



(51) МПК

A61K 9/70 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 47/12 (2006.01)

A61K 47/38 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 38/16 (2006.01); A61K 9/70 (2018.08); A61K 47/12 (2018.08); A61K 47/38 (2018.08); A61P 7/04 (2018.08)

(21)(22) Заявка: 2014150497, 13.05.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
13.05.2013

Дата регистрации:
04.02.2019

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
14.05.2012 JP 2012-110395;
14.05.2012 JP 2012-110764;
01.03.2013 JP 2013-040594

(43) Дата публикации заявки: 10.07.2016 Бюл. № 19

(45) Опубликовано: 04.02.2019 Бюл. № 4

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 15.12.2014

(86) Заявка РСТ:
JP 2013/063867 (13.05.2013)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2013/172467 (21.11.2013)

Адрес для переписки:
109012, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО
"Союзпатент"

(72) Автор(ы):

КАГЕЯМА Юкако (JP),
ФУДЗИНАГА Кентаро (JP),
ЯМАГУТИ Аюко (JP),
АКИЯМА Юсуке (JP),
КАТО Сонтиро (JP),
КИМУРА Юкико (JP),
ХОНДА Сусуму (JP),
САТАКЕ Макото (JP),
КАНЕКО Хироаки (JP),
ИСИВАРИ Аюми (JP),
ХИРАСИМА Масаки (JP)

(73) Патентообладатель(и):

ТЕЙДЗИН ЛИМИТЕД (JP),
ТЕЙДЗИН ФАРМА ЛИМИТЕД (JP)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: JI J.A., et al., Effect of EDTA and
methionine on preventing loss of viscosity of
cellulose-based topical gel.AAPS
PharmSciTech. 2009; 10(2):678-83. doi: 10.1208/
s12249-009-9258-6. Epub 2009 May 21. WO
2010003670 A1, 14.01.2010. WO 2004045634
A1, 03.06.2004. SABATO SF., et al., Mechanical
and barrier properties of cross-linked soy and
whey (см. прод.)

(54) БЕЛКОВАЯ КОМПОЗИЦИЯ, УСТОЙЧИВАЯ К СТЕРИЛИЗАЦИИ ОБЛУЧЕНИЕМ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине и касается композиции фибриногена для гемостатического применения, содержащей смесь глицина, фенилаланина и гистидина и эфирного производного целлюлозы в качестве добавки, в которой эфирное производное целлюлозы выбрано из группы, состоящей из гидроксипропилцеллюлозы, метилцеллюлозы,

гидроксипропилцеллюлозы, гидроксипропилметилцеллюлозы, карбоксиметилцеллюлозы натрия и их смесей, и фибриноген содержится в количестве не менее от 100 до 950 мас.% от эфирного производного целлюлозы. Изобретение обеспечивает устойчивость к стерилизации облучением. 6 з.п. ф-лы, 10 пр., 2 ил., 6 табл.

(56) (продолжение):

protein based films.J Agric Food Chem. 2001 Mar; 49(3):1397-403. WO 9956798 A1, 11.11.1999.

R U 2 6 7 8 8 2 8 C 2

R U 2 6 7 8 8 2 8 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A61K 9/70 (2006.01)*A61K 38/16* (2006.01)*A61K 47/12* (2006.01)*A61K 47/38* (2006.01)*A61P 7/04* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 38/16 (2006.01); *A61K 9/70* (2018.08); *A61K 47/12* (2018.08); *A61K 47/38* (2018.08); *A61P 7/04* (2018.08)

(21)(22) Application: **2014150497, 13.05.2013**

(24) Effective date for property rights:
13.05.2013

Registration date:
04.02.2019

Priority:

(30) Convention priority:
14.05.2012 JP 2012-110395;
14.05.2012 JP 2012-110764;
01.03.2013 JP 2013-040594

(43) Application published: **10.07.2016 Bull. № 19**(45) Date of publication: **04.02.2019 Bull. № 4**(85) Commencement of national phase: **15.12.2014**

(86) PCT application:
JP 2013/063867 (13.05.2013)

(87) PCT publication:
WO 2013/172467 (21.11.2013)

Mail address:
109012, Moskva, ul. Ilinka, 5/2, OOO "Soyuzpatent"

(72) Inventor(s):

KAGEYAMA Yukako (JP),
FUDZINAGA Kentaro (JP),
YAMAGUTI Ayuko (JP),
AKIYAMA Yusuke (JP),
KATO Sontiro (JP),
KIMURA Yukiko (JP),
KHONDA Susumu (JP),
SATAKE Makoto (JP),
KANEKO Khiroaki (JP),
ISIVARI Ayumi (JP),
KHIRASIMA Masaki (JP)

(73) Proprietor(s):

TEJDZIN LIMITED (JP),
TEJDZIN FARMA LIMITED (JP)

(54) RADIATION-STERILIZATION-RESISTANT PROTEIN COMPOSITION

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medicine and relates to a composition of fibrinogen for hemostatic use, containing a mixture of glycine, phenylalanine and histidine, and a cellulose-ether as an additive, wherein the cellulose-ether derivative is selected from the group consisting of hydroxypropyl cellulose, methylcellulose,

hydroxyethyl cellulose, hydroxypropyl methylcellulose, sodium carboxymethylcellulose, and mixtures thereof, and fibrinogen is contained in an amount of at least 100 to 950 % by weight of the cellulose-ether derivative.

EFFECT: invention provides resistance to radiation sterilization.

7 cl, 10 ex, 2 dwg, 6 tbl

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к белковой композиции, которая содержит специфические аминокислоты и/или эфирное производное целлюлозы и обладает устойчивостью к стерилизации облучением.

5 Предшествующий уровень техники

Натуральные и синтетические белки приобретают все более важное значение как лекарственные средства. Если они используются для медицинских целей, то их продукты должны быть стерилизованными. Из способов стерилизации известны тепловая стерилизация в автоклаве, стерилизация ионизирующим излучением, например, γ -лучами
10 или пучком электронов, газовая стерилизация газом этиленоксидом, плазменная стерилизация плазмой пероксида водорода и раздельная стерилизация с применением химического стерилианта, включающего глутаральдегидный состав, или фильтра. Однако активность белков, таких как биоактивные белки, снижается при стерилизации нагревом или облучением. При стерилизации этиленоксидом существует вероятность того, что
15 в результате химической реакции возможно образование побочного продукта и что высокотоксичный остаточный газ может негативно воздействовать на человеческий организм. Стерилизация химическим стерилиантом связана с проблемой необходимости обязательного учитывания устойчивости белка к стерилианту и изменений pH, интенсивности ионов и температуры. Поэтому процессы производства фармацевтических
20 препаратов и медицинских изделий, содержащих или иммобилизирующих белок, должны осуществляться в полностью стерильных условиях, что требует огромных производственных затрат.

Хотя раствор, содержащий белок, подвергается раздельной стерилизации с использованием фильтра, довольно трудно применить эту раздельную стерилизацию
25 к композиции, содержащей крупные частицы, или к твердой либо полутвердой композиции.

EP0437095 заявляет, что нейтрализованный окисленный целлюлозный продукт в комбинации с гепарином или фрагментом гепарина (nORC) можно стерилизовать гамма-излучением. Однако в этом документе ничего не говорится о стерилизации ORC или n-
30 ORC, связанного с белком.

EP0562864 раскрывает композитное вещество для ухода за ранами, содержащее коллагеновый губчатый матрикс, второй биоабсорбируемый полимер (такой как дисперсное волокно окисленной регенерированной целлюлозы (ORC) и активатор (такой как пептид). Этот документ сообщает, что активатор может содержаться в
35 матриксе, биоабсорбируемом полимере или в обоих из них и что композитное губчатое вещество может стерилизоваться в процессе его упаковки.

US5730933 описывает способ стерилизации биологически активного пептида гамма-излучением или пучком электронов без потерь биологической активности пептида. Этот способ представляет собой технологию, включающую стадии приготовления
40 смеси биологически активного пептида с чужеродным белком, таким как желатин; замораживания или лиофилизации полученной смеси и ее облучения. Указанный документ заявляет, что присутствие чужеродного белка стабилизирует пептид и препятствует снижению активности пептида.

WO2000/033893 предлагает комплекс из пептида с терапевтическими свойствами и
45 полисахарида, выбранного из группы, состоящей из окисленной регенерированной целлюлозы, нейтрализованной окисленной регенерированной целлюлозы и их смесей. Этот документ заявляет, что, если пептид комбинируется с эффективным количеством полисахарида перед стерилизацией ионизирующим излучением, то биологическая

активность пептидного терапевтического агента не утрачивается и стабилизируется, если пептид стерилизуется ионизирующим излучением.

Однако в вышеперечисленных документах не говорится о том, что деактивация белка во время стерилизации ионизирующим излучением может подавляться при сочетании эфирного производного целлюлозы и специфических аминокислот с белком.

Между тем, JP-A 2011-47089 раскрывает способ производства ферментсодержащего нановолокна, показывающего высокую ферментативную активность. В этом способе из прядильного раствора, содержащего фермент и полимер, растворенный в неводном растворителе, формируется методом электростатического прядения (электроформования) зимогенное нановолокно, которое затем пропитывается водой и высушивается. Однако в этом документе ничего не говорится о стерилизации ферментсодержащего нановолокна.

Раскрытие изобретения

Целью настоящего изобретения является создание белковой композиции, показывающей устойчивость к стерилизации облучением.

Авторы настоящего изобретения провели интенсивные исследования для решения вышеуказанной проблемы и им неожиданно удалось установить, что устойчивость белка к стерилизации облучением повышается за счет сочетания смеси глицина, фенилаланина и гистидина и/или эфирного производного целлюлозы с белком.

Настоящее изобретение было создано на основе этого открытия.

То есть настоящее изобретение представляет собой белковую композицию, которая содержит смесь глицина, фенилаланина и гистидина и/или эфирного производного целлюлозы в качестве добавки.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 показывает эффект устойчивости к стерилизации для белка, обусловленный комбинацией эфирного производного целлюлозы и специфических добавок по настоящему изобретению (ось ординат: относительная величина интенсивности геля (до стерилизации: 100)).

Фиг. 2 показывает эффект устойчивости к стерилизации, оказываемый комбинацией эфирного производного целлюлозы и специфических добавок по настоящему изобретению (ось ординат: увеличение количества белковых агрегатов (%)).

Предпочтительный вариант осуществления изобретения

Настоящее изобретение представляет собой белковую композицию, которая содержит смесь из глицина, фенилаланина и гистидина и/или эфирного производного целлюлозы в качестве добавки.

Белок, использующийся в настоящем изобретении, особо не ограничивается. Примеры белка включают гемостатические белки, типичными примерами которых являются фибриноген и тромбин; ферменты, типичными примерами которых являются аспарагиназа, каталаза, супероксиддисмутаза и липаза; транспортные белки, типичными примерами которых являются гемоглобин, сывороточный альбумин и липопротеид низкой плотности; мышечные белки, типичными примерами которых являются актин и миозин; защитные белки, типичными примерами которых являются антитела и комплементы; белки токсинов, таких как токсин дифтерии, ботулинический токсин и змеиный яд; белковые гормоны, типичными примерами которых являются инсулин, факторы роста и цитокины; запасные белки, типичными примерами которых являются овальбумин и ферритин; структурные белки, типичными примерами которых являются коллаген и кератин, и факторы роста, типичными примерами которых являются эпидермальный фактор роста (EGF), инсулиноподобный фактор роста (IGF),

трансформирующий фактор роста (TGF), фактор роста нерва (NGF), нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF); фактор роста, 5
происходящий из тромбоцитов (PDGF), эритропоэтин (EPO), тромбопоэтин (TPO), основной фактор роста фибробластов (bFGF или FGF2) и фактор роста гепатоцитов (HGF). Из вышеперечисленного предпочтительными являются гемостатические белки, ферменты, транспортные белки, мышечные белки, защитные белки, белки токсинов, белковые гормоны, запасные белки, структурные белки и факторы роста; особенно 10
предпочтительным - фибриноген.

Белок, использующийся в настоящем изобретении, может быть животного происхождения или может быть получен методом генетической рекомбинации. Если белок животного происхождения, то он предпочтительно человеческого происхождения. Белок, полученный методом генетической рекомбинации, может представлять собой 15
вариант, полученный заменой аминокислотной последовательности на другую аминокислотную последовательность, если основная биоактивность их одинакова. Могут также использоваться белки, полученные модификацией указанных белков, и их смеси.

К белку, используемому в настоящем изобретении, могут добавляться стабилизатор 20
и добавка, которые являются фармацевтически приемлемыми (именуемый в дальнейшем как "стабилизатор и др." и отличающийся от добавки, которая сочетается с белком для придания ему устойчивости к стерилизации облучением в настоящем изобретении). Предпочтительные примеры стабилизатора и др. включают аргинин, изолейцин, глутаминовую кислоту, лимонную кислоту, хлорид кальция, хлорид натрия, ингибиторы 25
протеазы (такие как апротинин), альбумин, поверхностно-активные вещества, фосфолипиды, полиэтиленгликоль, гиалуронат натрия, глицерин, трегалозу и сахарные спирты (такие как глицерин и маннитол). Предпочтительным является по меньшей мере один компонент, выбранный из аргинина, хлорида натрия, трегалозы, маннитола и лимонной кислоты, особенно предпочтительным - лимонная кислота.

30 Смесь белка и стабилизатора и др., используемая в настоящем изобретении, содержит белок в количестве не более 35 массовых частей, предпочтительно - не более 30 массовых частей, в пересчете на 100 массовых частей смеси.

Если добавка, используемая в настоящем изобретении, является смесью глицина, фенилаланина и гистидина, то содержание глицина в большинстве случаев составляет 35
от 5 до 90 массовых частей, предпочтительно - от 15 до 60 массовых частей, более предпочтительно - от 20 до 40 массовых частей; содержание фенилаланина в большинстве случаев составляет от 1 до 80 массовых частей, предпочтительно - от 2 до 40 массовых частей, более предпочтительно - от 4 до 20 массовых частей; содержание гистидина в большинстве случаев составляет от 2 до 70 массовых частей, 40
предпочтительно - от 5 до 40 массовых частей, более предпочтительно - от 8 до 20 массовых частей, в пересчете на 100 массовых частей общей смеси добавки и белка.

Если добавка в настоящем изобретении является эфирным производным целлюлозы, то белок или смесь белка и стабилизатора и др., используемая в настоящем изобретении, могут удерживаться на эфирном производном целлюлозы, но 45
предпочтительно содержаться в эфирном производном целлюлозы (слово "содержаться" относится к состоянию, в котором по меньшей мере часть белка входит внутрь эфирного производного целлюлозы). В этом случае молекулы белка и стабилизатора и др. могут диспергироваться в эфирном производном целлюлозы, но предпочтительно в виде

частиц, образующихся в результате агрегации молекул белка и стабилизатора и др. (могут именоваться как "белковые частицы", включающие смешанные частицы со стабилизатором и др.).

Это предпочтительное присутствие белка или белковых частиц в эфирном производном целлюлозы остается неизменным, если добавка представляет собой только эфирное производное целлюлозы, а также если добавка состоит из смеси глицина, фенилаланина гистидина и эфирного производного целлюлозы.

Примеры эфирного производного целлюлозы, используемого в настоящем изобретении, включают гидроксипропилцеллюлозу, метилцеллюлозу, гидроксиэтилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, натрий-карбоксиметилцеллюлозу и их смеси.

Предпочтительным является производное, выбранное из группы, состоящей из гидроксипропилцеллюлозы, гидроксиэтилцеллюлозы, гидроксипропилметилцеллюлозы и их смесей, наиболее предпочтительным - гидроксипропилцеллюлоза.

Хотя молекулярная масса эфирного производного целлюлозы, используемого в настоящем изобретении, особо не ограничивается, но если измерение вязкости проводится при концентрации 2% и температуре 20°C, то выбирается молекулярная масса, которая показывает вязкость от 1 до 10000 мПа·с, предпочтительно - от 2 до 5000 мПа·с, более предпочтительно - от 2 до 40000 мПа·с.

В белковой композиции настоящего изобретения может использоваться другой полимер или другое соединение в комбинации при условии, что это не противоречит цели настоящего изобретения.

Эфирное производное целлюлозы, используемое в настоящем изобретении, предпочтительно имеет высокую степень чистоты. В основном, количества добавок и пластификатора, содержащихся в эфирном производном целлюлозы, и остатков, таких как остаточный катализатор, остаточные мономеры и остаточный растворитель, используемый для формования и последующей обработки, предпочтительно являются по возможности низкими. В том случае, если композиция применяется для медицинских целей, необходимо снизить эти количества до значений, ниже стандартов безопасности.

Форма белковой композиции настоящего изобретения не ограничивается какой-либо конкретной формой, включая неопределенную форму; композиция может быть в виде пленки, волокна, листа, пластинчатого тела, трубкообразного тела, линейного тела, стержнеобразного тела, амортизирующего материала, пенного или пористого тела. Способ формования для получения формованного изделия особо не ограничивается, если это способ, в котором активность белка не снижается. Например, могут применяться такие подходящие способы формования, как экструзионное формование, инъекционное формование, каландрование, формование прессованием, формование раздувом, вакуумное формование, формование порошков, формование отливкой без давления и литьевое формование. Белковая композиция настоящего изобретения пригодна для производства пленок и волокон. Волокнистая форма в контексте изобретения относится к 3D-формованному телу, полученному ламинированием, плетением, вязанием или другим способом соединения одного или множества волокон. Волокнистая форма может представлять собой, например, нетканый материал. Кроме того, волокнистая форма включает трубчатую и сетчатую формы, получаемые обработкой нетканого материала.

Для изготовления последних может применяться любой из способов, традиционно используемых для изготовления пленок или полимерных волокон. Например, могут применяться способы экструзионного формования, такие как литьевое формование,

электропрядение (электроформование), экструзионно-раздувное формование и экструзионное формование через Т-образную фильеру, и способ каландрования. Вышеуказанное формование может быть формованием из раствора или формованием из расплава, из которых предпочтение отдается формованию из раствора, чтобы
 5 облегчить диспергирование белка или белковых частиц с тем, чтобы предотвратить нарушение функции белка.

Способ изготовления белковой композиции, имеющей форму пленки по настоящему изобретению, разъясняется ниже на примере способа литьевого формования. Белковые частицы, имеющие средний диаметр (в большинстве случаев от 0,1 до 200 мкм,
 10 предпочтительно - от 1 до 100 мкм), подходящий для их диспергирования в растворителе, получают растиранием пестиком лиофилизированных порошков белка в ступке. Затем белковые частицы диспергируют в одном или более пригодных для данной цели растворителях (таких как 2-пропанол и этанол), которые способны растворять эфирное производное целлюлозы, способны к образованию суспензии с белковыми частицами
 15 и испаряются на стадии пленкообразования с получением пленки; эфирное производное целлюлозы и дополнительный (необязательно!) пластификатор, такой как MACROGOL, растворяют в готовой дисперсии так, чтобы получился прядильный раствор, содержащий белковые частицы, диспергированные в растворе эфирного производного целлюлозы. Пленка формируется литьевым способом из полученного прядильного раствора.

Белковая композиция, имеющая форму пленки по настоящему изобретению, содержит белок или белковые частицы в количестве, составляющем в большинстве случаев не менее 100 мас. %, предпочтительно - не менее 500 мас. %, более предпочтительно - от 800 до 950 мас. %, в пересчете на эфирное производное целлюлозы, хотя это зависит от вида белка и вида эфирного производного целлюлозы. Если содержание белка или
 25 белковых частиц падает ниже указанного выше диапазона, то функция белка может проявляться не полностью, а если содержание превышает вышеуказанный диапазон, то формимость пленки может стать неудовлетворительной.

Средняя толщина пленки белковой композиции, имеющей форму пленки по настоящему изобретению, которая различается в зависимости от предполагаемого
 30 применения композиции, предпочтительно составляет от 10 до 1000 мкм.

Средний диаметр волокон белковой композиции, имеющей волокнистую форму по настоящему изобретению, составляет, например, от 0,01 до 50 мкм и может определяться соответствующим образом специалистом в данной области техники в зависимости от предполагаемого применения. Белковая композиция может быть в виде длинного
 35 волокна. Длинное волокно - это волокно, сформованное без добавления стадии резания волокна в процессе перехода от прядения к обработке волокнистого формованного тела. Оно может быть получено способом электропрядения (электроформования), фильерным (метод "спанбонд") и фильерно-раздувным (метод "мелтблаун") способами формования из расплава. Из перечисленных способов предпочтение отдается способу
 40 электропрядения (электроформования), поскольку длинное волокно может формироваться без дополнительного нагрева и функциональное ухудшение белка может подавляться.

Способ электропрядения (электроформования) - это способ, в котором волокнистое формованное тело получают на электроде путем приложения высокого электрического напряжения к раствору, содержащему полимер. Этот процесс включает стадии
 45 приготовления прядильного раствора, содержащего полимер; прикладывания высокого электрического напряжения к раствору; формирования струи из раствора; образования волокнистого формованного тела в результате испарения растворителя из струи раствора; снятия электрического заряда с полученного волокнистого формованного

тела (как необязательная стадия) и отложение волокнистого формованного тела в результате потери электрического заряда.

Ниже дается последовательное описание способа производства белковой композиции, имеющей волокнистую форму или форму нетканого материала по настоящему изобретению, с применением способа электропрядения (электроформования) в качестве примера.

Ниже разъясняется стадия приготовления прядильного раствора в способе электропрядения (электроформования). В качестве прядильного раствора в настоящем изобретении предпочтительно используется суспензия из раствора эфирного производного целлюлозы и белковых частиц.

Концентрация эфирного производного целлюлозы в суспензии предпочтительно составляет от 1 до 30 мас. %. Если концентрация эфирного производного целлюлозы ниже 1 мас. %, то это затрудняет получение волокнистого формованного тела, что можно отнести к недостаткам. Если же концентрация выше 30 мас. %, то диаметр волокон полученного волокнистого формованного тела становится большим и вязкость суспензии становится высокой, что можно отнести к недостаткам. Более предпочтительно, если концентрация эфирного производного целлюлозы в суспензии составляет от 1,5 до 20 мас. %.

Растворитель для эфирного производного целлюлозы особо не ограничивается, если он способен растворять эфирное производное целлюлозы, образует суспензию с белковыми частицами и испаряется на стадии прядения, что делает возможным формирование волокна. Может использоваться только один растворитель либо комбинация из двух или более растворителей. Примеры растворителя включают хлороформ, 2-пропанол, толуол, бензол, бензиловый спирт, дихлорметан, четыреххлористый углерод, циклогексан, циклогексанон, трихлорэтан, метилэтилкетон, этилацетат, ацетон, этанол, метанол, тетрагидрофуран, 1,4-диоксан, 1-пропанол, фенол, пиридин, уксусную кислоту, муравьиную кислоту, гексафтор-2-пропанол, гексафторацетон, N,N-диметилформамид, N,N-диметилацетамид, ацетонитрил, N-метил-2-пирролидинон, N-метилморфолин-N-оксид, 1,3-диоксолан, воду и их смеси. Из вышеперечисленного предпочтается использовать 2-пропанол или этанол с точки зрения несложности обработки и физических свойств.

Хотя способ приготовления суспензии путем смешивания эфирного производного целлюлозы и белковых частиц особо не ограничивается, может применяться ультрафиолетовое излучение или перемешивающее средство. В качестве перемешивающего средства может использоваться высокоскоростное перемешивающее средство, такое как гомогенизатор, или перемешивающее средство, такое как аттритор или шаровая мельница. Из вышеперечисленного предпочтение отдается приготовлению дисперсии с помощью ультразвука.

Следовательно, прядильный раствор может готовиться путем добавления эфирного производного целлюлозы после получения суспензии из растворителя и белковых частиц.

До приготовления суспензии белковые частицы могут быть подвергнуты микрообработке. Для микрообработки существуют сухой и мокрый способы измельчения, которые оба могут использоваться, а также могут комбинироваться в настоящем изобретении.

Сухой способ проводится путем измельчения в шаровой мельнице, планетарной мельнице или качающейся мельнице, путем растирания в ступке пестиком либо путем помола в мельнице тонкого измельчения со среднескоростным перемешиванием,

струйной мельнице или жерновой мельнице.

В то время как мокрый способ измельчения осуществляется путем перемешивания с помощью мешалки или в месилке, работающей с высоким усилием среза, в процессе диспергирования белковых частиц в подходящей дисперсионной среде либо с применением шаровой или бисерной мельницы в процессе диспергирования белковых частиц в среде.

Помимо этого, могут использоваться белковые частицы, полученные распылительной сушкой.

В белковой композиции, имеющей волокнистую форму или форму нетканого материала по настоящему изобретению, размеры белковых частиц особо не ограничиваются, но предпочтительно они составляют от 0,01 до 100 мкм. Технически трудно получить белковые частицы, имеющие размер менее 0,01 мкм, а если размер частиц составляет более 100 мкм, то диспергируемость их ухудшается и волокнистое формованное тело становится хрупким, что является недостатком.

Метод стерилизации, использующийся для белковой композиции настоящего изобретения, является стерилизацией облучением. Примеры включают облучение альфа-лучами, бета-лучами, гамма-лучами, нейтронами, пучком электронов и рентгеновскими лучами. Из вышеперечисленного предпочтение отдается облучению гамма-лучами и пучком электронов, наиболее предпочтительным является облучение пучком электронов. Хотя метод стерилизации особо не ограничивается, доза облучения составляет от 10 до 80 кГр (килогрей), предпочтительно - от 20 до 30 кГр. Хотя температурный режим особо не ограничивается, он составляет от -80 до 40°C, предпочтительно - от -80 до 30°C.

Облучение, например, альфа-лучами, позитронами, гамма-лучами, нейтронами, пучком электронов или рентгеновскими лучами отрывает электрон от молекул или атомов, составляющих вещество, когда оно (т.е. облучение) прикладывается к веществу. При этом молекулярная связь разрывается и образуется высокореактивный радикал, который химически реагирует с окружающим веществом вторично.

Хорошо известно, что белок при подвергании облучению имеет тенденцию терять свою функцию (активность). Считается, что это происходит вследствие деструкции "структуры высшего порядка", которая является источником формирования функции, из-за разрыва молекулярной связи при облучении. Однако функциональное ухудшение белковой композиции настоящего изобретения подавляется, даже если она подвергается облучению. Это означает, что структура высшего порядка белка сохраняется (поддерживается)-в композиции настоящего изобретения, что является общим эффектом независимо от вида белка. Его нельзя рассматривать с точки зрения толщины эфирного производного целлюлозы, через которую проходит излучение: этот эффект является скорее эффектом экранирования, и механизм контроля его не известен. Механизм явления, состоящего в том, что эффект эфирного производного целлюлозы заметно улучшается при добавлении специфических аминокислот, также неизвестен.

Белковая композиция настоящего изобретения может дополнительно содержать акцептор электронов/ионов, агент-переносчик энергии, акцептор радикалов, антиоксидант и пластификатор. Примеры акцептора электронов/ионов включают N,N'-тетраметилфенилендиамин, дифенилендиамин, пирен и хинон. Примеры агента-переносчика энергии включают аценафтен. Примеры акцептора радикалов включают меркаптаны, октагидрофенантрены, моноалкилдифениловые эфиры, токоферол, лимонную кислоту, бутилированный гидроксианизол, бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), t-бутилгидрохинон, пропилгаллат и производные аскорбиновой кислоты.

Примеры антиоксиданта включают ВНТ, фосфитные триэфиры, фенольные агенты, предотвращающие старение, и соли органических тиокислот. Предпочтение отдается добавкам, которые повсеместно одобрены как безопасные к применению в пищевой промышленности и фармацевтике. Количество добавки, которое особо не

5 ограничивается, составляет, например, от 0,01 до 10 мас. % в пересчете на эфирное производное целлюлозы в белковой композиции.

Эфирное производное целлюлозы, содержащее белок, на стадии стерилизации предпочтительно не содержит воды. Влагосодержание эфирного производного целлюлозы предпочтительно составляет не более 10 мас. %, более предпочтительно -

10 не более 4 мас. %, наиболее предпочтительно - в основном 0 мас. %.

Белковая композиция настоящего изобретения может завертываться в упаковочный материал, стерилизуемый облучением. В качестве упаковочного материала предпочтительно используется материал с высокой газонепроницаемостью, такой как алюминий. Белковая композиция может герметически запечатываться и упаковываться

15 вместе с восстановителем либо десикантом или в процессе заполнения упаковки инертным газом после удаления из нее воздуха, или оба способа могут комбинироваться друг с другом. В качестве восстановителя и десиканта предпочитается использовать такие, которые не оказывают вредного воздействия на человеческий организм и которые не деактивируются при подвергании облучению.

Белковая композиция настоящего изобретения может применяться как медицинский материал, который требует активности и стерильности белка.

Настоящее изобретение включает стерильную белковую композицию, полученную стерилизацией белковой композиции настоящего изобретения облучением.

Примеры

Следующие примеры приводятся с целью дополнительной иллюстрации настоящего изобретения, но ни в коей мере не должны рассматриваться как ограничивающие его.

Методы измерения для примеров 1-4 и сравнительных примеров 1 и 2

1. Средний диаметр волокон

По диаметрам волокон в 20 местах, выбранных произвольно на фотографии

30 поверхности полученного волокнистого формованного тела, сделанной с помощью сканирующего электронного микроскопа (VE8800 от Keyence Corporation) при 3000-кратном увеличении, определяли среднее значение всех диаметров волокон как средний диаметр волокон. $N=20$.

2. Средняя толщина

Толщину пленок 15 волокнистых формованных тел, уменьшенных до размера 50 мм × 100 мм, измеряли с измерительным усилием 0,01 Н (ньютон) с помощью высокоточного измерительного прибора с устройством для вывода данных digimatic (LITEMATIC VL-50 от Mitutoyo Corporation), чтобы рассчитать среднее значение. Это измерение проводилось с минимальным измерительным усилием, на которое рассчитан

40 измерительный прибор.

3. ELISA-измерение

(1) Фибриноген

10 мкг/мл античеловеческого антитела к фибриногену (DAKO A0080) были иммобилизованы на планшете для ELISA (NUNC 468667). После отмывки его PBS (фосфатно-солевым буферным раствором), содержащим 0,05% Tween 20 (эмульгатор), в каждую лунку добавляли Block Ace (блокирующий буфер) (UK-B80 от DS Pharma Biomedical Co., Ltd.) для проведения маскирования. После отмывки PBS, содержащим 0,05% Tween 20, добавляли тестируемое тело. В качестве стандарта для построения

калибровочной кривой использовали человеческий фибриноген (No. FIB3 от Enzyme Research Laboratories). После отмывки PBS, содержащим 0,05% Tween 20, добавляли HRP-меченое (т.е. меченое пероксидазой хрена) античеловеческое антитело к фибриногену (CPL5523). По окончании реакции продукт реакции отмывали PBS, содержащим 0,05% Tween 20, добавляли реагент ТМВ (тетраметилбензидин) (KPL 50-76-02 50-65-02) и общую смесь оставляли в покое на 6 минут до появления окрашивания. 1 М H_3PO_4 добавляли для прекращения окрашивания с тем, чтобы измерить оптическую плотность OD450-650 нм с помощью микропланшетного ридера (считывателя).

(2) Тромбин

5 мкг/мл античеловеческого антитела к тромбину (No. SAHT-AP от Affinity Biologicals Inc.) были иммобилизованы на планшете для ELISA (NUNC 468667). После отмывки его PBS, содержащим 0,05% Tween 20, в каждую лунку добавляли Block Ace (UK-B80 от DS Pharma Biomedical Co., Ltd.) для проведения маскирования. После отмывки PBS, содержащим 0,05% Tween 20, добавляли тестируемое тело. В качестве стандарта для построения калибровочной кривой использовали человеческий тромбин (HCT-0020 от Haematologic Technologies, Inc.). После отмывки PBS, содержащим 0,05% Tween 20, добавляли 0,1 мкг/мл HRP-меченого античеловеческого антитела к тромбину (No. SAHT-HRP от Affinity Biologicals Inc.). По окончании реакции продукт реакции отмывали PBS, содержащим 0,05% Tween 20, добавляли реагент ТМВ (DaKo S1599) и общую смесь оставляли в покое на 10 минут до появления окрашивания. 0,5 М H_2SO_4 добавляли для прекращения окрашивания с тем, чтобы измерить оптическую плотность OD450-650 нм с помощью микропланшетного ридера.

4. Измерение активности тромбина

20 мкл образца и 80 мкл разбавленного раствора для измерения активности (0,01% F-68, 50 ммол/л NaCl, 50 ммол/л трис-HCl, pH 8,4) добавляли в полистироловую пробирку BD для последующей инкубации при 37°C в течение 3 минут. В качестве стандарта использовался рекомбинантный тромбин (400 JPU/мл (японских единиц/мл) согласно стандарту Японии для тромбина или 110 МЕ/мл согласно стандарту ВОЗ/США для тромбина: приготовленный их собственными компаниями), разбавленный вышеуказанным буфером до 4, 2, 1, 0,5 и 0,25 ед./мл в случае JPU и до 6, 3, 1,5, 0,75 и 0,375 МЕ/мл в случае IU (МЕ) (ВОЗ/США). Добавляли 100 мкл хромогенного субстрата S-2238 для исследований (1 mM: Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.) и смешивали с полученным реакционным раствором при перемешивании для проведения реакции при 37°C в течение 7 минут, затем добавляли 800 мкл 0,1 М раствора лимонной кислоты для прекращения реакции. 200 мкл реакционного раствора переносили на 96-луночные планшеты для измерения OD405/650.

Пример 1

В дисперсии, полученной диспергированием в 2-пропанолe лиофилизированных порошков фибриногена (Volheal (зарегистрированная торговая марка, то же относится и к остальному тексту), тканевой адгезив: флакон 1), растворяли гидроксипропилцеллюлозу (6-10 мПа·с, изготовитель - Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) до концентрации 16 мас. % с тем, чтобы получить прядильный раствор, имеющий отношение фибриногенсодержащие частицы/гидроксипропилцеллюлоза, равное 20(9,2 по фибриногену)/100 (мас./мас). Прядение волокон проводили методом электропрядения (электроформования) при температуре 22°C и влажности не выше 26% с получением листовидного волокнистого формованного тела. Внутренний диаметр струйного сопла составлял 0,8 мм, напряжение - 11 кВ, скорость потока прядильного раствора - 1,2 мл/ч и расстояние от струйного сопла до плоской пластины - 15 см. Полученное волокнистое

формованное тело имело средний диаметр волокон 0,86 мкм и среднюю толщину 137 мкм. Полученный лист стерилизовали пучком электронов в дозе 20 кГр.

Стерилизованный лист обрезали до размера 0,5 см × 0,5 см и экстрагировали белок физиологическим раствором (62,5 мкл) для проведения ELISA-измерения. В итоге

количество иммобилизованного белка составило 0,15 мг/см². Между тем, при проведении ELISA-измерения на аналогичном нестерилизованном листе количество

иммобилизованного белка было 0,16 мг/см². Таким образом, степень извлечения белка из стерилизованного листа составила 94% от степени извлечения белка из нестерилизованного листа.

Пример 2

В дисперсии, полученной диспергированием в 2-пропанолe лиофилизированных порошков фибриногена (тканевой адгезив Bolheal: флакон 1), растворяли гидроксипропилцеллюлозу (6-10 мПа·с, изготовитель - Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) до концентрации 16 мас. % с тем, чтобы получить прядильный раствор, имеющий отношение лиофилизированный порошок фибриногена/гидроксипропилцеллюлоза, равное 40 (18 по фибриногену)/100 (мас./мас). Прядение волокон проводили методом электропрядения (электроформования) при температуре 22°C и влажности не выше 26% с получением листовидного волокнистого формованного тела. Внутренний диаметр струйного сопла составлял 0,8 мм, напряжение - 12,5 кВ, скорость потока прядильного раствора - 1,2 мл/ч и расстояние от струйного сопла до плоской пластины - 15 см.

Полученное волокнистое формованное тело имело средний диаметр волокон 0,43 мкм и среднюю толщину 152 мкм. Полученный лист стерилизовали пучком электронов в дозе 20 кГр. Стерилизованный лист обрезали до размера 0,5 см × 0,5 см и экстрагировали белок физиологическим раствором (62,5 мкл) для проведения ELISA-измерения. В итоге количество иммобилизованного белка составило 0,27 мг/см². Между тем, при проведении ELISA-измерения на аналогичном нестерилизованном листе количество

иммобилизованного белка было 0,30 мг/см². Таким образом, степень извлечения белка из стерилизованного листа составила 90% от степени извлечения белка из нестерилизованного листа.

Пример 3

В дисперсии, полученной диспергированием в 2-пропанолe лиофилизированных порошков фибриногена (тканевой адгезив Bolheal: флакон 1), растворяли гидроксипропилцеллюлозу (6-10 мПа·с, изготовитель - Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) до концентрации 16 мас. % с тем, чтобы получить прядильный раствор, имеющий отношение лиофилизированный порошок фибриногена/гидроксипропилцеллюлоза, равное 100(46 по фибриногену)/100 (мас./мас). Прядение волокон проводили методом электропрядения (электроформования) при температуре 22°C и влажности не выше 26% с получением листовидного волокнистого формованного тела. Внутренний диаметр струйного сопла составлял 0,8 мм, напряжение - 12,5 кВ, скорость потока прядильного раствора - 1,2 мл/ч и расстояние от струйного сопла до плоской пластины - 15 см.

Полученное волокнистое формованное тело имело средний диаметр волокон 0,35 мкм и среднюю толщину 191 мкм. Полученный лист стерилизовали пучком электронов в дозе 20 кГр. Стерилизованный лист обрезали до размера 0,5 см × 0,5 см и экстрагировали белок физиологическим раствором (62,5 мкл) для проведения ELISA-измерения. В итоге количество иммобилизованного белка составило 0,78 мг/см². Между тем, при проведении ELISA-измерения на аналогичном нестерилизованном листе количество

иммобилизованного белка было $0,76 \text{ мг/см}^2$. Таким образом, степень извлечения белка из стерилизованного листа составила 102% от степени извлечения белка из нестерилизованного листа.

Сравнительный пример 1

Леофилизированные порошки фибриногена (тканевой адгезив Bolheal: флакон 1) стерилизовали пучком электронов в дозе 20 кГр. Белок экстрагировали физиологическим раствором (1 мл) для проведения ELISA-измерения. В итоге результат ELISA-измерения составил 31 мкг/мл. Между тем, при проведении ELISA-измерения на аналогичных нестерилизованных леофилизированных порошках фибриногена (Bolheal) результат ELISA-измерения составил 90 мкг/мл. Таким образом, степень извлечения белка из стерилизованного листа составила 34% от степени извлечения белка из нестерилизованного листа.

Пример 4

В дисперсии, полученной диспергированием в 2-пропанол тромбинсодержащих частиц (приготовленных леофилизацией водного раствора, содержащего 1 мг/мл рекомбинантного тромбина, хлорид натрия, цитрат натрия, хлорид кальция и маннитол и имеющего pH 7), растворяли гидроксипропилцеллюлозу (2,0-2,9 мПа·с, изготовитель - Nippon Soda Co., Ltd.) до концентрации 13 мас. % с тем, чтобы получить прядильный раствор, имеющий отношение тромбинсодержащие частицы/гидроксипропилцеллюлоза, равное 100/100 (мас./мас). Прядение волокон проводили методом электропрядения (электроформования) с получением листовидного волокнистого формованного тела. Полученное волокнистое формованное тело имело толщину 204 мкм, массу - $2,08 \text{ мг/см}^2$ и насыпную плотность - 101 мг/см^3 . Полученный лист обрезали до диаметра 1 см и экстрагировали белок физиологическим раствором (200 мкл) для измерения его активности. В итоге измеренное значение активности составило 110,3 ед./см². Полученный лист стерилизовали облучением пучком электронов в дозе 30 кГр с последующим измерением активности тромбина. Если до стерилизации активность тромбина была 100%, то сразу после стерилизации пучком электронов уровень сохранения (удерживания) активности тромбина составил 68,4%.

Сравнительный пример 2

После прикладывания пучка электронов в дозе 30 кГр к тромбинсодержащим частицам (приготовленным леофилизацией водного раствора, содержащего 1 мг/мл рекомбинантного тромбина, хлорид натрия, цитрат натрия, хлорид кальция и маннитол и имеющего pH 7) для стерилизации их измеряли активность тромбина. Активность тромбина до облучения составляла 404,73 ед./флакон. Если до стерилизации активность тромбина была 100%, то сразу после стерилизации пучком электронов уровень сохранения активности тромбина составил 51,8%.

Методы измерения для примеров 5 и 6 и сравнительных примеров 3 и 4

1. Средняя толщина

Толщину пленок 9 волокнистых формованных тел, полученных разрезанием композиции до подходящего размера, измеряли с измерительным усилием 0,01 Н с помощью высокоточного измерительного прибора с устройством для вывода данных digimatic (LITEMATIC VL-50 от Mitutoyo Corporation) для расчета среднего значения. Это измерение проводилось с минимальным измерительным усилием, на которое рассчитан измерительный прибор.

2. Измерение активности ферментов

Для измерения активности липазы использовали набор реагентов для непрерывного

флуориметрического теста на липазу (изготовитель - ROGEN BIOTECHNIK GmbH).
Уровень сохранения активности рассчитывали по следующему уравнению. Количество активного фермента вычисляли в рамках концентрации, исходя из значения активности.

Уровень сохранения активности (%) = [количество активного фермента после
стерилизации (мг/см²) / количество активного фермента до стерилизации (мг/см²)]×100.

Для измерения активности β-глюкозидазы применяли флуоресцентный метод с использованием Tokyo Green (флуоресцентный краситель) (зарегистрированная торговая марка, то же относится и к остальному тексту) - βGlu (Sekisui Medical Co., Ltd.). Уровень восстановления активности рассчитывали по следующему уравнению. Теоретическую массу иммобилизованного фермента вычисляли, исходя из мас. % заряженного фермента в порошке и массы композиции.

Уровень восстановления активности (%) = [количество активного фермента (мг) / теоретическая масса иммобилизованного фермента (мг)]×100.

Уровень сохранения активности рассчитывали по следующему уравнению.

Уровень сохранения активности (%) = [уровень восстановления активности после стерилизации (%) / уровень восстановления активности до стерилизации (%)]×100.

Пример 5

В дисперсии, полученной диспергированием в 2-пропанолe порошков липазы (выделенной из поджелудочной железы свиней, изготовитель - Wako Pure Chemical Industries, Ltd., то же относится и к остальному тексту), растворяли гидроксипропилцеллюлозу (6-10 мПа·с, изготовитель - Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) до концентрации 13 мас. % с тем, чтобы получить прядильный раствор, имеющий отношение порошок липазы/гидроксипропилцеллюлоза, равное 50/100 (мас./мас).

Прядение волокон проводили методом электропрядения (электроформования) при температуре 27°C и влажности не выше 27% с получением листовидного волокнистого формованного тела. Внутренний диаметр струйного сопла составлял 0,8 мм, напряжение - 18 кВ, скорость потока прядильного раствора - 1,2 мл/ч и расстояние от струйного сопла до плоской пластины - 16,5 см. Полученное волокнистое формованное тело (10 см × 14 см) имело среднюю толщину 168 мкм. Полученное волокнистое формованное тело стерилизовали пучком электронов в дозе 20 кГр. После обрезки стерилизованного волокнистого формованного тела до размера 1 см × 1 см экстрагировали липазу с использованием 1 мл буфера для пробы на липазу, содержащегося в наборе реагентов для измерения ее активности. В итоге количество активного фермента составило 0,46

мг/см². Между тем, при измерении активности на аналогичном нестерилизованном листе количество активного фермента было 0,40 мг/см². Из вышесказанного ясно, что уровень сохранения активности стерилизованного волокнистого формованного тела составил 115% от уровня сохранения активности нестерилизованного волокнистого формованного тела и что липаза не деактивировалась при стерилизации пучком электронов.

Пример 6

В дисперсии, полученной диспергированием в 2-пропанолe порошков липазы, растворяли гидроксипропилцеллюлозу (6-10 мПа·с, изготовитель - Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) до концентрации 13 мас. % с тем, чтобы получить формовочный (отливочный) раствор, имеющий отношение порошок липазы/гидроксипропилцеллюлоза, равное 50/100 (мас./мас). Формование из отливочного раствора проводили с использованием ракеля (YBA-3 от YOSHIMITSU) при толщине покрытия 15 мил (381 микрон) для получения листа. Полученный лист (4 см × 6 см)

имел среднюю толщину 180 мкм. Полученный лист стерилизовали пучком электронов в дозе 20 кГр. После обрезки стерилизованного листа до размера 1 см × 1 см экстрагировали липазу с использованием 1 мл буфера для пробы на липазу, содержащегося в наборе реагентов для измерения ее активности. В итоге количество

5 активного фермента составило 0,69 мг/см². Между тем, при измерении активности на аналогичном нестерилизованном листе количество активного фермента составило 0,64 мг/см². Из вышесказанного ясно, что уровень сохранения активности стерилизованного

10 листа составил 108% от уровня сохранения активности нестерилизованного листа и что липаза не деактивировалась при стерилизации пучком электронов.

Пример 7.

В дисперсии, полученной диспергированием в 2-пропаноле порошков β-глюкозидазы (выделенной из миндаля, изготовитель - Oriental Yeast Co., Ltd, то же относится и к

15 остальному тексту), растворяли гидроксипропилцеллюлозу (6-10 мПа·с, изготовитель - Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) до концентрации 13 мас. % с тем, чтобы получить прядильный раствор, имеющий отношение порошок β-глюкозидазы / гидроксипропилцеллюлоза, равное 38/62 (мас./мас). Прядение волокон проводили методом электропрядения (электроформования) при температуре 27°C и влажности не

20 выше 27% для получения листовидного волокнистого формованного тела. Внутренний диаметр струйного сопла составлял 0,9 мм, напряжение - 18 кВ, скорость потока прядильного раствора - 1,2 мл/ч и расстояние от струйного сопла до плоской пластины - 16,5 см. Полученное волокнистое формованное тело (10 см × 10 см) имело среднюю

25 толщину 207 мкм. После обрезки полученного волокнистого формованного тела до размера 2 см × 2 см его стерилизовали пучком электронов в дозе 20 кГр. Из полученного стерилизованного листа экстрагировали β-глюкозидазу физиологическим раствором (1 мл) для измерения ее активности с Tokyogreen-βGlu. В итоге уровень восстановления

30 активности составил 42%. Между тем, при измерении активности на аналогичном нестерилизованном листе уровень восстановления активности был 46%. Из вышесказанного ясно, что уровень сохранения активности стерилизованного

35 волокнистого формованного тела составил 91% от уровня сохранения активности нестерилизованного волокнистого формованного тела и что деактивация фермента может подавляться, если он содержится в эфирном производном целлюлозы.

Сравнительный пример 3

Порошки липазы стерилизовали пучком электронов в дозе 20 кГр. 1 мл буфера для

35 пробы на липазу добавляли к 1 мг порошков для измерения активности липазы. В результате было получено значение активности 0,25 пикомолей/мл·мин. Между тем, при измерении активности на аналогичных нестерилизованных порошках липазы значение активности составило 0,34 пмоль/мл·мин. Следовательно, уровень сохранения активности стерилизованных порошков составил 74% от уровня сохранения активности

40 нестерилизованных порошков.

Сравнительный пример 4

Порошки β-глюкозидазы стерилизовали пучком электронов в дозе 20 кГр. 2 мг порошков растворяли в 1 мл физиологического раствора для измерения активности β-

45 глюкозидазы с Tokyogreen-βGlu. В итоге уровень сохранения активности составил 81%.

Метод измерения для примеров 8-10

При прикладывании пучка электронов к лиофилизированным порошкам фибриногена (фибриногенсодержащим частицам) происходили изменения фибриногена (увеличение количества его агрегатов, снижение прочности геля). Для изучения эффекта подавления изменений фибриногена облучением пучком электронов (эффект устойчивости к

стерилизации) готовили маточный раствор фибриногена и 1 мл этого раствора помещали в стеклянный флакон на 5 мл для последующей лиофилизации. Пучком электронов в дозе 30 кГр облучали часть флакона, в котором лиофилизация завершилась, для-сравнительной оценки каждого лиофилизированного продукта до и после стерилизации.

5 Сравнительную оценку проводили путем измерения прочности геля с помощью малогабаритного настольного тестера серии EZTest (Shimadzu Corporation) и содержания агрегатов с использованием колонки BioSep-SEC-s4000 (Phenomenex) (условия анализа: фракционирование с применением 50 mM фосфорно-кислотного буферного раствора (pH 7,0) и 0,5 M гидрохлорида аргинина в качестве подвижных фаз при скорости потока
10 1,0 мл/мин; детекция целевого вещества при длине волны 280 нм и определение количества агрегатов по площади пика, который был обнаружен раньше, чем пик мономера).

Что касается процедуры подготовки образца для анализа (аналитический образец), то содержимое каждого из флаконов с нестерилизованным лиофилизированным
15 продуктом и стерилизованным лиофилизированным продуктом растворяли в 1 мл дистиллированной воды. Полученные растворы центрифугировали в центрифужной пробирке при 15000 об./мин в течение 5 минут и пропускали через 0,45 мкм-фильтр с последующим использованием в качестве аналитических образцов.

Пример 8

20 Эффект устойчивости к стерилизации для белка от присутствия комбинации эфирного производного целлюлозы и специфических добавок, исследовали следующим методом. (Метод) Функцию фибриногена оценивали путем измерения прочности геля каждого из маточных растворов фибриногена с композициями, включающими "эфирное производное целлюлозы + специфические добавки" (композиции (1), указанные под
25 №№1-6 в таблице 1, см. ниже), и маточных растворов фибриногена с композициями (2), полученными путем удаления эфирного производного целлюлозы из композиций (1), и прочность гелей до и после стерилизации указанных растворов сравнивали друг с другом для изучения эффекта устойчивости к стерилизации. Результаты приведены в таблице 2.

30 Композиции (1) (лиофилизированные порошки и гидроксипропилцеллюлозу суспендировали в 2-пропанолу с получением листа) и композиции (2) (лиофилизированные порошки) растворяли в воде до концентрации фибриногена (Fbg) 1% и разбавляли буферным раствором, содержащим 10 mM аргинина и 270 mM хлорида натрия и имеющим pH 8,5, до концентрации 2 мг/мл.

35 После внесения 10 мкл фиброгаммина (240 единиц/мл) и 110 мкл раствора тромбина (содержащего 0,2 мг/мл 100 mM раствора хлорида кальция) в полипропиленовую пробирку на 2 мл и отмеривания пипеткой результирующего раствора добавляли 900 мкл 2 мг/мл-раствора фибриногена таким образом, чтобы предотвратить образование воздушных пузырьков, и оставляли в покое при 37°C в течение 1 часа для последующего
40 измерения прочности геля с помощью малогабаритного настольного тестера серии EZTest (Shimadzu Corporation).

Таблица 1. Композиции (1): композиции, содержащие эфирное производное целлюлозы + специфические добавки

Композиция	Состав маточного раствора с композицией
№ 1	1% фибриногена, 10 мМ аргинина, 110 мМ хлорида натрия, 1,0% глицина, 0,1% маннитола, 0,4% гидроксипропилцеллюлозы
№ 2	1% фибриногена, 10 мМ аргинина, 110 мМ хлорида натрия, 1,0% глицина, 0,2% маннитола, 0,4% гидроксипропилцеллюлозы
№ 3	1% фибриногена, 10 мМ аргинина, 110 мМ хлорида натрия, 1,0% глицина, 0,25% фенилаланина, 0,2% трегалозы, 0,4% гистидина, 0,1% тринатрийцитрата, 0,4% гидроксипропилцеллюлозы
№ 4	1% фибриногена, 10 мМ аргинина, 110 мМ хлорида натрия, 1,0% глицина, 0,1% маннитола, 0,25% фенилаланина, 0,2% трегалозы, 0,4% гистидина, 0,1% тринатрийцитрата, 0,4% гидроксипропилцеллюлозы
№ 5	1% фибриногена, 10 мМ аргинина, 110 мМ хлорида натрия, 1,0% глицина, 0,1% маннитола, 0,25% фенилаланина, 0,4% гистидина, 0,1% тринатрийцитрата, 0,4% гидроксипропилцеллюлозы
№ 6	1% фибриногена, 10 мМ аргинина, 110 мМ хлорида натрия, 1,0% глицина, 0,2% маннитола, 0,25% фенилаланина, 0,4% гистидина, 0,1% тринатрийцитрата, 0,4% гидроксипропилцеллюлозы

Композиции (2): композиции, содержащие специфические добавки.

Эти композиции были приготовлены путем удаления эфирного производного целлюлозы (гидроксипропилцеллюлозы: НРС) из композиций (1).

(Результаты)

Значения прочности геля после стерилизации приводятся в таблице 2 и на фиг. 1 (значения до стерилизации приняты за 100).

Таблица 2. Эффект устойчивости к стерилизации для белка от присутствия комбинации эфирного производного целлюлозы и специфических добавок

Композиция	Композиции (1) (эфирное производное целлюлозы + специфические добавки)	Композиции (2) (специфические добавки)
№ 1	51,5	49,8
№ 2	51,1	36,5
№ 3	81,5	58,1
№ 4	84,0	57,9
№ 5	77,6	57,7
№ 6	84,4	59,6

Эффект повышения устойчивости к стерилизации от присутствия эфирного производного целлюлозы не наблюдался в композиции №1, в то время как в композициях №№2-6 указанный эффект, обусловленный присутствием эфирного производного целлюлозы, был отмечен. Этот эффект был особенно выражен в композициях №№3-6.

Пример 9

Эффект устойчивости к стерилизации от присутствия глицина изучался на композициях (двух), показанных в таблице 3 (см. ниже), по такой же методике, что и в примере 8. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 3. Композиции для оценки эффекта устойчивости к стерилизации, обусловленного добавлением глицина

Композиция	фибриноген	аргинин (pH 8,5)	хлорид натрия	маннитол	глицин (G)
G (-)	1,0%	10 мМ	110 мМ	0,2%	0%
G (+)	1,0%	10 мМ	110 мМ	0,2%	1,0%

Таблица 4. Результаты оценки эффекта устойчивости к стерилизации, обусловленного добавлением глицина

Композиция	s4000 (агрегаты)		
	До стерилизации (%)	После стерилизации (%)	Увеличение количества (%)
G (-)	14,0	28,0	14,0
G (+)	14,0	21,6	7,6

Увеличение содержания агрегатов фибриногена подавлялось за счет добавления глицина.

Пример 10

Эффект устойчивости к стерилизации от присутствия комбинации эфирного производного целлюлозы и специфических добавок изучали тем же методом, что и в примере 8.

Использовали гидроксипропилцеллюлозу (НРС) в качестве эфирного производного целлюлозы и восемь различных маточных растворов фибриногена, указанных в таблице 5 (см. ниже). В следующих восьми композициях использовали 1,0% фибриногена, 110 мМ хлорида натрия, 1,0% глицина и 0,2% маннитола. Результаты приводятся в таблице 6 и на фиг. 2.

Таблица 5. Эффект устойчивости к стерилизации, обеспечиваемый комбинацией эфирного производного целлюлозы со специфическими добавками

Композиция	аргинин (pH 8,5)	трис (pH 8,5)	гистидин	фенилаланин	цитрат натрия	НРС
1НРС(-)	10 мМ	0 мМ	0%	0%	0%	0%
1НРС(+)	10 мМ	0 мМ	0%	0%	0%	0,419%
2НРС(-)	10 мМ	0 мМ	0,4%	0,25%	0%	0%
2НРС(+)	10 мМ	0 мМ	0,4%	0,25%	0%	0,419%
3НРС(-)	10 мМ	0 мМ	0,4%	0,25%	0,1%	0%
3НРС(+)	10 мМ	0 мМ	0,4%	0,25%	0,1%	0,419%
4НРС(-)	0,4 мМ	10 мМ	0,4%	0,25%	0,1%	0%
4НРС(+)	0,4 мМ	10 мМ	0,4%	0,25%	0,1%	0,419%

Таблица 6. Результаты оценки эффекта устойчивости к стерилизации от присутствия комбинации эфирного производного целлюлозы со специфическими добавками

Композиция	s4000 (агрегаты)		
	До стерилизации (%)	После стерилизации (%)	Увеличение количества (%)
1НРС(-)	14,0	21,6	7,6
1НРС(+)	12,8	18,4	5,7
2НРС(-)	13,8	19,2	5,4
2НРС(+)	13,9	15,8	1,9
3НРС(-)	15,1	19,8	4,7
3НРС(+)	14,8	17,8	2,9
4НРС(-)	14,9	19,5	4,6
4НРС(+)	14,2	15,5	1,3

Увеличение содержания белковых агрегатов подавлялось добавлением эфирного производного целлюлозы. Эффект подавления увеличения вышеуказанного содержания, обусловленный присутствием эфирного производного целлюлозы, был отмечен в композициях 2-4, включающих фенилаланин и гистидин. Из вышесказанного ясно, что причиной того, что эффект повышения устойчивости к стерилизации, обусловленный присутствием эфирного производного целлюлозы, не наблюдался в композиции №1, в то время как этот эффект наблюдался и был заметно выражен в композициях №№3-6 в примере 7, можно считать тот факт, что именно сочетание фенилаланина и гистидина с эфирным производным целлюлозы в композициях №№3-6 обеспечивает заметный эффект устойчивости к стерилизации для белка.

Эффект от использования изобретения

Белковая композиция настоящего изобретения показывает устойчивость к стерилизации облучением. Стерильная композиция настоящего изобретения сохраняет (удерживает) структуру и функцию белка, хотя и является стерилизованной.

Промышленная применимость

Белковая композиция настоящего изобретения применяется в производстве медицинских изделий, которые требуют функциональности и стерильности белка.

(57) Формула изобретения

1. Композиция фибриногена для гемостатического применения, содержащая смесь глицина, фенилаланина и гистидина и эфирного производного целлюлозы в качестве добавки, в которой эфирное производное целлюлозы выбрано из группы, состоящей из гидроксипропилцеллюлозы, метилцеллюлозы, гидроксиэтилцеллюлозы, гидроксипропилметилцеллюлозы, карбоксиметилцеллюлозы натрия и их смесей, и фибриноген содержится в количестве не менее от 100 до 950 мас.% от эфирного производного целлюлозы.

2. Композиция по п. 1, в которой добавка состоит из смеси глицина, фенилаланина и гистидина и эфирного производного целлюлозы, и фибриноген содержится в эфирном производном целлюлозы.

3. Композиция по п. 1 или 2, в которой эфирное производное целлюлозы выбрано из группы, состоящей из гидроксипропилцеллюлозы, гидроксиэтилцеллюлозы, гидроксипропилметилцеллюлозы и их смесей.

4. Композиция по п. 1 или 2, в которой эфирным производным целлюлозы является гидроксипропилцеллюлоза.

5. Композиция по п. 1 или 2, которая имеет форму плёнки.

6. Композиция по п. 1 или 2, которая имеет волокнистую форму или форму нетканого материала.

7. Композиция по п. 1 или 2, которая стерилизуется облучением.

10

15

20

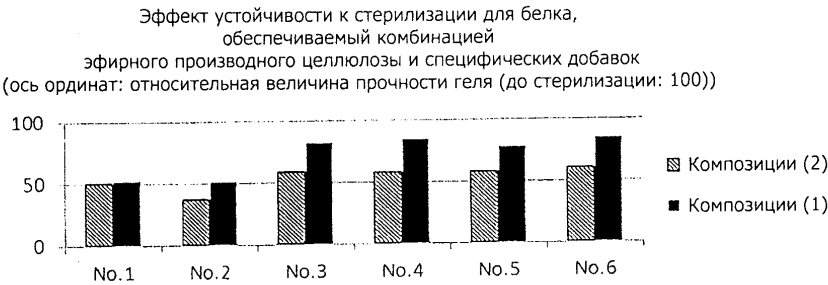
25

30

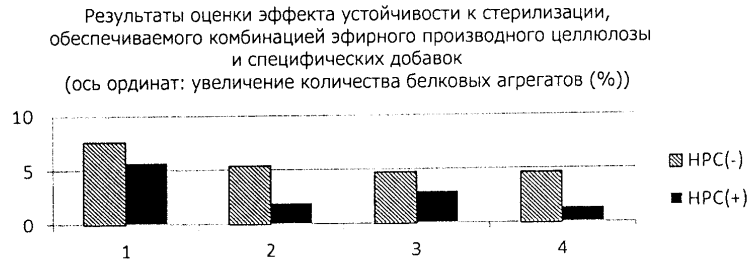
35

40

45



Фиг. 1



Фиг. 2