

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 682 024**

51 Int. Cl.:

|                   |                             |           |
|-------------------|-----------------------------|-----------|
| <b>A61L 27/26</b> | (2006.01) <b>A61K 38/48</b> | (2006.01) |
| <b>A61L 27/50</b> | (2006.01) <b>A61L 31/14</b> | (2006.01) |
| <b>A61L 28/00</b> | (2006.01) <b>A61K 38/17</b> | (2006.01) |
| <b>A61L 29/04</b> | (2006.01)                   |           |
| <b>A61L 31/04</b> | (2006.01)                   |           |
| <b>A61K 47/38</b> | (2006.01)                   |           |
| <b>A61L 15/22</b> | (2006.01)                   |           |
| <b>A61L 17/10</b> | (2006.01)                   |           |
| <b>A61K 38/00</b> | (2006.01)                   |           |
| <b>A61K 9/70</b>  | (2006.01)                   |           |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.05.2013** **PCT/JP2013/063867**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.11.2013** **WO13172467**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2013** **E 13790434 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.06.2018** **EP 2851083**

54 Título: **Composición de proteína resistente a la esterilización por radiación**

30 Prioridad:

**14.05.2012 JP 2012110395**  
**14.05.2012 JP 2012110764**  
**01.03.2013 JP 2013040594**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**18.09.2018**

73 Titular/es:

**TEIJIN LIMITED (33.3%)**  
**6-7 Minamihommachi 1-chome, Chuo-ku**  
**Osaka-shi, Osaka 541-0054, JP;**  
**TEIJIN PHARMA LIMITED (33.3%) y**  
**THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH**  
**INSTITUTE (33.3%)**

72 Inventor/es:

**KAGEYAMA, YUKAKO;**  
**FUJINAGA, KENTARO;**  
**YAMAGUCHI, AYUKO;**  
**AKIYAMA, YUSUKE;**  
**KATOU, SOUICHIROU;**  
**KIMURA, YUKIKO;**  
**HONDA, SUSUMU;**  
**SATAKE, MAKOTO;**  
**KANEKO, HIROAKI;**  
**ISHIWARI, AYUMI y**  
**HIRASHIMA, MASAKI**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 682 024 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).

**DESCRIPCIÓN**

Composición de proteína resistente a la esterilización por radiación

5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a una composición de proteína que comprende aminoácidos específicos y/o un derivado de éter de celulosa y tiene resistencia a la esterilización por radiación.

10 ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

Las proteínas naturales y sintéticas son cada vez más importantes como fármacos. Cuando se usan para aplicaciones médicas, sus productos deben esterilizarse. Como medio de esterilización, se conoce la esterilización por calor en un autoclave, esterilización por radiación ionizante como un rayo y o haz de electrones, esterilización por gas con un gas de óxido de etileno, esterilización por plasma con peróxido de hidrógeno, y esterilización separada usando un esterilizante químico que comprende una formulación de glutaraldehído o un filtro. Sin embargo, las actividades de proteínas como las proteínas bioactivas se reducen por la esterilización con calor o radiación. La esterilización con óxido de etileno tiene la posibilidad de que se pueda producir un subproducto por una reacción química y que un gas residual altamente tóxico pueda afectar negativamente al cuerpo humano. La esterilización con un esterilizante químico tiene el problema de que se deben 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. Entonces, para fabricar productos farmacéuticos y médicos que contienen o inmovilizan una proteína, sus procesos de producción deben realizarse completamente en condiciones estériles y se requiere una cantidad enorme de coste de producción.

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

30 La EP0437095 enseña que un producto de celulosa oxidada neutralizada combinada 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 con la que se une 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 dispersada de celulosa regenerada oxidada (ORC)) y un activador (como un péptido). Este documento enseña que el activador puede estar contenido en la matriz, el polímero bioabsorbible o en ambos y que la sustancia de esponja compuesta puede esterilizarse mientras está envasada.

40 La US5730933 divulga un método de esterilizar péptidos biológicamente activos mediante irradiación con rayos gamma o haces 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 evita 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 los mismos. Este documento enseña que cuando el péptido se formula 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 la desactivación de una proteína en el momento de la esterilización con radiación ionizante pueda suprimirse elaborando un derivado de éter de celulosa y aminoácidos específicos coexistentes con la proteína.

55 Mientras tanto, la JP-A 2011-47089 divulga un proceso para producir una nanofibra que contiene enzimas que tiene excelente actividad enzimática. En este proceso, una solución de hilado que contiene un enzima y un polímero disueltos 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

Es un objeto de la presente invención proporcionar una composición de proteína que tenga resistencia a la esterilización por radiación.

65

Los inventores de la presente invención realizaron estudios intensivos para resolver el problema anterior y descubrieron que, sorprendentemente, la resistencia a la esterilización por radiación de una proteína se mejora haciendo una mezcla de glicina, fenilalanina e histidina y/o un derivado de éter de celulosa coexistente con la proteína. La presente invención se llevó a cabo en base a este descubrimiento.

Es decir, la presente invención es una composición de proteína que comprende una mezcla de glicina, fenilalanina e histidina y/o un derivado de éter de celulosa como aditivo.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra el efecto de resistencia a la esterilización para una proteína de una combinación de un derivado de éter de celulosa y aditivos específicos de la presente invención (eje de ordenadas: valor relativo de la intensidad del gel (antes de la esterilización: 100)); y

La Figura 2 muestra el efecto de resistencia a la esterilización de una combinación de un derivado de éter de celulosa y aditivos específicos de la presente invención (eje de ordenadas: un aumento en la cantidad de un agregado de proteína (%)).

#### MEJOR MODO DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

La presente invención es una composición de proteína que comprende una mezcla de glicina, fenilalanina e histidina y/o un derivado de éter de celulosa como aditivo.

La proteína usada en la presente invención no está particularmente limitada. Los ejemplos de la proteína incluyen proteínas hemostáticas tipificadas por fibrinógeno y trombina, enzimas tipificadas por asparaginasa, catalasa, superóxido dismutasa y lipasa, proteínas de transporte tipificadas por hemoglobina, albúmina sérica y lipoproteína 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 proteicas tipificadas por insulina, factores de crecimiento y citoquina, proteínas de almacenamiento tipificadas por ovoalbúmina y ferritina, proteínas estructurales tipificadas por colágeno y queratina, y factores de crecimiento caracterizados por factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento tipo 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 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 las proteínas hemostáticas, enzimas, proteínas de transporte, proteínas musculares, proteínas de defensa, proteínas de toxinas, hormonas proteicas, proteínas de almacenamiento, proteínas estructurales y factores de crecimiento, y se prefiere particularmente el fibrinógeno.

La proteína usada en la presente invención puede ser de origen animal o fabricarse mediante una técnica de recombinación genética. Si es de origen animal, es preferiblemente de origen humano. La proteína fabricada mediante la 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, pueden añadirse un estabilizante y un aditivo que sean farmacéuticamente aceptables (referidos como "estabilizante, etc." en lo sucesivo y se distinguen del aditivo que se hace coexistente con la proteína para proporcionar resistencia a la esterilización por radiación en la presente invención). Los ejemplos preferidos del estabilizante, etc. incluyen arginina, isoleucina, ácido glutámico, ácido cítrico, cloruro de calcio, cloruro de sodio, inhibidores de proteasa (como aprotinina), albúmina, surfactantes, fosfolípidos, polietilenglicol, hialuronato de sodio, glicerina, trehalosa y alcoholes de azúcares (como glicerol y manitol). Se prefiere particularmente por lo menos uno seleccionado de arginina, cloruro de sodio, trehalosa, manitol y ácido cítrico, y se prefiere particularmente el ácido cítrico.

Una mezcla de la proteína y el estabilizante, etc. usada en la presente invención contiene la proteína en una cantidad de no más de 35 partes en peso, preferiblemente no más de 30 partes en peso en base a 100 partes en peso de la mezcla.

Cuando el aditivo usado en la presente invención es una mezcla de glicina, fenilalanina e histidina, el contenido de glicina es generalmente de 5 a 90 partes en peso, preferiblemente de 15 a 60 partes en peso, más preferiblemente de 20 a 40 partes en peso, el contenido de fenilalanina es generalmente de 1 a 80 partes en peso, preferiblemente de 2 a 40 partes en peso, más preferiblemente de 4 a 20 partes en peso, y el contenido de histidina es generalmente de 2 a 70 partes en peso, preferiblemente de 5 a 40 partes en peso; más preferiblemente de 8 a 20 partes en peso en base a 100 partes en peso del total del aditivo y la proteína.

Quando el aditivo en la presente invención es un derivado de éter de celulosa, la proteína o una mezcla de la proteína y el estabilizante, etc. usada en la presente invención puede ser soportada en el derivado de éter de celulosa pero preferiblemente contenido en el derivado de éter de celulosa (la palabra "contenido" se refiere a un estado en el que al menos parte de la proteína entra en el interior del derivado de éter de celulosa). En este caso, las moléculas de la proteína y el estabilizante, etc. pueden dispersarse en el derivado de éter de celulosa, pero preferiblemente como partículas formadas mediante la agregación de las moléculas de la proteína y el estabilizante, etc. (puede ser referido como "partículas de proteínas" incluyendo partículas mezcladas con el estabilizante, etc.)

Esta existencia preferida de la proteína o las partículas de proteína en el derivado de éter de celulosa permanece sin cambios cuando el aditivo es solo el derivado de éter de celulosa y también cuando el aditivo consiste en una mezcla de glicina, fenilalanina e histidina y el derivado de éter de celulosa.

Los ejemplos del derivado de éter de celulosa usado en la presente invención incluyen hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y mezclas de los mismos.

Se prefiere uno seleccionado del grupo que consiste de hidroxipropilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y mezclas de los mismos, y el más preferido es la hidroxipropilcelulosa.

Aunque el peso molecular del derivado de éter de celulosa usado en la presente invención no está particularmente limitado, cuando se lleva a cabo la medición de la viscosidad a una concentración del 2% y 20° C, se selecciona un peso molecular que muestra una viscosidad de 1 a 10.000 mPa·s, preferiblemente de 2 a 5.000 mPa·s, más preferiblemente de 2 a 4.000 mPa·s.

En la composición de proteína de la presente invención, se puede usar otro polímero u otro compuesto en combinación siempre que el objeto de la presente invención no se vea afectado.

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

La forma de la composición de proteína de la presente invención no está limitada a una forma particular que incluya una forma indeterminada, y la composición puede estar en la forma de una película, fibra, lámina, cuerpo en forma de placa, cuerpo en forma de tubo, cuerpo lineal, cuerpo en forma de varilla, material de amortiguación, espuma o cuerpo poroso. El método de moldeo para producir un producto moldeado no está particularmente limitado si es un método en el que la actividad de la proteína no se reduce. Por ejemplo, pueden emplearse técnicas de moldeo adecuadas como moldeo por extrusión, moldeo por inyección, moldeo por calandrado, moldeo por compresión, moldeo por soplado, conformado al vacío, moldeo de polvos, moldeo fundido y fundición. La composición de proteína de la presente invención es adecuada para la producción de películas y fibras. La forma de fibra como se usa en la presente se refiere a un cuerpo moldeado en 3-D formado por la laminación, tejido, tricotado u otra técnica de una o una pluralidad de fibras. La forma de fibra es, por ejemplo, una tela no tejida. Además, un tubo y una malla obtenidos mediante el procesamiento de la tela no tejida se incluyen en la forma de fibra.

Para la producción de estos, puede emplearse cualquiera de las técnicas que se han empleado para la producción de películas o fibras plásticas. Por ejemplo, se pueden usar técnicas de moldeo por extrusión como fundición, electrohilado, moldeo por extrusión por inflado y moldeo por extrusión con matriz en T, y técnica de calandrado. El moldeado anterior puede ser moldeado en solución o moldeado en fusión, de los cuales se prefiere el moldeo en solución para facilitar la dispersión de la proteína o las partículas de proteína para evitar el deterioro funcional de la proteína.

Se explicará el proceso para producir la composición de proteína que tiene una forma de película de la presente invención, tomando como ejemplo la técnica de fundición. Las partículas de proteína que tienen un diámetro de partícula medio (generalmente de 0,1 a 200  $\mu\text{m}$ , preferiblemente de 1 a 100  $\mu\text{m}$ ) adecuadas para la dispersión en un solvente se preparan machacando polvos de proteína liofilizada en un mortero. Después de que las partículas de proteína se han dispersado en uno o más solventes adecuados (como 2-propanol y etanol) que pueden disolver el derivado de éter de celulosa, pueden formar una suspensión con las partículas de proteína y evaporarse en el paso de formación de película para formar una película, el derivado de éter de celulosa y además opcionalmente un plastificante tal como MACROGOL se disuelven en la dispersión resultante para preparar una solución de dopado que contiene las partículas de proteína dispersas en la solución de derivado de éter de celulosa. Se forma una película mediante la técnica de fundición usando la solución de dopado obtenida.

La composición de proteína que tiene una forma de película de la presente invención comprende la proteína o las partículas de proteína en una cantidad de generalmente no menos del 100% en peso, preferiblemente no

menos del 500% en peso, más preferiblemente del 800 al 950% en peso en base al derivado de éter de celulosa aunque esto depende del tipo de proteína y del tipo del derivado de éter de celulosa. Cuando el contenido de la proteína o las partículas de proteína cae por debajo del intervalo anterior, puede no obtenerse completamente la función de la proteína y cuando el contenido excede el intervalo anterior, la moldeabilidad de la película puede volverse insatisfactoria.

El grosor medio de una película de la composición de proteína que tiene una forma de película de la presente invención que difiere de acuerdo con el uso pretendido es preferiblemente de 10 a 1.000  $\mu\text{m}$ .

El diámetro de fibra medio de la composición de proteína que tiene una forma de fibra de la presente invención es, por ejemplo, de 0,01 a 50  $\mu\text{m}$  y puede determinarse adecuadamente por un experto en la técnica de acuerdo con el uso pretendido. La composición de proteína puede estar en la 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 electrohilado, unión por hilado y métodos de soplado en fusión. De estos, se prefiere el método de electrohilado ya que la fibra larga puede moldearse sin añadir calor y puede suprimirse el deterioro funcional de la proteína.

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

A continuación se da una descripción del proceso para producir la composición de proteína que tiene una forma de fibra o una forma de tela no tejida de la presente invención, tomando el método de electrohilado como un ejemplo.

Se explicará el paso de preparar una solución de hilado en el método de electrohilado. En la presente invención se usa preferiblemente como solución de hilado una suspensión de una solución de derivado de éter de celulosa y partículas de proteína.

La concentración del derivado de éter de celulosa en la suspensión es preferiblemente del 1 al 30% en peso. Cuando la concentración del derivado de éter de celulosa es inferior al 1% en peso, es difícil formar un cuerpo moldeado de fibra desventajosamente. Cuando la concentración es más alta del 30% en peso, el diámetro de la fibra del cuerpo moldeado de fibra obtenido se vuelve grande y la viscosidad de la suspensión se vuelve alta desventajosamente. La concentración del derivado de éter de celulosa en la suspensión es más preferiblemente del 1,5 al 20% en peso.

El solvente para el derivado de éter de celulosa no está particularmente limitado si puede disolver el derivado de éter de celulosa, forma una suspensión con las partículas de proteína y se evapora en el paso de hilado para que pueda formarse una fibra. Se puede usar solo 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, 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-metilmorfolino-N-óxido, 1,3-dioxolan, agua y mezclas de los mismos. De estos, se usa preferiblemente 2-propanol o etanol desde los puntos de vista de facilidad de manejo y propiedades físicas.

Aunque el método de preparar una suspensión mezclando entre sí la solución del derivado de éter de celulosa y las partículas de proteína no está particularmente limitado, se pueden usar 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 molidora o un molino de bolas. De estos, se prefiere la dispersión con ondas ultrasónicas.

También, la solución de hilado puede prepararse añadiendo el derivado de éter de celulosa después de que se forme una suspensión a partir de un solvente y las partículas de proteína.

Antes de la preparación de la suspensión, las partículas de proteína se pueden microfabricar. Para la microfabricación, existen la molienda en seco y la molienda en húmedo ambas de las cuales pueden emplearse y también combinarse en la presente invención.

La molienda en seco se lleva a cabo mediante molienda con un molino de bolas, un molino planetario o un molino oscilante, golpeando en un mortero con una maja, o pulverizando con un pulverizador de tipo medio de agitación, molino de chorro o molino de piedra.

Por otro lado, la molienda en húmedo se lleva a cabo agitando con un agitador o amasadora que tiene una alta fuerza de cizallamiento mientras las partículas de proteína se dispersan en un medio de dispersión adecuado, o usando un molino de bolas o molino de perlas mientras las partículas de proteína se dispersan en un medio.

5 Además, también pueden usarse partículas de proteína producidas por un secador de pulverización.

En la composición de proteína que tiene una forma de fibra o una forma de tela no tejida de la presente invención, los tamaños de las partículas de proteína no están particularmente limitados pero son preferiblemente de 0,01 a 100  $\mu\text{m}$ . Técnicamente es difícil fabricar partículas de proteína que tengan un tamaño de partícula menor de 10  
10 0,01  $\mu\text{m}$ , y cuando el tamaño de partícula es mayor de 100  $\mu\text{m}$ , se degrada la dispersabilidad y el cuerpo moldeado de fibra se vuelve frágil desventajosamente.

El método de esterilización usado para la composición de proteína de la presente invención es la esterilización por radiación. Los ejemplos de radiación 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 haces de electrones son los más preferidos. Aunque el método de esterilización no está particularmente limitado, la dosis de la 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.

20 La radiación como los rayos alfa, positrones, rayos gamma, rayos de neutrones, haces de electrones o rayos X quita un electrón de las moléculas o átomos que constituyen una sustancia cuando se aplica a la sustancia. A partir de esto se rompe un enlace molecular, y se produce un radical altamente reactivo y reacciona químicamente de forma secundaria con una sustancia circundante.

25 Es bien sabido que una proteína tiende a perder su función (actividad) tras exponerla a radiación. Se considera que esto se debe a la destrucción de "una estructura de orden superior" que es una fuente para desarrollar una función mediante la ruptura de un enlace molecular por exposición. Sin embargo, el deterioro funcional de la composición de proteína de la presente invención se suprime incluso cuando se expone a radiación. Esto significa que la estructura de orden superior de la proteína se retiene en la composición de la presente  
30 invención, que es un efecto común independientemente del tipo de proteína. Del espesor del derivado de éter de celulosa mediante el que se transmite la radiación no se considera que este efecto se deba a la selección, y el mecanismo de control no es conocido. Tampoco se conoce el mecanismo por el que el fenómeno de que el efecto del derivado de éter de celulosa se mejora notablemente mediante la adición de aminoácidos específicos.

35 La composición de proteína de la presente invención puede comprender además un captador de electrones/iones, agente de transferencia de energía, captador de radicales, antioxidante y plastificante. Los ejemplos de captador de electrones/iones incluyen N,N'-tetrametilfenilendiamina, difenilendiamina, pireno y quinona. Los ejemplos del agente de transferencia de energía incluyen acenafteno. Los ejemplos de captador de radicales incluyen mercaptanos, octahidrofenantreno, monoalquil difenil éteres, tocoferol, ácido cítrico, hidroxianisol butilado,  
40 hidroxitolueno butilado, t-butil hidroquinona, galato de propilo y derivados de ácido ascórbico. Los ejemplos de antioxidante incluyen BHT, triésteres de fosfito, agentes antienviejecimiento fenólicos y sales de tioácidos orgánicas. Se prefieren los aditivos aceptados generalmente 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 en base al derivado de éter de celulosa en la composición de proteína.

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

50 La composición de proteína de la presente invención puede envolverse en un material de envasado para ser esterilizada con radiación. Como material de envasado, se usa preferiblemente un material que tiene altas propiedades de barrera a gases, como el aluminio. La composición de proteína puede sellarse herméticamente y envasarse junto con un desoxidante o desecante o mientras se carga un gas inerte en el envase después de la desgasificación, o pueden combinarse entre sí ambos métodos. Como desoxidante y desecante, se prefieren  
55 aquellos que no dañan el cuerpo humano y no se desactivan tras exponerlos a radiación.

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

60 La presente invención incluye una composición de proteína estéril obtenida esterilizando la composición de proteína de la presente invención con radiación.

#### EJEMPLOS

65 Los siguientes ejemplos se proporcionan con el propósito de ilustrar adicionalmente la presente invención,

pero de ningún modo deben entenderse como limitativos.

Métodos de medición para los Ejemplos 1 a 4 y los Ejemplos Comparativos 1 y 2

#### 5 1. Diámetro de fibra medio:

Los diámetros de las fibras en 20 localizaciones seleccionadas aleatoriamente de una fotografía de la superficie del cuerpo moldeado de fibra obtenido por un microscopio electrónico de barrido (VE8800 de Keyence Corporation) con un aumento de 3.000 veces para obtener el valor medio de todos los diámetros de fibra como un diámetro de fibra medio  $N = 20$ .

#### 2. Espesor medio:

Se midieron los espesores de película de 15 cuerpos moldeados de fibra cortados a un tamaño de 50 mm x 100 mm 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. Esta medición se llevó a cabo con la fuerza de medición mínima que podía usarse por la unidad de medición.

#### 3. Medición de ELISA

##### (1) Fibrinógeno

Se inmovilizaron 10 µg/ml de un anticuerpo de fibrinógeno antihumano (DAKO A0080) en una placa de ELISA (NUNC 468667). Después de lavarlo con PBS que contenía 0,05% de Tween 20, 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 0,05% de Tween 20, se añadió un cuerpo de prueba. Se usó fibrinógeno humano (N° FIB3 de Enzyme Research Laboratories) como un estándar para formar una curva de calibración. Después de lavar con PBS que contenía 0,05% de Tween 20, se añadió un anticuerpo de fibrinógeno antihumano marcado con HRP (CPL5523). Después de una reacción, el producto de la reacción se lavó con PBS que contenía 0,05% de Tween 20, se añadió un reactivo TMB (KPL 50-76-02 50-65-02), y la mezcla resultante se dejó durante 6 minutos para desarrollar color. Se añadió  $H_3PO_4$  1M para detener el desarrollo de color para medir OD450-650 nm con un lector de microplacas.

##### (2) Trombina

Se inmovilizaron 5 µg/ml de un anticuerpo de trombina antihumano (N° SAHT-AP de Affinity Biologicals Inc.) en una placa de ELISA (NUNC 468667). Después de lavarlo con PBS que contenía 0,05% de Tween 20, 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 0,05% de Tween 20, se añadió un cuerpo de prueba. Se usó trombina humana (HCT-0020 de Haematologic Technologies, Inc.) como un estándar para formar una curva de calibración. Después de lavar con PBS que contenía 0,05% de Tween 20, 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 0,05% de Tween 20, se añadió un reactivo TMB (DaKo S1599), y la mezcla resultante se dejó durante 10 minutos para desarrollar el color. Se añadió  $H_2SO_4$  0,5M para detener el desarrollo del color a fin de medir OD450-650 nm con un lector de microplacas.

#### 4. Medición de la actividad de la trombina

Se añadieron 20 µl de una muestra y 80 µl de una solución de dilución para medir la actividad (0.01% de F-68, 50 mmol/l de NaCl, 50 mmol/l de Tris-HCl, pH 8.4) al tubo de poliestireno de BD para ser incubado a 37° C durante 3 minutos. Se usó trombina recombinante (Estándar de Trombina JPU 400 U/ml o Estándar de Trombina WHO/US 110 IU/ml: preparada por sus propias compañías) 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 UI/ml en el caso de IU como estándar. Se añadieron 100 µl 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 µl de una solución de ácido cítrico 0,1 M para finalizar la reacción. Se transfirieron 200 µl de la solución de la reacción a placas de 96 pocillos para medir OD405/650.

#### Ejemplo 1

Después de dispersar los polvos de fibrinógeno liofilizados (Bolheal, (marca registrada, lo mismo se aplicará en lo sucesivo, adhesivo tisular: Vial 1) en 2-propanol, se disolvió hidroxipropilcelulosa (6-10 mPa·s, fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) en la dispersión resultante a una concentración del 16% en peso para preparar una solución de hilado que tiene una proporción de partícula que contiene fibrinógeno/hidroxipropilcelulosa de 20 (9,2 como fibrinógeno)/100 (p/p). El hilado se llevó a cabo mediante un método de electrohilado a una temperatura

de 22° C y una humedad no mayor del 26% para obtener un cuerpo moldeado de fibra tipo lámina. El diámetro interno de una boquilla de chorro era de 0,8 mm, el voltaje era de 11 kV, el caudal de la solución de hilado era de 1,2 ml/h, y la distancia desde la boquilla de chorro a una placa plana era de 15 cm. El cuerpo moldeado con fibra obtenido tenía un diámetro de fibra medio de 0,86  $\mu\text{m}$  y un espesor medio de 137  $\mu\text{m}$ . La lámina obtenida se esterilizó con un haz de electrones de 20 kGy. La lámina esterilizada se cortó a un tamaño de 0,5 cm x 0,5 cm, y la proteína se extrajo con 62,5  $\mu\text{l}$  de solución salina fisiológica para llevar a cabo la medición de ELISA. Como resultado, la cantidad de proteína inmovilizada fue de 0,15  $\text{mg}/\text{cm}^2$ . Por otra parte, cuando la medición de ELISA se hizo sobre una lámina no esterilizada del mismo modo, la cantidad de proteína inmovilizada fue de 0,16  $\text{mg}/\text{cm}^2$ . Por lo tanto, la tasa de recuperación de la proteína de la lámina esterilizada fue del 94% de la de la lámina no esterilizada.

#### Ejemplo 2

Después de dispersar los polvos de fibrinógeno liofilizados (adhesivo de tejido Bolheal: Vial 1) en 2-propanol, se disolvió hidroxipropilcelulosa (6-10 mPa·s, fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) en la dispersión resultante a una concentración del 16 % en peso para preparar una solución de hilado que tenía una proporción de polvo de fibrinógeno liofilizado/hidroxipropilcelulosa de 40 (18 como fibrinógeno)/100 (p/p). El hilado se llevó a cabo mediante el método de electrohilado a una temperatura de 22° C y una humedad no mayor del 26% para obtener un cuerpo moldeado de fibra en forma de lámina. El diámetro interno de la boquilla de chorro era de 0,8 mm, el voltaje era de 12,5 kV, el caudal de la solución de hilado era de 1,2 ml/h, y la distancia desde la boquilla de chorro a la placa plana era de 15 cm. El cuerpo moldeado de fibra obtenido tenía un diámetro de fibra medio de 0,43  $\mu\text{m}$  y un espesor promedio de 152  $\mu\text{m}$ . La lámina obtenida se esterilizó con un haz de electrones de 20 kGy. La lámina esterilizada se cortó a un tamaño de 0,5 cm x 0,5 cm, y la proteína se extrajo con 62,5  $\mu\text{l}$  de solución salina fisiológica para llevar a cabo la medición de ELISA. Como resultado, la cantidad de proteína inmovilizada fue de 0,27  $\text{mg}/\text{cm}^2$ . Por otra parte, cuando la medición ELISA se realizó sobre la lámina no esterilizada del mismo modo, la cantidad de la proteína inmovilizada fue de 0,30  $\text{mg}/\text{cm}^2$ . Por lo tanto, la tasa de recuperación de la proteína de la lámina esterilizada fue del 90% de la de la lámina no esterilizada.

#### Ejemplo 3

Después de dispersar polvos de fibrinógeno liofilizados (adhesivo de tejido Bolheal: Vial 1) en 2-propanol, se disolvió hidroxipropilcelulosa (6-10 mPa·s, fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) en la dispersión resultante a una concentración del 16 % en peso para preparar una solución de hilado que tiene una proporción de polvo de fibrinógeno liofilizado/hidroxipropilcelulosa de 100 (46 como fibrinógeno)/100 (p/p). El hilado se llevó a cabo mediante el método de electrohilado a una temperatura de 22° C y una humedad no mayor del 26% para obtener un cuerpo moldeado de fibra en forma de lámina. El diámetro interno de la boquilla de chorro era de 0,8 mm, el voltaje era de 12,5 kV, el caudal de la solución de hilado era de 1,2 ml/h, y la distancia desde la boquilla de chorro a la placa plana era de 15 cm. El cuerpo moldeado de fibra obtenido tenía un diámetro de fibra medio de 0,35  $\mu\text{m}$  y un espesor medio de 191  $\mu\text{m}$ . La lámina obtenida se esterilizó con un haz de electrones de 20 kGy. La lámina esterilizada se cortó a un tamaño de 0,5 cm x 0,5 cm, y la proteína se extrajo con 62,5  $\mu\text{l}$  de solución salina fisiológica para llevar a cabo la medición de ELISA. Como resultado, la cantidad de proteína inmovilizada fue de 0,78  $\text{mg}/\text{cm}^2$ . Por otra parte, cuando la medición de ELISA se realizó sobre la lámina no esterilizada del mismo modo, la cantidad de la proteína inmovilizada fue de 0,76  $\text{mg}/\text{cm}^2$ . Por lo tanto, la tasa de recuperación de la proteína de la lámina esterilizada fue del 102% de la de la lámina no esterilizada.

#### Ejemplo Comparativo 1

Los polvos de fibrinógeno liofilizado (adhesivo de tejido Bolheal: Vial 1) se esterizaron con un haz de electrones de 20 kGy. La proteína se extrajo con 1 ml de solución salina fisiológica para llevar a cabo la medición de ELISA. Como resultado, el valor de la medición de ELISA fue de 31  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Por otra parte, cuando la medición de ELISA se hizo en polvos de fibrinógeno liofilizado no esterilizados (Bolheal) del mismo modo, el valor de medición de ELISA fue de 90  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Por lo tanto, la tasa de recuperación de la proteína de la lámina esterilizada fue del 34% de la de la lámina no esterilizada.

#### Ejemplo 4

Después de dispersar partículas que contienen 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 2-propanol, se disolvió hidroxipropil celulosa (2,0-2,9 mPa·s, fabricada por Nippon Soda Co., Ltd.) en la dispersión resultante a una concentración del 13% en peso para preparar una solución de dopaje que tenía una proporción partícula que contiene trombina/hidroxipropilcelulosa de 100/100 (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 204  $\mu\text{m}$ , un peso de 2,08  $\text{mg}/\text{cm}^2$  y una densidad aparente de 101  $\text{mg}/\text{cm}^3$ . La lámina obtenida se cortó a un diámetro de 1 cm, y la proteína se extrajo con 200  $\mu\text{l}$  de solución salina fisiológica para medir su actividad. Como resultado, el valor de medición de la actividad fue de 110,3 U/ $\text{cm}^2$ . La lámina obtenida se

esterilizó por exposición a un haz de electrones de 30 kGy para medir la actividad de la trombina. Cuando la actividad de la trombina antes de la esterilización era del 100%, la tasa de retención de la actividad de la trombina justo después de la exposición a un haz de electrones era del 68,4%.

## 5 Ejemplo Comparativo 2

Después de aplicar un haz de electrones de 30 kGy a partículas que contienen 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) para esterilizarlas, se midió 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 era del 100%, la tasa de retención de la actividad de la trombina justo después de la exposición a un haz de electrones era del 51,8%.

Métodos de medición para los Ejemplos 5 y 6 y los Ejemplos Comparativos 3 y 4

### 1. Espesor medio:

Se midieron los espesores de película de 9 cuerpos moldeados de fibra obtenidos cortando la composición a un tamaño adecuado 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. Esta medición se llevó a cabo con la fuerza de medición mínima que podía usarse por la unidad de medición.

### 2. Medición de la actividad enzimática

Se usó un kit de prueba de lipasa fluorométrica continua (fabricado por PROGEN BIOTECHNIK GMBH) para medir la actividad de la lipasa. La tasa de retención de la actividad se calculó a partir de la siguiente ecuación. La cantidad de enzima activa se calculó en términos de concentración a partir del valor de la actividad.

$$\text{Tasa de retención de actividad (\%)} = \left\{ \frac{\text{cantidad de enzima activa después de la esterilización (mg/cm}^2\text{)}}{\text{cantidad de enzima activa antes de la esterilización (mg/cm}^2\text{)}} \right\} \times 100$$

Se empleó medición fluorescente usando Tokyogreen (marca registrada, lo mismo se aplicará en lo sucesivo)-βGlu (de Sekisui Medical Co., Ltd.) para medir la actividad de 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 cargado y el peso de la composición.

$$\text{Tasa de recuperación de la actividad (\%)} = \left\{ \frac{\text{cantidad de enzima activa (mg)}}{\text{peso teórico de la enzima inmovilizada (mg)}} \right\} \times 100$$

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

$$\text{Tasa de retención de la actividad (\%)} = \left\{ \frac{\text{tasa de recuperación de la actividad después de la esterilización (\%)}}{\text{tasa de recuperación de la actividad antes de la esterilización (\%)}} \right\} \times 100$$

## Ejemplo 5

Después de dispersar los polvos de lipasa (derivados de páncreas de cerdo, fabricados por Wako Pure Chemical Industries, Ltd., lo mismo se aplicará en lo sucesivo) en 2-propanol, se disolvió hidroxipropil celulosa (6-10 mPa·s, fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) en la dispersión resultante a una concentración del 13% en peso para preparar una solución de hilado que tenía una proporción de polvo de lipasa/hidroxipropilcelulosa 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 27% para obtener un cuerpo moldeado de fibra tipo lámina. El diámetro interno de la boquilla de chorro era de 0,8 mm, el voltaje era de 18 kV, el caudal de la solución de hilado era de 1,2 ml/h, y la distancia desde la boquilla de chorro a la placa plana era de 16,5 cm. El cuerpo moldeado de fibra obtenido (10 cm x 14 cm) tenía un espesor medio de 168 μm. El cuerpo moldeado de fibra obtenido se esterilizó con un haz de electrones de 20 kGy. Después de cortar el cuerpo moldeado con fibra esterilizada a un tamaño de 1 cm x 1 cm, se extrajo la lipasa con 1 ml de un tampón de lipasa contenido en un kit para medir su actividad. Como resultado, la

cantidad de enzima activa fue 0,46 mg/cm<sup>2</sup>. Por otra parte, cuando la medición de la actividad se hizo sobre una lámina no esterilizada del mismo modo, la cantidad de la enzima activa fue de 0,40 mg/cm<sup>2</sup>. De lo anterior se entiende que la tasa de retención de la actividad del cuerpo moldeado de fibra esterilizado fue del 115% de la del cuerpo moldeado de fibra no esterilizado y que la lipasa no se desactivó por esterilización con un haz de electrones.

#### Ejemplo 6

Después de dispersar los polvos de lipasa en 2-propanol, se disolvió hidroxipropilcelulosa (6-10 mPa·s, fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) en la dispersión resultante a una concentración del 13% en peso para preparar una solución moldeada que tiene una proporción de polvo de lipasa/hidroxipropilcelulosa de 50/100 (p/p). La fundición se llevó a cabo usando una racleta (YBA-3 de YOSHIMITSU) a una anchura de recubrimiento de 15 mil para obtener una lámina. La lámina obtenida (4 cm x 6 cm) tenía un espesor medio de 180 µm. La lámina obtenida se esterilizó con un haz de electrones de 20 kGy. Después de cortar la lámina esterilizada a un tamaño de 1 cm x 1 cm, la lipasa se extrajo con 1 ml de un tampón de lipasa contenido en un kit para medir su actividad. Como resultado, la cantidad de la enzima activa fue de 0,69 mg/cm<sup>2</sup>. Por otra parte, cuando la medición de la actividad se hizo sobre una lámina no esterilizada del mismo modo, la cantidad de la enzima activa fue de 0,64 mg/cm<sup>2</sup>. De lo anterior se entiende que la tasa de retención de la actividad de la lámina esterilizada fue del 108% de la de la lámina no esterilizada y que la lipasa no se desactivó por esterilización con un haz de electrones.

#### Ejemplo 7

Después de dispersar los polvos de β-glucosidasa (derivados de almendra, fabricados por Oriental Yeast Co., Ltd, lo mismo se aplicará en lo sucesivo) en 2-propanol, se disolvió hidroxipropilcelulosa (6-10 mPa·s, fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) en la dispersión resultante a una concentración del 13% en peso para preparar una solución de hilado que tenía una proporción de polvo de β-glucosidasa/hidroxipropilcelulosa 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 no mayor del 27% para obtener un cuerpo moldeado de fibra tipo lámina. El diámetro interior de la boquilla de chorro era de 0,9 mm, el voltaje era de 18 kV, el caudal de la solución de hilado era de 1,2 ml/h, y la distancia desde la boquilla de chorro a la placa plana era de 16,5 cm. El cuerpo moldeado de fibra obtenido (10 cm x 10 cm) tenía un espesor medio de 207 µm. Después de cortar el cuerpo moldeado de fibra obtenido a un tamaño de 2 cm x 2 cm, se esterilizó con un haz de electrones de 20 kGy. La β-glucosidasa se extrajo de la lámina esterilizada obtenida con 1 ml de solución salina fisiológica para medir su actividad con Tokyogreen-βGlu. Como resultado, la tasa de recuperación de la actividad era del 42%. Por otra parte, cuando la medición de la actividad se hizo en una lámina esterilizada del mismo modo, la tasa de recuperación de la actividad fue del 46%. De lo anterior se entiende que la tasa de retención de la actividad del cuerpo moldeado de fibra esterilizado fue el 91% de la del cuerpo moldeado de fibra no esterilizado y que la desactivación de la enzima puede suprimirse conteniéndola en el derivado de éter de celulosa.

#### Ejemplo Comparativo 3

Los polvos de lipasa se esterilizaron 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 su actividad. Como resultado, el valor de la actividad fue de 0,25 pmol/ml·min. Por otra parte, cuando la medición de la actividad se hizo en polvos de lipasa no esterilizados del mismo modo, el valor de actividad fue de 0,34 pmol/ml·min. Por lo tanto, la tasa de retención de la actividad de los polvos esterilizados fue el 74% de la de los polvos no esterilizados.

#### Ejemplo Comparativo 4

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

#### Método de Medición para los Ejemplos 8 a 10

Cuando se aplica un haz de electrones a los polvos de fibrinógeno liofilizado (partículas que contienen fibrinógeno), tienen lugar cambios del fibrinógeno (aumento en la cantidad de su agregado, reducción en la resistencia del gel). Para investigar el efecto de la supresión de los cambios de fibrinógeno por exposición a un haz de electrones (efecto de resistencia a la esterilización), se preparó una solución madre de fibrinógeno y se cargó 1 ml de la solución madre en un vial de vidrio de 5 ml para ser liofilizada. Se aplicó un haz de electrones de 30 kGy a una parte del vial en la que se completó la liofilización para comparar cada producto liofilizado antes y después de la esterilización.

La evaluación comparativa se llevó a cabo midiendo la resistencia del gel mediante el probador de mesa de tamaño pequeño EZTest (de Shimadzu Corporation) y el contenido del agregado mediante BioSep-SEC-s4000 (de Phenomenex) (analizando las condiciones: fraccionando con una solución tampón de ácido fosfórico 50 mM (pH de

7,0) y sal de clorhidrato de arginina 0,5 M como fases móviles a un caudal de 1,0 ml/min, detectando una sustancia objetivo con una longitud de onda de 280 nm; y determinando la cantidad del agregado de un pico detectado antes que un pico monomérico).

En cuanto al procedimiento de preparación de una muestra para análisis (muestra analítica), se disolvieron un vial de producto liofilizado no esterilizado y un vial de producto liofilizado esterilizado cada uno en 1 ml de agua destilada. Las soluciones resultantes se centrifugaron mediante un tubo centrífugo a 15.000 rpm durante 5 minutos y dejaron pasar a través de un filtro de 0,45 µm para ser usadas como muestras analíticas.

#### Ejemplo 8

El efecto de resistencia a la esterilización para una proteína de una combinación de un derivado de éter de celulosa y aditivos específicos se investigó mediante el método siguiente. (método) La función del fibrinógeno se evaluó midiendo la resistencia del gel de cada una de las soluciones madre de composiciones que comprenden "un derivado de éter de celulosa + aditivos específicos" (composiciones (1) mostradas en los N° 1 a 6 en la Tabla 1 a continuación) y las soluciones madre de fibrinógeno de las composiciones (2) preparadas eliminando el derivado de éter de celulosa de las composiciones (1), y se compararon entre sí las fuerzas del gel antes y después de la esterilización de estas soluciones para investigar el efecto de resistencia a la esterilización. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Se disolvieron las composiciones (1) (polvos liofilizados e hidroxipropilcelulosa se suspendieron en 2-propanol para formar una lámina) y las composiciones (2) (polvos liofilizados) en agua hasta una concentración de Fbg del 1% y se diluyeron con una solución tampón que contenía arginina 10 mM y cloruro de sodio 270 mM y que tenía un pH de 8,5 a una concentración de 2 mg/ml.

Después de añadir 10 µl de fibrogammina (240 unidades/ml) y 110 µl de una solución de trombina (que contenía 0,2 mg/ml de cloruro de calcio 100 mM) a un tubo de polipropileno de 2 ml y pipetear la solución resultante, se añadieron 900 µl de una solución de fibrinógeno de 2 mg/ml de tal manera que no se contuvieron las burbujas de aire y se dejó reposar a 37° C durante 1 hora para medir la resistencia del gel mediante el probador de mesa de pequeño tamaño EZTest (de Shimadzu Corporation).

Tabla 1 composiciones (1): composiciones que comprenden derivados de éter de celulosa + aditivos específicos

| Composición | composición de la solución madre                                                                                                                                                                                  |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| N° 1        | 1% de Fbg, 10 mM de arginina, 110 mM de cloruro de sodio, 1,0% de glicina, 0,1% de manitol, 0,4% de hidroxipropilcelulosa                                                                                         |
| N° 2        | 1% de Fbg, 10 mM de arginina, 110 mM de cloruro de sodio, 1,0% de glicina, 0,2% de manitol, 0,4% de hidroxipropilcelulosa                                                                                         |
| N° 3        | 1% de Fbg, 10 mM de arginina, 110 mM de cloruro de sodio, 1,0% de glicina, 0,25% de fenilalanina, 0,2% de trehalosa, 0,4% de histidina, 0,1% de citrato trisódico, 0,4% de hidroxipropilcelulosa                  |
| N° 4        | 1% de Fbg, 10 mM de arginina, 110 mM de cloruro de sodio, 1,0% de glicina, 0,1% de manitol, 0,25% de fenilalanina, 0,2% de trehalosa, 0,4% de histidina, 0,1% de citrato trisódico, 0,4% de hidroxipropilcelulosa |
| N° 5        | 1% de Fbg, 10 mM de arginina, 110 mM de cloruro de sodio, 1,0% de glicina, 0,1% de manitol, 0,25% de fenilalanina, 0,4% de histidina, 0,1% de citrato trisódico, 0,4% de hidroxipropilcelulosa                    |
| N° 6        | 1% de Fbg, 10 mM de arginina, 110 mM de cloruro de sodio, 1,0% de glicina, 0,2% de manitol, 0,25% de fenilalanina, 0,4% de histidina, 0,1% de citrato trisódico, 0,4% de hidroxipropilcelulosa                    |

#### Composiciones (2): composiciones que comprenden aditivos específicos

Estas se prepararon eliminando el derivado de éter de celulosa (hidroxipropilcelulosa: HPC) de las composiciones (1).

(resultados)

Los valores de la resistencia del gel después de la esterilización se muestran en la Tabla 2 y la Figura 1 cuando los valores antes de la esterilización son 100.

Tabla 2 Efecto de resistencia a la esterilización para proteínas de una combinación de derivado de éter de celulosa y aditivos específicos

| composición | Composiciones (1) (derivado de éter de celulosa + aditivos específicos) | composiciones (2) (aditivos específicos) |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| Nº 1        | 51. 5                                                                   | 49.8                                     |
| Nº 2        | 51.1                                                                    | 36.5                                     |
| Nº 3        | 81. 5                                                                   | 58.1                                     |
| Nº 4        | 84.0                                                                    | 57.9                                     |
| Nº 5        | 77.6                                                                    | 57.7                                     |
| Nº 6        | 84.4                                                                    | 59.6                                     |

El efecto de mejora de la resistencia a la esterilización debido a la existencia del derivado de éter de celulosa no se observó en la composición Nº 1 mientras que el efecto anterior debido a la existencia del derivado de éter de celulosa se observó en las composiciones Nº 2 a 6. Este efecto fue especialmente marcado en las composiciones Nº 3 a 6.

#### Ejemplo 9

Se investigó el efecto de resistencia a la esterilización de la glicina con las composiciones (dos) mostradas en la Tabla 3 a continuación de la misma manera que en el Ejemplo 8. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 3 composiciones para evaluar el efecto de resistencia a la esterilización de la glicina

| Composición | fibrinógeno | Arginina (pH 8.5) | cloruro de sodio | manitol | glicina |
|-------------|-------------|-------------------|------------------|---------|---------|
| G (-)       | 1.0%        | 10 mM             | 110 mM           | 0.2%    | 0%      |
| G (+)       | 1.0%        | 10 mM             | 110 mM           | 0.2%    | 1.0%    |

Tabla 4 resultados de la evaluación del efecto de resistencia a la esterilización de la glicina

| Composición | s4000 (agregado)               |                                  |                            |
|-------------|--------------------------------|----------------------------------|----------------------------|
|             | Antes de la esterilización (%) | después de la esterilización (%) | aumento en la cantidad (%) |
| G (-)       | 14.0                           | 28.0                             | 14.0                       |
| G (+)       | 14.0                           | 21. 6                            | <b>7.6</b>                 |

Un aumento en el contenido del agregado de fibrinógeno se suprimió mediante la adición de glicina.

#### Ejemplo 10

Se investigó el efecto de resistencia a la esterilización de una combinación de un derivado de éter de celulosa y aditivos específicos mediante el mismo método que en el Ejemplo 8.

Se usó hidroxipropil celulosa (HPC) como el derivado de éter de celulosa y se usaron ocho soluciones madre de fibrinógeno diferentes mostradas en la Tabla 5 a continuación. Se usaron 1,0% de fibrinógeno, 110 mM de cloruro sódico, 1,0% de glicina y 0,2% de manitol en las siguientes ocho composiciones. Los resultados se muestran en la Tabla 6 y la Figura 2.

Tabla 5: efecto de resistencia a la esterilización de una combinación de derivado de éter de celulosa y aditivos específicos

| Composición | Arginina (pH8.5) | tris (pH8.5) | histidina | fenilalanina | citrato de sodio | HPC    |
|-------------|------------------|--------------|-----------|--------------|------------------|--------|
| 1HPC (-)    | 10mM             | 0mM          | 0%        | 0%           | 0%               | 0%     |
| 1HPC (+)    | 10mM             | 0mM          | 0%        | 0%           | 0%               | 0.419% |
| 2HPC (-)    | 10mM             | 0mM          | 0.4%      | 0.25%        | 0%               | 0%     |
| 2HPC (+)    | 10mM             | 0mM          | 0.4%      | 0.25%        | 0%               | 0.419% |
| 3HPC (-)    | 10mM             | 0mM          | 0.4%      | 0.25%        | 0.1%             | 0%     |
| 3HPC (+)    | 10mM             | 0mM          | 0.4%      | 0.25%        | 0.1%             | 0.419% |
| 4HPC (-)    | 0.4mM            | 10mM         | 0.4%      | 0.25%        | 0.1%             | 0%     |
| 4HPC (+)    | 0.4mM            | 10mM         | 0.4%      | 0.25%        | 0.1%             | 0.419% |

Tabla 6 resultados de evaluación del efecto de resistencia a la esterilización de una combinación de derivado de éter de celulosa y aditivos específicos

| Composición | s4000 (agregado)               |                                  |                            |
|-------------|--------------------------------|----------------------------------|----------------------------|
|             | Antes de la esterilización (%) | después de la esterilización (%) | aumento en la cantidad (%) |
| 1HPC (-)    | 14.0                           | 21.6                             | 7.6                        |
| 1HPC (+)    | 12.8                           | 18.4                             | <b>5.7</b>                 |
| 2HPC (-)    | 13.8                           | 19.2                             | 5.4                        |
| 2HPC (+)    | 13.9                           | 15.8                             | <b>1.9</b>                 |
| 3HPC (-)    | 15.1                           | 19.8                             | 4.7                        |
| 3HPC (+)    | 14.8                           | 17.8                             | <b>2.9</b>                 |
| 4HPC (-)    | 14.9                           | 19.5                             | 4.6                        |
| 4HPC (+)    | 14.2                           | 15.5                             | <b>1.3</b>                 |

Se suprimió un aumento en el contenido del agregado proteico mediante la adición del derivado de éter de celulosa. El efecto de suprimir un aumento en el contenido anterior debido a la existencia del derivado de éter de celulosa fue marcado en las composiciones 2 a 4 que comprenden fenilalanina e histidina. De esto se entiende que la razón de que el efecto de mejora en la resistencia a la esterilización debido a la existencia del derivado de éter de celulosa no se observe en la composición N° 1 mientras que el efecto se observa y es marcado en las composiciones N° 3 a 6 en el Ejemplo 7 se considera que se debe al hecho de que la coexistencia de fenilalanina e histidina con el derivado de éter de celulosa en las composiciones N° 3 a 6 proporciona un efecto de resistencia a la esterilización marcado para una proteína.

#### Efecto de la invención

La composición de proteína de la presente invención tiene resistencia a la esterilización por radiación. La composición estéril de la presente invención retiene la estructura y función de una proteína a pesar de estar esterilizada.

#### Viabilidad industrial

La composición de proteína de la presente invención se usa en la industria de fabricación de productos médicos que requiere la función y la esterilidad de una proteína.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición de proteína que comprende una mezcla de glicina, fenilalanina e histidina y un derivado de éter de celulosa como aditivo y que se esteriliza con radiación.

2. La composición de proteína de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el aditivo consiste en una mezcla de glicina, fenilalanina e histidina y un derivado de éter de celulosa, y por lo menos parte de la proteína está dentro del derivado de éter de celulosa.

3. La composición de proteína de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en la que el derivado de éter de celulosa se selecciona del grupo que consiste de hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y mezclas de los mismos.

4. La composición de proteína de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en la que el derivado de éter de celulosa se selecciona del grupo que consiste de hidroxipropilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y mezclas de los mismos.

5. La composición de proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que el derivado de éter de celulosa es hidroxipropilcelulosa.

6. La composición de proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la proteína se selecciona del grupo que consiste de enzimas, proteínas de transporte, proteínas musculares, proteínas de defensa, proteínas de toxinas, hormonas proteicas, proteínas de almacenamiento, proteínas estructurales, factores de crecimiento y mezclas de los mismos.

7. La composición de proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la proteína es fibrinógeno.

8. La composición de proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que está en una forma de película.

9. La composición de proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que está en forma de fibra o en una forma de tela no tejida.

Fig. 1

Efecto de resistencia a la esterilización para proteína de una combinación de un derivado de éter de celulosa y aditivos específicos (eje de ordenadas: valor relativo de resistencia del gel (antes de la esterilización: 100))

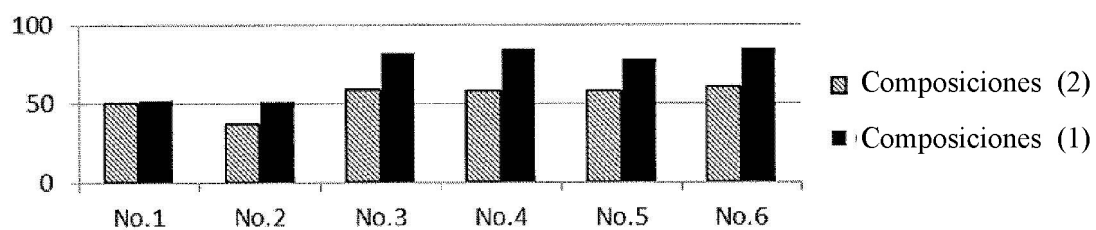


Fig. 2

Resultados de la evaluación del efecto de resistencia a la esterilización de una combinación de un derivado de éter de celulosa y aditivos específicos (eje de ordenadas: un aumento en la cantidad del agregado de proteína(%))

