uma solução tampão de ácido fosfórico ou salina fisiológica é preferivelmente usada.

[0037] A concentração da proteína na solução aquosa da proteína usada na presente invenção não é particularmente limitada e pode ser adequadamente determinada, de acordo com as propriedades características da proteína. Ela é, por exemplo, 0,5 a 50% em peso.

[0038] Para preparar uma emulsão a partir de uma solução de solvente orgânico de um poliéster alifático e uma solução aquosa de uma proteína, a razão de mistura destas soluções não é particularmente limitada se elas formarem uma emulsão estável. Por exemplo, a razão (solução aquosa de proteína)/(solução de solvente orgânico de poliéster alifático) (razão em volume) é 1/100 a 1/2. Quando este valor é maior que 1/2, a emulsão se torna desvantajosamente instável.

[0039] Embora o método de preparar uma emulsão misturando uma solução de solvente orgânico de um poliéster alifático e uma solução aquosa de uma proteína não seja particularmente limitado, ondas ultravioletas ou dispositivos de agitação podem ser usados. Como o dispositivo de agitação, dispositivos de agitação com alta velocidade, tal como um homogeneizador ou dispositivo de agitação, tal como um atritor ou moinho de bola pode ser usado. Destes, dispersão com ondas ultrassônicas é preferida.

[0040] Também, a solução de centrifugação pode ser preparada adicionando um poliéster alifático depois que uma emulsão é formada a partir de um solvente orgânico e uma solução aquosa de uma proteína.

[0041] Na presente invenção, quando uma suspensão contendo uma solução de solvente orgânico de um poliéster alifático e uma proteína é usada como a solução de centrifugação, os tamanhos das partículas de proteína não são particularmente limitados, mas preferivelmente 0,01 a 100  $\mu\text{m}$ . É tecnicamente difícil fabricar partículas de proteína com um tamanho de partícula menor que 0,01  $\mu\text{m}$  e, quando o tamanho de partícula é maior que

100  $\mu\text{m}$ , dispersibilidade degrada e a composição estéril se torna desvantajosamente frágil.

[0042] Embora o método de preparar uma suspensão misturando uma solução de solvente orgânico de um poliéster alifático e partículas de proteína não é particularmente limitado, ondas ultravioletas ou dispositivos de agitação podem ser usados. Como o dispositivo de agitação, dispositivo de agitação de alta velocidade, tal como um homogeneizador ou dispositivo de agitação, tal como um atritor ou moinho de bola, podem ser usados. Destes, dispersão com ondas ultrassônicas é preferida.

[0043] Ainda, a solução de centrifugação pode ser preparada adicionando um poliéster alifático depois que uma suspensão é formada a partir de um solvente orgânico e partículas de proteína.

[0044] Antes da preparação da suspensão, partículas de proteína podem ser microfabricadas. Para microfabricação, existem trituração seca e trituração úmida, ambas as quais podem ser empregadas e também podem ser combinadas na presente invenção.

[0045] Trituração seca pode ser realizada por trituração com um moinho de bola, moinho planetário ou moinho de oscilação, pesando em um pilão com um almofariz, ou triturando com um pulverizador tipo de agitação de meio, moinho de jato ou moinho de pedra.

[0046] Nesse ínterim, trituração úmida é realizada agitando com um agitador ou amassador com alta força de cisalhamento, enquanto que partículas de proteína são dispersas em um meio de dispersão adequado, ou usando um moinho de bola ou moinho de contas, enquanto que partículas de proteína são dispersas em um meio. Ainda, partículas de proteína produzidas por um aspersor seco também podem ser usadas.

[0047] O método de esterilização usado na presente invenção é esterilização por radiação. Exemplos da radiação em uso incluem raios alfa, raios beta, raios gama, raios neutron, feixes de elétron e raios-X. Destes, raios

gama e feixes de elétron são preferidos e feixes de elétron são, acima de tudo, preferidos. Embora o método de esterilização não seja particularmente limitado, a dose da radiação é 10 a 80 kGy, preferivelmente 20 a 30 kGy. Embora a condição de temperatura não seja particularmente limitada, ela é -80 a 40°C, preferivelmente -80 a 30°C.

[0048] A radiação, tais como raios alfa, pósitron, raios gama, raios neutron, feixes de elétron ou raios-X retira um elétron das moléculas ou átomos que constituem uma substância quando aplicado na substância. Uma ligação molecular é quebrada mediante isto, e um radical altamente reativo é produzido e quimicamente reage com uma substância circundante secundariamente.

[0049] Sabe-se que uma proteína tende perder sua função (atividade) mediante exposição à radiação. Isto é considerado devido à destruição de “uma estrutura de alta ordem” que é uma fonte de desenvolvimento de uma função pela quebra de uma ligação molecular por exposição. Ainda, conforme mostrado nos exemplos comparativos da especificação do presente pedido de patente, a destruição estrutural ou desativação de uma proteína também ocorre por armazenamento depois da exposição à radiação. Entretanto, a destruição estrutural e a deterioração funcional da proteína contida no poliéster alifático na presente invenção são suprimidas, mesmo quando a proteína é exposta à radiação, e também a destruição estrutural e a deterioração funcional por armazenamento depois da exposição são suprimidas. Isto significa que a estrutura de alta ordem da proteína é retida na composição, que é um efeito comum independente do tipo da proteína. Não é considerado, a partir da espessura do poliéster alifático, através do qual a radiação é transmitida, que este efeito é devido à seleção e o mecanismo de controle não é conhecido.

[0050] O poliéster alifático contendo a proteína antes da esterilização por radiação na presente invenção pode adicionalmente conter um removedor de elétron/íon, agente de transferência de energia, removedor de radical,

antioxidante e plastificante. Exemplos do removedor de elétron/íon incluem N,N'-tetrametil fenilenodiamina, difenilenediamina, pireno e quinona. Exemplos do agente de transferência de energia incluem acenaftenona. Exemplos do removedor de radical incluem mercaptanos, octaidrofenantreno, monoalquil difenil éteres, tocoferol, ácido cítrico, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, t-butil hidroquinona, galato de propila e derivados de ácido ascórbico. Exemplos do antioxidante incluem BHT, triésteres de fosfito, agentes antienvhecimento fenólicos e sais de tio ácido orgânico. Aditivos que são geralmente aceitos como seguros para uso em alimentos e produtos farmacêuticos são preferidos. A quantidade do aditivo que não é particularmente limitada é, por exemplo, 0,01 a 10% em peso com base no poliéster alifático na composição estéril.

[0051] O poliéster alifático contendo a proteína na etapa de esterilização preferivelmente não contém água. O teor de água do poliéster alifático é preferivelmente não mais que 10% em peso, mais preferivelmente não mais que 4% em peso, muito mais preferivelmente substancialmente 0% em peso.

[0052] O poliéster alifático contendo a proteína pode ser envolto em um material de embalagem a ser esterilizado com radiação. Como o material de embalagem, um material com propriedades de barreira de gás superiores, tal como alumínio, é preferivelmente usado. O poliéster alifático pode ser hermeticamente selado e embalado junto com um desoxidante ou dissecante, ou um gás inerte é preenchido na embalagem depois da desgaseificação, ou ambos os métodos podem ser combinados. Como o desoxidante e o dissecante, os que não prejudicam o corpo humano e não são desativados mediante exposição à radiação são preferidos.

[0053] A composição estéril da presente invenção pode ser usada como um material médico que exige a função e esterilidade de uma proteína.

EXEMPLOS

[0054] Os seguintes exemplos são fornecidos para os propósitos de ilustrar adicionalmente a presente invenção, mas não devem ser considerados, de nenhuma maneira, limitantes.

#### 1. Medição de atividade de trombina

[0055] 20  $\mu\text{L}$  de uma amostra, 60  $\mu\text{L}$  de um tris-HCl 50 mM (pH 8,5) + tampão de NaCl 50 mM e 20  $\mu\text{L}$  de PLURONIC F-68 0,1% foram adicionados ao tubo 2008 da FALCON Corporation para ser incubado a 37°C por 3 minutos.  $\alpha$ -trombina purificada derivada de plasma de humano (adquirida da Haematologic Technologies, Inc.: HCT-0020) diluída com o tampão anterior para 5, 2,5, 1,25, 0,625 e 0,3125 U/mL foi usada como um padrão. 100  $\mu\text{L}$  do substrato cromogênico da equipe de teste S-2238 (1 mM: Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.) foram adicionados e misturados com a solução de reação obtida sob agitação para realizar uma reação a 37°C por 5 minutos, e 800  $\mu\text{L}$  de uma solução de ácido cítrico 0,1 M foi adicionada para terminar a reação. 200  $\mu\text{L}$  da solução de reação foram transferidos para placas de 96 poços para medir OD405/650.

[0056] O método seguinte foi usado para medir a atividade de trombina nos exemplos e Exemplo comparativos, exceto pelos exemplos 5 a 7 e Exemplo comparativo 4. 20  $\mu\text{L}$  de uma amostra e 80  $\mu\text{L}$  de uma solução diluída para a medição de atividade (0,01% F-68, 50 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8,4) foram adicionados ao tubo de poliestireno da BD para ser incubados a 37°C por 3 minutos. Trombina recombinante (JPU Trombina Padrão 400 U/mL ou WHO/US Trombina Padrão 110 IU/mL) diluída com o tampão anterior para 4, 2, 1, 0,5 e 0,25 U/mL no caso de JPU e para 6, 3, 1,5, 0,75 e 0,375 IU/mL no caso de IU foi usada como um padrão. 100  $\mu\text{L}$  do substrato cromogênico da equipe de teste S-2238 (1 mM: Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.) foram adicionados e misturados com a solução de reação obtida sob agitação para realizar uma reação a 37°C por 7 minutos, e então 800  $\mu\text{L}$  de uma solução de ácido cítrico 0,1 M foram adicionados para

terminar a reação. 200  $\mu\text{L}$  da solução de reação foram transferidos para placas de 96 poços para medir OD405/650.

## 2. Medição de quantidade de agregado de fibrinogênio

[0057] Depois que lâmina foi cortada em um diâmetro de 1 cm, fibrinogênio foi extraído com uma solução de diluição para medir a quantidade de seu agregado por cromatografia líquida de alta velocidade.

<condições de teste>

Detector: fotômetro de absorção ultravioleta (medição comprimento de onda: 280 m)

Coluna: Bio Sep-SEC-s4000 (7,8 x 300 mm, Fenomenex)

Temperatura da coluna: 25°C

Temperatura do amostrador: 6°C

Fase de transferência: Arg-HCl 0,5 mol/L/tampão de ácido fosfórico 50 mmol/L

Vazão: 1 mL/min

Tempo de análise: 20 min

## 3. Espessura

[0058] As espessuras de 15 corpos moldados foram medidas com uma força de medição de 0,01 N por meio de uma unidade de medição digimatic de alta resolução ((LITEMATIC VL-50 de Mitutoyo Corporation) para calcular o valor médio como a espessura do corpo moldado. Esta medição foi realizada com mínima força de medição que poderia ser usada pela unidade de medição.

## 4. Peso

[0059] O corpo moldado foi cortado em um tamanho de 50 mm x 100 m para medir seu peso de maneira a calcular o peso do corpo moldado.

## 5. Densidade aparente

[0060] A densidade aparente do corpo moldado foi calculada a partir do valor de espessura e peso de medição anteriores.

## 6. Medição de trombina ELISA

[0061] 5 µg/mL de um anticorpo de trombina anti-humano (No. SAHT-AP da Affinity Biologicals Inc.) foram imobilizados em uma placa de ELISA (NUNC 468667). Depois que ela foi lavada com PBS contendo 0,05% de Tween 20, Block Ace (UK-B80 de DS Pharma Biomedical Co., Ltd.) foi adicionado a cada poço para realizar mascaramento. Depois da lavagem com PBS contendo 0,05% de Tween 20, um corpo de teste foi adicionado. Trombina de humano (HCT-0020 da Haetologic Technologies, Inc.) foi usada como um padrão para formar uma curva de calibração. Depois da lavagem com PBS contendo 0,05% de Tween 20, 0,1 µg/mL de um anticorpo de trombina anti-humano marcado com HRP (No. SAHT-HRP da Affinity Biologicals Inc.) foi adicionado. Depois de uma reação, o produto da reação foi lavado com PBS contendo 0,05% de Tween 20, um reagente TMB (DaKo S1599) foi adicionado, e a mistura resultante foi deixada por 10 minutos para revelar a cor. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N foi adicionado para interromper a revelação da cor de maneira a medir OD<sub>450-650</sub> nm com uma leitora de microplaca.

## 7. Medição de atividades de enzima de lipase e β-glucosidase

### (1) Medição da taxa de extração

[0062] O corpo moldado foi cortado em um tamanho de 2 cm x 2 cm e imerso em 1 mL de salina fisiológica por 3 minutos ou 3 horas para eluir uma enzima imobilizada. Este processo foi realizado em três corpos moldados para medir suas mudanças de peso de maneira a obter o valor médio da taxa de extração calculada a partir da equação seguinte. O peso teórico da enzima imobilizada foi calculado a partir do peso da composição e% em peso do pó de enzima carregado.

$$\text{Taxa de extração} = \frac{\text{perda de peso (mg)}}{\text{peso teórico (mg) de enzima imobilizada}}$$

### (2) Medição de atividade enzimática

[0063] Um estojo de teste de lipase fluormétrico contínuo (fabricado

por PROGEN BIOTECHNIK GMBH) foi usado para medir a atividade de lipase. A taxa de recuperação de atividade foi calculada pela equação seguinte. A quantidade da enzima ativa foi calculada em termos de concentração a partir do valor de atividade. O peso teórico da enzima imobilizada por área unitária foi calculado a partir da % em peso do pó de enzima carregado e do peso da composição.

$$\text{A taxa de recuperação de atividade (\%)} = \left\{ \text{quantidade de enzima ativa (mg/cm}^2\text{) / peso teórico de enzima imobilizada por área unitária (mg/cm}^2\text{) x taxa de extração} \right\} \times 100$$

[0064] Medição fluorescente usando Tokyogreen (marca registrada, o deve se aplicar a seguir)- $\beta$ Glu (de Sekisui Medical Co., Ltd.) foi usada para medir a atividade de  $\beta$ -glucosidase. A taxa de recuperação de atividade foi calculada pela equação seguinte. O peso teórico da enzima imobilizada foi calculado a partir de % em peso do pó de enzima carregado e do peso da composição.

$$\text{Taxa de recuperação de atividade (\%)} = \left\{ \text{quantidade de enzima ativa (mg) / peso teórico de enzima imobilizada (mg) x taxa de extração} \right\} \times 100$$

[0065] A taxa de retenção de atividade foi calculada pela equação seguinte.

$$\text{Taxa de retenção de atividade (\%)} = \left\{ \text{taxa de recuperação de atividade depois da esterilização (\%)/taxa de recuperação de atividade antes da esterilização (\%)} \right\} \times 100$$

Exemplo 1

[0066] Depois que partículas contendo trombina (preparadas por liofilização de uma solução aquosa contendo 1 mg/mL de trombina recombinante, cloreto de sódio, citrato de sódio, cloreto de cálcio e manitol e com um pH de 7) foram dispersas em etanol, diclorometano foi adicionado à dispersão resultante, e um copolímero de ácido poliglicólico-ácido polilático

(Purasorb PDLG5010 de PURAC) foi dissolvido na dispersão até uma concentração de 10% em peso para preparar uma solução de centrifugação com uma razão de copolímero de partícula contendo de trombina/ácido poliglicólico-ácido polilático de 100 (1,69 como trombina)/100 (p/p). Centrifugação foi realizada por um método de eletrocentrifugação para obter um corpo moldado de fibra tipo lâmina. O corpo moldado de fibra obtido teve uma espessura de 131  $\mu\text{m}$ , um peso de 1,44  $\text{mg}/\text{cm}^2$  e uma densidade aparente de 111  $\text{mg}/\text{cm}^3$ . A lâmina obtida foi cortada em um diâmetro de 1 cm, e a proteína foi extraída com 200  $\mu\text{L}$  de salina fisiológica para medir sua atividade. Como um resultado, o valor de medição de atividade foi 26,7  $\text{U}/\text{cm}^2$ . A lâmina obtida foi esterilizada por exposição a um feixe eletrônico de 20 kGy e mantida a 40°C e 75% RH por um mês para medir a atividade de trombina. Quando a atividade de trombina antes da esterilização foi 100%, a taxa de retenção da atividade de trombina logo depois da exposição ao feixe eletrônico foi 79%. A taxa de retenção de atividade depois de um mês foi 78%, e nenhuma redução na atividade de trombina foi observada durante armazenamento.

#### Exemplo 2

[0067] Depois que partículas contendo trombina (preparadas por liofilização de uma solução aquosa contendo 1  $\text{mg}/\text{mL}$  de trombina recombinante, cloreto de sódio, citrato de sódio, cloreto de cálcio e manitol e com um pH de 7) e Quinizarin Green SS (de Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) foram dispersos em etanol, diclorometano foi adicionado à dispersão resultante, e um copolímero de ácido poliglicólico-ácido polilático (Purasorb PDLG5010 de PURAC) foi dissolvido na dispersão a uma concentração de 10% em peso para preparar uma solução de centrifugação com uma razão de copolímero de partícula contendo trombina/ácido poliglicólico-ácido polilático de 100 (1,69 como trombina)/100 (p/p). Centrifugação foi realizada pelo método de eletrocentrifugação para obter um corpo moldado de fibra tipo

lâmina. A lâmina obtida contendo o corpo moldado de fibra (espessura média: 129  $\mu\text{m}$ , peso: 1,49  $\text{mg}/\text{cm}^2$ , densidade aparente: 124  $\text{mg}/\text{cm}^3$ ), foi cortada em um diâmetro de 1 cm, e a proteína foi extraída com 200  $\mu\text{L}$  de salina fisiológica para medir a atividade de trombina. Como um resultado, o valor de medição de atividade foi 40,2  $\text{IU}/\text{cm}^2$ . A lâmina obtida foi esterilizada por exposição a um feixe eletrônico de 30 kGy e mantida a 40°C e 75%RH por um mês para medir a atividade de trombina. Quando a atividade de trombina antes da esterilização foi 100%, a taxa de retenção da atividade de trombina logo depois da exposição a um feixe eletrônico foi 70%. A taxa de retenção de atividade depois de um mês foi 74%, e nenhuma redução na atividade de trombina foi observada durante armazenamento.

### Exemplo 3

[0068] Depois que partículas contendo trombina (preparadas por liofilização de uma solução aquosa contendo 1  $\text{mg}/\text{mL}$  de trombina recombinante, cloreto de sódio, citrato de sódio, cloreto de cálcio e manitol e com um pH de 7) foram dispersas em etanol, diclorometano foi adicionado à dispersão resultante, e um copolímero de ácido poliglicólico-ácido polilático (Purasorb PDLG5010 de PURAC) foi dissolvido na dispersão a uma concentração de 10% em peso para preparar uma solução de dopagem com uma razão de copolímero de partícula contendo trombina/ácido poliglicólico-ácido polilático de 100 (1,69 como trombina)/100 (p/p). A solução de dopagem obtida foi usada para formar uma película por um método de disposição. O intervalo de revestimento foi 127  $\mu\text{m}$ , e a velocidade de revestimento foi 30,1  $\text{mm}/\text{sec}$ . A lâmina obtida teve uma espessura de 58  $\mu\text{m}$ , um peso de 2,9  $\text{mg}/\text{cm}^2$  e uma densidade aparente de 504  $\text{mg}/\text{cm}^3$ . A lâmina obtida foi cortada em um diâmetro de 1 cm, e a proteína foi extraída com 200  $\mu\text{L}$  de salina fisiológica para medir a atividade de trombina. Como um resultado, o valor de medição de atividade foi 71.1  $\text{IU}/\text{cm}^2$ . A lâmina obtida foi esterilizada por exposição a um feixe eletrônico de 30 kGy e mantida a

40°C e 75%RH por um mês para medir a atividade de trombina. Quando a atividade de trombina antes da esterilização foi 100%, a taxa de retenção da atividade de trombina logo depois da exposição a um feixe eletrônico foi 75,7%. A taxa de retenção de atividade depois de um mês foi 82%, e nenhuma redução na atividade de trombina foi observada durante armazenamento.

#### Exemplo 4

[0069] Depois que partículas contendo fibrinogênio (preparadas por liofilização de uma solução aquosa contendo 10 mg/mL de fibrinogênio recombinante, arginina, cloreto de sódio e manitol e com um pH de 8,5) foram dispersas em etanol, diclorometano foi adicionado à dispersão resultante, e um copolímero de ácido poliglicólico-ácido polilático (Purasorb PDLG5010 de PURAC) foi dissolvido na dispersão a uma concentração de 10% em peso para preparar uma solução de centrifugação com uma razão de copolímero de partícula contendo fibrinogênio/ácido poliglicólico-ácido polilático de 100 (50,85 as fibrinogênio)/100 (p/p). Centrifugação foi realizada pelo método de eletrocentrifugação para obter um corpo moldado de fibra tipo lâmina. O corpo moldado de fibra obtido teve uma espessura de 131  $\mu\text{m}$ , um peso de 1,44  $\text{mg}/\text{cm}^2$  e uma densidade aparente de 110  $\text{mg}/\text{cm}^3$ . A lâmina obtida foi cortada em um diâmetro de 1 cm, e fibrinogênio foi extraído com uma solução de diluição para medir a quantidade de seu agregado por cromatografia de alta velocidade. Como um resultado, a quantidade do agregado foi 9,79%. A lâmina obtida foi esterilizada por exposição a um feixe eletrônico de 30 kGy e mantida a 40°C e 75%RH por um mês para medir a quantidade do agregado. A quantidade do agregado logo depois da exposição a um feixe eletrônico foi 18,81%. O peso do agregado depois de um mês foi 24,14%.

#### Exemplo Comparativo 1

[0070] Depois que um feixe eletrônico de 30 kGy foi aplicado nas

partículas contendo trombina (preparadas por liofilização de uma solução aquosa contendo 1 mg/mL de trombina recombinante, cloreto de sódio, citrato de sódio, cloreto de cálcio e manitol e com um pH de 7) para esterilizá-las, as partículas contendo trombina foram mantidas a 40°C e 75%RH por um mês para medir a atividade de trombina. A atividade de trombina antes da exposição foi 404,73 U/vial. Quando a atividade de trombina antes da esterilização foi 100%, a taxa de retenção da atividade de trombina logo depois da exposição a um feixe eletrônico foi 51,8%. A taxa de retenção de atividade depois de um mês foi 17,9%, e uma redução na atividade de trombina foi observada durante armazenamento.

#### Exemplo comparativo 2

[0071] Depois que partículas contendo trombina (preparadas por liofilização de uma solução aquosa contendo 1 mg/mL de trombina recombinante, cloreto de sódio, citrato de sódio, cloreto de cálcio e manitol e com um pH de 7) foram dispersas em 2-propanol, hidroxipropil celulose (2,0-2,9 mPa.s, fabricada pela Nippon Soda Co., Ltd.), foi dissolvido na dispersão resultante a uma concentração de 13% em peso para preparar uma solução de dopagem com uma razão de partícula contendo trombina/hidroxipropil celulose de 100/100 (p/p). Centrifugação foi realizada pelo método de eletrocentrifugação para obter um corpo moldado de fibra tipo lâmina. O corpo moldado de fibra obtido teve uma espessura de 204  $\mu\text{m}$ , um peso de 2,08  $\text{mg}/\text{cm}^2$  e uma densidade aparente de 101  $\text{mg}/\text{cm}^3$ . A lâmina obtida foi cortada em um diâmetro de 1 cm, e a proteína foi extraída com 200  $\mu\text{L}$  de salina fisiológica para medir sua atividade. Como um resultado, o valor de medição de atividade foi 110,3 IU/ $\text{cm}^2$ . A lâmina obtida foi esterilizada por exposição a um feixe eletrônico de 30 kGy e mantida a 40°C e 75%RH por um mês para medir a atividade de trombina. Quando a atividade de trombina antes da esterilização foi 100%, a taxa de retenção da atividade de trombina logo depois da exposição a um feixe eletrônico foi 68,4%. A taxa de retenção

de atividade depois de um mês foi 54,9% e uma redução na atividade de trombina foi observada durante armazenamento.

### Exemplo comparativo 3

[0072] Depois que um feixe eletrônico de 30 kGy foi aplicado nas partículas contendo fibrinogênio (preparadas por liofilização de uma solução aquosa contendo 10 mg/mL de fibrinogênio recombinante, arginina, cloreto de sódio e manitol e com um pH de 8,5) para esterilizá-las, as partículas contendo trombina foram mantidas a 40°C e 75%RH por um mês para medir a quantidade de um agregado de fibrinogênio. A quantidade do agregado antes da exposição foi 6,97%. A quantidade do agregado logo depois da exposição a um feixe eletrônico foi 18,51%. A quantidade do agregado depois de um mês foi 54,72%.

[0073] Os resultados (as taxas de retenção de atividade de trombina (Th) depois da esterilização e depois do armazenamento depois da esterilização com base no valor antes da esterilização) dos exemplos 1 a 3 e Exemplos comparativos 1 e 2 são mostrados na fig. 1.

[0074] Deve-se entender que, quando a proteína é contida no poliéster alifático, a mudança estrutural e deterioração funcional da proteína causada por esterilização por radiação são suprimidas, comparadas com um caso onde somente partículas contendo proteína são usadas (Exemplo comparativo 1) e adicionalmente que a mudança e a deterioração causadas pelo armazenamento depois da esterilização por radiação são suprimidas, comparadas com um caso onde poliéster não alifático mas uma celulose (hidroxipropil celulose) é usado (Exemplo comparativo 2).

[0075] Os resultados (a quantidade do agregado de fibrinogênio depois da esterilização e depois do armazenamento depois da esterilização) do exemplo 4 e Exemplo comparativo 3 estão mostrados na fig. 2.

[0076] Deve-se entender que, quando a proteína é contida no poliéster alifático (Exemplo 4), a mudança estrutural da proteína causada pelo

armazenamento depois da esterilização por radiação é suprimida, comparada com um caso onde somente partículas contendo proteína são usadas (Exemplo comparativo 3).

#### Exemplo 5

[0077] Depois que partículas contendo trombina (Bolheal, (marca registrada, o mesmo deve se aplicar a seguir), adesivo de tecido: Vial 3) foram dispersas em etanol, diclorometano foi adicionado à dispersão resultante, e ácido polilático (PL18 de Purac Biomaterials) foi dissolvido na dispersão a uma concentração de 10% em peso para preparar uma solução de centrifugação com uma razão de partícula contendo trombina/ácido polilático de 40 (0,45 como trombina)/100 (p/p). Centrifugação foi realizada pelo método de eletrocentrifugação para obter um corpo moldado de fibra tipo lâmina. A lâmina obtida foi esterilizada com um feixe eletrônico de 20 kGy. A lâmina obtida foi cortada em um tamanho de 2 cm x 2 cm, e a proteína foi extraída com 1 mL de salina fisiológica para medir sua atividade e ELISA. Como um resultado, o valor de medição da atividade foi 5,0 U/cm<sup>2</sup>, e o valor de medição ELISA foi 3,4 µg/cm<sup>2</sup>. Quando as medições de atividade e ELISA foram feitas em uma lâmina não esterilizada similarmente, o valor de medição de atividade foi 7,5 U/cm<sup>2</sup> e o valor de medição ELISA foi 4,35 µg/cm<sup>2</sup>. Ou seja, a taxa de retenção da atividade da lâmina esterilizada foi 73% da lâmina não esterilizada.

#### Exemplo 6

[0078] Depois que partículas contendo trombina (adesivo de tecido Bolheal: Vial 3) foram dispersos em etanol, diclorometano foi adicionado à dispersão resultante, e ácido polilático (PL18 de Purac Biomaterials) foi dissolvido na dispersão a uma concentração de 10% em peso para preparar uma solução de centrifugação com uma razão de partícula contendo trombina/ácido polilático de 70 (0,78 como trombina)/100 (p/p). Centrifugação foi realizada pelo método de eletrocentrifugação para obter um

corpo moldado de fibra tipo lâmina. A lâmina obtida foi esterilizada com um feixe eletrônico de 20 kGy. A lâmina obtida foi cortada em um tamanho de 2 cm x 2 cm, e a proteína foi extraída com 1 mL de salina fisiológica para medir sua atividade e ELISA. Como um resultado, o valor de medição de atividade foi 9,575 U/cm<sup>2</sup>, e o valor de medição ELISA foi 7.0 µg/cm<sup>2</sup>. Quando as medições de atividade e ELISA foram feitas em uma lâmina não esterilizada similarmente, o valor de medição de atividade foi 11,15 U/cm<sup>2</sup> e o valor de medição ELISA foi 7,2 µg/cm<sup>2</sup>. Ou seja, a taxa de retenção da atividade da lâmina esterilizada foi 86% da lâmina não esterilizada.

#### Exemplo 7

[0079] Depois que pós liofilizados de trombina (adesivo de tecido Bolheal: Vial 3) foram dispersos em etanol, diclorometano foi adicionado à dispersão resultante, e ácido polilático (PL18 de Purac Biomaterials) foi dissolvido na dispersão a uma concentração de 10% em peso para preparar uma solução de centrifugação com uma razão de pó liofilizado de trombina /ácido polilático de 100 (1,1 como trombina)/100 (p/p). Centrifugação foi realizada pelo método de eletrocentrifugação a uma temperatura de 22°C e uma umidade de não mais que 26% para obter um corpo moldado de fibra tipo lâmina. O diâmetro interno de um bico de jato foi 0,8 mm, a tensão foi 15 kV, a vazão da solução de centrifugação foi 3,0 mL/h, e a distância do bico de jato até uma chapa plana foi 25 cm. A lâmina obtida foi esterilizada com um feixe eletrônico de 20 kGy. A lâmina obtida foi cortada em um tamanho de 2 cm x 2 cm, e a proteína foi extraída com 1 mL de salina fisiológica para medir sua atividade e ELISA. Como um resultado, o valor de medição de atividade foi 15 U/cm<sup>2</sup>, e o valor de medição ELISA foi 11 µg/cm<sup>2</sup>. Quando as medições de atividade e ELISA foram feitas em uma lâmina não esterilizada similarmente, o valor de medição de atividade foi 23 U/cm<sup>2</sup> e o valor de medição ELISA foi 16 µg/cm<sup>2</sup>. Ou seja, a taxa de retenção da atividade da lâmina esterilizada foi 64% da lâmina não esterilizada.

## Exemplo comparativo 4

[0080] Partículas contendo trombina (Bolheal) foram esterilizadas com um feixe eletrônico de 20 kGy. A proteína foi extraída com 1 mL de salina fisiológica para medir sua atividade e ELISA. Como um resultado, o valor de medição de atividade foi 22,5 U/cm<sup>2</sup> e o valor de medição ELISA foi 11,5 µg/cm<sup>2</sup>. Quando as medições de atividade e ELISA foram feitas em partículas contendo trombina não esterilizadas similarmente, o valor de medição de atividade foi 68,5 U/cm<sup>2</sup> e o valor de medição ELISA foi 41,5 µg/cm<sup>2</sup>. Ou seja, a taxa de retenção da atividade da lâmina esterilizada foi 32% da lâmina não esterilizada.

## Exemplo 8

[0081] Depois que pós de lipase (derivados de pâncreas de porco, fabricados pela Wako Pure Chemical Industries, Ltd., o mesmo deve se aplicar a seguir) foram dispersos em etanol, diclorometano foi adicionado à dispersão resultante, e um copolímero de ácido polilático-ácido glicólico (PDLG5010 de Purac Biomaterials) foi dissolvido na dispersão a uma concentração de 10% em peso para preparar uma solução de centrifugação com uma razão de copolímero de lipase pó/ácido polilático-ácido glicólico de 50/100 (p/p). Centrifugação foi realizada pelo método de eletrocentrifugação a uma temperatura de 27°C e uma umidade de não mais que 25% para obter um corpo moldado de fibra tipo lâmina. O diâmetro interno de um bico de jato foi 0,9 mm, a tensão foi 15 kV, a vazão da solução de centrifugação foi 4,0 mL/h, e a distância do bico de jato até uma chapa plana foi 25 cm. A taxa de extração de lipase da lâmina obtida foi 79%. A lâmina obtida foi esterilizada com um feixe eletrônico de 20 kGy. A lâmina esterilizada obtida foi cortada em um tamanho de 1 cm x 1 cm, e lipase foi extraída com 1 mL de um tampão de lipase contido em um estojo para medir sua atividade. Como um resultado, a taxa de recuperação de atividade foi 100%.

## Exemplo 9

[0082] Diclorometano foi adicionado a pós de lipase, e um copolímero de ácido polilático-ácido glicólico (PDLG5010 de Purac Biomaterials) foi dissolvido na mistura resultante a uma concentração de 10% em peso para preparar uma solução de centrifugação com uma razão de pó de lipase/ácido polilático de 50/100 (p/p). Centrifugação foi realizada pelo método de eletrocentrifugação a uma temperatura de 26°C e uma umidade de não mais que 25% para obter um corpo moldado de fibra tipo lâmina. O diâmetro interno de um bico de jato foi 0,8 mm, a tensão foi 15 kV, a vazão da solução de centrifugação foi 4,0 mL/h, e a distância do bico de jato até uma chapa plana foi 25 cm. A taxa de extração de lipase da lâmina obtida foi 63%. A lâmina obtida foi esterilizada com um feixe eletrônico de 20 kGy. A lâmina esterilizada obtida foi cortada em um tamanho de 1 cm x 1 cm, e lipase foi extraída com 1 mL de um tampão de lipase contido em um estojo para medir sua atividade. Como um resultado, a taxa de recuperação de atividade foi 92%.

#### Exemplo 10

[0083] Depois que pós de  $\beta$ -glucosidase (derivados de amêndoa, fabricada pela Oriental Yeast Co., Ltd, o mesmo deve se aplicar a seguir) foram dispersos em etanol, diclorometano foi adicionado à dispersão resultante, e um copolímero de ácido polilático-ácido glicólico (PDLG5010 de Purac Biomaterials) foi dissolvido na dispersão a uma concentração de 10% em peso para preparar uma solução de centrifugação com uma razão de copolímero de pó de  $\beta$ -glucosidase/ácido polilático-ácido glicólico de 38/62 (p/p). Centrifugação foi realizada pelo método de eletrocentrifugação a uma temperatura de 27°C e uma umidade de não mais que 25% para obter um corpo moldado de fibra tipo lâmina. O diâmetro interno de um bico de jato foi 0,9 mm, a tensão foi 15 kV, a vazão da solução de centrifugação foi 4,0 mL/h, e a distância do bico de jato até uma chapa plana foi 25 cm. Depois que a lâmina obtida foi cortada em um tamanho de 2 cm x 2 cm, ela foi esterilizada

com um feixe eletrônico de 20 kGy.  $\beta$ -glucosidase foi extraído com 1 mL de salina fisiológica para medir sua atividade com Tokyogreen- $\beta$ Glu. Como um resultado, a taxa de recuperação de atividade foi 92%. Quando a medição da atividade foi feita em uma lâmina não esterilizada similarmente, a taxa de recuperação de atividade foi 94%. Concluiu-se pelo exposto que a taxa de retenção da atividade do corpo moldado de fibra esterilizado foi 98% do corpo moldado de fibra não esterilizado e que  $\beta$ -glucosidase não foi desativada pela esterilização de feixe eletrônico.

#### Exemplo 11

[0084] Depois que pós de  $\beta$ -glucosidase foram dispersos em etanol, diclorometano foi adicionado à dispersão resultante, e um copolímero de ácido polilático-caprolactona (PLCA8812 de Taki Chemical Co., Ltd.) foi dissolvido na dispersão a uma concentração de 10% em peso para preparar uma solução de centrifugação com uma razão de copolímero de pó de  $\beta$ -glucosidase/ácido polilático-caprolactona de 38/62 (p/p). Centrifugação foi realizada pelo método de eletrocentrifugação a uma temperatura de 27°C e uma umidade de não mais que 25% para obter um corpo moldado de fibra tipo lâmina. O diâmetro interno de um bico de jato foi 0,9 mm, a tensão foi 15 kV, a vazão da solução de centrifugação foi 3,0 mL/h, e a distância do bico de jato até uma chapa plana foi 25 cm. Depois que a lâmina obtida foi cortada em um tamanho de 2 cm x 2 cm, ela foi esterilizada com um feixe eletrônico de 20 kGy.  $\beta$ -glucosidase foi extraída com 1 mL de salina fisiológica para medir sua atividade com Tokyogreen- $\beta$ Glu. Como um resultado, a taxa de recuperação de atividade foi 81%. Quando a medição da atividade foi feita em uma lâmina não esterilizada similarmente, a taxa de recuperação de atividade foi 80%. Concluiu-se pelo exposto que a taxa de retenção da atividade do corpo moldado de fibra esterilizado foi 101% do corpo moldado de fibra não esterilizado e que  $\beta$ -glucosidase não foi desativada pela esterilização de feixe eletrônico.

## Exemplo 12

[0085] Depois que pós de  $\beta$ -glucosidase foram dispersos em etanol, diclorometano foi adicionado à dispersão resultante, e ácido polilático (PL18 de Purac Biomaterials) foi dissolvido na dispersão a uma concentração de 11% em peso para preparar uma solução de centrifugação com uma razão  $\beta$ -glucosidase pó/ácido polilático de 38/62 (p/p). Centrifugação foi realizada pelo método de eletrocentrifugação a uma temperatura de 27°C e uma umidade de não mais que 25% para obter um corpo moldado de fibra tipo lâmina. O diâmetro interno de um bico de jato foi 0,9 mm, a tensão foi 15 kV, a vazão da solução de centrifugação foi 3,0 mL/h, e a distância do bico de jato até uma chapa plana foi 25 cm. Depois que a lâmina obtida foi cortada em um tamanho de 2 cm x 2 cm, ela foi esterilizada com um feixe eletrônico de 20 kGy.  $\beta$ -glucosidase foi extraída com 1 mL de salina fisiológica para medir sua atividade com Tokyogreen- $\beta$ Glu. Como um resultado, a taxa de recuperação de atividade foi 62%. Quando a medição de atividade foi feita em uma lâmina não esterilizada similarmente, a taxa de recuperação de atividade foi 71%. Concluiu-se pelo exposto que a taxa de retenção da atividade do corpo moldado de fibra esterilizado foi 87% do corpo moldado de fibra não esterilizado e que  $\beta$ -glucosidase não foi desativada por esterilização de feixe eletrônico.

## Exemplo comparativo 5

[0086] Pós de lipase foram esterilizados com um feixe eletrônico de 20 kGy. 1 mL de um tampão de lipase foi adicionado a 1 mg dos pós para medir a atividade de lipase. Como um resultado, a taxa de recuperação de atividade foi 74%.

## Exemplo comparativo 6

[0087] Pós de  $\beta$ -glucosidase foram esterilizados com um feixe eletrônico de 20 kGy. 2 mg dos pós foram dissolvidos em 1 mL de salina fisiológica para medir a atividade de  $\beta$ -glucosidase com Tokyogreen- $\beta$ Glu.

Como um resultado, a taxa de retenção de atividade foi 81%.

#### EFEITO DA INVENÇÃO

[0088] A composição estéril da presente invenção retém a estrutura e função de uma proteína, embora ela seja esterilizada.

#### VIABILIDADE INDUSTRIAL

[0089] A composição estéril da presente invenção é usada na indústria de fabricação de produtos medicinais que exigem a função e esterilidade de uma proteína.

## REIVINDICAÇÕES

1. Composição estéril esterilizada com radiação, que compreende uma proteína e um poliéster alifático, caracterizada pelo fato de que a proteína é selecionada do grupo que consiste em fibrinogênio, enzimas, proteínas de transporte, proteínas de defesa, proteínas de toxinas, hormônios proteicos, fatores de crescimento e misturas dos mesmos; pelo menos parte da proteína entra no interior do poliéster alifático como dispersão de partículas da proteína ou partículas de uma mistura da proteína e aditivos farmacologicamente aceitáveis; e o tamanho das partículas não é inferior a 0,01  $\mu\text{m}$ ;

e a referida composição estéril está na forma de uma fibra, película, lâmina, corpo tipo placa, corpo tipo tubo, corpo linear, corpo tipo bastão, corpo espumoso e poroso; e a referida composição estéril foi produzida a partir de uma suspensão contendo uma solução de solvente orgânico do poliéster alifático e as partículas da proteína.

2. Composição estéril, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o poliéster alifático é selecionado do grupo que consiste em ácido poliglicólico, ácido polilático, policaprolactona, copolímeros destes e misturas dos mesmos.

3. Composição estéril, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que é em uma forma de fibra.

4. Composição estéril, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que é produzida por um método de eletrocentrifugação.

5. Composição estéril, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que é em uma forma de película.

6. Composição estéril, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que é produzida por um método de disposição.

Fig. 1

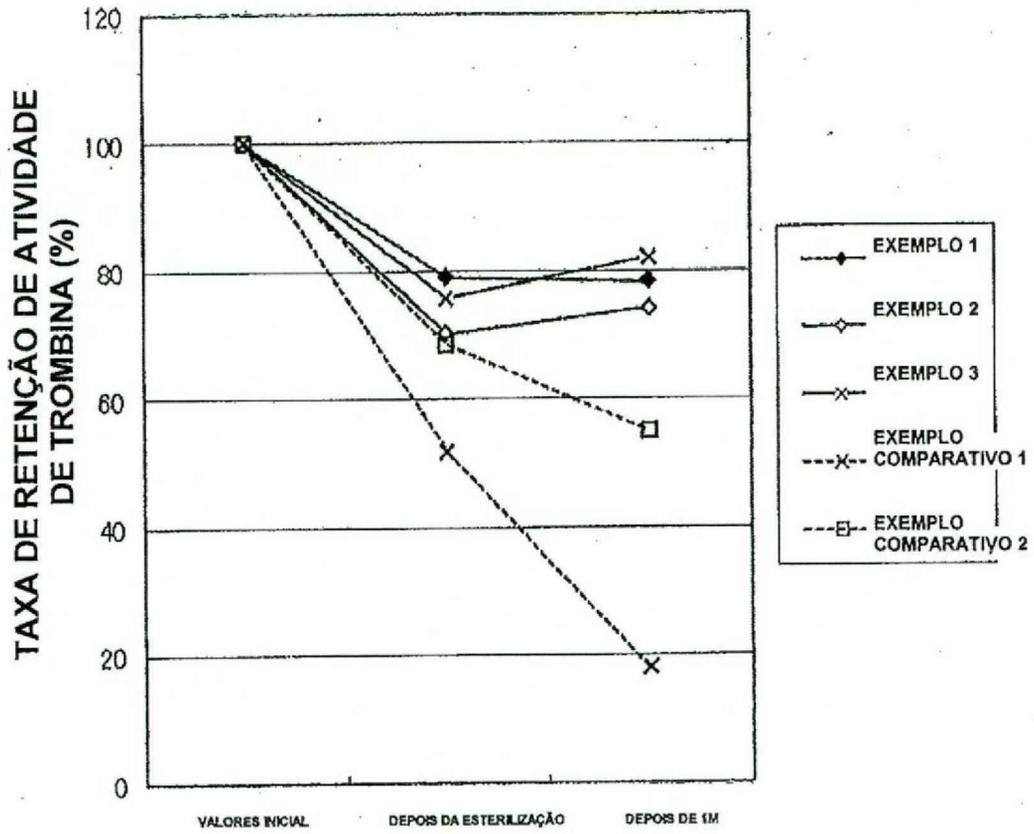


Fig. 2

