



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104271145 B

(45)授权公告日 2017.01.18

(21)申请号 201380025293.2

(22)申请日 2013.05.13

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104271145 A

(43)申请公布日 2015.01.07

(30)优先权数据

2012-110395 2012.05.14 JP

2012-110764 2012.05.14 JP

2013-040594 2013.03.01 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.11.14

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2013/063867 2013.05.13

(87)PCT国际申请的公布数据
W02013/172467 JA 2013.11.21

(73)专利权人 帝人株式会社
地址 日本大阪府大阪市
专利权人 帝人制药株式会社
一般财团法人化学及血清疗法研
究所

(72)发明人 景山由佳子 藤永贤太郎

山口鲇子 秋山佑介 加藤宗一郎

木村由妃子 本多勸 佐竹真

兼子博章 A.石割 平岛正树

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公
司 72001

代理人 张桂霞 石克虎

(51)Int.Cl.

A61K 38/00(2006.01)

A61K 9/70(2006.01)

A61K 38/48(2006.01)

A61K 47/38(2006.01)

A61L 15/44(2006.01)

A61P 7/04(2006.01)

(56)对比文件

W0 9956798 A1,1999.11.11,

W0 2004045634 A1,2004.06.03,

US 5756481 A,1998.05.26,

US 5730933 A,1998.03.24,

审查员 江涵

权利要求书1页 说明书13页 附图1页

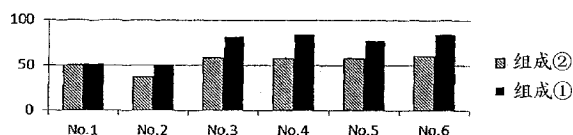
(54)发明名称

放射线灭菌耐性的蛋白组合物

(57)摘要

具有放射线灭菌耐性的蛋白组合物,该组合
物含有由甘氨酸、苯丙氨酸和组氨酸构成的混合
物和/或纤维素醚衍生物作为添加剂。

纤维素醚衍生物与特定添加剂的组合的蛋白灭菌耐性效果
(纵轴:凝胶强度相对值(灭菌前:100))



1. 蛋白组合物, 该蛋白组合物含有选自羟丙基纤维素、甲基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、以及它们的混合物的纤维素醚衍生物, 而且蛋白的至少一部分进入纤维素醚衍生物的内部、水分为10重量%以下。

2. 权利要求1所述的蛋白组合物, 其中, 进一步含有由甘氨酸、苯丙氨酸和组氨酸构成的混合物作为添加剂。

3. 权利要求1或2所述的蛋白组合物, 其中, 纤维素醚衍生物选自羟丙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、以及它们的混合物。

4. 权利要求1或2所述的蛋白组合物, 其中, 纤维素醚衍生物为羟丙基纤维素。

5. 权利要求1或2所述的蛋白组合物, 其中, 蛋白选自酶、转运蛋白、肌肉蛋白、防御蛋白、毒蛋白、蛋白质激素、贮存蛋白、结构蛋白、生长因子、以及它们的混合物。

6. 权利要求1或2所述的蛋白组合物, 其中, 蛋白为纤维蛋白原。

7. 权利要求1或2所述的蛋白组合物, 该蛋白组合物为薄膜形状。

8. 权利要求1或2所述的蛋白组合物, 该蛋白组合物为纤维形状。

9. 权利要求1或2所述的蛋白组合物, 该蛋白组合物进行了放射线灭菌。

放射线灭菌耐性的蛋白组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及包含特定的氨基酸组和/或纤维素醚衍生物的、具有放射线灭菌耐性的蛋白组合物。

背景技术

[0002] 近年来,作为药物,天然和合成蛋白的重要性在增大。另外,用于医疗用途时,产品必须要灭菌。作为灭菌方法,已知有利用高压灭菌器的加热灭菌、利用 γ 射线或电子射线进行的电离放射线灭菌、利用环氧乙烷气体的气体灭菌、利用过氧化氢进行的等离子体灭菌、使用戊二醛制剂的化学灭菌剂和使用滤器的分离灭菌等。然而,生理活性蛋白等蛋白通过热或放射线的灭菌而活性降低。环氧乙烷灭菌不仅有可能通过化学反应产生副产物,而且毒性强,残留气体有可能对人体等带来不良影响。利用化学灭菌剂进行的灭菌存在着以下问题:需要考虑蛋白对灭菌剂的耐性、pH的变化、离子强度的变化或温度的变化。因此,在制备含有、固定有蛋白的药品、医疗用品时,整个制造过程必须在无菌状态下进行制造,需要莫大的制造成本,这是现状。

[0003] 另外,虽然包含蛋白的溶液是通过滤器进行分离灭菌,但这难以适用于包含大颗粒的组合物、或者固体或半固体组合物。

[0004] EP0437095号中公开了:利用 γ 射线照射可以将与肝素或肝素片段复合的中和氧化纤维素产物(nORC)灭菌。但是,在该文献中没有显示将结合有蛋白的ORC或nORC灭菌。

[0005] EP0562864号中公开了:包含胶原蛋白海绵基质、第二的生物体吸收性聚合物(例如氧化再生纤维素(ORC)的分散纤维)和活性剂(例如肽)的复合疗伤(伤手当)物质。其中记载着:活性剂可以包含基质或生物体吸收性聚合物、或其两者,可以将该复合海绵物质包装后进行灭菌。

[0006] US5730933号中公开了一种方法:利用 γ 射线或电子束照射将生物学活性肽灭菌,而不丧失其生物学活性。该方法是包括下述步骤的技术:形成包含生物学活性肽和明胶等外来蛋白的混合物,将该混合物冷冻或冷冻干燥,接下来对该混合物进行照射,其中记载着:外来蛋白的存在使肽稳定化,以防止肽的活性降低。

[0007] 国际公开W02000/033893号中记载着治疗肽与多糖的复合体,所述多糖选自氧化再生纤维素、中和氧化再生纤维素、以及它们的混合物。而且,还记载着:在利用电离放射线进行灭菌之前,通过将肽和有效量的多糖一起制成制剂,即使利用电离放射线进行灭菌,肽治疗剂的生物学活性也不会消失,实现了稳定化。

[0008] 但是,这些文献并没有暗示:通过与纤维素醚衍生物或特定的氨基酸组共存,可以抑制利用电离放射线进行灭菌时的蛋白的失活。

[0009] 另一方面,日本特开2011-47089号公报中记载着:含有酶活性优异的酶的纳米纤维的制造方法。该方法是将含有酶和溶解于非水溶剂中的聚合物的纺丝液通过静电纺丝法进行纺丝,以形成酶前驱纳米纤维,之后赋予水并进行干燥。但是,该文献中没有关于将含酶纳米纤维灭菌的记述。

发明内容

[0010] 本发明的目的在于：提供对放射线灭菌具有耐性的蛋白组合物。

[0011] 本发明人为了解决上述课题进行了深入研究的结果，令人惊奇的是，发现通过使由甘氨酸、苯丙氨酸和组氨酸构成的混合物和/或纤维素醚衍生物共存，蛋白对放射线灭菌的耐性提高，完成了本发明。

[0012] 即，本发明涉及一种蛋白组合物，该蛋白组合物含有由甘氨酸、苯丙氨酸和组氨酸构成的混合物和/或纤维素醚衍生物作为添加剂。

附图说明

[0013] 图1显示本发明的纤维素醚衍生物与特定添加剂的组蛋白的灭菌耐性效果(纵轴：凝胶强度相对值(灭菌前：100))。

[0014] 图2显示本发明的纤维素醚衍生物与特定添加剂的组蛋白的灭菌耐性效果(纵轴：蛋白聚集体增加量(%))。

具体实施方式

[0015] 本发明涉及蛋白组合物，该蛋白组合物包含由甘氨酸、苯丙氨酸和组氨酸构成的混合物和/或纤维素醚衍生物作为添加剂。

[0016] 对本发明中使用的蛋白没有特别限定，例如可以列举：纤维蛋白原或凝血酶所代表的止血性蛋白；天冬酰胺酶、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶、脂肪酶所代表的酶；血红蛋白、血清白蛋白、低密度脂蛋白所代表的转运蛋白；肌动蛋白、肌球蛋白所代表的肌肉蛋白；抗体、补体所代表的防御蛋白；白喉毒素、肉毒杆菌毒素、蛇毒所代表的毒蛋白；胰岛素、增殖因子、细胞因子所代表的蛋白质激素；卵白蛋白、铁蛋白所代表的贮存蛋白；胶原蛋白、角蛋白所代表的结构蛋白；上皮生长因子(Epidermal growth factor:EGF)、胰岛素样生长因子(Insulin-like growth factor:IGF)、转化生长因子(Transforming growth factor:TGF)、神经生长因子(Nerve growth factor:NGF)、脑源性神经营养因子(Brain-derived neurotrophic factor:BDNF)、血管内皮细胞增殖因子(Vesicular endothelial growth factor:VEGF)、粒细胞集落刺激因子(Granulocyte-colony stimulating factor:G-CSF)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor:GM-CSF)、血小板源性生长因子(Platelet-derived growth factor:PDGF)、促红细胞生成素(Erythropoietin:EPO)、促血小板生成素(Thrombopoietin:TPO)、碱性成纤维细胞增殖因子(basic fibroblast growth factor:bFGF或FGF2)、肝细胞增殖因子(Hepatocyte growth factor:HGF)所代表的生长因子。其中，优选的是止血性蛋白、酶、转运蛋白、肌肉蛋白、防御蛋白、毒蛋白、蛋白质激素、贮存蛋白、结构蛋白和生长因子，特别优选纤维蛋白原。

[0017] 即使本发明中使用的蛋白是来源于动物的蛋白，也可以利用基因重组技术来制造。当来源于动物时，优选来源于人。另外，利用基因重组技术制作的蛋白，只要其本质上的生物活性相同，则可以是将氨基酸序列取代成其他氨基酸序列的改变体。另外，还可以使用这些蛋白的修饰物、以及它们的混合物。

[0018] 另外，本发明中使用的蛋白，除了该成分以外，还可以添加药学上可接受的稳定剂

或添加剂(以下,将其表述为“稳定剂等”,在本发明中,将其与为了赋予放射线灭菌耐性而与蛋白共存的添加剂区别开来。)。作为这样的稳定剂等例子,可以列举精氨酸、异亮氨酸、谷氨酸、枸橼酸类、氯化钙、氯化钠、蛋白酶抑制剂(例如抑肽酶)、白蛋白、表面活性剂、磷脂、聚乙二醇、透明质酸钠、甘油、海藻糖和糖醇(例如甘油、甘露醇)等,其中优选的是选自精氨酸、氯化钠、海藻糖、甘露醇和枸橼酸类的一种以上,特别优选枸橼酸类。

[0019] 在本发明所使用的蛋白与稳定剂等混合物中,相对于100重量份的该混合物,含有35重量份以下、优选30重量份以下的蛋白。

[0020] 当本发明中使用的添加剂是由甘氨酸、苯丙氨酸和组氨酸构成的混合物时,相对于添加剂和蛋白的总计100重量份,甘氨酸的含量通常为5重量份以上且90重量份以下、优选15重量份以上且60重量份以下、进一步优选20重量份以上且40重量份以下,苯丙氨酸的含量通常为1重量份以上且80重量份以下、优选2重量份以上且40重量份以下、进一步优选4重量份以上且20重量份以下,组氨酸的含量通常为2重量份以上且70重量份以下、优选5重量份以上且40重量份以下、进一步优选8重量份以上且20重量份以下。

[0021] 当本发明中的添加剂为纤维素醚衍生物时,本发明中使用的蛋白或蛋白与稳定剂等混合物可以担载在纤维素醚衍生物上,但优选以含有在纤维素醚衍生物中(这里,含有是指至少一部分蛋白进入纤维素醚衍生物内部的状态)的状态存在。这种情况下,蛋白或稳定剂等分子可以分散在纤维素醚衍生物中而存在,但优选蛋白分子或稳定剂等分子以各自的聚集物又进一步聚集的颗粒(以下,有时将其与稳定剂等混合颗粒一并记作“蛋白颗粒”。)的形式分散、存在。

[0022] 不仅是在添加剂为纤维素醚衍生物的情况下,在添加剂为由甘氨酸、苯丙氨酸和组氨酸构成的混合物和纤维素醚衍生物的情况下,这种蛋白或蛋白颗粒在纤维素醚衍生物中的适当的存在形式也相同。

[0023] 作为本发明中使用的纤维素醚衍生物的具体例子,可以例示羟丙基纤维素、甲基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、以及它们的混合物。

[0024] 其中,优选选自羟丙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、以及它们的混合物,最优选为羟丙基纤维素。

[0025] 另外,对本发明中使用的纤维素醚衍生物的分子量没有特别限定,例如在浓度2%、20℃下进行粘度测定时,选择显示出1~10000mPa·s、优选2~5000mPa·s、更优选2~4000mPa·s的粘度的分子量。

[0026] 在本发明的蛋白组合物中,在不损及其目的范围内,可以结合使用其他的聚合物或其他的化合物。

[0027] 本发明中使用的纤维素醚衍生物优选为高纯度,尤其是优选纤维素醚衍生物中所含的添加剂或增塑剂、残留催化剂、残留单体、成型加工或后加工中使用的残留溶剂等的残留物少。特别是,在用于医疗的情况下,需要控制在不足安全性的基准值。

[0028] 本发明的蛋白组合物的形状包括不定形的形状,没有特别限定,例如可以列举:薄膜、纤维、薄片、板状体、管状体、线状体、棒状体、缓冲材料、发泡体、多孔质体等。制造成型品时的成型方法只要是蛋白活性不降低的方法,则没有特别限定,例如可以采用挤出成型、射出成型、压延成型、压缩成型、吹塑成型、真空成型、粉末成型、流延成型、浇注等适当的成型方法。其中,本发明的蛋白组合物适合薄膜和纤维形状。这里,纤维形状是指,将得到的一

根或多根纤维通过层合、纺织、编织或其他方法形成的三维成型体。作为具体的纤维的形态,例如可以列举无纺布。而且,纤维形状还包含以纤维为基础加工而成的管、网等。

[0029] 制造这些形状时,可以采用以往在薄膜或塑料纤维的制造中采用的所有方法,例如可以列举流延法(浇铸法)、静电纺丝法、吹塑挤出成型法、T型挤出成型法等挤出成型法、压延法等。上述成型可以通过溶液成型来进行,或者可以通过熔融成型来进行,但为了防止蛋白的功能下降、且容易分散蛋白或蛋白颗粒,优选溶液成型。

[0030] 在本发明中,以流延法为例,来说明具有薄膜形状的蛋白组合物的制备方法。使用乳钵等将蛋白的冷冻干燥粉末粉碎,制作具有适合在溶剂中分散的平均粒径(通常为 $0.1\sim 200\ \mu\text{m}$ 、优选 $1\sim 100\ \mu\text{m}$)的蛋白颗粒。将其分散在一种或多种适当的溶剂(2-丙醇或乙醇等)中,所述溶剂能够溶解纤维素醚衍生物,并且与蛋白颗粒形成悬浮液,在薄膜制作阶段蒸发而能够形成薄膜。之后,溶解纤维素醚衍生物、以及根据需要溶解聚乙二醇等增塑剂,调制蛋白颗粒分散在纤维素醚衍生物溶液中的掺杂(dope)溶液。使用得到的掺杂溶液,利用流延法制作薄膜。

[0031] 本发明中,在具有薄膜形状的蛋白组合物中,根据蛋白或纤维素醚衍生物的种类,相对于纤维素醚衍生物,通常含有100重量%以上、优选500重量%以上、更优选800~950重量%的蛋白或蛋白颗粒。若少于上述的值,则有时无法充分发挥蛋白的功能,若多于上述的值,则有时薄膜的成型性不好。

[0032] 在本发明中,虽然具有薄膜形状的蛋白组合物的薄膜的平均厚度(厚度)还取决于用途,但优选为 $10\sim 1000\ \mu\text{m}$ 。

[0033] 在本发明中,具有纤维形状的蛋白组合物,其平均纤维径例如为 $0.01\sim 50\ \mu\text{m}$,但本领域技术人员根据使用目的可以适当确定。另外,可以是由长纤维构成的蛋白组合物。具体而言,在由纺丝直至加工成纤维成型体的步骤中,长纤维是指没有加入切断纤维的步骤而形成的纤维,其可以通过静电纺丝法、纺粘法、熔喷法等来形成,但从可以不加热地进行成型、且可以抑制蛋白的功能下降的角度考虑,优选采用静电纺丝法。

[0034] 静电纺丝法是指,通过对溶解有聚合物的溶液施加高电压,而在电极上得到纤维成型体的方法。作为其步骤,可以包含如下的步骤:制备溶解有聚合物的纺丝液的步骤、对该溶液施加高电压的步骤、喷出该溶液的步骤、从喷出的溶液中蒸发溶剂以形成纤维成型体的步骤、能够任意实施的使所形成的纤维成型体的电荷消失的步骤、以及通过电荷消失来积累纤维成型体的步骤。

[0035] 以下,在本发明中,以静电纺丝法为例,对具有纤维形状或无纺布形状的蛋白组合物的制备方法进行说明。

[0036] 对静电纺丝法中的、制备纺丝液的阶段进行说明。本发明中的纺丝液优选使用由纤维素醚衍生物溶液和蛋白颗粒构成的悬浮液。

[0037] 该悬浮液中的纤维素醚衍生物的浓度优选为1~30重量%。纤维素醚衍生物的浓度若低于1重量%,则难以形成纤维成型体,不优选。而若高于30重量%,则所得纤维成型体的纤维径变大,而且悬浮液的粘度变高,不优选。更优选的悬浮液中的纤维素醚衍生物的浓度为1.5~20重量%。

[0038] 纤维素醚衍生物的溶剂只要是能够溶解纤维素醚衍生物、并且与蛋白颗粒形成悬浮液、在纺丝阶段蒸发并能够形成纤维的溶剂,则没有特别限定,可以单独使用一种,也可

以组合多种溶剂。例如可以列举：氯仿、2-丙醇、甲苯、苯、苯醇、二氯甲烷、四氯化碳、环己烷、环己酮、三氯乙烷、丁酮、乙酸乙酯、丙酮、乙醇、甲醇、四氢呋喃、1,4-二氧杂环己烷、1-丙醇、苯酚、吡啶、乙酸、甲酸、六氟-2-丙醇、六氟丙酮、N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、乙腈、N-甲基-2-吡咯烷酮、N-甲基吗啉-N-氧化物、1,3-二氧杂环戊烷、水、以及这些溶剂的混合溶剂。其中，从操作性或物理性质等方面考虑，优选使用2-丙醇、乙醇。

[0039] 对混合纤维素醚衍生物溶液和蛋白颗粒来制备悬浮液的方法没有特别限定，可以采用超声波或各种搅拌方法。作为搅拌方法，还可以采用均质器这样的高速搅拌或磨碎机、球磨机等搅拌方法。其中，优选通过超声波处理进行的分散方法。

[0040] 另外，在用溶剂和蛋白颗粒形成悬浮液后，可以添加纤维素醚衍生物来调制纺丝液。

[0041] 另外，在调制悬浮液之前，可以对蛋白颗粒进行微细处理。作为微细处理，有干式粉碎和湿式粉碎，在本发明中，可以采用任一种方式，也可以将两种方式组合。

[0042] 作为干式粉碎处理，可以列举：使用球磨机的处理、使用行星式轧机或振动磨的处理、使用乳钵并通过乳棒进行研碎的处理、使用介质搅拌型粉碎机、喷射磨、石磨进行磨碎的处理等。

[0043] 另一方面，作为湿式粉碎处理，可以列举：在使蛋白颗粒分散在适当的分散介质中的状态下，利用高剪切力的搅拌装置、混炼装置等进行搅拌的处理；或者，分散于介质中的状态的球磨机、玻璃研磨机处理等。

[0044] 而且，还可以使用利用喷雾干燥器制作的蛋白颗粒。

[0045] 本发明中，在具有纤维形状或无纺布形状的蛋白组合物中，对蛋白颗粒的大小没有特别限定，优选处于 $0.01\sim 100\ \mu\text{m}$ 的范围。制作小于 $0.01\ \mu\text{m}$ 的蛋白粉末在技术上较为困难，若大于 $100\ \mu\text{m}$ ，则分散性差，纤维成型体变得脆弱，不优选。

[0046] 本发明的蛋白组合物中使用的灭菌方法为放射线灭菌。作为放射线，可以列举 α 射线、 β 射线、 γ 射线、中子射线、电子射线和X射线。其中，优选 γ 射线或电子射线，最优选的是电子射线。对这些灭菌方法没有特别限定，放射线的照射量为 $10\sim 80\text{kGy}$ 、优选为 $20\sim 30\text{kGy}$ 。对温度条件没有特别限定，温度为 $-80\sim 40^\circ\text{C}$ 、优选为 $-80\sim 30^\circ\text{C}$ 。

[0047] 对物质照射 α 射线、正电子射线、 γ 射线、中子射线、电子射线、X射线等放射线时，会从构成物质的分子、原子中除去电子。此时分子键被切断，产生反应性高的自由基等，其与周边物质发生二次化学反应。

[0048] 已熟知蛋白通过放射线照射容易失去功能(活性)。认为这是由于：通过照射导致分子键断裂，作为功能体现的根源的“高级结构”被破坏。但是，本发明的蛋白组合物即使进行放射线照射，其功能的降低也会得到抑制。这意味着本发明组合物中的蛋白的高级结构得以保持，这在普通蛋白中(蛋白質一般において)是共通的效果。从透过的纤维素醚衍生物的厚度来考虑，认为该效果并不是由屏蔽产生的，抑制机理尚不确定。另外，该纤维素醚衍生物的效果通过添加特定的氨基酸组而显著提高，这种现象的机理也不明确。

[0049] 本发明的蛋白组合物可以进一步包含电子·离子捕捉剂、能量转移剂、自由基捕捉剂、抗氧化剂、增塑剂。作为电子·离子捕捉剂，可以列举N,N'-四甲基苯二胺、二苯二胺、苊、醌等。作为能量转移剂，可以列举苊等。作为自由基捕捉剂，可以列举硫醇、八氢化菲、单烷基二苯基醚、生育酚、枸橼酸、丁基化羟基アンソール、丁基化羟基甲苯、叔丁基氢醌、没

食子酸丙酯、抗坏血酸衍生物等。作为抗氧化剂,可以列举BHT、亚磷酸三酯、酚系抗老化剂、有机硫代酸盐类等。其中,优选通常认为在食品或药品中使用安全的添加剂。对添加剂的量没有特别限定,例如,相对于蛋白组合物中的纤维素醚衍生物,可以包含0.01~10重量%的添加剂。

[0050] 另外,灭菌步骤中的含有蛋白的纤维素醚衍生物优选不含水分。水分率优选10重量%以下,更优选4重量%以下,进一步优选实质上无水。

[0051] 另外,本发明的蛋白组合物可以包装在包装材料中进行放射线灭菌。作为所涉及的包装材料,优选使用象铝这样的阻气性高的材料。另外,可以和脱氧剂或干燥剂一起密封包装,也可以在脱气后填充了惰性气体的状态下进行包装,还可以两者都进行。所涉及的脱氧剂和干燥剂优选对人体无害、在放射线灭菌时不会失活的物质。

[0052] 本发明的蛋白组合物,例如可以用作要求蛋白的功能和灭菌性的医疗用材料。

[0053] 另外,本发明还包含:对本发明的蛋白组合物进行放射线灭菌而形成的灭菌蛋白组合物。

实施例

[0054] 以下,通过实施例来说明本发明的实施方式,但这些实施例并不限制本发明的范围。

[0055] 关于实施例1~4和比较例1~2的测定方法

[0056] 1. 平均纤维径:

[0057] 使用扫描型电子显微镜(キーエンス株式会社:商品名“VE8800”),在3000倍的倍率下拍摄所得的纤维成型体的表面,从得到的照片中随机选出20处测定纤维径,求出所有纤维径的平均值,作为平均纤维径。 $n=20$ 。

[0058] 2. 平均厚度:

[0059] 对于剪成50mm×100mm大小的纤维成型体,使用高精度数字测长仪(株式会社ミツトヨ:商品名“ライトマチックVL-50”),以0.01N的测长力、 $n=15$ 测定纤维成型体的膜厚,算出平均值。需要说明的是,在该测定中,以测定仪器所能使用的最小测定力进行测定。

[0060] 3. ELISA测定

[0061] (1) 纤维蛋白原

[0062] 将抗人纤维蛋白原抗体(DAKO A0080)以10 μ g/mL固定在ELISA板(NUNC 468667)上。用含有0.05% Tween20的PBS清洗后,在各孔中添加Block Ace(DSファーマバイオメディカルUK-B80),进行屏蔽。用含有0.05% Tween20的PBS清洗后,添加样本。使用人纤维蛋白原(Enzyme Research Laboratories No.FIB3)作为标准品,制作标准曲线。用含有0.05% Tween20的PBS清洗后,添加HRP标记抗人纤维蛋白原抗体(CPL5523),反应后用含有0.05% Tween20的PBS清洗,添加TMB试剂(KPL 50-76-02 50-65-02),静置6分钟,使其显色。加入1M的 H_3PO_4 ,停止显色,用酶标仪测定OD450-650nm。

[0063] (2) 凝血酶

[0064] 将抗人凝血酶抗体(Affinity Biological公司、No.SAHT-AP)以5 μ g/mL固定在ELISA板(NUNC 468667)上。用含有0.05% Tween20的PBS清洗后,在各孔中添加Block Ace(DSファーマバイオメディカル UK-B80),进行屏蔽。用含有0.05% Tween20的PBS清洗后,添

加样本。使用人凝血酶(ヘマトロジックテクノロジー公司:HCT-0020)作为标准品,制作标准曲线。用含有0.05% Tween20的PBS清洗后,以 $0.1 \mu\text{g/mL}$ 添加HRP标记抗人凝血酶抗体(Affinity Biological公司、No.SAHT-HRP)。反应后,用含有0.05% Tween20的PBS清洗,添加TMB试剂(DaKo S1599),静置10分钟,使其显色。加入0.5M的 H_2SO_4 ,停止显色,用酶标仪测定OD450-650nm。

[0065] 4. 凝血酶活性测定

[0066] 向BD公司制造的聚苯乙烯管中加入 $20 \mu\text{L}$ 样品和 $80 \mu\text{L}$ 活性测定用稀释溶液(0.01% F-68、50mmol/L NaCl、50mmol/L Tris-HCl、pH8.4),在 37°C 下培养3分钟。作为标准品,使用用相同缓冲液稀释重组凝血酶(JPU凝血酶标准品400U/mL或WHO/US凝血酶标准品、110IU/mL:本公司调制品)而得到的稀释品,当为JPU时稀释至4、2、1、0.5、0.25U/mL,当为IU时稀释至6、3、1.5、0.75、0.375IU/mL。向该反应液中添加 $100 \mu\text{L}$ 测试组(テストチーム)显色底物S-2238(1mM:第一化学药品工业),搅拌混合,在 37°C 下反应7分钟后,加入 $800 \mu\text{L}$ 0.1M的枸橼酸溶液,停止反应。将 $200 \mu\text{L}$ 反应液转移到96孔板中,测定OD405/650。

[0067] 实施例1

[0068] 将纤维蛋白原冷冻干燥粉末(ボルヒール(注册商标、下同)组织粘接用:小瓶(管形瓶)1)分散在2-丙醇中,之后溶解羟丙基纤维素(6-10mPa $\cdot$ s,和光纯药制造)使其达到16wt%,调制含纤维蛋白原的颗粒/羟丙基纤维素=20(以纤维蛋白原计为9.2)/100(w/w)的纺丝液。在温度 22°C 、湿度26%以下,利用静电纺丝法进行纺丝,得到薄片状的纤维成型体。喷嘴内径为0.8mm,电压为11kV,纺丝液流量为1.2mL/小时,喷嘴到平板的距离为15cm。得到的纤维成型体的平均纤维径为 $0.86 \mu\text{m}$,平均厚度为 $137 \mu\text{m}$ 。得到的薄片以20kGy进行电子射线灭菌。将已灭菌的薄片剪成 $0.5\text{cm} \times 0.5\text{cm}$,用 $62.5 \mu\text{L}$ 生理盐水提取蛋白,实施ELISA测定。结果,固定化蛋白量为 $0.15\text{mg}/\text{cm}^2$ 。另一方面,对于没有进行灭菌处理的薄片,也同样实施ELISA测定,结果,固定化蛋白量为 $0.16\text{mg}/\text{cm}^2$ 。由以上的结果可知:灭菌薄片相对于未灭菌薄片的蛋白回收率为94%。

[0069] 实施例2

[0070] 将纤维蛋白原冷冻干燥粉末(ボルヒール组织粘接用:小瓶1)分散在2-丙醇中,之后溶解羟丙基纤维素(6-10mPa $\cdot$ s,和光纯药制造)使其达到16wt%,调制纤维蛋白原冷冻干燥粉末/羟丙基纤维素=40(以纤维蛋白原计为18)/100(w/w)的纺丝液。在温度 22°C 、湿度26%以下,利用静电纺丝法进行纺丝,得到薄片状的纤维成型体。喷嘴内径为0.8mm,电压为12.5kV,纺丝液流量为1.2mL/小时,喷嘴到平板的距离为15cm。得到的纤维成型体的平均纤维径为 $0.43 \mu\text{m}$,平均厚度为 $152 \mu\text{m}$ 。得到的薄片以20kGy进行电子射线灭菌。将已灭菌的薄片剪成 $0.5\text{cm} \times 0.5\text{cm}$,用 $62.5 \mu\text{L}$ 生理盐水提取蛋白,实施ELISA测定。结果,固定化蛋白量为 $0.27\text{mg}/\text{cm}^2$ 。另一方面,对于没有进行灭菌处理的薄片,也同样实施ELISA测定,结果,固定化蛋白量为 $0.30\text{mg}/\text{cm}^2$ 。由以上的结果可知:灭菌薄片相对于未灭菌薄片的蛋白回收率为90%。

[0071] 实施例3

[0072] 将纤维蛋白原冷冻干燥粉末(ボルヒール组织粘接用:小瓶1)分散在2-丙醇中,之后溶解羟丙基纤维素(6-10mPa $\cdot$ s,和光纯药制造)使其达到16wt%,调制纤维蛋白原冷冻干燥粉末/羟丙基纤维素=100(以纤维蛋白原计为46)/100(w/w)的纺丝液。在温度 22°C 、湿度

26%以下,利用静电纺丝法进行纺丝,得到薄片状的纤维成型体。喷嘴内径为0.8mm,电压为12.5kV,纺丝液流量为1.2mL/小时,喷嘴到平板的距离为15cm。得到的纤维成型体的平均纤维径为0.35 μm ,平均厚度为191 μm 。得到的薄片以20kGy进行电子射线灭菌。将已灭菌的薄片剪成0.5cm $\times$ 0.5cm,用62.5 μL 生理盐水提取蛋白,实施ELISA测定。结果,固定化蛋白量为0.78mg/cm²。另一方面,对于没有进行灭菌处理的薄片,也同样实施ELISA测定,结果,固定化蛋白量为0.76mg/cm²。由以上的结果可知:灭菌薄片相对于未灭菌薄片的蛋白回收率为102%。

[0073] 比较例1

[0074] 将纤维蛋白原冷冻干燥粉末(ボルヒール组织粘接用:小瓶1)以20kGy进行电子射线灭菌。用1mL的生理盐水提取蛋白,实施ELISA测定。结果,ELISA测定值为31 $\mu\text{g/mL}$ 。另一方面,对于没有进行灭菌处理的纤维蛋白原冷冻干燥粉末(ボルヒール),也同样实施ELISA测定,结果,ELISA测定值为90 $\mu\text{g/mL}$ 。由以上的结果可知:灭菌薄片相对于未灭菌薄片的蛋白回收率为34%。

[0075] 实施例4

[0076] 将含凝血酶的颗粒(含有重组凝血酶1mg/mL、氯化钠、枸橼酸钠、氯化钙和甘露醇的pH7水溶液的冷冻干燥品)分散在2-丙醇中,之后溶解羟丙基纤维素(2.0-2.9mPa $\cdot$ s,日本曹达制)使其达到13重量%,调制含凝血酶的颗粒/羟丙基纤维素=100/100(w/w)的掺杂溶液。利用静电纺丝法进行纺丝,得到薄片状的纤维成型体。得到的纤维成型体的厚度为204 μm ,单位面积重量为2.08mg/cm²,堆积密度为101mg/cm³。将所得薄片剪成直径为1cm,用200 μL 生理盐水提取蛋白,实施活性测定。其结果,活性测定值为110.3U/cm²。对得到的薄片照射30kGy的电子射线,灭菌后测定凝血酶活性。以灭菌前的凝血酶活性为100%时,刚刚照射电子射线后的凝血酶活性为68.4%的保持率。

[0077] 比较例2

[0078] 对含凝血酶的颗粒(含有重组凝血酶1mg/mL、氯化钠、枸橼酸钠、氯化钙和甘露醇的pH7水溶液的冷冻干燥品)照射30kGy的电子射线,灭菌后测定凝血酶活性。照射前的凝血酶活性为404.73U/小瓶。以灭菌前的凝血酶活性为100%时,刚刚照射电子射线后的凝血酶活性为51.8%的保持率。关于实施例5~6和比较例3~4的测定方法

[0079] 1. 平均厚度:

[0080] 使用高精度数字测长仪(株式会社ミツトヨ:商品名“ライトマチックVL-50”),以0.01N的测长力、n=9测定剪成适当大小的组合物的纤维成型体的膜厚,算出平均值。需要说明的是,在该测定中,以测定仪器所能使用的最小测定力进行测定。

[0081] 2. 酶活性测定

[0082] 在脂肪酶的活性测定中,使用Continuous Fluorometric脂肪酶试验试剂盒(PROGEN BIOTECHNIK GMBH制造)。通过下式算出活性保持率。由活性值进行浓度换算,算出活性酶量。

[0083] 活性保持率(%)={灭菌后的活性酶量(mg/cm²)/灭菌前的活性酶量(mg/cm²)} $\times$ 100

[0084] 另一方面,在 β -葡萄糖苷酶的活性测定中,通过使用Tokyogreen(注册商标、下同。)- β Glu(积水メディカル株式会社)的荧光测定来进行。通过下式算出活性回收率。由投入的酶粉末重量%和组合物的重量算出固定化酶的理论重量。

[0085] 活性回收率(%)={活性酶量(mg)/(固定化酶理论重量(mg))}×100

[0086] 通过下式算出活性保持率。

[0087] 活性保持率(%)={灭菌后的活性回收率(%) / 灭菌前的活性回收率(%) }×100

[0088] 实施例5

[0089] 将脂肪酶粉末(来自猪胰脏、和光纯药制造、下同)分散在2-丙醇中,之后溶解羟丙基纤维素(6-10mPa·s,和光纯药制造)使其达到13wt%,调制脂肪酶粉末/羟丙基纤维素=50/100(w/w)的纺丝液。在温度27℃、湿度27%以下,利用静电纺丝法进行纺丝,得到薄片状的纤维成型体。喷嘴内径为0.8mm,电压为18kV,纺丝液流量为1.2mL/小时,喷嘴到平板的距离为16.5cm。得到的纤维成型体(10cm×14cm)的平均厚度为168 μm。得到的纤维成型体以20kGy进行电子射线灭菌。将已灭菌的纤维成型体剪成1cm×1cm后,用试剂盒中所含的1mL脂肪酶缓冲液提取脂肪酶,实施活性测定。结果,活性酶量为0.46mg/cm²。另一方面,对于没有进行灭菌处理的薄片,也同样实施活性测定,结果,活性酶量为0.40mg/cm²。由以上的结果可知:灭菌纤维成型体相对于未灭菌纤维成型体的活性保持率为115%,通过电子射线灭菌并没有失活。

[0090] 实施例6

[0091] 将脂肪酶粉末分散在2-丙醇中,之后溶解羟丙基纤维素(6-10mPa·s,和光纯药制造)使其达到13wt%,调制脂肪酶粉末/羟丙基纤维素=50/100(w/w)的浇铸液。使用刮片(YOSHIMITSU制造、YBA-3型)以15毫米的涂刷宽度进行浇铸,得到薄片。所得薄片(4cm×6cm)的平均厚度为180 μm。得到的薄片用20hGy的电子射线进行灭菌。将已灭菌的薄片剪成1cm×1cm,之后用试剂盒中所含的1mL脂肪酶缓冲液提取脂肪酶,实施活性测定。结果,活性酶量为0.69mg/cm²。另一方面,对于没有进行灭菌处理的薄片,也同样实施活性测定,结果,活性酶量为0.64mg/cm²。由以上的结果可知:灭菌薄片相对于未灭菌薄片的活性保持率为108%,通过电子射线灭菌并没有失活。

[0092] 实施例7

[0093] 将β-葡萄糖苷酶粉末(来自アーモンド、オリエンタル酵母工业制造、下同)分散在2-丙醇中,之后溶解羟丙基纤维素(6-10mPa·s,和光纯药制造)使其达到13wt%,调制β-葡萄糖苷酶粉末/羟丙基纤维素=38/62(w/w)的纺丝液。在温度27℃、湿度27%以下,利用静电纺丝法进行纺丝,得到薄片状的纤维成型体。喷嘴内径为0.9mm,电压为18kV,纺丝液流量为1.2mL/小时,喷嘴到平板的距离为16.5cm。得到的纤维成型体(10cm×10cm)的平均厚度为207 μm。将得到的纤维成型体剪成2cm×2cm,之后以20kGy进行电子射线灭菌。对于得到的灭菌薄片,用1mL生理盐水提取β-葡萄糖苷酶,通过Tokyogreen-βGlu实施活性测定。结果,活性回收率为42%。另一方面,对于没有进行灭菌处理的薄片,也同样实施活性测定,结果,活性回收率为46%。由以上的结果可知:灭菌纤维成型体相对于未灭菌纤维成型体的活性保持率为91%,通过将其包含在纤维素醚衍生物中,可以抑制酶的失活。

[0094] 比较例3

[0095] 以20kGy对脂肪酶粉末进行电子射线灭菌。在1mg粉末中添加1mL脂肪酶缓冲液,实施活性测定。结果,活性值为0.25pmol/mL·分钟。另一方面,对于没有进行灭菌处理的脂肪酶粉末,也同样实施活性测定,结果,活性值为0.34pmol/mL·分钟。由以上的结果可知:灭菌粉末相对于未灭菌粉末的活性保持率为74%。

[0096] 比较例4

[0097] 以20kGy对 β -葡萄糖苷酶粉末进行电子射线灭菌。将2mg粉末溶解于1mL生理盐水中,通过Tokyogreen- β Glu实施活性测定。其结果,活性保持率为81%。

[0098] 关于实施例8~10的测定方法

[0099] 对纤维蛋白原冷冻干燥粉末(含纤维蛋白原的颗粒)照射电子射线时,纤维蛋白原发生变化(聚集体增加、凝胶强度降低)。为了研究对电子射线照射所引起的纤维蛋白原变化的抑制效果(灭菌耐性效果),调制纤维蛋白原的自体溶液,将1mL填充在5mL的玻璃小瓶中,之后进行冷冻干燥。对冷冻干燥结束后的一部分小瓶照射30kGy的电子射线,比较灭菌前后的各冷冻干燥品。

[0100] 在比较评价中,使用小型台式试验机EZTest(岛津制作所制造)进行凝胶强度测定、以及使用BioSep-SEC-s4000(Phenomenex公司制造)进行聚集体含量测定(分析条件:以50mM的磷酸缓冲液(pH7.0)、0.5M的精氨酸盐酸盐作为流动相,以1.0mL/分钟的流速进行分馏,利用280nm的波长检测目标物质;定量在单体峰之前检测到的峰作为聚集体)。

[0101] 分析时的样本(分析用样本)调制顺序如下:用1mL的蒸馏水溶解未灭菌冷冻干燥品和灭菌过的冷冻干燥品的小瓶。将该溶液以离心管15000rpm $\times$ 5分钟进行离心,溶液通过0.45 μ m的滤器后,作为分析用样本使用。

[0102] 实施例8

[0103] 利用以下的方法研究纤维素醚衍生物与特定添加剂的组成的蛋白灭菌耐性效果。

[0104] (方法)使用“纤维素醚衍生物+特定添加剂”组成(下述表1的No. 1~6所示的组成①)和相当于从其中除去了纤维素醚衍生物的组成的组成②的纤维蛋白原的自体溶液,测定其凝胶强度,由此评价作为纤维蛋白原的功能,通过比较灭菌前后的凝胶强度,研究灭菌耐性效果。结果见表2。

[0105] 将组成①(将冷冻干燥粉末和羟丙基纤维素悬浮于2-丙醇中,之后薄片化)、组成②(冷冻干燥粉末)的各样品均用水溶解使达到1%Fbg浓度,之后用10mM精氨酸、270mM氯化钠、pH8.5的缓冲液稀释使达到2mg/mL的浓度。

[0106] 在2mL的聚丙烯管中加入10 μ L 240单位/mL的Fibrogammin(フィブロガミン)、110 μ L 0.2mg/mL的凝血酶溶液(含有100mM的氯化钙),移液后添加900 μ L 2mg/mL的纤维蛋白原溶液使不混入气泡,在37 $^{\circ}$ C下静置1小时后,使用小型台式试验机EZTest(岛津制作所制造)测定凝胶的强度。

[0107] 表1. 组成①:“纤维素醚衍生物+特定添加剂”组成

[0108]

组成	本体溶液组成
No.1	1%Fbg、10mM 精氨酸、110mM 氯化钠、1.0%甘氨酸、0.1%甘露醇、0.4%羟丙基纤维素
No.2	1%Fbg、10mM 精氨酸、110mM 氯化钠、1.0%甘氨酸、0.2%甘露醇、0.4%羟丙基纤维素
No.3	1%Fbg、10mM 精氨酸、110mM 氯化钠、1.0%甘氨酸、0.25%苯丙氨酸、0.2%海藻糖、0.4%组氨酸、0.1%枸橼酸三钠、0.4%羟丙基纤维素
No.4	1%Fbg、10mM 精氨酸、110mM 氯化钠、1.0%甘氨酸、0.1%甘露醇、0.25%苯丙氨酸、0.2%海藻糖、0.4%组氨酸、0.1%枸橼酸三钠、0.4%羟丙基纤维素
No.5	1%Fbg、10mM 精氨酸、110mM 氯化钠、1.0%甘氨酸、0.1%甘露醇、0.25%苯丙氨酸、0.4%组氨酸、0.1%枸橼酸三钠、0.4%羟丙基纤维素
No.6	1%Fbg、10mM 精氨酸、110mM 氯化钠、1.0%甘氨酸、0.2%甘露醇、0.25%苯丙氨酸、0.4%组氨酸、0.1%枸橼酸三钠、0.4%羟丙基纤维素

[0109] 组成②:特定添加剂组成

[0110] 相对于上述组成①不含纤维素醚衍生物(羟丙基纤维素:HPC)的组成。

[0111] (结果)

[0112] 以灭菌前的凝胶强度值为100时,灭菌后的凝胶强度值见表2和图1。

[0113] 表2. 纤维素醚衍生物与特定添加剂的組合的蛋白灭菌耐性效果

[0114]

组成	组成①(纤维素醚衍生物+特定添加剂)	组成②(特定添加剂)
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

[0115] 在组成No. 1中没有确认到因纤维素醚衍生物的存在而产生的灭菌耐性提高效果,相对于此,在组成No. 2~6中确认到了因纤维素醚衍生物的存在而产生的相同效果,特别是在组成No. 3~6中效果显著。

[0116] 实施例9

[0117] 利用与实施例8相同的方法,根据下述表3的组成(2种)研究了甘氨酸的灭菌耐性效果。结果见表4。

[0118] 表3. 甘氨酸的灭菌耐性效果评价组成

[0119]

组成	纤维蛋白原	精氨酸 (pH8.5)	氯化钠	甘露醇	甘氨酸
G(-)	1.0%	10 mM	110 mM	0.2%	0%
G(+)	1.0%	10 mM	110 mM	0.2%	1.0%

[0120] 表4. 甘氨酸的灭菌耐性效果评价结果

组成	s4000(聚集体)		
	灭菌前 (%)	灭菌后 (%)	增加量 (%)
G(-)	14.0	28.0	14.0
G(+)	14.0	21.6	7.6

[0122] 通过添加甘氨酸,抑制了纤维蛋白原聚集体含量的增加。

[0123] 实施例10

[0124] 利用与实施例8相同的方法,研究了纤维素醚衍生物与特定添加剂的組合的灭菌耐性效果。

[0125] 使用作为纤维素醚衍生物的羟丙基纤维素(HPC)和下述表5的8种组成的纤维蛋白原的本体溶液。在下述8种组成中,1.0%纤维蛋白原、110mM氯化钠、1.0%甘氨酸、0.2%甘露醇是共通的。结果见表6和图2。

[0126] 表5. 纤维素醚衍生物与特定添加剂的組合的灭菌耐性效果

组成	精氨酸 (pH 8, 5)	Tris (pH 8, 5)	组氨酸	苯丙氨酸	枸橼酸钠	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%

[0128] 表6. 纤维素醚衍生物与特定添加剂的組合的灭菌耐性效果评价结果

组成	s4000(聚集体)		
	灭菌前 (%)	灭菌后 (%)	增加量 (%)
1HPC(-)	14.0	21.6	7.6
1HPC(+)	12.8	18.4	5.7
2HPC(-)	13.8	19.2	5.4
2HPC(+)	13.9	15.8	1.9
3HPC(-)	15.1	19.8	4.7
3HPC(+)	14.8	17.8	2.9
4HPC(-)	14.9	19.5	4.6
4HPC(+)	14.2	15.5	1.3

[0130] 通过添加纤维素醚衍生物,蛋白聚集体含量的增加得到了抑制。另外,在苯丙氨酸与组氨酸共存的组成2~4中,因纤维素醚衍生物的存在而产生的同含量的增加抑制效果显著。由此可知:在实施例7中,在组成No. 1中没有确认到因纤维素醚衍生物的存在而产生的灭菌耐性提高效果,相对于此,在组成No. 3~6中确认到了该效果且效果显著,认为这是由于:通过组成No. 3~6的苯丙氨酸和组氨酸与纤维素醚衍生物共存,带来了显著的蛋白灭菌耐性效果。

[0131] 发明效果

[0132] 本发明的蛋白组合物具有放射线灭菌耐性。本发明的灭菌组合物虽然被灭菌，但仍保持蛋白的结构或功能。

[0133] 产业实用性

[0134] 本发明的蛋白组合物在例如要求蛋白的功能和灭菌性的医疗品的制造业中使用。

纤维素醚衍生物与特定添加剂的组合的蛋白灭菌耐性效果
(纵轴: 凝胶强度相对值(灭菌前: 100))

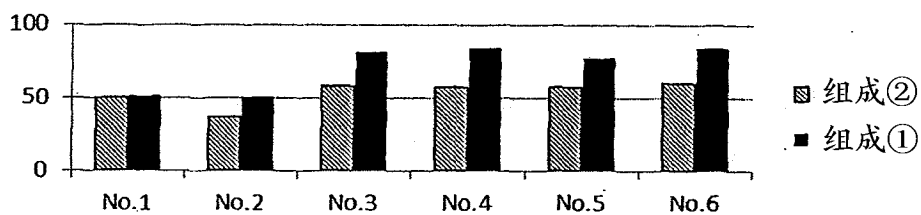


图 1

纤维素醚衍生物与特定添加剂的组合的灭菌耐性效果的评价结果
(纵轴: 蛋白聚集体增加量(%))

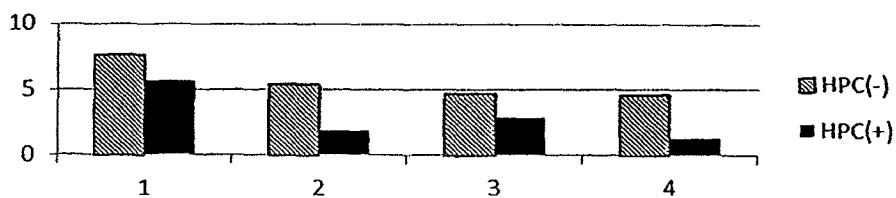


图 2