

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 970 869**

51 Int. Cl.:

A61K 38/54 (2006.01)

A61L 2/08 (2006.01)

C12N 9/94 (2006.01)

A61P 1/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.03.2017 PCT/US2017/024315**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.10.2017 WO17172619**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2017 E 17719952 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2023 EP 3436055**

54 Título: **Composiciones enzimáticas con contaminación vírica y microbiana reducida**

30 Prioridad:

28.03.2016 US 201662314048 P

31.01.2017 US 201762452746 P

03.02.2017 US 201762454184 P

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

31.05.2024

73 Titular/es:

ABBOTT LABORATORIES GMBH (50.0%)

Freundallee 9A

30173 Hannover, DE y

ABBOTT GMBH (50.0%)

72 Inventor/es:

BABCOCK, MARTIN;

BURNELL, CYNTHIA;

KALTHOD, VIKRAM;

BREITENBACH, JÖRG;

SCZESNY, FRITHJOF;

SHLIEOUT, GEORGE;

RUEFFER, FRAUKE-REGINA;

HESS, MARK;

DETE, JOHN;

CRANDALL, DANIEL;

HERTZLER, SHANNON;

RIORDAN, WILLIAM y

SANDERS, HOUSTON

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 970 869 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones enzimáticas con contaminación vírica y microbiana reducida

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una preparación de enzima pancreatina producida mediante un método de someter tejido pancreático inalterado de mamífero a radiación con haz de electrones y aislar la pancreatina del tejido pancreático irradiado, a métodos de producción de dichas preparaciones y al uso de las preparaciones en el tratamiento de la insuficiencia pancreática exocrina.

Antecedentes

Los productos procedentes de tejido animal pueden presentar contaminación vírica y/o microbiana. Determinados contaminantes biológicos, tales como bacterias o protozoos, pueden inactivarse durante los procesos de fabricación. Sin embargo, otros contaminantes biológicos, tales como los virus sin envoltura, son resistentes a los métodos establecidos para la reducción o inactivación de contaminantes. Una dificultad particular es la inactivación o eliminación de virus de composiciones enzimáticas procedentes de tejido animal sin destruir o cambiar la actividad de las enzimas en el proceso.

Los métodos establecidos para la inactivación vírica incluyen, por ejemplo, pasteurización, calor seco, calor de vapor, tratamiento con disolventes/detergentes y pH bajo. La selección de los métodos a emplear para la inactivación vírica depende de la naturaleza y la contaminación del producto, del método de purificación utilizado, si lo hubiera, y de la naturaleza del contaminante vírico. Por ejemplo, el tratamiento con disolventes o detergentes puede alterar la membrana lipídica de los virus con envoltura y, por lo tanto, se ha utilizado para la inactivación de virus con envoltura. Sin embargo, muchos virus sin envoltura generalmente no se inactivan mediante un tratamiento con disolventes o detergentes.

El calor, en particular el calor seco, es otro método establecido para la inactivación vírica. Si bien el tratamiento con calor seco puede inactivar incluso virus altamente resistentes, tales como virus sin envoltura, el tratamiento necesita períodos de tiempo prolongados (de varias horas) y control del grado de humedad. Por otro lado, el tratamiento con calor puede comprometer la actividad biológica deseada del producto, en particular, cuando el producto es una composición enzimática.

Los productos de enzimas pancreáticas se han utilizado durante mucho tiempo para tratar la insuficiencia pancreática exocrina, una afección asociada con la fibrosis quística (FQ), la pancreatitis crónica, la obstrucción del páncreas o del conducto biliar común (tal como, por ejemplo, por una enfermedad neoplásica), y con procedimientos quirúrgicos, tales como pancreatomectomía o revascularización quirúrgica gastrointestinal, así como con otras enfermedades y trastornos. El páncreas secreta enzimas digestivas, incluidas lipasas, proteasas y amilasas, hacia la luz duodenal proximal, donde facilitan la hidrólisis de los macronutrientes. Las amilasas y proteasas son secretas por órganos distintos del páncreas y contribuyen a la digestión de hidratos de carbono y proteínas. Sin embargo, hay relativamente poca lipasa procedente de fuentes distintas del páncreas implicadas en la digestión de los lípidos. Por lo tanto, los pacientes con insuficiencia pancreática exocrina no tratada suelen tener dificultades para digerir las grasas y pueden sufrir síntomas de mala digestión o desnutrición, o ambos, con deficiencias de ácidos grasos esenciales y vitaminas liposolubles, pérdida de peso, calambres, flatulencia, hinchazón y heces grasas, malolientes y blandas (esteatorrea). Para pacientes con FQ, un tratamiento inadecuado puede tener consecuencias graves, ya que un buen estado nutricional se ha correlacionado directamente con una buena función pulmonar.

La terapia con enzimas pancreáticas trata y/o evita la mala absorción y facilita el crecimiento y desarrollo en pacientes con insuficiencia pancreática exocrina. En pacientes con FQ, la mucosidad bloquea el conducto pancreático en el páncreas al igual que los pulmones. Las enzimas digestivas pancreáticas no se secretan en el intestino y, por tanto, se altera la digestión del almidón, las grasas y las proteínas. La falta de digestión produce esteatorrea, dolor abdominal y pérdida de peso, entre otros.

La mala digestión en mamíferos y seres humanos suele basarse en una deficiencia de enzimas digestivas, en particular en una deficiencia de lipasa endógena, pero también de proteasa y/o amilasa. Si la insuficiencia pancreática es patológica, esto puede ser congénito o adquirido. La insuficiencia pancreática crónica adquirida puede, por ejemplo, atribuirse al alcoholismo. La insuficiencia pancreática congénita puede, por ejemplo, atribuirse a la enfermedad congénita fibrosis quística. Las consecuencias de la deficiencia de enzimas digestivas pueden ser síntomas graves de desnutrición y desnutrición, lo que puede ir acompañado de una mayor susceptibilidad a enfermedades secundarias.

La sustitución con enzimas digestivas exógenas o mezclas de enzimas digestivas (es decir, terapia con enzimas pancreáticas) ha demostrado ser un tratamiento eficaz para la deficiencia de enzimas digestivas endógenas. Lo más frecuente es que las preparaciones farmacéuticas que contienen pancreatina porcina se utilicen para la terapia con enzimas pancreáticas (también conocida como "terapia de sustitución enzimática"). Para dichas preparaciones farmacéuticas, el principio activo evaluado en los ensayos clínicos es la lipasa y las dosis de los productos comerciales

se dan en unidades de lipasa. No obstante, dichas mezclas de enzimas digestivas obtenidas del páncreas de cerdo comprenden lipasas, amilasas y proteasas, y se pueden utilizar de manera eficaz para la terapia con enzimas pancreáticas en seres humanos debido a la gran similitud de las enzimas y sustancias acompañantes contenidas en ellas con el contenido de los jugos pancreáticos humanos. Las enzimas pancreáticas suelen administrarse por vía oral en forma de preparados sólidos.

Las glándulas pancreáticas pueden obtenerse de animales, tales como cerdos, criados y sacrificados para alimento. Las regulaciones gubernamentales a menudo requieren que las glándulas pancreáticas se obtengan de un matadero de una sola especie (es decir, un instalación donde no se sacrifiquen ni procesen otras especies) y, se limite así la disponibilidad de material de partida. La contaminación generalizada de las instalaciones con agentes infecciosos puede provocar el cese de la producción y la escasez de suministro. Los procedimientos de ensayo actuales pueden identificar lotes contaminados y su eliminación supone cargas adicionales a un suministro de material de partida ya limitado.

Están disponibles procesos para obtener enzima(s) pancreática(s) de una glándula pancreática de mamífero. Por ejemplo, en el documento US 4.623.624 se describen procesos mediante los cuales se obtiene pancreatina mediante autólisis de una suspensión acuosa de tejido que contiene isopropanol.

Se reconoce la presencia de agentes infecciosos, y en particular de virus, en el páncreas porcino utilizado para la fabricación de pancreatina. De hecho, la mayoría de las piaras de cerdos se han infectado con parvovirus porcino (PVP), que tiene una resistencia elevada a la inactivación. Se ha detectado PVP en la pancreatina como agente infeccioso. Aunque no se cree que el PVP sea patógeno para los seres humanos, es deseable obtener pancreatina con una carga de PVP reducida. Además, el PVP es un virus modelo común ya que es difícil de inactivar mediante métodos convencionales, tales como el procesamiento químico o térmico.

El documento US 2010/0119654 se refiere a la irradiación de un extracto biológico alcohólico o acuoso que contiene sólidos en forma de suspensión. La radiación empleada en el documento US 2010/0119654 es radiación ultravioleta (UV), radiación de rayos X, radiación β o radiación γ . La irradiación UV de un intermedio de pancreatina disuelto en isopropanol al 40 % produjo una reducción de hasta 4 en escala \log_{10} del fago M2. La irradiación γ de la pancreatina (PAF) produjo una disminución de aproximadamente un 40 % en la actividad de la lipasa a 27 kGy y una disminución del 13 % en la actividad de la lipasa a 5 kGy. El contenido bacteriano se redujo en más de 2,5 en escala \log_{10} pero no se registró inactivación del virus. Cuando la pancreatina (PAF) se trató con irradiación β , se informó que se mantuvo >85 % de la actividad enzimática, pero el "recuento de gérmenes" sólo se redujo en aproximadamente 1,5 en escala \log_{10} .

El documento WO 2003/020324 se refiere a la esterilización de enzimas digestivas, tales como tripsina, α -galactosidasa e iduronato 2-sulfatasa, con irradiación. Se irradiaron enzimas liofilizadas o líquidas (tripsina, una glucosidasa o una sulfatasa) solas o en presencia de un estabilizador. La irradiación γ se logró utilizando una fuente de ^{60}Co . No se registró inactivación vírica.

El documento WO 2007/014896 se refiere a la reducción de la concentración de uno o más contaminantes biológicos, en particular víricos, de la pancreatina mediante el calentamiento de la pancreatina.

En el documento US 2009/0233344, el tratamiento térmico de la pancreatina a 80 °C durante 32 horas proporcionó una reducción de aproximadamente 2,5 en escala \log_{10} de la cantidad vírica del PVP, pero también una pérdida del 20 % de la actividad de la lipasa. El tratamiento térmico de la pancreatina a 100 °C durante 8 horas proporcionó una reducción superior a 3 en escala \log_{10} de la cantidad vírica de PVP, pero se perdió casi un 50 % de la actividad de la lipasa.

Por lo tanto, las etapas del proceso que pueden ser eficaces contra virus difíciles de inactivar, tales como el PVP, tienen un potencial elevado para cambiar la naturaleza del producto de pancreatina mediante la degradación o reducción de las enzimas pancreáticas, en particular, la lipasa, a niveles inaceptables. Dichos cambios en la potencia pueden reducir o alterar el perfil de eficacia del producto final. Por tanto, es deseable mantener la actividad enzimática, en particular la actividad de la lipasa, durante el proceso de fabricación.

Dado que cada uno de los procesos de eliminación vírica previamente probados que demostraron cierta eficacia contra virus difíciles de inactivar (por ejemplo, el PVP) dieron como resultado una pérdida significativa de la actividad enzimática, incluida la actividad de la lipasa, había escepticismo en la industria sobre la posibilidad de lograr un nivel sólido de inactivación/eliminación vírica sin comprometer la calidad del producto. En particular, había escepticismo en la industria sobre la posibilidad de desarrollar una etapa de eliminación vírica ortogonal robusta y adecuada sin afectar negativamente las propiedades químicas, físicas o farmacéuticas de la pancreatina. Véase, por ejemplo, "Letter from Scientific Protein Laboratories to FDA" fechada el 22 de junio de 2004 en Docket n.º 2003D-0206.

Sumario de la invención

La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjuntas.

La presente divulgación se refiere a preparaciones de enzima pancreatina (es decir, pancreatina o preparación de enzima pancreatina) que pueden aislarse de una fuente de tejido animal que incluye una o más enzimas, que tienen una contaminación vírica y/o microbiana reducida en relación con el de tejido animal de origen, y mantienen al menos una actividad biológica del tejido animal de origen. La preparación enzimática se produce sometiendo el tejido animal de origen a radiación con haz de electrones y posteriormente aislando la pancreatina del tejido irradiado. El tejido animal de origen es tejido inalterado. El tejido irradiado presenta una reducción de al menos tres en escala \log_{10} , preferentemente de al menos cuatro en escala \log_{10} , en la carga vírica de un virus modelo en comparación con una muestra de control. Pueden emplearse etapas de reducción vírica ortogonales (por ejemplo, durante la etapa de aislar una o más enzimas del tejido irradiado). En determinadas realizaciones, la preparación enzimática aislada del tejido irradiado tiene una actividad biológica correspondiente a al menos un 50 %, preferentemente al menos un 90 %, de la actividad biológica de una preparación enzimática de control, tal como una preparación enzimática aislada de tejido animal de origen no irradiado. En determinadas realizaciones, la actividad biológica es la actividad lipasa. El tejido irradiado puede presentar una reducción de al menos tres en escala \log_{10} , preferentemente de al menos cuatro en escala \log_{10} , en los contaminantes víricos y/o microbianos en comparación con el tejido animal de origen no irradiado, y la preparación enzimática aislada del tejido irradiado puede tener una actividad biológica correspondiente a al menos un 50 %, preferentemente al menos un 90 %, de la actividad biológica de una preparación enzimática de control, tal como una preparación enzimática aislada de tejido animal de origen no irradiado.

Un método para producir una preparación de enzima pancreatina procedente de tejido pancreático inalterado de mamífero, en donde el método incluye un tratamiento suficiente para producir una reducción de al menos tres en escala \log_{10} , preferentemente de al menos cuatro en escala \log_{10} , de los contaminantes víricos y/o microbianos en comparación con el tejido animal de origen. El tratamiento de la invención comprende someter tejido pancreático de mamífero de origen inalterado a radiación con haz de electrones, para producir tejido pancreático irradiado. El tratamiento con radiación con haz de electrones puede ser suficiente para reducir la contaminación vírica y/o microbiana del tejido animal de origen, mientras se mantiene al menos una actividad biológica del tejido animal de origen. En determinadas realizaciones, la actividad biológica es la actividad lipasa. Se pueden extraer una o más enzimas y/o proenzimas del tejido animal irradiado. Se aíslan una o más enzimas del tejido animal pancreático irradiado. El método puede reducir el riesgo de contaminación infecciosa de la preparación enzimática de origen animal o de una composición farmacéutica que comprende la preparación enzimática de origen animal en relación con un control no tratado.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende las preparaciones enzimáticas descritas en el presente documento, en donde la preparación enzimática comprende o es pancreatina. La composición farmacéutica puede ser una forma farmacéutica de dosificación oral. La composición farmacéutica se puede utilizar en el tratamiento o prevención de una enfermedad que responde a la terapia de reemplazo de enzimas pancreáticas, tal como la insuficiencia pancreática exocrina. Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a una preparación de enzima pancreatina o composición farmacéutica descrita en el presente documento para su uso en el tratamiento o prevención de la insuficiencia pancreática exocrina.

Descripción detallada de la invención

A. Definiciones

Como se utiliza en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, a menos que se especifique lo contrario, los siguientes términos tienen el significado indicado:

El término "PAF", tal como se utiliza en el presente documento, significa "principio activo farmacéutico". El PAF preferido tal como se describe en el presente documento es la pancreatina, en particular la pancreatina porcina tal como se utiliza generalmente con fines terapéuticos, es decir, la pancreatina de acuerdo con los requisitos de las farmacopeas habituales, por ejemplo, Ph. Eur. y/o USP y adecuada para administración oral en el tratamiento o profilaxis de la mala digestión en mamíferos, en particular en seres humanos, y en particular de la mala digestión debido a la insuficiencia pancreática exocrina crónica, tal como en pacientes que padecen fibrosis quística, pancreatitis crónica o pacientes que se han sometido a cirugía gastrointestinal superior.

El término "bruta", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una preparación o mezcla no purificada que contiene enzimas y/o proenzimas, así como componentes adicionales procedentes del tejido de origen. Una preparación o mezcla bruta incluye, pero sin limitación, tejido animal en sí.

La expresión "preparación enzimática" se refiere a cualquier composición de materia que contenga una o más enzimas, ya sea en forma activa o inactiva (es decir, proenzimas o zimógenos). La expresión incluye extractos de células o tejidos, así como preparaciones brutas procedentes de tejido animal u otro material celular. Un ejemplo de preparación enzimática es la pancreatina, pancrelipasa, un extracto procedente del páncreas de mamíferos, preferentemente porcinos. La preparación enzimática de la invención se refiere a la preparación enzimática de pancreatina, es decir, pancreatina.

El término "extracto" en lo que se refiere a preparaciones enzimáticas, como se utiliza en el presente documento, se refiere a una o más enzimas y/o proenzimas que se han separado de al menos un componente del tejido del que proceden. Los componentes extraídos pueden estar en forma de una enzima activa o una proenzima (zimógeno) que requiere una conversión posterior a la forma activa.

5 El término "aislada" en lo que se refiere a preparaciones enzimáticas, como se utiliza en el presente documento, se refiere a una o más enzimas activas que se han separado de al menos un componente del tejido del que proceden. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, una "enzima aislada" o una "preparación enzimática aislada" incluye una o más enzimas activas que se han convertido a partir de la forma proenzimática correspondiente mediante hidrólisis y/o autólisis. La hidrólisis y/o autólisis para convertir la proenzima en una enzima activa puede ocurrir antes, durante o después de la extracción.

15 Los términos "enzimas pancreáticas", "pancreatina" y "pancrelipasa", como se utilizan en el presente documento, se refieren a mezclas enzimáticas procedentes de glándulas pancreáticas de mamíferos que comprenden enzimas digestivas, tales como lipasa, proteasa y amilasa, como componentes principales. En particular, los términos "enzimas pancreáticas", "pancreatina" y "pancrelipasa" pueden utilizarse como sinónimos en el presente documento y se refieren a extractos pancreáticos adecuados para uso terapéutico, de acuerdo con las farmacopeas habituales, que contienen varias enzimas digestivas cuyas propiedades están definidas en monografías habituales como se explicó anteriormente. Debido a los procesos de fabricación convencionales, "enzimas pancreáticas", "pancreatina" y "pancrelipasa" normalmente se presentan en forma de polvo como "pancreatina en polvo", a veces también se lo denomina "polvo de páncreas". Las enzimas pancreáticas, la pancreatina y la pancrelipasa también pueden ser, y preferentemente son, PAF. La pancreatina para uso farmacéutico suele ser de origen bovino o porcino. Se prefiere la pancreatina porcina. La pancrelipasa se ha descrito en algunas referencias como una preparación enzimática con mayor actividad (lipasa) en relación con la pancreatina.

25 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "composición farmacéutica" significa una composición que comprende una preparación enzimática como se describe en el presente documento y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

30 La expresión "farmacéuticamente aceptable" se utiliza como adjetivo para significar que el sustantivo modificado es adecuado para su uso como producto farmacéutico o como parte de un producto farmacéutico.

35 Una etapa de reducción microbiana y/o vírica "ortogonal" se refiere a un método distinto para la reducción de los microbios y/o virus que pueden estar presentes en una muestra. Una etapa de reducción microbiana y/o vírica puede ser ortogonal siempre que haya una o más etapas de reducción microbiana y/o vírica adicionales en el proceso. En determinadas realizaciones, una etapa de reducción microbiana y/o vírica "ortogonal" tiene un mecanismo suficientemente distinto de todas las demás etapas de reducción microbiana y/o vírica utilizadas en el proceso, de modo que la destrucción en escala \log_{10} lograda mediante la etapa "ortogonal" se vuelve aditiva con la reducción en escala \log_{10} acumulativa lograda a partir de todas las demás etapas de reducción microbiana y/o vírica que se utilizan para obtener la preparación enzimática.

45 Los términos "prevenir", "que previene" y "prevención" se refieren a un método para prevenir la aparición de una afección, trastorno o enfermedad y/o los síntomas que lo acompañan o impedir que un sujeto adquiera una afección, trastorno o enfermedad. Como se utiliza en el presente documento, "prevenir", "que previene" y "prevención" también incluyen retrasar la aparición de una afección, trastorno o enfermedad y/o los síntomas que lo acompañan y reducir el riesgo de que un sujeto adquiera una afección, trastorno o enfermedad.

50 El término "sujeto" incluye seres humanos y otros primates, así como animales domesticados y semidomesticados, incluidos, pero sin limitación, aves de corral, abejas, vacas, ovejas, cabras, cerdos, caballos, perros, gatos, conejos, ratas, ratones y similares. El término "aves de corral" abarca todos los tipos de aves domésticas, incluidos, pero sin limitación, pollos, pavos, patos, gansos, el grupo de aves ratite y aves de caza. El sujeto puede ser un ser humano.

55 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad suficiente de la preparación enzimática o composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una afección, trastorno o enfermedad, con una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Cuando se utiliza en un tratamiento médico, se puede emplear una cantidad terapéuticamente eficaz de una de las preparaciones enzimáticas como extracto o en forma bruta. Como alternativa, la composición enzimática se puede administrar como una composición farmacéutica que contiene la composición enzimática de interés en combinación con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

60 Los términos "tratar", "que trata" y "tratamiento" se refieren a un método para aliviar o anular una afección, trastorno o enfermedad y/o los síntomas que lo acompañan.

65 B. PREPARACIONES ENZIMÁTICAS Y MÉTODOS DE FABRICACIÓN

En el presente documento se divulga una preparación de enzima pancreatina, es decir, pancreatina. La preparación

enzimática puede comprender una proenzima, tal como una prolipasa o un tipsinógeno. La preparación enzimática puede estar en forma bruta. La preparación enzimática comprende una o más proenzimas que se han extraído de tejido pancreático de mamífero inalterado. La preparación enzimática se ha aislado de un tejido pancreático de mamífero inalterado.

5 Una preparación enzimática aislada puede tener la misma actividad biológica o sustancialmente la misma, pero menos contagiosa, que el tejido del que se aisló. La preparación de enzima aislada puede tener la misma actividad biológica, o sustancialmente la misma, que una preparación enzimática de control. La infecciosidad de la preparación enzimática
10 aislada puede reducirse en al menos tres en escala \log_{10} , preferentemente al menos cuatro en escala \log_{10} , en relación con la infecciosidad del tejido del que se aisló. La infecciosidad que se reduce es la infecciosidad vírica, en particular, la infecciosidad de virus sin envoltura y/o infecciosidad de virus con envoltura. La actividad biológica de la preparación enzimática aislada puede ser al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 % o preferentemente al menos un 90 % de la actividad biológica de una preparación enzimática de control. La actividad biológica puede ser actividad enzimática, tal como actividad de la proteasa, actividad de la amilasa o, preferentemente,
15 activación de la lipasa.

La preparación de enzima pancreatina se aísla de una fuente de tejido pancreático pretratado y puede tener la misma actividad biológica, o sustancialmente la misma, pero menos contagiosa, que una preparación de control aislada de una fuente de tejido no tratado. La infecciosidad de la preparación enzimática puede reducirse en al menos tres en
20 escala \log_{10} , preferentemente de al menos cuatro en escala \log_{10} , en relación con la preparación de control. La infecciosidad de la fuente de tejido pretratada puede reducirse en al menos tres en escala \log_{10} , preferentemente de al menos cuatro en escala \log_{10} , en relación con la fuente de tejido no tratado. La infecciosidad que se reduce es la infecciosidad vírica, en particular, la infecciosidad de virus sin envoltura. La actividad biológica de la preparación enzimática puede ser al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 % o preferentemente
25 al menos un 90 % de la actividad biológica de una preparación de control aislada de una fuente de tejido no tratado. La actividad biológica puede ser actividad enzimática, tal como actividad de la proteasa, actividad de la amilasa o, preferentemente, activación de la lipasa.

La preparación de enzima pancreatina procede de un tejido pancreático de mamífero inalterado irradiado con un haz
30 de electrones. El tejido irradiado con haz de electrones puede ser tejido pancreático porcino. La preparación enzimática procedente de tejido irradiado con haz de electrones comprende pancreatina. La preparación enzimática aislada de tejido pancreático irradiado con haz de electrones puede comprender una proenzima, tal como una prolipasa o un tipsinógeno. La preparación enzimática aislada de tejido pancreático irradiado con haz de electrones puede estar en forma bruta. La preparación enzimática aislada de tejido pancreático irradiado con haz de electrones puede comprender una o más enzimas y/o proenzimas que se han extraído del tejido irradiado.
35

La preparación de enzima pancreatina se aísla de un tejido pancreático de mamífero inalterado irradiado con un haz de electrones y puede tener la misma actividad biológica, o sustancialmente la misma, pero menos contagiosa, que una preparación de control aislada de una fuente de tejido no irradiado. El tejido irradiado es tejido pancreático de mamífero inalterado. En determinadas realizaciones, el tejido irradiado es tejido pancreático en forma de escamas, una glándula pancreática completa o una parte de una glándula pancreática completa. La fuente de tejido no irradiado es tejido pancreático de mamífero. La infecciosidad de la preparación enzimática puede reducirse en al menos tres en
40 escala \log_{10} , preferentemente de al menos cuatro en escala \log_{10} , en relación con la preparación de control. La infecciosidad que se reduce puede ser una infecciosidad vírica, en particular, infecciosidad por virus sin envoltura y/o con envoltura. En determinadas realizaciones, la infecciosidad que se reduce puede ser infecciosidad por PVP. La actividad biológica de la preparación enzimática aislada puede ser al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 % o preferentemente al menos un 90 % de la actividad biológica de la preparación de control. La actividad biológica puede ser actividad enzimática, tal como actividad de la proteasa, actividad de la amilasa o, preferentemente, activación de la lipasa.
50

La preparación enzimática puede comprender proenzimas irradiadas con haz de electrones. La preparación enzimática puede procesarse adicionalmente, tal como mediante la conversión de las proenzimas irradiadas en su forma activa (por ejemplo, mediante autólisis y/o hidrólisis).

55 Las presentes preparaciones de enzima pancreatina se pueden entender mejor en relación con los siguientes métodos que ilustran técnicas ilustrativas mediante las cuales se pueden obtener las preparaciones enzimáticas.

La presente divulgación incluye un método para fabricar un producto de pancreatina. El método comprende someter tejido pancreático de mamífero inalterado a radiación con haz de electrones. El tejido pancreático de mamífero inalterado puede ser un bloque de tejido congelado. En determinadas realizaciones, el tejido pancreático de mamífero inalterado es tejido animal en forma de escamas o triturado.
60

El método comienza con tejido pancreático de mamífero inalterado. El tejido pancreático de mamífero puede ser páncreas porcino. El páncreas porcino puede adquirirse en un matadero autorizado, preferentemente un matadero de una sola especie.
65

El tejido pancreático inalterado incluye una glándula pancreática completa o una parte de la misma, tal como uno o más lóbulos. El tejido pancreático inalterado puede incluir tejido congelado en forma de escamas. El tejido pancreático inalterado puede incluir un bloque de tejido congelado, que se puede haber procesado mecánicamente. El tejido pancreático inalterado puede incluir tejido pancreático que se ha manipulado o alterado muy poco, o preferentemente no manipulado o alterado, de manera que, por ejemplo, destruya enzimas activas y/o convierta proenzimas en el tejido a su forma activa. Por ejemplo, un homogeneizado de tejido que se sometió a un procesamiento químico o enzimático significativo para convertir las proenzimas a su forma activa no es "tejido inalterado" como se utiliza el término en el presente documento. Como otro ejemplo, el tejido que se ha molido o picado en condiciones que destruyen las enzimas activas y/o convierten las proenzimas en el tejido a su forma activa no es "tejido inalterado" como se utiliza el término en el presente documento.

El tejido pancreático inalterado de mamífero, que puede ser tejido animal congelado, puede estar triturado. La trituración se puede lograr con una trituradora de bloques congelados, tal como un Hydraflake Chunker proporcionado por General Machinery Corporation (Sheboygan, WI), que está diseñado para fragmentar tejido congelado en preparación para su posterior procesamiento.

El tejido pancreático inalterado de mamífero se irradia mediante exposición a un haz esterilizante de electrones acelerados, es decir, una radiación de haz E o de haz de electrones. En determinadas realizaciones, se expone una glándula pancreática completa o una parte inalterada de la misma a la irradiación con un haz de electrones. El tejido pancreático porcino en forma de escamas puede quedar expuesto a la irradiación con haces de electrones.

La radiación de haz E es una forma de energía ionizante que generalmente se caracteriza por su baja penetración y altas tasas de dosificación. El haz, una corriente de electrones concentrada y altamente cargada, se genera por la aceleración y conversión de la electricidad. Los electrones se generan mediante equipos denominados aceleradores, que son capaces de producir haces pulsados o continuos. A medida que el material que se irradia pasa por debajo o por delante del haz de electrones, se absorbe la energía de los electrones. Esta absorción de energía altera varios enlaces químicos y propiedades biológicas en el producto/material. La energía que se absorbe se denomina "dosis absorbida". Es esta absorción de energía, o "suministro de dosis", la que destruye virus y microorganismos, por ejemplo, mediante la destrucción de sus cadenas de ADN o ARN.

La irradiación puede llevarse a cabo de manera convencional, tal como mediante la colocación del tejido en un recipiente adecuado y la exposición del tejido a un haz de electrones. El recipiente que contiene el tejido puede colocarse en un transportador que después pasa a través del haz de electrones. El recipiente que contiene el tejido no puede contener ningún disolvente. El recipiente que contiene el tejido puede estar sustancialmente libre de disolvente. El recipiente que contiene el tejido no puede contener ningún disolvente inflamable. El recipiente que contiene el tejido puede estar sustancialmente libre de un disolvente inflamable, tal como alcohol. Por ejemplo, el recipiente puede contener tejido inalterado congelado, tal como una glándula entera, una parte de una glándula entera o tejido en forma de escamas.

La radiación se proporciona en una dosis suficiente para producir una reducción de al menos tres en escala \log_{10} de la carga vírica de un virus modelo en comparación con una muestra de control. La radiación puede ser en una dosis que evite la pérdida de una actividad biológica, preferentemente una actividad enzimática, en relación con una preparación enzimática de control aislada de tejido no irradiado.

El haz de electrones acelerados puede proporcionarse con un acelerador de electrones, tal como un acelerador de electrones proporcionado por Iotron Industries USA, Inc. (Columbia City, IN). En determinadas realizaciones, el acelerador de electrones funciona con potencias de 20 a 250 kW y energías de haz de 5 a 18 megaelectronvoltios (MeV). El acelerador de electrones puede funcionar a 60 kW y 10 MeV. El acelerador de electrones puede proporcionar una energía de haz de 10 MeV o superior.

Un tejido puede exponerse a irradiación con haz de electrones durante un tiempo y en una cantidad suficiente para lograr la inactivación vírica o microbiana sin comprometer la actividad biológica de una o más enzimas extraídas o aisladas posteriormente del tejido irradiado. La dosis de irradiación con haz de electrones necesaria para esterilizar un tejido puede variar según, por ejemplo, el tamaño del tejido, el tipo de tejido y el tipo y cantidad de contaminante vírico o microbiano que esté en la muestra de tejido o que se sospecha que está presente en ella. Un experto en la materia reconocerá y podrá determinar una dosis y un tiempo adecuados para un tejido particular y según las características del tejido y el acelerador que se utilicen. La dosis de haz de electrones seleccionada puede ser eficaz para la inactivación de agentes infecciosos que son difíciles de destruir mediante procesos convencionales mientras provocan una pérdida mínima en la actividad enzimática.

Una "dosis absorbida" de radiación se expresa en términos de kilogray (kGy), en donde un kilogray equivale a mil julios de energía depositada por kilogramo de material. El tejido se expone al haz de electrones hasta que se absorbe una cantidad de radiación que inactiva el agente infeccioso. Por ejemplo, el tejido puede exponerse al haz de electrones hasta que se logra una dosis de aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45 o aproximadamente 50 kilograys (kGy) o más. Como otro ejemplo, el tejido puede exponerse al haz de electrones hasta que se logra una

dosis de aproximadamente 5 a aproximadamente 50, de aproximadamente 10 a aproximadamente 40, de aproximadamente 15 a aproximadamente 35 kGy. El tejido puede exponerse al haz de electrones hasta que se absorbe una dosis de aproximadamente 30 kGy. El páncreas porcino puede irradiarse con una dosis de haz de electrones suficiente para proporcionar una destrucción elevada en escala \log_{10} de agentes infecciosos, preferentemente agentes infecciosos que sean difíciles de inactivar, tal como virus sin envoltura, mientras provoca una pérdida mínima en la actividad enzimática.

La dosis se puede determinar con el uso de películas de tinte radiocrómico. Estas películas se pueden calibrar con referencia a un patrón nacional.

El tejido se expone a la radiación con haz de electrones durante un tiempo y en una cantidad suficiente para producir una reducción de al menos tres en escala \log_{10} , preferentemente de al menos cuatro en escala \log_{10} , de la carga vírica de un virus modelo en comparación con una muestra de control. El tejido puede exponerse a la radiación con haz de electrones durante un tiempo y en una cantidad suficiente para producir una reducción entre aproximadamente tres en escala \log_{10} y aproximadamente cinco en escala \log_{10} de la carga vírica de un virus modelo en comparación con una muestra de control. El tejido puede exponerse a la radiación con haz de electrones durante un tiempo y en una cantidad suficiente para producir una reducción de aproximadamente cuatro en escala \log_{10} de la carga vírica de un virus modelo en comparación con una muestra de control. En determinadas realizaciones, el virus modelo es PVP. El tejido es tejido pancreático de mamífero inalterado. En algunas de dichas realizaciones, el tejido inalterado es una glándula pancreática completa o una parte de la misma, tal como uno o más lóbulos de una glándula pancreática. El tejido inalterado puede ser tejido en forma de escamas congelado.

La exposición al haz de electrones puede incluir exposición de unilateral o de multilateral. El tejido puede someterse a una exposición al haz de electrones unilateral. El tejido puede someterse a una exposición multilateral, por ejemplo, una exposición bilateral al haz de electrones. Por lo tanto, una dosis de aproximadamente 20 kGy puede comprender una exposición bilateral a aproximadamente 10 kGy/lado; una dosis de aproximadamente 30 kGy puede comprender una exposición bilateral a aproximadamente 15 kGy/lado; una dosis de aproximadamente 40 kGy puede comprender una exposición bilateral a aproximadamente 20 kGy/lado; y una dosis de aproximadamente 50 kGy puede comprender una exposición bilateral a aproximadamente 25 kGy/lado.

Los métodos de fabricación de la preparación de enzima pancreatina pueden reducir el riesgo de infecciosidad vírica o microbiana de una composición farmacéutica que comprende la preparación de enzima.

La infecciosidad de una glándula pancreática irradiada puede reducirse en al menos tres en escala \log_{10} , preferentemente de al menos cuatro en escala \log_{10} , en relación con la infecciosidad de la glándula antes del tratamiento con radiación. La infecciosidad de una preparación de enzima pancreatina procedente o aislada de una glándula pancreática irradiada puede reducirse en al menos tres en escala \log_{10} , preferentemente de al menos cuatro en escala \log_{10} , en relación con la infecciosidad de la glándula antes del tratamiento con radiación. Como alternativa, la infecciosidad de la preparación de enzima pancreatina se puede determinar en relación con una preparación enzimática de control procedente o aislada de una glándula pancreática no irradiada.

La infecciosidad que se reduce puede ser una infecciosidad vírica, en particular, la infecciosidad vírica de un virus sin envoltura, tal como el PVP. Por ejemplo, la infecciosidad del PVP de un producto de pancreatina aislado de una glándula pancreática irradiada puede reducirse en al menos tres en escala \log_{10} , preferentemente al menos cuatro en escala \log_{10} en relación con una preparación enzimática de control aislada de una glándula pancreática no irradiada. Como otro ejemplo, la infecciosidad del PVP de una glándula pancreática irradiada puede reducirse en al menos tres en escala \log_{10} , preferentemente al menos cuatro en escala \log_{10} en relación con una glándula pancreática no irradiada. La infecciosidad del PVP de una preparación enzimática puede reducirse aún más mediante etapas de inactivación vírica ortogonales posteriores realizadas después de la irradiación.

El método también puede incluir la etapa de, después de la etapa de irradiación, probar para detectar la presencia o cantidad de uno o más microorganismos (por ejemplo, virus, bacterias o protozoos) en el tejido o preparación enzimática procedente del tejido. Los métodos para determinar si una muestra contiene un microorganismo se conocen en la materia e incluyen, por ejemplo, ensayos de placas o pruebas de formación de colonias. La esterilización eficaz también se puede determinar mediante técnicas microbiológicas convencionales, tales como, por ejemplo, la inclusión de indicadores biológicos adecuados en un lote de radiación o la puesta en contacto del tejido con un medio de cultivo y la incubación del medio para determinar la esterilidad del tejido.

La infecciosidad vírica se puede calcular mediante la valoración del criterio de valoración y el cálculo posterior de la dosis infecciosa del 50 % en cultivo tisular ($DICT_{50}$). Los valores del virus calculados de esta manera pueden expresarse como $DICT_{50}$ por ml en escala \log_{10} con intervalos de confianza del 95 %.

La reducción de la contaminación vírica se da de acuerdo con el capítulo general de USP-NF <1050>, como un factor de reducción logarítmico que es la diferencia en el valor del virus entre una muestra de control y la muestra procedente de un tejido irradiado con haz de electrones tras el aislamiento. Por ejemplo, una reducción de 3 en escala \log_{10} puede indicar una reducción de la carga vírica en un factor de 1.000 y una reducción de 4 en escala \log_{10} puede indicar una

reducción de la carga vírica en un factor de 10.000.

Los métodos de fabricación de la preparación de enzima pancreatina pueden permitir la reducción de la contaminación vírica y/o microbiana de la preparación enzimática sin una reducción sustancial de su actividad enzimática.

Se puede mantener la actividad enzimática de una preparación de enzima pancreatina aislada de una glándula pancreática irradiada. Por ejemplo, una actividad biológica de la preparación enzimática puede ser al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 % o preferentemente al menos un 90 % de la actividad biológica de una preparación de control aislada de una glándula pancreática no irradiada. La actividad biológica puede ser actividad enzimática, tal como actividad de la proteasa, actividad de la amilasa o, preferentemente, activación de la lipasa.

Después de la irradiación, el tejido pancreático de mamífero inalterado se procesa adicionalmente para proporcionar la composición enzimática mediante el aislamiento de una o más enzimas y/o proenzimas. Se conocen varios métodos para aislar enzimas a partir de muestras de tejido. Por ejemplo, el documento US 4.623.624 proporciona métodos para aislar pancreatina mediante autólisis de una suspensión acuosa de tejido que contiene isopropanol.

El tejido irradiado puede someterse a autólisis y/o hidrólisis para convertir las proenzimas a su forma activa. Por ejemplo, el tejido irradiado puede combinarse con un iniciador de hidrólisis para iniciar la autólisis. La autólisis y/o hidrólisis se pueden llevar a cabo a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se puede filtrar una vez completada la reacción; se puede recoger el filtrado; las enzimas presentes en el filtrado pueden precipitarse (por ejemplo, con isopropanol); y el precipitado se puede filtrar, lavar con isopropanol y secar al vacío.

C. COMPOSICIONES

En al menos un aspecto, la presente invención incluye composiciones farmacéuticas que comprenden una preparación de enzima pancreatina como se describe en el presente documento. Las composiciones comprenden una o más enzimas aisladas de un tejido pancreático de mamífero inalterado irradiado. La composición puede ser una mezcla bruta que contiene una o más enzimas aisladas de tejido pancreático de mamífero inalterado.

Se proporciona una composición farmacéutica que comprende una preparación de enzima pancreatina como se describe en el presente documento, y puede comprender además opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables convencionales, tales como los que se encuentran en libros de texto como Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18.^a ed. (Alfonso R. Gennaro, ed.; Mack Publishing Company, Easton, PA, 1990); *Remington: the Science and Practice of Pharmacy* 19.^a ed. (Lippincott, Williams & Wilkins, 1995); *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 3.^a ed. (Arthur H. Kibbe, ed.; Amer. Pharmaceutical Assoc, 1999); *the Pharmaceutical Codex: Principles and Practice of Pharmaceutics*, 12.^a ed. (Walter Lund ed.; Pharmaceutical Press, Londres, 1994); *The United States Pharmacopeia: The National Formulary* (United States Pharmacopeial Convention); y Goodman and Gilman's: *the Pharmacological Basis of Therapeutics* (Louis S. Goodman y Lee E. Limbird, eds.; McGraw Hill, 1992).

Las composiciones farmacéuticas que comprenden una preparación de enzima pancreatina como se describe en el presente documento se pueden utilizar para complementar las enzimas digestivas en el tratamiento y/o la profilaxis de la mala digestión debido a la insuficiencia pancreática exocrina crónica, que puede ocurrir en pacientes que padecen fibrosis quística, pancreatitis crónica o pacientes que se han sometido a cirugía gastrointestinal superior. Las composiciones farmacéuticas o formas farmacéuticas como se describen en el presente documento pueden ser preferentemente formas farmacéuticas orales que se pueden administrar en particular a seres humanos.

Una forma farmacéutica oral que contiene una preparación enzimática puede estar en forma de, por ejemplo, cápsulas, gránulos, granulados, microgránulos, microesferas, microcomprimidos, miniesferas, píldoras, polvos y/o comprimidos. Para los fines de la presente descripción, el prefijo "micro" se utiliza para describir una forma farmacéutica oral si el diámetro de la forma farmacéutica oral o todas sus dimensiones (longitud, altura, ancho) es igual o inferior a aproximadamente 5 mm.

La forma farmacéutica oral puede ser una cápsula. La cápsula puede comprender entre aproximadamente 2.000 y aproximadamente 40.000 unidades de lipasa por cápsula. La forma farmacéutica oral puede ser una cápsula que comprende 3.000, 6.000, 12.000, 24.000 o 36.000 unidades de lipasa por cápsula. La forma farmacéutica oral puede ser una cápsula que comprende 3.000, 5.000, 10.000, 15.000, 20.000, 25.000 o 40.000 unidades de lipasa por cápsula. La forma farmacéutica oral puede ser una cápsula que comprende 2.600, 4.200, 10.500, 16.800 o 21.000 unidades de lipasa por cápsula. La forma farmacéutica oral puede ser una cápsula que comprende 4.000, 13.800, 20.700 o 23.000 unidades de lipasa por cápsula. La forma farmacéutica oral puede ser una cápsula que comprende 4.000, 8.000 o 16.000 unidades de lipasa por cápsula. La forma farmacéutica oral puede ser una cápsula que comprende 4.000, 8.000 o 16.000 unidades de lipasa por cápsula. La forma farmacéutica oral puede ser una cápsula que comprende 3.000, 4.000, 6.000 u 8.000 unidades de lipasa por cápsula. La concentración de la dosis se puede expresar de diversas formas, incluso en unidades USP, unidades Ph.Eur. o unidades BP.

La forma farmacéutica oral puede ser un comprimido que comprende 10.440 o 20.880 unidades de lipasa por

comprimido.

Se conocen diversas composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas que contienen pancreatina, tales como composiciones de liberación retardada y de liberación inmediata. Por ejemplo, el documento US 9.198.871 proporciona composiciones de pancreatina de liberación retardada.

La forma farmacéutica oral puede ser una microgránulo de pancreatina o una microesfera de pancreatina. El microgránulo de pancreatina o la microesfera de pancreatina pueden estar recubiertos con, por ejemplo, un recubrimiento entérico. El microgránulo de pancreatina o la microesfera de pancreatina, independientemente de cualquiera de dichos recubrimientos, puede comprender entre aproximadamente un 10 % y aproximadamente un 95 % en peso de pancreatina, entre aproximadamente un 5 % y aproximadamente un 90 % en peso de al menos un agente aglutinante farmacéuticamente aceptable, y entre el 0 % y aproximadamente un 10 % en peso de al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. De manera más específica, el microgránulo de pancreatina o la microesfera de pancreatina puede comprender entre aproximadamente un 70 % y aproximadamente un 90 % en peso de pancreatina, entre aproximadamente un 10 % y aproximadamente un 30 % en peso de al menos un agente aglutinante farmacéuticamente aceptable, y entre el 0 % y aproximadamente un 5 % en peso de al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. El microgránulo de pancreatina o microesfera de pancreatina puede comprender entre aproximadamente un 70 % y aproximadamente un 90 % en peso de pancreatina y entre aproximadamente un 10 % y aproximadamente un 30 % en peso de al menos un agente aglutinante farmacéuticamente aceptable. El microgránulo de pancreatina o microesfera de pancreatina puede ser aproximadamente esférica y tiene un diámetro entre aproximadamente 0,5 mm y aproximadamente 2,0 mm. El microgránulo de pancreatina o microesfera de pancreatina puede tener una primera dimensión entre aproximadamente 0,5 mm y aproximadamente 2,0 mm y una segunda dimensión entre aproximadamente 0,5 mm y aproximadamente 2,0 mm. El microgránulo de pancreatina o microesfera de pancreatina puede tener una primera dimensión entre aproximadamente 0,8 mm y aproximadamente 1,0 mm y una segunda dimensión entre aproximadamente 0,5 mm y aproximadamente 2,0 mm.

Ejemplos de agentes aglutinantes farmacéuticamente aceptables pueden incluir polietilenglicol 1500, polietilenglicol 2000, polietilenglicol 3000, polietilenglicol 4000, polietilenglicol 6000, polietilenglicol 8000, polietilenglicol 10000, hidroxipropilmetilcelulosa, polioxietileno, copolímeros de polioxietileno y polioxipropileno, y mezclas de dichos polímeros orgánicos. El polietilenglicol 4000 puede ser un agente aglutinante farmacéuticamente aceptable preferido.

Ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados pueden incluir agentes fluidificantes como estearato de magnesio o estearato de calcio, ácido esteárico, talco y/o almidón; rellenos como fosfato de calcio, almidón de maíz, dextranos, dextrina, dióxido de silicio hidratado, celulosa microcristalina, caolín, lactosa, manitol, polivinilpirrolidona, carbonato de calcio precipitado, sorbitol y/o talco; agentes desintegrantes como Aerosil (ácido silícico), ácido alginico, amilosa, alginato de calcio, carbonato de calcio, gelatina de formaldehído, carbonato péptico, almidón de sagú, bicarbonato de sodio y/o almidón; y/o humectantes como glicerol y/o almidón. Para los fines de la presente divulgación, los aceites sintéticos y los ésteres monoméricos del ácido ftálico pueden no considerarse excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados. Los microgránulos de pancreatina o las microesferas de pancreatina pueden no contener excipientes farmacéuticamente aceptables, pero opcionalmente pueden contener una mayor cantidad de pancreatina.

Una forma farmacéutica oral, tal como una forma farmacéutica oral con recubrimiento entérico, de pancreatina puede proporcionarse para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de afecciones médicas, tales como trastornos digestivos, insuficiencia pancreática exocrina, pancreatitis, fibrosis quística, diabetes de tipo I y/o diabetes de tipo II.

La composición farmacéutica puede ser una composición farmacéutica de liberación controlada. Por ejemplo, se puede obtener una composición farmacéutica de liberación controlada mediante la aplicación de un recubrimiento entérico a una forma farmacéutica oral. El recubrimiento entérico puede comprender un agente formador de película, un plastificante y, opcionalmente, un agente antiadherente.

Los agentes formadores de película adecuados pueden incluir agar, homopolímero y copolímeros de carbómero (es decir, polímeros a base de ácido acrílico reticulados y de elevado peso molecular), carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa, carragenina, acetatoftalato de celulosa, succinato de acetato de celulosa, trimetilato de acetato de celulosa, quitina, extracto de proteína de maíz, etilcelulosa, goma arábica, hidroxipropilcelulosa, succinato de acetato de hidroxipropilmetilo, succinato de acetato de hidroxipropilmetilcelulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, copolímero de ácido metacrílico y metacrilato de etilo, metilcelulosa, pectina, poli(acetato ftalato de vinilo), alcohol polivinílico, goma laca, alginato de sodio, acetato ftalato de almidón y/o copolímero de estireno/ácido maleico o mezclas de dichos polímeros formadores de película. Los agentes formadores de película preferidos son acetato ftalato de celulosa, succinato de acetato de hidroxipropilmetilcelulosa y/o copolímero de ácido metacrílico y metacrilato de etilo. El más preferido es el ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, tal como HP 55 o HPMCP HP-50. Los aceites sintéticos no deben considerarse como agentes formadores de película preferidos.

El o los plastificantes pueden estar presentes en una cantidad superior a aproximadamente un 1,5 % y normalmente en una cantidad entre aproximadamente un 2 % y aproximadamente un 20 % en peso, en relación con el agente

formador de película. El plastificante puede contener alcoholes monohídricos lineales saturados con 12 a 30 átomos de carbono. De manera más específica, los plastificantes aceptables incluyen alcohol laurílico, alcohol tridecílico, alcohol miristílico, alcohol pentadecílico, alcohol cetílico, alcohol heptadecílico, alcohol estearílico, alcohol nonadecílico, alcohol aráquico, alcohol behenílico, alcohol carnaubílico, alcohol cerílico, alcohol corianílico, alcohol melisílico, tributilcitrato de acetilo, sebacato de dibutilo, ésteres de ácidos grasos de glicerol, glicerol, polietilenglicol, propilenglicol, ácidos grasos de sorbitán, triacetina, citrato de trietilo y mezclas de dichos plastificantes. Los plastificantes preferidos son alcohol cetílico, alcohol estearílico, citrato de trietilo y mezclas de los mismos. Cuando se utiliza alcohol cetílico como plastificante único, puede estar presente en una cantidad superior a aproximadamente un 1,5 %, normalmente en una cantidad de aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 15 %, preferentemente de aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 10 %, en peso con respecto al agente formador de película. Cuando se utiliza citrato de trietilo como plastificante único, puede estar presente en una cantidad entre aproximadamente un 5 % y aproximadamente un 20 %, preferentemente entre aproximadamente un 12 % y aproximadamente un 15 %, en peso con respecto al agente formador de película. Los aceites sintéticos y los ésteres monoméricos del ácido ftálico no deben considerarse plastificantes adecuados.

El plastificante puede estar compuesto por alcohol cetílico y citrato de trietilo, que en conjunto se presentan en una cantidad superior a aproximadamente un 3 %, normalmente en una cantidad de aproximadamente un 4 % a aproximadamente un 20 %, en particular entre aproximadamente un 6 % y aproximadamente un 15 %, en particular entre aproximadamente un 7 % y aproximadamente un 10 %, en peso con respecto al agente formador de película. La relación peso a peso de alcohol cetílico a citrato de trietilo cuando ambos están presentes puede ser de aproximadamente 0,05:1 a aproximadamente 1:1, por ejemplo 0,1:1, 0,2:1, 0,3:1, 0,4:1, 0,5:1, 0,6:1, 0,7:1, 0,8:1 o 0,9:1. En particular, la relación de alcohol cetílico a citrato de trietilo puede ser de aproximadamente 0,25:1 a aproximadamente 0,5:1, preferentemente de aproximadamente 0,3:1 a aproximadamente 0,45:1, más preferentemente de aproximadamente 0,35:1 a aproximadamente 0,4:1 e incluso más preferentemente de aproximadamente 0,38:1 a aproximadamente 0,4:1 (p/p).

El recubrimiento entérico puede comprender opcionalmente un agente antiadherente. Los agentes antiadherentes adecuados pueden incluir dimeticona y aceite de ricino. La dimeticona, en particular la dimeticona 1000, es el agente antiadherente preferido. La cantidad de agente antiadherente (si está presente) en el recubrimiento entérico está entre aproximadamente un 1,5 % y aproximadamente un 3 % en peso con respecto al agente formador de película. Los aceites sintéticos no deben considerarse como agentes antiadherentes preferidos.

El recubrimiento entérico puede comprender entre aproximadamente un 5 % y aproximadamente un 30 % en peso, más preferentemente entre aproximadamente un 7 % y aproximadamente un 20 % en peso, aún más preferentemente entre aproximadamente un 10 % y aproximadamente un 15 % en peso de la composición total de la forma farmacéutica oral con recubrimiento entérico o composición farmacéutica de liberación controlada. El recubrimiento entérico puede comprender entre aproximadamente un 20 % y aproximadamente un 30 % en peso, más preferentemente entre aproximadamente un 22 % y aproximadamente un 26 % en peso, aún más preferentemente entre aproximadamente un 22,5 % y aproximadamente un 25 % en peso de la composición total de la forma farmacéutica oral con recubrimiento entérico o composición farmacéutica de liberación controlada.

La composición farmacéutica puede ser una cápsula de liberación controlada para administración oral. La cápsula puede contener gránulos con recubrimiento entérico que comprenden lipasa, proteasa y amilasa. Los gránulos con recubrimiento entérico pueden tener una primera dimensión entre aproximadamente 0,5 mm y aproximadamente 2,0 mm y, opcionalmente, una segunda dimensión entre aproximadamente 0,5 mm y aproximadamente 2,0 mm. Por ejemplo, los gránulos con recubrimiento entérico pueden ser aproximadamente esféricos y tener un diámetro de aproximadamente 0,71 a aproximadamente 1,60 mm. Como otro ejemplo, los gránulos con recubrimiento entérico pueden tener forma de hebras y tener un diámetro de aproximadamente 0,5 mm a aproximadamente 2,0 mm y una longitud de aproximadamente 0,5 mm a aproximadamente 2,0 mm. La composición puede incluir además excipientes descritos en el presente documento, tales como alcohol cetílico, dimeticona, ftalato de hipromelosa, polietilenglicol y citrato de trietilo.

La composición farmacéutica puede ser una composición farmacéutica de liberación inmediata. Por ejemplo, la composición farmacéutica de liberación inmediata puede carecer de un recubrimiento entérico.

D. MÉTODOS DE USO

En al menos un aspecto, la presente invención incluye pancreatina o una composición farmacéutica que comprende la pancreatina como se divulga en el presente documento para su uso en el tratamiento de la insuficiencia pancreática exocrina en un sujeto, en particular un sujeto humano, que necesita dicho tratamiento, en donde la insuficiencia pancreática exocrina puede deberse a la fibrosis quística, la pancreatitis crónica, la pancreatectomía u otras afecciones.

En relación con los métodos y usos mencionados anteriormente, la preparación enzimática comprende pancreatina. Una dosis adecuada de pancreatina puede basarse en unidades de lipasa. La Cystic Fibrosis Foundation (CFF) ha publicado directrices de consenso que contienen las dosis diarias totales recomendadas de unidades de lipasa.

Pueden administrarse de 2.000 a 4.000 unidades de lipasa, preferentemente 3.000 unidades de lipasa, por 120 ml de fórmula o por lactancia materna a un lactante de hasta 12 meses de edad.

5 Pueden administrarse de 1.000 a 2.500 unidades de lipasa por kg de peso corporal por comida a un individuo de uno (1) a cuatro (4) años de edad. Pueden administrarse de 500 a 2.500 unidades de lipasa por kg de peso corporal por comida a un individuo de al menos cuatro (4) años de edad.

10 La dosis máxima diaria no puede exceder las 10.000 unidades de lipasa por kg de peso corporal. La dosis máxima diaria no podrá exceder las 4.000 unidades de lipasa por g de grasa ingerida.

15 La preparación enzimática o la composición farmacéutica que contiene la preparación enzimática se puede administrar inmediatamente antes de una comida. La preparación enzimática o la composición farmacéutica que contiene la preparación enzimática se puede administrar durante una comida o un refrigerio.

La preparación enzimática comprende una o más enzimas aisladas del tejido pancreático de mamífero inalterado irradiado con haz de electrones. La preparación enzimática puede estar en forma bruta.

20 Las preparaciones enzimáticas, composiciones, métodos y usos descritos en el presente documento se entenderán mejor haciendo referencia a las siguientes realizaciones y ejemplos ilustrativos.

E. REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

25 Un aspecto de la presente invención incluye una pancreatina producida mediante un método que comprende las etapas de: (a) someter tejido pancreático inalterado de mamífero a radiación con haz de electrones para producir tejido pancreático irradiado, en donde la radiación con haz de electrones es suficiente para producir al menos una reducción de tres en escala \log_{10} de la carga vírica de un virus modelo en comparación con una muestra de control; y (b) aislar pancreatina del tejido pancreático irradiado. La etapa de aislamiento puede comprender iniciar la hidrólisis o autólisis del tejido pancreático. La etapa de aislamiento puede comprender mezclar el tejido pancreático irradiado con agua.

30 La etapa (b) puede comprender activar una proenzima del tejido pancreático irradiado. La reducción de la carga microbiana y/o vírica puede ser una reducción de al menos tres en escala \log_{10} , preferentemente de al menos cuatro en escala \log_{10} , en relación con una muestra de control obtenida de tejido no irradiado. Por ejemplo, la reducción de la carga microbiana y/o vírica puede ser una reducción de al menos tres en escala \log_{10} , preferentemente de al menos cuatro en escala \log_{10} , de la carga vírica de PVP en relación con una muestra de control obtenida de tejido no irradiado.

35 En determinadas realizaciones, una actividad biológica de la preparación enzimática obtenida en la etapa (b) corresponde a al menos un 50 %, preferentemente al menos un 90 %, de la actividad biológica de una preparación enzimática de control obtenida a partir de tejido pancreático no irradiado. En determinadas realizaciones, la actividad biológica es la actividad lipasa. La actividad biológica puede ser actividad proteasa o actividad amilasa. El método puede comprender además una o más etapas adicionales que proporcionan una reducción adicional de la carga microbiana y/o vírica.

40

De acuerdo con la invención, antes del aislamiento de la enzima, el tejido de mamífero se ha sometido a una irradiación con haz de electrones suficiente para producir una reducción de al menos tres en escala \log_{10} , preferentemente de al menos cuatro en escala \log_{10} , de la carga vírica. Por ejemplo, el tratamiento puede ser suficiente para producir una

45 reducción de al menos tres en escala \log_{10} , preferentemente de al menos cuatro en escala \log_{10} , de la carga vírica de PVP en relación con una muestra de control no tratada. El tejido de mamífero puede ser una glándula pancreática porcina. La glándula pancreática porcina puede estar descamada. La glándula pancreática porcina puede estar en un bloque congelado. La glándula pancreática porcina puede ser una glándula completa o una parte de la misma, tal como uno o más lóbulos. La una o más enzimas comprenden pancreatina. El tratamiento comprende radiación con haz de electrones y puede realizarse en una dosis de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 kGy, preferentemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 kGy. En determinadas realizaciones, una actividad biológica de la preparación enzimática corresponde a al menos un 50 %, preferentemente al menos un 90 %, de la actividad biológica de una preparación enzimática de control obtenida a partir de una preparación enzimática de control. En determinadas realizaciones, la actividad biológica es la actividad lipasa. La actividad biológica puede ser

50 actividad proteasa o actividad amilasa. La reducción de la carga vírica es una reducción ortogonal.

55

La presente divulgación incluye una composición farmacéutica que comprende la pancreatina aislada de tejido pancreático de mamífero inalterado que se ha sometido a irradiación con haz de electrones para reducir el riesgo de infectividad vírica y microbiana, en donde la composición puede tener una actividad biológica que corresponde a al menos un 50 %, preferentemente al menos un 90 %, de la actividad biológica de una composición de control. La composición de control puede comprender una muestra no tratada de tejido de mamífero correspondiente al tejido de mamífero que se puede haber sometido a un tratamiento para reducir el riesgo de infectividad vírica y microbiana. La radiación con haz de electrones puede tener una dosis de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 kGy, preferentemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 kGy.

60

65

Otro aspecto de la presente invención incluye un método para producir un producto de pancreatina que comprende

las etapas de: (a) someter tejido pancreático de mamífero inalterado a radiación con haz de electrones para producir tejido pancreático irradiado; y (b) aislar pancreatina del tejido pancreático irradiado. En determinadas realizaciones, una actividad biológica del producto de pancreatina obtenido en la etapa (b) corresponde a al menos un 50 %, preferentemente al menos un 90 %, de la actividad biológica de un producto de pancreatina de control. El producto de pancreatina de control puede obtenerse de tejido pancreático no irradiado. En determinadas realizaciones, la radiación con haz de electrones es suficiente para producir una reducción de al menos tres en escala \log_{10} , preferentemente de al menos cuatro en escala \log_{10} , de la carga vírica. Por ejemplo, el tratamiento es suficiente para producir una reducción de la carga vírica de al menos tres en escala \log_{10} , preferentemente de al menos cuatro en escala \log_{10} , de la carga vírica de PVP en relación con una muestra de control no irradiada. La radiación con haz de electrones puede tener una dosificación de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 kGy, preferentemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 kGy. En determinadas realizaciones, la actividad biológica es la actividad lipasa. La actividad biológica puede ser actividad proteasa o actividad amilasa.

La presente divulgación incluye un método para digerir una proteína que puede comprender las etapas de: (a) proporcionar una preparación de enzima o proenzima aislada de un tejido animal irradiado con un haz de electrones; y (b) poner en contacto la proteína con la preparación de enzima o proenzima en condiciones suficientes para digerir la proteína. En determinadas realizaciones, la etapa de poner en contacto se produce *in vivo*. La etapa de poner en contacto puede producirse *in vitro*. El tejido animal puede ser páncreas porcino. La proteína digerida se puede utilizar para preparar un producto hidrolizado de proteína. La preparación de enzima o proenzima procedente de un tejido animal irradiado con haz de electrones puede presentar una reducción de al menos tres en escala \log_{10} , preferentemente de al menos cuatro en escala \log_{10} , de la carga vírica en comparación con una preparación de enzima o proenzima de control procedente de tejido animal no irradiado. La preparación de enzima o proenzima procedente de un tejido animal irradiado con haz de electrones puede presentar una actividad biológica correspondiente a al menos un 50 %, preferentemente al menos un 90 %, de la actividad biológica de una preparación de enzima o proenzima de control procedente de tejido animal no irradiado.

Otro aspecto de la presente invención incluye una pancreatina aislada a partir de tejido pancreático inalterado de mamífero irradiado con haz de electrones. El tejido pancreático puede comprender una glándula pancreática porcina. La glándula pancreática porcina puede congelarse y procesarse mecánicamente en escamas o bloques antes de la irradiación. Por lo tanto, el tejido pancreático sujeto a irradiación con haz de electrones puede ser tejido pancreático de mamífero congelado en forma de escamas o un bloque congelado de tejido pancreático de mamífero. La glándula pancreática porcina puede ser una glándula completa o una parte de la misma, tal como uno o más lóbulos. La una o más enzimas pueden comprender pancreatina. La preparación enzimática puede presentar una reducción de al menos tres en escala \log_{10} , preferentemente de al menos cuatro en escala \log_{10} , de la carga vírica en comparación con una preparación enzimática de control. Por ejemplo, la preparación enzimática puede presentar una reducción de al menos tres en escala \log_{10} , preferentemente de al menos cuatro en escala \log_{10} , de la carga vírica de PVP en relación con una preparación enzimática de control. En determinadas realizaciones, una actividad biológica de la preparación enzimática corresponde a al menos un 50 %, preferentemente al menos un 90 %, de la actividad biológica de una preparación enzimática de control. En determinadas realizaciones, la actividad biológica es la actividad lipasa. La actividad biológica puede ser actividad proteasa o actividad amilasa. La preparación enzimática de control puede obtenerse de tejido no irradiado. La reducción de la carga vírica puede ser una reducción ortogonal.

Otro aspecto de la presente invención incluye una pancreatina o una composición farmacéutica que comprende pancreatina como se divulga en el presente documento para su uso en el tratamiento de la insuficiencia pancreática exocrina. En determinadas realizaciones, la insuficiencia pancreática exocrina se debe a fibrosis quística o pancreatitis crónica.

F. Ejemplos

50 Ejemplo 1. Irradiación con haz de electrones del parvovirus porcino (PVP), PAF de pancreatina y páncreas porcino

Materiales y métodos.

55 *Parvovirus porcino en viales en líquido de cultivo celular.* Debido a que el propio tejido de la glándula porcina puede tener algunos efectos inactivadores en los virus, inicialmente, las muestras de virus utilizadas para estos estudios se prepararon a partir de cultivos celulares infectados. El parvovirus porcino (PVP), la cepa NADL-2 (ATCC® VR-742™) y las células de testículo de cerdo (ST) (ATCC® CRL-1746™) se adquirieron de la American Type Culture Collection (ATCC). El PVP se propagó, cultivó y mantuvo de acuerdo con las recomendaciones de la ATCC. El PVP se propagó hasta una cantidad aproximada de 10^8 unidades infecciosas del virus (UI)/ml. El virus se recogió de células lisadas en medios de cultivo celular que consistían en medio esencial mínimo (MEM), suero fetal bovino al 10 % (FBS), glutamina 2 mM, penicilina 100 unidades/ml, estreptomycin 100 mg/ml.

65 El PVP se envasó en viales y después se embolsó en dos veces antes del envío. Los viales eran viales criogénicos de Nalgene (es decir, polipropileno con cierre externo enroscado de polietileno de alta densidad (HDPE) con un anillo de sellado a prueba de fugas que tiene una longitud de 4,75 cm (1,87 pulgadas); un diámetro de 1,27 cm (0,5

pulgadas); una capacidad de 2,0 ml; y un volumen de llenado de 1,0 ml. Cada vial individual se colocó en una bolsa Food Saver (polietileno con una capa exterior de nailon) y se selló al vacío. Las bolsas se recortaron para que se ajustaran exactamente al vial. A continuación se colocaron cuatro viales sellados individualmente dentro de otra bolsa Food Saver (aproximadamente 28 × 35 cm (11 × 14")) y se sellaron al vacío.

5 *Glándulas pancreáticas porcinas en forma de escamas congeladas.* Las glándulas pancreáticas obtenidas de cerdo para carne (Animal Technologies, Tyler, TX) se mantuvieron en hielo seco.

10 Se colocaron glándulas pancreáticas porcinas en forma de escamas congeladas en un recipiente de 30 cm × 30 cm × 4,45 cm (12" × 12" × 1 3/4") (polipropileno transparente), que se selló al vacío dentro de una bolsa transparente de poli/nailon de 3 mil. La bolsa estaba termosellada. Las glándulas pancreáticas se mantuvieron en hielo seco para garantizar temperaturas inferiores a -20 °C. El peso de la muestra de la glándula pancreática porcina en forma de escamas congeladas fue de 1,05 kg más un peso del embalaje de 270 gramos (0,27 kg). La tapa pesaba 100 g. La densidad superficial fue de 1,3 g/cm². Se fabricaron dos paquetes por cada dosis de radiación incluido el control sin radiación, se utilizó un paquete inalterado para el aislamiento de la preparación enzimática después del tránsito de vuelta al lugar donde se realizó el aislamiento, siendo el otro paquete una reserva.

15 *Pancreatina (PAF).* Se utilizaron dos tipos de PAF de pancreatina: pancreatina N y pancreatina S. Ambos PAF se mantuvieron en condiciones ambientales. La pancreatina N (Material n.º 1030828, Abbott Laboratories) es un polvo de color amarillo claro/gris a blanquecino. La pancreatina N se originó en el páncreas de cerdo para carne. La pancreatina S (Material n.º 1030829, Abbott Laboratories) es un polvo de color amarillo claro/gris a blanquecino. La pancreatina S se originó a partir del páncreas de la cerda.

20 El PAF de pancreatina se colocó en un recipiente de 6,35 cm × 8,89 cm × 4,12 cm (2 1/2" × 3 1/2" × 1 5/8") (polipropileno transparente), que se selló al vacío dentro de una bolsa transparente de poli/nailon de 3 mil. La bolsa estaba termosellada. El peso de la muestra del PAF de pancreatina fue de 80 gramos más el peso del embalaje de 26 gramos. La densidad superficial fue de 1,4 g/cm². Se expusieron muestras de pancreatina N a radiación con haz de electrones a la dosis indicada. El control no estuvo expuesto a la radiación con haz de electrones. Se analizó la actividad de la pancreatina N después del tránsito de vuelta al lugar experimental. La pancreatina N procede de cerdo para carne. Todos los paquetes de pancreatina N llegaron inalterados desde el lugar de irradiación.

25 *Irradiación con haz de electrones.*

30 La fuente del haz de electrones fue un acelerador lineal de electrones para procesamiento de materiales industriales (IMPELA®; lotron Industries, Inc. Columbia City, IN), 10 MeV, ancho de barrido de 80 cm.

35 Las muestras de páncreas porcino en forma de escamas congeladas y envasadas y de parvovirus porcino se mantuvieron por debajo de -20 °C colocándolas en hielo seco contenido en una bandeja de aluminio. Se colocaron dosímetros en la superficie superior de cada muestra. Las muestras de PAF de pancreatina envasadas mantenidas a temperatura ambiente se colocaron en una lámina de espuma de poliestireno expandido, y se colocaron dosímetros en la superficie superior. Los paquetes se enviaban en una cinta transportadora situada bajo la bocina de escaneo del haz de electrones. Después de una pasada de radiación, se recuperaron los dosímetros. Los paquetes se enviaron debajo de la bocina de radiación para una segunda pasada después de invertir el paquete (la parte superior ahora mira hacia abajo) y se colocó un nuevo dosímetro en la superficie superior. Después de la segunda ronda de radiación, se recuperaron los paquetes y dosímetros. Los paquetes de páncreas porcino en forma de escamas congeladas y de parvovirus porcino se recuperaron y se colocaron en hielo seco para su envío. Los paquetes de PAF de pancreatina se recuperaron y se mantuvieron a temperatura ambiente para su envío. Los paquetes de control de páncreas en forma de escamas congeladas y parvovirus porcino colocados en hielo seco se prepararon para su reenvío en hielo seco sin someterse a radiación. Los paquetes de control de PAF de pancreatina mantenidos a temperatura ambiente se prepararon para su reenvío a temperatura ambiente sin someterse a radiación. La dosis del haz de electrones se calculó a partir de la exposición del dosímetro utilizando una curva de calibración.

40 *Pruebas de infectividad vírica.*

45 La infectividad vírica se determinó mediante valoración de diluciones de diez veces en microplacas de 96 pocillos utilizando controles adecuados para muestras por triplicado en cada dosis de energía. Las cantidades de virus se calcularon con el método de Reed y Muench descrito en Reed, L. J.; Muench, H. (1938). "A simple method of estimating fifty percent endpoints". The American Journal of Hygiene 27: 493-497 y expresadas como un 50 % de DICT₅₀ por ml.

50 *Aislamiento y pruebas de pancreatina.*

55 El método utilizado para el aislamiento de pancreatina es sustancialmente similar al descrito en el documento US 4.623.624 que comprende hidrólisis y/o autólisis, seguida de tamizado de fibra, precipitación de enzimas, separación del precipitado por filtración y/o centrifugación, lavado de la torta, secado y reducción del tamaño de partículas. La hidrólisis se realizó utilizando un paquete correspondiente a cada dosis de radiación, incluido el control no irradiado. Para cada experimento de aislamiento se seleccionó un paquete sin daños en el embalaje (tales como grandes

grietas). Debido al cuidado tenido durante el tránsito de vuelta al lugar experimental, todos los paquetes llegaron inalterados y se seleccionó un paquete al azar para cada dosis de radiación, incluido el control para el aislamiento. Se utilizó pancreatina de un aislamiento anterior como fuente de proteasa para iniciar la hidrólisis. Se utilizó hidróxido de calcio para suministrar los iones de calcio necesarios para la activación de las proteasas. El bicarbonato de sodio se utiliza como agente tampón para la hidrólisis. Se utilizó simeticona como agente antiespumante. La hidrólisis del páncreas se realizó cerca de la temperatura ambiente. La finalización de la hidrólisis se comprobó mediante centrifugación de la mezcla hidrolizada después de la adición de isopropanol como se describe a continuación. Después de completar la hidrólisis, se añadió isopropanol adicional para reducir la velocidad de hidrólisis, la mezcla se enfrió, la mezcla se agitó y las fibras se separaron mediante una malla de 1,079 cm (0,425 pulgadas). Las fibras se lavaron con isopropanol y se comprimieron para expulsar el líquido retenido. El lavado se combinó con el filtrado obtenido anteriormente. Se añadió isopropanol adicional al filtrado para provocar la precipitación de las enzimas. La suspensión se filtró a través de una malla filtrante con aberturas de 15 micrómetros y se lavó con concentraciones crecientes de isopropanol con isopropanol absoluto como lavado final. La torta se secó en la malla filtrante con un flujo de nitrógeno mientras se aplicaba vacío debajo de la malla filtrante hasta que la torta apareció visualmente seca (el color de la torta se vuelve más claro después de eliminar el isopropanol y el agua). La torta se despegó de la malla filtrante y se secó al vacío y con flujo de nitrógeno a una temperatura inferior a aproximadamente 50 °C hasta un contenido de agua según Karl Fischer del 3,5 % o inferior. El rendimiento de la pancreatina seca es de 80 a 100 g a partir de 1 kg de páncreas porcino en forma de escamas congeladas procedente de cerdo para carne.

Prueba de centrifugación para completar la hidrólisis. Se tomó una muestra de tres cucharadas de aproximadamente 10 ml del recipiente de hidrólisis y se pasó por un tamiz de 0,425 mm, se recogió el filtrado en un vaso de plástico (se raspó el filtrado en un vaso de plástico también), se desecharon las fibras que quedaron retenidas en la malla. Con una pipeta, se añadieron 10 g de solución del reactor a un tubo de centrifuga de 50 ml, se añadió 5,5 ml de IPA al 85 %, se agitó durante 1 minuto con una espátula. Se añadieron 20 ml de IPA al 85 % al filtrado en un tubo de centrifuga de 50 ml. Se agitó durante un minuto con una espátula. Se centrifugó la suspensión a aproximadamente 90 × g durante dos minutos.

La primera muestra se puede tomar dos horas después del inicio de la hidrólisis o cuando el color cambie de rosa a parduzco y la suspensión se vuelva más líquida (aproximadamente 2 horas).

La siguiente muestra se toma cuando el color es marrón sin tono rosado, en este punto se espera que el sedimento sea aproximadamente del 25 %, el sedimento será menos firme y es posible que haya restos rezagados en la capa transparente superior. Después de esto, el muestreo podrá realizarse cada media hora, en la medida de lo posible.

La hidrólisis se detiene si dos mediciones posteriores muestran menos del 20 % de sedimentos. En este punto, el sedimento estará firme y sin restos en la capa transparente superior.

La irradiación con haz de electrones bilateral del PVP en viales se realizó por triplicado. Los datos de la reducción de la carga vírica y la destrucción en escala logarítmica del PVP expuesto a la radiación con haz de electrones se muestran en la tabla 1:

| Dosis (KGy) | 0 | 9,5 | 19,25 | 38,45 | 0 | 9,5 | 19,25 | 38,45 |
|-------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | Carga vírica | Carga vírica | Carga vírica | Carga vírica | Destrucción en escala logarítmica | Destrucción en escala logarítmica | Destrucción en escala logarítmica | Destrucción en escala logarítmica |
| | Cantidad de virus/ml | Cantidad de virus/ml | Cantidad de virus/ml | Cantidad de virus/ml | | | | |
| Prueba A | $1,50 \times 10^8$ | $2,50 \times 10^6$ | $1,50 \times 10^5$ | | $0,00 \times 10^0$ | $1,78 \times 10^0$ | $3,00 \times 10^0$ | |
| Prueba B | $1,50 \times 10^8$ | $6,34 \times 10^6$ | $6,34 \times 10^4$ | | 0 | $1,37 \times 10^0$ | $3,37 \times 10^0$ | |
| Prueba C | $4,00 \times 10^8$ | $1,26 \times 10^6$ | $4,00 \times 10^5$ | $1,50 \times 10^2$ | 0 | $2,50 \times 10^0$ | $3,00 \times 10^0$ | $6,43 \times 10^0$ |
| Media | | | | | 0 | $1,88 \times 10^0$ | $3,12 \times 10^0$ | $6,43 \times 10^0$ |

La dosis del haz de electrones se determinó mediante la estimación de la dosis absorbida por cada muestra a partir de la dosis superficial como lo indica el dosímetro fijado al recipiente de la muestra.

En la tabla 1 se muestra que la exposición del PVP a aproximadamente 40 kGy proporciona una destrucción de aproximadamente 6,5 en escala \log_{10} , mientras que la exposición a aproximadamente 20 kGy proporciona una destrucción de aproximadamente 3 en escala \log_{10} . Basándose en estos datos, se espera que la exposición a aproximadamente 30 kGy proporcione una destrucción de al menos 4 en escala \log_{10} .

La exposición del PVP a aproximadamente 60 kGy, aproximadamente 80 kGy o aproximadamente 100 kGy dio como resultado cantidades de virus finales por debajo del límite de detección del ensayo.

Se analizó la actividad de la pancreatina en cuanto a proteasa, amilasa y lipasa libres como se describe en la USP mediante métodos validados. Se analizó la proteasa total de la pancreatina como se describe en la Farmacopea Europea (EP) mediante métodos validados.

5 Se realizó una irradiación con haz de electrones bilateral de pancreatina N. Todos los recipientes de pancreatina N se recibieron inalterados en el sitio experimental y se utilizaron para el ensayo. Los datos de la actividad enzimática del PAF de pancreatina expuesto a la radiación con haz de electrones se muestran en la tabla 2:

| Dosis de haz E | Actividad de lipasa | Actividad de amilasa | Actividad de proteasa total | Actividad de proteasa libre |
|-----------------|---------------------|----------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| KGy | Unidades USP/gramo | Unidades USP/gramo | Unidades USP/gramo | Unidades USP/gramo |
| Control (0 kGy) | 89106 | 564390 | 383192 | 314093 |
| 18,6 kGy | 63328 | 398752 | 321567 | 266540 |
| 37,45 kGy | 58631 | 386628 | 302341 | 244531 |
| 56,5 kGy | 47755 | 282378 | 272499 | 232087 |
| 76,35 kGy | 40583 | 272760 | 259117 | 214914 |
| 99,4 kGy | 37799 | 286652 | 247005 | 196356 |

10 En la tabla 2 se muestra que la exposición del PAF de pancreatina a aproximadamente 20 kGy produce una pérdida de aproximadamente un 30 % en la actividad de la lipasa, la exposición del PAF de pancreatina a aproximadamente 40 kGy produce una pérdida de aproximadamente un 35 % en la actividad de la lipasa, la exposición del PAF de pancreatina a aproximadamente 60 kGy produce una pérdida de aproximadamente un 46 % en la actividad de la lipasa, la exposición del PAF de pancreatina a aproximadamente 80 kGy produce una pérdida de aproximadamente un 54 % en la actividad de la lipasa y la exposición del PAF de pancreatina a aproximadamente 100 kGy produce una pérdida de aproximadamente un 58 % en la actividad de la lipasa. Basándose en estos datos, se espera que la exposición del PAF de pancreatina a aproximadamente 30 kGy proporcione una pérdida de al menos un 30 % en la actividad de la lipasa.

20 Se realizó una irradiación con haz de electrones bilateral al páncreas de cerdo para carne. En la tabla 3 se muestran los datos de la actividad enzimática de la pancreatina procedente de glándulas pancreáticas porcinas en forma de escamas congeladas expuestas a radiación con haz de electrones:

| Dosis de haz E | Actividad de lipasa | Actividad de amilasa | Actividad de proteasa total | Actividad de proteasa libre |
|-----------------|---------------------|----------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| KGy | Unidades USP/gramo | Unidades USP/gramo | Unidades USP/gramo | Unidades USP/gramo |
| Control (0 kGy) | 74986 | 423487 | 243421 | 151365 |
| 18,75 kGy | 74741 | 449569 | 337594 | 128749 |
| 35,5 kGy | 65348 | 349816 | 360407 | 128506 |
| 56,55 kGy | 57976 | 398281 | 268297 | 119727 |
| 77,4 kGy | 34806 | 251691 | 175994 | 109158 |
| 100,4 kGy | 36362 | 276118 | 206217 | 100342 |

25 En la tabla 3 se muestra que la exposición de glándulas pancreáticas porcinas en forma de escamas congeladas a aproximadamente 20 kGy produce una pérdida de aproximadamente un 1 % en la actividad de la lipasa, la exposición de glándulas pancreáticas porcinas en forma de escamas congeladas a aproximadamente 40 kGy produce una pérdida de aproximadamente un 13 % en la actividad de la lipasa, la exposición de glándulas pancreáticas porcinas en forma de escamas congeladas a aproximadamente 60 kGy produce una pérdida de aproximadamente un 23 % en la actividad de la lipasa, la exposición de glándulas pancreáticas porcinas en forma de escamas congeladas a aproximadamente 80 kGy produce una pérdida de aproximadamente un 54 % en actividad de la lipasa y la exposición de glándulas pancreáticas porcinas en forma de escamas congeladas a aproximadamente 100 kGy produce una pérdida de aproximadamente un 52 % en actividad de la lipasa. Basándose en estos datos, se espera que la exposición de glándulas pancreáticas porcinas en forma de escamas congeladas a aproximadamente 30 kGy produzca una pérdida de aproximadamente un 10 % en la actividad de la lipasa.

40 Como se muestra en las tablas 2 y 3, la irradiación con haz de electrones del PAF de pancreatina produce una mayor pérdida de actividad enzimática en comparación con la irradiación con haz de electrones del tejido pancreático antes del aislamiento. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, la resistencia del tejido inalterado a la irradiación con haz de electrones puede deberse a la conformación de la enzima (por ejemplo, como proenzima) en el tejido de origen y/o a cofactores en el tejido de origen que proporcionan protección estructural.

Ejemplo 2. Irradiación con haz de electrones de glándulas pancreáticas porcinas completas

Se realizó un estudio adicional con páncreas porcino completo. Se empaquetaron aproximadamente 3,6 kg de páncreas porcino descongelado en cajas de cartón forradas con cera de aproximadamente 25 × 38 × 3,8 cm (10 × 15 × 1,5 pulgadas) de espesor. Las cajas se congelaron a -20 °C y se mantuvieron hasta su uso para la irradiación con haz de electrones. Las cajas se enviaron para irradiación con haz de electrones en un camión para congelados (-20 °C). Las cajas se sacaron del camión para congelados y después se expusieron a una irradiación con haz de electrones bilateral; las cajas no irradiadas sirvieron como control. Se utilizaron cinco (5) cajas para cada dosis de radiación nominal: 0, 15, 20 y 25 kGy y se devolvieron para evaluaciones en el camión para congelados (-20 °C), incluidas las cajas no irradiadas, y después se mantuvieron a -20 °C.

Se seleccionaron muestras de páncreas congeladas de cada caja en ubicaciones aleatorias dentro de la caja para el posterior aislamiento de pancreatina. El aislamiento se realizó como se describe en el presente documento. A continuación se analizó la actividad enzimática de la pancreatina aislada del páncreas completo irradiado con haz de electrones de acuerdo con un ensayo colorimétrico.

Las muestras de pancreatina (PAF) se analizaron mediante análisis cinético colorimétrico con un lector de microplacas con el uso de sustratos estructuralmente similares a los utilizados en USP 39 <Pancrelipasa>. Las actividades enzimáticas se determinaron mediante la medición de la tasa de producción del producto con respecto al patrón de referencia de pancrelipasa. Se ha demostrado la comparabilidad analítica entre los métodos de monografía USP presentados y los métodos alternativos de lectura de microplacas.

El procedimiento de muestreo, aislamiento y ensayo se repitió cuatro veces para cada dosis para obtener un total de cinco mediciones para cada dosis. Los valores medios de las cinco mediciones se indican en la tabla 4.

Tabla 4: Actividad enzimática del PAF después de la irradiación de glándulas pancreáticas completas

| Dosis del haz E* | Actividad media de la lipasa | Actividad media de la amilasa | Actividad media de la proteasa libre | Actividad media de la proteasa total |
|------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| KGy | Unidades USP/mg | Unidades USP/mg | Unidades USP/mg | Unidades USP/mg |
| Control (0 kGy) | 104 | 456 | 197 | 344 |
| 14,9 kGy | 99 | 435 | 201 | 291 |
| 19,9 kGy | 106 | 411 | 200 | 316 |
| 24,9 kGy | 104 | 395 | 183 | 301 |

* (dosis mínima + dosis máxima)/2

En la tabla 4 se muestra que la pancreatina aislada de una glándula pancreática completa expuesta a una dosis de hasta aproximadamente 25 kGy de irradiación con haz de electrones tiene la misma o sustancialmente la misma actividad de la lipasa que la pancreatina aislada de un control no irradiado.

Ejemplo 3. Irradiación con haz de electrones de dosis baja de tejido de páncreas porcino inalterado

Se han realizado estudios adicionales mediante la adición de virus vivos al tejido del páncreas porcino y después sometiendo el tejido infectado con el virus a radiación con haz de electrones en dosis más bajas (aproximadamente 12,3 kGy) para permitir la recuperación y evaluación del virus. Este trabajo adicional se realizó para demostrar la inactivación eficaz de varios virus relacionados en una dosis baja que permitiría la enumeración eficaz del impacto de la irradiación con haz de electrones.

Se añadieron deliberadamente virus seleccionados a la muestra de tejido y se evaluó el grado de eliminación del virus mediante la comparación de la cantidad de virus ingresado con la cantidad de virus restante después del tratamiento con haz de electrones. Los virus seleccionados para este estudio se identifican en la tabla 5.

Tabla 5: Virus seleccionados para el estudio de eliminación vírica

| Virus | Familia | Genoma | Envoltura | Tamaño (nm) | Resistencia fisicoquímica |
|---------------------------|---------|--------|-----------|-------------|---------------------------|
| Reovirus de tipo 3 (REO3) | Reo | ARN | No | 60-80 | Media |
| Parvovirus porcino (PVP) | Parvo | ADN | No | 18-24 | Elevada |
| Calicivirus felino (CVF) | Calici | ARN | No | 35-39 | Media |

REO3 tiene un genoma segmentado de ARN bicatenario y pertenece a la familia de virus Reoviridae, que también incluye rotavirus. Por lo tanto, REO 3 puede servir como modelo para el rotavirus. El CVF se ha utilizado como virus modelo para la validación de métodos de inactivación en productos sanguíneos y, en particular, como modelo para el virus de la hepatitis E (VHE).

Se cortaron y trituraron glándulas pancreáticas porcinas. A continuación se añadió el tejido a una placa de Petri y se le añadió el virus indicado. Las reservas de virus convencionales tenían cantidades certificadas de al menos 1×10^7 ufp/ml. La muestra enriquecida se incubó a temperatura ambiente durante un mínimo de 60 minutos (hasta que el tejido volvió a su sequedad original). Después de la incubación, se añadió tejido de páncreas porcino adicional a la placa. El plato se selló y se colocó en hielo seco para su envío a la instalación de haz de electrones. Cada placa contenía aproximadamente 13 gramos de tejido y la densidad del tejido era similar a la densidad de una glándula entera.

Para cada virus, se incluyeron muestras de recuperación enriquecidas (no enviadas) y un control de envío no irradiado (enviado a las instalaciones de del haz de electrones pero no irradiado).

La irradiación con haz de electrones se realizó en las instalaciones del haz de electrones. Una vez completada la exposición a la radiación con haz de electrones, las muestras irradiadas y los controles de envío no irradiados se enviaron de vuelta para evaluar la carga vírica. Tras su recepción, las muestras se almacenaron a ≤ -60 °C hasta el momento de la prueba.

Para cada muestra, se añadieron 50 ml de medio de cultivo a un frasco estéril. El tejido se extrajo mediante la realización de 3 rondas de remojo durante aproximadamente 5 a 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de una mezcla en vórtex de 15 a 30 segundos. A continuación, las muestras se centrifugaron a 3.000 RPM durante 10 minutos. El sobrenadante de la extracción se utilizó para pruebas víricas.

Las cantidades de virus se determinaron mediante ensayos de placas convencionales. El tipo de célula indicadora para REO3, PVP y CVF fueron Vero, PT-1 y CRFK, respectivamente. Las cantidades de virus y los factores de eliminación vírica se calcularon de acuerdo con procedimientos convencionales. El factor de eliminación del virus (FEV) se calculó de la siguiente manera:

$$FEV = \log_{10} \left[\frac{\text{Volumen} * \text{cantidad antes del procesamiento}}{\text{Volumen} * \text{cantidad después del procesamiento}} \right]$$

Los datos sobre la eliminación vírica producida por la exposición del tejido enriquecido a la radiación con haz de electrones se muestran en la tabla 6.

Tabla 6: Eliminación vírica después de la irradiación de glándulas pancreáticas con virus

| Virus modelo | Virus total en escala log | | FEV | Límite de confianza del 95 % |
|--------------|---------------------------|---------------------------|------------|------------------------------|
| | Antes del procesamiento | Después del procesamiento | | |
| REO3 | 6,5 | <2,4 | $\geq 4,1$ | 0,08 |
| CVF | 6,7 | 4,9 | 1,8 | 0,05 |
| PVP | 5,8 | 3,6 | 2,2 | 0,29 |

Estos estudios confirmaron que una inactivación suficiente del virus, incluido del calicivirus felino (CVF) y del reovirus 3 (REO3), podrían lograrse con radiación con haz de electrones de un tejido inalterado. Por otro lado, la irradiación de una glándula pancreática seguida del aislamiento de una preparación enzimática (por ejemplo, PAF de pancreatina) de la glándula irradiada mostró resultados similares con respecto a la pérdida de actividad enzimática en relación con un control no irradiado a los que se muestran en la tabla 3, donde se utilizó páncreas porcino en forma de escamas.

La introducción de una etapa de descontaminación antes del procesamiento del páncreas porcino proporciona un control eficaz de agentes infecciosos conocidos tanto en términos de seguridad del operador durante el aislamiento de enzimas como de seguridad del paciente. Por lo tanto, el uso de un tratamiento con haz de electrones que es eficaz para inactivar un amplio espectro de microbios y virus, incluidos los virus difíciles de inactivar (por ejemplo, el parvovirus porcino), con una pérdida mínima de actividad enzimática es ventajoso sobre otros métodos.

Como se utiliza en el presente documento, la etapa de radiación con haz de electrones puede considerarse una etapa de inactivación vírica ortogonal. La reducción de la carga microbiana y/o vírica obtenida en el tejido pancreático irradiado con haz de electrones se transfiere a la pancreatina que se aísla del mismo de manera aditiva con respecto a la reducción obtenida por otras etapas de reducción microbiana y/o vírica. La destrucción total en escala \log_{10} lograda por todas las etapas, incluida la radiación con haz de electrones, es la destrucción acumulativa en escala \log_{10} lograda por todas las etapas de inactivación microbiana y/o vírica realizadas en el tejido pancreático.

REIVINDICACIONES

1. Una pancreatina producida mediante un método que comprende las etapas de:
 - 5 (a) someter tejido pancreático inalterado de mamífero a radiación con haz de electrones para producir tejido pancreático irradiado, en donde la radiación con haz de electrones es suficiente para producir al menos una reducción de tres en escala \log_{10} de la carga vírica de un virus modelo en comparación con una muestra de control;
y
 - 10 (b) aislar la pancreatina del tejido pancreático irradiado.
2. La pancreatina de la reivindicación 1, en donde la radiación con haz de electrones es suficiente para producir una reducción de al menos cuatro en escala \log_{10} de la carga vírica del virus modelo en comparación con la muestra de control.
- 15 3. La pancreatina de la reivindicación 1, en donde el virus modelo es el parvovirus porcino (PVP).
4. La pancreatina de la reivindicación 1, en donde la etapa (b) comprende iniciar la hidrólisis o autólisis del tejido pancreático irradiado o activar una proenzima del tejido pancreático irradiado.
- 20 5. La pancreatina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la radiación con haz de electrones tiene una dosificación de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 kGy, preferentemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 kGy.
- 25 6. Un método para la producción de un producto de pancreatina que comprende las etapas de:
 - (a) someter tejido pancreático de mamífero inalterado a radiación con haz de electrones para producir tejido pancreático irradiado; y
 - (b) aislar la pancreatina del tejido pancreático irradiado.
- 30 7. El método de la reivindicación 6, en donde la actividad biológica del producto de pancreatina obtenido en la etapa (b) corresponde a al menos un 50 %, preferentemente al menos un 90 %, de la actividad biológica de un producto de pancreatina de control, opcionalmente en donde la actividad biológica es actividad lipasa.
- 35 8. El método de la reivindicación 6 o 7, en donde la radiación con haz de electrones es suficiente para producir una reducción de al menos tres en escala \log_{10} , preferentemente de al menos cuatro en escala \log_{10} , de la carga vírica de un virus modelo en comparación con una muestra de control, en donde el virus modelo es preferentemente parvovirus porcino (PVP).
- 40 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde la radiación con haz de electrones tiene una dosificación de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 kGy, preferentemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 kGy.
10. Una composición farmacéutica que comprende la pancreatina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 45 11. La pancreatina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o la composición farmacéutica de la reivindicación 10 para su uso en el tratamiento de la insuficiencia pancreática exocrina, opcionalmente en donde la insuficiencia pancreática exocrina se debe a la fibrosis quística o a la pancreatitis crónica.