



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106659773 A

(43)申请公布日 2017.05.10

(21)申请号 201480040273.7

(22)申请日 2014.11.05

(30)优先权数据

61/900,092 2013.11.05 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.01.15

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/063984 2014.11.05

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/069677 EN 2015.05.14

(71)申请人 阿勒根制药国际有限公司

地址 爱尔兰维克罗郡

(72)发明人 斯蒂芬·佩雷特 罗伯特·贝克尔

路易吉·波尔特里

路易吉·吉多斯 保拉·阿尔祖菲

温琴扎·皮隆蒂 迈克尔·托塔

威廉·沃德

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 王思琪 郑霞

(51)Int.Cl.

A61K 38/54(2006.01)

权利要求书4页 说明书34页 附图6页

(54)发明名称

高效的胰酶药物组合物

(57)摘要

本公开内容提供高效的药物组合物,所述药物组合物包含高活性胰酶。本发明还涉及生产HA-胰酶及其组合物或剂型的方法,以及它们的使用方法。

1. 一种高活性胰酶 (HA-胰酶), 其中所述胰酶具有至少约120USP IU/mg的脂肪酶比活性。
2. 根据权利要求1所述的胰酶, 所述胰酶具有至少约150USP IU/mg的脂肪酶比活性。
3. 根据权利要求1所述的胰酶, 所述胰酶具有至少约200USP IU/mg的脂肪酶比活性。
4. 根据权利要求1所述的胰酶, 所述胰酶具有至少约500USP IU/mg的脂肪酶比活性。
5. 一种高效的药物组合物, 所述药物组合物包含根据权利要求1、2、3或4所述的HA-胰酶。
6. 根据权利要求1、2、3、4或5所述的组合物, 其中所述胰酶是源自猪的。
7. 根据权利要求5或6所述的组合物, 其中所述组合物包含每剂量单位至少约9,000、约20,000、约40,000、约60,000、约80,000或约100,000USP IU脂肪酶。
8. 根据权利要求7所述的组合物, 所述组合物包含多个HA胰酶的包衣的颗粒, 所述包衣的颗粒包含用至少一种肠溶的聚合物包衣的核心。
9. 根据权利要求5、6、7或8所述的组合物, 所述组合物为粉末、丸剂、微球、胶囊、袋剂、片剂、液体悬浮剂或液体溶液的形式。
10. 一种用于制备HA-胰酶的方法, 所述HA-胰酶具有至少约120USP IU/mg的脂肪酶比活性, 所述方法包括用具有包含在28和45 (MPa)^{0.5}之间的Hildebrand溶解度参数的溶剂处理胰酶, 其中所述溶剂是一种有机溶剂或有机溶剂的混合物或至少一种有机溶剂和水性溶剂的混合物, 且所述方法的温度低于室温。
11. 根据权利要求10所述的方法, 其中所述溶剂具有包含在28和38 (MPa)^{0.5}之间的Hildebrand溶解度参数。
12. 根据权利要求10所述的方法, 其中所述溶剂具有包含在28和34 (MPa)^{0.5}之间的Hildebrand溶解度参数。
13. 根据权利要求10所述的方法, 其中所述溶剂具有包含在34和38 (MPa)^{0.5}之间的Hildebrand溶解度参数。
14. 根据权利要求10所述的方法, 其中所述溶剂具有包含在34和45 (MPa)^{0.5}之间的Hildebrand溶解度参数。
15. 根据权利要求10所述的方法, 其中所述溶剂具有包含在38和45 (MPa)^{0.5}之间的Hildebrand溶解度参数。
16. 根据权利要求10、11、12、13、14或15所述的方法, 所述方法用于制备具有至少约150USP IU/mg的脂肪酶比活性的胰酶。
17. 根据权利要求10、11、12、13、14或15所述的方法, 所述方法用于制备具有至少约200USP IU/mg的脂肪酶比活性的胰酶。
18. 根据权利要求10、11、12、13、14或15所述的方法, 所述方法用于制备具有至少约250USP IU/mg的脂肪酶比活性的胰酶。
19. 根据权利要求10所述的方法, 所述方法包括以下步骤:
 - a1) 在溶剂中悬浮胰酶并沉淀不可溶部分, 所述溶剂具有包含在34和45 (MPa)^{0.5}之间的Hildebrand溶解度参数;
 - a2) 将步骤a1的所述不可溶部分从可溶部分分离;
 - a3) 干燥步骤a2的所述不可溶部分。

20. 权利要求19所述的方法,其中步骤1a) 在约4℃的温度进行约60分钟。
21. 根据权利要求10、19或20所述的方法,所述方法包括以下步骤:
- a1.1) 在搅拌下在水性溶剂中悬浮胰酶;
- a1.2) 通过向步骤a1.1的悬浮液添加至少一种有机溶剂或其混合物来沉淀不可溶部分;
- a2) 将步骤a1.2的所述不可溶部分从可溶部分分离;
- a3) 干燥步骤a2的所述不可溶部分。
22. 根据权利要求21所述的方法,所述方法包括以下步骤:
- a1.1) 在搅拌下在水性溶剂中悬浮胰酶;
- a1.2) 将步骤a1.1的可溶部分从不可溶部分分离;
- a1.3) 通过向步骤a1.2的所述可溶部分添加至少一种有机溶剂或其混合物来沉淀不可溶部分;
- a2) 将步骤a1.3的所述不可溶部分从可溶部分分离;
- a3) 干燥步骤a2的所述不可溶部分。
23. 根据权利要求22所述的方法,其中步骤a1.3进行约30分钟,且方法温度是4℃。
24. 根据权利要求19所述的方法,所述方法包括以下步骤:
- a1.1) 在溶剂中悬浮胰酶并沉淀不可溶部分,所述溶剂具有包含在38和45 (MPa)^{0.5}之间的Hildebrand溶解度参数;
- a1.2) 将步骤a1.1的可溶部分从所述不可溶部分分离;
- a1.3) 通过向步骤a1.2的可溶部分添加至少一种有机溶剂或其混合物以获得具有包含在28和36之间的Hildebrand溶解度参数的混合物来沉淀不可溶部分;
- a2) 将步骤a1.3的不可溶部分从可溶部分分离;
- a3.1) 干燥步骤a1.2的不可溶部分;
- a3.2) 干燥步骤a2的不可溶部分;
- a4) 将步骤a3.1的不可溶部分与步骤a3.2的不可溶部分混合在一起。
25. 根据权利要求21、22、23或24所述的方法,其中步骤a1.1的胰酶是以包含在0.05和0.3g/ml之间的量。
26. 根据权利要求21、22或23所述的方法,其中步骤a.1的水性溶剂和步骤a1.2或步骤a1.3的有机溶剂所包含的溶剂具有38 (MPa)^{0.5}的Hildebrand溶解度参数。
27. 根据权利要求24或25所述的方法,其中步骤a1.1的溶剂具有38 (MPa)^{0.5}的Hildebrand溶解度参数且步骤a1.3的溶剂具有36 (MPa)^{0.5}的Hildebrand溶解度参数。
28. 根据权利要求10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26或27所述的方法,其中所述有机溶剂选自以下的组:正戊烷、正己烷、正庚烷、乙醚、环己烷、四氯化碳、乙酸乙酯、四氢呋喃、氯仿、三氯乙烯、丙酮、二甲基甲酰胺、正丙醇、异丙醇、乙醇、二甲亚砜丁醇、甲醇、乙腈、二噁烷和methylenechloride。
29. 根据权利要求28所述的方法,其中所述有机溶剂选自丙酮、异丙醇和乙醇的组。
30. 根据权利要求10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26或27所述的方法,其中所述水性溶剂是缓冲溶液。
31. 根据权利要求30所述的方法,其中所述缓冲溶液具有pH=7或pH=4。

32. 根据权利要求10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26或27所述的方法,其中所述有机溶剂是丙酮且所述水性溶剂是pH=7的缓冲溶液。

33. 根据权利要求10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26或27所述的方法,其中所述有机溶剂是乙醇且所述水性溶剂是pH=7的缓冲溶液。

34. 根据权利要求10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26或27所述的方法,其中所述有机溶剂是丙酮且所述水性溶剂是pH=4的缓冲溶液。

35. 根据权利要求10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26或27所述的方法,其中所述有机溶剂是乙醇且所述水性溶剂是pH=4的缓冲溶液。

36. 根据权利要求22所述的方法,其中步骤a1.1的水性溶剂和步骤a1.3的有机溶剂所包含的溶剂具有 $38 \text{ (MPa)}^{0.5}$ 的Hildebrand溶解度参数,且其中所述溶剂是丙酮和pH=7的缓冲溶液的混合物,及步骤1.1a中的胰酶是以0.1g/ml的浓度。

37. 根据权利要求22所述的方法,其中步骤a1.1的水性溶剂和步骤a1.3的有机溶剂所包含的溶剂具有 $38 \text{ (MPa)}^{0.5}$ 的Hildebrand溶解度参数,且其中所述溶剂是丙酮和pH=4的缓冲溶液的混合物,及步骤a1.1中的胰酶是以0.1g/ml的浓度。

38. 根据权利要求22所述的方法,其中步骤a1.1的水性溶剂和步骤a1.3的有机溶剂所包含的溶剂具有 $38 \text{ (MPa)}^{0.5}$ 的Hildebrand溶解度参数,且其中所述溶剂是乙醇和pH=4的缓冲溶液的混合物,及步骤a1.1中的胰酶是以0.1g/ml的浓度。

39. 根据权利要求22所述的方法,其中步骤a1.1的水性溶剂和步骤a1.3的有机溶剂所包含的溶剂具有 $38 \text{ (MPa)}^{0.5}$ 的Hildebrand溶解度参数,且其中所述溶剂是丙酮和pH=7的缓冲溶液的混合物,及步骤a1.1中的胰酶是以0.3g/ml的浓度。

40. 根据权利要求22所述的方法,其中步骤a1.1的水性溶剂和步骤a1.3的有机溶剂所包含的溶剂具有 $38 \text{ (MPa)}^{0.5}$ 的Hildebrand溶解度参数,且其中所述溶剂是丙酮和pH=4的缓冲溶液的混合物,及步骤a1.1中的胰酶是以0.3g/ml的浓度。

41. 根据权利要求22所述的方法,其中步骤a1.1的水性溶剂和步骤a1.3的有机溶剂所包含的溶剂具有 $38 \text{ (MPa)}^{0.5}$ 的Hildebrand溶解度参数,且其中所述溶剂是乙醇和pH=4的缓冲溶液的混合物,及步骤a1.1中的胰酶是以0.3g/ml的浓度。

42. 根据权利要求22所述的方法,其中步骤a1.1的溶剂具有 $38 \text{ (MPa)}^{0.5}$ 的Hildebrand溶解度参数,且其是丙酮和pH=7的缓冲溶液的混合物,及步骤a1.1中的胰酶是在0.1g/ml的浓度。

43. 根据权利要求10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41或42所述的方法,所述方法包括微生物和/或病毒负载减少的步骤。

44. 根据权利要求43所述的方法,其中所述细菌和/或病毒负载减少通过过滤、加热、离子辐射、高压或通过烷基化进行。

45. 治疗患有与胰腺酶不足相关的生理状况的患者的方法,所述方法包括对患者施用药学上可接受量的根据权利要求5、6、7、8或9所述的组合物。

46. 一种制备HA-胰酶的方法,所述方法包括用饱和硫酸铵从天然胰酶溶液中沉淀胰酶。

47. 一种制备HA-胰酶的方法,所述方法包括以下步骤:

- a) 在水性缓冲剂中悬浮天然胰酶；
 - b) 离心天然胰酶的悬浮液；
 - c) 滗出步骤b的上清液；
 - d) 向所述上清液添加硫酸铵溶液以形成沉淀；
 - e) 离心步骤d的悬浮液以产生包含HA-胰酶的小团。
48. 根据权利要求47所述的方法，其中所述硫酸铵溶液是饱和硫酸铵溶液。
49. 根据权利要求48所述的方法，其中将饱和硫酸铵添加到所述上清液中以达到最终浓度50-75%的饱和硫酸铵。
50. 根据权利要求48所述的方法，其中将饱和硫酸铵添加到所述上清液中以达到最终浓度60%的饱和硫酸铵。
51. 根据权利要求47所述的方法，所述方法还包括以下步骤：
- f) 用硫酸铵洗涤所述小团。
52. 根据权利要求47所述的方法，所述方法还包括在水性缓冲剂中溶解所述小团以形成HA-胰酶溶液。
53. 根据权利要求52所述的方法，其中所述HA-胰酶溶液通过凝胶过滤脱盐。
54. 根据权利要求53所述的方法，其中凝胶过滤在包含交联的葡聚糖凝胶的柱上进行。
55. 根据权利要求46或47所述的方法，其中所述HA-胰酶具有天然胰酶的脂肪酶活性的至少60%。
56. 根据权利要求46或47所述的方法，其中所述HA-胰酶具有天然胰酶的淀粉酶活性的至少75%。
57. 根据权利要求46或47所述的方法，其中所述HA-胰酶具有天然胰酶的蛋白酶活性的至少50%。
58. 根据权利要求46或47所述的方法，其中所述HA-胰酶具有天然胰酶的蛋白质浓度的2-5倍的蛋白质浓度。
59. 根据权利要求46或47所述的方法，其中所述HA-胰酶具有天然胰酶的脂肪酶活性的至少60%、淀粉酶活性的至少75%和蛋白酶活性的至少50%。
60. 根据权利要求46或47所述的方法，其中所述HA-胰酶具有天然胰酶的脂肪酶活性的至少60%、淀粉酶活性的至少75%和蛋白酶活性的至少50%，且具有天然胰酶的蛋白质浓度的2-5倍的蛋白质浓度。
61. 一种高效的药物组合物，所述药物组合物包含通过根据权利要求10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41或42所述的方法制备的HA-胰酶。

高效的胰酶药物组合物

[0001] 相关交叉申请

[0002] 本申请根据35USC§119 (e) 要求2013年11月5日提交的美国临时专利申请系列号：61/900,092的权益，其公开内容通过引用为所有目的完整并入本文。

[0003] 领域

[0004] 本公开内容涉及高效的药物组合物，所述药物组合物包含高活性胰酶 (high activity pancreatin, HA-胰酶) 酶。本公开内容还涉及生产HA-胰酶酶及其组合物或剂型的方法，及它们的使用方法。

[0005] 背景

[0006] FDA估计超过200,000美国人患有胰腺外分泌不足 (EPI)，胰腺外分泌不足 (EPI) 包括生理紊乱，其中个体由于缺少由他们的胰腺产生的消化酶而不能很好地消化食物。这种消化酶的丧失导致诸如营养消化不良和吸收不良的紊乱，这导致营养不良及与其相关的其他后续和不良的生理状况。这些紊乱在患有囊性纤维化 (CF) 和损伤胰腺的外分泌功能的其它状况的患者中常见，所述其它状况诸如胰腺癌、胰切除术和胰腺炎。如果放置不理，营养不良能够危及生命，尤其是在婴儿和CF患者中。紊乱能够导致生长受损、妥协的免疫反应及缩短预期寿命。

[0007] 能够施用消化酶，诸如胰脂肪酶酶和其它胰腺酶产物 (pancreatic enzyme product, PEP)，从而至少部分补救EPI。施用的消化酶允许患者更有效地消化他们的食物。

[0008] 用于治疗EPI的胰脂肪酶酶主要是三类酶同其它酶及多种辅因子和辅酶的组合，所述三类酶是脂肪酶、淀粉酶和蛋白酶，所述其它酶，除了其他以外，包括弹性蛋白酶、磷脂酶、和胆固醇酯酶。这些酶在胰腺中天然产生并对于脂肪、蛋白质和碳水化合物的消化十分重要。这些酶催化脂肪水解成甘油和脂肪酸，淀粉水解成糊精和糖，及蛋白质水解成氨基酸和衍生物。然而，消化是涉及许多其它酶和底物的复杂过程，所述酶和底物有助于正确的消化功能和生产全范围的消化产物。

[0009] 胰脂肪酶酶可以从猪胰腺制备。其它胰脂肪酶来源包括牛胰腺和/或胰液。这些酶的天然哺乳动物来源产生具有与由人类胰腺分泌的相似的酶组成的产物。还能够使用其它非哺乳动物来源，例如，在U.S. 6,051,220、U.S. 2004/0057944、2001/0046493和/或WO2006044529中描述的那些。

[0010] 虽然包含胰脂肪酶的产物能够提供有效的治疗，问题也随之而来。每餐需要多个 (4-9) 相当大的胶囊 (高药物负载) 降低了患者对给药的坚持。还注意到高药物负载带来的潜在的微生物和病毒污染是不希望的。所有这些问题都与酶提取物的低纯度有关。纯度问题是已经使用多年的酶提取方法的结果，所述酶提取方法包括原液混合液或浆液的形成、用酒精的沉淀、离心和过滤。这样的提取方法生产的最终产物可以具有仅25%的蛋白质。例如，脂肪酶，这些胰脂肪酶提取物中一种在效力方面重要的酶，具有大约100 USP IU/mg的活性。这与纯的猪脂肪酶活性有差距，纯的猪脂肪酶具有约25,000 IU/mg的活性 (诸如可获得自Sigma Aldrich的猪脂肪酶)。使用这个近似值作为计算的基础，能够估算产物包含少于0.5%的活性脂肪酶。进一步讲，过量非活性物质存在的另外后果是，任何传染性污染可能

不可避免地是这一团块 (bulk) 的一部分并也随混合物的期望的活性成分一同被摄取。非活性物质的过量还干扰旨在减少生物负担的技术, 例如通过阻塞膜过滤器或过滤柱及遮蔽提取物不受电离辐射, 所述电离辐射可用于降低其潜在的传染性负担。

[0011] 在一个情形中, 一些纯的单个酶或三种单个酶的混合物已经进入用于治疗EPI的临床开发。这些是重组胆汁盐刺激的脂肪酶 (BSSL) (EXINALDA™/KIOBRINA®); 包含在母乳中的重组人类脂肪酶 **MERISPASE®**; 重组犬胃脂肪酶MS1819; 重组脂肪酶和 liprotamase; 由化学交联的重组细菌脂肪酶组成的混合物; 及提取自微生物来源的蛋白酶和淀粉酶。所有这些实验治疗方法目前都不能证明与来自猪胰脏的商业酶提取物诸如 **ZENPEP®** 或 **ULTRESA®** 相当的治疗效率水平。相似的, FDA咨询委员会会议在2011年1月12日投票反对批准 liprotamase, 这是由于其与之前用胰脂肪酶提取产物获得的相比在脂肪吸收系数 (CFA) 增加方面更低的效率。

[0012] 对相比现有的包含胰脂肪酶的产品更浓缩和纯净, 还要保持其对于治疗EPI的功效的产品存在明显需要, 因为这将允许生产更好、更便利且潜在地更安全的产品。有一些文献报道描述使用胰脂肪酶作为用于分离蛋白酶、脂肪酶或淀粉酶的起始材料。然而, 没有在 PEP 中发现的胰脂肪酶类型或相似产品被纯化以用于制造用于治疗用途的改良产品的报道。在每个情形中, 之前的努力是要相对于其它级分纯化特定酶或酶级分或移除某些成分而不实质性地增加总体的酶活性。在所有的情形中, 还没有对生产用作治疗剂的HA-胰酶产品的指导。

[0013] 用于蛋白质纯化的现有技术方法目标是以提取并分离简单的蛋白质富集级分, 如通过胰脂肪酶举例的, 或目标是以分离单个蛋白质或单个的蛋白质类, 如脂肪酶或蛋白酶。

[0014] 例如, Hwang等 (Ind. Eng. Chem. Res. 2007, 46, 4289), 通过引用并入本文, 公开了胰腺酶溶解度和溶剂极性之间的关系, 并报道了脂肪酶、蛋白酶和淀粉酶从胰腺蛋白的选择性沉淀。Hwang等展示了, 当使用具有降低的极性的溶剂时胰酶沉淀被提高, 且当溶剂具有 $28 \text{ (MPa)}^{0.5}$ 以下的Hildebrand溶解度参数时被最大化。淀粉酶和蛋白酶的选择性沉淀随着溶剂极性降低到 $34 \text{ (MPa)}^{0.5}$ 以下而增加, 而脂肪酶的选择性沉淀与溶液极性无关, 且混合物中存在的脂肪酶的不多于65%被回收。从这些结果, 不存在一起纯化胰腺酶混合物以获得HA-胰酶的动机, 且对于本领域技术人员不存在在纯化期间维持不同类酶的混合物的动机。胰脂肪酶已经被在治疗性产品中使用远超过60年, 没有纯化胰脂肪酶的尝试的事实是这种操作的益处还没有被设想或意识到的强烈指示。所有改善胰脂肪酶产品的尝试都聚焦在来自非胰来源的单个酶上, 进一步强调了使用胰脂肪酶作为用于改善的产品的制造的更纯的和/或更浓缩的酶的来源之前没有被意识到。

[0015] 因胰脂肪酶目前被用于药学和清洁应用, 没有动机或原因去纯化胰脂肪酶, 所述纯化以生产以数倍更高的酶浓度的具有酶活性的实质上相似的定性和定量属性的产品为目的。事实上, 目前的产品充分地满足它们的角色并已经如此保持超过60年没有实质上的改变, 且似乎在本领域没有对本文描述的显著改进的产品或相关制备方法的描述。包含用于治疗EPI的纯酶的这些产品都是基于来自重组技术或微生物来源的单个酶或, 在一个情形中, 三种纯的并化学修饰的单个酶的混合物。没有纯化来自粗胰腺提取物的包含蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶的混合物用于EPI的治疗、清洁和组织消化的努力。相似的, 没有单独纯化

并随后重组来自胰来源的酶的动机或报道。这样的方法与实现分离的酶或酶类的目的背道而驰。

[0016] 概述

[0017] 本公开内容涉及HA-胰酶及其高效的药物组合物或剂型。本公开内容还涉及生产HA-胰酶的高产量方法及使用该产品的的方法。

[0018] 附图简述

[0019] 图1示出胰酶提取物的UV吸收光谱。

[0020] 图2示出产生自在实施例15中描述的胰酶的硫酸铵沉淀的上清液(A)和再溶解的沉淀(B)的UV吸收光谱。

[0021] 图3示出实施例15的未洗涤和洗涤的硫酸铵沉淀的UV吸收光谱。

[0022] 图4示出实施例15的硫酸铵级分的洗脱曲线。级分4-8表现出在280nm的吸收,指示了蛋白质的存在。

[0023] 图5示出实施例15的级分6和10的UV吸收光谱。

[0024] 图6示出实施例17的硫酸铵级分的洗脱曲线。

[0025] 详述

[0026] 本公开内容涉及高活性胰酶(HA-胰酶),其包括具有有效且显著地高治疗活性的必需酶类,更具体地,所述酶类还具有降低的不必要的生物成分和/或不良的潜在传染成分的生物负担。本公开内容还涉及用于生产HA-胰酶的方法,更具体地,所述方法以极高的产量生产HA-胰酶。HA-胰酶使更小且更便利的剂型的配制成为可能,尤其是可以作为单个药片递送的剂型、用于悬浮的小颗粒剂型和能够在单个剂量单位中与其它治疗剂或有益成分合并的剂型。本公开内容的组合物对于患有EPI的患者,诸如囊性纤维化患者可以具有特别价值。本公开内容还有益于配制成其中患者的年龄或状况可能需要胶囊以外的替代施用形式的制剂,替代施用形式如,悬浮液和/或颗粒。更浓缩,并因此更小的剂型、单位或颗粒将对于这种患者组有巨大价值。本公开内容还使为以上列出的原因而应用设计为减少或移除不必要或不良的生物成分的技术成为可能,所述不必要或不良的生物成分诸如微生物和任何相关毒素。

[0027] 本公开内容涉及HA-胰酶酶(HA-胰酶)及其高效药物组合物。在特定实施方案中,HA-胰酶是猪来源的。HA-胰酶包含脂肪酶、蛋白酶和淀粉酶并具有至少约120、或至少约150、或至少约200、或至少约400、或至少约500USP IU/mg的脂肪酶比活性。

[0028] 本文使用的术语“消化酶”指消化道中的酶,其分解食物成分以使其能够被生物体获取或吸收。消化酶的非限制性实例包括胰脂肪酶酶(也称为胰脂肪酶或胰酶)、脂肪酶、辅脂肪酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胰凝乳蛋白酶B、胰肽酶、羧肽酶A、羧肽酶B、甘油酯水解酶、磷脂酶、甾醇酯水解酶、弹性蛋白酶、激肽酶原、核糖核酸酶、脱氧核糖核酸酶、 α -淀粉酶、木瓜蛋白酶、木瓜凝乳蛋白酶、谷蛋白酶(glutenase)、菠萝蛋白酶、无花果蛋白酶、 β -淀粉酶、纤维素酶、 β -半乳糖苷酶、乳糖酶、蔗糖酶、异麦芽糖酶及其混合物。

[0029] 如本文使用的术语“胰腺酶(pancreatic enzyme)”指存在于胰分泌物中的任意一种酶类型,诸如淀粉酶、脂肪酶、蛋白酶或其混合物,或任何具有酶活性的胰腺来源提取物,诸如胰酶。

[0030] 术语“胰脂肪酶酶(pancrelipase enzymes)”或“胰脂肪酶”或“胰酶”指几类酶的

混合物,包括淀粉酶、脂肪酶和蛋白酶。胰脂肪酶是可以商业获得的,例如,从Nordmark Arzneimittel GmbH或Scientific Protein Laboratories LLC。

[0031] 本文使用术语“API”指代“消化酶”或“胰脂肪酶”或“胰酶”。

[0032] 术语“脂肪酶”指催化脂肪分解为甘油和简单脂肪酸的酶。适当的脂肪酶的实例包括,但不限于,动物脂肪酶(如,猪脂肪酶)、细菌脂肪酶(如,假单胞菌属(*Pseudomonas*)脂肪酶和/或伯克氏菌属(*Burkholderia*)脂肪酶)、真菌脂肪酶、植物脂肪酶、重组脂肪酶(如,通过重组DNA技术由适当的宿主细胞生产的,所述宿主细胞选自培养中的细菌、酵母、真菌、植物、昆虫或哺乳动物宿主细胞的任一种、或包含与天然存在的序列同源或基本上相同的氨基酸序列的重组脂肪酶、由与天然存在的脂肪酶编码核酸同源或基本上相同的核酸编码的脂肪酶等等)、合成脂肪酶、化学修饰的脂肪酶及其混合物。术语“脂肪”广泛地包括天然存在的分子,包括脂肪、蜡、甾醇、脂溶性维生素(诸如维生素A、D、E和K)、单甘酯、双甘酯、三甘酯、磷脂等。

[0033] 术语“淀粉酶”指的是分解淀粉的糖苷水解酶,例如, α -淀粉酶、 β -淀粉酶、 γ -淀粉酶、酸性 α -葡萄糖苷酶、唾液淀粉酶,诸如唾液素等。适用于本公开内容中的淀粉酶包括,但不限于,动物淀粉酶、细菌淀粉酶、真菌淀粉酶(如,曲霉属(*Aspergillus*)淀粉酶,例如,米曲霉(*Aspergillus oryzae*)淀粉酶)、植物淀粉酶,重组淀粉酶(如,通过重组DNA技术由适当的宿主细胞生产的,所述宿主细胞选自培养中的细菌、酵母、真菌、植物、昆虫或哺乳动物宿主细胞的任一种、或包含与天然存在的序列同源或基本上相同的氨基酸序列的重组淀粉酶、由与天然存在的淀粉酶编码核酸同源或基本上相同的核酸编码的淀粉酶等等)、化学修饰的淀粉酶、及其混合物。

[0034] 术语“蛋白酶(protease)”通常指打破蛋白质的氨基酸之间的肽键的酶(如胰酶(proteinase)、肽酶、或蛋白水解酶)。蛋白酶通常由其催化类型鉴别,如天冬氨酸肽酶、半胱氨酸(硫醇)肽酶、金属肽酶、丝氨酸肽酶、苏氨酸肽酶、碱性或半碱性蛋白酶、中性及催化机理未知的肽酶。适用于本公开内容的蛋白酶的非限制性实例包括丝氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶(如,plasmepsin)金属蛋白酶和谷氨酸蛋白酶。此外,适用于本公开内容的蛋白酶的非限制性实例包括,但不限于,动物蛋白酶、细菌蛋白酶、真菌蛋白酶(例如,蜂蜜曲霉(*Aspergillus melleus*)蛋白酶)、植物蛋白酶,重组蛋白酶(如,通过重组DNA技术由适当的宿主细胞生产的,所述宿主细胞选自培养中的细菌、酵母、真菌、植物、昆虫或哺乳动物宿主细胞的任一种、或包含与天然存在的序列同源或基本上相同的氨基酸序列的重组蛋白酶、由与天然存在的蛋白酶编码核酸同源或基本上相同的核酸编码的蛋白酶等等)、化学修饰的蛋白酶及其混合物。

[0035] 本公开内容的组合物的胰脂肪酶可以包括一种或更多种脂肪酶(即,一种脂肪酶、或两种或更多种脂肪酶)、一种或更多种淀粉酶(即,一种淀粉酶、或两种或更多种淀粉酶)、一种或更多种蛋白酶(即,一种蛋白酶、或两种或更多种蛋白酶)、和这些酶以不同组合和比例的混合物。

[0036] 在本公开内容的组合物中的脂肪酶活性能够从约650到约100,000IU(USP方法)。其能够从约675到约825IU、从约2,500到约28,000IU、从约2,700到约3,300IU、从约4,500到约5,500IU、从约8,000到约11,000IU、从约13,500到约16,500IU、及从约18,000到约22,000IU、从约22,500到约27,500IU、从约36,000到约44,000IU,及在这些之间的所有范围和

子范围。

[0037] 本公开内容的组合物优选地能够包含每剂量单位至少约650IU (USP方法)、至少约9,000,甚至更优选地它们包含约20,000、约40,000、约60,000、约80,000或约100,000USP IU单位脂肪酶。

[0038] 根据本公开内容的HA胰酶组合物可以为粉末形式或可以为压制的形式,如,片剂,或可以包括多个包衣和/或无包衣的颗粒。所述颗粒可包含以至少一种肠溶包衣包衣的核心,其中所述包衣包含肠溶聚合物。上述组合物除包衣颗粒外还可包含胰脂肪酶的无包衣颗粒。具体来说,颗粒是小片剂、微片剂、微粒、微球、微胶囊和/或微丸。所述颗粒可以具有达约5毫米的直径。它们可以具有任何合适的粒径或形状。例如,颗粒能够具有从约25-5,000 μm 范围的粒径。例如,它们能够为“小片剂”的形式,所述小片剂具有在约2-5mm范围的标称颗粒直径,或者它们可以是“微片剂”,所述微片剂具有小于约2mm的标称颗粒直径,例如约1-2mm。颗粒可以具有小于约800 μm 的平均粒径,优选小于约500 μm ,更优选小于约200 μm 。颗粒可具有不小于400 μm 的体积直径($d(v,0.1)$) (定义为其中体积分布的10%低于此值且90%高于此值的直径)和不超过约800 μm 的体积直径($d(v,0.9)$) (定义为其中90%的体积分布低于此值且10%高于此值的直径)。

[0039] 在其中胰脂肪酶核心被肠溶包衣包围的实施方案中,包衣作为屏障保护药物免受胃的酸性环境和实质防止药物在到达小肠之前的释放。肠溶包衣组合物同其他包衣组合物的合适的组合能够用于提供对药物释放或治疗效果的所需类型的控制。肠溶包衣包含至少一种肠溶聚合物和另外的赋形剂。短语“肠溶聚合物”是指保护消化酶免受胃内容物的聚合物,例如,在酸性pH稳定但在较高的pH下能迅速分解的聚合物,或当它在胃中时其水合或侵蚀速率足够慢以确保胃内容物与消化酶的接触相对较小,而在胃肠道的其余部分时与此相反的聚合物。

[0040] 肠溶聚合物的非限制性实例包括纤维素乙酸邻苯二甲酸酯、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯、羟丙基甲基纤维素醋酸琥珀酸酯、聚醋酸乙烯邻苯二甲酸酯、甲基丙烯酸共聚物、甲基丙烯酸甲酯的酯、甲基丙烯酸甲酯共聚物、和甲基丙烯酸/甲基丙烯酸甲酯共聚物、甲基丙烯酸-丙烯酸乙酯共聚物(1:1)、虫胶和乙基纤维素。这些聚合物可以以不同商标名称市售获得,诸如:Cellacefate (纤维素乙酸邻苯二甲酸酯)、EUDRAGIT[®]L100、S100、L30D、FS30D、L100-55、L30D55 (甲基丙烯酸的共聚物)、AQUATERIC[®] (纤维素乙酸邻苯二甲酸酯)、AQOAT[®] (羟丙基甲基纤维素醋酸琥珀酸酯) 及HP55[®] (羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯)。肠溶包衣还可以包括其它赋形剂如滑石。优选地肠溶包衣包括:10-20wt.%的至少一种肠溶聚合物,其中每个所述wt.%是基于包衣颗粒的总重量。包衣还可包括亲脂剂,诸如C6-C30的亲脂性低分子量分子,选自脂肪族羧酸和醇,优选地C14-C18的羧酸和醇,诸如硬脂酸、肉豆蔻酸、肉豆蔻醇、或硬脂醇。包衣的其它可选成分是增塑剂、抗结剂(诸如滑石、硬脂酸镁、胶体二氧化硅及其组合;还任选地低粘度乙基纤维素)。适合的增塑剂的非限制性实例包括三醋精、柠檬酸三丁酯、柠檬酸三乙酯、乙酰基柠檬酸三正丁酯(acetyl tri-n-butyl citrate)、邻苯二甲酸二乙酯、癸二酸二丁酯、聚乙二醇、聚丙二醇、蓖麻油、乙酰化的单和双甘油酯、鲸蜡醇,及其混合物。优选的增塑剂是非邻苯二甲酸酯增塑剂或其混合物。

[0041] 包衣或无包衣的HA-胰酶颗粒可以根据已知的方法制备。例如,可以通过添加适当的粘合剂到HA-胰酶,随后在合适的溶剂存在下挤压并随后滚圆以制备微丸核心。可以施加控制的滚圆以生成小尺寸的HA-胰酶颗粒。可以将喷涂包衣、粉末分层和流化床技术用于通过包衣惰性核心制备珠剂。凝聚方法也可用于包衣的脂肪酶颗粒的制备。

[0042] 直接压片法可用于制备无赋形剂的压制片剂。在某些情况下,片剂可能显示胃耐受性,这是由于在与胃液的接触原位形成疏水包衣层。

[0043] 包括HA-胰酶的组合物可以为适合于含有消化酶的治疗剂的给药的任何形式,诸如例如,它们可以为粉末、丸剂(pellet)、微球、胶囊、袋剂、片剂、液体悬浮剂和液体溶液的形式。

[0044] 在本公开内容的一个实施方案中,可以制备包含HA-胰酶的剂型,尤其是包含HA-胰酶的更小和/或单剂型。HA-胰酶的可利用性允许胶囊尺寸的减少和/或使人们每餐以减少数量的胶囊递送剂量成为可能,例如,相比于20,000单位强度Zenpep[®]规格0的胶囊的典型制剂组合物,其里面装的是250-275mg的API。成年患者每餐可以摄取从4到10个这样的胶囊。为了200,000USP IU的脂肪酶的总体每日剂量,患者现在摄取10个胶囊且药物制品的摄入量是2,500-2,750mg。至少约2倍的纯化构成有意义的改善,因为它将大大减少所需的药物制品的量,且更程度的纯化将提供甚至更多的好处。事实上,本公开内容的HA-胰酶药物剂型,其采用口服胶囊的形式,其可具有约100-110mg药物含量(对比250-275mg),因此为了200,000USP IU的脂肪酶的总体每日剂量,患者的药物制品摄入量是约1,000-1,100mg(对比2,500-2,750mg)。此外,使用HA-胰酶胶囊,可以使用规格2(对比规格0),从而也大大减少施用的胶囊的总数量,或替代地保持规格0的胶囊并适当地调整其内容物,从而显著减少每日摄入。因EPI的治疗是长期治疗,其往往始于婴儿期,配制胰脂肪酶从而使其能够被包含在更小的剂量单位内和/或以减少量的每餐剂量单位摄入的能力构成对患者的显著益处。

[0045] 本公开内容的新颖剂型还可以包括小颗粒剂型。具有每单位体积提高的效力的胰脂肪酶产品将克服关于珠剂尺寸减少的重要问题。大部分商业胰脂肪酶剂型是胶囊,其被用胰脂肪酶珠剂填充,所述珠剂以肠溶聚合物包衣。施加包衣是因为胰腺脂肪酶在酸性介质中被不可逆地失活。可以将胶囊打开,并将珠剂撒在某些食物上,这对于年幼患者或那些吞咽困难的人或应对高药物负担是重要的选择。然而由于珠剂具有可感知的直径,可达2mm,此选择不解决所有患者的需要。这意味着,对于婴儿或需要管喂的患者,珠剂不能容易地悬浮在液体中。减少珠剂尺寸的尝试导致总表面积大大增加并因此需要多得多的肠溶聚合物以有效地包衣颗粒的增加的表面积。这大大增加了剂型的体积和摄入的聚合物的量到临界点,在该临界点剂型的体积进一步增加了药物负担,且包衣赋形剂的水平可能超过为其每天摄入设立的限量。

[0046] 具有大大减少的体积的HA-胰酶的可利用性不仅允许将全部剂量包含在单个剂量单位或减少数量的剂量单位中,而且还使得胰脂肪酶与其它化合物的组合成为可能。例如,抗酸缓冲剂,诸如碳酸氢钠和HA-胰酶可以在单个剂量单位中组合,而使用现有的胰脂肪酶不可能考虑胰腺酶和增加胃pH的剂的这样的组合,因为这会大大增加已经非常高的药物负担,因为将需要另外的胶囊/片剂和/或胶囊/片剂的尺寸将会过大。

[0047] 本公开内容的HA-胰酶还提供了无需肠溶包衣提供可分散的剂型的选择,因为缓

冲剂将防止胰酶的脂肪酶成分的酸失活。此外,补充的碳酸氢盐还可以提供治疗益处,因为在患有EPI的患者中碳酸氢盐分泌通常降低。可将这种新颖的剂型配制用于立即或延后释放并能够在液体介质中分散。这后一性质为需要液体喂食的患者提供了显著的优势,因为可以方便地将成分分散在食物或另一便利的介质中。这些组合可以以多种便利的形式递送,如胶囊、片剂、袋剂、珠剂和液体。如上所述,需要使用肠溶聚合物包衣胰脂肪酶剂型是由于脂肪酶在酸性介质中不稳定。但是,如果通过使用质子泵抑制剂使胃的pH升高,那么已经证明脂肪酶保持活性,这大概是因为其不暴露于足够低以灭活酶的pH水平。这种方法不方便,也不一定是医学上可取的,因为它增加了药物负担,并使用额外的慢性药物来克服另一个的缺点。使用简单的抗酸剂诸如碳酸氢钠,可暂时中和胃pH,这已被证明可有效保护酸不稳定的药物,诸如PPI奥美拉唑,其是药物Zegerid®的成分。这种药物中的碳酸氢钠水平是1.1g及奥美拉唑的水平是20mg或40mg,且这些成分都被包含在硬壳胶囊内。

[0048] 含有HA-胰酶和至少一种其它活性化合物,诸如H₂拮抗剂、质子泵抑制剂或胆盐的组合的单个剂型,也在本公开内容中公开。

[0049] 本公开内容获得了产品改进。事实上,制备HA-胰酶使得生物负担减少,仅仅是由于携带这一生物负担的材料的量的减少。然而,此外,用于制备过程的方法也能够减少生物负担,并将因此生产出显著较少拖累的产品。进一步讲,从产品中去除大量的非活性材料使无菌技术的使用成为可能,所述无菌技术用于将施用的可注射的生物制品,如,过滤、紫外线(UV)照射。再次,这代表产品特性中显著且未预料到的改进。

[0050] 存在于本公开内容的组合物或口服剂型中的HA-胰酶根据本文公开的方法制备。

[0051] 原材料是胰酶。在本公开内容中我们还可以用术语“API”、或“起始胰酶”、或“起始胰腺酶”、或“天然胰酶”、“起始胰脂肪酶”、或“天然胰脂肪酶”指代胰酶。

[0052] 一种方便的原材料是猪源性胰脂肪酶;原材料的实例是市售材料,例如来自Nordmark Arzneimittel GmbH、或Scientific Protein Laboratories LLC。也可以使用来自牛或其他哺乳动物来源的类似提取物。优选的原材料是猪源性胰脂肪酶。用于生产粗提取物的提取程序可以概括为包括以下步骤:猪腺体湿润研磨;添加胰脂肪酶“激活剂”;用冷和热的异丙醇处理“粗酶浆液”以沉淀蛋白质并去除脂肪;离心和过滤步骤以去除纤维并压缩和浓缩;真空干燥“湿饼”;为体积密度和粒径破坏结块并粉碎“湿饼”。这种干燥的产品是在现有产品中使用的胰酶。

[0053] 本公开内容的HA-胰酶通过处理起始胰酶(天然胰酶)制备。它保留对于基于胰腺酶的产品们的功效关键的那些要素,并去除不必要的那些要素。由本公开内容的方法所得到的材料是HA-胰酶。这种HA-胰酶具有至少约120、或至少约150、或至少约200、或至少约400,或者至少约500USP IU/mg的脂肪酶比活性。

[0054] 本公开内容的HA-胰酶可以通过包括沉淀的方法获得,所述沉淀可以通过溶剂或硫酸铵诱导。

[0055] 具有至少约120USP IU/mg的脂肪酶比活性的HA-胰酶,使用包括用溶剂处理胰酶的方法获得,其中所述溶剂具有包含在28和45 (MPa)^{0.5}之间的Hildebrand溶解度参数(SP),且所述溶剂是一种有机溶剂或有机溶剂的混合物,或至少一种有机溶剂和水性溶剂的混合物,且在低温,优选在低于室温的温度下进行该方法。本公开内容的溶剂诱发沉淀的方法以包含悬浮胰酶、沉淀不可溶部分、干燥不可溶部分以获得HA-胰酶为特征。

[0056] 在一个具体实施方案中,具有至少约120USP IU/mg的脂肪酶比活性的HA-胰酶使用包括用溶剂处理胰酶的方法制备,其中所述溶剂具有包含在28和38 (MPa)^{0.5}之间的Hildebrand溶解度参数(SP),且所述溶剂是一种有机溶剂或有机溶剂的混合物,或至少一种有机溶剂和水性溶剂的混合物,且在低温,优选在低于室温的温度下进行该方法。

[0057] 在另一个具体实施方案中,具有至少约120USP IU/mg的脂肪酶比活性的HA-胰酶使用包括用溶剂处理胰酶的方法制备,其中所述溶剂具有包含在28和34 (MPa)^{0.5}之间的Hildebrand溶解度参数(SP),且所述溶剂是一种有机溶剂或有机溶剂的混合物,或至少一种有机溶剂和水性溶剂的混合物,且在低温,优选在低于室温的温度下进行该方法。

[0058] 在另一个具体实施方案中,具有至少约120USP IU/mg的脂肪酶比活性的HA-胰酶使用包括用溶剂处理胰酶的方法制备,其中所述溶剂具有包含在34和38 (MPa)^{0.5}之间的Hildebrand溶解度参数(SP),且所述溶剂是一种有机溶剂或有机溶剂的混合物,或至少一种有机溶剂和水性溶剂的混合物,且在低温,优选在低于室温的温度下进行该方法。

[0059] 在另一个实施方案中,具有至少约120USP IU/mg的脂肪酶比活性的HA-胰酶使用包括用溶剂处理胰酶的方法制备,其中所述溶剂具有包含在34和45 (MPa)^{0.5}之间的Hildebrand溶解度参数(SP),且所述溶剂是一种有机溶剂或有机溶剂的混合物,或至少一种有机溶剂和水性溶剂的混合物,且在低温,优选在低于室温的温度下进行该方法。在一个具体实施方案中,具有至少约120USP IU/mg的脂肪酶比活性的HA-胰酶使用包括用溶剂处理胰酶的方法制备,其中所述溶剂具有包含在38和45 (MPa)^{0.5}之间的Hildebrand溶解度参数(SP),且所述溶剂是一种有机溶剂或有机溶剂的混合物,或至少一种有机溶剂和水性溶剂的混合物,且在低温,优选在低于室温的温度下进行该方法。

[0060] 使用本公开内容的方法获得的HA-胰酶具有至少约120、或至少约150、或至少约200、或至少约400、或至少约500USP IU/mg的脂肪酶比活性。

[0061] Hildebrand溶解度参数是指示特定溶剂的相对溶解性能的数值。它来自于溶剂的内聚能密度,而内聚能密度又是来自于汽化热。Hildebrand值可从文献来源获得,如从Barton Handbook of Solubility Parameters, CRC Press, 1983。本公开内容的方法溶剂是一种有机溶剂或多种有机溶剂的混合物或至少一种有机溶剂和水性溶剂的混合物;有机溶剂和水性溶剂的混合物可以包括一种或更多种有机溶剂和一种或更多种水性溶剂。本说明书中使用的术语“溶剂”标识上述所有可能的混合物,除非另有说明。溶剂可具有以下溶解度值:45、42、40、38、36、35、34和28,优选的溶解度值是38和36。

[0062] 有机溶剂可选自包括正戊烷、正己烷、正庚烷、乙醚、环己烷、四氯化碳、乙酸乙酯、四氢呋喃、氯仿、三氯乙烯、丙酮、二甲基甲酰胺、正丙醇、异丙醇、乙醇、二甲亚砜丁醇、甲醇、乙腈、二噁烷和methylenechloride的溶剂的组。优选的有机溶剂是丙酮、异丙醇、乙醇,及其组合。

[0063] 水性溶剂可选自由以下组成的组:水或缓冲溶液。优选的缓冲剂具有pH=7或pH=4。它们可以分别为pH=7:10mM磷酸盐缓冲剂和pH=4:10mM乙酸盐缓冲剂。

[0064] 在本公开内容的一个实施方案中,溶剂是包括一种或更多种有机溶剂和一种水性溶剂的混合物,所述混合物具有范围从28至45 (MPa)^{0.5}的Hildebrand溶解度参数。

[0065] 在本公开内容的实施方案中,溶剂是包括一种或更多种有机溶剂和一种水性溶剂的混合物,所述混合物具有范围从28至38 (MPa)^{0.5}的Hildebrand溶解度参数。

[0066] 在一个具体实施方案中,溶剂是包括一种或更多种有机溶剂和一种水性溶剂的混合物,所述混合物具有范围从28至34 (MPa)^{0.5}的Hildebrand溶解度参数。

[0067] 在一个具体实施方案中,溶剂是包括一种或更多种有机溶剂和一种水性溶剂的混合物,所述混合物具有范围从34至38 (MPa)^{0.5}的Hildebrand溶解度参数。

[0068] 在另一个实施方案中,溶剂是包括一种或更多种有机溶剂和一种水性溶剂的混合物,所述混合物具有范围从34至45 (MPa)^{0.5}的Hildebrand溶解度参数。

[0069] 在一个具体实施方案中,溶剂是包括一种或更多种有机溶剂和一种水性溶剂的混合物,所述混合物具有范围从38至45 (MPa)^{0.5}的Hildebrand溶解度参数。

[0070] 溶剂混合物的溶解度参数(SP)使用Hildebrand溶解度参数计算。

[0071] 在一个实施方案中,溶剂具有38 (MPa)^{0.5}的SP并且是有机溶剂与水性溶剂的混合物。这样的具有SP=38的二元溶剂的几个实例是:

[0072] 丙酮-缓冲剂:丙酮与pH=7的缓冲剂的体积比为35:65;丙酮与pH=4.0的缓冲剂的体积比为35:65;其中:SP(丙酮)=20.2,SP(缓冲剂)=47.9;

[0073] 乙醇-缓冲剂:乙醇与pH=7的缓冲剂的体积比为45:55;乙醇与pH=4.0的缓冲剂的体积比为45:55;其中SP(乙醇)=26.0,SP(缓冲剂)=47.9;

[0074] 在另一个实施方案中,SP=34 (MPa)^{0.5}的二元溶剂是:丙酮-缓冲剂:丙酮与pH=7的缓冲剂的体积比为50:50;其中SP(丙酮)=20.2,SP(缓冲剂)=47.9。

[0075] 在还另一个实施方案中,SP=35 (MPa)^{0.5}的二元溶剂是丙酮-缓冲剂:丙酮与pH=7的缓冲剂的体积比为45:55;其中SP(丙酮)=20.2,SP(缓冲剂)=47.9。

[0076] 在本公开内容的一个实施方案(单步法)中,用具有28-45 (MPa)^{0.5}的SP的溶剂处理胰酶,所述处理包括以下步骤:a1)在具有包含在28和45 (MPa)^{0.5}之间的Hildebrand溶解度参数的溶剂中在搅拌下悬浮胰酶且沉淀不可溶部分;a2)从步骤a1的混合物的可溶部分(上清液)分离不可溶部分(小团(pellet));a3)干燥在步骤a2中得到的不可溶部分;且其中步骤a1-a3在低于室温的温度下进行。适于执行方法的温度为4℃。

[0077] 在本公开内容的一个实施方案(单步法)中,用具有34-45 (MPa)^{0.5}的SP的溶剂处理胰酶,所述处理包括以下步骤:a1)在具有包含在34和45 (MPa)^{0.5}之间的Hildebrand溶解度参数的溶剂中在搅拌下悬浮胰酶且沉淀不可溶部分;a2)将步骤a1的混合物的不可溶部分(小团)从可溶部分(上清液)分离;a3)干燥在步骤a2中得到的不可溶部分;且其中步骤a1-a3在低于室温的温度下进行。适于执行方法的温度为4℃。

[0078] 在本公开内容的一个实施方案(单步法)中,用具有34-38 (MPa)^{0.5}的SP的溶剂处理胰酶,所述处理包括以下步骤:a1)在具有包含在34和38 (MPa)^{0.5}之间的Hildebrand溶解度参数的溶剂中在搅拌下悬浮胰酶且沉淀不可溶部分;a2)从步骤a1的混合物的可溶部分(上清液)分离不可溶部分(小团);a3)干燥在步骤a2中得到的不可溶部分;且其中步骤a1-a3在低于室温的温度下进行。适于执行方法的温度为4℃。

[0079] 优选执行步骤1a约60分钟,且优选温度是4℃。可以通过不同方法执行分离步骤(步骤a2),诸如离心、沉降或过滤。干燥步骤(a3)可以在以下机器中执行,例如高效烘干机、真空泵、或冷冻干燥机。也可以使用其它方法。在步骤a1中溶剂中的胰酶浓度优选以包含在0.050和0.3g/ml之间的量,优选在0.065和0.1g/ml之间,优选为0.065或0.1g/ml。

[0080] 在单步法的一个具体实施方案中,溶剂具有38 (MPa)^{0.5}的SP且是丙酮和pH 7的缓

冲剂(如10mM磷酸盐)的混合物,且在步骤a1中的胰酶的浓度为0.1g/mL。

[0081] 具有包含在28和45 (MPa)^{0.5}之间的Hildebrand溶解度参数的溶剂(或溶剂混合物)被用于本公开内容以悬浮胰酶并沉淀不可溶部分。此溶剂可作为用于同时的悬浮和沉淀的单个添加或作为2个相继的添加:第一添加以悬浮(悬浮溶剂)及第二添加以沉淀不可溶部分(沉淀溶剂)。在第二种情况下,优选第一添加是水性溶剂并且第二添加是有机溶剂(或混合物)。包括第一添加的水性溶剂(悬浮溶剂)和第二添加的有机溶剂(沉淀溶剂)的溶剂混合物具有包含在28和45之间的溶解度参数。

[0082] 在其中溶剂是有机溶剂和水性溶剂的混合物的本公开内容的一个实施方案中(两步法),首先将胰酶分散在水性溶剂中(悬浮溶剂)并随后加入有机溶剂(沉淀溶剂)。在这个实施方案中,步骤a1包括以下步骤:a1.1在搅拌下在水性溶剂中悬浮胰酶(悬浮);a1.2通过对步骤a1.1的悬浮液添加有机溶剂或其混合物来沉淀不可溶部分(沉淀)。因此这种两步法包括以下步骤:a1.1)在搅拌下在水性溶剂中悬浮胰酶;a1.2)通过对步骤a1.1的悬浮液添加至少一种有机溶剂或其混合物来沉淀不可溶部分(沉淀);a2)将步骤a1.2的不可溶部分从可溶部分分离;a3)干燥步骤a2的不可溶部分。

[0083] 步骤a1-a3在低于室温的温度进行。将步骤a1.1的混合物保持在静止条件下。取决于规模和设备,步骤a1.1的持续时间是约10到约30分钟,且步骤a1.2的持续时间是约30分钟。

[0084] 在水性溶剂中的胰酶优选地以包含在0.050和0.3g/ml之间的量,优选在0.1和0.3g/ml之间,优选为0.1或0.3g/ml。有机溶剂优选为乙醇或丙酮,且水性溶剂优选pH=4的缓冲剂(诸如10mM乙酸盐缓冲剂)或pH7缓冲剂(诸如10mM磷酸盐)。

[0085] 在两步法的一个具体实施方案中,悬浮溶剂和沉淀溶剂(在步骤a1.1和a1.2中分别使用的溶剂)所包含的溶剂具有38 (MPa)^{0.5}的SP,且是丙酮(沉淀溶剂)和pH 7的缓冲剂(诸如10mM磷酸盐)(悬浮溶剂)的混合物,且步骤a1中的胰酶浓度为0.1g/ml。

[0086] 在两步法的另一个具体实施方案中,悬浮溶剂和沉淀溶剂(在步骤a1.1和a1.2中分别使用的溶剂)所包含的溶剂具有38 (MPa)^{0.5}的SP,且是丙酮(沉淀溶剂)和pH 4的缓冲剂(诸如10mM乙酸盐缓冲剂)(悬浮溶剂)的混合物,且步骤a1中的胰酶浓度为0.1g/ml。

[0087] 在本发明的还另一实施方案中(多步法),当溶剂是有机溶剂和水性溶剂的混合物时,胰脂肪酶首先分散在水性溶剂中,并随后将有机溶剂添加到这个水性分散液的可溶部分。在这个实施方案中,方法步骤a1)包括三个步骤:a1.1)悬浮,a1.2)将步骤a1.1的可溶部分(上清液)从不可溶部分(小团)分离,a1.3)沉淀。这种多步法包括以下步骤:a1.1)在搅拌下在水性溶剂中悬浮胰酶;a1.2)将步骤a1.1的可溶部分从不可溶部分分离;a1.3)通过对步骤a1.2的可溶部分添加至少一种有机溶剂或其混合物来沉淀不可溶部分(沉淀);a2)将步骤a1.3的不可溶部分从可溶部分分离;a3)干燥步骤a2的不可溶部分。

[0088] 优选执行步骤a1.1约30分钟。将步骤a1.3的混合物在静止条件下保持约15分钟,且对此步骤的优选温度为4℃。

[0089] 在水性溶剂中的胰酶优选地以包含在0.05和0.3g/ml之间的量,优选在0.1和0.3g/ml之间,优选为0.1或0.3g/ml。使用的包含悬浮溶剂和沉淀溶剂(分别在步骤a1.1和步骤a1.3中使用的溶剂)的溶剂的SP优选为38。有机溶剂优选为乙醇或丙酮(沉淀溶剂),且水性溶剂优选为pH=4的缓冲剂(诸如10mM乙酸盐缓冲剂)或pH 7缓冲剂(诸如10mM磷酸盐)

(悬浮溶剂)。

[0090] 在多步法的一个具体实施方案中,悬浮溶剂和沉淀溶剂(分别在步骤a1.1和步骤a1.3中使用的溶剂)所包含的溶剂具有 $38 \text{ (MPa)}^{0.5}$ 的SP,且其是丙酮(沉淀溶剂)和pH 4.0的缓冲剂(诸如10mM乙酸盐缓冲剂)(悬浮溶剂)的混合物,且步骤a1中的胰酶浓度为0.3g/ml。

[0091] 在多步法的还另一个实施方案中,悬浮溶剂和沉淀溶剂(分别在步骤a1.1和步骤a1.3中使用的溶剂)所包含的溶剂具有 $38 \text{ (MPa)}^{0.5}$ 的SP,且其是乙醇(沉淀溶剂)和pH 4.0的缓冲剂(诸如10mM乙酸盐缓冲剂)(悬浮溶剂)的混合物,且步骤a1中的胰酶浓度为0.3g/ml。

[0092] 在多步法的还另一个实施方案中,悬浮溶剂和沉淀溶剂(分别在步骤a1.1和步骤a1.3中使用的溶剂)所包含的溶剂具有 $38 \text{ (MPa)}^{0.5}$ 的SP,且其是丙酮(沉淀溶剂)和pH 4.0的缓冲剂(诸如10mM乙酸盐缓冲剂)(悬浮溶剂)的混合物,且步骤a1中的胰酶浓度为0.1g/ml。

[0093] 在多步法的还另一个实施方案中,悬浮溶剂和沉淀溶剂(分别在步骤a1.1和步骤a1.3中使用的溶剂)所包含的溶剂具有 $38 \text{ (MPa)}^{0.5}$ 的SP,且其是丙酮(沉淀溶剂)和pH 7的缓冲剂(诸如10mM磷酸盐)(悬浮溶剂)的混合物,且步骤1a中的胰酶浓度为0.3g/ml。

[0094] 分离步骤(单步法和多步法的步骤)可以通过不同的方法执行,诸如离心或过滤。HA-胰酶制备方法的所有方法步骤在温度控制下执行,其总是低于室温,优选约4℃。也可控制湿度。

[0095] 在本公开内容的一个实施方案中(双沉淀法),用具有包含在28和45 (MPa) $^{0.5}$ 之间的Hildebrand溶解度参数的溶剂处理胰酶的步骤,包括以下步骤:a1.1)在具有包含在28和45 (MPa) $^{0.5}$ 之间的Hildebrand溶解度参数的溶剂中悬浮胰酶并沉淀不可溶部分(悬浮和沉淀);a1.2)将步骤a1.1的可溶部分从不可溶部分分离;a1.3)通过对步骤a1.2的可溶部分添加至少一种有机溶剂或其混合物来沉淀不可溶部分,获得具有比a1.1使用的溶剂的SP值更低的SP值的混合物(沉淀);a2)将步骤a1.3的不可溶部分从可溶部分分离;a3.1)干燥步骤a1.2的不可溶部分;a3.2)干燥步骤a2的不可溶部分;a4)将步骤a3.1的不可溶部分同步骤a3.2的不可溶部分混合在一起。

[0096] 步骤a1.3的溶剂的SP值与a1.1中使用的溶剂的SP值不同,其永远比a1.1中的溶剂的SP值低至少约2个单位。例如,当a1.1中的溶剂的SP为38时,则步骤a1.3中的溶剂的SP为36或更低,可以优选为在27和36之间。

[0097] 在本公开内容的一个实施方案中(双沉淀法),使用具有38-45 (MPa) $^{0.5}$ 的Hildebrand溶解度参数的溶剂处理胰酶的步骤包括以下步骤:a1.1)在具有包含在38和45 (MPa) $^{0.5}$ 之间的Hildebrand溶解度参数的溶剂中悬浮胰酶和沉淀不可溶部分(悬浮和沉淀);a1.2)将步骤a1.1的可溶部分从不可溶部分分离;a1.3)通过向步骤a1.2的可溶部分添加至少一种有机溶剂或其混合物来沉淀不可溶部分,获得包含在28和36之间的Hildebrand溶解度参数(沉淀);a2)将步骤a1.3的不可溶部分从可溶部分分离;a3.1)干燥步骤a1.2的不可溶部分;a3.2)干燥步骤a2的不可溶部分;A4)将步骤a3.1的不可溶部分同步骤a3.2的不可溶部分混合在一起。

[0098] 在本公开内容的一个优选的实施方案中(双沉淀法),使用具有38 (MPa) $^{0.5}$ 的SP的溶剂处理胰酶的步骤包括以下步骤:a1.1)在具有38 (MPa) $^{0.5}$ 的Hildebrand溶解度参数的溶剂中悬浮胰酶和沉淀不可溶部分(悬浮和沉淀);a1.2)将步骤a1.1的可溶部分从不可溶部分分离;a1.3)通过向步骤a1.2的可溶部分添加至少一种有机溶剂或其混合物来沉淀不可

溶部分,获得36的Hildebrand溶解度参数(沉淀);a2)将步骤a1.3的不可溶部分从可溶部分分离;a3.1)干燥步骤a1.2的不可溶部分;a3.2)干燥步骤a2的不可溶部分;a4)将步骤a3.1的不可溶部分同步骤a3.2的不可溶部分混合在一起。

[0099] 干燥步骤a3.1和a3.2在室温真空下执行48小时;且其中步骤a1.1、a1.2、a1.3、a2在低于室温的温度执行。适于进行该方法的温度是4℃。

[0100] 可以通过不同方法执行分离步骤,诸如离心、沉降或过滤。干燥步骤可以在以下机器中执行,例如高效烘干机、真空泵、或冷冻干燥机。也可以使用其它方法。在步骤a1的溶剂中的胰酶浓度优选以包含在0.05-0.2g/ml之间的量,优选0.1g/ml。

[0101] 在双沉淀法的一个具体实施方案中,悬浮溶剂和沉淀溶剂(步骤a1.1使用的溶剂)所包含的溶剂具有38 (MPa)^{0.5}的SP,且其是丙酮(沉淀溶剂)和pH 7的缓冲剂(诸如10mM磷酸盐)(悬浮溶剂)的混合物,步骤a1.3的溶剂具有36 (MPa)^{0.5}的SP,且其是丙酮(沉淀溶剂)和pH 7的缓冲剂(诸如10mM磷酸盐)(悬浮溶剂)的混合物,且步骤a1中的胰酶浓度为50g/500mL。

[0102] 在双沉淀法的一个具体实施方案中,悬浮溶剂和沉淀溶剂(步骤a1.1使用的溶剂)所包含的溶剂具有38 (MPa)^{0.5}的SP,且其是丙酮(沉淀溶剂)和pH 7的缓冲剂(诸如10mM磷酸盐)(悬浮溶剂)的混合物,步骤a1.3的溶剂具有36 (MPa)^{0.5}的SP,且其是丙酮(沉淀溶剂)和pH 7的缓冲剂(诸如10mM磷酸盐)(悬浮溶剂)的混合物,且步骤a1中的胰酶浓度为0.1g/mL。

[0103] 在本公开内容的进一步实施方案中,胰酶提取物是通过硫酸铵诱发沉淀法纯化的。在本公开内容的另一实施方案中,将胰酶分散于水或缓冲剂中,诸如,但不限于,磷酸盐缓冲盐水。通过离心并回收上清液或通过任何其他合适的方法,移除可能存在的任何固体。然后将合适量的饱和硫酸铵溶液加入到如此制备的胰酶溶液中使溶解的成分沉淀。通过任何合适的方法回收沉淀,诸如,但不限于,离心和/或过滤。随后将回收的沉淀再溶于水或适当的缓冲剂中,诸如,但不限于磷酸盐缓冲盐水。

[0104] 在本公开内容的进一步实施方案中,将胰酶分散在适当的水性介质中,诸如PBS并将该分散液培育在冰上约五到约十五分钟,并不时搅拌。随后以16,000xg离心分散液约三到约八分钟并将上清液滗出。随后将饱和硫酸铵溶液添加到上清液以达到约50%到约75%的饱和硫酸铵终浓度。随后在16,000xg离心悬浮液约三到约八分钟并将上清液移除并随后将小团再溶到PBS中。在还进一步的实施方案中,在再溶之前用饱和硫酸铵洗涤小团。

[0105] 本公开内容的方法还可以包括HA-胰酶的灭菌和病毒灭活或减少病毒负载,其可以通过以下被执行:例如,过滤、加热、辐射(紫外线、X射线、β射线和γ射线),高压处理和/或核酸的烷基化,诸如使用β-propiolactone (BPL)。在诸如85℃以上的温度加热,优选在85℃和100℃之间持续适当的时间段,诸如18小时以上,及优选在18和48小时之间,甚至更优选在18和30小时之间也可以有效地减少病毒污染物。在较低的温度下加热(84℃,优选80℃)可在具有0.5重量%或更少的剩余水分的固体HA-胰酶上进行。

[0106] 本文公开一种治疗患有与胰腺酶不足(pancreatic enzymatic insufficiency)相关的生理状况的患者的方法。所述治疗方法包括给患者施用药学上可接受的量的本文公开的组合物。本文公开一种制备HA-胰酶的方法,所述方法包括使用饱和硫酸铵从天然胰酶溶液沉淀胰酶。制备HA-胰酶的方法包括以下步骤:a)在水性缓冲剂中悬浮天然胰酶;b)离心天然胰酶的悬浮液;c)滗出步骤b的上清液;d)将硫酸铵溶液加入到上清液中以形成沉

淀;e)离心步骤d的悬浮液以产生包含HA-胰酶的小团,其中硫酸铵溶液是饱和硫酸铵溶液且将饱和硫酸铵添加到上清液中以达到约50-75%的饱和硫酸铵终浓度,优选60%的饱和硫酸铵终浓度。该方法还包括用硫酸铵洗涤小团,在水性缓冲剂中溶解小团以形成HA-胰酶溶液,其中通过凝胶过滤将HA-胰酶溶液脱盐且凝胶过滤是在包含交联的葡聚糖凝胶的柱上进行的。HA-胰酶具有天然胰酶的至少约50%、60%或70%的脂肪酶活性,天然胰酶的蛋白质浓度的2-5倍的蛋白质浓度并具有天然胰酶的脂肪酶活性的至少约60%、淀粉酶活性的至少约75%和蛋白酶活性的至少约50%。HA-胰酶具有天然胰酶的脂肪酶活性的至少约60%、淀粉酶活性的至少约75%、蛋白酶活性的至少约50%及天然胰酶的蛋白质浓度的2-5倍的蛋白质浓度。

[0107] 从以上清楚的是,本公开内容中公开的悬浮-沉淀法具有很多优势。它允许制备具有高酶活性的胰酶。它保留了消化液中存在的消化酶,并保持原材料的消化特性。它移除了作为粗提取方法的结果而保留的消化不需要的那些材料,因此降低了API的体积。它使细菌或病毒污染物的减少或清除成为可能。它使控制混合酶类彼此的比率成为可能。此外,它使以数种剂型配制高效的API成为可能。

[0108] 为制备本发明的高活性胰酶,相较利用硫酸铵沉淀的方法优选悬浮-沉淀法(单步、两步、多步、双沉淀法);双沉淀法是本发明的更优选的方法。

实施例

[0109] 材料

[0110] 胰脂肪酶(API,起始胰脂肪酶或胰酶、天然胰脂肪酶或胰酶)由Nordmark提供,且其是从猪胰脏中提取的。它通常包含约30%的蛋白质(使用Bradford法定量)并具有94.4IU USP/mg的脂肪酶活性、253.2IU USP/mg的蛋白酶活性、420.3IU USP/mg的淀粉酶活性;P/L比是2.7,A/L比是4.5,且水含量为0.3%。

[0111] 通过单和二维电泳及随后的MALDI TOF表征来分析这一材料以确定胰脂肪酶组成部分(Mario Negri Institute,Milan,Italy)。对该提取物的二维电泳显示明显易溶(apparently readily soluble in water)于水的级分中有至少50个蛋白质/肽点,及明显不易溶于水(apparently less readily soluble in water)的级分中有30个蛋白质/肽点。溶解度的确定因活性酶可以吸附到胰脂肪酶的非水溶性成分上或以其他方式被胰脂肪酶的非水溶性成分困住的事实而混淆。溶解性也受pH影响。在切下并用牛胰蛋白酶消化主要点,且使用基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF)和酶谱法分析之后,分析对应混合物中的单个蛋白质的点和使用较易溶或较不溶的级分制备的凝胶的图像。将肽质量指纹术与来自文库的那些参照对比,并鉴定淀粉酶、脂肪酶、辅脂肪酶、羧肽酶A1和B、弹性蛋白酶2A和1、胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶和磷脂酶A2。提取物明显相对粗糙并包含数种活性酶类型以外的许多额外的蛋白质。

[0112] 肠内配方:PEPTAMEN® Junior 1.0Cal (Nestle,250mL装):脂肪含量:3.8g/100mL,蛋白含量:3g/100ml,碳水化合物含量:MLML13.8g/100mL。

[0113] 方法

[0114] 脂解活性:测量以基于胰脂肪酶酶USP专著中描述的脂肪酶测定的药典方法的方法进行,其基于通过pH稳态方法滴定由从使用的基质(橄榄油)中的酯化脂肪酸的水解形成

的自由脂肪酸。它是基于以下原理：脂肪酶催化甘油三酯水解，导致游离脂肪酸 (FFA) 的形成。根据时间形成的 FFA 的滴定提供脂肪酶的酶活性的确认，其可以表示为单位： $1\text{U}=1\mu\text{mol}$ 形成的 FFA/分钟。反应通过由实验系统保持稳定 pH 值而发生，所述实验系统当 pH 值相较固定值变化时提供添加 NaOH (滴定标准液) (pH 稳态方法)。根据时间添加的滴定标准液的量与由脂肪酶对甘油三酯作用形成的 FFA 的量相对应。曲线斜率 {加入的滴定标准液 = f (体积 (mL)/时间 (分钟))} 给出脂肪酶的酶活性。

[0115] 以下报道的脂肪酶活性 (LA) 始终表示为 IU USP。以下报道的脂肪酶比活性 (LSA) 始终表示为 IU USP/mg。

[0116] 蛋白质水解和 amilolytic 活性：测量根据在胰脂肪酶酶 USP 专著中描述的药典方法进行。以下报道的酶比活性 (SA) 始终表示为 IU USP/mg。

[0117] 含水量通过 TGA 在 80℃ 下 4 小时 (样品 18、19 和 20) 或卡尔·费休方法 (样品 26、27 和 28) 测量。

[0118] 使用己烷：异丙醇 (3:2) 提取甘油三酯，使用棕榈酸胆甾醇酯为内部标准，并通过 HPLC 分析。通过与标准三油精溶液比较所有保留时间来鉴定峰。

[0119] 蛋白质分析：使用 Bradford 测定定量总蛋白质含量。

[0120] 碳水化合物分析：1) 通过 HPLC 分析短链糖，使用木糖醇作为内部标准；通过与标准糖即麦芽糖比较所有保留时间来鉴定峰。2) 在 Carrez I 和 Carrez II 存在下提取麦芽糖糊精，并通过 HPLC 分析。通过与标准麦芽糖糊精即麦芽糖一水合物、麦芽三糖、麦芽四糖、麦芽五糖、麦芽六糖和麦芽七糖比较所有保留时间来鉴定峰。

[0121] 饱和硫酸铵：如下制备饱和硫酸铵溶液：计算 4℃ 的饱和度并在室温制备溶液，随后在冰上冷却。例如，将 1.43g 硫酸铵加入到 2mL 的室温 PBS (50mM 磷酸钠、150mM NaCl, pH 7.4) 中，并混合以溶解至 2.76mL 的终体积。在硫酸铵已经溶解后，将溶液置于冰上。

[0122] 胰酶提取：如下制备 40mg/mL 胰酶提取物：将粉末化的胰酶 (约 40–50mg) 添加到微量离心管中，随后是冷的 PBS 缓冲剂。摇动管以再悬浮粉末并在冰上培育约 15 分钟同时不时混合。或者，可将约 200mg 的粉末化的胰酶添加到小的冷却的烧杯中，随后是 5mL 冷的 PBS。将混合物用磁搅拌器在冰上搅拌约 15–30 分钟并转移到 1.5mL 微量离心管中。在室温或 4℃，16,000g 旋转微量离心管 5 分钟。如果在室温旋转，将管冷却，滗出上清液，并将提取物储存于冰上。

[0123] 硫酸铵沉淀：如下发生硫酸铵沉淀：在微量离心管中，将 750μl 的冷却的饱和硫酸铵缓慢加入到 500μl 冷却的胰酶提取物中，所述胰酶提取物如以上讨论的制备。混合物充分混合并在冰上培育 20 分钟，并不时混合。16,000g 离心混合物 5 分钟，滗出上清液并储存在冰上。

[0124] 洗涤小团：可以如下洗涤小团：将来自硫酸铵沉淀的小团重新悬浮于 500μl 冷却的 60% 饱和硫酸铵中 (在 PBS 缓冲剂中)。将悬浮液在冰上培育 5 分钟，随后 16,000g 离心 5 分钟并放回冰上。随后可将上清液滗出，留下洗涤过的小团。可以如下重新溶解硫酸铵小团：将 1mL 冷却的 PBS 加入到小团，并随后温和摇动管以溶解。将产生的混合物在冰上培育 15 分钟，随后 16,000g 离心 5 分钟以移除任何不溶的材料。还可以将小团重新溶解在 0.5mL 的 PBS 中以制造更浓缩的溶液。

[0125] 脱盐：在去离子水中平衡 4mL G-25Sephadex 柱并在 2000g 旋转干燥 2 分钟。加入要

脱盐的样品(0.75mL)并在2000g旋转柱2分钟。

[0126] 4-甲基伞形酮油酸酯测定:制备4-甲基伞形酮油酸酯在乙醇中的20mM储存溶液,并储存在-20℃。在测定当天通过用PBS稀释乙醇储存液到0.1mM的浓度制备工作稀释液。将以下混合:50μl的0.1mM 4-甲基伞形酮油酸酯储存液;25μl的PBS;25μl的~0.4μg在50mM Tris HCl中的胰酶、100mM NaCl pH 7.6。在酶标仪中测量具有355nm激发的450nm发射。可以以终点法施行测定,所述终点法通过在约10分钟以后加入1mL的5mM Triton X-100以终止反应。

[0127] 淀粉酶测定方案:用于淀粉酶测定的材料:淀粉酶测定需要:2,2'-连氮-二(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS)、葡萄糖氧化酶、α-葡糖苷酶、淀粉和大豆过氧化物酶(Rz=1.63)。将ABTS在4℃储存在50mM磷酸盐-柠檬酸盐pH 7的缓冲剂中。大豆过氧化物酶在4℃储存在PBS pH 7.4中。将葡萄糖氧化酶储存在50mM乙酸钠/100mM NaCl pH 5中。将α-葡糖苷酶和淀粉在4℃储存在去离子水中。一旦作为溶液提出,将所有的试剂保持在4℃。在4℃或冰上制造0.1mg/mL ABTS、39μg/mL大豆过氧化物酶(SBP)、10U/mL或80.6g/mL葡萄糖氧化酶、7U/mL或63μg/mL葡糖苷酶、及1mg/mL淀粉的100μl反应混合物。不同于其它成分,淀粉在被添加到反应混合物前为室温,并且还是在马上要在盘中使用之前将其加入到反应混合物中。应以这个顺序加入反应混合物的成分:ABTS、SBP、葡萄糖氧化酶、葡糖苷酶及淀粉。通过向95μl反应混合物加入5μl胰酶启动反应,所述胰酶被稀释在1mM PBS/30mM CaCl₂中。在测定中的胰酶终浓度是4μg/mL。记录在405nm的吸光度达约15分钟。将数据点作为时间的函数绘图。存在停滞期,且通常在运行测定的约8-12分钟之间发现曲线的线性部分。计算曲线的线性部分的斜率,并使用其作为最终数据。

[0128] 实施例1:多步骤方法

[0129] HA胰酶的制备;0.1g/mL;多步:悬浮、分离、沉淀;(SP=38:丙酮:水性溶剂=35:65;乙醇:水性溶剂=45:55)

[0130] 步骤a1.1-悬浮:在4℃将起始胰脂肪酶以0.1g/mL的浓度分散在水性溶剂中,并在搅拌下保持30分钟。在实验室规模使用650mg(当有机溶剂是丙酮时)或550mg(当有机溶剂是乙醇时)的起始胰脂肪酶执行实验。为胰脂肪酶悬浮测试了四种不同的水性溶剂:1) pH=4.0的缓冲剂(10mM乙酸盐缓冲剂);2) pH=7.0的缓冲剂(10mM磷酸盐);3) 去离子水(DW);4) 含有NaCl(0.5M)的pH=4.0的缓冲剂(10mM乙酸盐)。

[0131] 步骤a1.2-分离:离心来自步骤a1.1的悬浮液(10分钟,4℃,约11,000g)并将上清液(SN)从小团(P)分离。

[0132] 步骤a1.3-沉淀:将有机溶剂加入到步骤a1.2的上清液中,并将混合物以静止状态在4℃保持15分钟。所述有机溶剂是丙酮或乙醇。以每65份(体积)水性溶剂35份(体积)的量加入丙酮。以每55份(体积)水性溶剂45份(体积)的量加入乙醇。

[0133] 步骤a2-分离:离心混合物(10分钟,4℃,约11,000g)以将上清液从小团分离,所述小团包含胰腺酶。将小团重新悬浮在步骤a1.1使用的水性溶剂中(在重新悬浮、沉淀之后的小团中的LA)。

[0134] 分析不同步骤的材料。测量胰脂肪酶的量,将其表示为脂肪酶活性(LA)。

[0135] -在步骤a1.1的悬浮液中(悬浮液中的LA;LA-Sa1.1);

[0136] -在步骤a2获得的上清液中(在沉淀SN中的LA,LA-SN)

[0137] -在步骤a2获得并随后重新悬浮在起始介质的小团中(在沉淀小团中的LA, LA-P)。

[0138] 在表1、2、3、4中报告结果。

[0139] 表1

[0140]

样品	实验条件		悬浮液 (步骤a1.1)	分离 (步骤a2)				产量 (%)
	介质	溶剂	LA-Sa1.1	上清液 (SN)		小团 (P)		
				LA-SN	% LA-SN/ LA-Sa1.1	LA-P	% LA-P/ LA-Sa1.1	
1	pH 4.0	A	33528.2	5820.0	17.4	25376.4	75.7	93.1
2	水	A	31974.0	8105.5	25.4	22659.2	70.9	96.3
3	pH 4.0	E	35388.9	3464.3	9.8	27417.6	77.5	87.3
4	水	E	30369.8	4301.0	14.2	20835.1	68.6	82.8
5	pH 4.0+ NaCl	A	47761.0	9408.0	19.7	34543.3	72.3	92.0
6	pH 4.0+ NaCl	E	40364.0	10410.4	25.8	27101.5	67.1	92.9
7	pH 7.0	A	40388.9	9798.8	24.3	30178.8	74.7	99.0

[0141] LA=脂肪酶活性(IU USP); A=丙酮。E=乙醇; S=悬浮液; SN=上清液; P=小团

[0142] 表1示出, 胰脂肪酶的沉淀(步骤a1.3)允许在沉淀部分(小团)中的脂肪酶活性的良好回收, 其范围从约67%到约77%。产量是步骤a2的总脂肪酶活性(小团和上清液)相对表示为在步骤a1.1的悬浮液中的脂肪酶活性(Sa1.1)的初始的悬浮的胰脂肪酶的脂肪酶活性的%: $(LA-SN+LA-P)/(LA-Sa1.1)$ 。

[0143] 表2

[0144]

样品	实验条件			分离（步骤a2）				产量 （%）
	介质	溶剂	步骤a1.1 中的Theor. LA	上清液（SN）		小团（P）		
				LA-SN	% LA-SN/ theor LA-Sa1.1	LA-P	% LA-P/ theor LA- Sa1.1	
1	pH 4.0	A	61605.4	5820.0	9.4	25376.4	41.2	50.6
2	水	A	61458.2	8105.5	13.2	22659.2	36.9	50.1
3	pH 4.0	E	51940.8	3464.3	6.7	27417.6	52.8	59.5
4	水	E	51894.0	4301.0	8.3	20835.1	40.1	48.4
5	pH 4.0+ NaCl	A	61452.0	9408.0	15.3	34543.3	56.2	71.5
6	pH 4.0+ NaCl	E	52031.5	10410.4	20.0	27101.5	52.1	72.1
7	pH 7.0	A	61470.4	9798.8	15.9	30178.8	49.1	65.0

[0145] LA=脂肪酶活性(IU USP); A=丙酮。E=乙醇; S=悬浮液; SN=上清液; P=小团;

Theor. = 理论。

[0146] 该方法的产量在从约37%到约56%的范围。产量%是在步骤a2的小团和上清液中的总脂肪酶活性相对在步骤a1.1中使用的胰脂肪酶的理论脂肪酶活性,所述理论脂肪酶活性是通过包括未处理的原始材料的比活性(即如根据药典USP方法确定的94.4IU USP/mg)及其起始重量的因素计算的。

[0147] 表3

[0148]

样品	实验条件		分离 (步骤a2)		EF
	介质	溶剂	上清液 (SN)	小团 (P)	
			LSA	LSA	
1	pH 4.0	A	10.7	239.4	2.5
2	水	A	14.5	233.6	2.5
3	pH 4.0	E	10.1	179.2	1.9
4	水	E	11.5	145.7	1.5
5	pH 4.0+ NaCl	A	14.7	101.3	1.1
6	pH 4.0+ NaCl	E	18.2	80.9	0.9
7	pH 7.0	A	18.7	181.8	1.9

[0149] LSA=脂肪酶比活性(IU USP/mg);A=丙酮。E=乙醇;SN=悬浮液;EF=富集系数=在步骤a2的小团中的LSA/在步骤1.1a中的理论脂肪酶比活性,理论脂肪酶比活性即如根据药典USP方法所确定的94.4IU USP/mg。

[0150] 通过计算步骤a2的小团的脂肪酶活性和起始胰酶的脂肪酶活性(其为94.4IU/mg)之间的比率确定富集系数(不依赖pH的)。使用这个方法获得了最高到2.5的富集系数;还通过HPLC曲线分析确认了该富集。

[0151] 关于其它消化酶,在最终的小团(步骤a2中的沉淀)中的淀粉酶含量低于起始胰脂肪酶中的淀粉酶含量。

[0152] 实施例2:多步骤方法

[0153] HA胰酶的制备;0.3g/mL;多步:悬浮、分离、沉淀(SP=38:丙酮:水性溶剂=35:65;乙醇:水性溶剂=45:55)

[0154] 步骤a1.1-悬浮:在4℃将胰脂肪酶(API)以0.3g/mL的浓度分散在水性溶剂中,并搅拌30分钟。在实验室规模使用0.650ml(当有机溶剂是丙酮时)或0.550ml(当有机溶剂是乙醇时)的起始胰脂肪酶执行实验。在不同水性溶剂中各自运行两个实验:1) pH=4.0的缓冲剂(10mM乙酸盐缓冲剂);2) pH=7.0的缓冲剂(10mM磷酸盐)。

[0155] 步骤a1.2-分离:离心来自步骤a1的悬浮液(10分钟,4℃,约11,000g)并将上清液(SN)从小团(P)分离。

[0156] 步骤a1.3-沉淀:将有机溶剂加入到步骤a1.2的上清液中,并将混合物以静止状态在4℃保持15分钟。所述有机溶剂是丙酮或乙醇。以每65份(体积)水性溶剂35份(体积)的量加入丙酮。以每55份(体积)水性溶剂45份(体积)的量加入乙醇。

[0157] 步骤a2-分离:离心混合物(10分钟,4℃,约11,000g)以将上清液从小团分离,所述小团包含胰脂肪酶酶。将小团重新悬浮在起始水性溶剂中(在重新悬浮、沉淀之后的小团中

的LA)。

[0158] 步骤a3-干燥:将步骤a2的小团干燥。

[0159] 分析不同步骤的材料。胰脂肪酶的量表示为脂肪酶活性(LA)且其在以下中测量:

[0160] -在步骤a1.1的悬浮液中(悬浮液中的LA;LA-Sa1.1);

[0161] -在步骤a2获得的上清液中(在沉淀SN中的LA,LA-SN)

[0162] -在步骤a2获得的并随后重新悬浮在起始水性介质的小团中(在沉淀小团中的LA, LA-P)。在表4、5、6中报告结果。

[0163] 表4

[0164]

样品	实验条件		悬浮液 (步骤a1.1)	分离(步骤a2)				
	介质	溶剂	LA (Sa1.1)	上清液(SN)		小团(P)		产量 (%)
				LA-SN	% LA-SN/ LA-Sa1.1	LA-P	% LA-P/ LA- Sa1.1	
8	pH 4.0	A	139968.7	11856.6	8.5	112830.4	80.6	89.1
9	pH 4.0	E	107348.7	5035.2	4.7	99146.6	92.4	97.0
10	pH 4.0	A	137050.4	8778.9	6.4	108734.7	79.3	85.7
11	pH 4.0	E	115965.7	5097.9	4.4	88019.7	75.9	80.3
12	pH 7.0	A	137267.4	10535.3	7.7	108038.6	78.7	86.4
13	pH 7.0	E	118929.3	11340.9	9.5	86636.2	72.8	82.4

[0165] LA=脂肪酶活性(IU USP);A=丙酮.E=乙醇;S=悬浮液;SN=上清液;P=小团

[0166] 表4示出,沉淀之后的回收非常好(73-92%)。

[0167] 表5

[0168]

样品	实验条件			分离（步骤a2）				产量 (%)
	介质	溶剂	步骤a1.1 中的Theor. LA	上清液（SN）		小团（P）		
				LA	% LA-SN/ theor LA- Sa1.1	LA	% LA-P/ theor LA- Sa1.1	
8	pH 4.0	A	184080.0	11856.6	6.4	112830.4	61.3	67.7
90	pH 4.0	E	155760.0	5035.2	3.2	99146.6	63.7	66.9
10	pH 4.0	A	184080.0	8778.9	4.8	108734.7	59.1	63.8
11	pH 4.0	E	155760.0	5097.9	3.3	88019.7	56.5	59.8
12	pH 7.0	A	184080.0	10535.3	5.7	108038.6	58.7	64.4
13	pH 7.0	E	155760.0	11340.9	7.3	86636.2	55.6	62.9

[0169] LA=脂肪酶活性(IU USP);A=丙酮.E=乙醇;S=悬浮液;SN=上清液;P=小团;
Theor.=理论。

[0170] 对0.3g/mL胰脂肪酶浓度执行的多步法的小团产量在从约56到约64的范围。

[0171] 表6

[0172]

样品	实验条件		分离 (步骤a2)		EF
	介质	溶剂	上清液 (SN)	小团 (P)	
			LSA	LSA	
8	pH 4.0	A	6.2	197.9	2.1
9	pH 4.0	E	5.3	250.4	2.7
10	pH 4.0	A	7.5	284.6	3.0
11	pH 4.0	E	5.5	185.7	2.0
12	pH 7.0	A	8.4	248.9	2.6
13	pH 7.0	E	11.1	180.9	1.9

[0173] LSA=脂肪酶比活性 (IU USP/mg) ;A=丙酮。E=乙醇;SN=上清液;EF=富集系数=在步骤a2的小团中的LSA (IU USP/mg) /在步骤a1.1中的理论脂肪酶活性 (IU USP/mg)。

[0174] 通过计算步骤a2的小团的脂肪酶活性和步骤a1.1的起始胰脂肪酶的脂肪酶活性 (其为94.4IU/mg) 之间的比率确定富集系数。富集系数在从1.9到3.0的范围。

[0175] 实施例3: 两步法

[0176] HA-胰酶的制备;0.1g/mL;两步:悬浮、沉淀 (SP=38:丙酮:水性溶剂=35:65;乙醇:水性溶剂=45:55,其中SP (丙酮)=20.2,SP (乙醇)=26.0,SP (缓冲剂)=47.9)

[0177] 步骤a1.1-悬浮:在4℃将胰脂肪酶以0.1g/mL的浓度分散在水性溶剂中,并在搅拌下保持30分钟。在实验室规模使用650mg (当有机溶剂是丙酮时) 或550mg (当有机溶剂是乙醇时) 的起始胰脂肪酶执行实验。在不同水性溶剂中各自运行两个实验:1) pH=4.0,10mM乙酸盐缓冲剂;2) pH=7.0,10mM磷酸盐缓冲剂。

[0178] 步骤a1.2-沉淀:将有机溶剂加入到步骤a1.1的悬浮液中,并将这个混合物在4℃保持15分钟。所述有机溶剂是丙酮或乙醇。以每65份 (体积) 水性溶剂35份 (体积) 的量加入丙酮。以每55份 (体积) 水性溶剂45份 (体积) 的量加入乙醇。

[0179] 步骤a2-分离:离心混合物 (10分钟,4℃,约11,000g) 以将上清液从小团分离,所述小团包含胰脂肪酶酶。将小团重新悬浮在起始水性溶剂中 (在重新悬浮、分离之后的小团中的LA)。

[0180] 分析不同步骤的材料。在整个过程中检测胰脂肪酶的量,将其表示为脂肪酶活性:

[0181] -在步骤a1.1的悬浮液中 (悬浮液中的LA;LA-Sa1.1);

[0182] -在步骤a2获得的上清液中 (在分离SN中的LA,LA-SN)

[0183] -在步骤a2获得的并随后重新悬浮在起始介质的小团中 (在沉淀小团中的LA,LA-P)。

[0184] 在表7、8、9中报告结果。

[0185] 表7

[0186]

样品	实验条件		悬浮液 (步骤a1.1)	分离（步骤a2）				产量 (%)
	介质	溶剂	LA (Sa1.1)	上清液（SN）		小团（P）		
				LA	% LA-SN/ LA-Sa1.1	LA	% LA-P/ LA-Sa1.1	
14	pH 4.0	A	48960.7	4688.0	9.6	45021.4	92.0	101.5
15	pH 4.0	E	41428.3	1394.3	3.4	40656.7	98.1	101.5
16	pH 7.0	A	56936.9	4750.9	8.3	46955.0	82.5	90.8
17	pH 7.0	E	48177.4	2316.1	4.8	41808.2	86.8	91.6

[0187] LA=脂肪酶活性 (IU USP); A=丙酮. E=乙醇; S=悬浮液; SN=上清液; P=小团。

[0188] 沉淀后的回收高, 使用两步法几乎达到完全回收。

[0189] 表8

[0190]

样品	实验条件			分离（步骤a2）				
	介质	溶剂	Theor. LA 步骤 1a	上清液（SN）		小团（P）		产量 (%)
				LA	% LA-SN/ theor SL-S1a	LA	% LA-P/ theor LA-S1a	
14	pH 4.0	A	61605.4	4688.0	7.6	45021.4	73.1	80.7
15	pH 4.0	E	51940.8	1394.3	2.7	40656.7	78.3	81.0
16	pH 7.0	A	61421.4	4750.9	7.7	46955.0	76.4	84.2
17	pH 7.0	E	51971.9	2316.1	4.5	41808.2	80.4	84.9

[0191] LA=脂肪酶活性 (IU USP); A=丙酮. E=乙醇; S=悬浮液; SN=上清液; P=小团; Theor.=理论。

[0192] 小团的方法产量在从73.1到80.4的范围, 高于使用多步法获得的。产量%是在步骤a2的小团和上清液中的总脂肪酶活性相对在步骤a1.1中使用的胰脂肪酶的理论脂肪酶活性, 所述理论脂肪酶活性是通过包括起始材料的比活性 (即如根据药典USP方法确定的94.4IU USP/mg) 及其初始重量的因素计算的。

[0193] 表9

[0194]

样品	实验条件		分离 (步骤a2)		EF
	介质	溶剂	上清液 (SN)	小团 (P)	
			LSA	LSA	
14	pH 4.0	A	10.1	247.4	2.6
15	pH 4.0	E	4.0	204.3	2.2
16	pH 7.0	A	10.1	276.2	2.9
17	pH 7.0	E	6.7	193.6	2.1

[0195] LSA=脂肪酶比活性(IU USP/mg);A=丙酮。E=乙醇;SN=上清液;EF=富集系数=在步骤a2的小团中的LSA(IU USP/mg)/在步骤a1.1中的理论脂肪酶活性(IU USP/mg)。

[0196] 结果显示,在两步法中使用pH=7的水性缓冲剂和丙酮提供有益的产量(小团的方法产量约76%)且富集系数在从2.1到2.9的范围。

[0197] 实施例4:两步法

[0198] HA胰酶的制备;0.1g/mL;两步:悬浮、沉淀;小型(pilot)(SP=38:丙酮:水性溶剂=35:65)

[0199] 步骤a1.1-悬浮:在4℃将6.5g起始胰脂肪酶(61,400U脂肪酶)分散在45mL的pH=7.0的缓冲溶液中(10mM磷酸盐缓冲剂),并每循环搅拌(Ultraturrax,3个循环)1分钟,将搅拌器用10mL冷缓冲剂洗涤两次以回收剩余的胰脂肪酶。

[0200] 步骤a1.2-沉淀:将35mL丙酮加入到步骤a1.1的悬浮液中,并将这个混合物以静止状态在4℃保持30分钟。

[0201] 步骤a2-分离:离心混合物(10分钟,4℃,约2,700g)以将上清液从小团分离,所述小团包含胰腺酶。

[0202] 步骤a3-干燥:根据两种不同方案干燥小团,干燥后的小团的平均重量是1.55g,脂肪酶活性(LA)是365,000IU脂肪酶,比活性(LSA)是235IU USP/mg。

[0203] 表10报告了对使用两种方案获得的每种材料测量的脂肪酶(L)、蛋白酶(P)及淀粉酶(A)比活性。还在干燥处理前测量在小团中的脂肪酶活性(在将其悬浮在1mL缓冲剂之后测量);其等于233.7IU USP/mg。

[0204] 表10

[0205]

样品	方案	LSA	PSA	ASA	P/L 比率	A/L 比率	水含量 (%)
18	72 h 6-8° C 0.2 mbar	234.2	226.5	149.5	0.97	0.64	7.4
19	72 h 6-8° C 0.2 mbar	254.0	217.7	130.7	0.86	0.51	6.5
20	24 h 6-8° C 0.2 mbar	216.3	230.1	129.8	1.06	0.60	7.4
平均值		234.8	224.8	136.7	0.96	0.58	7.10
Ds		18.9	6.4	11.1			
cv%		8%	3%	8%			

[0206] LSA=脂肪酶比活性(IU USP/mg);PSA=蛋白酶比活性(IU USP/mg);ASA=淀粉酶比活性(IU USP/mg)。

[0207] 分析显示,干燥过程自身不影响LSA且不同方案得到具有相同的酶活性的材料。如在先实施例那样计算的富集系数也总是大于2,且在不同的方案之间恒定。其为:2.5(样品18)、2.7(样品19)、2.3(样品20),平均值为2.5。在干燥处理前测量的小团中的脂肪酶活性,等于233.7IU USP/mg(样品18)。

[0208] 表11

[0209]

样品	W 起始 容器	W 小团	初始的 LA	初始的 PA	初始的 AA	回收的 LA	回收的 PA	回收的 AA	L Y	P Y	A Y
18	6.5113	1.5325	614666.7	1648661.2	2736699.4	358911.5	347111.3	229108.8	58	21	8
20	6.4997	1.7084	613571.7	1645724.0	2731823.9	369526.9	393102.8	221750.3	60	24	8
19	6.5137	1.3673	614893.3	1649268.8	2737708.1	347294.2	297661.2	178706.1	56	18	7

[0210] L=脂肪酶;P=蛋白酶;A=淀粉酶;A=活性;Y=产量(%);W=重量(g),对于干燥后测量的小团。

[0211] 使用不同方案获得的HPLC曲线是可叠加的;没有观察到起始材料的HPLC曲线的相关定性差异。

[0212] 实施例5:两步法

[0213] HA胰酶的制备;0.1g/mL;两步:悬浮、沉淀;扩大规模(SP=38:乙醇:水性溶剂(pH=7)=45:55,样品21);(SP=34:丙酮:水性溶剂(pH=7)=50:50样品22);(SP=35:丙酮:水性溶剂(pH=7)=45:55,样品23)。对不同量的起始胰脂肪酶、不同体积的缓冲溶液和不同体积的丙酮(SP=34或35)或体积的乙醇(SP=38)实行实施例4的制备过程。干燥方案为24小时,6-8℃,0.2mbar,所有其它参数和条件与实施例4相同。

[0214] 表12

[0215]

样品		胰脂肪酶(g)	缓冲剂(mL)	丙酮(mL)	乙醇(mL)
21	38	5.5	55	无	45
22	34	5.0	50	50	无
23	35	5.5	55	45	无

[0216] 在表13、14中报告结果。

[0217] 表13

[0218]

样品	LSA	PSA	ASA	P/L比率	A/L比率
21	150.2	-	-	-	-
22	123.3	351.7	436.0	2.85	3.54
23	158.7	388.9	241.9	2.45	1.52

[0219] LSA=脂肪酶比活性(IU USP/mg);PSA=蛋白酶比活性(IU USP/mg);ASA=淀粉酶比活性(IU USP/mg)。

[0220] 如在先实施例中的那样计算的富集系数是:1.6(样品21)、1.3(样品22)、1.7(样品23)。

[0221] 表14显示使用在此施加的扩大规模的方法获得的最终的纯化的材料的酶活性以及酶产量。

[0222] 表14

[0223]

样品	W 起始 容器	W 小团	初始的 LA	初始的 PA	初始的 AA	回收的 LA	回收的 PA	回收的 AA	L Y	P Y	A Y
21	5.5197	1.6826	514988.0	-	-	252390.0	-	-	49	-	-
22	5.5183	2.0255	520927.5	1397233.6	2319341.5	321446.9	787717.0	489968.5	62	56	21
23	4.9986	2.7464	471867.8	1265645.5	2100911.6	338631.1	965908.9	1197430.4	72	76	57

[0224] L=脂肪酶;P=蛋白酶;A=淀粉酶;A=活性;Y=产量(%);W=重量(g),对于干燥后测量的小团。

[0225] 没有观察到起始材料的HPLC曲线的相关定性差异。

[0226] 使用不同方案获得的样品22和23表现出比使用方案(SP=38)生产的样品20更低的比LA和更高的PA和AA。

[0227] 实施例6:单步法

[0228] HA-胰酶的制备;0.065和0.1g/mL;单步;实验室规模;(SP=38-丙酮:水性溶剂=35:65)

[0229] 步骤a1.1-悬浮-沉淀:在4℃在搅拌下将650mg(样品24)或1000mg(样品25)的天然胰脂肪酶分散在10mL的65:35的缓冲剂(pH=7.10mM磷酸盐)和丙酮的混合物(65体积的缓冲剂和35体积的丙酮)中60分钟。

[0230] 步骤a2-分离:离心步骤a1的混合物(10分钟,4℃,10,000g)以将上清液从小团分离,所述小团包含胰腺酶。

[0231] 步骤a3-干燥:使用高效泵在0.2mbar干燥小团。

[0232] 分析材料。在整个过程中测量胰脂肪酶的量,表示为脂肪酶活性:

[0233] -在步骤a2获得的上清液中(在分离SN中的LA,LA-SN)

[0234] -在步骤a2获得的并随后重新悬浮在起始介质的小团中(在沉淀小团中的LA,LA-P)。

[0235] -悬浮-沉淀步骤a1的LA(悬浮液中的LA;LA-SN)在表15和16中报告结果。

[0236] 表15

样品	实验条件			分离(步骤a2)				
	介质	溶剂	Theor. 起始LA 步骤a1	上清液(SN)		小团(P)		产量 (%)
				LA	% LA-SN/ theor SL-Sa1	LA	% LA-P/ theor LA-Sa1	
24	pH 7.0	A	-	2834.7	-	47807.9	-	-
25	pH 7.0	A	-	3360.4	-	71997.8	-	-

[0238] LA=脂肪酶活性(IU USP);A=丙酮;E=乙醇;S=悬浮液;SN=上清液;P=小团;Theor.=理论。

[0239] 表16

样品	实验条件		分离(步骤a2)		EF
	介质	溶剂	上清液(SN)	小团(P)	
			LSA	LSA	
24	pH 7.0	A	5.4	237.9	2.5
25	pH 7.0	A	5.7	265.7	2.8

[0241] LA=脂肪酶活性;A=丙酮.E=乙醇;SN=上清液;EF=富集系数=在步骤a2的小团中的LSA(IU USP/mg)/在天然原始材料中的脂肪酶比活性(IU USP/mg)。

[0242] 单步法提供良好的产量和富集系数。这因其实行的简单和直接而有益于工业化。

[0243] 表16a报告了使用不同悬浮-沉淀时间获得的纯化的材料的脂肪酶比活性(LSA)。

[0244] 表16a. 在不同时间的脂肪酶活性

时间 (min)	LSA	
	上清液 (SN)	小团 (P)
15	5.3	238.6
30	3.7	233.8
45	3.6	244.6
60	4.4	264.3

[0246] LSA=脂肪酶比活性 (IU USP/mg) ; SN=上清液; P=小团。

[0247] 表16b. 脂肪酶比活性, 不同方法的比较。

样品	方法	LSA	
		上清液 (SN)	小团(P)
16	两步法	10.1	276.2
24	单步法	5.4	237.9
25	单步法	5.7	265.7

[0249] LSA=脂肪酶比活性 (IU USP/mg) ; SN=上清液; P=小团。

[0250] 数据显示, 使用的方法自身不影响相之间的脂肪酶分配。

[0251] 实施例7: 单步法

[0252] HA胰酶的制备; 0.1g/mL; 单步; 小型规模; (SP=38-丙酮: 水性溶剂=35:65)。

[0253] 步骤a1-悬浮-沉淀: 在4℃在搅拌下将10g天然胰脂肪酶分散在100mL的缓冲剂 (pH=7, 10mM磷酸盐) 和丙酮的溶剂混合物 (65体积的缓冲剂和35体积的丙酮) 中60分钟。

[0254] 步骤a2-分离: 离心步骤a1的混合物 (10分钟, 4℃, 2,700g) 以将上清液从小团分离, 所述小团包含胰腺酶。

[0255] 步骤a3-干燥: 将样品26中的小团倒入培养皿中, 而将样品27和28的小团保留在离心管中并使用高效泵在0.2mbar直接干燥。

[0256] 分析材料。测量以下中的胰脂肪酶的量, 表示为脂肪酶活性:

[0257] -在步骤a2中获得并根据步骤a3干燥的小团-

[0258] 在表17和18中报告结果。

[0259] 表17

[0260]

样品	LSA	PSA	ASA	P/L比率	A/L比率
----	-----	-----	-----	-------	-------

26	207.8	249.4	155.2	1.20	0.75
27	222.7	249.2	158.9	1.12	0.71
28	219.1	285.0	167.5	1.30	0.76

[0264] LSA=脂肪酶比活性(IU USP/mg);PSA=蛋白酶比活性(IU USP/mg);ASA=淀粉酶比活性(IU USP/mg)。

[0262] 在脂肪酶、蛋白酶、淀粉酶活性方面获得了良好的再现性。

[0263] 表18

样品	W 起始 容器	W 小团	LY	PY	AY
26	10.02	3.94	87	39	15
27	10.01	4.22	100	42	16
28	10.02	4.28	99	48	17

[0265] L=脂肪酶;P=蛋白酶;A=淀粉酶;A=活性;Y=产量(%);W=重量(g),对于干燥后测量的小团。

[0266] 获得了非常高的脂肪酶产量,及高的富集系数(高于2)。例如,富集系数是2.2(样品26)、2.4(样品27)、2.3(样品28)。

[0267] 单步法提供良好产量。获得了4.2g HA-胰酶(起始胰脂肪酶的42%),脂肪酶的总单位是940,000IU USP(初始LA的99-100%)。考虑27和28之间的平均值,获得的HA-胰酶具有221IU USP/mg的比活性。

[0268] 使用不同方案获得的样品26-28的HPLC、SDS-Page曲线和UV光谱是可叠加的。没有观察到起始材料的HPLC曲线的相关定性差异。

[0269] 表18a

样品	规模	方法	LSA	
			上清液 (SN)	小团(P)
25	实验室 规模	单步法	5.7	265.7
29	小型规模	单步法	6.2	250.1

[0271] LSA=脂肪酶比活性(IU USP/mg);SN=上清液;P=小团。

[0272] 表18a的数据显示,规模不影响相间脂肪酶分配和方法结果可相应放大规模。

[0273] 使用在表18b中列出的不同胰脂肪酶原始材料评估单步法的再现性。

[0274] 表18b.胰酶原始材料

[0275]

原始材料 编码	起始 LSA (IU USP/mg)
005	94.4
005A	81.1
005B	85.5
004	70.4
008	99.6

[0276] LSA=脂肪酶比活性 (IU USP/mg)。

[0277] 表18c. 单步法再现性

[0278]

	起始原始材料编码									
	005		005A		005B		004		008	
	天然	样品 27	天然	样品 30	天然	样品 31	天然	样品 32	天然	样品 33
LSA	94.4	222.7	81.1	168.1	85.5	184.3	70.4	145.9	99.6	227.2
EF	NA	2.4	NA	2.1	NA	2.2	NA	2.1	NA	2.3
LY	NA	99.5	NA	89.1	NA	88.4	NA	82.9	NA	82.1

[0279] LSA=脂肪酶比活性 (IU USP/mg) ; EF=富集系数=在步骤a2的小团中的LSA (IU USP/mg) /在天然原始材料中的脂肪酶活性 (IU USP/mg) ; LY=脂肪酶产量 (%)。

[0280] 表18c的数据显示,从富集系数的角度具有不同起始LSA的天然原始材料不影响纯化处理的结果,且获得了良好的产量。

[0281] 实施例8:比较性实施例

[0282] HA-胰酶的制备;0.1g/mL;悬浮、沉淀、分离;比较性实施例 (SP=38-丙酮:水=35:65)。

[0283] 步骤1-悬浮:在4℃在搅拌下将胰脂肪酶以0.045g/mL的浓度(样品29)分散在水性溶剂(蒸馏水)中约30分钟。

[0284] 步骤2-沉淀:将80mL的溶剂混合物(丙酮:水=35:45)加入到20mL步骤a1.1的悬浮液中(以获得SP=38 (Mpa)^{0.5}的最终溶剂混合物)。将混合物在静止状态下在25℃保持60分钟。

[0285] 步骤3-分离:离心混合物(10分钟,3,000g,25℃)以从上清液分离小团,所述小团包含胰腺酶。

[0286] 分析不同步骤的材料。在整个过程中检测胰脂肪酶的量,表示为脂肪酶活性:

[0287] -在步骤1的悬浮液中(悬浮液中的LA;LA-Sa1);

[0288] -在步骤a2获得的上清液中(在沉淀SN中的LA,LA-SN)

[0289] -在步骤a3获得的并随后重新悬浮在起始蒸馏水的小团中(在沉淀小团中的LA,LA-P)。

[0290] 在表19-20中报告结果。为了直接比较的目的,在此处报告在之前的实施例中使用的

两步和单步方法获得的结果。

[0291] 表19

[0292]

样品	实验条件			分离(步骤2)				产量 (%)
	介质	溶剂	初始的LA 步骤1	上清液(SN)		小团(P)		
				LA	% LA-SN/ SL-Sal	LA	% LA-P/ LA-Sal	
16	pH 7.0	A	56936.9	4750.9	8.3	46955.0	82.5	90.8
18	pH 7.0	A	-	2834.7	-	47807.9	-	-
19	pH 7.0	A	-	3360.4	-	71997.8	-	-
29	水	A	66313.9	7928.8	12.0	24082.9	36.3	48.3

[0293] LA=脂肪酶活性(IU USP);A=丙酮;E=乙醇;S=悬浮液;SN=上清液;P=小团;

[0294] 表20

[0295]

样品	实验条件		沉淀(步骤a2)		EF
	介质	溶剂	上清液 (SN)	小团(P)	
			LSA	LSA	
16	pH 7.0	A	10.1	276.2	2.9
18	pH 7.1	A	5.4	237.9	2.5
19	pH 7.0	A	5.7	265.7	2.8
29	水	A	9.7	27.1	0.3

[0296] LSA=脂肪酶比活性(IU USP/mg);A=丙酮.E=乙醇;SN=上清液;EF=富集系数=在步骤a2的小团中的LSA(IU USP/mg)/在天然原始材料中的脂肪酶比活性(IU USP/mg)。

[0297] 这种比较性方法提供低的产量,酶失活显著且没有获得脂肪酶的富集。

[0298] 实施例9:纯化的HA-胰酶的表征(样品20)

[0299] 测试HA材料的消化能力并将其同起始胰脂肪酶比较。将20mg HA-胰酶和50mg起始胰脂肪酶(对应2300IU USP脂肪酶)分别悬浮于1mL去离子水中并在37℃将其加入到50mL肠内制剂PEPTAMEN® Junior 1.0中,并在100rpm搅拌60、120和240分钟。在1、2和4小时后进行消化测试。对每个胰脂肪酶样品重复测试6次。

[0300] 通过测量三油精的消化(三油精峰的降低)监测脂类营养物;通过Bradford方法监测总蛋白质的消化。通过测量短链糖的形成监测淀粉水解过程。通过在4小时的消化后比较天然和HA材料的消化表现获得消化程度的差异。

[0301] 表21

[0302]	样品	W	LA	PA	AA
	N	50	4,720	12,660	21,015
	H	20	4,142	4,354	2,614
	活性差异 (%)		-12	-66	-88
	消化差异 (%)		-10	6	-33

[0303] H=HA-胰酶;N=天然胰酶;W=重量(mg)

[0304] 使用以下公式计算活性差异:

[0305] (天然胰酶活性-HA-胰酶活性)/天然胰脂肪酶活性

[0306] 使用以下公式计算消化差异:

[0307] (天然胰酶消化的%-HA-胰酶消化的%)

[0308] 这一体外测试允许对HA-胰酶的脂类、蛋白质和碳水化合物消化的分析。脂肪酶消化对反应容器中存在的酶活性的差异极其敏感,因此活性中达10%的差异对应于消化量中10%的差异。消化动力学显示相似的趋势。这些结果显示,天然和HA-胰酶具有相似的脂类消化模式。

[0309] 蛋白质消化曲线也几乎重叠,显示HA-胰酶的蛋白酶活性支持同天然胰脂肪酶水平相同的消化。蛋白酶活性上约60%的差异没有对蛋白质的消化程度产生任何影响。

[0310] 因麦芽糖产生在HA-胰酶中较低,碳水化合物的消化曲线是有差异的。在淀粉酶活性的差异和消化产物的量上的比较显示,在HA-胰酶中也发生淀粉水解。

[0311] 实施例10:单步法

[0312] HA-胰酶的制备;0.1g/mL;单步法;扩大规模(SP=38-丙酮:水性溶剂=35:65)。

[0313] 为此实施例,使用具有以下特征的天然胰脂肪酶(编码005A):脂肪酶比活性81.1IU USP/mg、蛋白酶活性284.2IU USP/mg及淀粉酶活性517.9IU USP/mg;P/L比率是3.5及A/L比率是6.4。

[0314] 步骤a1) 悬浮-沉淀:在4℃在搅拌下将100g天然胰脂肪酶分散在1L的缓冲剂(pH=7,10mM磷酸盐)和丙酮的溶剂混合物(65体积缓冲剂和35体积丙酮)中60分钟。

[0315] 步骤a2) 分离:离心步骤a1的混合物(15min,2,700g,4℃)以将上清液从小团分离,所述小团包含胰腺酶。

[0316] 步骤a3) 干燥:使用高效泵在0.2mbar干燥小团。

[0317] 分析材料。表22报告对使用不同规模获得的样品测量的脂肪酶(L)比活性。

[0318] 表22

[0319]

样品	规模	LSA	LY	EF
34	小型	168.1	89	2.1
35	扩大	176.2	81	22
36	扩大	169.5	81	2.1

[0320] LSA=脂肪酶比活性(IU USP/mg);EF=富集系数=在步骤a2的小团中的LSA(IU USP/mg)/在天然原始材料中的脂肪酶活性(IU USP/mg);LY=脂肪酶产量(%)。

[0321] 表22示出使用在此施行的扩大规模方法获得的最终纯化材料的脂肪酶活性。这种规模下的结果与小型规模的一致。

[0322] 表23

[0323]

样品	LSA	PSA	ASA	P/L比率	A/L比率
35	176.2	260.3	169.2	1.48	0.96
36	169.5	265.0	179.6	1.56	1.06

[0324] LSA=脂肪酶比活性(IU USP/mg);PSA=蛋白酶比活性(IU USP/mg);ASA=淀粉酶比活性(IUUSP/mg)。

[0325] 在脂肪酶、蛋白酶、淀粉酶活性方面获得良好的再现性。

[0326] 实施例11:双沉淀法

[0327] HA-胰酶的制备:0.1g/mL;双沉淀;小型规模(SP(a1.1)=38-丙酮:水性溶剂=35:65;SP(a1.3)=36)。

[0328] 使用具有以下特征天然胰脂肪酶(编码005A):脂肪酶比活性81.1IU USP/mg、蛋白酶活性284.2IU USP/mg及淀粉酶活性517.9IU USP/mg;P/L比率是3.5及A/L比率是6.4。

[0329] 步骤a1.1-悬浮-沉淀:在4℃在搅拌下将10g天然胰脂肪酶分散在100mL的缓冲剂(pH=7,10mM磷酸盐)和丙酮的溶剂混合物(65体积缓冲剂和35体积丙酮)中60分钟。

[0330] 步骤a1.2-分离:离心步骤a1的混合物(10min,2,700g,4℃)以从小团分离上清液,所述小团包含胰腺酶。

[0331] 步骤a3.1-干燥:使用高效泵在0.2mbar干燥小团。

[0332] 步骤a1.3-沉淀:在4℃在搅拌下将丙酮添加到步骤a1.2的上清液(以达到36的SP)中60分钟。

[0333] 步骤a2-分离:离心步骤a4的混合物(10min,2,700g,4℃)以从小团分离上清液,所述小团包含胰腺酶。

[0334] 步骤a3.2-干燥:使用高效泵在0.2mbar干燥小团。

[0335] 步骤a4-混合:将来自步骤a3.1和a3.2的干燥的小团混合在一起。

[0336] 分析材料。表24报告对每个样品测量的脂肪酶(L)、蛋白酶(P)和淀粉酶(A)比活性。

[0337] 表24

[0338]

样品	LSA	PSA	ASA	LY	PY	AY
37	175.6	264.7	202.3	90	39	16
38	9.3	573.1	555.9	1	21	11
39	145.6	337.8	275.3	91	60	27

[0339] LSA=脂肪酶比活性(IU USP/mg);PSA=蛋白酶比活性(IU USP/mg);ASA=淀粉酶比活性(IUUSP/mg);L=脂肪酶;P=蛋白酶;A=淀粉酶;A=活性;Y=产量(%)。

[0340] 实施例12:双沉淀法

[0341] HA-胰酶的制备:0.1g/mL;双沉淀;扩大规模(SP(a1.1)=38-丙酮:水性溶剂=35:65;SP(a1.3)=36)。

[0342] 使用具有以下特征的天然胰脂肪酶：脂肪酶活性128.7IU USP/mg、蛋白酶活性324.6IU USP/mg及淀粉酶活性408.0IU USP/mg；P/L比率是2.5及A/L比率是3.2。

[0343] 步骤a1.1-悬浮-沉淀：在4℃在搅拌下将100g天然胰脂肪酶分散在1L的缓冲剂（pH=7，10mM磷酸盐）和丙酮的溶剂混合物（65体积缓冲剂和35体积丙酮）中60分钟。

[0344] 步骤a1.2-分离：离心步骤a1的混合物（15min，2,700g，4℃）以从小团分离上清液，所述小团包含胰腺酶。

[0345] 步骤a3.1-干燥：使用高效泵在0.2mbar干燥小团。

[0346] 步骤a1.3-二次沉淀：在4℃静止状态下将丙酮添加到步骤a1.2的上清液中（36的SP）120或180分钟。

[0347] 步骤a2-分离：离心步骤a1.3的混合物（15min，2,700g，4℃）以从小团分离上清液，所述小团包含胰腺酶。

[0348] 步骤a3.2-干燥：使用高效泵在0.2mbar干燥小团。

[0349] 步骤a4-混合：将来自步骤a3.1和a3.2的干燥的小团混合在一起。

[0350] 分析材料。表25报告对每个样品测量的脂肪酶（L）、蛋白酶（P）和淀粉酶（A）比活性。

[0351] 表25

样品	步骤	沉淀时间 (min)	LSA	PSA	ASA	LY	PY	AY
40	a1.1	60	282.0	274.7	174.1	81	31	16
41	A1.3	120	90.4	544.0	371.0	5	11	6
42	A1.3	180	118.6	496.1	251.7	4	7	3

[0353] LSA=脂肪酶比活性（IU USP/mg）；PSA=蛋白酶比活性（IU USP/mg）；ASA=淀粉酶比活性（IU USP/mg）；L=脂肪酶；P=蛋白酶；A=淀粉酶；A=活性；Y=产量（%）。

[0354] 实施例13：单步法

[0355] HA胰酶的制备：0.1g/mL；单步法；小型规模（SP=36-丙酮：水性溶剂=43：57）

[0356] 对此实施例使用了具有以下特征的天然胰脂肪酶：脂肪酶活性85.5IU USP/mg、蛋白酶活性337.8IU USP/mg及淀粉酶活性434.0IU USP/mg；P/L比率是2.5及A/L比率是3.2。

[0357] 步骤a1-悬浮-沉淀：在4℃在搅拌下将10 g天然胰脂肪酶分散在100mL的缓冲剂（pH=7，10mM磷酸盐）和丙酮的溶剂混合物（57体积缓冲剂和43体积丙酮）中60分钟。

[0358] 步骤a2-分离：离心步骤a1的混合物（10min，2,700g，4℃）以从小团分离上清液，所述小团包含胰腺酶。

[0359] 步骤a3)-干燥：使用高效泵在0.2mbar干燥步骤a2的小团。

[0360] 分析材料。测量来自步骤a3的小团中的胰脂肪酶的量，表示为脂肪酶活性。

[0361] 表26

[0362]

样品	LSA	LY	EF
43	149.0	83	1.7
31	184.3	88	22

[0363] LSA=脂肪酶比活性(IU USP/mg);L=脂肪酶=;Y=产量(%);EF=富集系数=在步骤a2的小团中的LSA(IU USP/mg)/在天然原始材料中的脂肪酶活性(IU USP/mg)。

[0364] 在表26中报告的结果显示,SP=38产生良好的结果。

[0365] 实施例14:单步法

[0366] HA-胰酶的制备:0.1g/mL;单步法;小型规模(SP=38-异丙醇:水性溶剂=40:60)

[0367] 步骤a1-悬浮-沉淀:在4℃在搅拌下将10g天然胰脂肪酶分散在100mL的缓冲剂(pH=7,10mM磷酸盐)和异丙醇的溶剂混合物(60体积缓冲剂和40体积异丙醇)中60分钟。

[0368] 步骤a2-分离:离心步骤a1的混合物(10min,2,700g,4℃)以从小团分离上清液,所述小团包含胰腺酶。

[0369] 步骤a3)-干燥:使用高效泵在0.2mbar干燥步骤a2的小团。

[0370] 表27

[0371]

样品	LSA	EF	ASA
44	162.0	1.8	200.7
27	222.7	2.4	158.9

[0372] LSA=脂肪酶比活性(IU USP/mg);ASA=淀粉酶比活性(IU USP/mg);EF=富集系数=在步骤a2的小团中的LSA(IU USP/mg)/在天然原始材料中的脂肪酶活性(IU USP/mg)。

[0373] 在表27中报告的结果显示,丙酮沉淀相比异丙醇在脂肪酶活性和增强方面产生更好的结果。

[0374] 实施例15:硫酸铵沉淀

[0375] 通过在冷的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中分散至40mg/mL浓度来制备胰酶的水溶性提取物。将分散液在冰上培育并不时搅拌,并随后在16,000xg离心5分钟。将包含溶解的胰酶的上清液滗出。上清液在UV中强吸光,具有在259nm的吸光度峰值,指示溶解的核酸的存在(图1)。

[0376] 随后将上清液同饱和硫酸铵混合至约60%饱和硫酸铵的终浓度。通过离心回收产生的沉淀并溶解于磷酸盐缓冲盐水(PBS)中。再溶解的沉淀的适当稀释物的UV光谱在图2B中示出。在280nm的峰是蛋白质溶液典型的。上清液具有在260nm的峰,该峰是溶解的核酸典型的。浓度和吸光度的值的比较(图1和图2)指示,在260nm区域吸光的材料的约60-90%被移除。光谱的位置和形状与蛋白质和/或肽成分的富集一致。包含不被硫酸铵沉淀的材料的上清液(图2A)具有1.7的260nm/280nm吸光度比率,相比于水溶性胰酶提取物的1.4的260nm/280nm吸光度比率(图1)。这种260nm/280nm比率的增加与材料中DNA和/或RNA的富集一致,所述材料不被硫酸铵所沉淀。

[0377] 不受特定理论的限制,这些结果显示,硫酸铵沉淀从胰酶的蛋白质成分中移除质量的DNA/RNA材料,所述胰酶的蛋白质成分即包含淀粉酶、脂肪酶和蛋白酶的级分。

[0378] 用60%饱和硫酸铵溶液洗涤收集自硫酸铵沉淀的小团。光谱显示在洗涤沉淀后峰从272nm移位到275nm(图3),指示吸光度峰在260nm的材料的一步移除。

[0379] 溶液的蛋白质浓度可以基于其在280nm的吸光度估算。蛋白质测定(使用牛血清白蛋白作为标准物)确定,在280nm的1.0吸光度(路径长度1cm)的溶液对应于0.19mg/mL的蛋白质。

[0380] 胰酶原始提取物包含40mg/mL,将其0.5mL同0.75mL饱和硫酸铵如实验部分描述的混合以形成沉淀。随后将这一沉淀重新溶解在1mL PBS中。测量在1.2mL PBS中稀释的重新溶解的沉淀的5μL溶液的吸光度。图3示出未洗涤和洗涤的硫酸铵沉淀的光谱,稀释后(1/240)在280nm记录的吸光度的值分别为约0.085和0.075(1cm路径长度)。

[0381] 因为1.0的吸光度对应0.19mg/mL蛋白,未洗涤的小团具有3.9mg/mL (240x 0.085x 0.19)的蛋白质浓度,及洗涤过的小团具有3.4mg/mL的蛋白质浓度。由于通过纯化方法获取了20mg的材料(0.5mL的包含40mg/mL的溶液),这表示纯化了约20/3.9=5倍。确定在蛋白质富集的沉淀中的脂肪酶和淀粉酶活性。如在表28和29中所见的,在未洗涤的小团中回收了平均81%的脂肪酶活性和83%的淀粉酶活性。用60%的硫酸铵洗涤小团减少脂肪酶回收到68%。这些百分数是对原始胰脂肪酶的水溶性级分中的活性水平标准化。

[0382] 表28

[0383]

未洗涤的小团				洗涤的小团				注释
回收, %		UV峰, nm	回收, %		UV峰, nm			
脂肪酶	UV		脂肪酶	UV				
104	37	272.0						
60								
103								
72								
163							1	
75	32	274.0	68	24	276.7			
				27	275.3		2	
			73	25	275.6			
			69					
65	33	270.0	60	30	274.0			
70	28	273.0						
80							3	
83							3	
72							3	
75			88					
108								
73							4	
87							4	
平均值	81	33	272.3	72	27	275.4		
标准偏差	17	3.7	1.7	10.3	2.6	1.1		

[0384] 脂肪酶测定是与提取物比较的回收

[0385] UV材料是来自245-325nm的积分面积(integrated area)并是与提取物比较的回收

[0386] 峰值是硫酸铵级分的UV峰

[0387] 在提取的5小时内测定脂肪酶

[0388] 1.脂肪酶>>100%,剔除数据

[0389] 2.酶标仪故障,当天没有酶测定。

[0390] 3.数据没有被包含在平均值内。将小团以比通常的更浓缩的体积重新悬浮,回收体积显著大于通常。

[0391] 4.实施体积校正,将小团以比通常的更浓缩的体积重新悬浮。

[0392] 表29

硫酸铵级分的淀粉酶活性 与提取物比较的回收%			
		未洗涤的小团	洗涤的小团
[0393]		124	
		53	
		83	
		84	82
		78	
		75	
	平均值	83	
	标准偏差	23	

[0394] 在以每毫克基础确定小团活性之前,使用适当的柱将沉淀脱盐。实施凝胶过滤色谱法以脱盐硫酸铵沉淀产物。将未洗涤的硫酸铵小团重新悬浮于两倍体积的PBS缓冲剂中,并将0.5mL产生的悬浮液施加到G-25Sephadex柱上并通过重力洗脱。硫酸铵级分的洗脱曲线呈现在图4中。级分4-8在280nm表现出吸光,指示了蛋白质的存在。测量脂肪酶活性的甲基伞形酮测定也在级分4-8表现出活性。

[0395] 之后洗脱的材料(级分10,图5,在水中1比20稀释,在1cm比色皿中扫描)具有260nm的最大吸光度,与DNA的吸光度曲线一致。这显示,除脱盐以外,G-25柱能够被用于移除260nm UV材料(如,DNA)的残留的量。

[0396] 实施例16:硫酸铵沉淀

[0397] 脱盐还能够通过使用G-25sephadex旋转柱进行。无需浓缩脱盐的材料就能够完成干重的回收。

[0398] 如在以上实施例中描述的那样制备60%饱和硫酸铵级分,将硫酸铵小团重新悬浮在一倍体积的PBS缓冲剂中(与提取物相比)。通过两个G-25sephadex旋转柱对硫酸铵级分的部分脱盐,所述G-25sephadex离心柱如前所述的在水中平衡。一mL的脱盐材料(相当于37mg的胰酶)使用2体积的异丙醇沉淀以帮助随后的干燥并在16K离心5分钟。移除上清液并将小团在室温过夜风干,并回收到7.9mg的固体。

[0399] 在异丙醇沉淀期间观察到约17%的UV吸收材料的损失。如果UV吸收材料代表相当于在小团中的蛋白质质量的蛋白质质量,则校正其将表示,脱盐的材料包含9.5mg的固体。这表示胰酶起始材料的 $37/9.5=3.9$ 倍浓缩。对于提取物,假设脂肪酶和淀粉酶的活性是78%和83%(表28和29),则这表示对于脂肪酶和淀粉酶比活性增长约3。已经观察到,在提取过程中90%的脂肪酶活性被回收,因此比活性的增加应是2.7倍。然而,回收材料的干燥是不完全的,在进一步的干燥中期待比活性的进一步增加。

[0400] 使用更高热度的额外的干燥进行干重确认的重复。如在以上描述的那样制备60%饱和硫酸铵级分,将硫酸铵小团重新悬浮在一倍体积的PBS缓冲剂中(与提取物相比)。通过两个G-25sephadex旋转柱对硫酸铵级分的部分脱盐,所述G-25sephadex旋转柱如在实验部分描述的在水中平衡。一mL的脱盐材料(相当于37.5mg的胰酶)使用2体积的异丙醇沉淀以帮助随后的干燥并在16K离心5分钟。移除上清液并将小团在80℃过夜风干;并回收到4.6mg的固体。

[0401] 在异丙醇沉淀期间观察到约17%的UV吸收材料的损失。如果UV吸收材料代表相当于在小团中的蛋白质质量的蛋白质质量,则校正其将表示,脱盐的材料包含5.4mg的固体。这表示胰酶起始材料的 $37.5/5.4=7$ 倍浓缩。对于提取物,脂肪酶和淀粉酶的活性是74%和78%。这表示对于脂肪酶和淀粉酶比活性增长约5。已经观察到,在提取过程中90%的脂肪酶活性被回收,因此比活性的增加应是4.5倍。

[0402] 在用PBS平衡的柱中的脂肪酶回收是87-103%,而在用水平衡的柱中的脂肪酶回收是52-72%,表示,相比水当用PBS平衡柱时保留了更大的酶活性。

[0403] 更长的柱运行时间也表现出蛋白质的自发水解迹象,可能由于存在的蛋白酶。这可以通过加入蛋白酶抑制剂或通过调节诸如pH和温度的条件而减弱。

[0404] 优选添加成分以在处理期间稳定蛋白质,所述处理包括最终的干燥步骤。这些稳定剂可以包括盐、碳水化合物、抗氧化剂、聚合物和蛋白酶抑制剂诸如EDTA和大豆胰蛋白酶抑制剂。5mM磷酸盐缓冲为pH=7.4的盐溶液,将起到保持pH和可能地结合钙离子的功能,这将抑制蛋白质水解。发现异丙醇沉淀之后的最终干燥步骤导致脂肪酶活性的显著降低。可能优选冷冻干燥最终材料。

[0405] 实施例17:硫酸铵沉淀

[0406] 在4℃在台式离心机中如在以上描述的那样进行硫酸铵提取和沉淀。如之前在实施例中描述的那样将产生的固体在G-25 Sephadex旋转柱中脱盐。将0.5mL重新悬浮的沉淀上样到4.5mL的G-25柱上。假设所有的胰酶被硫酸铵沉淀,估计重新悬浮的沉淀应包含16mg的胰酶。图6示出每个级分中的脂肪酶、淀粉酶和胰蛋白酶活性,以及以mg计的回收材料的重量。在提取、使用硫酸铵的沉淀和通过G-25柱脱盐之后,在级分4和5中回收约5mg的固体。这产生计算结果:在级分4和5中,相较原始胰酶水性悬浮液/溶液,脂肪酶比活性增加约3倍、淀粉酶活性增加约1.7倍及胰蛋白酶活性增加约2倍。

[0407] 当在两个脱盐柱上进行脱盐时,以来自于33.3mg起始材料的13.4g材料,脂肪酶的比活性增加约1.2倍,及淀粉酶的比活性增加约1.5倍。不受特定理论的限制,这种活性的减少可以是由于延长处理时间的延长脱盐处理造成的重要的稳定性盐的移除。

[0408] 仅为了清楚的理解提供了前述的详细描述,且因修改对于本领域技术人员是明显的,不应从其理解不必要的限制。虽然本发明已经以与其具体实施方案相联系的方式描述,应理解其能够进一步修改且本申请意图覆盖本发明的任何变形、用途或调整,所述本发明的任何变形、用途或调整在总体上遵循本发明的原则,且包括从本公开内容的偏离,所述偏离如在本发明从属的领域已知或惯用实践内的,和如可以被应用于在上文中陈述的基本特征以及如遵循附加的权利要求的范围的。本文引用的每个和所有的专利、专利申请和出版物的公开内容,包括权利要求、附图和/或绘图在此通过引用将其完整并入本文。

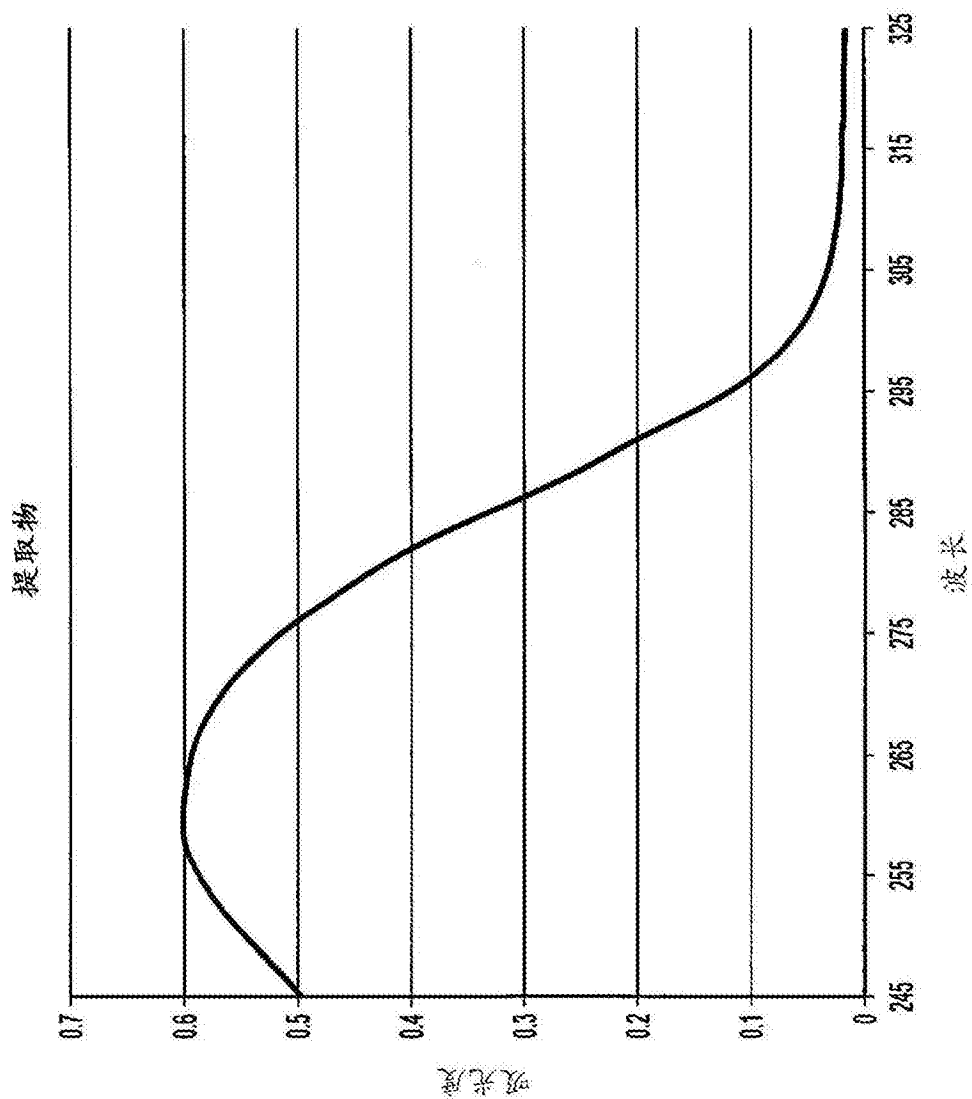


图1

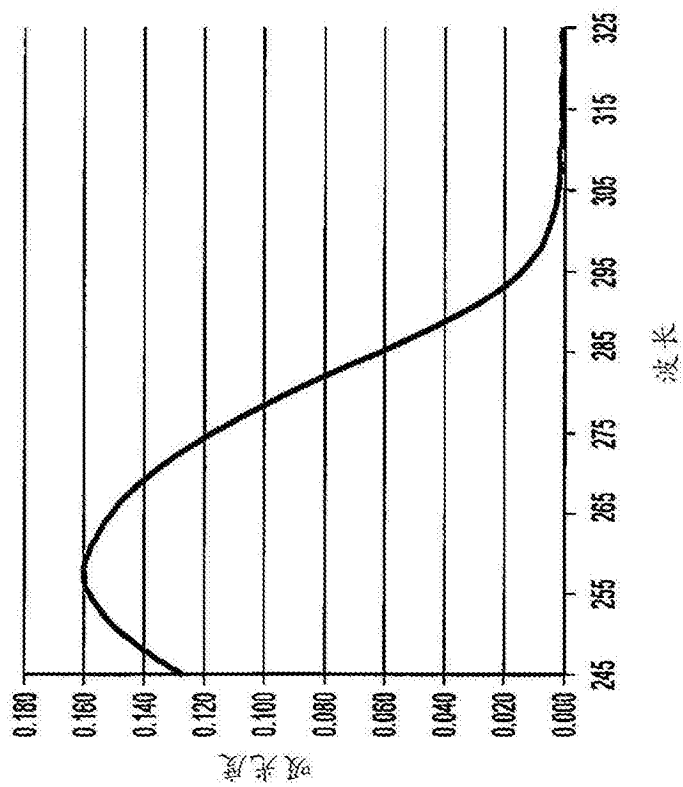


图2A

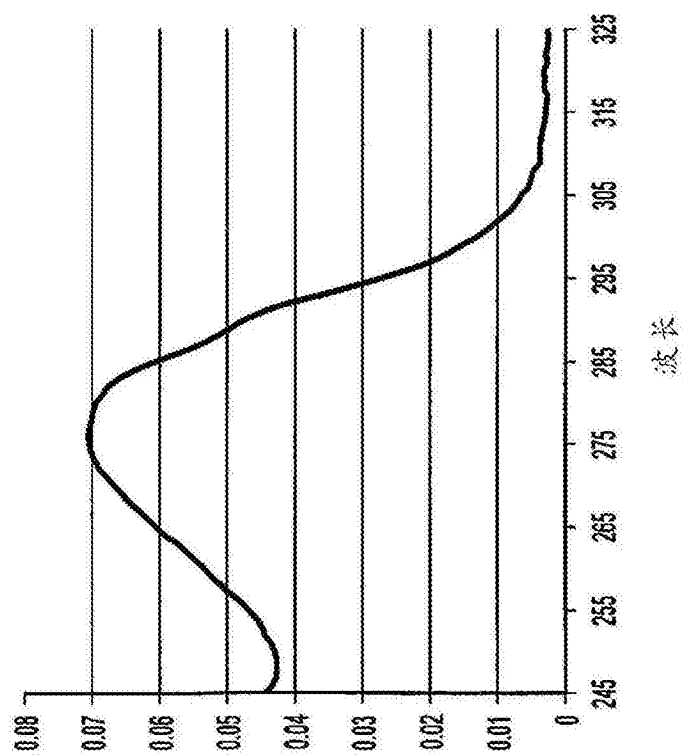


图2B

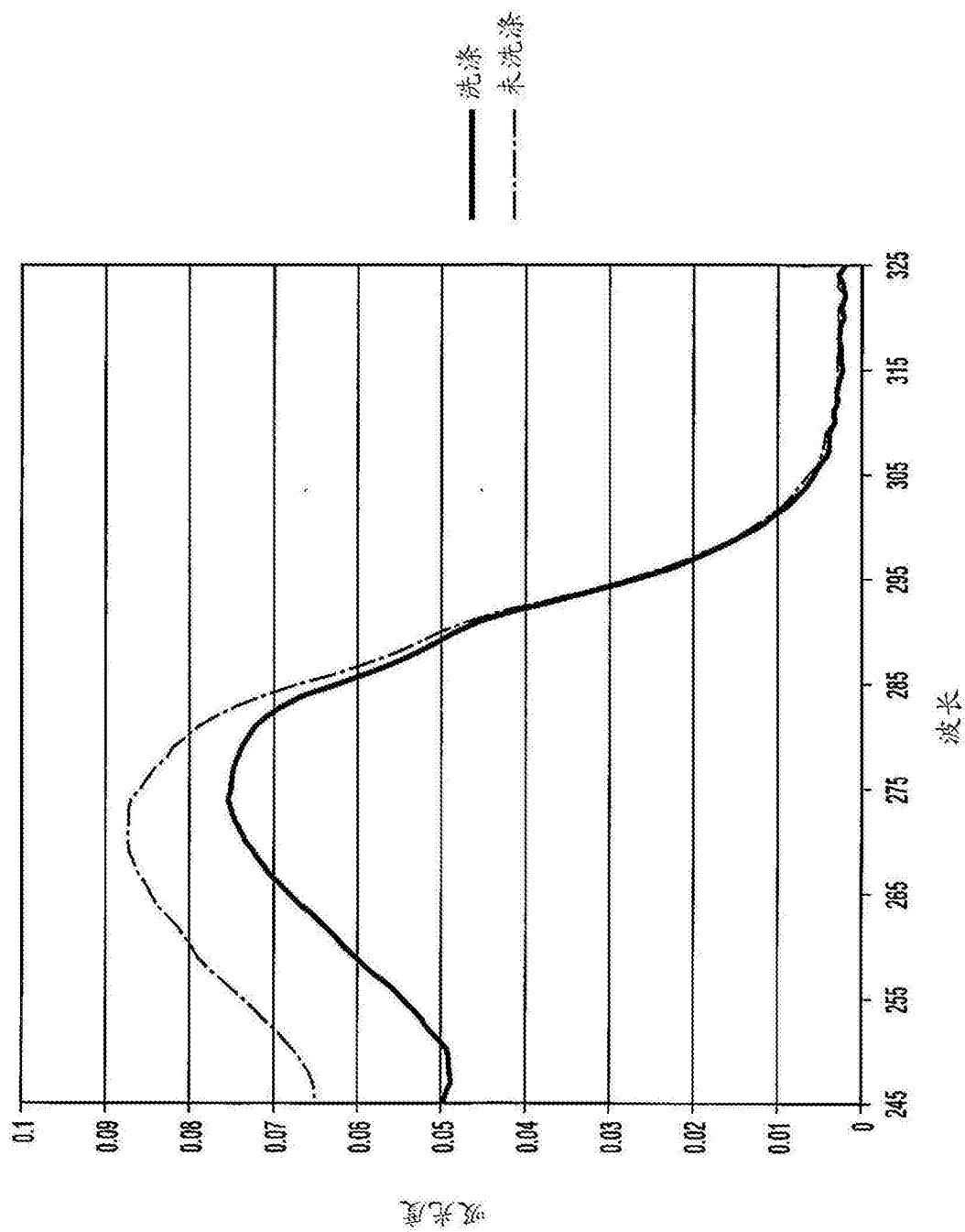


图3

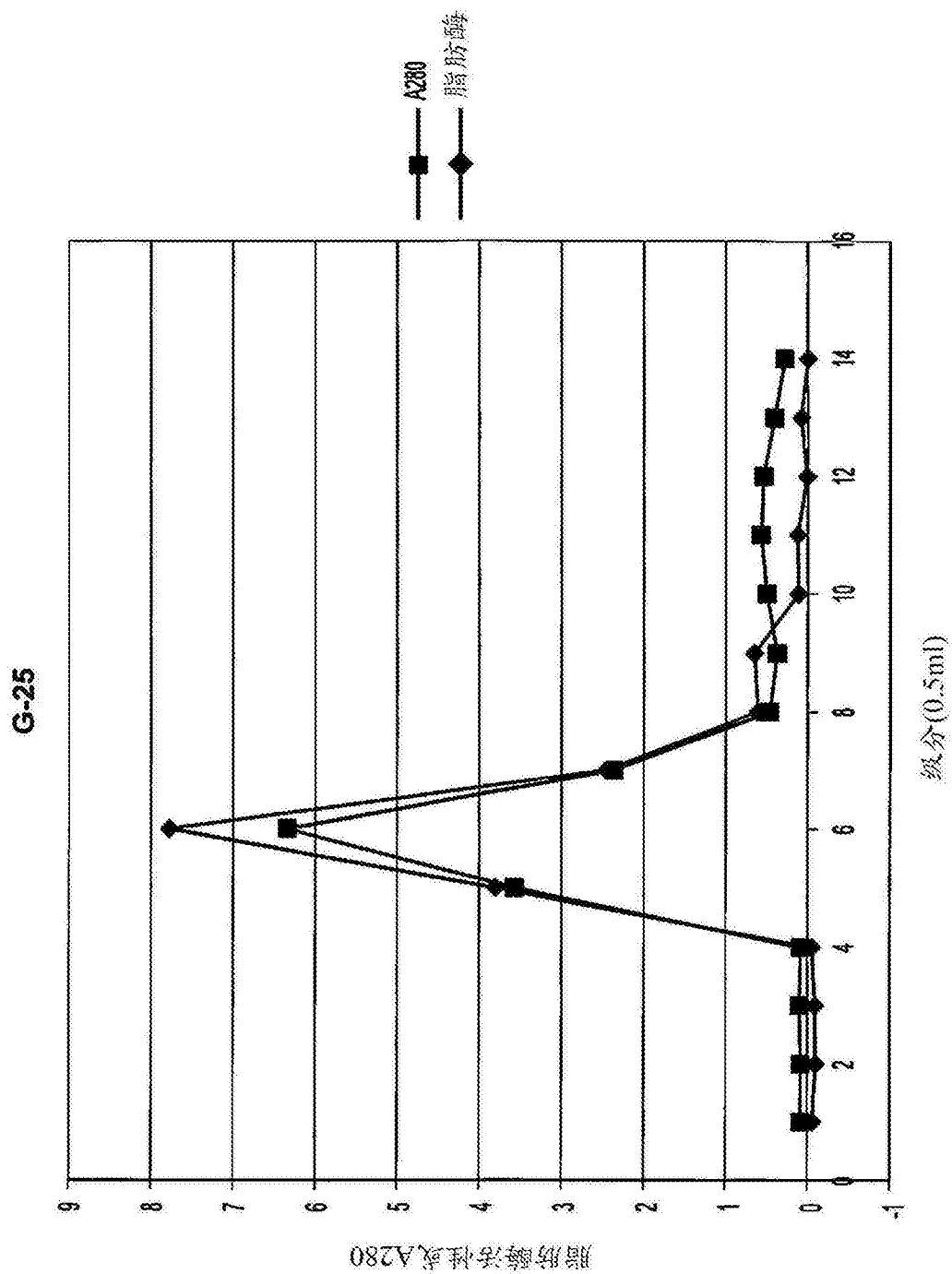


图4

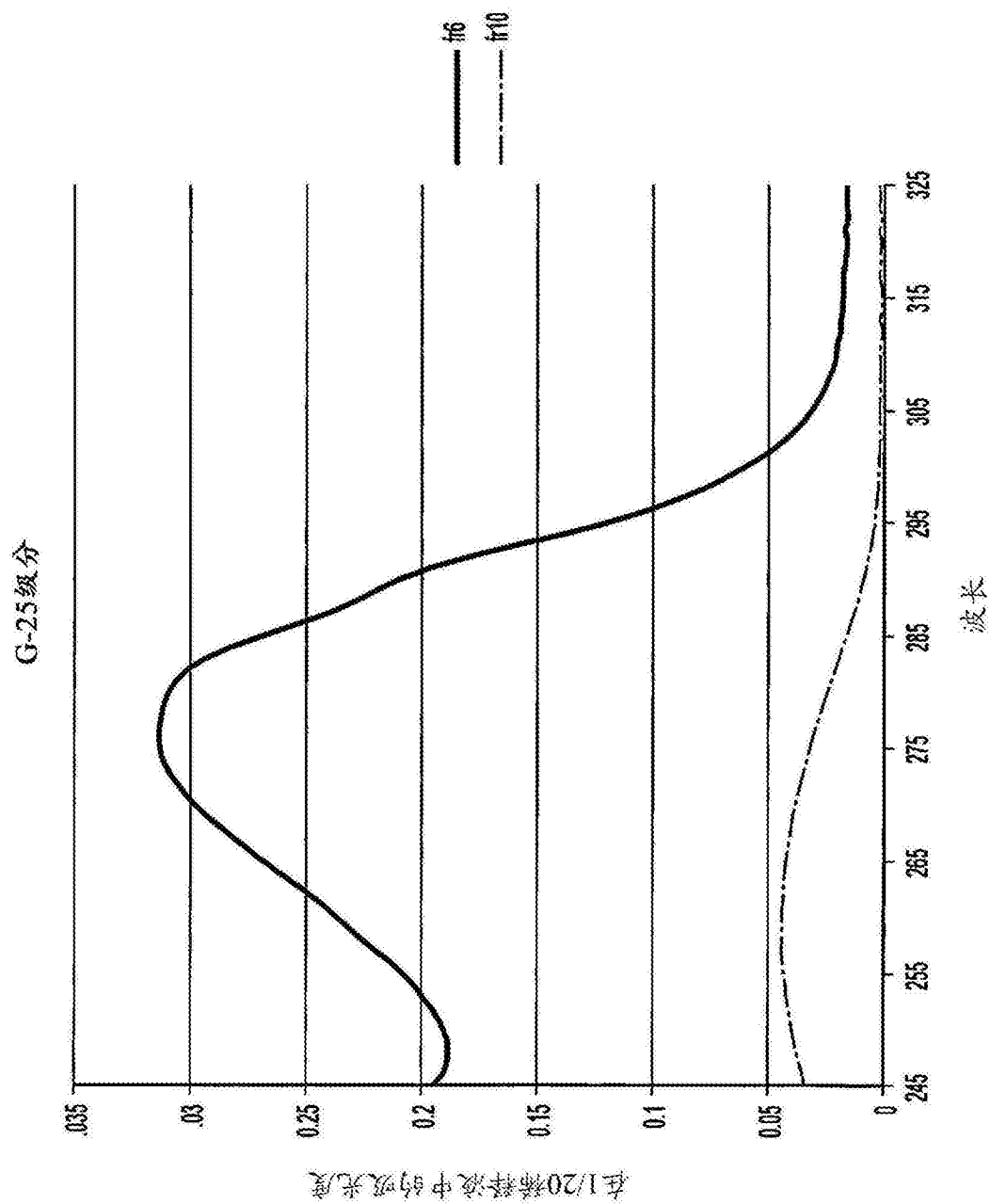


图5

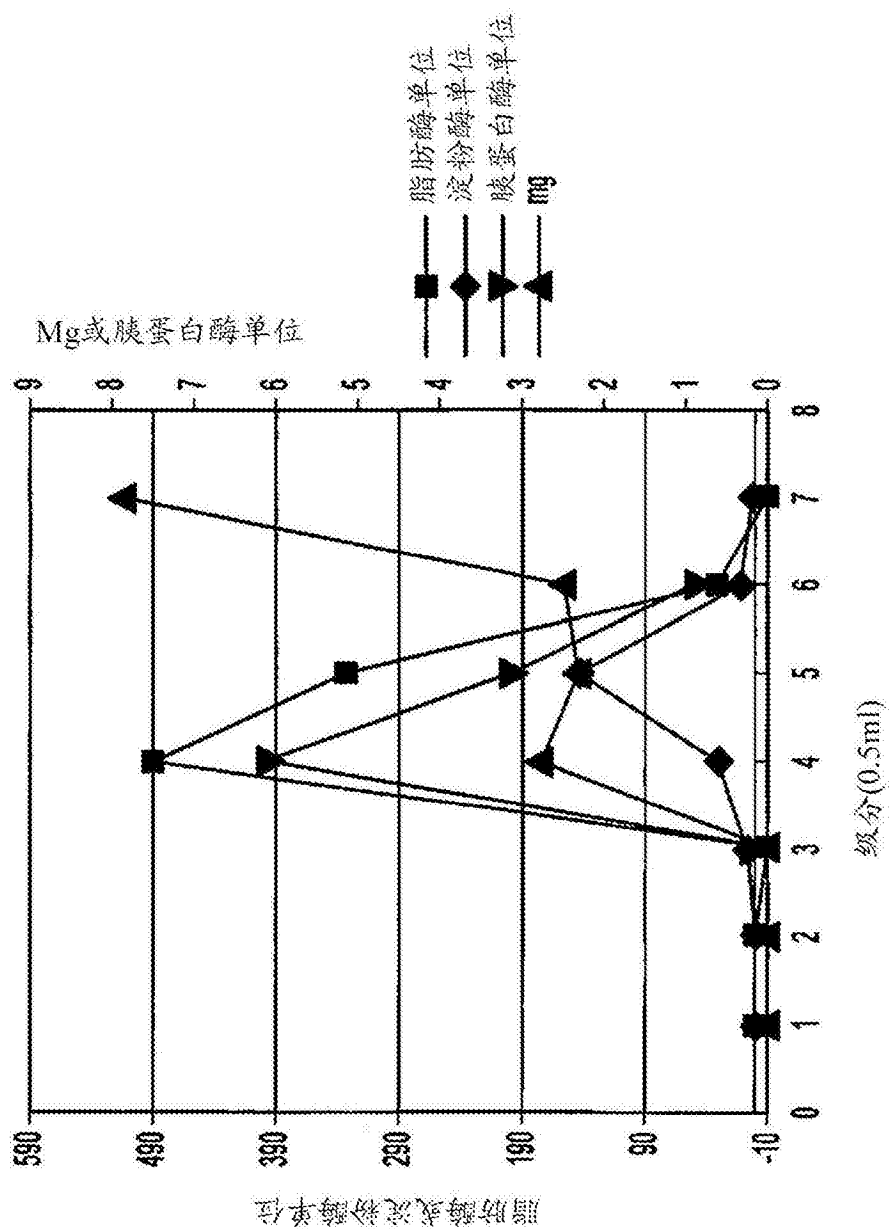


图6