

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **040925**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2022.08.18**

**(21)** Номер заявки  
**201892145**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2017.03.27**

**(51)** Int. Cl. **A61K 38/54** (2006.01)  
**A61L 2/08** (2006.01)  
**C12N 9/94** (2006.01)  
**A61P 1/18** (2006.01)

---

**(54) ПРЕПАРАТ ПАНКРЕАТИНА С УМЕНЬШЕННОЙ ВИРУСНОЙ И МИКРОБНОЙ НАГРУЗКОЙ И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ**

---

**(31)** 62/314,048; 62/452,746; 62/454,184

**(32)** 2016.03.28; 2017.01.31; 2017.02.03

**(33)** US

**(43)** 2019.03.29

**(86)** PCT/US2017/024315

**(87)** WO 2017/172619 2017.10.05

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

**(72)** Изобретатель:  
**Бэбкок Мартин, Бернелл Синтия,  
Калтод Викрам (US), Брайтенбах  
Йорг, Шлиаут Джордж, Счесны  
Фритйоф, Руефер Фрауке-Регина  
(DE), Крендалл Дэниэл, Дит Джон,  
Хесс Марк, Хертцлер Шеннон,  
Райордан Уильям, Сэндлер Хьюстон  
(US)**

**(74)** Представитель:  
**Самсонова Н.Н., Махлина М.Г. (RU)**

**(56)** US-A1-2010119654  
WO-A2-2015019198  
O Ferdes ET AL.: "IAEA-  
SM-350/25 THE USE OF DIFFERENT  
TYPE OF ELECTRON BEAM RADIATION  
EQUIPMENT FOR BIOTECHNOLOGICAL  
MATERIALS", 1 January 1998 (1998-01-01),  
XP055379497, Retrieved from the Internet:  
URL: <http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollect ionStore/ Public/29/050/29050436.pdf?r=1> [retrieved on 2017-06-08] the whole document  
US-A1-2006011376

---

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

---

**B1**

**040925**

**040925**

**B1**

### **Перекрестная ссылка на родственные заявки**

По данной заявке испрашивается приоритет на основании предварительной заявки US 62/314,048, поданной 28 марта 2016, предварительной заявки US 62/452,746, поданной 31 января 2017 и предварительной заявки US 62/454,184, поданной 3 февраля 2017, которые во всей полноте включены в настоящее изобретение посредством ссылки.

### **Область техники**

Настоящее изобретение относится к ферментным препаратам, получаемым из тканей животных, фармацевтическим композициям, содержащим такие ферментные препараты, и способам снижения риска вирусного или микробного загрязнения таких препаратов и композиций. Примеры ферментных композиций включают экстракты поджелудочной железы, подходящие для терапевтического применения, например для лечения и/или профилактики нарушений пищеварения, в частности нарушений пищеварения вследствие внешнесекреторной недостаточности поджелудочной железы у животных и людей.

### **Предпосылки**

Продукты, полученные из тканей животных, могут иметь вирусные и/или микробные загрязнения. Некоторые биологические загрязнения, такие как бактериальные или протозойные, могут быть дезактивированы в процессе производства. Однако другие биологические загрязнения, такие как безоболочечные вирусы, устойчивы к общепринятым способам снижения или дезактивации загрязнений. В частности, проблемой является дезактивация или удаление вирусов из получаемых из тканей животных ферментных композиций, без уничтожения или изменения активности ферментов в этом процессе.

Общепринятые способы дезактивации вирусов включают, например, пастеризацию, сухой нагрев, обработку паром, обработку растворителем/детергентом и понижение pH. Выбор используемых способов дезактивации вирусов зависит от природы и загрязнения продукта, применяемого способа очистки, если таковой имеется, и природы вирусного загрязнителя. Например, обработка растворителем или детергентом может разрушить липидную мембрану оболочечных вирусов и, таким образом, может применяться для дезактивации оболочечных вирусов. Однако многие безоболочечные вирусы обычно не дезактивируются обработкой растворителем или детергентом.

Нагрев, в частности сухой нагрев, является другим общепринятым способом дезактивации вирусов. Тепловая обработка, способная дезактивировать даже высокоустойчивые вирусы, такие как безоболочечные вирусы, требует продолжительного времени (до нескольких часов) и контроля влагосодержания. Более того, тепловая обработка может повредить желаемой биологической активности продукта, в частности если продуктом является ферментная композиция.

Ферментные продукты поджелудочной железы давно применяют для лечения внешнесекреторной недостаточности поджелудочной железы, связанной с фиброзом желчного пузыря (CF), хроническим панкреатитом, непроходимостью поджелудочной железы или желчных протоков (например, вследствие неопластического заболевания), хирургическими вмешательствами, такими как панкреатэктомия или операции желудочно-кишечного обвода, равно, как и с другими заболеваниями и расстройствами. Поджелудочная железа выделяет ферменты, включая липазы, протеазы и амилазы, в проксимальный просвет двенадцатиперстной кишки, где они способствуют гидролизу основных питательных веществ. Амилазы и протеазы выделяют и другие органы кроме поджелудочной железы, и они вносят вклад в переработку углеводов и белков. Однако только незначительная доля липазы из источников, отличных от поджелудочной железы, вовлечена в переработку липидов. Таким образом, пациенты с не излеченной внешнесекреторной недостаточностью поджелудочной железы обычно испытывают затруднения с переработкой жиров и могут страдать симптомами нарушения пищеварения или нарушения питания или того и другого с дефицитом незаменимых жирных кислот и жирорастворимых витаминов, потерей массы тела, запорами, метеоризмом, вздутием живота и жирным, дурнопахнущим жидким стулом (стреаторея). Для пациентов с CF неправильное лечение может иметь серьезные последствия, поскольку нормальное состояние питания напрямую связано с правильной работой легких.

Терапия ферментами поджелудочной железы излечивает и/или предотвращает нарушение всасывания и способствует выздоровлению и развитию пациентов с внешнесекреторной недостаточностью поджелудочной железы. У пациентов с CF слизь закупоривает протоки поджелудочной железы так же, как она это происходит в легких. Пищеварительные ферменты поджелудочной железы не выделяются в кишечник, и потому нарушается переработка крахмала, жира и белка. Недостаточность переработки среди прочего приводит к стреаторее, абдоминальным болям и потере массы тела.

Основой нарушения пищеварения у животных и людей обычно является недостаток пищеварительных ферментов, в частности, недостаток эндогенной липазы, а также протеазы и/или амилазы. Если недостаточность поджелудочной железы является патологической, то она может быть врожденной или приобретенной. Приобретенная недостаточность поджелудочной железы, например, может быть следствием алкоголизма. Врожденная недостаточность поджелудочной железы может быть, например, следствием фиброза желчного пузыря. Последствия дефицита пищеварительных ферментов могут быть тяжелыми симптомами недостаточного питания или неправильного питания, которые могут сопровождаться нарастающей восприимчивостью ко вторичным заболеваниям.

Замещение экзогенными пищеварительными ферментами или смесями пищеварительных фермен-

тов (т.е. терапия ферментами поджелудочной железы) показало себя эффективной терапией недостатка эндогенных пищеварительных ферментов. Наиболее часто в терапии ферментов поджелудочной железы применяют фармацевтические препараты, содержащие свиной панкреатин (также известной, как "ферментозаместительная терапия"). Для таких фармацевтических препаратов активным ингредиентом, оцениваемым в клинических испытаниях, является липаза, и дозировка в доступных в продаже продуктах выражается в единицах липазы. Тем не менее, такие смеси пищеварительных ферментов, получаемые из поджелудочной железы свиней, содержат липазы, амилазы и протеазы и могут быть эффективно использованы в терапии ферментов поджелудочной железы у людей благодаря большому сходству содержащихся в них ферментов и сопутствующих веществ с составом сока поджелудочной железы человека. Ферменты поджелудочной железы обычно вводят перорально в виде твердых препаратов.

Поджелудочные железы могут быть получены от животных, таких как свиньи, выращенные и забитые на мясо. Законодательное регулирование часто требует, чтобы поджелудочные железы получали со скотобойни одного вида животных (т.е. ни один другого вида животных не подлежит забою на данном оборудовании), что ограничивает доступность исходного сырья. Распространенное загрязнение оборудования инфицирующими агентами может привести к свертыванию производства и дефициту поставок. Выполнение текущего тестирования помогает выявить загрязненные партии, а отбраковка таких партий накладывает дополнительные ограничения на и так уже ограниченные поставки исходного сырья.

Разработаны способы получения фермента(ов) из поджелудочной железы животных. Например, в US 4623624 описаны способы, с помощью которых панкреатин получают аутолизом водной, содержащей изопропанол, суспензии ткани.

В поджелудочных железах свиньи, применяемых в производстве панкреатина, отмечается присутствие инфицирующих агентов, и, в частности, вирусов. В действительности, большинство поголовья свиней инфицировано парвовирусом свиней (ПВС), который высокоустойчив к дезактивации. В панкреатине ПВС определяется как инфицирующий агент. Несмотря на то, что ПВС, как полагают, не является патогенным для людей, желателно получать панкреатин с пониженной нагрузкой по ПВС. При этом ПВС является обычным модельным вирусом, его трудно дезактивировать стандартными способами, такими как химическая или термическая обработка.

US 2010/0119654 касается облучения спиртового или водного биологического экстракта, который содержит твердую фазу в виде суспензии. Излучение, применяемое в US 2010/0119654, является ультрафиолетовым (UV) излучением, рентгеновским излучением,  $\beta$ -излучением или  $\gamma$ -излучением. UV облучение панкреатинового промежуточного продукта, растворенного в 40% изопропанол, приводит к снижению содержания М2 фагов вплоть до  $4 \log_{10}$ . Гамма-облучение панкреатина (АФИ) дает приблизительно 40% снижение активности липазы при 27 кГр и 13% снижение активности липазы при 5 кГр. Содержание бактерий снижается более, чем в  $2,5 \log_{10}$ , но об инактивации вирусов не сообщается. Когда панкреатин (АФИ) подвергают  $\beta$ -облучению, то, как сообщается, сохраняется более 85% ферментной активности, но "число микробов" уменьшается только приблизительно в  $1,5 \log_{10}$ .

Публикация WO 2003/020324 относится к стерилизации облучением пищеварительных ферментов, таких как трипсин,  $\alpha$ -галактозидаза и идуронат 2сульфатаза. Лиофилизированные или жидкие ферменты (трипсин, гликозидаза или сульфатаза) облучают как таковые или в присутствии стабилизатора. Облучение  $\gamma$ -излучением осуществляют с применением источника  $^{60}\text{Co}$ . Об инактивации вирусов не сообщается.

Публикация WO2007/014896 описывает снижение концентрации одного или более биологических, в частности вирусных, загрязнений панкреатина путем нагревания панкреатина.

В US 2009/0233344 тепловая обработка панкреатина при 80°C в течение 32 ч обеспечивает снижение вирусного титра ПВС в  $2,5 \log_{10}$ , сопровождаемое также 20% потерей липазной активности. Тепловая обработка панкреатина при 100°C в течение 8 ч обеспечивает снижение вирусного титра ПВС более чем в  $3 \log_{10}$ , сопровождаемое примерно 50% потерей липазной активности.

Таким образом, стадии способа, которые могут быть эффективны против трудно дезактивируемых вирусов, таких как ПВС, в значительной степени изменяют природу панкреатинового продукта путем дегградации или уменьшения содержания ферментов поджелудочной железы, в частности липазы, до неприемлемых уровней. Такие изменения активности способны снизить или изменить профиль эффективности конечного продукта. Поэтому в течение процесса производства желателно поддерживать ферментативную активность, в особенности липазную активность.

Поскольку каждый из ранее протестированных способов очистки от вирусных загрязнений, обладающих определенной эффективностью в отношении трудно дезактивируемых вирусов (например, РПВС), приводят к существенной потере ферментативной активности, включая липазную активность, производители выражают скептицизм в отношении того, что может быть достигнут разумный уровень соотношения инактивация/очистка без ухудшения качества продукта. В частности, производители высказывают скептицизм в отношении того, что может быть разработана приемлемая независимая стадия вирусной очистки без негативного влияния на химические, физические или фармацевтические свойства панкреатина. Например, см. письмо от Scientific Protein Laboratories к FDA от 22 июня 2004 в деле номер 2003В-0206.

### Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к ферментному препарату, выделенному из источника, представляющего собой ткань животного. Выделенный ферментный препарат включает один или более ферментов, имеет пониженное, по сравнению с исходной тканью животного, вирусное и/или микробное загрязнение и сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность источника, представляющего собой ткань животного. В частных вариантах осуществления ферментный препарат получают, подвергая исходную ткань животного облучению, предпочтительно электронно-лучевым излучением с последующим выделением из облученной ткани одного или более ферментов. В некоторых вариантах осуществления исходную ткань животного является незараженная ткань. В некоторых вариантах облученная ткань показывает снижение содержания вирусных и/или микробных загрязнений по меньшей мере  $3 \log_{10}$ , предпочтительно по меньшей мере  $4 \log_{10}$  по сравнению с необлученной исходной тканью животного. В некоторых вариантах осуществления применяют дополнительные независимые стадии снижения содержания вирусов (например, во время выполнения стадий выделения одного или более ферментов из облученной ткани). В некоторых вариантах осуществления ферментный препарат, выделенный из облученной ткани, обладает биологической активностью, соответствующей по меньшей мере 50%, предпочтительно - по меньшей мере 90% биологической активности ферментного препарата сравнения, такого, как ферментный препарат, выделенный из необлученного источника ткани животного. В некоторых вариантах осуществления биологической активностью является липазная активность. В некоторых вариантах осуществления облученная ткань показывает снижение содержания вирусных и/или микробных загрязнений по меньшей мере  $3 \log_{10}$ , предпочтительно по меньшей мере  $4 \log_{10}$  по сравнению с необлученной исходной тканью животного, а ферментный препарат, выделенный из облученной ткани, обладает биологической активностью, соответствующей по меньшей мере 50%, предпочтительно по меньшей мере 90% биологической активности ферментного препарата сравнения, такого как ферментный препарат, выделенный из необлученного источника ткани животного.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу получения ферментного препарата, происходящего из ткани животного, в котором ферментный препарат имеет пониженное вирусное и/или микробное загрязнение по сравнению с исходной тканью животного. Способ включает обработку, достаточную для достижения содержания вирусных и/или микробных загрязнений на величину по меньшей мере  $3 \log_{10}$ , предпочтительно по меньшей мере  $4 \log_{10}$  по сравнению с исходной тканью животного. В некоторых вариантах осуществления обработка включает подвергание интактного источника ткани животного воздействию излучения, предпочтительно электронно-лучевого, с получением облученной ткани животного. В некоторых вариантах осуществления электронно-лучевое воздействие достаточно для уменьшения вирусного и/или микробного загрязнения исходной ткани животного при сохранении по меньшей мере одной биологической активности исходной ткани животного. В некоторых вариантах осуществления биологической активностью является липазная активность. В некоторых вариантах осуществления один или более ферментов и/или проферментов экстрагированы из облученной ткани животного. В некоторых вариантах осуществления способ снижает риск инфекционного загрязнения препарата, полученного из животного источника, или фармацевтической композиции, включающей препарат, полученный из животного источника, по сравнению с необработанным образцом.

Другой аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, включающей раскрытый в описании препарат. Фармацевтическая композиция может быть пероральной дозированной фармацевтической формой. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию применяют для лечения или предотвращения заболевания, восприимчивого к заместительной терапии ферментами поджелудочной железы, такого как внешнесекреторная поджелудочная недостаточность. Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения или предотвращения внешнесекреторной поджелудочной недостаточности, включающему введение пациенту в целях лечения дозы ферментного препарата или фармацевтической композиции, раскрытых в описании.

Другой аспект настоящего изобретения относится к наборам, которые содержат ферментный препарат или фармацевтическую композицию, раскрытые в описании.

Эти и другие объекты изобретения раскрыты в последующих подразделах. Не следует рассматривать указанные объекты как ограничивающие объем изобретения.

### Подробное описание изобретения

Данное подробное описание предназначено исключительно для того, чтобы ознакомить специалистов в данной области техники с настоящим изобретением, его принципами, его практическим применением таким образом, чтобы специалисты в данной области техники были бы в состоянии адаптировать и применять изобретение во всей многочисленности его форм так, чтобы наилучшим образом приспособить его к требованиям практического применения. Описание и частные примеры предназначены исключительно для иллюстративных целей. Таким образом, данное изобретение не ограничено вариантами его осуществления, раскрытыми в настоящей заявке на выдачу патента, и может быть различным образом модифицировано.

#### А. Определения.

Использованные в описании и в прилагаемой формуле изобретения определения, если не указано

иного, имеют следующие приводимые ниже значения.

Используемый термин "АФИ" обозначает "активный фармацевтический ингредиент". Как указано, предпочтительным АФИ является панкреатин, в частности свиной панкреатин, который обыкновенно применяют в терапевтических целях, т.е. панкреатин, соответствующий стандартам фармакопей, например Европейской Фармакопеи и/или Фармакопеи США, и подходящий для перорального введения для лечения или профилактики нарушений пищеварения у млекопитающих, и в особенности нарушения пищеварения вследствие хронической внешнесекреторной недостаточности поджелудочной железы, такой как у пациентов, страдающих фиброзом желчного пузыря, хроническим панкреатитом или у пациентов, перенесших хирургическое вмешательство на верхнем отделе желудочно-кишечного тракта.

Используемый термин "неочищенный" относится к неочищенному составу или смеси, содержащей ферменты и/или проферменты, а также дополнительные компоненты ткани источника. Неочищенный препарат или смесь включает, но не ограничивается, тканью животного.

Термин "ферментный препарат" относится к любой композиции по изобретению, содержащей один или несколько ферментов, как в активной, так и в неактивной форме (т.е. проферменты или зимогены). Термин включает экстракты из клеток или тканей, а также препараты, полученные из тканевого или клеточного материала животных. Одним из примеров ферментного препарата является панкреатин, панкреолипаза, экстракт, получаемый из поджелудочной железы млекопитающего, предпочтительно свиньи.

Термин "экстракт" в той мере, в какой он относится к настоящим ферментным препаратам, определяет один или более ферментов и/или проферментов, которые выделены из по меньшей мере одного компонента ткани, из которой они происходят. Экстрагированные компоненты могут быть в форме активного фермента или профермента (зимогена), требующего последующего превращения в активную форму.

Термин "выделенное вещество" в той мере, в какой он относится к данным ферментным препаратам, относится к одному или более активным ферментам, которые были выделены из по меньшей мере одного компонента ткани, из которой они происходят. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления "выделенный фермент" или "выделенный ферментный препарат" включает один или более активных ферментов, которые получены превращением из соответствующей проферментной формы путем гидролиза и/или аутолиза. Гидролиз и/или аутолиз с целью превращения профермента в активный фермент могут происходить до, во время или после экстракции.

Используемые здесь термины "ферменты поджелудочной железы", "панкреатин" и "панкреолипаза", относятся к ферментным смесям, выделяемым из поджелудочных желез животных, включающим в качестве основных компонентов пищеварительные ферменты, такие как липаза, протеаза и амилаза. В частности, термины "ферменты поджелудочной железы", "панкреатин" и "панкреолипаза" здесь используются как синонимичные и относятся к экстрактам поджелудочной железы, пригодным для терапевтического применения в соответствии со стандартными фармакопеями, и содержащим некоторые пищеварительные ферменты, свойства которых определены в известных монографиях, как указано выше. В результате осуществления стандартных способов производства, "ферменты поджелудочной железы", "панкреатин" и "панкреолипаза" обычно доступны в форме порошка, такого как "порошок панкреатина", иногда именуемого "порошком поджелудочной железы". Ферменты поджелудочной железы, панкреатин и панкреолипаза также могут быть, и предпочтительно являются, активными изолятами поджелудочной железы. Панкреатин для фармацевтического применения обычно имеет коровье или свиное происхождение. Свиной панкреатин является предпочтительным. Панкреолипаза в некоторых источниках описана как ферментный препарат с повышенной (липазной) активностью по сравнению с панкреатином.

Используемый здесь термин "фармацевтическая композиция" обозначает композицию, включающую раскрытый в описании ферментный препарат и необязательно один или более фармацевтических эксципиентов.

Термин "фармацевтически приемлемый" используется в качестве прилагательного и обозначает, что соответствующее существительное относится к продукту, подходящему для фармацевтического применения или к части фармацевтического продукта.

"Ортогональная" стадия снижения микробной и/или вирусной нагрузки относится к определенному способу снижения содержания микробов и/или вирусов, которые могут присутствовать в образце. Стадия снижения микробной и/или вирусной нагрузки может быть ортогональной, благодаря тому, что в способе предоставлены одна или более дополнительных стадий снижения микробной и/или вирусной нагрузки. В определенных вариантах осуществления "ортогональная" стадия снижения микробной и/или вирусной нагрузки имеет механизм, существенно отличный от других применяемых в способе стадий снижения микробной и/или вирусной нагрузки, таким образом, что достигаемая "ортогональной" стадией величина  $\log_{10}$  уничтожения становится аддитивна с кумулятивной величиной  $\log_{10}$  уничтожения, достигаемой при проведении всех остальных стадий снижения микробной и/или вирусной нагрузки, проводимых при получении ферментного препарата.

Термин "предотвращать", "предотвращая" или "предотвращение" относится к способу предотвращения начала состояния, расстройства или заболевания и/или проявления сопутствующих им симптомов или к предохранению субъекта от возникновения состояния, расстройства или заболевания. Используе-

мые здесь термины "предотвращать", "предотвращая" или "предотвращение" также включает отсрочку начала состояния, расстройства или заболевания и/или проявления сопутствующих им симптомов и снижение у субъекта риска проявления возникновения состояния, расстройства или заболевания.

Термин "субъект" включает людей и прочих приматов, равно как и домашних и практически одомашненных животных, без ограничения включающих домашнюю птицу, пчел, коров, овец, коз, свиней, лошадей, собак, кошек, кроликов, крыс, мышей и им подобных. Термин "домашняя птица" охватывает все типы пернатых, включая без ограничения цыплят, индюков, уток, гусей, группу нелетающих птиц и пернатую дичь. В определенных вариантах осуществления субъектом является человек.

Термин "терапевтически эффективное количество" обозначает достаточное количество ферментного препарата или фармацевтической композиции для лечения состояния расстройства или заболевания с разумным соотношением польза/риск, применимым к любому медицинскому лечению. При использовании в медицинском лечении терапевтически эффективное количество одного из ферментных препаратов может быть применено в виде экстракта или в неочищенной форме. Альтернативно ферментная композиция может быть введена в виде фармацевтической композиции, содержащей целевую ферментную композицию в сочетании с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями.

Термины "лечить", "лечебный" и "лечение" относятся к способу частичного снятия и подавления симптомов состояния, расстройства или заболевания и/или их сопутствующих симптомов.

#### Б. Ферментные препараты и способы получения.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение включает ферментный препарат, содержащий один или более ферментов и/или проферментов, имеющих животное происхождение, предпочтительно из тканей млекопитающего. В определенных вариантах осуществления ферментный препарат включает смесь пищеварительных ферментов и/или проферментов. В определенных вариантах осуществления ферментный препарат включает липазу. В некоторых вариантах осуществления ферментный препарат включает амилазу. В некоторых вариантах осуществления ферментный препарат включает протеазу. В некоторых вариантах осуществления ферментный препарат включает панкреатин. В некоторых вариантах осуществления ферментный препарат включает профермент, такой, как пролипаза или типсиноген. В некоторых вариантах осуществления ферментный препарат находится в неочищенной форме. В некоторых вариантах осуществления ферментный препарат включает один или более ферментов и/или проферментов, которые были экстрагированы их тканей животного. В некоторых вариантах осуществления ферментный препарат включает один или более ферментов, которые были выделены из тканей животного.

В некоторых вариантах выделенный ферментный препарат имеет ту же самую или по существу ту же самую биологическую активность, но менее инфицирован по сравнению с той тканью, из которой он был выделен. В определенных вариантах осуществления выделенный ферментный препарат имеет ту же самую или по существу ту же самую биологическую активность, что и ферментный препарат сравнения. В определенных вариантах осуществления инфицированность выделенного ферментного препарата уменьшена по меньшей мере на три  $\log_{10}$ , предпочтительно по меньшей мере на четыре  $\log_{10}$ , по сравнению с инфицированностью ткани, из которой он был выделен. В определенных вариантах осуществления инфицированность, которую снижают, является вирусной инфицированностью, в частности, инфицированностью безоболочечным вирусом и/или инфицированностью оболочечным вирусом. В определенных 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% биологической активности ферментного препарата сравнения. В определенных вариантах осуществления биологическая активность является ферментной активностью, такой как протеазная активность, амилазная активность или предпочтительно липазная активность.

В другом варианте осуществления ферментный препарат выделен из предварительно обработанного тканевого источника и имеет ту же самую или по существу ту же самую биологическую активность, но менее инфицирован, чем препарат сравнения, выделенный из необработанного тканевого источника. В определенных вариантах осуществления инфицированность ферментного препарата уменьшена по меньшей мере на три  $\log_{10}$ , предпочтительно по меньшей мере на четыре  $\log_{10}$ , по отношению к препарату сравнения. В определенных вариантах осуществления инфицированность предварительно обработанного тканевого источника уменьшена по меньшей мере на три  $\log_{10}$ , предпочтительно по меньшей мере на четыре  $\log_{10}$ , по отношению к необработанному тканевому источнику. В определенных вариантах осуществления уменьшаемая инфицированность является вирусной инфицированностью, особенно инфицированностью безоболочечным вирусом. В определенных 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% биологической активности препарата сравнения, выделенного из необработанного тканевого источника. В определенных вариантах осуществления биологическая активность является ферментной активностью, такой как протеазная активность, амилазная активность или предпочтительно липазная активность.

В другом варианте осуществления ферментный препарат получен из ткани, облученной пучком электронов. В некоторых вариантах осуществления ткань, облученная пучком электронов, является тка-

нюю млекопитающего, предпочтительно тканью свиньи. В некоторых вариантах осуществления ферментный препарат, полученный из ткани, облученной пучком электронов, включает панкреатин. В некоторых вариантах осуществления ферментный препарат, полученный из ткани, облученной пучком электронов, включает профермент, такой как пролипаза или тирпсиноген. В некоторых вариантах осуществления ферментный препарат, полученный из ткани, облученной пучком электронов, находится в неочищенной форме. В некоторых вариантах осуществления ферментный препарат, полученный из ткани, облученной пучком электронов, включает один или более ферментов и/или проферментов, которые были экстрагированы из облученной ткани. В некоторых вариантах осуществления ферментный препарат, полученный из ткани, облученной пучком электронов, включает один или более ферментов, которые были выделены из облученной ткани.

В другом варианте осуществления ферментный препарат выделен из ткани, облученной пучком электронов, и имеет ту же самую или по существу ту же самую биологическую активность, но менее инфицирован, чем препарат сравнения, выделенный из необлученного тканевого источника. В некоторых вариантах осуществления облученной тканью является ткань поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления облученной тканью является отслоенная ткань поджелудочной железы, цельная поджелудочная железа или часть цельной поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления необлученным тканевым источником является ткань поджелудочной железы. В определенных вариантах осуществления инфицированность ферментного препарата уменьшена по меньшей мере на три  $\log_{10}$ , предпочтительно по меньшей мере на четыре  $\log_{10}$  по отношению к препарату сравнения. В определенных вариантах осуществления инфицированность, которую снижают, является вирусной инфицированностью, в частности инфицированностью безоболочечным вирусом и/или инфицированностью оболочечным вирусом. В некоторых вариантах осуществления инфицированность, которую снижают, является инфицированностью парвовирусом свиней. В определенных 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% биологической активности препарата сравнения. В некоторых вариантах осуществления биологической активностью является ферментная активность, такая как протеазная активность, амилазная активность или предпочтительно липазная активность.

В другом варианте осуществления ферментный препарат включает проферменты, облученные электронным пучком. В определенных вариантах осуществления ферментный препарат подвергают дальнейшей обработке, такой как превращение облученных проферментов в их активную форму (например, аутолизом и/или гидролизом).

Настоящие ферментные препараты будут более понятны в связи со следующими способами, которые иллюстрируют примеры методик, с помощью которых данные ферментные препараты могут быть получены.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение включает способ получения ферментной композиции, состоящий в воздействии облучения на источник проэнзима, предпочтительно, облучение пучком электронов. В определенных вариантах осуществления источником профермента является группа клеток. В некоторых вариантах осуществления группой клеток является интактная ткань, полученная из железы млекопитающего или ее части. В некоторых вариантах осуществления группой клеток является цельная железа, полученная от млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления группой клеток является часть железы, полученной от млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления группой клеток является замороженный блок ткани. В некоторых вариантах осуществления группой клеток является интактная ткань животного или отслоенная или измельченная ткань животного.

В другом аспекте настоящее изобретение включает способ производства энзиматического препарата. Метод включает воздействие облучения на ткань животного, предпочтительно облучение пучком электронов. В некоторых вариантах ткань животного является интактной тканью. В некоторых вариантах интактной тканью животного является замороженный блок ткани. В некоторых вариантах интактная ткань животного является отслоенной или измельченной тканью животного.

В некоторых вариантах осуществления метод начинается с ткани животного, предпочтительно с интактной ткани животного. В некоторых вариантах осуществления тканью животного является ткань млекопитающего, и, предпочтительно, тканью поджелудочной железы свиньи. В некоторых вариантах осуществления тканью поджелудочной железы свиньи получена с проверенной скотобойни, предпочтительно с моновидовой скотобойни.

В определенных вариантах осуществления интактная ткань животного включает интактную ткань поджелудочной железы. В определенных вариантах осуществления интактная ткань поджелудочной железы включает цельную поджелудочную железу или ее часть, такую, как одна или более долей. В определенных вариантах осуществления интактная ткань поджелудочной железы включает отслоенную замороженную ткань. В некоторых вариантах осуществления интактная ткань поджелудочной железы включает блок замороженной ткани, который может быть подвержен механической обработке. В некоторых вариантах осуществления интактная ткань поджелудочной железы включает ткань поджелудочной железы, которая подверглась минимальной манипуляции или изменению или не была подвергнута

манипуляции или изменению таким образом, что, например, уничтожает активные ферменты и/или переводит проферменты в ткани в их активную форму. Например, гомогенат ткани, который подвергся существенной химической или ферментной обработке для перевода проэнзимов в их активную форму, не является "интактной тканью" в используемом здесь смысле. В качестве другого примера ткань, которая была раздроблена или измельчена в условиях, в которых уничтожаются активные ферменты и/или проферменты превращаются в ткани в их активную форму, не является "интактной тканью" в используемом здесь смысле.

В некоторых вариантах осуществления ткань животного, предпочтительно замороженная ткань животного, является тонкоизмельченной. В некоторых вариантах осуществления тонкое измельчение может быть достигнуто с использованием дробильной машины для замороженных блоков, такой как Hydraflake Chunker, выпускаемой General Machinery Corporation (Sheboygan, WI), которая предназначена для раздробления замороженной обрабатываемой ткани для последующей переработки.

В определенных вариантах осуществления животная ткань подвергают воздействию стерилизующего пучка ускоренных электронов, например E-пучка или электроннолучевого излучения. В некоторых вариантах осуществления интактную животную ткань подвергают облучению пучком электронов. В некоторых вариантах осуществления цельную поджелудочную железу или ее интактную часть подвергают облучению пучком электронов. В некоторых вариантах осуществления отслоенную ткань поджелудочной железы свиньи подвергают облучению пучком электронов.

Электронный пучок является формой ионизирующей энергии, которая обычно характеризуется малой глубиной проникания и высокими дозами. Пучок, т.е. концентрированный, высокозаряженный поток электронов, генерируют ускорением и конверсией электричества. Электроны генерируют с помощью оборудования, называемого здесь ускорителями, которые способны производить пучки, которые являются либо импульсными, либо непрерывными. Когда облучаемый материал проходит под или перед электронным пучком, энергия электронов поглощается. Эта поглощенная энергия изменяет различные химические связи и биологические свойства продукта/материала. Энергия, которая была поглощена, называется "поглощенной дозой". Именно это поглощение энергии - или "дозировка" - уничтожает вирусы и микроорганизмы, например, разрушая их цепочки ДНК или РНК.

Облучение может быть выполнено общепринятым способом, таким как помещение ткани в подходящий контейнер и подвергание этой ткани воздействию пучка электронов. В определенных вариантах осуществления контейнер, содержащий ткань, помещен на конвейер, который проходит через пучок электронов. В определенных вариантах осуществления контейнер, содержащий ткань, не содержит никакого растворителя. В определенных вариантах осуществления контейнер, содержащий ткань, по существу, свободен от растворителя. В определенных вариантах осуществления контейнер, содержащий ткань, не содержит никакого легковоспламеняющегося растворителя. В определенных вариантах осуществления контейнер, содержащий ткань, по существу свободен от легковоспламеняющегося растворителя, такого, как спирт. Например, контейнер может содержать замороженную интактную ткань, такую как цельная железа, часть цельной железы или отслоенную ткань.

В некоторых вариантах осуществления осуществляют облучение дозой, достаточной, по существу, для инактивации устойчивых вирусов и/или микробов в ткани. В определенных вариантах осуществления облучение осуществляют в дозе, которая предотвращает потерю биологической активности, предпочтительно, ферментной активности, относительно ферментного препарата сравнения, выделенного из необлученной ткани.

Пучок ускоренных электронов может быть получен на ускорителе электронов, таком как ускоритель электронов, поставляемый Iotron Industries USA, Inc. (Columbia City, IN). В определенных вариантах осуществления, ускоритель электронов работает при мощности от 20 до 250 кВт с энергией электронов от 5 до 18 МэВ. В некоторых вариантах осуществления ускоритель электронов работает при 50 кВт и 10 МэВ. В некоторых вариантах осуществления ускоритель электронов обеспечивает энергию пучка в 10 МэВ или выше.

Ткань может быть подвергнута облучению пучком электронов в течение времени и в дозе, достаточных для достижения инактивации вирусов и микробов без отрицательного влияния на биологическую активность одного или более ферментов, которые впоследствии экстрагируют или выделяют из облученной ткани. Доза электронного облучения, требуемая для стерилизации ткани, может изменяться, например, в зависимости от размера ткани, типа ткани и типа и количества вирусного или микробного загрязнителя, который предполагается или наличествует в образце ткани. Специалист в данной области может осознать и способен определить соответствующую дозу и время, подходящие для конкретной ткани и основанные на характеристиках ткани и используемого ускорителя. Выбранная доза электронного излучения эффективна для инактивации инфицирующих агентов, которые трудно уничтожить общепринятыми способами без минимальной потери ферментной активности.

"Поглощенная доза" излучения выражается в кил로그рях (кГр), где один киллогрей равен тысяче джоулей энергии, приложенной к килограмму материала. В определенных вариантах осуществления ткань подвергают воздействию пучка электронов до тех пор, пока не будет поглощено количество излу-

чения, инактивирующего инфицирующий агент. Например, ткань может быть подвергнута воздействию пучка электронов до достижения дозы приблизительно 10, приблизительно 15, приблизительно 20, приблизительно 25, приблизительно 30, приблизительно 35, приблизительно 40, приблизительно 45 или приблизительно 50 кГр или более. В качестве другого примера ткань может быть подвергнута воздействию пучка электронов до достижения дозы приблизительно от 5 до 50, приблизительно от 10 до 40, приблизительно от 15 до 35 кГр. В некоторых вариантах осуществления ткань может быть подвергнута воздействию пучка электронов до достижения дозы приблизительно 30 кГр. В некоторых вариантах осуществления поджелудочную железу свиньи облучают дозой пучка электронов, достаточной для обеспечения высокого показателя  $\log_{10}$  уничтожения инфицирующих агентов, предпочтительно, инфицирующих агентов, которые трудно дезактивировать, таких как безоболочечные вирусы, с минимальной потерей ферментной активности.

В некоторых вариантах осуществления доза может быть определена с применением пленок радиохромных красителей. Такие пленки могут быть откалиброваны по референтным национальным стандартам.

В некоторых вариантах осуществления ткань подвергают облучению пучком электронов в течение времени и в дозе, достаточных для достижения по меньшей мере трех  $\log_{10}$ , предпочтительно по меньшей мере четырех  $\log_{10}$ , снижения величины вирусной нагрузки модельного вируса относительно образца сравнения. В одном из таких вариантов осуществления ткань подвергают облучению пучком электронов в течение времени и в дозе, достаточных для достижения по меньшей мере предпочтительно по меньшей мере четыре  $\log_{10}$ , снижение величины вирусной нагрузки модельным вирусом относительно образца сравнения. В некоторых вариантах осуществления модельным вирусом является парвовирус свиней. В некоторых вариантах осуществления ткань является интактной тканью. В некоторых из таких осуществлений интактной тканью является железа, такая как цельная поджелудочная железа или ее часть, такая как одна или более долей поджелудочной железы. В другом из таких осуществлений интактной тканью является замороженная отслоенная ткань.

В некоторых вариантах осуществления воздействие пучком электронов включает воздействие с одной стороны или с другой стороны. В некоторых вариантах осуществления ткань подвергают воздействию электронным пучком с одной стороны. В некоторых вариантах осуществления ткань подвергают воздействию электронным пучком с разных сторон, например, воздействию пучка электронов с двух сторон. Таким образом, доза приблизительно в 20 кГр может включать двухстороннее воздействие приблизительно 10 кГр/сторону, доза приблизительно в 30 кГр может включать двухстороннее воздействие приблизительно 15 кГр/сторону, доза приблизительно в 40 кГр может включать двухстороннее воздействие приблизительно 20 кГр/сторону, доза приблизительно в 50 кГр может включать двухстороннее воздействие приблизительно 25 кГр/сторону.

В некоторых вариантах осуществления способы получения ферментного препарата снижают риск инфицирования вирусами или микробами фармацевтической композиции, содержащей ферментный препарат.

В некоторых вариантах осуществления инфицированность облученной поджелудочной железы снижена по меньшей мере на три  $\log_{10}$ , предпочтительно по меньшей мере на четыре  $\log_{10}$ , по сравнению с инфицированностью железы перед обработкой излучением.

В некоторых вариантах осуществления инфицированность ферментного препарата, производного или выделенного из облученной поджелудочной железы, снижена по меньшей мере на три  $\log_{10}$ , предпочтительно, по меньшей мере на четыре  $\log_{10}$  по сравнению с инфицированностью железы перед обработкой излучением. Альтернативно инфицированность ферментного препарата определяют по отношению к ферментному препарату, полученному или выделенному из необлученной поджелудочной железы.

В некоторых вариантах осуществления снижаемая инфицированность является вирусной инфицированностью, в частности, инфицированностью безоболочечным вирусом, таким как парвовирус свиней (ПВС). Например, инфицированность ПВС панкреатического продукта, выделенного из облученной поджелудочной железы, снижена по меньшей мере на три  $\log_{10}$ , предпочтительно по меньшей мере на четыре  $\log_{10}$ , по отношению к препарату сравнения, выделенному из необлученной поджелудочной железы. В качестве другого примера, инфицированность парвовирусом свиней панкреатического продукта, выделенного из облученной поджелудочной железы, снижена по меньшей мере на три  $\log_{10}$ , предпочтительно по меньшей мере на четыре  $\log_{10}$ , по отношению к необлученной поджелудочной железе. В одном из таких вариантов осуществления инфицированность ферментного препарата парвовирусом свиней дополнительно уменьшают последующими стадиями ортогональной вирусной инактивации, проводимыми после облучения.

В некоторых вариантах осуществления способы могут также включать следующие за стадией облучения стадии исследования на присутствие или количественное определение в ткани или в ферментном препарате, выделенном из ткани, одного или более микроорганизмов (например, вирусов, бактерий, простейших). Способы определения того, содержит ли образец микроорганизм, известны из уровня техники и включают, например, анализ бляшкообразования или анализ образования колоний. Эффективная стерилизация также может быть определена с использованием общепринятых микробиологических методов, таких как, например, включения подходящих биологических индикаторов в облучаемую партию или

контактирование ткани с культуральной средой и инкубирование среды для определения стерильности ткани.

В определенных вариантах осуществления вирусную инфицированность можно определить по конечной точке титрования с последующим вычислением половинной дозы инфицирующей тканевую культуру (TCID<sub>50</sub>). Вычисленные таким способом вирусные титры могут быть представлены как log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub> на мл с доверительным интервалом 95%.

В некоторых вариантах осуществления снижение вирусного загрязнения приведено в соответствии с общей главой <1050> USP-NF национальной фармакопеи США как логарифмический фактор уменьшения, который является разницей в вирусном титре между образцом сравнения и образцом, полученным из ткани, облученной электронным пучком после выделения. Например, уменьшение на 3 log<sub>10</sub> может означать уменьшение вирусной нагрузки в 1000 раз, а уменьшение на 4 log<sub>10</sub> может означать уменьшение вирусной нагрузки в 10000 раз.

В некоторых вариантах осуществления способы получения ферментного препарата позволяют снизить вирусное и/или микробное загрязнение ферментного препарата без существенного снижения его ферментной активности.

В некоторых вариантах осуществления ферментная 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% биологической активности препарата сравнения, выделенного из необлученной поджелудочной железы. В определенных вариантах осуществления биологическая активность является ферментной активностью, такой как протеазная активность, амилазная активность или предпочтительно липазная активность.

После облучения ткань может быть далее обработана с получением ферментной композиции. Например, в некоторых вариантах осуществления из облученной ткани могут быть экстрагированы один или более ферментов и/или проферментов. В некоторых вариантах осуществления из облученной ткани могут быть выделены один или более ферментов и/или проферментов. Известны различные способы выделения ферментов из образцов ткани. Например, US 4623624 предоставляет способы выделения панкреатина аутолизом водной, содержащей изопропанол, суспензии ткани.

В некоторых вариантах осуществления облученная ткань может быть подвергнута аутолизу и/или гидролизу для превращения проферментов в их активную форму. Например, облученная ткань может быть объединена с инициатором гидролиза для начала аутолиза. В некоторых вариантах осуществления аутолиз и/или гидролиз проводят при температуре окружающей среды. В некоторых вариантах осуществления реакцию смесь по окончании реакции фильтруют, фильтрат собирают, присутствующие в фильтрате ферменты осаждают (например, изопропанолом), осадок отфильтровывают, промывают изопропанолом и сушат при пониженном давлении.

Следует понимать, что способы, описанные выше и проиллюстрированные в разделе "Примеры", являются иллюстративными, и их не следует рассматривать как ограничивающие объем изобретения в том виде, как оно охарактеризовано в прилагаемой формуле изобретения. Все альтернативы, модификации и эквиваленты способов и конкретных примеров включены в объем формулы изобретения.

#### В. Композиции.

По меньшей мере в одном варианте осуществления настоящее изобретение включает композиции, содержащие ферментный препарат, раскрытый в описании. В определенных вариантах осуществления композиция включает один или более ферментов и/или проферментов, экстрагированных из облученной ткани животного. В определенных вариантах осуществления композиция включает один или более ферментов, выделенных из облученной ткани животного. В определенных вариантах осуществления композиция является неочищенной смесью, содержащей один или более ферментов, выделяемых из ткани животного.

В другом аспекте обеспечена фармацевтическая композиция, содержащая ферментный препарат, раскрытый в описании, и далее необязательно содержащая один или более общепринятых фармацевтически приемлемых эксципиентов, таких как можно найти в монографиях, 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 12<sup>th</sup> Ed. (Water Lund ed.; Pharmaceutical Press, London, 1994); The United Kingdom Pharmacopoeia: The National Formulary (United States Pharmacopoeial Convention); и Goodman and Gilman's: the Pharmacological Basis of Therapeutics (Louis S. Goodman and Lee E. Limbird, eds.; McGraw Hill, 1992), содержание которых включено в настоящее описание путем ссылки.

Фармацевтические композиции, содержащие ферментный препарат, раскрытый в описании, могут быть использованы для восполнения пищеварительных ферментов при лечении и/или профилактике расстройства пищеварения у животных, в частности расстройства пищеварения вследствие хронической экзокринной недостаточности поджелудочной железы, такой как у пациентов, страдающих муковисцидозом, хроническим панкреатитом или у пациентов, перенесших хирургическое вмешательство на верх-

нем отделе желудочно-кишечного тракта. Фармацевтические композиции или дозированные формы, раскрытые в описании, предпочтительно могут быть пероральными дозированными формами, которые, в частности, могут быть введены людям.

Пероральная дозированная форма, содержащая ферментный препарат, может быть, например, в форме капсул, гранул, гранулятов, микропеллет, микросфер, микротаблеток, пеллет, пилюль, порошков и/или таблеток. В целях данного описания приставка "микро" используется для описания пероральной дозированной формы, если диаметр пероральной дозированной формы или все ее измерения (длина, высота, ширина) равны или менее приблизительно 5 мм.

В определенных вариантах осуществления пероральная дозированная форма является капсулой. Капсула может содержать приблизительно от 2000 до приблизительно 40000 липазных единиц на капсулу. В некоторых вариантах осуществления пероральной дозированной формой является капсула, содержащая 3000, 6000, 12000, 24000 или 36000 липазных единиц на капсулу. В некоторых вариантах осуществления пероральной дозированной формой является капсула, содержащая 3000, 5000, 10000, 15000, 20000, 25000 или 40000 липазных единиц на капсулу. В некоторых вариантах осуществления пероральной дозированной формой является капсула, содержащая 2600, 4200, 10500, 16800 или 21000 липазных единиц на капсулу. В некоторых вариантах осуществления пероральной дозированной формой является капсула, содержащая 4000, 13800, 20700 или 23000 липазных единиц на капсулу. В некоторых вариантах осуществления пероральной дозированной формой является капсула, содержащая 4000, 8000 или 16000 липазных единиц на капсулу. В некоторых вариантах осуществления пероральной дозированной формой является капсула, содержащая 4000, 8000 или 16000 липазных единиц на капсулу. В других вариантах осуществления пероральной дозированной формой является капсула, содержащая 3000, 4000, 6000 или 8000 липазных единиц на капсулу. Дозировка может быть выражена разнообразными способами, которые включают в себя единицы Фармакопеи США, единицы Европейской Фармакопеи или единицы Британской Фармакопеи.

В некоторых вариантах осуществления пероральная дозированная форма является таблеткой, содержащей 10440 или 20880 липазных единиц на таблетку.

Известны разнообразные фармацевтические композиции и дозированные формы, содержащие панкреатин, такие как композиции с отсроченным или немедленным высвобождением. Например, US 9198871 обеспечивает композиции панкреатина с отсроченным высвобождением.

В некоторых вариантах осуществления пероральная дозированная форма является панкреатиновой микропеллетой или панкреатиновой микросферой. В некоторых вариантах осуществления панкреатиновая микропеллета или панкреатиновая микросфера покрыта, например, кишечнорастворимым покрытием. В некоторых вариантах осуществления панкреатиновая микропеллета или панкреатиновая микросфера вне зависимости от наличия любого подобного покрытия содержит примерно от 10% до примерно 95% по массе панкреатина, примерно от 5% до примерно 90% по массе по меньшей мере одного фармацевтически приемлемого связующего агента и между 0% и примерно 10% по массе по меньшей мере одного фармацевтически приемлемого эксципиента. Более конкретно, панкреатиновая микропеллета или панкреатиновая микросфера содержит примерно от 70% до примерно 90% по массе панкреатина, примерно от 10% до примерно 30% по массе по меньшей мере одного фармацевтически приемлемого связующего агента и между 0% и приблизительно 5% по массе по меньшей мере одного фармацевтически приемлемого эксципиента. В некоторых вариантах осуществления панкреатиновая микропеллета или панкреатиновая микросфера содержит примерно от 70% до примерно 90% по массе панкреатина, примерно от 10% до примерно 30% по массе по меньшей мере одного фармацевтически приемлемого связующего агента. В некоторых вариантах осуществления панкреатиновая микропеллета или панкреатиновая микросфера являются приблизительно сферическими и имеют диаметр от примерно 0,5 до примерно 2,0 мм. В некоторых вариантах осуществления панкреатиновая микропеллета или панкреатиновая микросфера имеет первое измерение примерно от 0,5 до примерно 2,0 мм и второе измерение примерно от 0,5 до примерно 2,0 мм. В некоторых вариантах осуществления панкреатиновая микропеллета или панкреатиновая микросфера имеет первое измерение примерно от 0,8 до примерно 1,0 мм и второе измерение примерно от 0,5 до примерно 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-полиоксипропилен и смеси указанных органических полимеров. Предшествующий список фармацевтически приемлемых связующих агентов не следует понимать как исчерпывающий, но исключительно как иллюстративный, поскольку средний специалист в данной области способен понимать, что может быть использовано множество других фармацевтически приемлемых связующих агентов или комбинация связующих агентов. Полиэтиленгликоль 4000 является предпочтительным фармацевтически приемлемым связующим агентом.

Примеры подходящих фармацевтически приемлемых эксципиентов 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, гидратиро-

ванные диоксид кремния, микрокристаллическая целлюлоза, каолин, лактоза, маннит, поливинилпирролидон, осажденный карбонат кальция, сорбит и/или тальк; агенты, способствующие распадемости лекарственной формы, такие как аэросил (кремневая кислота), альгиновая кислота, амилоза, альгинат кальция, карбонат кальция, формальдегид-желатин, пектинкарбонат, саговый крахмал, бикарбонат натрия и/или крахмал; и/или увлажняющие агенты, такие как глицерин и/или крахмал. Предшествующий список фармацевтически приемлемых эксципиентов не следует понимать как исчерпывающий, но исключительно как иллюстративный, поскольку средний специалист в данной области способен понимать, что может быть использовано множество других фармацевтически приемлемых эксципиентов или комбинация эксципиентов. Для целей данного описания синтетические масла и мономерные сложные эфиры фталевой кислоты не следует рассматривать как подходящие фармацевтически приемлемые эксципиенты. В некоторых вариантах осуществления панкреатиновые микропеллеты или панкреатиновые микросферы не содержат фармацевтически приемлемых эксципиентов, но необязательно могут содержать увеличенное количество панкреатина.

В другом варианте осуществления пероральная дозированная форма панкреатина, такая как пероральная дозированная форма с кишечнорастворимым покрытием, предлагается для производства лекарственного средства для лечения медицинских состояний, таких как расстройство пищеварения, эндокринная недостаточность поджелудочной железы, панкреатит, муковисцидоз, диабет типа I и/или диабет типа II.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция является фармацевтической композицией с контролируемым высвобождением, например фармацевтическая композиция с контролируемым высвобождением может быть получена нанесением кишечнорастворимого покрытия на пероральную дозированную форму. В некоторых вариантах осуществления кишечнорастворимое покрытие включает пленкообразующий агент, пластификатор и необязательно добавки, уменьшающие липкость.

Подходящие пленкообразующие агенты включают агар, карбомерный гомополимер и сополимеры (то есть, перекрестно-сшитые полимеры на основе акриловой кислоты с большой молекулярной массой), карбоксиметилцеллюлозу, карбоксиметилэтилцеллюлозу, каррагин, ацетат фталат целлюлозу, ацетат сукцинат целлюлозу, ацетат тримеллиат целлюлозу, хитин, белковый экстракт зерновых, этилцеллюлозу, гуммиарабик, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилацетат сукцинат, ацетат сукцинат гидроксипропилметилцеллюлозу, фталат гидроксипропилметилцеллюлозу, сополимер метакриловой кислоты и этилметакрилата, метилцеллюлозу, пектин, поливинилацетатфталат, поливиниловый спирт, шеллак, альгинат натрия, ацетат фталат крахмала и/или сополимер стирол/малеиновая кислота или смеси указанных пленкообразующих полимеров. Предпочтительными пленкообразующими агентами являются ацетат фталат целлюлозы, ацетат сукцинат гидроксипропилметилцеллюлозы и сополимер метакриловой кислоты и этилметакрилата. Наиболее предпочтительным является фталат гидроксипропилметилцеллюлозы, такой как НР 55 или НРМСР НР-50. Синтетические масла не следует рассматривать как предпочтительные пленкообразующие агенты. Предшествующий список пленкообразующих агентов не следует понимать как исчерпывающий, но исключительно как иллюстративный, поскольку средний специалист в данной области способен понимать, что может быть использовано множество других пленкообразующих агентов или комбинация пленкообразующих агентов.

Пластификатор(ы) обычно может (могут) присутствовать в количестве более чем примерно 1,5% и обычно в количестве примерно от 2% до примерно 20% по массе по отношению к пленкообразующему агенту. Пластификатор может содержать насыщенные неразветвленные одноатомные спирты, имеющие от 12 до 30 углеродных атомов. Более конкретно подходящие пластификаторы включают лауриловый спирт, тридециловый спирт, миристиловый спирт, пентадециловый спирт, цетиловый спирт, гептдециловый спирт, стеариловый спирт, нонадециловый спирт, арахиноновый спирт, бегениловый спирт, карнаубиловый спирт, цериловый спирт, корианиловый спирт, мелиссильный спирт, ацетилтрибутилцитрат, дибутилсебакат, сложные эфиры жирной кислоты и глицерина, глицерин, полиэтиленгликоль, пропиленгликоль, сорбитовые жирные кислоты, триацетин, триэтилцитрат и смеси указанных пластификаторов. Предпочтительными пластификаторами являются цетиловый спирт, стеариловый спирт, триэтилцитрат и их смеси. Когда цетиловый спирт применяют в качестве единственного пластификатора, он может присутствовать в количестве более чем примерно 1,5%, обычно в количестве примерно от 2% до примерно 15%, предпочтительно примерно от 2% до примерно 10% по массе по отношению к пленкообразующему агенту. Когда триэтилцитрат применяют в качестве единственного пластификатора, он может присутствовать в количестве от примерно 5% до примерно 20%, предпочтительно примерно от 12% до примерно 15% по массе по отношению к пленкообразующему агенту. Синтетические масла и сложные мономерные эфиры фталевой кислоты не следует рассматривать как подходящие пластификаторы. Предшествующий список пластификаторов не следует понимать как исчерпывающий, но исключительно как иллюстративный, поскольку средний специалист в данной области способен понимать, что может быть использовано множество других пластификаторов или комбинация пластификаторов в том случае, если они по существу свободны как от синтетических масел, так и от мономерных сложных эфиров фталевой кислоты.

В определенных вариантах осуществления пластификатор состоит из цетилового спирта и триэтил-

цитрата, которые совместно присутствуют в количестве более чем примерно 3%, обычно в количестве примерно от 4% до примерно 20%, в особенности между примерно 6% и примерно 15%, более конкретно, между примерно 7% и примерно 10% по массе по отношению к пленкообразующему агенту. Массовое соотношение цетилового спирта и триэтилцитрата при их совместном присутствии может быть от примерно 0,05:1 до примерно 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, соотношение цетилового спирта и триэтилцитрата может быть от примерно 0,25:1 до примерно 0,5:1, предпочтительно от примерно 0,3:1 до примерно 0,45:1, более предпочтительно от примерно 0,35:1 до примерно 0,4:1 и еще более предпочтительно от примерно 0,38:1 до примерно 0,4:1 (мас./мас.).

Кишечнорастворимое покрытие необязательно содержит добавку, уменьшающую липкость. Подходящие добавки, уменьшающие липкость, включают диметикон и касторовое масло. Диметикон, в особенности диметикон 1000, является предпочтительной добавкой, уменьшающей липкость. Количество добавки, уменьшающей липкость (если присутствует), в кишечнорастворимом покрытии составляет примерно от 1,5% до примерно 3% по массе по отношению к пленкообразующему агенту. Синтетические масла не следует рассматривать как предпочтительные добавки, уменьшающие липкость. Предшествующий список добавок, уменьшающих липкость, не следует понимать как исчерпывающий, но исключительно как иллюстративный, поскольку средний специалист в данной области способен понимать, что может быть использовано множество других добавок, уменьшающих липкость или комбинация добавок, уменьшающих липкость.

В некоторых вариантах осуществления кишечнорастворимое покрытие составляет от примерно 5% до примерно 30% по массе, более предпочтительно от примерно 7% до примерно 20%, еще более предпочтительно от примерно 10% до примерно 15% по массе от полного состава преоральной дозированной формы с кишечнорастворимым покрытием или фармацевтической композиции с контролируемым высвобождением. В некоторых вариантах осуществления кишечнорастворимое покрытие составляет от примерно 20% до примерно 30% по массе, более предпочтительно от примерно 22% до примерно 26% по массе, еще более предпочтительно от примерно 22,5% до примерно 25% по массе от полного состава преоральной дозированной формы с кишечнорастворимым покрытием или фармацевтической композиции с контролируемым высвобождением.

В некоторых вариантах фармацевтическая композиция является капсулой с контролируемым высвобождением для перорального введения. Капсула может содержать пеллеты с кишечнорастворимым покрытием, включающие липазу, протеазу и амилазу. Пеллеты с кишечнорастворимым покрытием могут иметь первое измерение от примерно 0,5 мм до примерно 2 мм, и, необязательно, второе измерение от примерно 0,5 мм до примерно 2 мм. Например, пеллеты с кишечнорастворимым покрытием могут быть приблизительно сферическими и иметь диаметр от примерно 0,71 мм до примерно 1,60 мм. В качестве другого примера пеллеты с кишечнорастворимым покрытием могут быть нитеобразными и иметь диаметр от примерно 0,5 мм до примерно 2,0 мм и длину от примерно 0,5 мм до примерно 2,0 мм. Композиция может далее включать неактивные ингредиенты, раскрытые в описании, такие, как цетиловый спирт, диметикон, фталат гипромеллозы, полиэтиленгликоль и триэтилцитрат.

В некоторых других вариантах осуществления фармацевтическая композиция является фармацевтической композицией с немедленным высвобождением. Например, в фармацевтической композиции с немедленным высвобождением кишечнорастворимое покрытие может отсутствовать.

#### Г. Способы применения.

По меньшей мере в одном аспекте настоящее изобретение включает способ лечения экзокринной недостаточности поджелудочной железы у субъекта, в частности у субъекта человека в целях такого лечения. Способ включает введение субъекту ферментного препарата или фармацевтической композиции, содержащей ферментный препарат. В некоторых вариантах осуществления экзокринная недостаточность поджелудочной железы является следствием муковисцидоза, хронического панкреатита, панкреатэктомии или других состояний.

В другом аспекте настоящее изобретение включает способ лечения или предотвращения у субъекта расстройства пищеварения, в частности - у субъекта человека в целях такого лечения или предотвращения. В некоторых вариантах осуществления расстройство пищеварения является следствием хронической экзокринной недостаточности поджелудочной железы, такой как у пациентов, страдающих муковисцидозом, хроническим панкреатитом или у пациентов, перенесших хирургическое вмешательство 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 в целях такого лечения.

В другом аспекте настоящее изобретение включает применение ферментного препарата или фармацевтической композиции, содержащей ферментный препарат, для лечения или профилактики расстройства пищеварения у субъекта в целях такого лечения или профилактики.

В некоторых вариантах осуществления, относящихся к способам и применениям, упомянутым выше, ферментный препарат содержит панкреатин. В некоторых вариантах осуществления подходящая дозировка панкреатина может быть основана на липазных единицах. Комитет по муковисцидозу (CFF)

опубликовал Согласованное Руководство, которой содержит рекомендованные общие суточные дозы липазных единиц.

В некоторых вариантах осуществления младенцам до 12 месяцев возраста вводят от 2000 до 4000 липазных единиц, предпочтительно 3000 липазных единиц на 120 мл питательного состава или на одно грудное кормление.

В некоторых вариантах осуществления пациентам в возрасте от одного (1) года до четырех (4) лет вводят от 1000 до 2500 липазных единиц на килограмм массы тела на один прием пищи. В некоторых вариантах осуществления вводят от 500 до 2500 липазных единиц на килограмм массы тела на один прием пищи вводят пациентам в возрасте по крайней мере 4 лет.

В некоторых вариантах осуществления максимальная суточная дозировка не превышает 10000 липазных единиц на килограмм массы тела. В некоторых вариантах осуществления максимальная суточная дозировка не превышает 4000 липазных единиц на грамм поглощенного жира.

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 приема пищи или легкой закуски.

В еще одном варианте осуществления обеспечен способ лечения медицинского состояния, такого как расстройства пищеварения, экзокринная недостаточность поджелудочной железы, панкреатит, муковисцидоз, диабеты типа I и/или II введением лицу терапевтически эффективного количества ферментного препарата или фармацевтической композиции, содержащей ферментный препарат, в целях такого лечения.

По меньшей мере в одном аспекте настоящее изобретение включает способ расщепления белка. Способ включает контактирование белка, подлежащего перевариванию, с ферментной композицией в условиях, достаточных для расщепления белка.

В некоторых вариантах осуществления ферментный препарат включает один или более ферментов и/или проферментов, экстрагированных из ткани животного, облученной пучком электронов. В некоторых вариантах осуществления ферментный препарат включает один или более ферментов и/или проферментов, выделенных из ткани животного, облученной пучком электронов. В некоторых вариантах осуществления ферментный препарат находится в неочищенной форме.

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

В некоторых вариантах осуществления перевариваемый белок применяют для приготовления белкового гидролизованного продукта.

Ферментные препараты, композиции, способы и методы применения, раскрытые в описании, будут более понятны со ссылкой на следующие варианты осуществления и примеры, которые включены в настоящее описание в качестве иллюстрации и не ограничивают объем изобретения.

#### Д. Варианты осуществления.

Один аспект настоящего изобретения включает ферментный препарат, полученный способом, включающим стадии: (а) получение ткани поджелудочной железы животного; (б) облучение ткани поджелудочной железы пучком электронов с получением облученной ткани поджелудочной железы, где облучение пучком электронов достаточно для достижения снижения микробной и/или вирусной нагрузки; и (в) выделение панкреатина из облученной ткани поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления стадия выделения выключает инициирование гидролиза или аутолиза ткани поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления стадия выделения выключает 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 снижения микробной и/или вирусной нагрузки составляет, по меньшей мере, три  $\log_{10}$ , предпочтительно, по меньшей мере, четыре  $\log_{10}$  по отношению к образцу сравнения, полученному из необлученной ткани. Например, снижение микробной и/или вирусной нагрузки парвовирусом свиней (ПВС) составляет, по меньшей мере, три  $\log_{10}$ , предпочтительно, по меньшей мере, четыре  $\log_{10}$  по отношению к образцу сравнения, полученному 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 ферментного препарата сравнения, полученного из необлученной ткани поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления биологическая активность является липазной активностью. В некоторых вариантах осуществления биологическая активность является протеазной активностью или амилазной активностью. В некоторых вариантах осуществления способ далее включает одну или более дополнительных стадий, которые обеспечивают дополнительное снижение микробной и/или вирусной нагрузки.

Другой аспект настоящего изобретения включает ферментный препарат, содержащий один или более ферментов, выделенных из ткани млекопитающего, подвергнутой обработке, достаточной для достижения снижения вирусной нагрузки, по меньшей мере, на три  $\log_{10}$ , предпочтительно, по меньшей мере, на четыре  $\log_{10}$ . Например, обработка достаточна для достижения снижения вирусной нагрузки ПВС,

по меньшей мере, на три  $\log_{10}$ , предпочтительно, по меньшей мере, на четыре  $\log_{10}$  по отношению к необлученному контрольному образцу.

Другой аспект настоящего изобретения включает ферментный препарат, содержащий один или более ферментов, выделенных из ткани млекопитающего, где перед выделением фермента ткань млекопитающего подвергают обработке, достаточной для достижения снижения вирусной нагрузки, по меньшей мере, на три  $\log_{10}$ , предпочтительно, по меньшей мере, на четыре  $\log_{10}$ . Например, обработка достаточна для достижения снижения вирусной нагрузки ПВС по меньшей мере на три  $\log_{10}$ , предпочтительно по меньшей мере на четыре  $\log_{10}$  по отношению к необработанному контрольному образцу. В некоторых вариантах осуществления ткань млекопитающего является тканью поджелудочной железы свиньи. В некоторых вариантах осуществления ткань поджелудочной железы свиньи является расслоенной. В некоторых вариантах осуществления ткань поджелудочной железы свиньи находится в виде замороженного блока. В некоторых вариантах осуществления ткань поджелудочной железы свиньи является цельной поджелудочной железой или ее частью, такой как одна или более долей. В некоторых вариантах осуществления один или более ферментов включают панкреатин. В некоторых вариантах осуществления обработка включает облучение пучком электронов. В некоторых вариантах осуществления облучение пучком электронов имеет дозу примерно от 5 до примерно 50 кГр, предпочтительно примерно от 10 до примерно 40 кГр. В некоторых вариантах осуществления биологическая активность ферментного препарата соответствует по меньшей мере 50%, предпочтительно по меньшей мере 90% биологической активности препарата сравнения, полученного из необлученной ткани млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления биологическая активность является липазной активностью. В некоторых вариантах осуществления биологическая активность является протеазной активностью или амилазной активностью. В некоторых вариантах осуществления снижение вирусной нагрузки является ортогональным снижением.

Другой аспект настоящего изобретения включает способ уменьшения риска загрязнения панкреатического продукта инфицирующим агентом, включающий стадии: (а) обеспечения ткани поджелудочной железы млекопитающего; (б) подвергания ткани поджелудочной железы облучению пучком электронов с получением облученной ткани поджелудочной железы, где облучение пучком электронов достаточно для достижения уменьшения риска загрязнения панкреатического продукта инфицирующим агентом; и (в) выделения панкреатина из облученной ткани поджелудочной железы с получением таким образом панкреатического продукта с уменьшенным риском загрязнения инфицирующим агентом по отношению к ткани поджелудочной железы млекопитающего, полученной на стадии (а) или образцу панкреатина, выделяемому из необлученной ткани поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления инфицирующим агентом является парвовирус свиней (ПВС). В некоторых вариантах осуществления способ обеспечивает снижение по меньшей мере на три  $\log_{10}$ , предпочтительно по меньшей мере на четыре  $\log_{10}$  в отношении меры, характеризующей уровень активности безоболочечного вируса, такого как парвовирус свиней (ПВС). В некоторых вариантах осуществления мера, характеризующая уровень активности безоболочечного вируса, является вирусной нагрузкой.

Другой аспект настоящего изобретения включает ферментный препарат, содержащий один или более ферментов, выделенных из ткани млекопитающего и по существу инактивированный безоболочечный вирус, где препарат имеет биологическую активность, которая соответствует по меньшей мере 50%, предпочтительно по меньшей мере 90% биологической активности препарата сравнения. В некоторых вариантах осуществления препарат сравнения не был подвергнут обработке, достаточной для инактивирования безоболочечного вируса. В некоторых вариантах осуществления по существу инактивированный безоболочечный вирус является парвовирусом свиней (ПВС). В некоторых вариантах осуществления один или более ферментов включают панкреатин. В некоторых вариантах осуществления один или более ферментов выделены из ткани млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления тканью млекопитающего является ткань млекопитающего, облученная пучком электронов.

Другой аспект настоящего изобретения включает фармацевтическую композицию, содержащую один или более ферментов, выделенных из ткани млекопитающего, которая была подвергнута обработке для уменьшения риска вирусной или микробной инфицированности, где композиция имеет биологическую активность, соответствующую по меньшей мере 50%, предпочтительно по меньшей мере 90% биологической активности композиции сравнения. В некоторых вариантах осуществления один или более ферментов включают липазу. В некоторых вариантах осуществления композиция сравнения содержит необработанный образец ткани млекопитающего, соответствующей ткани млекопитающего, которая была подвергнута обработке для уменьшения риска вирусной или микробной инфицированности. В некоторых вариантах осуществления обработка включает облучение пучком электронов. В некоторых вариантах осуществления облучение пучком электронов имеет дозу примерно от 5 до примерно 50 кГр, предпочтительно примерно от 10 до примерно 40 кГр.

Другой аспект настоящего изобретения включает способ получения панкреатического продукта, включающий стадии: (а) получение ткани поджелудочной железы млекопитающего; (б) облучение ткани поджелудочной железы пучком электронов с получением облученной ткани поджелудочной железы; и (в) выделение панкреатина из облученной ткани поджелудочной железы с получением панкреатического продукта. В некоторых вариантах осуществления биологическая активность панкреатического продукта,

полученного на стадии (в), соответствует по меньшей мере 50%, предпочтительно по меньшей мере 90% биологической активности панкреатинного продукта сравнения. В некоторых вариантах осуществления панкреатинный продукт сравнения получен из необлученной ткани поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления облучение пучком электронов достаточно для достижения снижения вирусной нагрузки, по меньшей мере, на три  $\log_{10}$ , предпочтительно, по меньшей мере, на четыре  $\log_{10}$ . Например, обработка достаточна для достижения снижения вирусной нагрузки ПВС по меньшей мере на три  $\log_{10}$ , предпочтительно по меньшей мере на четыре  $\log_{10}$  по отношению к необлученному образцу сравнения. В некоторых вариантах осуществления облучение пучком электронов имеет дозу примерно от 5 до примерно 50 кГр, предпочтительно примерно от 10 до примерно 40 кГр. В некоторых вариантах осуществления биологической активностью является липазная активность. В некоторых вариантах осуществления биологической активностью является протеазная активность или амилазная активность.

Другой аспект настоящего изобретения включает способ переваривания белка, включающий стадии: (а) обеспечение ферментного или проферментного препарата, выделенного из ткани животного, облученной пучком электронов; и (б) контактирование белка с ферментным или проферментным препаратом в условиях, достаточных для переваривания 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 перевариваемый белок применяют для приготовления белкового гидролизованного продукта. В некоторых вариантах осуществления ферментный или проферментный препарат, выделенный из ткани животного, облученной пучком электронов, показывает снижение вирусной нагрузки по меньшей мере на три  $\log_{10}$ , предпочтительно по меньшей мере на четыре  $\log_{10}$  по отношению к ферментному или проферментному препарату сравнения, выделяемому из необлученной ткани животного. В некоторых вариантах осуществления ферментный или проферментный препарат, выделяемый из ткани животного, облученной пучком электронов, показывает биологическую активность, соответствующую по меньшей мере 50%, предпочтительно по меньшей мере 90% биологической активности ферментного или проферментного препарата сравнения, выделяемого из необлученной ткани животного.

Другой аспект настоящего изобретения включает ферментный препарат, содержащий один или более ферментов, выделенных из ткани поджелудочной железы, облученной пучком электронов. В некоторых вариантах осуществления ткань поджелудочной железы включает поджелудочную железу свиньи. В некоторых вариантах осуществления перед облучением поджелудочную железу свиньи замораживают и механически перерабатывают в чешуйки или блоки. Так в некоторых таких вариантах ткань поджелудочной железы, подвергаемая облучению пучком электронов, является расслоенной замороженной тканью поджелудочной железы или замороженным блоком ткани поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления поджелудочная железа свиньи является цельной поджелудочной железой или ее частью, такой как одна или более долей. В некоторых вариантах осуществления один или более ферментов включают панкреатин. В некоторых вариантах осуществления ферментный препарат показывает снижение вирусной нагрузки по меньшей мере на три  $\log_{10}$ , предпочтительно по меньшей мере на четыре  $\log_{10}$  по отношению к ферментному препарату сравнения. Например, ферментный препарат показывает снижение вирусной нагрузки ПВС по меньшей мере на три  $\log_{10}$ , предпочтительно по меньшей мере на четыре  $\log_{10}$  по отношению к ферментному препарату сравнения. В некоторых вариантах осуществления биологическая активность ферментного препарата соответствует по меньшей мере 50%, предпочтительно по меньшей мере 90% биологической активности ферментного препарата сравнения. В некоторых вариантах осуществления биологическая активность является липазной активностью. В некоторых вариантах осуществления биологическая активность является протеазной активностью или амилазной активностью. В некоторых вариантах осуществления ферментный препарат сравнения получен из необлученной ткани. В некоторых вариантах осуществления снижение вирусной нагрузки является ортогональным снижением.

Другой аспект настоящего изобретения включает способ лечения экзокринной недостаточности поджелудочной железы, включающий введение пациенту дозы любого из указанных выше ферментных препаратов и/или фармацевтических композиций. В некоторых вариантах осуществления экзокринная недостаточность поджелудочной железы является следствием муковисцидоза или хронического панкреатита.

Е. Примеры.

Пример 1. Облучение пучком электронов парвовируса свиней (ПВС), панкреатина АФИ и поджелудочной железы свиньи.

Материалы и способы.

Парвовирус свиней в клеточной культуральной жидкости во флаконах. Поскольку сама ткань поджелудочной железы свиньи может обладать некоторым инактивирующим действием на вирусы, первоначально образцы вирусов, используемые в данных исследованиях, готовят из инфицированных культур клеток. Парвовирус свиней (ПВС), штамм NADL-2 (ATCC® VR-742™) и свиные семенные клетки (ATCC® CRL-1746™) приобретают в Американской коллекции типовых культур (ATCC). ПВС размно-

жают, культивируют и хранят в соответствии с рекомендациями АТСС. ПБС размножают приблизительно до титра  $10^8$  вирусных инфекционных единиц (ИЕ)/мл. Вирус собирают из лизированных клеток в клеточной культуральной среде, состоящей из минимальной питательной среды (МПС), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 2 мМ глутамина, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина.

Перед поставкой ПБС фасуют во флаконы, а затем помещают в двойные пакеты. Флаконами являются криогенные флаконы Nalgene, т. е. полипропиленовые с навинчиваемыми снаружи крышками из полиэтилена высокой плотности (ПЭВП) с кольцом, предохраняющим от протечки, имеющие длину 1,87 дюйма, диаметр 0,5 дюйма и вместимость 2,0 мл и объем заполнения 1,0 мл. Каждый отдельный флакон помещают в пакет Food Saver (полиэтиленовый с внешним нейлоновым слоем) и запечатывают под вакуумом. Пакеты обрезают так, чтобы они точно подходили к флаконам. Четыре отдельных флакона затем помещают внутрь другого пакета Food Saver (приблизительно 11×14 дюймов) и запечатывают под вакуумом.

Замороженные расслоенные поджелудочные железы свиней. Поджелудочную железу, полученную от убойного бора (Animal Technology, Tyler, TX) хранят на сухом льду.

Замороженную расслоенную поджелудочную железу свиньи помещают в 12×12×1 3/4-дюймовый контейнер (прозрачный полипропилен), который запечатывают под вакуумом в 3 мил пакет из полипропилена/нейлона. Пакет запечатывают нагревом. Поджелудочные железы хранят на сухом льду, чтобы гарантировать температуры ниже 20°C. Масса образца замороженной расслоенной поджелудочной железы свиньи равна 1,05 кг плюс масса упаковки 270 г (0,27 кг). Крышка весит 100 г. Поверхностная плотность 1,3 г/см<sup>2</sup>. Для каждой дозы излучения готовят две упаковки, включая контроль без облучения, одну невскрытую упаковку применяют для выделения ферментного препарата после доставки обратно на место проведения выделения с другой упаковкой, составляющей запас.

Панкреатин (АФИ). Применяли два типа АФИ панкреатина: панкреатин N и панкреатин S. Оба АФИ хранили в условиях окружающей среды. Панкреатин N (номер материала 1030828, Abbott Laboratories) является порошком от желтоватого/серого до нечисто белого цвета. Панкреатин N имеет происхождение из поджелудочной железы убойного бора. Панкреатин S (номер материала 1030829, Abbott Laboratories) является порошком от желтоватого/серого до нечисто белого цвета. Использовался панкреатин S из поджелудочной железы коровы.

Панкреатин АФИ помещали в 2 1/2×3 1/2×1 5/8 дюймовый контейнер (прозрачный полипропилен), который запечатывали под вакуумом в 3 мил пакет из полипропилена/нейлона. Пакет запечатывали нагревом. Масса образца АФИ панкреатина 80 г плюс масса упаковки 26 г. Поверхностная плотность 1,4 г/см<sup>2</sup>. Образцы панкреатина N подвергали облучению пучком электронов при указанной дозе. Контроль не подвергали облучению пучком электронов.

Активность панкреатина N определяли после возвращения на место исследования. Использовался панкреатин N из поджелудочной железы убойного бора. Все упаковки панкреатина N приходят с места облучения невскрытыми.

Облучение пучком электронов.

Источником пучка электронов является линейный ускоритель для обработки промышленных материалов (IMPELA®, Iotron Industries, Inc. Columbia City, IN), 10 МэВ, ширина сканирования 80 см.

Образцы замороженной расслоенной поджелудочной железы свиньи и парвовируса свиней хранят при температуре ниже -20°C, поместив на сухой лед, находящийся на алюминиевом поддоне. Дозиметры размещают на верхней поверхности каждого образца. Образцы упакованного АФИ панкреатина, находящиеся при температуре окружающей среды, помещают на растянутый лист пенополистирола, дозиметры размещают на верхней поверхности. Упаковки направляют на конвейерную ленту под электронно-лучевой трубкой. После одного прохода облучения дозиметры забирают. Упаковки направляют на второй проход под излучающей трубкой после переворачивания упаковки (верхняя сторона теперь обращена вниз) и на верхней поверхности размещают новый дозиметр. После второго круга облучения упаковки и дозиметры забирают. Упаковки замороженных расслоенных поджелудочных желез свиньи и парвовируса свиней забирают и помещают для перевозки на сухой лед. Упаковки АФИ панкреатина забирают и хранят при перевозке при температуре окружающей среды. Упаковки контроля замороженных расслоенных поджелудочных желез свиньи и парвовируса свиней, помещенные на сухой лед, для обратной перевозки на сухом льду готовят без воздействия излучением. Упаковки контроля АФИ панкреатина, приготовленные для обратной перевозки, хранят при температуре окружающей среды и готовят без воздействия излучением. Дозу пучка электронов вычисляют из показаний дозиметра с помощью калибровочной кривой.

Исследование вирусной инфицированности.

Вирусную инфицированность определяют титрованием десятикратных разведений на 96-луночных микропланшетах с применением подходящих контролей в трехкратном повторении для каждой дозы энергии. Вирусные титры вычисляют с применением способа Рида и Мюнха, описанного в статье Reed L. J.; Muench H. (1938). "A simple method of estimating fifty percent endpoints". The American Journal of Hygiene 27: 493-493 и выражают как 50% TCID<sub>50</sub> на миллилитр.

## Выделение и исследование панкреатина.

Способ, применяемый для выделения панкреатина, по существу схож с раскрытым в US 4623624 и включает гидролиз и/или аутолиз с последующим просеиванием волокна, осаждение ферментов, отделение осадка фильтрацией и/или центрифугированием, промывку фильтровальной лепешки, сушку и уменьшение размера частиц. Гидролиз проводят, используя одну упаковку, соответствующую каждой дозе излучения, включая необлученный контроль. Для каждого опыта по выделению отбирают упаковку без повреждений (таких, как большие трещины). Благодаря предосторожностям, принятым при обратной перевозке на место исследования, все упаковки приходят неповрежденными, и одну упаковку для каждой дозы излучения, включая контроль, случайным образом выбирают для выделения. Для начала гидролиза в качестве источника протеазы применяют панкреатин с более раннего выделения. Для подачи ионов кальция, необходимых для активации протеаз, применяют гидроксид кальция. В качестве буферного агента для гидролиза применяют бикарбонат натрия. В качестве пеногасящего агента применяют симетикон. Гидролиз поджелудочной железы проводят при температуре, близкой к температуре окружающей среды. Окончание гидролиза определяют центрифугированием гидролизованной смеси после добавления изопропанола как описано ниже. После окончания гидролиза для снижения скорости гидролиза добавляют дополнительный изопропанол, смесь охлаждают, смесь перемешивают и отделяют волокна с применением сита 0,425 дюйма. Волокна промывают изопропанолом и сдавливают для вытеснения удерживаемой жидкости. Промывную жидкость объединяют с ранее полученным фильтратом. Для осаждения ферментов к фильтрату добавляют дополнительный изопропанол. Суспензию фильтруют через фильтровальную ткань с отверстиями в 15 мкм и промывают повышающимися концентрациями изопропанола и абсолютным изопропанолом в качестве конечной промывки. Лепешку сушат на фильтровальной ткани в токе азота, создавая вакуум под фильтровальной тканью до тех пор, пока лепешка не будет визуально казаться сухой (цвет лепешки становится светлее после удаления изопропанола и воды). Лепешку снимают с фильтровальной ткани и сушат в вакууме и в токе азота при температуре ниже примерно 50°C до содержания воды по Карлу Фишеру 3,5% или ниже. Выход панкреатина составляет от 80 до 100 г с 1 кг замороженной расслоенной поджелудочной железы убойного борова.

## Центрифужное исследование на окончание гидролиза.

Из сосуда для гидролиза отбирают три черпака примерно по 10 мл и пропускают через сито 0,425 мм, собирают фильтрат в пластиковый стакан (в пластиковый стакан также выскребают фильтрат), отбрасывают волокна, которые задержались на сите. С помощью пипетки в 50 мл центрифужную пробирку добавляют 10 г раствора из реактора, добавляют 5,5 мл 85% ИПС, перемешивают 1 мин шпателем. В 50 мл центрифужную пробирку к фильтрату добавляют 20 мл 85% ИПС, перемешивают 1 мин шпателем. Центрифугируют суспензию примерно при 90× g в течение 2 мин.

Первый образец можно отбирать через два часа после начала гидролиза или когда цвет изменится с розового до коричневатого и суспензия станет более тонкой (примерно 2 ч).

Следующий образец отбирают, когда цвет станет коричневым без розового оттенка, в этой точке ожидается примерно 25% осадка, осадок будет менее твердым и в прозрачном верхнем слое могут присутствовать остатки. После этого отбор проб, по возможности, можно производить с получасовыми интервалами.

Гидролиз прекращают, когда два последовательных измерения показывают менее 20% осадков. В этой точке осадок будет твердым без остатков в прозрачном верхнем слое.

Двустороннее облучение ПВС во флаконах пучком электронов проводят в трех повторениях. Данные по вирусной нагрузке и логарифмической редукции ПВС, подвергнутого облучению пучком электронов, приведены в табл. 1.

Доза (кГр)	0	9,5	19,25	38,45	0	9,5	19,25	38,45
	Вирусная нагрузка	Вирусная нагрузка	Вирусная нагрузка	Вирусная нагрузка	Логарифмическая редукция	Логарифмическая редукция	Логарифмическая редукция	Логарифмическая редукция
	Вирус, титр/мл	Вирус, титр/мл	Вирус, титр/мл	Вирус, титр/мл				
Тест А	1,50E+08	2,50E+06	1,50E+05		0,00E+00	1,78E+00	3,00E+00	
Тест В	1,50E+08	6,34E+06	6,34E+04		0	1,37E+00	3,37E+00	
Тест С	4,00E+08	1,26E+06	4,00E+05	1,50E+02	0	2,50+00	3,00E+00	6,43E+00
<b>Среднее</b>					<b>0</b>	<b>1,88E+00</b>	<b>3,12E+00</b>	<b>6,43E+00</b>

Дозу пучка электронов определяют, оценивая дозу, поглощенную каждым образцом из поверхностной дозы, показанной дозиметром, закрепленным на контейнере с образцом. В табл. 1 показано, что воздействие на ПВС примерно 40 кГр обеспечивает примерно 6,5 log<sub>10</sub> логарифмической редукции, тогда

как воздействие примерно 20 кГр обеспечивает примерно 3  $\log_{10}$  логарифмической редукции. На основе этих данных ожидается, что воздействие примерно 30 кГр обеспечит примерно 4  $\log_{10}$  логарифмической редукции.

Воздействие на ПВС примерно 60 кГр, примерно 80 кГр или примерно 100 кГр приводит к конечным вирусным титрам ниже предела обнаружения исследования.

Панкреатин исследуют валидированными способами на активности свободных протеазы, амилазы и липазы как описано в Фармакопее США. Панкреатин исследуют валидированными способами на общую протеазу как описано в Европейской Фармакопее (ЕФ).

Выполнение двустороннего облучения панкреатина N пучком электронов. Все контейнеры с панкреатином N в месте исследования получают неповрежденными и используют для исследования.

Данные по ферментной активности АФИ панкреатина, подвергнутого облучению пучком электронов, приведены в табл. 2.

Доза электронного пучка	Активность	Активность	Общая	Активность
	липазы	амилазы	активность	свободной
кГр	единицы	единицы	единицы	единицы
	Американской фармакопей/г	Американской фармакопей/г	Американской фармакопей/г	Американской фармакопей/г
Контроль (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

В табл. 2 показано, что воздействие на АФИ панкреатина примерно 20 кГр приводит к потере примерно 30% липазной активности, воздействие на АФИ панкреатина примерно 40 кГр приводит к потере примерно 35% липазной активности, воздействие на АФИ панкреатина примерно 60 кГр приводит к потере примерно 46% липазной активности, воздействие на АФИ панкреатина примерно 80 кГр приводит к потере примерно 54% липазной активности, воздействие на АФИ панкреатина примерно 100 кГр приводит к потере примерно 58% липазной активности. На основе этих данных ожидается, что воздействие примерно 30 кГр приведет к потере примерно 30% липазной активности.

Выполнение двустороннего облучения поджелудочной железы убойного бора пучком электронов. Данные по ферментной активности панкреатина, полученного из замороженной расслоенной поджелудочной железы убойного бора, подвергнутой облучению пучком электронов, приведены в табл. 3:

Доза электронного пучка	Активность	Активность	Общая активность	Активность
	липазы	амилазы	протеазы	свободной
кГр	единицы	единицы	единицы	единицы
	Американской фармакопей/г	Американской фармакопей/г	Американской фармакопей/г	Американской фармакопей/г
Контроль (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

В табл. 3 показано, что воздействие на замороженную расслоенную поджелудочную железу убойного бора примерно 20 кГр приводит к потере примерно 1% липазной активности, воздействие на замороженную расслоенную поджелудочную железу убойного бора примерно 40 кГр приводит к потере примерно 13% липазной активности, воздействие на замороженную расслоенную поджелудочную железу убойного бора примерно 60 кГр приводит к потере примерно 23% липазной активности, воздействие на замороженную расслоенную поджелудочную железу убойного бора примерно 80 кГр приводит

к потере примерно 54% липазной активности, воздействие на замороженную расслоенную поджелудочную железу убойного бора примерно 100 кГр приводит к потере примерно 52% липазной активности. На основе этих данных ожидается, что воздействие примерно 30 кГр приведет к потере примерно 10% липазной активности.

Как показано в табл. 2 и 3, облучение АФИ панкреатина пучком электронов приводит к меньшей потере ферментной активности по сравнению с облучением ткани поджелудочной железы пучком электронов перед выделением. Не желая быть связанным теорией, устойчивость интактной ткани к облучению пучком электронов может быть связана с конформацией фермента (т.е. в форме профермента) в ткани-источнике и/или сопутствующими коферментами в ткани-источнике, обеспечивающими защиту структуры.

Пример 2. Облучение электронным пучком целой поджелудочной железы свиней.

Дальнейшее исследование выполняют с применением целой поджелудочной железы свиней. Примерно 3,6 кг замороженной поджелудочной железы свиней помещают в картонные коробки, обработанные изнутри воском, размером примерно 10×15×1,5 дюймов. Коробки замораживают до -20°C и хранят до применения для облучения пучком электронов. Коробки перевозят для облучения пучком электронов в грузовике-рефрижераторе (-20°C). Коробки достают из грузовика-рефрижератора и затем подвергают двустороннему облучению электронным пучком, при этом необлученные коробки служат в качестве контрольных. По 5 коробок используют для каждой номинальной дозы облучения: 0, 15, 20, и 25 кГр, и отправляют обратно для оценки в грузовике-рефрижераторе (-20°C), вместе с необлученными коробками, и затем хранят при -20°C.

Замороженные образцы поджелудочной железы выбираются из каждой коробки в произвольном порядке внутри коробки для дальнейшего выделения панкреатина. Выделение проводят, как описано в данном описании изобретения. Панкреатин, выделенный из цельной поджелудочной железы, подвергнутой облучению пучком электронов, затем исследуют на ферментную активность согласно колориметрическому исследованию.

Образцы АФИ панкреатина испытывают, используя колориметрический кинетический анализ при помощи считывателя микропланшет с применением субстратов, структурно схожих с теми, что используются в USP 39 <Pancrelipase>. Активности ферментов определяют, измеряя скорость образования продукта по отношению к стандартному образцу панкреатина. Показана аналитическая сравнимость между зарегистрированными методами из монографии Американской фармакопеи и альтернативными способами, использующими методы считывателя микропланшета.

Процедуры приготовления образцов, выделения и оценки повторяют по четыре раза для каждой дозы для того, чтобы получить в общей сложности по пять измерений для каждой дозы. Средние значения пяти измерений приведены в табл. 4.

Таблица 4. Ферментная активность АФИ после облучения цельной поджелудочной железы

Доза электронного пучка*	Средняя	Средняя	Средняя	Средняя общая
	липазная активность	амилазная активность	активность свободной протеазы	активность протеазы
кГр	единицы Американской фармакопеи/мг	единицы Американской фармакопеи/мг	единицы Американской фармакопеи/мг	единицы Американской фармакопеи/мг
Контроль (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

В табл. 4 показано, что панкреатин, выделенный из цельной поджелудочной железы, подвергнутой облучению электронным пучком дозой до примерно 25 кГр, обладает такой же или по существу такой же липазной активностью, что и панкреатин, выделенный из необлученного контрольного образца.

Пример 3. Облучение пучком электронов малыми дозами интактной ткани поджелудочной железы свиней.

Дальнейшие исследования проводят впрыскиванием в ткань поджелудочной железы свиней живого вируса и затем подвергают содержащие вирус ткани облучению электронным пучком с малыми дозами (приблизительно 12,3 кГр), чтобы обеспечить выделение и оценку вируса. Данное дополнительное исследование проводят для демонстрации эффективную инактивацию нескольких родственных вирусов при малых дозах, чтобы обеспечить эффективную количественную оценку влияния облучения пучком

электронов.

Избранные вирусы намеренно впрыскивают в образцы тканей и уровень элиминации вируса определяют сравнением количества введенного вируса и количества вируса, оставшегося после обработки пучком электронов. Вирусы, выбранные для данного исследования, приведены в табл. 5.

Таблица 5. Вирусы, выбранные для исследования элиминации вируса

Вирус	Семейство	Геном	Оболочка	Размер (нм)	Физико-химическая резистентность
Реовирус типа 3 РЕОЗ	Reo	РНК	Нет	60-80	Средняя
Парвовирус свиной ПВС	Parvo	ДНК	Нет	18-24	Высокая
Кошачий калицивирус ККВ	Calici	РНК	Нет	35-39	Средняя

РЕОЗ имеет двухцепочечную РНК, сегментированный геном и принадлежит к семейству вирусов Reoviridae, к которому также относится ротавирус. Таким образом, РЕОЗ может служить моделью для ротавируса. ККВ используется в качестве модельного вируса для проверки достоверности методов инактивации в кровяных продуктах, и в частности в качестве модельного для вируса гепатита Е (ВГЕ).

Поджелудочную железу свиной нарезают и измельчают. Ткань затем добавляют на чашку Петри и впрыскивают в нее определенный вирус. Стандартные вирусные материалы обладают сертифицированными титрами по меньшей мере  $1 \times 10^7$  БОЕ/мл. Образец с добавкой выдерживают при комнатной температуре по меньшей мере в течение 60 мин (до тех пор, пока ткань не вернется к исходной сухости). Вслед за выдержкой, дополнительное количество ткани поджелудочной железы свиной добавляют на чашку. Чашку затем запечатывают и помещают на сухой лед для перевозки к установке для облучения электронным пучком. Каждая из чашек содержит приблизительно 13 граммов ткани, при этом плотность ткани схожа с плотностью цельной железы.

Для каждого вируса имеются также обработанные образцы восстановления (не перевезенные) и необлученные перевозимые образцы контроля (перевезенные к установке для облучения электронным пучком, но не облученные).

Облучение пучком электронов проводят на установке по облучению пучком электронов. После того, как обработка излучением пучка электронов окончена, облученные образцы и необлученные перевезенные образцы контроля, перевозят обратно для определения вирусной нагрузки. По методике образцы до исследования хранят при температуре не более чем  $-60^\circ\text{C}$ .

Для каждого образца 50 мл культуральной среды добавляют в стерильную бутылку. Ткань экстрагируют, выполняя трижды вымачивание в течение приблизительно 5-10 мин при комнатной температуре с последующим 15-30-секундным перемешиванием на вортексе. Затем образцы центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость от экстракции используют для исследования вируса.

Вирусные титры определяют, используя стандартный тест бляшкообразования. В качестве типа клеток-индикаторов для РЕОЗ, ПВС и ККВ используют Vero, PT-1 и CRFK, соответственно. Вирусные титры и фактор элиминации вируса рассчитывают в соответствии со стандартными процедурами. Фактор элиминации вируса (ФЭВ) рассчитывают следующим образом:

$$\text{ФЭВ} = \log_{10} \left[ \frac{\text{Объем} * \text{титр перед обработкой}}{\text{Объем} * \text{титр после обработки}} \right]$$

Данные по элиминации вируса, вызванной облучением образца содержащей вирус ткани пучком электронов, представлены в табл. 6.

Таблица 6. Элиминация вируса после облучения поджелудочной железы с добавкой вируса

Модельный вирус	Общий вирусный log		Фактор элиминации вируса	95% доверительный интервал
	До обработки	После обработки		
РЕОЗ	6,5	< 2,4	$\geq 4,1$	0,08
ККВ	6,7	4,9	1,8	0,05
ПВС	5,8	3,6	2,2	0,29

Данные исследования подтверждают, что достаточная инактивация вирусов, включая кошачий калицивирус (ККВ) и реовирус типа 3 (РЕОЗ), может быть достигнута при помощи облучения интактной ткани пучком электронов малой дозой. Более того, облучение поджелудочной железы с последующим выделением ферментного препарата (например, АФИ панкреатина) из облученной железы демонстрирует схожие результаты потери ферментной активности по отношению к необлученному контрольному образцу, как показано в табл. 3, где использовалась расслоенная поджелудочная железа свиней.

Введение стадии обеззараживания перед обработкой поджелудочной железы свиней обеспечивает эффективный контроль известных инфекционных агентов как касательно безопасности оператора при выделении ферментов, так и относительно безопасности пациентов. Таким образом, использование обработки пучком электронов, которая эффективна для инактивации широкого спектра микробов и вирусов, включая вирусы, которые сложно инактивировать (например, парвовирус свиней), с минимальными потерями ферментной активности, обеспечивает преимущество по сравнению с другими способами.

Как раскрыто в описании, стадия облучения пучком электронов может рассматриваться как стадия ортогональной инактивации вируса. Уменьшение микробной и/или вирусной нагрузки, полученной в ткани поджелудочной железы, облученной пучком электронов, аддитивно переходит и на панкреатин, из нее выделяемый, по отношению к уменьшению, достигнутому на других стадиях снижения микробной и/или вирусной нагрузки. Общая логарифмическая ( $\log_{10}$ ) редукция, достигаемая на всех стадиях, включая облучение пучком электронов, является кумулятивной логарифмической ( $\log_{10}$ ) редукцией, достигаемой на всех стадиях микробной и/или вирусной инактивации, произведенной на ткани поджелудочной железы.

Следует понимать, что предыдущее подробное описание и прилагаемые примеры являются исключительно иллюстративными и их не следует воспринимать как ограничивающие объем изобретения, который определен исключительно прилагаемой формулой изобретения и ее эквивалентами. Специалисту в данной области очевидны различные замены и модификации к раскрытым вариантам осуществления изобретения. Такие замены и модификации, включая, без ограничения, относящиеся к химическим структурам, заместителям, производным, промежуточным продуктам, синтезам, составам или способам или любым комбинациям таких замен и модификаций в применении изобретения могут быть сделаны, не отступая от замысла и объема охраны изобретения.

Все источники (из патентной и непатентной литературы), цитированные выше, включены в данную патентную заявку посредством ссылки. Обсуждение таких источников предназначено исключительно для того, чтобы обобщить утверждения, сделанные их авторами. Не предполагается, что любой из этих источников (или часть любого источника) является релевантным из уровня техники (и вообще входит в уровень техники). Заявитель оставляет за собой право выражать сомнения в точности и уместности цитированных источников.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

- Способ получения препарата панкреатина, включающий стадии:
  - облучение пучком электронов интактной ткани поджелудочной железы млекопитающего с получением облученной ткани поджелудочной железы, при этом излучение пучка электронов имеет дозу примерно от 5 до примерно 50 кГр; и
  - выделение панкреатина из облученной ткани поджелудочной железы.
- Способ по п.1, где биологическая активность панкреатина, полученного на стадии (б), соответствует по меньшей мере 80% биологической активности ферментного препарата, выделенного из необлученной ткани поджелудочной железы.
- Способ по п.1, где облучение пучком электронов достаточно для достижения снижения вирусной нагрузки модельного вируса по меньшей мере на три  $\log_{10}$  по отношению к необлученной ткани поджелудочной железы.
- Способ по п.2, где биологическая активность является липазной активностью.
- Способ по п.1, где излучение пучка электронов имеет дозу примерно от 10 до примерно 40 кГр.

6. Способ по п.1, где облучение пучком электронов достаточно для достижения снижения вирусной нагрузки модельного вируса по меньшей мере на четыре  $\log_{10}$  по отношению к необлученной ткани поджелудочной железы.

7. Способ по пп. 3 и 6, где модельный вирус является парвовирусом свиней (ПВС).

8. Способ по п.1, где интактной тканью поджелудочной железы млекопитающего является расслоенная ткань, цельная железа или часть цельной железы.

9. Способ по п.1, где стадия (б) включает инициирование гидролиза или аутолиза облученной ткани поджелудочной железы или активацию профермента из облученной ткани поджелудочной железы.

10. Лекарственная форма для перорального применения, включающая панкреатин, полученный способом, включающим следующие стадии:

(а) облучение пучком электронов интактной ткани поджелудочной железы млекопитающего с получением облученной ткани поджелудочной железы, при этом излучение пучка электронов имеет дозу примерно от 5 до примерно 50 кГр; и

(б) выделение панкреатина из облученной ткани поджелудочной железы, где биологическая активность панкреатина, полученного на стадии (б), соответствует по меньшей мере 80% биологической активности ферментного препарата, выделенного из необлученной ткани поджелудочной железы,

при этом облучение пучком электронов достаточно для достижения снижения вирусной нагрузки модельного вируса по меньшей мере на три  $\log_{10}$  по отношению к необлученной ткани поджелудочной железы, и

при этом лекарственная форма для перорального применения включает примерно от 2000 до примерно 40000 единиц липазы на лекарственную форму.

11. Лекарственная форма для перорального применения по п.10, где лекарственная форма для перорального применения представляет собой капсулу, таблетку, микропеллету или микросферу.

12. Лекарственная форма для перорального применения по п.10, где лекарственная форма для перорального применения представляет собой композицию контролируемого или немедленного высвобождения.

