

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045569**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.12.06

(21) Номер заявки
202090851

(22) Дата подачи заявки
2018.09.27

(51) Int. Cl. **C12N 9/94** (2006.01)
A61K 38/46 (2006.01)
A61K 38/54 (2006.01)
A61L 2/08 (2006.01)

(54) ФЕРМЕНТНЫЙ ПРЕПАРАТ СО СНИЖЕННЫМ УРОВНЕМ ВИРУСНОГО И МИКРОБНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ

(31) 15/717,396

(32) 2017.09.27

(33) US

(43) 2020.08.07

(86) PCT/US2018/053161

(87) WO 2019/067743 2019.04.04

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЭББОТТ ЛЭБОРАТОРИЗ ГМБХ;
ЭББОТТ ГМБХ (DE)**

(56) WO-A1-2017172619
US-A1-2010119654
WO-A1-2007014896
US-A1-2009233344

RAYMOND W NIMS MARK PLAVSIC:
"Efficacy of Electron Beam for Viral
Inactivation", JOURNAL OF MICROBIAL &
BIOCHEMICAL TECHNOLOGY, vol. 07, no. 04,
1 January 2015 (2015-01-01), XP55526318, DOI:
10.4172/1948-5948.1000200 table 1

(72) Изобретатель:
**Бэбкок Мартин, Бернелл Синтия,
Калтод Викрам (US), Брайтенбах
Йорг, Счесны Фритхоф, Руеффер
Фрауке-Регина, Шлиаут Джордж (DE)**

(74) Представитель:
Махлина М.Г. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к ферментному препарату, полученному из облученной пучком электронов ткани животных, такой как поджелудочная железа свиньи. Настоящее изобретение также относится к способам получения таких ферментных препаратов, фармацевтическим композициям, содержащим такие ферментные препараты, и способам применения таких фармацевтических композиций и ферментных препаратов.

B1

045569

045569

B1

Притязание на приоритет

Настоящая заявка испрашивает приоритет по заявке на патент США №15/717396, поданной 27 сентября 2017 года, все содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Заявка '396 является частичным продолжением заявки на патент США №15/470,386, поданной 27 марта 2017 г., в которой испрашивается приоритет по предварительной заявке на патент США №62/314,048, поданной 28 марта 2016 г., предварительной заявке на патент США №62/452,746, поданной 31 января 2017 г., и предварительной заявке на патент США № 62/454,184, поданной 3 февраля 2017 г.

Соглашение о совместных исследованиях

Предмет, раскрытый в этой заявке, был создан компанией AbbVie Inc. или от ее имени и/или Abbott Laboratories, которые являются сторонами соглашения о совместных исследованиях, которое вступило в силу в дату или до даты подачи настоящей заявки, и такой предмет был создан в результате деятельности, осуществляемой в рамках соглашения о совместных исследованиях.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к ферментным препаратам, полученным из тканей животных, фармацевтическим композициям, содержащим такие ферментные препараты, и способам снижения риска вирусного и микробного загрязнения в таких препаратах и композициях. Типичные ферментные композиции включают экстракты поджелудочной железы, подходящие для применения в терапевтических целях, таких как лечение и/или профилактика нарушенного пищеварения, и, в частности, нарушенного пищеварения, основанного на хронической экзокринной недостаточности поджелудочной железы, у млекопитающих и людей.

Сведения о предшествующем уровне техники

Продукты, полученные из тканей животных, могут вызывать вирусное и/или микробное загрязнение. Некоторые биологические загрязнители, такие как бактерии или простейшие, могут быть инактивированы во время производственных процессов. Однако другие биологические загрязнители, такие как вирусы без оболочки и некоторые спорообразующие бактерии (например, *Bacillus cereus*), устойчивы к традиционным способам уменьшения или инактивации загрязнителей. Особой проблемой является инаktivация или удаление вирусов и спорообразующих бактерий из ферментных композиций, полученных из тканей животных, без разрушения или изменения активности ферментов в процессе.

Традиционные способы инаktivации вируса включают, например, пастеризацию, стерилизацию сухим жаром, стерилизацию паром, обработку растворителем/детергентом и низкий pH. Выбор способов, которые следует использовать для вирусной инаktivации, зависит от природы и загрязнения продукта, используемого метода очистки, если таковой имеется, и природы вирусного загрязнителя. Например, обработка растворителем или детергентом может разрушить липидную мембрану вирусов с оболочкой и, таким образом, используется для инаktivации вирусов с оболочкой. Однако многие вирусы без оболочки обычно не инаktivировываются обработкой растворителем или детергентом. Точно так же многие спорообразующие бактерии устойчивы как к нагреванию, так и к органическим растворителям.

Стерилизация теплом, в частности сухим жаром, является еще одним традиционным методом вирусной инаktivации. Хотя стерилизация сухим жаром может инаktivировать даже очень устойчивые вирусы, такие как вирусы без оболочки, для обработки требуются длительные периоды времени (от нескольких часов) и контроль содержания влаги. Кроме того, термическая обработка может негативно влиять на желаемую биологическую активность продукта, особенно когда продукт представляет собой ферментную композицию.

Панкреатические ферментные продукты уже давно используются для лечения экзокринной недостаточности поджелудочной железы, состояния, связанного с кистозным фиброзом (КФ), хроническим панкреатитом, обструкцией поджелудочной железы или общего желчного протока (например, из-за опухолевого заболевания), хирургическими процедурами, такими как панкреатэктомия или шунтирование желудочно-кишечного тракта, а также других заболеваний и расстройств. Поджелудочная железа выделяет пищеварительные ферменты, включая липазы, протеазы и амилазы, в проксимальную полость двенадцатиперстной кишки, где они облегчают гидролиз макронутриентов. Амилазы и протеазы выделяются и другими органами, кроме поджелудочной железы, и они способствуют усвоению углеводов и белков. Тем не менее, относительно мало липазы выделяется из других источников, кроме поджелудочной железы, участвующих в переваривании липидов. Таким образом, пациенты с невылеченной экзокринной недостаточностью поджелудочной железы, как правило, испытывают трудности с перевариванием жиров и могут страдать от симптомов нарушенного пищеварения или недоедания, или от того и другого, с недостатком незаменимых жирных кислот и жирорастворимых витаминов, потерей веса, спазмами, метеоризмом, вздутием живота и жирным, зловонным, жидким стулом (стеаторея). Для пациентов с КФ несоответствующее лечение может иметь серьезные последствия, так как высокий пищевой статус напрямую связан с хорошей функцией легких.

Ферментотерапия поджелудочной железы лечит и/или предотвращает мальабсорбцию и способствует росту и развитию у пациентов с экзокринной недостаточностью поджелудочной железы. У пациен-

тов с КФ слизь блокирует панкреатический проток в поджелудочной железе, как это происходит в легких. Пищеварительные ферменты поджелудочной железы не секретируются в кишечнике, и, следовательно, усвоение крахмала, жиров и белков нарушается. Отсутствие пищеварения приводит, среди прочего, к стеаторее, болям в животе и потере веса.

Нарушенное пищеварение у млекопитающих и людей обычно основано на дефиците пищеварительных ферментов, в частности на дефиците эндогенной липазы, а также протеазы и/или амилазы. Если недостаточность поджелудочной железы является патологической, то она может быть врожденной или приобретенной. Приобретенную хроническую недостаточность поджелудочной железы можно, например, объяснить алкоголизмом. Врожденную недостаточность поджелудочной железы можно, например, объяснить врожденном заболевании кистозным фиброзом. Последствиями дефицита пищеварительных ферментов могут быть тяжелые симптомы недостаточного питания и недоедания, которые могут сопровождаться повышенной предрасположенностью к вторичным заболеваниям.

Замена экзогенными пищеварительными ферментами или смесями пищеварительных ферментов (т.е. панкреатической ферментотерапия) доказала эффективность лечения дефицита эндогенных пищеварительных ферментов. Чаще всего фармацевтические препараты, содержащие панкреатин свиного происхождения, используются для ферментотерапии поджелудочной железы (также известной как "заместительная ферментативная терапия"). Для таких фармацевтических препаратов активный ингредиент, оцениваемый в клинических испытаниях, представляет собой липазу, а дозированные количества для коммерческих продуктов приведены в единицах липазы. Тем не менее, такие смеси пищеварительных ферментов, полученные из поджелудочной железы свиньи, содержат липазы, амилазы и протеазы, и могут эффективно использоваться для ферментотерапии поджелудочной железы у людей благодаря большому сходству содержащихся в них ферментов и сопутствующих веществ с содержащим поджелудочного сока человека. Ферменты поджелудочной железы обычно вводят перорально в форме твердых препаратов.

Поджелудочная железа может быть получена от животных, таких как свиньи, выращенные и убитые для еды. Государственные нормативные акты часто требуют, чтобы поджелудочные железы были получены с бойни одного вида (т.е. никакие другие виды не были забиты и обработаны на этом объекте) и, таким образом, ограничивают доступность исходного материала. Широко распространенное загрязнение объектов инфекционными агентами может привести к остановке производства и дефициту поставок. Текущие процедуры испытаний могут выявлять загрязненные партии, а устранение таких партий создает дополнительную нагрузку на и без того ограниченные поставки исходного материала.

Доступны способы получения панкреатического фермента(ов) из поджелудочной железы млекопитающих. Например, в патенте США 4623624 описаны способы, с помощью которых панкреатин получают путем автолиза водной тканевой суспензии, содержащей изопропанол.

Присутствие инфекционных агентов, в частности вирусов и спорообразующих бактерий, в поджелудочной железе свиньи, используемой для производства панкреатина, является общепризнанным. Действительно, большинство стад свиней были инфицированы свинным парвовирусом (PPV), который обладает высокой устойчивостью к инактивации. PPV был обнаружен в панкреатине в качестве инфекционного агента. Хотя PPV не считается патогенным для человека, желательно получать панкреатин со сниженным содержанием PPV. Кроме того, PPV является распространенным модельным вирусом, так как его трудно инактивировать стандартными методами, такими как химическая или термическая обработка. Также сообщалось о загрязнении лекарственного вещества панкреатина *Bacillus cereus* и/или энтеротоксином *Bacillus cereus*.

US 2010/0119654 относится к облучению спиртового или водного биологического экстракта, который содержит твердые частицы в форме суспензии. Излучение, используемое в US 2010/0119654, представляет собой ультрафиолетовое (УФ) излучение, рентгеновское излучение, β -излучение или γ -излучение. УФ облучение промежуточного соединения панкреатина, растворенного в 40% изопропанол, приводило к снижению содержания бактериофагов M2 до $4 \log_{10}$. Гамма-облучение панкреатина (АФИ) вызывало снижение активности липазы на ~40% при 27 кГр и снижение активности липазы на 13% при 5 кГр. Содержание бактерий было снижено более чем на $2,5 \log_{10}$, но об инактивации вируса не сообщалось. Когда панкреатин (АФИ) обрабатывали β -облучением, как сообщалось, активность фермента сохранялась >85%, но "количество микроорганизмов" снижалось только на $\sim 1,5 \log_{10}$.

WO 2003/020324 относится к стерилизации пищеварительных ферментов, таких как трипсин, α -галактозидаза и идуронат-2-сульфатаза, с облучением. Лиофилизированные или жидкие ферменты (трипсин, гликозидаза или сульфатаза) облучали отдельно или в присутствии стабилизатора. γ -Облучение осуществляли с использованием источника ^{60}Co . О вирусной инактивации не сообщалось.

WO 2007/014896 относится к уменьшению концентрации одного или нескольких биологических, в частности вирусных, загрязнителей панкреатина путем нагревания панкреатина.

В US 2009/0233344 термическая обработка панкреатина при 80°C в течение 32 часов приводила к снижению концентрации вируса PPV примерно на $2,5 \log_{10}$, но также к потере липазной активности на 20%. Термическая обработка панкреатина при 100°C в течение 8 часов обеспечивала снижение концентрации вируса PPV более чем на $3 \log_{10}$, но почти 50% активности липазы было потеряно.

Таким образом, технологические этапы, которые могут быть эффективными против трудно инактивируемых вирусов, таких как PPV, имеют высокий потенциал для изменения природы продукта панкреатина путем разложения или снижения ферментов поджелудочной железы, особенно липазы, до недопустимых уровней. Такие изменения в специфической активности могут уменьшить или изменить профиль эффективности конечного продукта. Следовательно, желательно поддерживать активность фермента, в частности активность липазы, в процессе производства.

Так как каждый из ранее протестированных процессов удаления вирусов, который продемонстрировал некоторую эффективность в отношении трудно инактивируемых вирусов (например, PPV), приводил к значительной потере ферментативной активности, включая активность липазы, в промышленности существовал скептицизм по поводу того, что высокий уровень вирусной инактивации/клиренса может быть достигнут без ущерба для качества продукта. В частности, в промышленности существовал скептицизм в отношении того, что можно разработать подходящую надежную независимую стадию удаления вирусов, не оказывая неблагоприятного воздействия на химические, физические или фармацевтические свойства панкреатина. См., например, письмо Scientific Protein Laboratories в FDA от 22 июня 2004 г. в Docket № 2003D-0206.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к ферментному препарату, выделенному из тканей животных. Выделенный ферментный препарат включает в себя один или несколько ферментов, имеет сниженный уровень вирусного и/или микробного загрязнения относительно исходной ткани животных, и сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность исходной ткани животных. В некоторых вариантах осуществления ферментный препарат получают путем воздействия излучения на исходную ткань животного, предпочтительно электронно-лучевого излучения, и последующего выделения одного или нескольких ферментов из облученной ткани. В некоторых вариантах осуществления исходная ткань животных является незагрязненной тканью. В некоторых вариантах осуществления облученная ткань демонстрирует на по меньшей мере три \log_{10} , предпочтительно, по меньшей мере четыре \log_{10} , уменьшение вирусного и/или микробного загрязнения по сравнению с необлученной исходной тканью животного. В некоторых вариантах осуществления облученная ткань демонстрирует на по меньшей мере три \log_{10} , предпочтительно, по меньшей мере четыре \log_{10} , снижение концентрации вируса по сравнению с исходной тканью животного. В некоторых вариантах осуществления применяются дополнительные независимые стадии снижения вирусной нагрузки (например, во время этапа выделения одного или нескольких ферментов из облученной ткани). В некоторых вариантах осуществления ферментный препарат, выделенный из облученной ткани, имеет биологическую активность, соответствующую по меньшей мере 50%, предпочтительно, по меньшей мере 90% биологической активности контрольного ферментного препарата, такого как ферментный препарат, выделенный из необлученной ткани животного. В некоторых вариантах осуществления биологическая активность представляет собой активность липазы. В некоторых вариантах осуществления облученная ткань демонстрирует на по меньшей мере три \log_{10} , предпочтительно, по меньшей мере четыре \log_{10} , уменьшение вирусных и/или микробных загрязнителей по сравнению с необлученной исходной тканью животного, и ферментный препарат, выделенный из облученной ткани, обладает биологической активностью, соответствующей по меньшей мере 50%, предпочтительно, по меньшей мере 90% биологической активности контрольного ферментного препарата, такого как ферментный препарат, выделенный из необлученной ткани животного.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу получения ферментного препарата, полученного из ткани животного, причем ферментный препарат имеет сниженный уровень вирусного и/или микробного загрязнения по сравнению с исходной тканью животного. Способ включает обработку, достаточную для получения по меньшей мере 3 \log_{10} , предпочтительно, по меньшей мере 4 \log_{10} снижения вирусных и/или микробных загрязнителей по сравнению с исходной тканью животного. В некоторых вариантах осуществления обработка включает в себя облучение интактной ткани животного, предпочтительно электронно-лучевым излучением, для получения облученной ткани животного. В некоторых вариантах осуществления обработка электроннолучевым излучением достаточна для уменьшения уровня вирусного и/или микробного загрязнения исходной ткани животного при сохранении по меньшей мере одной биологической активности исходной ткани животного. В некоторых вариантах осуществления биологическая активность представляет собой активность липазы. В некоторых вариантах осуществления один или несколько ферментов и/или проферментов выделяются из облученной ткани животных. В некоторых вариантах осуществления один или несколько ферментов выделяют из облученной ткани животных. В некоторых вариантах осуществления способ уменьшает риск инфекционного загрязнения ферментного препарата животного происхождения или фармацевтической композиции, содержащей ферментный препарат животного происхождения, по сравнению с необработанным контрольным образцом.

Другой аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей ферментные препараты, описанные здесь. Фармацевтическая композиция может представлять собой фармацевтическую лекарственную форму для перорального применения. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция используется для лечения или предотвращения заболевания,

чувствительного к заместительной терапии панкреатическими ферментами, такого как экзокринная недостаточность поджелудочной железы. Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения или профилактики экзокринной недостаточности поджелудочной железы, включающему введение субъекту, нуждающемуся в этом, дозы ферментного препарата или фармацевтической композиции, описанных здесь.

Другой аспект настоящего изобретения относится к наборам, которые содержат ферментные препараты или фармацевтические композиции, описанные здесь.

Эти и другие объекты изобретения описаны в следующих параграфах. Эти объекты не должны ограничивать объем изобретения.

Подробное описание изобретения

Это подробное описание предназначено только для ознакомления других специалистов в данной области техники с настоящим изобретением, его принципами и его практическим применением, чтобы другие специалисты в данной области техники могли адаптировать и применять изобретение в его многочисленных формах, так как они могут наилучшим образом соответствовать требованиям конкретного применения. Это описание и его конкретные примеры предназначены только для иллюстрации. Следовательно, данное изобретение не ограничено вариантами осуществления, описанными в этой заявке на патент, и может быть различным образом модифицировано.

А. Определения.

Следующие термины, используемые в описании и прилагаемой формуле изобретения, имеют указанное значение, если не указано иное:

Используемый здесь термин "АФИ" означает "активный фармацевтический ингредиент". Предпочтительным АФИ, раскрытым в данном документе, является панкреатин, в частности панкреатин свиного происхождения, который обычно используется в терапевтических целях, т.е. панкреатин в соответствии с требованиями стандартных фармакопей, например, Ph. Eur. и/или USP, и подходит для перорального применения при лечении или профилактике нарушенного пищеварения у млекопитающих, в частности людей, и, в частности, нарушенного пищеварения, вызванного хронической экзокринной недостаточностью поджелудочной железы, такой как у пациентов, страдающих кистозным фиброзом, хроническим панкреатитом или у пациентов, которые перенесли операции на верхних отделах желудочно-кишечного тракта.

Используемый здесь термин "сырой" относится к неочищенному препарату или смеси, содержащей ферменты и/или проферменты, а также дополнительные компоненты, полученные из исходной ткани. Неочищенный препарат или смесь включает, но не ограничивается ими, саму ткань животного.

Термин "ферментный препарат" относится к любой композиции вещества, содержащей один или несколько ферментов, в активной или неактивной форме (т.е., проферменты или зимогены). Термин включает клеточные или тканевые экстракты, а также неочищенные препараты, полученные из ткани животных или другого клеточного материала. Одним из примеров ферментного препарата является панкреатин, панкрелипаза, экстракт, полученный из поджелудочной железы млекопитающих, предпочтительно свиней.

Термин "экстракт" применительно к настоящим ферментным препаратам относится к одному или нескольким ферментам и/или проферментам, которые были отделены, по меньшей мере, от одного компонента ткани, из которой они были получены. Выделенные компоненты могут быть в форме активного фермента или профермента (зимогена), требующего последующего превращения в активную форму.

Термин "изолят" применительно к настоящим ферментным препаратам относится к одному или нескольким активным ферментам, которые были отделены, по меньшей мере, от одного компонента ткани, из которой они были получены. Таким образом, в определенных вариантах осуществления "выделенный фермент" или "выделенный ферментный препарат" включает один или несколько активных ферментов, которые были превращены из соответствующей формы профермента путем гидролиза и/или автолиза. Гидролиз и/или автолиз с целью превращения профермента в активный фермент может происходить до, во время или после экстракции.

Используемые здесь термины "ферменты поджелудочной железы", "панкреатин" и "панкрелипаза" относятся к ферментативным смесям, полученным из поджелудочной железы млекопитающих, включающим пищеварительные ферменты, такие как липаза, протеаза и амилаза, в качестве основных компонентов. В частности, термины "ферменты поджелудочной железы", "панкреатин" и "панкрелипаза" могут использоваться здесь как синонимы и относиться к экстрактам поджелудочной железы, пригодным для терапевтических целей, в соответствии со стандартными фармакопеями, которые содержат несколько пищеварительных ферментов, свойства которых определены стандартными фармакопейными статьями, как упоминалось выше. Благодаря стандартным производственным процессам "ферменты поджелудочной железы", "панкреатин" и "панкрелипаза" обычно предоставляются в порошкообразной форме в виде "порошка панкреатина", иногда также называемого "порошком поджелудочной железы". Ферменты поджелудочной железы, панкреатин и панкрелипаза также могут быть и предпочтительно являются АФИ. Панкреатин фармацевтического назначения, как правило, бычьего или свиного происхождения. Свиной панкреатин является предпочтительным. Панкрелипаза была описана в некоторых ссылках как

ферментный препарат с повышенной активностью (липазой) по сравнению с панкреатином.

Используемый здесь термин "фармацевтическая композиция" означает композицию, содержащую ферментный препарат, как описано здесь, и, необязательно, один или несколько фармацевтически приемлемых наполнителей.

Термин "фармацевтически приемлемый" используется в качестве прилагательного для обозначения того, что модифицированное существительное подходит для использования в качестве фармацевтического продукта или в качестве части фармацевтического продукта.

Стадия "независимого" снижения уровня микробной и/или вирусной нагрузки относится к отдельному способу уменьшения количества бактерий и/или вирусов, которые могут присутствовать в образце. Стадия снижения уровня микробной и/или вирусной нагрузки может быть независимой при условии, что в этом процессе есть одна или несколько дополнительных стадий снижения уровня микробной и/или вирусной нагрузки. В некоторых вариантах осуществления "независимая" стадия снижения уровня микробной и/или вирусной нагрузки имеет достаточно отличный механизм от всех других стадий снижения уровня микробной и/или вирусной нагрузки, используемых в процессе, так что уменьшение \log_{10} , достигаемое на "независимой" стадии, становится аддитивным с кумулятивным уменьшением \log_{10} , достигнутым на всех других стадиях снижения уровня микробной и/или вирусной нагрузки, которые используются для получения ферментного препарата.

Термины "предотвращать", "предотвращающий" и "предотвращение" относятся к способу предотвращения возникновения состояния, расстройства или заболевания и/или сопутствующих им симптомов или запрета субъекту приобретать состояние, расстройство или заболевание. Используемый здесь термин "предотвращать", "предотвращающий" и "предотвращение" также включает задержку наступления состояния, расстройства или заболевания и/или сопутствующих им симптомов и уменьшение риска приобретения субъектом состояния, расстройства или заболевания.

Термин "субъект" включает людей и других приматов, а также одомашненных и полудомашненных животных, включая, но не ограничиваясь этим, домашнюю птицу, медоносных пчел, коров, овец, коз, свиней, лошадей, собак, кошек, кроликов, крыс, мышей и т.п. Термин "домашняя птица" охватывает все виды домашней птицы, включая, но не ограничиваясь этим, кур, индейку, утку, гусей, группу бескилевых птиц и промысловых птиц. В определенных вариантах осуществления субъектом является человек.

Термин "терапевтически эффективное количество" означает достаточное количество ферментного препарата или фармацевтической композиции для лечения состояния, расстройства или заболевания при разумном соотношении польза/риск, применимом к любому терапевтическому лечению. При использовании в терапевтическом лечении терапевтически эффективное количество одного из ферментных препаратов может быть использовано в виде экстракта или в сырой форме. В другом варианте ферментную композицию можно вводить в виде фармацевтической композиции, содержащей интересующую ферментную композицию в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями.

Термины "лечить", "лечащий" и "лечение" относятся к способу облегчения или отмены состояния, расстройства или заболевания и/или сопровождающих их симптомов.

В. Ферментный препарат и способы получения.

В одном аспекте настоящее изобретение включает ферментный препарат, содержащий один или несколько ферментов и/или проферментов, полученных из ткани животного, предпочтительно млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления ферментный препарат содержит смесь пищеварительных ферментов и/или проферментов. В некоторых вариантах осуществления ферментный препарат содержит липазу. В некоторых вариантах осуществления ферментный препарат содержит амилазу. В некоторых вариантах осуществления ферментный препарат содержит протеазу. В некоторых вариантах осуществления ферментный препарат содержит панкреатин. В некоторых вариантах осуществления ферментный препарат содержит профермент, такой как пролипаза или типсиноген. В некоторых вариантах осуществления ферментный препарат находится в сырой форме. В некоторых вариантах осуществления ферментный препарат содержит один или несколько ферментов и/или проферментов, которые были экстрагированы из ткани животных. В некоторых вариантах осуществления ферментный препарат содержит один или несколько ферментов, которые были выделены из ткани животных.

В некоторых аспектах выделенный ферментный препарат обладает такой же или практически такой же биологической активностью, но меньшим загрязнением, что и ткань, из которой он был выделен. В некоторых вариантах осуществления выделенный ферментный препарат обладает такой же или практически такой же биологической активностью, что и контрольный ферментный препарат. В некоторых вариантах осуществления уровень загрязнения выделенного ферментного препарата снижается по меньшей мере на три \log_{10} , предпочтительно, по меньшей мере на четыре \log_{10} относительно загрязнения ткани, из которой он был выделен. В некоторых вариантах осуществления сниженное загрязнение представляет собой вирусное загрязнение, в частности, загрязнение вирусом без оболочки и/или загрязнение вирусом с оболочкой. В некоторых вариантах осуществления биологическая активность выделенного ферментного препарата составляет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей

мере 80% или, предпочтительно, по меньшей мере 90% от биологической активности контрольного ферментного препарата. В некоторых вариантах осуществления биологическая активность представляет собой ферментативную активность, такую как протеазная активность, амилазная активность или, предпочтительно, липазная активность.

В другом аспекте ферментный препарат выделен из предварительно обработанной исходной ткани и обладает такой же или практически такой же биологической активностью, но меньшим загрязнением, чем контрольный препарат, выделенный из необработанной исходной ткани. В некоторых вариантах осуществления уровень загрязнения ферментного препарата снижается по меньшей мере на три \log_{10} , предпочтительно, по меньшей мере на четыре \log_{10} относительно контрольного препарата. В некоторых вариантах осуществления уровень загрязнения предварительно обработанной исходной ткани снижается по меньшей мере на три \log_{10} , предпочтительно, по меньшей мере на четыре \log_{10} по сравнению с необработанной исходной тканью. В некоторых вариантах осуществления загрязнение, которое снижается, является вирусным загрязнением, в частности, загрязнением вирусом без оболочки. В некоторых вариантах осуществления биологическая активность ферментного препарата составляет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или предпочтительно, по меньшей мере 90% от биологической активности контрольного препарата, выделенного из необработанной исходной ткани. В некоторых вариантах осуществления биологическая активность представляет собой ферментативную активность, такую как протеазная активность, амилазная активность или, предпочтительно, липазная активность.

В другом аспекте ферментный препарат получают из ткани, облученной электронно-лучевым излучением. В некоторых вариантах осуществления ткань, облученная электронно-лучевым излучением, представляет собой ткань млекопитающего, предпочтительно свиньи. В некоторых вариантах осуществления ферментный препарат, полученный из ткани, облученной электронно-лучевым излучением, содержит панкреатин. В некоторых вариантах осуществления ферментный препарат, полученный из ткани, облученной электронно-лучевым излучением, содержит профермент, такой как пролипаза или типсиноген. В некоторых вариантах осуществления ферментный препарат, полученный из ткани, облученной электронно-лучевым излучением, находится в сырой форме. В некоторых вариантах осуществления ферментный препарат, полученный из ткани, облученной электронно-лучевым излучением, содержит один или несколько ферментов и/или проферментов, которые были выделены из облученной ткани. В некоторых вариантах осуществления ферментный препарат, полученный из ткани, облученной электронно-лучевым излучением, содержит один или несколько ферментов, которые были выделены из облученной ткани.

В другом аспекте ферментный препарат выделен из ткани, облученной электронно-лучевым излучением, и имеет такую же или практически такую же биологическую активность, но меньшее загрязнение, чем контрольный препарат, выделенный из необлученной исходной ткани. В некоторых вариантах осуществления облученная ткань представляет собой ткань поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления облученная ткань представляет собой хлопьеобразую ткань поджелудочной железы, целую поджелудочную железу или часть целой поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления необлученной исходной тканью является ткань поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления уровень загрязнения ферментного препарата снижается по меньшей мере на три \log_{10} , предпочтительно, по меньшей мере на четыре \log_{10} относительно контрольного препарата. В некоторых вариантах осуществления загрязнение, которое снижается, представляет собой вирусное загрязнение, в частности, загрязнение вирусом без оболочки и/или с оболочкой. В некоторых вариантах осуществления загрязнение, которое снижается, представляет собой загрязнение PPV. В некоторых вариантах осуществления биологическая активность выделенного ферментного препарата составляет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или, предпочтительно, по меньшей мере 90% от биологической активности контрольного препарата. В некоторых вариантах осуществления биологическая активность представляет собой ферментативную активность, такую как протеазная активность, амилазная активность или, предпочтительно, липазная активность.

В другом аспекте ферментный препарат содержит проферменты, облученные электронно-лучевым излучением. В некоторых вариантах осуществления ферментный препарат дополнительно обрабатывают, например, путем преобразования облученных проферментов в их активную форму (например, путем автолиза и/или гидролиза).

Настоящие ферментные препараты могут быть лучше поняты в связи со следующими способами, которые иллюстрируют примерные методики, с помощью которых могут быть получены ферментные препараты.

В одном аспекте настоящее изобретение включает способ изготовления ферментной композиции, включающий облучение источника проферментов, предпочтительно электронно-лучевым излучением. В некоторых вариантах осуществления источник проферментов представляет собой популяцию клеток. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток представляет собой незагрязненную ткань, полученную из железы млекопитающего или ее части. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток представляет собой целую железу, полученную от млекопитающего. В некоторых вариантах осуще-

ствления популяция клеток представляет собой часть железы, полученной от млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток представляет собой замороженный тканевый блок. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток представляет собой хлопьеобразную или измельченную ткань животных.

В другом аспекте настоящее изобретение включает способ изготовления ферментного препарата. Способ включает облучение ткани животного, предпочтительно электронно-лучевым излучением. В некоторых вариантах осуществления ткань животного представляет собой незагрязненную ткань. В некоторых вариантах осуществления незагрязненная ткань животных представляет собой замороженный тканевый блок. В некоторых вариантах осуществления незагрязненная ткань животных представляет собой хлопьеобразную или измельченную ткань животных.

В некоторых вариантах осуществления способ начинается с ткани животных, предпочтительно незагрязненной ткани животных. В некоторых вариантах осуществления тканью животного является поджелудочная железа млекопитающего, предпочтительно свиньи. В некоторых вариантах осуществления поджелудочная железа свиньи добывается на утвержденной бойне, предпочтительно на бойне одного вида.

В некоторых вариантах осуществления интактная ткань животных представляет собой интактную ткань поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления интактная ткань поджелудочной железы включает в себя целую поджелудочную железу или ее часть, такую как одна или несколько долей. В некоторых вариантах осуществления интактная ткань поджелудочной железы включает замороженную ткань в виде хлопьев. В некоторых вариантах осуществления интактная ткань поджелудочной железы включает замороженный тканевый блок, который может быть подвергнут механической обработке. В некоторых вариантах осуществления интактная ткань поджелудочной железы включает ткань поджелудочной железы, которая была минимально обработана или изменена, или предпочтительно не обработана или изменена таким образом, чтобы, например, разрушать активные ферменты и/или превращать проферменты в их активную форму в ткани. Например, гомогенат ткани, который подвергся значительной химической или ферментативной обработке для превращения проферментов в их активную форму, не является "интактной тканью", как этот термин используется здесь. В качестве другого примера, ткань, которая была измельчена в условиях, которые разрушают активные ферменты и/или превращают проферменты в их активную форму в ткани, не является "интактной тканью", как этот термин используется здесь.

Обычно измельчение включает обработку исходной ткани в гомогенизаторе на части не более $0,5 \text{ см}^3$, не более $0,4 \text{ см}^3$, не более $0,3 \text{ см}^3$, не более $0,2 \text{ см}^3$ или не более $0,1 \text{ см}^3$. Гомогенизация обычно включает смешивание измельченного материала с водой с образованием суспензии, как известно в данной области. Ткань также может быть смешана с другими растворами и/или стабилизаторами для обеспечения или облегчения механической обработки при условии, что смешивание с другими растворами и/или стабилизаторами не разрушает активные ферменты и/или не превращает проферменты в их активную форму в ткани, например, поддерживая температуру гомогената суспензии или кашицы при $10^\circ\text{C}+5^\circ\text{C}$, предпочтительно ниже 10°C .

Таким образом, механическая обработка ткани однозначно включает добавление или смешивание с водой и/или низшим спиртом (например, изопропиловым спиртом) в количестве, достаточном для обеспечения или облегчения механической обработки, такой как измельчение или гомогенизация, при условии, что смешивание/добавление не сопровождается сопутствующим автолизом или гидролизом. Таким образом, механическая обработка в соответствии со способами изобретения может выполняться для сохранения ткани при $10^\circ\text{C}+5^\circ\text{C}$, предпочтительно ниже 10°C (включая замораживание), во время обработки, чтобы минимизировать или остановить автолиз или гидролиз. Соответственно, например, гомогенат ткани может представлять собой смесь ткани и воды, которую поддерживают при $10^\circ\text{C}+5^\circ\text{C}$, предпочтительно ниже 10°C , во время обработки, чтобы предотвратить гидролиз и/или автолиз ткани.

Напротив, "промежуточный продукт в процессе" (и аналогичные термины) относится к ткани, которая, в дополнение к необязательному механическому изменению исходной ткани, также подвергалась одной или нескольким стадиям химической и/или ферментативной обработки, включая гидролиз и автолиз. В частности, один или несколько этапов химической и/или ферментативной обработки изменяют популяцию биомолекул и/или профиль биомолекулы, например, разрушая активные ферменты и/или превращая проферменты в их активную форму в ткани. Таким образом, промежуточный продукт в процессе может также иметь измененное отношение профермента(ов) к активному ферменту(ам).

В некоторых вариантах осуществления ткань животного, предпочтительно замороженная ткань животного, измельчается. В некоторых вариантах осуществления измельчение может быть достигнуто с использованием аппарата для переработки замороженного материала в хлопья, такого как Hydraflake Chunker, предоставленного General Machinery Corporation (Sheboygan, WI), который предназначен для измельчения замороженной ткани при подготовке к дальнейшей обработке.

В некоторых вариантах осуществления ткань животного облучают. В некоторых вариантах осуществления ткань животного подвергается воздействию стерилизующего пучка ускоренных электронов, то есть электронного луча или электронно-лучевого излучения. В некоторых вариантах осуществления ин-

тактная ткань животного подвергается облучению электронным лучом. В некоторых вариантах осуществления целая поджелудочная железа или ее интактная часть подвергаются облучению электронным лучом. В некоторых вариантах осуществления хлопьеобразная ткань поджелудочной железы свиньи подвергается облучению электронным лучом.

Электронно-лучевое излучение является формой ионизирующей энергии, которая обычно характеризуется низким уровнем проникновения и высокой дозировкой. Луч, концентрированный, сильно заряженный поток электронов, генерируется ускорением и преобразованием электричества. Электроны генерируются оборудованием, называемым ускорителями, которые способны генерировать лучи либо импульсные, либо непрерывные. Когда облучаемый материал проходит под электронным лучом или перед ним, энергия электронов поглощается. Это поглощение энергии изменяет различные химические связи и биологические свойства продукта/материала. Поглощенная энергия называется "поглощенной дозой". Именно это поглощение энергии - или "дозировка" - разрушает вирусы и микроорганизмы, например, разрушая их цепи ДНК или РНК.

Облучение можно проводить обычным способом, например, путем помещения ткани в подходящий контейнер и облучение потока электронов. В некоторых вариантах осуществления контейнер, содержащий ткань, помещают на конвейер, который затем проходит через поток электронов. В некоторых вариантах осуществления контейнер, содержащий ткань, не содержит какого-либо растворителя. В некоторых вариантах осуществления контейнер, содержащий ткань, по большей части не содержит растворителя. В некоторых вариантах осуществления контейнер, содержащий ткань, не содержит какого-либо легковоспламеняющегося растворителя. В некоторых вариантах осуществления контейнер, содержащий ткань, по большей части не содержит легковоспламеняющегося растворителя, например, спирта. Например, контейнер может содержать замороженную, интактную ткань, такую как целая железа, часть целой железы или хлопья ткани.

В некоторых вариантах осуществления облучение предоставляется в дозе, достаточной для существенной инактивации устойчивых вирусов и/или микроорганизмов в ткани. В некоторых вариантах осуществления излучение предоставляется в дозе, которая предотвращает потерю биологической активности, предпочтительно ферментативной активности, относительно контрольного ферментного препарата, выделенного из необлученной ткани.

Пучок ускоренных электронов может быть получен ускорителем электронов, таким как ускоритель электронов, предоставленный Iotron Industries USA, Inc. (Columbia City, IN). В некоторых вариантах осуществления ускоритель электронов работает при мощностях от 20 до 250 кВт и энергии пучка от 5 до 18 мегаэлектронвольт (МэВ). В некоторых вариантах осуществления ускоритель электронов работает при 60 кВт и 10 МэВ. В некоторых вариантах осуществления ускоритель электронов обеспечивает энергию пучка 10 МэВ или выше.

Ткань может подвергаться электронно-лучевому облучению в течение времени и в количестве, достаточном для достижения инактивации вирусов или бактерий без ущерба для биологической активности одного или нескольких ферментов, впоследствии извлеченных или выделенных из облученной ткани. Доза электронно-лучевого облучения, необходимая для стерилизации ткани, может варьироваться в зависимости, например, от размера ткани, типа ткани, а также от типа и количества вирусных или микробных загрязнителей или подозрения на их присутствие в образце ткани. Специалист в данной области распознает и сможет определить соответствующую дозу и время, подходящие для конкретной ткани и основанные на характеристиках используемой ткани и ускорителя. Выбранная доза электронного луча эффективна для инактивации инфекционных агентов, которые трудно разрушить обычными процессами при минимальной потере ферментной активности.

"Поглощенная доза" излучения выражается в килогреях (кГр), где один килогрей равен одной тысяче джоулей энергии, выделяемой на килограмм материала. В некоторых вариантах осуществления ткань подвергается воздействию электронного луча до тех пор, пока не будет поглощено количество, инактивирующее инфекционный агент. Например, ткань может подвергаться воздействию электронного луча до тех пор, пока доза около 10, около 15, около 20, около 25, около 30, около 35, около 40, около 45 или около 50 килогрей (кГр) или более не будет достигнута. В качестве другого примера, ткань может подвергаться воздействию электронного луча до тех пор, пока доза от около 5 до около 50, от около 10 до около 40, от около 15 до около 35 кГр не будет достигнута. В некоторых вариантах осуществления ткань подвергается воздействию электронного луча до тех пор, пока не будет поглощена доза около 30 кГр. В некоторых вариантах осуществления поджелудочную железу свиньи облучают дозой электронного луча, достаточной для обеспечения высокой степени уменьшения инфекционных агентов \log_{10} , предпочтительно инфекционных агентов, которые трудно инактивировать, таких как вирусы без оболочки, при этом вызывая минимальную потерю ферментной активности.

В некоторых вариантах осуществления дозировка может быть определена с использованием пленок радиохромного красителя. Такие пленки могут быть откалиброваны в соответствии с национальным стандартом.

В некоторых вариантах осуществления ткань подвергается воздействию электронно-лучевого облучения в течение времени и в количестве, достаточном для снижения вирусной нагрузки модельного ви-

руса по меньшей мере на три \log_{10} , предпочтительно, по меньшей мере на четыре \log_{10} по сравнению с контрольным образцом. В некоторых вариантах осуществления ткань подвергается воздействию электронно-лучевого облучения в течение времени и в количестве, достаточном для снижения вирусной нагрузки модельного вируса до примерно трех \log_{10} и до примерно пяти \log_{10} по сравнению с контрольным образцом. В некоторых вариантах осуществления ткань подвергается воздействию электроннолучевого облучения в течение времени и в количестве, достаточном для снижения вирусной нагрузки модельного вируса примерно на четыре \log_{10} по сравнению с контрольным образцом. В некоторых вариантах осуществления модельный вирус представляет собой PPV. В некоторых вариантах осуществления ткань представляет собой незагрязненную ткань. В некоторых вариантах осуществления незагрязненная ткань представляет собой железу, такую как целая поджелудочная железа или ее часть, такая как одна или несколько долей поджелудочной железы. В других таких вариантах осуществления незагрязненная ткань представляет собой замороженную ткань в виде хлопьев.

В некоторых вариантах осуществления электронно-лучевое экспонирование включает в себя одностороннее или многостороннее воздействие. В некоторых вариантах осуществления ткань подвергается одностороннему воздействию электронного луча. В некоторых вариантах осуществления ткань подвергается многостороннему воздействию, например, двустороннему воздействию электронного луча. Таким образом, доза около 20 кГр может включать двухстороннее воздействие со скоростью около 10 кГр/сут.; доза около 30 кГр может включать двухстороннее воздействие со скоростью около 15 кГр/сут.; доза около 40 кГр может включать двухстороннее воздействие со скоростью около 20 кГр/сут.; и доза около 50 кГр может включать двухстороннее воздействие со скоростью около 25 кГр/сут.

В некоторых вариантах осуществления способы изготовления ферментного препарата снижают риск вирусного или микробного загрязнения фармацевтической композиции, содержащей ферментный препарат.

В некоторых вариантах осуществления уровень загрязнения облученной поджелудочной железы снижается по меньшей мере на три \log_{10} , предпочтительно, по меньшей мере на четыре \log_{10} относительно загрязнения железы до лучевой терапии. В некоторых вариантах осуществления уровень загрязнения ферментного препарата, полученного или выделенного из облученной поджелудочной железы, снижается по меньшей мере на три \log_{10} , предпочтительно, по меньшей мере на четыре \log_{10} , относительно загрязнения железы до лучевой терапии. В другом варианте загрязнения ферментного препарата определяют относительно контрольного ферментного препарата, полученного или выделенного из необлученной поджелудочной железы.

В некоторых вариантах осуществления загрязнение, которое снижается, является вирусным загрязнением, в частности загрязнением вирусом без оболочки, таким как PPV. Например, загрязнение PPV продукта панкреатина, выделенного из облученной поджелудочной железы, снижается по меньшей мере на три \log_{10} , предпочтительно, по меньшей мере на четыре \log_{10} относительно контрольного ферментного препарата, выделенного из необлученной поджелудочной железы. В качестве другого примера, загрязнение PPV облученной поджелудочной железы снижается по меньшей мере на три \log_{10} , предпочтительно, по меньшей мере на четыре \log_{10} по сравнению с необлученной поджелудочной железой. В некоторых вариантах осуществления уровень загрязнения PPV ферментного препарата дополнительно снижается посредством последующих независимых стадий вирусной инактивации, выполняемых после облучения.

В некоторых вариантах осуществления способы также могут включать в себя этап, следующий за стадией облучения, тестирования на наличие или количество одного или нескольких микроорганизмов (например, вирусов, бактерий или простейших) в ткани или ферментном препарате, полученном из ткани. Способы определения того, содержит ли образец микроорганизмы, известны в данной области и включают, например, анализы бляшкообразования или тесты на колониеобразование. Эффективная стерилизация также может быть определена с использованием обычных микробиологических методов, таких как, например, включение подходящих биологических индикаторов в серию опытов облучения или контактирование ткани с культуральной средой, и инкубация среды для определения стерильности ткани.

В некоторых вариантах осуществления уровень вирусного загрязнения может быть рассчитан с использованием конечной точки титрования и последующего вычисления полуинфицирующей дозы культуры ткани ($TCID_{50}$). Титры вируса, рассчитанные таким образом, могут быть представлены как $\log_{10} TCID_{50}$ на мл с доверительным интервалом 95%.

В некоторых вариантах осуществления уменьшение уровня вирусного загрязнения дается в соответствии с общей главой USP-NF <1050> как логарифмический фактор снижения, который представляет собой разницу в титре вируса между контрольным образцом и образцом, полученным из ткани, облученной электронным лучом при выделении. Например, снижение на 3 \log_{10} может указывать на уменьшение вирусной нагрузки в 1000 раз, а снижение на 4 \log_{10} может указывать на уменьшение вирусной нагрузки в 10000 раз.

В некоторых вариантах осуществления способы изготовления ферментного препарата позволяют уменьшить уровень вирусного и/или микробного загрязнения ферментного препарата без существенного снижения его ферментативной активности.

В некоторых вариантах осуществления ферментативная активность ферментного препарата, выделенного из облученной поджелудочной железы, сохраняется. Например, в некоторых вариантах осуществления биологическая активность ферментного препарата составляет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или предпочтительно, по меньшей мере 90% от биологической активности контрольного препарата, выделенного из необлученной поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления биологическая активность представляет собой ферментативную активность, такую как протеазная активность, амилазная активность или, предпочтительно, липазная активность.

После облучения ткань может быть дополнительно обработана для получения ферментной композиции. Например, в некоторых вариантах осуществления один или несколько ферментов и/или проферментов выделяют из облученной ткани. В некоторых вариантах осуществления один или несколько ферментов выделяют из облученной ткани. Известны различные способы выделения ферментов из образцов ткани. Например, в патенте США 4,623,624 предложены способы выделения панкреатина путем автолиза водной суспензии ткани, содержащей изопропанол.

В некоторых вариантах осуществления облученная ткань может подвергаться автолизу и/или гидролизу для превращения проферментов в их активную форму. Например, облученную ткань можно объединить с инициатором гидролиза для иницирования автолиза. В некоторых вариантах осуществления автолиз и/или гидролиз проводят при температуре окружающей среды. В некоторых вариантах осуществления реакцию смесь отфильтровывают после завершения реакции; фильтрат собирают; ферменты, присутствующие в фильтрате, осаждаются (например, изопропанолом); и осадок отфильтровывают, промывают изопропанолом и сушат под вакуумом.

Следует понимать, что способы, описанные выше и показанные в разделе "Примеры", являются иллюстративными и не должны рассматриваться как ограничивающие объем изобретения, как он определен в прилагаемой формуле изобретения. Все альтернативы, модификации и эквиваленты способов и конкретных примеров включены в объем формулы изобретения.

С. Композиции.

По меньшей мере, в одном аспекте настоящее изобретение включает композиции, содержащие ферментный препарат, как описано здесь. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит один или несколько ферментов и/или проферментов, выделенных из облученной ткани животных. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит один или несколько ферментов, выделенных из облученной ткани животных. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой сырую смесь, содержащую один или несколько ферментов, полученных из ткани животных.

В дополнительном аспекте предложена фармацевтическая композиция, содержащая ферментный препарат, согласно настоящему описанию, дополнительно необязательно содержащий один или несколько обычных фармацевтически приемлемых наполнителей, таких как те, которые содержатся в учебных пособиях, таких как Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. (Alfonso R. Gennaro, ed.; Mack Publishing Company, Easton, PA, 1990); Remington: the Science and Practice of Pharmacy 19th Ed. (Lippincott, Williams & Wilkins, 1995); Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd Ed. (Arthur H. Kibbe, ed.; Amer. Pharmaceutical Assoc, 1999); the Pharmaceutical Codex: Principles and Practice of Pharmaceutics 12th Ed. (Walter Lund ed.; Pharmaceutical Press, London, 1994); The United States Pharmacopeia: The National Formulary (United States Pharmacopeial Convention); и Goodman and Gilman's: the Pharmacological Basis of Therapeutics (Louis S. Goodman and Lee E. Limbird, eds.; McGraw Hill, 1992), описания которых включены в данный документ с помощью ссылки.

Фармацевтические композиции, содержащие ферментный препарат, согласно настоящему описанию, можно использовать для дополнения пищеварительных ферментов при лечении и/или профилактике нарушенного пищеварения у млекопитающих, в частности нарушенного пищеварения, вызванного хронической экзокринной недостаточностью поджелудочной железы, такой как у пациентов, страдающих кистозным фиброзом, хроническим панкреатитом или пациентов, перенесших операции на верхних отделах желудочно-кишечного тракта. Фармацевтические композиции или лекарственные формы, согласно настоящему описанию, предпочтительно могут представлять собой лекарственные формы для перорального применения, которые, в частности, можно вводить людям.

Лекарственная форма для перорального применения, содержащая ферментный препарат, может быть в форме, например, капсул, гранул, гранулятов, микропеллет, микросфер, микротаблеток, сфер, пиллюль, порошков и/или таблеток. Для целей настоящего описания приставка "микро" используется для описания лекарственной формы для перорального применения, если диаметр лекарственной формы для перорального применения или все ее размеры (длина, высота, ширина) равны или меньше примерно 5 мм.

В некоторых вариантах осуществления лекарственная форма для перорального применения представляет собой капсулу. Капсула может содержать от около 2000 до около 40000 единиц липазы на капсулу. В некоторых вариантах осуществления лекарственная форма для перорального применения представляет собой капсулу, содержащую 3000, 6000, 12000, 24000 или 36000 единиц липазы на капсулу. В некоторых вариантах осуществления лекарственная форма для перорального применения представляет собой капсулу, содержащую 3000, 5000, 10000, 15000, 20000, 25000 или 40000 единиц липазы на капсулу.

В некоторых вариантах осуществления лекарственная форма для перорального применения представляет собой капсулу, содержащую 2600, 4200, 10500, 16800 или 21000 единиц липазы на капсулу. В некоторых вариантах осуществления лекарственная форма для перорального применения представляет собой капсулу, содержащую 4000, 13800, 20700 или 23000 единиц липазы на капсулу. В некоторых вариантах осуществления лекарственная форма для перорального применения представляет собой капсулу, содержащую 4000, 8000 или 16000 единиц липазы на капсулу. В некоторых вариантах осуществления лекарственная форма для перорального применения представляет собой капсулу, содержащую 4000, 8000 или 16000 единиц липазы на капсулу. В других вариантах осуществления лекарственная форма для перорального применения представляет собой капсулу, содержащую 3000, 4000, 6000 или 8000 единиц липазы на капсулу. Дозировка может быть выражена различными способами, в том числе в единицах Американской фармакопеи, Европейских фармакопейных единицах или единицах Британской фармакопеи.

В некоторых вариантах осуществления лекарственная форма для перорального применения представляет собой таблетку, содержащую 10440 или 20880 единиц липазы на таблетку.

Известны различные фармацевтические композиции и лекарственные формы, содержащие панкреатин, такие как композиции с отсроченным высвобождением и с немедленным высвобождением. Например, в патенте США №9198871 предложены композиции панкреатина с отсроченным высвобождением.

В некоторых вариантах осуществления лекарственная форма для перорального применения представляет собой микропеллету панкреатина или микросферу панкреатина. В некоторых вариантах осуществления микропеллета панкреатина или микросфера панкреатина покрыта, например, кишечнорастворимой оболочкой. В некоторых вариантах осуществления микропеллета панкреатина или микросфера панкреатина - независимо от любого покрытия - содержит от примерно 10% до примерно 95 мас.% панкреатина, от примерно 5% до примерно 90 мас.% по меньшей мере одного фармацевтически приемлемого связующего агента, и от 0 до примерно 10 мас.% по меньшей мере одного фармацевтически приемлемого вспомогательного вещества. Более конкретно, микропеллета панкреатина или микросфера панкреатина содержит от около 70% до около 90 мас.% панкреатина, от около 10% до около 30 мас.% по меньшей мере одного фармацевтически приемлемого связующего агента и от 0% до около 5 мас.% по меньшей мере одного фармацевтически приемлемого вспомогательного вещества. В некоторых вариантах осуществления микропеллета панкреатина или микросфера панкреатина содержит от около 70% до около 90 мас.% панкреатина и от около 10% до около 30 мас.% по меньшей мере одного фармацевтически приемлемого связующего агента. В некоторых вариантах осуществления микропеллета панкреатина или микросфера панкреатина имеет приблизительно сферическую форму и имеет диаметр от около 0,5 мм до около 2,0 мм. В некоторых вариантах осуществления микропеллета панкреатина или микросфера панкреатина имеет первый размер от около 0,5 мм до около 2,0 мм и второй размер от около 0,5 мм до около 2,0 мм. В некоторых вариантах осуществления микропеллета панкреатина или микросфера панкреатина имеет первый размер от около 0,8 мм до около 1,0 мм и второй размер от около 0,5 мм до около 2,0 мм.

Примеры фармацевтически приемлемых связующих агентов включают полиэтиленгликоль 1500, полиэтиленгликоль 2000, полиэтиленгликоль 3000, полиэтиленгликоль 4000, полиэтиленгликоль 6000, полиэтиленгликоль 8000, полиэтиленгликоль 10000, гидроксипропилметилцеллюлозу, полиоксиэтилен, сополимеры полиоксиэтилен-полиоксипропилена и смеси указанных органических полимеров. Вышеприведенный список фармацевтически приемлемых связывающих агентов не предназначен для того, чтобы быть исчерпывающим, а является просто иллюстративным, так как специалист в данной области техники должен понимать, что многие другие фармацевтически приемлемые связывающие агенты или комбинации связывающих агентов также могут быть использованы. Полиэтиленгликоль 4000 является предпочтительным фармацевтически приемлемым связующим агентом.

Примеры подходящих фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ включают вещества, способствующие скольжению, такие как стеарат магния или стеарат кальция, стеариновая кислота, тальк и/или крахмал; наполнители, такие как фосфат кальция, кукурузный крахмал, декстраны, декстрин, гидратированный диоксид кремния, микрокристаллическая целлюлоза, каолин, лактоза, маннит, поливинилпирролидон, осажденный карбонат кальция, сорбит и/или тальк; вещества для улучшения распадаемости таблеток, такие как аэросил (кремниевая кислота), альгиновая кислота, амилоза, альгинат кальция, карбонат кальция, формальдегидный желатин, пектиновый карбонат, саговый крахмал, бикарбонат натрия и/или крахмал; и/или увлажнители, такие как глицерин и/или крахмал. Вышеприведенный список фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ не является исчерпывающим, а просто иллюстративным, так как специалист в данной области техники должен понимать, что также могут быть использованы многие другие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества или комбинации вспомогательных веществ. Для целей настоящего изобретения синтетические масла и сложные эфиры мономерной фталевой кислоты не должны рассматриваться как подходящие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества. В некоторых вариантах осуществления микропеллеты панкреатина или микросферы панкреатина не содержат фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, но могут необязательно содержать большее количество панкреатина.

В другом варианте осуществления лекарственная форма панкреатина для перорального применения, такая как лекарственная форма для перорального применения с кишечнорастворимой оболочкой,

предназначена для изготовления лекарственного средства для лечения таких заболеваний, как нарушение пищеварения, экзокринная недостаточность поджелудочной железы, панкреатит, кистозный фиброз, диабет первого типа и/или диабет второго типа.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция представляет собой фармацевтическую композицию с контролируемым высвобождением. Например, фармацевтическая композиция с контролируемым высвобождением может быть получена путем нанесения кишечнорастворимой оболочки на лекарственную форму для перорального применения. В некоторых вариантах осуществления кишечнорастворимая оболочка содержит пленкообразующее вещество, пластификатор и, необязательно, антиприлипающий агент.

Подходящие пленкообразующие вещества включают агар, карбомерный гомополимер и сополимеры (т.е. высокомолекулярные, сшитые полимеры на основе акриловой кислоты), карбоксиметилцеллюлозу, карбоксиметилэтилцеллюлозу, карраген, ацетатфталат целлюлозы, ацетатсукцинат целлюлозы, ацетаттриметиллат целлюлозы, хитин, экстракт кукурузного белка, этилцеллюлоза, аравийская камедь, гидроксипропилцеллюлоза, ацетатсукцинат гидроксипропилметил, ацетатсукцинат гидроксипропилметилцеллюлозы, фталат гидроксипропилметилцеллюлозы, сополимер этилметакрилата и метакриловой кислоты, метилцеллюлоза, пектин, поливинилацетата фталат, поливиниловый спирт, шеллак, альгинат натрия, ацетатфталат крахмала и/или сополимер стирола/малеиновой кислоты или смеси указанных пленкообразующих полимеров.

Ацетатфталат целлюлозы, ацетатсукцинат гидроксипропилметилцеллюлозы и/или сополимер этилметакрилата и метакриловой кислоты являются предпочтительными пленкообразующими веществами. Наиболее предпочтительным является фталат гидроксипропилметилцеллюлозы, такой как HP 55 или НРМСР HP-50. Синтетические масла не должны рассматриваться как предпочтительные пленкообразующие вещества. Вышеприведенный список пленкообразующих веществ предназначен не для того, чтобы быть исчерпывающим, а просто иллюстративным, так как специалист в данной области техники должен понимать, что также могут использоваться многие другие пленкообразующие вещества или комбинации пленкообразующих веществ.

Пластификатор(ы), как правило, могут присутствовать в количестве более, чем около 1,5%, и, как правило, в количестве от около 2% до около 20 мас.% относительно пленкообразующего вещества. Пластификатор может содержать насыщенные линейные одноатомные спирты, имеющие от 12 до 30 атомов углерода. В частности, допустимые пластификаторы включают лауриловый спирт, тридециловый спирт, миристиловый спирт, пентадециловый спирт, цетиловый спирт, гептадециловый спирт, стеариловый спирт, нонадециловый спирт, арахиновый спирт, бегениловый спирт, лигноцериновый спирт, цериловый спирт, корианиловый спирт, мелиссированный трибутилцитрат, себаценоводибутиловый эфир, эфиры глицерина с жирными кислотами, глицерин, полиэтиленгликоль, пропиленгликоль, эфиры сорбита и жирных кислот, триацетилглицерин, триэтилцитрат и смеси указанных пластификаторов. Предпочтительными пластификаторами являются цетиловый спирт, стеариловый спирт, триэтилцитрат и их смеси. Когда цетиловый спирт используется в качестве одного пластификатора, он может присутствовать в количестве более, чем около 1,5%, обычно в количестве от около 2% до около 15%, предпочтительно от около 2% до около 10 мас.% относительно пленкообразующего вещества. Когда триэтилцитрат используется в качестве одного пластификатора, он может присутствовать в количестве от около 5% до около 20%, предпочтительно от около 12% до около 15 мас.% относительно пленкообразующего вещества. Синтетические масла и мономерные эфиры фталевой кислоты не должны рассматриваться как подходящие пластификаторы. Вышеприведенный список пластификаторов не предназначен для того, чтобы быть исчерпывающим, а является просто иллюстративным, так как специалист в данной области техники должен понимать, что многие другие пластификаторы или комбинации пластификаторов также могут быть использованы при условии, что они, по большей части, не содержат как синтетических масел, так и мономерных эфиров фталевой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления пластификатор состоит из цетилового спирта и триэтилцитрата, которые присутствуют суммарно в количестве более, чем около 3%, обычно в количестве от около 4% до около 20%, в частности, от около 6% до около 15%, более конкретно от около 7% до около 10 мас.% относительно пленкообразующего вещества. Соотношение веса к весу цетилового спирта к триэтилцитрату, когда оба присутствуют, может составлять от около 0,05:1 до около 1:1, например, 0,1:1, 0,2:1, 0,3:1, 0,4:1, 0,5:1, 0,6:1, 0,7:1, 0,8:1 или 0,9:1. В частности, отношение цетилового спирта к триэтилцитрату может составлять от около 0,25:1 до около 0,5:1, предпочтительно от около 0,3:1 до около 0,45:1, более предпочтительно от около 0,35:1 до около 0,4:1, и еще более предпочтительно от около 0,38:1 до около 0,4:1 (w/w).

Кишечнорастворимая оболочка необязательно содержит антиадгезивный агент. Подходящие антиадгезивные агенты включают диметикон и касторовое масло. Диметикон, в частности диметикон 1000, является предпочтительным антиадгезивным агентом. Количество антиадгезивного агента (если присутствует) в кишечнорастворимой оболочке составляет от около 1,5% до около 3 мас.% относительно пленкообразующего вещества. Синтетические масла не следует рассматривать в качестве предпочтительных антиадгезивных агентов. Вышеприведенный список антиадгезивных агентов не предназначен для того,

чтобы быть исчерпывающим, а является просто иллюстративным, так как специалист в данной области техники должен понимать, что также могут использоваться многие другие антиадгезивные агенты или комбинации антиадгезивных агентов.

В некоторых вариантах осуществления кишечнорастворимая оболочка составляет от около 5 до около 30 мас.%, более предпочтительно от около 7 до около 20 мас.%, еще более предпочтительно от около 10 до около 15 мас.% от общего состава лекарственной формы для перорального применения с кишечнорастворимой оболочкой или фармацевтической композиции с контролируемым высвобождением. В некоторых вариантах осуществления кишечнорастворимая оболочка составляет от около 20 до около 30 мас.%, более предпочтительно от около 22 до около 26 мас.%, еще более предпочтительно от около 22,5 до около 25 мас.% от общего состава лекарственной формы для перорального применения с кишечнорастворимой оболочкой или фармацевтической композиции с контролируемым высвобождением.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция представляет собой капсулу с контролируемым высвобождением для перорального введения. Капсула может содержать пеллеты с кишечнорастворимой оболочкой, содержащие липазу, протеазу и амилазу. Пеллеты с кишечнорастворимой оболочкой могут иметь первый размер от около 0,5 мм до около 2,0 мм и, необязательно, второй размер от около 0,5 мм до около 2,0 мм. Например, пеллеты с кишечнорастворимой оболочкой могут быть приблизительно сферическими и иметь диаметр от около 0,71 до около 1,60 мм. В качестве другого примера пеллеты с кишечнорастворимой оболочкой могут быть нитевидными и иметь диаметр от около 0,5 мм до около 2,0 мм и длину от около 0,5 мм до около 2,0 мм. Композиция может дополнительно включать вспомогательные вещества, описанные здесь, такие как цетиловый спирт, диметикон, фталат гипромеллозы, полиэтиленгликоль и триэтилцитрат.

В некоторых других вариантах осуществления фармацевтическая композиция представляет собой фармацевтическую композицию с немедленным высвобождением. Например, фармацевтическая композиция с немедленным высвобождением может не иметь кишечнорастворимой оболочки.

D. Способы применения.

По меньшей мере, в одном аспекте настоящее изобретение включает метод лечения экзокринной недостаточности поджелудочной железы у субъекта, в частности человека, нуждающегося в таком лечении. Метод включает введение субъекту ферментного препарата или фармацевтической композиции, содержащей ферментный препарат. В некоторых вариантах осуществления экзокринная недостаточность поджелудочной железы обусловлена кистозным фиброзом, хроническим панкреатитом, панкреатэктомией или другими состояниями.

В другом аспекте настоящее изобретение включает метод лечения или профилактики нарушенного пищеварения у субъекта, в частности человека, нуждающегося в таком лечении или профилактике. В некоторых вариантах осуществления нарушенное пищеварение происходит из-за хронической экзокринной недостаточности поджелудочной железы, такой как у субъектов, страдающих кистозным фиброзом, хроническим панкреатитом, или пациентов, которые перенесли операцию на верхнем отделе желудочно-кишечного тракта.

В другом аспекте настоящее изобретение включает применение ферментного препарата или фармацевтической композиции, содержащей ферментный препарат, для лечения экзокринной недостаточности поджелудочной железы у субъекта, нуждающегося в таком лечении.

В другом аспекте настоящее изобретение включает применение ферментного препарата или фармацевтической композиции, содержащей ферментный препарат, для лечения или профилактики нарушенного пищеварения у субъекта, нуждающегося в таком лечении или профилактике.

В некоторых вариантах осуществления, относящихся к упомянутым выше способам и применениям, ферментный препарат содержит панкреатин. В некоторых вариантах осуществления подходящая дозировка панкреатина может быть основана на единицах липазы. Фонд кистозного фиброза (CFF) опубликовал единые рекомендации, в которых содержатся рекомендуемые общие суточные дозы единиц липазы.

В некоторых вариантах осуществления от 2000 до 4000 единиц липазы, предпочтительно 3000 единиц липазы, на 120 мл смеси или грудного вскармливания вводят младенцу в возрасте до 12 месяцев.

В некоторых вариантах осуществления от 1000 до 2500 единиц липазы на кг массы тела на прием пищи вводят человеку в возрасте от одного (1) до четырех (4) лет. В некоторых вариантах осуществления от 500 до 2500 единиц липазы на кг массы тела на прием пищи вводят человеку в возрасте, по меньшей мере, четырех (4) лет.

В некоторых вариантах осуществления максимальная суточная доза не превышает 10000 единиц липазы на кг массы тела. В некоторых вариантах осуществления максимальная суточная доза не превышает 4000 единиц липазы на г потребленных жиров.

В некоторых вариантах осуществления ферментный препарат или фармацевтическую композицию, содержащую ферментный препарат, вводят непосредственно перед приемом пищи. В некоторых вариантах осуществления ферментный препарат или фармацевтическую композицию, содержащую ферментный препарат, вводят во время еды или перекуса.

В еще одном варианте осуществления предложен метод лечения медицинского состояния, такого

как нарушение пищеварения, экзокринная недостаточность поджелудочной железы, панкреатит, кистозный фиброз, диабет первого типа и/или диабет второго типа, путем введения терапевтически эффективного количества ферментного препарата или фармацевтической композиции, содержащей ферментный препарат, человеку, нуждающемуся в таком лечении.

По меньшей мере, в одном аспекте настоящее изобретение включает способ переваривания белков. Способ включает контактирование белка, подлежащего расщеплению, с ферментным препаратом в условиях, достаточных для переваривания белка.

В некоторых вариантах осуществления ферментный препарат содержит один или несколько ферментов и/или проферментов, выделенных из облученной электронным лучом ткани животных. В некоторых вариантах осуществления ферментный препарат содержит один или несколько ферментов, выделенных из облученной электронным лучом ткани животных. В некоторых вариантах осуществления ферментный препарат находится в сыром состоянии.

В некоторых вариантах осуществления этап контактирования происходит *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления этап контактирования происходит *in vitro*.

В некоторых вариантах осуществления переваримый белок используется для приготовления белкового гидролизатного продукта.

Ферментные препараты, композиции, способы и применения, согласно настоящему описанию, будут лучше поняты при обращении к следующим вариантам осуществления и примерам, которые включены в качестве иллюстрации, а не ограничения объема изобретения.

Е. Варианты осуществления.

Один аспект настоящего изобретения включает ферментный препарат, полученный способом, включающим стадии: (а) обеспечение тканью поджелудочной железы млекопитающих; (б) воздействие на ткань поджелудочной железы электронно-лучевым излучением для получения облученной ткани поджелудочной железы, причем электронно-лучевое излучение является достаточным для снижения уровня микробной и/или вирусной нагрузки; и (в) выделение панкреатина из облученной ткани поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления стадия выделения включает инициирование гидролиза или автолиза ткани поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления стадия выделения включает смешивание облученной ткани поджелудочной железы с водой. В некоторых вариантах осуществления стадия (в) включает активацию профермента из облученной ткани поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления снижение уровня микробной и/или вирусной нагрузки составляет по меньшей мере снижение на три \log_{10} , предпочтительно, по меньшей мере четыре \log_{10} по сравнению с контрольным образцом, полученным из необлученной ткани. Например, снижение уровня микробной и/или вирусной нагрузки составляет по меньшей мере три \log_{10} , предпочтительно, по меньшей мере четыре \log_{10} , снижения вирусной нагрузки РРV относительно контрольного образца, полученного из необлученной ткани. В некоторых вариантах осуществления биологическая активность ферментного препарата, полученного на стадии (в), соответствует по меньшей мере 50%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, биологической активности контрольного ферментного препарата, полученного из необлученной ткани поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления биологическая активность представляет собой липазную активность. В некоторых вариантах осуществления биологическая активность представляет собой протеазную активность или амилазную активность. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно содержит один или несколько дополнительных этапов, которые обеспечивают дополнительное снижение уровня микробной и/или вирусной нагрузки.

Другой аспект настоящего изобретения включает ферментный препарат, содержащий один или несколько ферментов, выделенных из ткани млекопитающего, подвергнутой обработке, достаточной для снижения вирусной нагрузки по меньшей мере на три \log_{10} , предпочтительно, по меньшей мере на четыре \log_{10} . Например, обработка достаточна для получения снижения вирусной нагрузки РРV по меньшей мере на три \log_{10} , предпочтительно, по меньшей мере на четыре \log_{10} , по сравнению с необлученным контрольным образцом.

Другой аспект настоящего изобретения включает ферментный препарат, содержащий один или несколько ферментов, выделенных из ткани млекопитающего, причем перед выделением фермента ткань млекопитающего подвергают обработке, достаточной для снижения вирусной нагрузки по меньшей мере на три \log_{10} , предпочтительно, по меньшей мере на четыре \log_{10} . Например, обработка достаточна для снижения вирусной нагрузки РРV по меньшей мере на три \log_{10} , предпочтительно, по меньшей мере на четыре \log_{10} , по сравнению с необработанным контрольным образцом. В некоторых вариантах осуществления ткань млекопитающего представляет собой поджелудочную железу свиньи. В некоторых вариантах осуществления поджелудочная железа свиньи является нарезанной в виде хлопьев. В некоторых вариантах осуществления поджелудочная железа свиньи находится в замороженном блоке.

В некоторых вариантах осуществления поджелудочная железа свиньи представляет собой целую железу или ее часть, такую как одна или несколько долей. В некоторых вариантах осуществления один или несколько ферментов включают панкреатин. В некоторых вариантах осуществления обработка включает электронно-лучевое излучение. В некоторых вариантах осуществления электронно-лучевое излучение имеет дозу от около 5 до около 50 кГр, предпочтительно от около 10 до около 40 кГр. В неко-

торых вариантах осуществления биологическая активность ферментного препарата соответствует по меньшей мере 50%, предпочтительно, по меньшей мере 90% биологической активности контрольного ферментного препарата, полученного из необработанной ткани млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления биологическая активность представляет собой липазную активность. В некоторых вариантах осуществления биологическая активность представляет собой протеазную активность или амилазную активность. В некоторых вариантах осуществления снижение вирусной нагрузки представляет собой независимое снижение.

Другой аспект настоящего изобретения включает способ снижения риска загрязнения продукта панкреатина инфекционным агентом, включающий стадии: (а) обеспечение тканью поджелудочной железы млекопитающего; (б) облучение ткани поджелудочной железы электронно-лучевым излучением для получения облученной ткани поджелудочной железы, причем электронно-лучевое излучение является достаточным для снижения риска загрязнения инфекционным агентом; и (в) выделение панкреатина из облученной ткани поджелудочной железы, в результате чего получают продукт панкреатина со сниженным риском загрязнения инфекционным агентом относительно ткани поджелудочной железы млекопитающего, предоставленной на стадии (а), или образца панкреатина, полученный из необлученной ткани поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления инфекционным агентом является свиной парвовирус (PPV). В некоторых вариантах осуществления способ обеспечивает по меньшей мере три \log_{10} , предпочтительно, по меньшей мере четыре \log_{10} , снижения показателя, указывающего на уровень или активность вируса без оболочки, такого как свиной парвовирус (PPV). В некоторых вариантах осуществления показателем, указывающим на уровень или активность вируса без оболочки, является вирусная нагрузка.

Другой аспект настоящего изобретения включает ферментный препарат, содержащий один или несколько ферментов, выделенных из ткани млекопитающего, и, по большей части, инактивированный вирус без оболочки, причем препарат обладает биологической активностью, которая соответствует по меньшей мере 50%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, биологической активности контрольного препарата. В некоторых вариантах осуществления контрольный препарат не подвергался обработке, достаточной для инактивации вируса без оболочки. В некоторых вариантах осуществления, по большей части, инактивированный вирус без оболочки представляет собой свиной парвовирус (PPV). В некоторых вариантах осуществления один или несколько ферментов включают панкреатин. В некоторых вариантах осуществления один или несколько ферментов выделяют из ткани млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления ткань млекопитающего представляет собой облученную электронным лучом ткань млекопитающего.

Другой аспект настоящего изобретения включает фармацевтическую композицию, содержащую один или несколько ферментов, выделенных из ткани млекопитающего, которая была подвергнута обработке для снижения риска вирусного и микробного загрязнения, причем композиция обладает биологической активностью, которая соответствует по меньшей мере 50%, предпочтительно, по меньшей мере 90% биологической активности контрольной композиции. В некоторых вариантах осуществления один или несколько ферментов содержат липазу. В некоторых вариантах осуществления контрольная композиция содержит необработанный образец ткани млекопитающего, соответствующий ткани млекопитающего, который был подвергнут обработке для снижения риска вирусного и микробного загрязнения. В некоторых вариантах осуществления обработка включает электронно-лучевое излучение. В некоторых вариантах осуществления электронно-лучевое излучение имеет дозу от около 5 до около 50 кГр, предпочтительно от около 10 до около 40 кГр.

Другой аспект настоящего изобретения включает способ получения продукта панкреатина, включающий стадии: (а) обеспечение тканью поджелудочной железы млекопитающего; (б) облучение ткани поджелудочной железы электроннолучевым излучением для получения облученной ткани поджелудочной железы; и (в) выделение панкреатина из облученной ткани поджелудочной железы для получения продукта панкреатина. В некоторых вариантах осуществления биологическая активность продукта панкреатина, полученного на стадии (в), соответствует по меньшей мере 50%, предпочтительно, по меньшей мере 90% биологической активности контрольного продукта панкреатина. В некоторых вариантах осуществления контрольный продукт поджелудочной железы получают из необлученной ткани поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления электронно-лучевое излучение достаточно для снижения вирусной нагрузки по меньшей мере на три \log_{10} , предпочтительно, по меньшей мере на четыре \log_{10} . Например, обработка является достаточной для снижения вирусной нагрузки по меньшей мере на три \log_{10} , предпочтительно, по меньшей мере на четыре \log_{10} снижения вирусной нагрузки PPV относительно необлученного контрольного образца. В некоторых вариантах осуществления электронно-лучевое излучение имеет дозировку от около 5 до около 50 кГр, предпочтительно от около 10 до около 40 кГр. В некоторых вариантах осуществления биологическая активность представляет собой липазную активность. В некоторых вариантах осуществления биологическая активность представляет собой протеазную активность или амилазную активность.

Другой аспект настоящего изобретения включает способ переваривания белков, включающий стадии: (а) получения ферментного или проферментного препарата, выделенного из ткани животных, облу-

ченной пучком электронов; и (б) контактирование белка с ферментным или проферментным препаратом в условиях, достаточных для усвоения белка. В некоторых вариантах осуществления стадия контактирования происходит *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления стадия контактирования происходит *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления тканью животного является поджелудочная железа свиньи. В некоторых вариантах осуществления переваримый белок используется для приготовления белкового гидролизатного продукта. В некоторых вариантах осуществления ферментный или проферментный препарат, полученный из ткани животных, облученной электронно-лучевым излучением, демонстрирует снижение вирусной нагрузки по меньшей мере на три \log_{10} , предпочтительно, по меньшей мере на четыре \log_{10} , по сравнению с контрольным ферментным или проферментным препаратом, полученным из необлученной ткани животных. В некоторых вариантах осуществления ферментный или проферментный препарат, полученный из облученной электронным лучом ткани животного, проявляет биологическую активность, соответствующую по меньшей мере 50%, предпочтительно, по меньшей мере 90% биологической активности контрольного ферментного или проферментного препарата, полученного из необлученной ткани животных.

Другой аспект настоящего изобретения включает ферментный препарат, содержащий один или несколько ферментов, выделенных из облученной пучком электронов ткани поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления ткань поджелудочной железы представляет собой поджелудочную железу свиньи. В некоторых вариантах осуществления поджелудочная железа свиньи замораживается и механически перерабатывается в хлопья или блоки перед облучением. Таким образом, в некоторых таких вариантах осуществления ткань поджелудочной железы, подвергаемая электронно-лучевому облучению, представляет собой хлопья замороженной ткани поджелудочной железы или замороженный блок ткани поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления поджелудочная железа свиньи представляет собой целую железу или ее часть, такую как одна или несколько долей. В некоторых вариантах осуществления один или несколько ферментов представляют собой панкреатин. В некоторых вариантах осуществления ферментный препарат демонстрирует снижение вирусной нагрузки по меньшей мере на три \log_{10} , предпочтительно, по меньшей мере на четыре \log_{10} по сравнению с контрольным ферментным препаратом. Например, ферментный препарат демонстрирует снижение вирусной нагрузки PPV по меньшей мере на три \log_{10} , предпочтительно, по меньшей мере на четыре \log_{10} относительно контрольного ферментного препарата. В некоторых вариантах осуществления биологическая активность ферментного препарата соответствует по меньшей мере 50%, предпочтительно, по меньшей мере 90% биологической активности контрольного ферментного препарата. В некоторых вариантах осуществления биологическая активность представляет собой липазную активность. В некоторых вариантах осуществления биологическая активность представляет собой протеазную активность или амилазную активность. В некоторых вариантах осуществления контрольный ферментный препарат получают из необлученной ткани. В некоторых вариантах осуществления снижение вирусной нагрузки представляет собой независимое снижение.

Другой аспект настоящего изобретения включает способ лечения экзокринной недостаточности поджелудочной железы, включающий: введение дозы любого из вышеуказанных ферментных препаратов и/или фармацевтических композиций субъекту, нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах осуществления экзокринная недостаточность поджелудочной железы обусловлена кистозным фиброзом или хроническим панкреатитом.

Ф. Примеры.

Пример 1. Электронно-лучевое облучение свиного парвовируса (PPV), панкреатина АФИ и поджелудочной железы свиньи.

Материалы и методы.

Свиной парвовирус во флаконах в культуральной жидкости. Так как сама ткань железы свиньи может оказывать некоторое инактивирующее воздействие на вирусы, первоначально образцы вируса, использованные для этих исследований, были получены из загрязненных клеточных культур. Свиной парвовирус (PPV), штамм NADL-2 (ATCC® VR-742™) и клетки Pig Testis (ST) (ATCC® CRL-1746™) были приобретены в Американской коллекции типовых культур (ATCC). PPV размножали, культивировали и поддерживали в соответствии с рекомендациями ATCC. PPV размножали до приблизительного титра вируса 10^8 инфекционных единиц (IU)/мл. Вирус собирали из клеток, подвергшихся лизису, в среде для культивирования клеток, состоящей из минимальной питательной среды (МПС), 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), 2 мМ глутамин, 100 единиц/мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина.

PPV упаковывали во флаконы, а затем упаковывали второй раз перед отправкой. Флаконы представляли собой криогенные флаконы Nalgene (т.е., полипропилен с крышкой из полиэтилена высокой плотности (ПЭВП) с наружной резьбой с герметичным уплотнительным кольцом длиной 1,87 дюйма; диаметром 0,5 дюйма; емкостью 2,0 мл; объемом наполнения 1,0 мл). Каждый отдельный флакон помещали в пакет Food Saver (полиэтилен с наружным слоем нейлона) и герметизировали в вакууме. Пакеты обрезают так, чтобы они точно подходили к флакону. Четыре индивидуально запечатанных флакона затем помещали в другой пакет Food Saver (приблизительно 11×14") и герметизировали в вакууме.

Замороженные поджелудочные железы свиньи в виде хлопьев. Поджелудочные железы, полученные от убойной свиньи (Animal Technologies, Tyler, TX), хранили на сухом льду.

Замороженные хлопьеобразные поджелудочные железы свиньи помещали в контейнер 12"×12"×1³/₄" (прозрачный полипропилен), который герметично упаковывали в вакууме в прозрачный нейлоновый пакет 3 мил. Пакет герметизировали термосваркой. Поджелудочные железы удерживали на сухом льду для обеспечения температуры ниже -20°C. Вес образца замороженных хлопьев поджелудочной железы свиньи составлял 1,05 кг плюс вес упаковки 270 г (0,27 кг). Вес крышки 100 г. Поверхностная плотность составляла 1,3 г/см². Для каждой дозы облучения были изготовлены две упаковки, включая контроль без облучения, одна упаковка без повреждения использовалась для выделения ферментного препарата после транзита обратно на участок, где проводилось выделение, а другая упаковка была резервной.

Панкреатин (АФИ). Использовали два типа панкреатина АФИ: панкреатин N и панкреатин S. Оба АФИ хранили в условиях окружающей среды. Панкреатин N (материал №1030828, Abbott Laboratories) представляет собой порошок от светло-желтого/серого до не совсем белого цвета. Панкреатин N происходил из поджелудочной железы убойной свиньи. Панкреатин S (материал №1030829, Abbott Laboratories) представляет собой порошок от светло-желтого/серого до не совсем белого цвета. Панкреатин S произошел из поджелудочной железы самки свиньи.

Панкреатин АФИ помещали в контейнер размером 2¹/₂"×3¹/₂"×1⁵/₈" (прозрачный полипропилен), который герметично упаковывали в вакууме в прозрачный нейлоновый пакет 3 мил. Пакет герметизировали термосваркой. Вес образца панкреатина АФИ составлял 80 г плюс вес упаковки 26 г. Поверхностная плотность составляла 1,4 г/см². Образцы панкреатина N подвергались электроннолучевому облучению в указанной дозе. Контрольный образец не подвергался воздействию электронного луча. Панкреатин N анализировали на активность после транзита обратно на экспериментальную площадку. Панкреатин N был получен от убойной свиньи. Все упаковки с панкреатином N прибыли без повреждений с места облучения.

Электронно-лучевое излучение.

Источником электронно-лучевого излучения был линейный ускоритель электронов для обработки промышленных материалов (IMPELA®; Iotron Industries, Inc. Columbia City, IN), 10 МэВ, ширина сканирования 80 см.

Образцы упакованной замороженной хлопьеобразной поджелудочной железы свиньи и свиного парвовируса выдерживали при температуре ниже -20°C, помещая на сухой лед, находящийся в алюминиевом лотке. Дозиметры были размещены на верхней поверхности каждого образца. Образцы упакованного панкреатина АФИ, выдерживаемого при температуре окружающей среды, помещали на лист пенополистирола, дозиметры размещали на верхней поверхности. Упаковки были отправлены на конвейерную ленту под электроннолучевым излучением. После одного прохода облучения дозиметры были извлечены. Упаковки были отправлены на второй проход после переворачивания упаковки (верхняя сторона теперь обращена вниз), и на верхней поверхности был установлен новый дозиметр.

После второго прохода облучения были извлечены упаковки и дозиметры. Замороженные хлопья поджелудочной железы свиньи и упаковки свиного парвовируса извлекали и помещали на сухой лед для отправки. Пакеты с панкреатином АФИ извлекали и хранили при температуре окружающей среды для отправки. Контрольные пакеты с замороженными хлопьями поджелудочной железой и свиным парвовирусом, помещенные на сухой лед, были подготовлены для повторной отправки на сухом льду без облучения. Контрольные пакеты с панкреатином АФИ, хранящиеся при температуре окружающей среды, были подготовлены для повторной отправки при температуре окружающей среды без облучения. Дозировка электронного луча рассчитывалась по экспозиции дозиметра с использованием калибровочной кривой.

Тестирование на уровень вирусного загрязнения.

Уровень вирусного загрязнения определяли титрованием с десятикратным разбавлением в микропланшетах с 96 лунками с использованием соответствующих контрольных образцов в трех параллельных опытах при каждой дозе энергии. Титры вируса рассчитывали с использованием метода Рида и Менча, описанного в Reed, L.J.; Muench, H. (1938). "A simple method of estimating fifty percent endpoints". The American Journal of Hygiene 27: 493-497 и выражается в виде 50% TCID₅₀ на мл.

Выделение и тестирование панкреатина.

Способ, используемый для выделения панкреатина, по большей части аналогичен тому, который описан в патенте США №4623624, который включает гидролиз и/или автолиз, с последующим фильтрованием волокон, осаждением ферментов, отделением осадка фильтрацией и/или центрифугированием, промыванием осадка, сушкой и уменьшением размера частиц. Гидролиз проводили с использованием одной упаковки, соответствующей каждой дозе облучения, включая необлученные контрольные образцы. Упаковка без повреждения пакета (например, большие трещины) была выбрана для каждого эксперимента по выделению.

Благодаря осторожности, предпринятой во время транзита обратно на место проведения экспери-

мента, все упаковки были без повреждений, и одна упаковка была выбрана случайным образом для каждой дозы облучения, включая контрольный образец для выделения. Панкреатин из более раннего выделения использовали в качестве источника протеазы для начала гидролиза. Гидроксид кальция использовали для подачи ионов кальция, необходимых для активации протеаз. Бикарбонат натрия используется в качестве буферного агента для гидролиза. Симетикон использовали в качестве антивспенивающего агента. Гидролиз поджелудочной железы проводили при температуре близкой к температуре окружающей среды. Завершение гидролиза проверяли центрифугированием гидролизованной смеси после добавления изопропанола, как описано ниже. После завершения гидролиза добавляли дополнительное количество изопропанола для снижения скорости гидролиза, смесь охлаждали, перемешивали и волокна разделяли с использованием сетки 0,425 дюйма. Волокна промывают изопропанолом и сжимают, чтобы удалить удерживаемую жидкость. Раствор после промывки объединяли с фильтратом, полученным ранее. Дополнительный изопропанол был добавлен к фильтрату, чтобы вызвать осаждение ферментов. Суспензию фильтровали через фильтровальную салфетку с отверстиями 15 микрон и промывали с увеличением концентрации изопропанола до абсолютного изопропанола в качестве конечной промывки. Осадок высушивали на фильтровальной салфетке в атмосфере азота, при этом вытягивая вакуумом под фильтровальной салфеткой, пока осадок визуально не стал сухим (цвет осадка становится светлее после удаления изопропанола и воды). Осадок отделяли от фильтровальной салфетки и сушили в вакууме и потоке азота при температуре ниже 50°C до содержания воды по методу К. Фишера 3,5% или ниже. Выход сухого панкреатина составляет от 80 до 100 г на 1 кг замороженных хлопьев поджелудочной железы из убойной свиньи.

Центрифугирование для завершения гидролиза. Отобрать три мерных ложки объемом около 10 мл из емкости для гидролиза и пропустить через сито 0,425 мм, собрать фильтрат в пластмассовый стакан, отбросить волокна, оставшиеся на сетке. Используя пипетку, добавить 10 г раствора из реактора в пробирку для центрифуги объемом 50 мл, добавить 5,5 мл IPA 85%, перемешивать в течение 1 минуты с помощью шпателя. Добавить 20 мл IPA 85% для фильтрации в пробирку для центрифуги объемом 50 мл. Перемешивать в течение одной минуты с помощью шпателя. Центрифугировать суспензию примерно при 90 об/мин в течение двух минут.

Первый образец может быть взят через два часа после начала гидролиза или, когда цвет меняется с розового на коричневатый, и суспензия становится более жидкой (около 2 часов).

Следующий образец берется, когда цвет становится коричневым без розового оттенка, в этот момент ожидается, что осадка будет около 25%, осадок будет менее твердым, и остатки могут присутствовать в прозрачном слое. После этого отбор проб может производиться каждые полчаса, насколько это возможно.

Гидролиз прекращают, если два последующих измерения показывают менее 20% осадков. В этот момент осадок будет твердым и без остатков в прозрачном слое.

Двустороннее электронно-лучевое облучение флаконов PPV проводили в 3 параллельных опытах. Данные по снижению вирусной нагрузки и уменьшению логарифма числа PPV, подвергнутого электронно-лучевому облучению, приведены в табл. 1.

Таблица 1

Дозировка (кГр)	0	9,5	19,25	38,45	0	9,5	19,25	38,45
	Вирусная нагрузка	Вирусная нагрузка	Вирусная нагрузка	Вирусная нагрузка	Уменьшение логарифма	Уменьшение логарифма	Уменьшение логарифма	Уменьшение логарифма
	Титр вируса/мл	Титр вируса/мл	Титр вируса/мл	Титр вируса/мл				
Опыт А	1,50E+08	2,50E+06	1,50E+05		0,00E+00	1,78E+00	3,00E+00	
Опыт В	1,50E+08	6,34E+06	6,34E+04		0	1,37E+00	3,37E+00	
Опыт С	4,00E+08	1,26E+06	4,00E+05	1,50E+02	0	2,50E+00	3,00E+00	6,43E+00
Среднее					0	1,88E+00	3,12E+00	6,43E+00

Дозировку электронно-лучевого излучения определяли путем оценки дозы, поглощенной каждым образцом, из поверхностной дозы, как указано дозиметром, прикрепленным к контейнеру для образца.

В табл. 1 показано, что воздействие на PPV до 40 кГр обеспечивает снижение до 3 \log_{10} , основываясь на этих данных, ожидается, что воздействие около 30 кГр обеспечит снижение по меньшей мере 4 \log_{10} .

Воздействие на PPV до около 60 кГр, около 80 кГр или около 100 кГр привело к конечным титрам вируса ниже предела обнаружения анализа.

Панкреатин был проверен на свободную протеазную, амилазную и липазную активность, как описано в фармакопее США, с помощью валидированных методов. Панкреатин был проверен на общую протеазу, как описано в Европейской Фармакопее (ЕФ), с помощью валидированных методов.

Было проведено двустороннее электронно-лучевое облучение панкреатина N. Все контейнеры с панкреатином N были получены без повреждений на экспериментальной площадке и использовались для анализа. Данные по ферментативной активности панкреатина АФИ, подвергнутого воздействию элек-

тронно-лучевого излучения, приведены в табл. 2.

Таблица 2

Дозировка электронно-лучевого излучения	Липазная активность	Амилазная активность	Общая протеазная активность	Свободная протеазная активность
кГр	Единицы USP/грамм	Единицы USP/грамм	Единицы USP/грамм	Единицы USP/грамм
Контрольный образец (0 кГр)	89106	564390	383192	314093
18,6 кГр	63328	398752	321567	266540
37,45 кГр	58631	386628	302341	244531
56,5 кГр	47755	282378	272499	232087
76,35 кГр	40583	272760	259117	214914
99,4 кГр	37799	286652	247005	196356

Табл. 2 показывает, что воздействие на панкреатин АФИ около 20 кГр обеспечивает потерю липазной активности примерно на 30%, воздействие на панкреатин АФИ около 40 кГр обеспечивает потерю липазной активности примерно на 35%, воздействие на панкреатин АФИ около 60 кГр обеспечивает потерю липазной активности примерно на 46%, воздействие на панкреатин АФИ около 80 кГр обеспечивает потерю липазной активности примерно на 54%, а воздействие на панкреатин АФИ около 100 кГр обеспечивает потерю липазной активности примерно на 58%. На основании этих данных ожидается, что воздействие на панкреатин АФИ до 30 кГр обеспечит потерю липазной активности по меньшей мере на 30%.

Было выполнено двухстороннее электронно-лучевое облучение поджелудочной железы свиньи. Данные по ферментативной активности панкреатина, полученного из замороженных хлопьев поджелудочной железы свиньи, подвергшейся воздействию электронно-лучевого облучения, приведены в табл. 3.

Таблица 3

Дозировка электронно-лучевого излучения	Липазная активность	Амилазная активность	Общая протеазная активность	Свободная протеазная активность
кГр	Единицы USP/грамм	Единицы USP/грамм	Единицы USP/грамм	Единицы USP/грамм
Контрольный образец (0 кГр)	74986	423487	243421	151365
18,75 кГр	74741	449569	337594	128749
35,5 кГр	65348	349816	360407	128506
56,55 кГр	57976	398281	268297	119727
77,4 кГр	34806	251691	175994	109158
100,4 кГр	36362	276118	206217	100342

Табл. 3 показывает, что воздействие на замороженную поджелудочную железу свиньи в виде хлопьев около 20 кГр обеспечивает потерю липазной активности примерно на 1%, воздействие на замороженную поджелудочную железу свиньи в виде хлопьев около 40 кГр обеспечивает потерю липазной активности примерно на 13%, воздействие на замороженную поджелудочную железу свиньи в виде хлопьев около 60 кГр обеспечивают потерю липазной активности примерно на 23%, воздействие на замороженную поджелудочную железу свиньи в виде хлопьев около 80 кГр обеспечивает потерю липазной активности примерно на 54% и воздействие на замороженную поджелудочную железу свиньи в виде хлопьев около 100 кГр обеспечивает потерю липазной активности примерно на 52%. На основании этих данных ожидается, что воздействие на замороженную поджелудочную железу свиньи в виде хлопьев около 30 кГр приведет к потере липазной активности примерно на 10%.

Как показано в табл. 2 и 3, электронно-лучевое облучение панкреатина АФИ вызывает большую потерю активности фермента по сравнению с электронно-лучевым облучением ткани поджелудочной железы перед выделением. Без привлечения теории отметим, что устойчивость незагрязненной ткани к электронно-лучевому облучению может быть обусловлена конформацией фермента (например, в виде профермента) в исходной ткани и/или кофакторами в исходной ткани, обеспечивающими структурную защиту.

Пример 2. Электронно-лучевое облучение целой поджелудочной железы свиньи.

Дальнейшее исследование было выполнено с использованием целой свиной поджелудочной железы. Приблизительно 3,6 кг оттаявшей поджелудочной железы свиньи упаковывали в картонные коробки, покрытые воском, толщиной примерно 10×15×1,5 дюйма. Коробки замораживали до -20°C и хранили до использования для электронно-лучевого облучения. Коробки были отправлены для электроннолучевого

облучения в автохолодильниках с режимом заморозки (-20°C). Коробки извлекали из автохолодильника и затем подвергали двухстороннему электроннолучевому облучению - необлученные коробки были в качестве контрольного образца. Пять (5) коробок использовались для каждой номинальной дозы облучения: 0, 15, 20 и 25 кГр и отправлялись обратно для оценки в автохолодильниках с режимом заморозки (-20°C), включая необлученные коробки, а затем выдерживались при -20°C.

Образцы замороженной поджелудочной железы отбирали из каждой коробки в случайных местах внутри коробки для последующего выделения панкреатина. Выделение была выполнено согласно настоящему описанию. Панкреатин, выделенный из облученной электронным лучом целой поджелудочной железы, затем тестировали на ферментную активность в соответствии с колориметрическим анализом.

Образцы панкреатина (АФИ) тестировали с использованием колориметрического кинетического анализа с помощью микропланшетного анализатора с использованием субстратов, структурно аналогичных тем, которые используются в фармакопее USP 39 <Pancrelipase>. Ферментную активность определяли путем измерения скорости продуцирования продукта относительно референтного препарата панкреатипазы. Аналитическая сопоставимость была продемонстрирована между методами из фармакопейной статьи USP и альтернативными методами микропланшетного анализатора.

Процедуры отбора проб, выделения и анализа повторяли четыре раза для каждой дозы, чтобы получить в общей сложности пять измерений для каждой дозы. Средние значения пяти измерений приведены в табл. 4.

Таблица 4

Ферментная активность АФИ после облучения целых поджелудочных желез

Дозировка электронно-лучевого излучения*	Средняя липазная активность	Средняя амилазная активность	Средняя общая протеазная активность	Средняя свободная протеазная активность
кГр	Единицы USP/грамм	Единицы USP/грамм	Единицы USP/грамм	Единицы USP/грамм
Контрольный образец (0 кГр)	104	456	197	344
14,9 кГр	99	435	201	291
19,9 кГр	106	411	200	316
24,9 кГр	104	395	183	301

* (минимальная доза + максимальная доза)/2.

Табл. 4 показывает, что панкреатин, выделенный из целой поджелудочной железы, подвергшейся воздействию электронно-лучевого облучения около 25 кГр, имеет такую же или по большей части такую же липазную активность, что и панкреатин, выделенный из необлученного контрольного образца.

Пример 3. Воздействие малой дозы электронно-лучевого облучения на незагрязненную ткань поджелудочной железы свиньи.

Дальнейшие исследования проводились путем добавления в ткань поджелудочной железы свиньи живого вируса, а затем воздействия на ткань, загрязненную вирусом, электронно-лучевого облучения при более низкой дозе (около 12,3 кГр), чтобы обеспечить восстановление вируса и оценку. Эта дополнительная работа была проделана для демонстрации эффективной инактивации нескольких родственных вирусов при низких дозах, что позволило бы эффективно подсчитать воздействие электронно-лучевого облучения.

Отобранные вирусы были намеренно добавлены в образец ткани, и степень вирусного клиренса была оценена путем сравнения количества введенного вируса с количеством вируса, оставшегося после обработки электронным лучом. Вирусы, отобранные для этого исследования, указаны в табл. 5.

Таблица 5

Вирусы, отобранные для изучения вирусного клиренса

Вирус	Семейство	Геном	Оболочка	Размер (нм)	Физико-химическая устойчивость
Реовирус 3 типа (REO3)	Reo	РНК	Нет	60-80	Средняя
Свиной парвовирус (PPV)	Parvo	ДНК	Нет	18-24	Высокая
Кошачий калицивирус (FCV)	Calici	РНК	Нет	35-39	Средняя

REO3 имеет двухцепочечную РНК, сегментированный геном и относится к семейству вирусов Reoviridae, которое также включает ротавирус. Таким образом, REO3 может служить моделью для ротавируса. FCV использовался в качестве модельного вируса для валидации методов инактивации в кровепродуктах и, в частности, в качестве модели вируса гепатита E (HEV).

Поджелудочные железы свиньи были нарезаны и измельчены. Затем ткань добавляли в чашку Петри и добавляли указанный вирус. Стандартные запасы вирусов имели сертифицированные титры не менее 1×10^7 БОЕ/мл. Образец с добавками инкубировали при комнатной температуре в течение минимум 60 минут (пока ткань не вернулась к своей первоначальной сухости). После инкубации в чашку добавляли дополнительную ткань поджелудочной железы свиньи. Чашка была запечатана и помещена на сухой лед для отправки на установку электроннолучевого облучения. Каждая чашка содержала приблизительно 13 граммов ткани, и плотность ткани была аналогична плотности целой железы.

Для каждого вируса были включены образцы с добавками для восстановления (не отправленные) и необлученные контрольные образцы (отправленные на установку электронно-лучевого облучения, но не облученные).

Электронно-лучевое облучение проводилось на установке электроннолучевого облучения. После завершения электронно-лучевого облучения облученные образцы и необлученные контрольные образцы были отправлены обратно для оценки вирусной нагрузки. После получения образцы хранили при $\leq -60^\circ\text{C}$ до испытания.

Для каждого образца в стерильный флакон добавляли 50 мл культуральной среды. Ткань извлекали, выполняя замачивание 3 раза в течение приблизительно 5-10 минут при комнатной температуре с последующим перемешиванием на вортексе в течение 15-30 секунд. Затем образцы центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут. Супернатант от экстракции использовали для тестирования вирусов.

Титры вируса определяли с помощью стандартных анализов бляшкообразования. Тип индикаторной ячейки для REO3, PPV и FCV были Vero, PT-1 и CRFK, соответственно. Титры вируса и коэффициент вирусного клиренса рассчитывали в соответствии со стандартными процедурами. Коэффициент клиренса вируса (VCF) рассчитывали следующим образом:

$$VCF = \log_{10} \left(\frac{\text{Объем} * \text{титр до обработки}}{\text{Объем} * \text{титр после обработки}} \right)$$

Данные по вирусному клиренсу, полученному при воздействии на ткань электронно-лучевого облучения, приведены в табл. 6.

Таблица 6

Модельный вирус	Логарифм общего количества вирусов		VCF	95% Доверительный интервал
	До обработки	После обработки		
REO3	6.5	<2.4	≥ 4.1	0.08
FCV	6.7	4.9	1.8	0.05
PPV	5.8	3.6	2.2	0.29

Эти исследования подтвердили, что достаточная инактивация вирусов, включая кошачий калицивирус (FCV) и реовирус 3 (REO3), может быть достигнута с помощью электронно-лучевого облучения незагрязненной ткани. Кроме того, облучение поджелудочной железы с последующим выделением ферментного препарата (например, панкреатина АФИ) из облученной железы в отношении потери ферментной активности по сравнению с необлученным контрольным образцом показало результаты, аналогичные тем, которые показаны в табл. 3, где была использована хлопьеобразная поджелудочная железа свиньи.

Пример 4. Электронно-лучевое облучение измельченной ткани и гомогенизированной ткани.

Измельченная поджелудочная железа: замороженные поджелудочные железы свиньи измельчают в куттере и затем замораживают для облучения, согласно настоящему описанию.

Гомогенизированная поджелудочная железа: замороженные поджелудочные железы свиньи измельчают в куттере, как описано выше, и перемешивают в воде при температуре $10^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ до однородной смеси (около 75 мин). Образцы впоследствии замораживают для облучения, согласно настоящему описанию.

В качестве контрольного конечного продукта панкреатин использовали в виде порошка терапевтического качества в соответствии со спецификацией Европейской фармакопеи. Порошок панкреатина получали непосредственно от производителя (Abbott Laboratories GmbH, Neustadt, Germany) и отбирали пробы у производителя. Панкреатин для терапевтического применения (согласно Европейской фармакопее) также коммерчески доступен, например, от Nordmark, Uetersen, Germany или BIOZYM Gesellschaft für Enzymtechnologie mbH, Hamburg, Germany, и/или может быть произведен в соответствии с известными способами (см., например, EP-A2 115023).

Для обработки облучением образцы извлекали из морозильной камеры или холодильника и поме-

шали в охлаждающие устройства для поддержания температуры, как описано ниже. Температурный диапазон контролировали и, при необходимости, проводили дополнительные этапы охлаждения. Так как использование термометра с замороженными образцами невозможно, для определения поверхностной температуры использовали тепловизионную камеру (Testo 880-3, Testo AG Lenzkirch, Germany).

Гомогенизированные образцы ткани поджелудочной железы размораживали и облучали при температуре выше 0°C ($T > 0^\circ\text{C}$), но ниже 20°C. Образцы панкреатина брали из холодильника и облучали при $T > 0^\circ\text{C}$.

Образцы подвергали воздействию электронно-лучевого облучения с использованием электронного ускорителя Rhodotron TT-100 10 МэВ 35 кВт (IBA Industrial, Louvain-La-Neuve, Belgium). Процесс облучения проходил поэтапно. Коробки для образцов проходили ускоритель с шагом 5 или 10 кГр до достижения необходимой дозы. Например, образцы, запланированные для более низких доз, были удалены на более ранних этапах, а образцы, запланированные для более высоких доз, были повторно подвергнуты облучению.

Ферментативные активности (т.е. липолитическая, протеолитическая, амилолитическая активность) тестируемых образцов перед облучением ("образцы для предварительной обработки") определяли в соответствии с Европейской фармакопеей относительно соответствующих референтных препаратов и взятых в качестве начальных ферментативных (липолитических, протеолитических, амилолитических, в зависимости от обстоятельств) активностей перед облучением. Впоследствии образцы для испытания облучали, согласно настоящему описанию. Ферментативные активности тестируемых образцов после облучения определяли ("образцы после обработки") таким же образом, как и для образцов до обработки. Сохраненные ферментативные активности в образцах после обработки были определены и представлены как относительный процент той же ферментативной активности, определенной в образце до обработки.

Липазную активность определяли следующим образом, как описано в Европейской фармакопее: необходимое количество тестируемого образца (в зависимости от ожидаемой активности, приблизительно 2,5 г) измельчали (например, дробили или мололи в зависимости от состояния/консистенции тестируемого образца) и непосредственно экстрагируется буферным раствором. Гидролитическую липазную активность определяют с помощью эмульсии оливкового масла в качестве субстрата. Свободные жирные кислоты, отщепленные от триглицеридов оливкового масла, титруют раствором гидроксида натрия при постоянном pH 9,0. Липазную активность образца определяют путем сравнения скорости, с которой суспензия образца гидролизует субстрат эмульсии оливкового масла, со скоростью, с которой суспензия стандартного референтного порошка поджелудочной железы (референтный препарат Европейской фармакопеей, как описано в фармакопейной статье "pancreas powder (lipase) BRP") гидролизует один и тот же субстрат в тех же условиях.

Значения потери липазной активности приведены в табл. 7.

Таблица 7

Ферментативная активность после облучения измельченной и гомогенизированной тканей

Дозировка электронно- лучевого излучения (кГр)	Потеря липазной активности (%)		
	Панкреатин (конечный продукт)	Измельченная ткань поджелудочной железы	Гомогенизированная ткань
10	24.0	ни	7.8
15	30.3	13.1	11.3
20	35.0	10.9	11.4
25	ни	19.8	ни
30	42.5	18.5	16.9
40	48.9	ни	24.3
50	53.6	ни	29.7

"ни": не испытан.

Облучение измельченной ткани или гомогенизированной ткани (т.е. до химической или ферментативной обработки популяции проферментов в активную форму) последовательно приводило к улучшению сохранения ферментативной активности относительно облучения конечного продукта. Облучение в диапазоне от 20 до 30 кГр привело к потере активности менее, чем на 20%, что ниже, чем достигается стандартными протоколами.

Пример 5. Электронно-лучевое облучение измельченной ткани с добавлением *V. Cereus*.

Поджелудочную железу, замороженную после измельчения, размораживают, упаковывают в стерильные полистироловые чашки Петри 50×9 мм (Ted Pella, Inc., Redding, CA, item 14014) с добавлением

ок. 10^8 КОЕ эндоспор *B. cereus* из имеющейся в продаже предварительно титрованной суспензии (*B. cereus* ATCC 14579, Mesa Labs, Bozeman, MT), запечатывают в вакуумный мешок ("seal-a-meal") и затем замораживают.

В настоящем эксперименте с измельченной поджелудочной железой был выбран диапазон уровней дозирования электронно-лучевого облучения от 0 до 20 кГр с шагом 5 кГр. Пакеты были отправлены для электронно-лучевого облучения на сухом льду. Пакеты подвергались электронно-лучевому облучению - не отправленные пакеты и необлученные пакеты служили в качестве контрольных образцов.

Образцы будут возвращены на сухой лед. Все образцы затем разбавляют и высевают на чашки с триптиказо-соевым агаром (Biomegieux item M1040) для подсчета КОЕ. Планшеты инкубируют при 30-35°C в течение 1-2 дней, пока колонии не будут иметь исчисляемый размер. Подсчет КОЕ будет записан.

Введение стадии деконтаминации перед обработкой поджелудочной железы свиньи обеспечивает эффективный контроль известных инфекционных агентов как с точки зрения безопасности оператора при выделении ферментов, так и безопасности пациента. Таким образом, использование электронно-лучевой обработки, которая эффективна для инактивации широкого спектра бактерий и вирусов, включая трудно инактивируемые вирусы (например, свиной парвовирус) и спорообразующие бактерии, с минимальной потерей ферментативной активности по другим методам.

В контексте данного документа, этап электронно-лучевого облучения можно считать этапом независимой вирусной инактивации. Снижение микробной и/или вирусной нагрузки, полученное в ткани поджелудочной железы, облученной электронным лучом, переносится на панкреатин, который выделен из нее аддитивным способом, по сравнению со снижением, полученным на других этапах снижения микробной и/или вирусной нагрузки. Полное снижение \log_{10} , достигнутое всеми этапами, включая электронно-лучевое облучение, представляет собой совокупное уменьшение \log_{10} , достигнутое всеми этапами инактивации бактерий и/или вирусов, выполняемыми на ткани поджелудочной железы.

Существует договоренность в отношении того, что вышеприведенное подробное описание и сопровождающие примеры являются только иллюстративными и не должны рассматриваться как ограничения объема изобретения, который определяется исключительно прилагаемой формулой изобретения и ее эквивалентами. Различные изменения и модификации раскрытых вариантов осуществления будут очевидны для специалистов в данной области техники. Такие изменения и модификации, включая без ограничения те, которые относятся к химическим структурам, заместителям, производным, промежуточным соединениям, синтезам, составам или способам, или любую комбинацию таких изменений и модификаций использования изобретения, могут быть сделаны без отклонения от его сущности и объема.

Все ссылки (патентные и непатентные), цитированные выше, включены посредством ссылки в данную патентную заявку. Обсуждение этих ссылок предназначено только для обобщения утверждений, сделанных их авторами. Не допускается, что какая-либо ссылка (или часть какой-либо ссылки) относится к предшествующему уровню техники (или вообще к уровню техники). Заявитель оставляет за собой право оспаривать точность и уместность цитируемых ссылок.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Ферментный препарат, полученный способом, включающим стадии:

(a) воздействие на измельченную или гомогенизированную ткань поджелудочной железы млекопитающего электронно-лучевого облучения для получения облученной ткани поджелудочной железы, причем электронно-лучевое облучение является достаточным для снижения нагрузки модельного вируса и бактерии по меньшей мере на три \log_{10} по сравнению с контрольным образцом; и

(b) выделение панкреатина из облученной ткани поджелудочной железы;

в котором модельным вирусом является свиной парвовирус (PPV) и модельной бактерией является *Bacillus cereus*, и

в котором ферментативная активность панкреатина, полученного на стадии (b), соответствует по меньшей мере 80% ферментативной активности необлученного препарата.

2. Ферментный препарат по п.1, в котором электронно-лучевого облучения достаточно для снижения нагрузки модельного вируса или бактерии по меньшей мере на четыре \log_{10} по сравнению с контрольным образцом.

3. Ферментный препарат по любому из пп.1-2, в котором стадия (b) включает поддержание облученной ткани поджелудочной железы при температуре от около 0 до около 20°C.

4. Ферментный препарат по любому из пп.1-3, в котором ферментативная активность препарата, полученного на стадии (b), соответствует по меньшей мере 90% ферментативной активности необлученного препарата.

5. Ферментный препарат по п.4, в котором ферментативная активность представляет собой липазную активность.

6. Ферментный препарат по любому из пп.1-5, в котором электронно-лучевое излучение имеет дозировку от около 5 до около 50 кГр.

7. Ферментный препарат, содержащий один или несколько ферментов, выделенных из измельчен-

ной или гомогенизированной ткани поджелудочной железы, облученной пучком электронов, причем электронно-лучевое облучение является достаточным для снижения нагрузки модельной бактерии по меньшей мере на три \log_{10} по сравнению с контрольным образцом, в котором модельной бактерией является *Vacillus cereus* и в котором ферментативная активность панкреатина соответствует по меньшей мере 80% ферментативной активности необлученного препарата.

8. Ферментный препарат по п.7, в котором один или несколько ферментов содержат панкреатин.

9. Ферментный препарат по п.7 или 8, в котором ферментативная активность препарата соответствует по меньшей мере 90% ферментативной активности необлученного препарата.

10. Ферментный препарат по п.9, в котором биологическая активность представляет собой липазную активность.

11. Способ получения панкреатина, включающий стадии:

(а) облучение измельченной или гомогенизированной ткани поджелудочной железы млекопитающих пучком электронов для получения облученной ткани поджелудочной железы; и

(б) выделение панкреатина из облученной ткани поджелудочной железы,

в котором электронно-лучевое излучение является достаточным для снижения уровня микробной нагрузки модельной бактерии по меньшей мере на три \log_{10} по сравнению с контрольным образцом, причем модельной бактерией является *Vacillus cereus*, и в котором ферментативная активность препарата соответствует по меньшей мере 80% ферментативной активности необлученного препарата.

12. Способ по п.11, в котором ферментативная активность панкреатина, полученного на стадии (б), соответствует по меньшей мере 80% ферментативной активности необлученного препарата.

13. Способ по п.11 или 12, в котором электронно-лучевое облучение является достаточным для снижения вирусной нагрузки модельного вируса по меньшей мере на три \log_{10} по сравнению с контрольным образцом, где модельным вирусом является свиной парвовирус (PPV).

14. Способ по любому из пп.11-13, в котором электронно-лучевое облучение имеет дозировку от около 5 до около 50 кГр.

15. Способ по п.14, в котором биологическая активность представляет собой липазную активность.

16. Фармацевтическая композиция, содержащая ферментный препарат по любому из пп.1-6.

17. Способ лечения экзокринной недостаточности поджелудочной железы, включающий:

введение доз ферментного препарата по любому из пп.1-6 субъекту, нуждающемуся в этом.

18. Способ по п.17, в котором экзокринная недостаточность поджелудочной железы обусловлена кистозным фиброзом или хроническим панкреатитом.

