

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 958**

51 Int. Cl.:  
**A61L 2/00** (2006.01)  
**C07K 14/435** (2006.01)  
**C12N 9/94** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **10150773 .9**  
96 Fecha de presentación: **03.11.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2295086**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.03.2011**

54 Título: **Procedimiento para reducir la carga viral y microbiana de pancreatina**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**06.08.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**06.08.2012**

73 Titular/es:  
**Nordmark Arzneimittel GmbH & Co.KG**  
**Pinnauallee 4**  
**25436 Uetersen, DE**

72 Inventor/es:  
**Kurfürst, Manfred;**  
**Rämsch, Christian;**  
**Schräder, Thomas y**  
**Moest, Thomas**

74 Agente/Representante:  
**Zea Checa, Bernabé**

ES 2 385 958 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

Procedimiento para reducir la carga viral y microbiana de pancreatina.

5

Campo de aplicación

**[0001]** La invención está relacionada con un procedimiento para producir pancreatina con carga viral y microbiana reducida.

10 Estado de la técnica

**[0002]** La pancreatina se obtiene como extracto de glándulas pancreáticas animales. Los extractos de este tipo que se obtienen a partir de material de partida biológico pueden presentar una carga viral alta. Los virus son ácidos nucleicos que están rodeados por una envuelta proteica. En caso de virus envueltos se añade aún una envuelta lipídica exterior. Dado que los virus no pueden replicarse de manera independiente, éstos dependen de los huéspedes. De manera correspondiente a esto, existen en prácticamente todos los seres vivos de la tierra. La menor cantidad de los virus conocidos son patógenos para el ser humano, dado que tienen una alta especificidad de huésped. Para excluir de antemano un riesgo de los consumidores, los extractos que se determinan para el consumo humano o que se usan como principio activo en fármacos, deberían presentar básicamente una carga viral lo más reducida posible o ninguna. El propio procedimiento de producción no siempre conduce a una eliminación o inactivación significativa de los virus existentes, de modo que particularmente en el caso de la producción de principios activos farmacéuticos deben integrarse en el procedimiento etapas adicionales de disminución de la concentración o inactivación.

**[0003]** Para la disminución de la concentración o inactivación de virus y microorganismos se describen numerosos procedimientos [K.H. Wallhäuser, Praxis der Sterilisation Desinfektion Konservierung, Thieme Verlag, Stuttgart 1995]. Además de la eliminación mecánica mediante por ejemplo cromatografía o filtración pueden inactivarse de manera selectiva estas contaminaciones mediante la adición de compuestos químicos. Sin embargo, este último procedimiento es problemático en tanto que estos compuestos deben eliminarse completamente de nuevo, para que no provoquen en el producto final ningún efecto tóxico. Los procedimientos físicos, tales como por ejemplo tratamiento con calor o radiación son procedimientos igualmente convencionales para inactivar virus o microorganismos.

**[0004]** Un reto especial es la inactivación o eliminación de virus de extractos biológicos complejos, cuya sustancia activa son mezclas enzimáticas, sin que a este respecto se destruya o se modifique la actividad enzimática de las proteínas.

**[0005]** Tiene importancia económica especial el principio activo farmacéutico pancreatina que se obtiene como extracto de páncreas de cerdo y se usa en forma secada como agente terapéutico oral tal como se describe en el documento DE 3248588 A1.

**[0006]** Las sustancias activas en la pancreatina son entre otras distintas enzimas que degradan polímeros, tales como lipasas, amilasas y proteasas. Un requisito para la actividad del agente terapéutico es que todas las enzimas estén presentes en una proporción determinada y en forma activa en el principio activo.

45

**[0007]** Ciertas investigaciones con respecto a la carga viral de pancreatina han mostrado que puede detectarse como partícula infecciosa parvovirus porcino (PVP) como virus único en la pancreatina. Los virus zoonóticos VEMC, PEV9 y VHE así como rotavirus y reovirus no pudieron detectarse ni como partículas infecciosas ni a nivel genómico. Básicamente, los principios activos farmacéuticos no deberían contener ningún virus infeccioso. Aunque el PVP, según el conocimiento actual, no es patógeno para el ser humano, el objetivo debería ser por tanto una pancreatina libre de PVP. El PVP es un virus modelo usado con frecuencia, dado que se caracteriza por una muy alta resistencia frente a distintos procedimientos de inactivación. Dado que el procedimiento de producción descrito en la figura 1 no puede eliminar completamente la carga de PVP existente, deben implementarse etapas adicionales que reducen el contenido vírico.

55

**[0008]** Ciertos procedimientos clásicos de inactivación de virus tales como por ejemplo calentamiento en seco o en húmedo o procedimientos que reducen la concentración de virus tales como por ejemplo filtración o cromatografía no pueden usarse en la mayoría de los casos, en caso de extractos de material de partida biológico y de manera particularmente especial en caso de extractos de órganos sin modificación de la composición y/o altas pérdidas de producto.

60

**[0009]** Por el documento US 3.956.483 A se conoce un procedimiento para producir una composición que contiene pancreatina en forma de polvo seco, en el que se mezcla páncreas triturado con una disolución acuosa que contiene

sulfato de calcio. A esta mezcla se añade entonces un activador enzimático. Tras un periodo de tiempo predeterminado para la activación enzimática se deshidrata finalmente la mezcla, de manera que deben inactivarse bacterias patógenas. Esta inactivación debe realizarse a temperaturas superiores a 160°F (73°C), preferentemente a 180°F (82°C). En todos los ejemplos se usa una temperatura de inactivación de 82°C.

5

**[0010]** El documento US 2007/0148151 A1 da a conocer un procedimiento para producir pancreatina. Este procedimiento prevé para reducir la carga de virus y bacterias un calentamiento de pancreatina en forma dispersa, para que la pancreatina deba contener menos del 9% en peso de uno o varios disolventes. Los ejemplos muestran procedimientos, en los que la proporción del disolvente ascendía al menos al 1% en peso. La pancreatina dispersa se calienta entonces hasta una temperatura de al menos 85°C durante un periodo de tiempo inferior a 48 h.

10

**[0011]** Según el documento US 2007/0148151 A1 es necesario un tratamiento a 85°C o temperaturas aún superiores para poder cumplir el reglamento oficial con respecto a la carga de virus de productos biológicos. A una temperatura de 80°C no pudo cumplirse el reglamento.

15

**[0012]** En el documento US 2007/0148151 A1 se indica además que un tratamiento térmico a 60°C durante 70 horas puede dañar la pancreatina. Un tratamiento térmico puede destruir una cantidad esencial de actividad enzimática de la pancreatina.

20

**[0013]** El documento WO 2007/014896 A está relacionado con procedimientos para producir polvo de pancreatina esterilizado. El procedimiento para producir pancreatina comprende el calentamiento de una forma dispersada de pancreatina como producto de partida, que contiene uno o varios disolventes, hasta una temperatura de al menos 85°C, debiéndose alcanzar un contenido total en disolvente en la forma dispersada de pancreatina inferior al 9% de proporción en masa en cada punto durante la etapa de calentamiento. El precalentamiento de la forma dispersada de la pancreatina, que contiene uno o varios disolventes, se realiza a este respecto hasta una temperatura de al menos 85°C. El calentamiento de la forma dispersada de pancreatina hasta una temperatura de al menos 85°C se continúa entonces durante un tiempo de hasta 48 horas, de modo que se alcance un contenido total en disolvente en la forma dispersa de pancreatina inferior al 9% de proporción en masa en cada punto durante el calentamiento de la forma dispersa de pancreatina, no refiriéndose esta especificación a la etapa de precalentamiento.

25

30

**[0014]** Según este procedimiento debe mantenerse el contenido total en disolvente durante la duración de las dos etapas de calentamiento (precalentamiento / calentamiento principal) de la forma dispersa de pancreatina inferior al 9% de proporción en masa.

35

**[0015]** El documento US 3.844.891 A da a conocer un preparado de pancreatina que puede fluir con bajo contenido en gérmenes, que presenta con respecto a pancreatina no purificada una actividad enzimática no modificada, y un procedimiento para su producción. Este preparado de pancreatina con bajo contenido en gérmenes y que puede fluir bien con una actividad enzimática no modificada se obtiene debido a que se trata un preparado de pancreatina contaminado con una disolución acuosa o con una emulsión estable de una cetona alifática de bajo peso molecular, preferentemente con de 3 a 6 átomos de carbono, predominantemente butan-2-ona, o de un hidrocarburo halogenado con un punto de ebullición entre 15°C y 100°C, particularmente de 30°C a 60°C, predominantemente cloruro de metileno o cloroformo en presencia de un agente espesante para dar una masa plástica y ésta se seca en estado triturado a una temperatura por debajo de 40°C.

40

45

**[0016]** Con este procedimiento debe obtenerse un producto granulado con bajo contenido en gérmenes con propiedades de flujo excelentes que puede tratarse fácilmente para dar formas farmacéuticas sólidas.

**[0017]** El documento DE-A-2106706 describe un procedimiento para producir pancreatina como polvo seco con alta actividad proteolítica, amilolítica y lipolítica. Este procedimiento consiste en que se añade duodeno de cerdo triturado al páncreas bovino o de cerdo triturado obtenido por mezcla de una disolución acuosa de sulfato de calcio y/o acetato de calcio en una cantidad del 5,5% en peso de agua y del 0,02% al 1,4% en peso de sal con respecto al páncreas triturado, añadiéndose el duodeno a esta mezcla aproximadamente en un 10% con respecto al peso del páncreas triturado, se mantiene la mezcla hasta 7 días a una temperatura de aproximadamente 3,3°C a 4,4°C, se lava con acetona y se calienta la mezcla lavada hasta un intervalo de temperatura de 49°C a 82°C. El producto secado se muele a continuación. No se hacen indicaciones con respecto a un contenido de humedad residual del producto producido según este procedimiento.

50

55

**[0018]** Por el estado de la técnica se conoce además que los resultados de una reducción de virus por medio de la acción de calor depende considerablemente de la humedad residual de las muestras. Cuanto más seco esté el material que se somete a calentamiento, superior es la resistencia de los virus frente a altas temperaturas.

60

**[0019]** De esto resulta que la temperatura del calentamiento puede seleccionarse tan baja cuanto mayor sea la humedad residual del material.

Objetivo, solución, ventaja

**[0020]** El objetivo de la invención es facilitar un procedimiento para producir pancreatina con carga viral y bacteriana reducida con mantenimiento de la actividad enzimática y con un contenido de humedad residual reducido.

5 **[0021]** Este objetivo se soluciona mediante las características de la reivindicación 1. Ciertas configuraciones convenientes de la invención resultan de las características de las reivindicaciones dependientes.

**[0022]** Por consiguiente, la invención consiste, según la reivindicación 1, en un procedimiento para producir pancreatina en forma molida como polvo con una humedad residual del 0,1% al 0,3% en peso, que comprende las  
10 siguientes etapas:

a) triturar glándulas pancreáticas que proceden de cerdos domésticos y someter a una autólisis por medio de un disolvente o varios disolventes, tales como isopropanol acuoso, agua, acetona o mezclas de los mismos,

15

a1) filtrar el producto intermedio obtenido según la etapa a), para obtener un filtrado de tamiz,

a2) precipitar las enzimas contenidas en el filtrado de tamiz obtenido mediante filtración según la etapa a1),

20

a3) filtrar la mezcla de la etapa a3) y obtener una torta de filtración,

a4) moler y a continuación secar a vacío la torta de filtración hasta obtener una humedad residual del 0,1% al 0,3% en peso,

25

a5) tratar térmicamente la torta de filtración con calor seco a una temperatura de 70°C a 80°C, preferentemente a 80°C, y en de 1 h a 48 h o de 8 h a 48 h o de 24 h a 48 h o de 32 h a 48 h,

30

a6) moler la torta de filtración tratada térmicamente hasta obtener pancreatina acabada con una humedad residual del 0,1% al 0,3% en peso.

**[0023]** La humedad residual de la pancreatina obtenida en la etapa (a6) asciende del 0,1% al 0,3% en peso. El tratamiento térmico en la etapa (a5) se realiza preferentemente a 80°C.

35 **[0024]** La pancreatina no tratada se obtiene a este respecto del páncreas del cerdo.

**[0025]** Según el procedimiento de producción según la invención se obtiene una pancreatina, en el que la actividad biológica de la pancreatina tratada térmicamente corresponde al menos en un 50% a la actividad biológica de la pancreatina no tratada, la infecciosidad viral de la pancreatina tratada térmicamente se ha reducido en un factor superior a 1 log<sub>10</sub> en comparación con la infecciosidad viral de la pancreatina no tratada y la carga de gérmenes de la pancreatina tratada térmicamente es inferior a 500 KBE/g.  
40

Breve descripción del dibujo

45 **[0026]** La invención se explica en más detalle a continuación con referencia a los dibujos. A este respecto muestran:

la Fig. 1 diagrama de flujo de un procedimiento según la invención para producir pancreatina a partir de glándulas pancreáticas de cerdo;

50

la Fig. 2 un diagrama que muestra la actividad de lipasa de muestras de pancreatina tratadas tras distintos tiempos de tratamiento;

la Fig. 3 un diagrama que muestra el título de virus de muestras de pancreatina tratadas tras distintos tiempos de tratamiento;

la Fig. 4 un diagrama que muestra la pérdida de actividad de lipasa con distintas humedades residuales de las muestras de pancreatina tratadas; y

55

la Fig. 5 un diagrama que muestra el título de virus de muestras de pancreatina tratadas tras distintos tiempos de tratamiento.

Descripción detallada de la invención y mejor modo de realizar la invención

60

**[0027]** Según la invención se prevé el tratamiento térmico de pancreatina sólida que presenta una humedad residual del 0,1% al 0,3% en peso. Se encontró que a diferencia de las suposiciones que se han encontrado en el estado de la técnica, también en el caso de una humedad residual reducida de este tipo puede alcanzarse una

reducción eficaz de la carga viral y microbiana.

5 **[0028]** Además se estableció que el tratamiento de pancreatina con la humedad residual indicada puede realizarse a una temperatura que asciende a preferentemente 80°C o inferior. Una temperatura de tratamiento más baja va unida junto a la ventaja económica particularmente con una mejor conservación de la actividad enzimática original de las enzimas de pancreatina. Mediante la reducción prevista del contenido de humedad residual según la invención pudo reducirse considerablemente la pérdida de la actividad enzimática (< 20%) con respecto al estado de la técnica.

10 **[0029]** Por la expresión “humedad residual” se entiende en este caso el contenido de pancreatina en uno o varios disolventes, por ejemplo agua, acetona, isopropanol o mezclas de los mismos, o otros líquidos.

15 **[0030]** Una forma de realización del procedimiento según la invención para producir pancreatina con carga viral y bacteriana reducida se describe a continuación con referencia a la Fig. 1. Las glándulas pancreáticas 1 que proceden de cerdos domésticos se trituran 2 en primer lugar y se someten a una autólisis 3. Mediante la filtración 4 del producto intermedio así obtenido se obtiene el filtrado de tamiz 5. A continuación se precipitan 6 las enzimas que se encuentran en el filtrado de tamiz 6, se filtra 7 la mezcla y se obtiene 8 la torta de filtración. Finalmente, la torta de filtración se muele 9 y se seca a vacío 10, hasta que presenta una humedad residual que asciende a 0,1% al 0,3% en peso. A continuación se somete 13 la torta de filtración a un tratamiento térmico a 80°C o inferior. La torta de filtración tratada térmicamente se muele entonces de nuevo, de manera que se obtiene 12 la pancreatina acabada.

20 **[0031]** La torta de filtración obtenida según el procedimiento mencionado anteriormente (número de referencia 8 en la Fig. 1) contiene aún una parte del disolvente que se usó para la autólisis de las glándulas pancreáticas trituradas (número de referencia 3 en la Fig. 1). Este disolvente es por regla general isopropanol acuoso. A pesar de la filtración, la torta de filtración obtenida contiene de manera condicionada por el procedimiento aún una parte del disolvente que se reduce posteriormente mediante el secado a vacío y a este respecto se ajusta hasta una proporción del 0,1% al 0,3% en peso, con respecto a la pancreatina obtenida mediante el secado a vacío.

30 **[0032]** El término “pancreatina” comprende en la presente invención en este caso la torta de filtración designada con el número de referencia 8, en caso de la cual se trata de pancreatina bruta que según la invención se somete a etapas de tratamiento posteriores (números de referencia 9 a 11 y 13 en la Fig. 1). Esta torta de filtración se designa también “pancreatina no tratada”. El término “pancreatina” comprende además la pancreatina que se ha sometido a la etapa de procedimiento (a5), es decir el tratamiento térmico. Esta pancreatina se designa en este caso también “pancreatina tratada”.

35 **[0033]** Por la expresión “en forma sólida” se entiende pancreatina que no se encuentra como disolución, emulsión o suspensión. La pancreatina se encuentra en forma molida sólida, por ejemplo como polvo.

40 **[0034]** El tratamiento térmico se realiza habitualmente en un horno. Preferentemente se realiza el tratamiento térmico a una temperatura de 70°C a 80°C, de manera especialmente preferente a 80°C. La temperatura debería encontrarse por debajo de 84°C. El tratamiento térmico debería realizarse con “calor seco”.

45 **[0035]** El tratamiento térmico se realiza preferentemente durante un periodo de tiempo de 48 h o inferior. Preferentemente se realiza el tratamiento térmico de 1 h a 48 h, más preferentemente de 8 h a 48 h, más preferentemente de 24 a 48 h y particularmente 24 h, 32 h o 48 h.

50 **[0036]** La actividad biológica de la pancreatina obtenida en la etapa (b) debería corresponder al menos en un 80%, preferentemente al menos en un 90% a la actividad biológica de la pancreatina proporcionada en la etapa (a5). Con respecto a las enzimas que están contenidas en la pancreatina, la expresión “actividad biológica” corresponde a la expresión “actividad enzimática”.

**[0037]** Además, la carga de la pancreatina obtenida en la etapa (a5) con sustancias tóxicas no debería ser superior a la carga de la pancreatina proporcionada en la etapa (a). La carga de gérmenes de la pancreatina obtenida en la etapa (a5) debería ser inferior a 500 KBE/g, preferentemente no más de 100 KBE/g.

55 **[0038]** Una fuente preferente a partir de la cual puede obtenerse pancreatina no tratada es el páncreas de cerdo.

60 **[0039]** El procedimiento según la invención puede aplicarse a todas las formas de virus, particularmente virus de ADN y ARN, virus con envoltura o sin envoltura, además a viriones y priones o sistemas biológicos similares así como bacterias y hongos. El procedimiento se usa preferentemente para reducir la carga de PVP y/o la carga de reovirus de pancreatina a partir del páncreas de cerdo. Adicionalmente o como alternativa, el procedimiento puede usarse para reducir la carga de los siguientes virus: virus de la pseudorrabia (VPR), virus de la diarrea viral bovina (VDVB), virus de la encefalomiocarditis (VEMC).

**[0040]** El procedimiento según la invención permite la reducción de la carga de virus y microorganismos de pancreatina, sin que se reduzca esencialmente su actividad enzimática, empeoren las propiedades farmacológicamente intencionadas o se generen compuestos químicos tóxicos.

5 **[0041]** La infecciosidad viral de la pancreatina tratada térmicamente debería haberse reducido en un factor superior a  $1 \log_{10}$ , preferentemente superior a  $3 \log_{10}$ , de manera especialmente preferente superior a  $4 \log_{10}$ , en comparación con la infecciosidad viral antes del tratamiento térmico. Esto vale particularmente también para la infecciosidad viral de parvovirus porcino (PVP) y/o la infecciosidad viral de reovirus. Por ejemplo, la infecciosidad de PVP en la pancreatina debería reducirse tras el tratamiento en un factor superior a  $1 \log_{10}$ , preferentemente superior a  $3 \log_{10}$ , de manera especialmente preferente superior a  $4 \log_{10}$ , en comparación con su infecciosidad antes del tratamiento.

15 **[0042]** La infecciosidad viral se calcula mediante la titulación de punto final y cálculo posterior del valor medio de la dosis infectante en cultivo tisular (DICT<sub>50</sub>) según la fórmula de Spearman-Kärber (Boletín oficial del estado, N.º 84, 4 de mayo de 1994). Los títulos de virus calculados así se indican como  $\log_{10}$  DICT<sub>50</sub> por ml con intervalos de confianza del 95%.

20 **[0043]** La reducción de la carga viral se indica según la directiva de la UE CMMP/BWP/268/95, anexo II) como factor de reducción logarítmica que es la diferencia de los títulos de virus entre una muestra control y las muestras tratadas térmicamente.

**[0044]** La humedad residual se determina según procedimientos conocidos.

25 **[0045]** La invención se explica en más detalle a continuación por medio de un ejemplo. El ejemplo no debe limitar de ningún modo el alcance de la invención.

#### Ejemplos

30 **[0046]** Se realizaron numerosos experimentos para estudiar la influencia de la humedad residual y de la temperatura a la que se realiza el tratamiento térmico sobre la actividad biológica y el título de virus de pancreatina sólida. A este respecto se estudió en primer lugar la influencia de la temperatura de tratamiento sobre la estabilidad de pancreatina. Como medida para la estabilidad de pancreatina se determinó la actividad de lipasa específica.

35 **[0047]** En la figura 2 se muestran los resultados de estos estudios. Las muestras sometidas a prueba presentaban antes del tratamiento térmico una humedad residual inferior al 3,0% en peso, y concretamente del 1,7% en peso. Estas muestras se trataron térmicamente a temperaturas de 80°C, 90°C y 100°C y se determinó la actividad de lipasa tras 8 h, 16 h y 48 h. Puede distinguirse en la figura 2 que la actividad de lipasa disminuye tanto más intensamente y tanto más rápidamente cuanto mayor sea la temperatura de tratamiento.

40 **[0048]** En la figura 3 se muestra la influencia de la temperatura de tratamiento seleccionada sobre el título de virus. Tal como puede distinguirse se consigue una reducción suficiente del título de virus con un tiempo de tratamiento suficiente también a una temperatura de tratamiento de 80°C.

45 **[0049]** En ensayos realizados adicionales se estableció que se consigue una inactivación de virus, particularmente de PVP y reovirus, también a 80°C y a una humedad residual muy reducida del 0,5% en peso o menos antes del tratamiento térmico.

50 **[0050]** La figura 4 muestra un diagrama que muestra la pérdida de actividad de lipasa de pancreatina tras un tratamiento térmico de 24 h a 80°C. Puede distinguirse que en caso de humedades residuales superiores, el tratamiento térmico va unido a una pérdida de actividad superior. Por este motivo han decidido los inventores el tratamiento térmico de pancreatina que presenta sólo una humedad residual baja del 0,5% en peso o inferior.

55 **[0051]** Los resultados del estudio de las muestras de pancreatina que estaban adicionadas con PVP, se muestran en la figura 5. La humedad residual de estas muestras fue del 0,1% al 0,3% en peso. La influencia del tratamiento térmico a 80°C sobre el PVP está representada en la tabla para dos series de ensayo:

Tabla 1

| Tiempo [h] | Factores de reducción de serie nº. 1 <sup>1</sup><br>[log <sub>10</sub> ] ± desviación estándar | Factores de reducción de serie nº. 2 <sup>2</sup><br>[log <sub>10</sub> ] ± Desviación estándar |
|------------|---|---|
| 16         | 1,55 ± 0,41   | 0,88 ± 0,55   |
| 24         | 1,81 ± 0,40   | 1,49 ± 0,47   |
| 32         | 2,28 ± 0,38   | 2,01 ± 0,66   |

|  |             |             |
|--|-------------|-------------|
| 48   | 2,48 ± 0,71 | 2,55 ± 0,99 |
| 1 humedad residual antes del tratamiento: del 0,1% al 0,3% en peso |             |             |
| 2 humedad residual antes del tratamiento: del 0,2% al 0,3% en peso |             |             |

**[0052]** Además se han sometido a prueba muestras de pancreatina que estaban adicionadas con reovirus (a continuación denominado "REO"). La humedad residual de estas muestras fue del 0,2% al 0,3% en peso. La influencia del tratamiento térmico a 80°C sobre reovirus está representado para dos series de ensayo en la tabla 2:

5

Tabla 2

| Tiempo [h] | Factores de reducción de serie nº. 1       | Factores de reducción de serie nº. 2       |
|------------|--|--|
|            | [log <sub>10</sub> ] ± desviación estándar | [log <sub>10</sub> ] ± Desviación estándar |
| 32         | 1,77 ± 0,37                                | 1,72 ± 0,31                                |

**[0053]** Además se realizaron ensayos comparativos en las mismas condiciones de tratamiento con muestras comparativas que se diferenciaban únicamente en la humedad residual de las muestras según la invención. Las 10 muestras comparativas presentaban una humedad residual entre el 2,0% y el 3,0% en peso (tabla 3).

Tabla 3

| Virus  | Factor de reducción (log <sub>10</sub> ) |               |               |
|--|--|---------------|---------------|
|  | Tras 24 h                                | Tras 32 h     | Tras 48 h     |
| REO-etapa de calentamiento a 80°C                            | 3,22 +/- 0,34                            | 1,14+/-0,34   | 3,13 +/- 0,31 |
| Humedades residuales <3%                                     | 4,13 +/- 0,89                            | 1,05 +/- 0,31 | 3,22 +/- 0,34 |
| REO-etapa de calentamiento a 80°C                            | 1,59 +/- 0,37                            | 1,77 +/- 0,30 | 0,87 +/- 0,35 |
| Humedades residuales <0,5%                                   | 1,42 +/- 0,29                            | 1,72 +/- 0,37 | 0,91 +/- 0,28 |
| PVP-etapa de calentamiento a 80°C                            | 1,31 +/- 0,42                            | 2,53 +/- 0,47 | 2,44 +/- 0,48 |
| Humedades residuales <3%                                     | 2,81 +/- 0,96                            | 2,36 +/- 0,30 | 2,81 +/- 0,96 |
| PVP-etapa de calentamiento a 80°C                            | 1,81 +/- 0,40                            | 2,28 +/- 0,38 | 2,24 +/- 0,71 |
| Humedades residuales <0,5%                                   | 2,00 +/- 0,47                            | 2,01 +/- 0,66 | 2,55 +/- 0,99 |
| *número de análisis más bajo (ninguna placa de gran volumen) |  |               |               |

**[0054]** Los estudios para determinar la disminución de virus mediante calentamiento en caso de contenidos de 15 humedad residual más bajos de la pancreatina (< 0,5%) dieron como resultado factores de reducción que se encontraban en el intervalo de los estudios en caso de contenidos de humedad residual más altos. Con ello pudo mostrarse que PVP se inactiva de manera eficaz también en caso de humedades residuales bajas y simultáneamente la actividad enzimática se reduce menos intensamente.

**[0055]** Por el contrario, la inactivación de reovirus depende más intensamente de la humedad residual de la 20 pancreatina secada. Las inactivaciones en caso de humedades residuales del 2,5% (<3%) dieron como resultado factores de reducción > 3 (24 y 48 horas), mientras que para el tratamiento con calor en caso de humedades residuales del 0,2% al 0,3% (< 0,5%) se determinaron factores de reducción en el intervalo de 1,75 log de etapas (32 25 horas). Sin embargo, la influencia del calor seco también en caso de humedad residual baja sobre la disminución de reovirus sigue siendo significativa.

**[0056]** Los resultados muestran que el procedimiento según la invención garantiza una disminución de virus significativa.

30 Preparación de muestras y procedimientos de prueba usados

Tratamiento térmico de muestras adicionadas con PVP con una humedad residual del 0,5% en peso o inferior

**[0057]** En primer lugar se adicionaron muestras de pancreatina no tratadas con virus. A continuación se liofilizaron 35 las muestras de pancreatina adicionadas para ajustar de ese modo la humedad residual necesaria. Las muestras obtenidas entonces se sometieron finalmente a un tratamiento térmico.

*Procedimiento de liofilización*

**[0058]** Se resuspendieron 1,5 g de material de partida de pancreatina (ECSM Ch.: 0677 005-P, Nordmark 40 Arzneimittel GmbH & Co. KG) con 3,2 ml de PBS y se agitaron. Los viales se adicionaron entonces con 0,3 ml de virus. Viales para controlar la temperatura y para determinar la humedad residual se dotaron de 0,3 ml de diluyente de virus. El contenido de todos los viales se mezcló entonces con un agitador magnético. Los viales se dispusieron en un liofilizador, ajustado a -30°C, para obtener una temperatura correspondiente de -25°C durante la noche.

45 **[0059]** La liofilización se realizó a vacío a 20°C durante 16 horas, a lo que le siguió un aumento de la temperatura

hasta 50°C durante 24 horas. Los viales se cerraron a vacío. Una muestra se tituló directamente tras finalizar la liofilización y para ello se disolvió en 5 ml de PBS. Se realizó una dilución 1:2000 en todas las muestras (con diluyentes de virus) para conseguir la disolución completa.

5 *Determinación de la humedad residual*

**[0060]** Las humedades residuales de las muestras antes del tratamiento térmico se determinaron según procedimientos conocidos.

10 *Tratamiento térmico*

**[0061]** El tratamiento térmico se realizó en un horno, ajustado a  $80^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . En cuanto la temperatura del horno alcanzó  $79^{\circ}\text{C}$  se colocaron las muestras en el horno y allí se dejaron durante el periodo de tiempo predeterminado. La temperatura se monitorizó durante el procedimiento.

15

**[0062]** Se tomaron las muestras para la titulación inmediata en los momentos indicados. Las muestras se titularon directamente y para ello se disolvieron en 5 ml de PBS. Se realizó una dilución 1:2000 en todas las muestras (con diluyente de virus) para conseguir la disolución completa. Las muestras se enfriaron en hielo antes de la titulación.

20 *Procedimientos de ensayo (ensayo de  $\text{DICT}_{50}$  indirecto)*

**[0063]** Se inocularon células PK-13 en placas de cultivo de 96 pocillos. Además se inocularon otras dos placas de 96 pocillos con respecto a controles negativo y positivo. Se inocularon ocho pocillos con cada dilución de la muestra ( $25 \mu\text{l/pocillo}$ ). Tras la incubación durante 70 minutos  $\pm$  10 minutos a  $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  se añadieron a las placas 175 ml de medio de crecimiento celular (el inóculo no se eliminó). El ensayo se realizó según SOP EPBT0062 y las placas de evaluaron con respecto al punto final de  $\text{DICT}_{50}$  como efecto citopatógeno (ECP), desarrollado en el control positivo. El punto final de  $\text{DICT}_{50}$  se calculó según el procedimiento de Spearman-Kärber, tal como se describe en SOP EPBT0062.

30 **[0064]** Los resultados se muestran en las tablas 1, 2 y 3 así como la figura 5.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para producir pancreatina en forma molida sólida como polvo con carga viral y microbiana reducida que comprende las siguientes etapas:

5

a) triturar glándulas pancreáticas que proceden de cerdos domésticos y someter a una autólisis por medio de uno o varios disolventes, tales como isopropanol acuoso, agua, acetona o mezclas de los mismos,

10

a1) filtrar el producto intermedio obtenido según la etapa a) para obtener un filtrado de tamiz,  
a2) precipitar las enzimas contenidas en el filtrado de tamiz obtenido mediante filtración según la etapa a1),

a3) filtrar la mezcla de la etapa a2) y obtener una torta de filtración,

15

a4) moler y a continuación secar a vacío la torta de filtración hasta obtener una humedad residual del 0,1% al 0,3% en peso

a5) tratar térmicamente la torta de filtración con calor seco a una temperatura de 70°C a 80°C, preferentemente a 80°C y en de 1 h a 48 h o de 8 h a 48 h o de 24 h a 48 h o 32 h o 48 h,

a6) moler la torta de filtración tratada térmicamente para obtener pancreatina acabada con una humedad residual del 0,1% al 0,3% en peso.

20

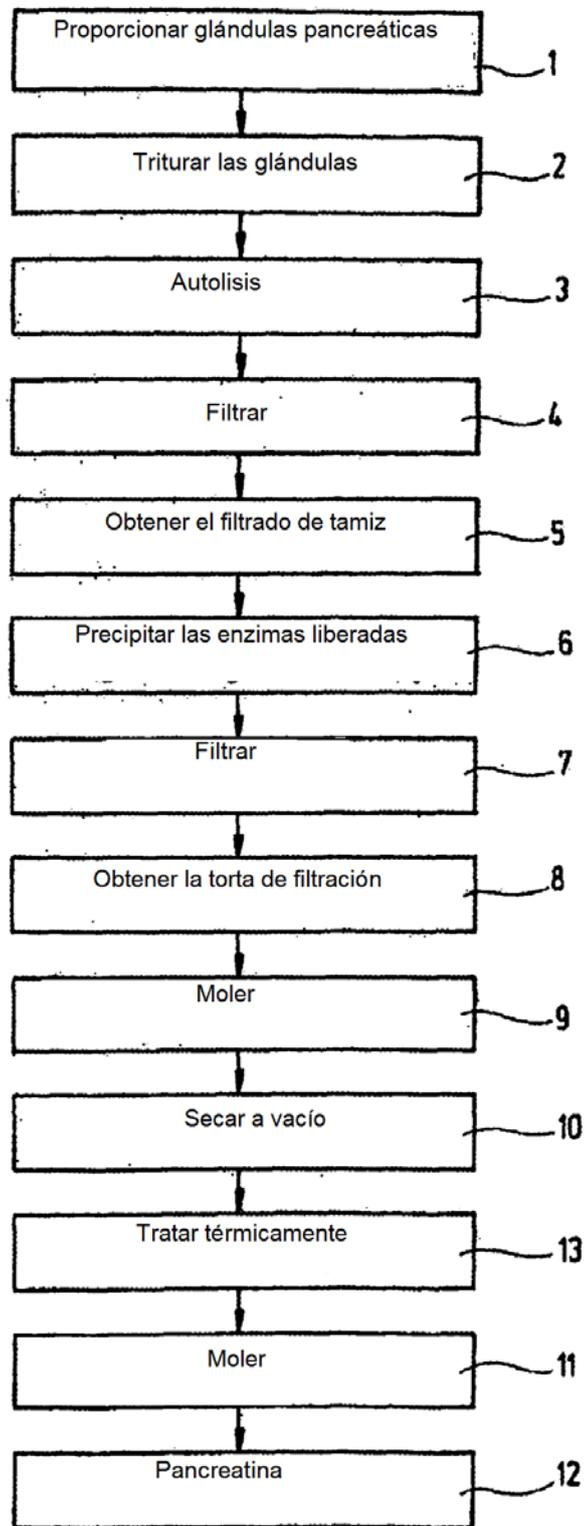


Fig. 1

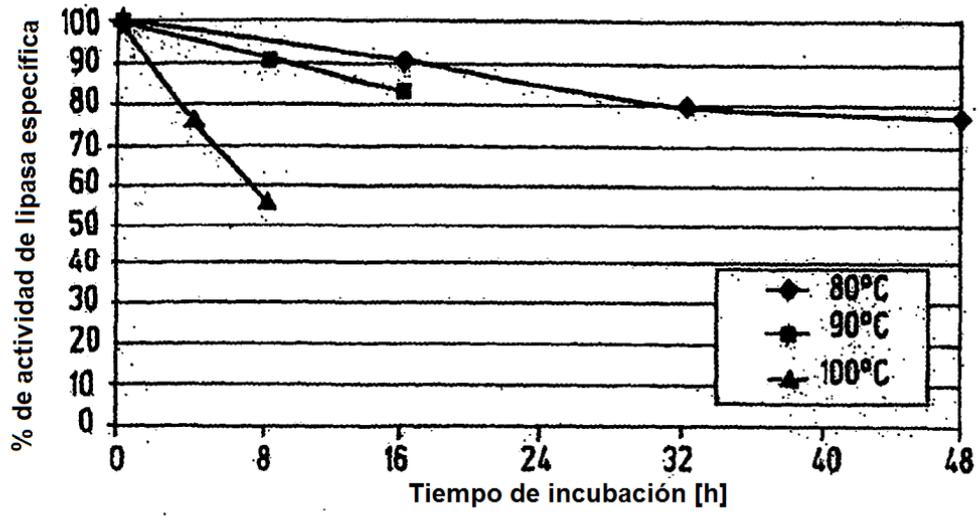


Fig. 2

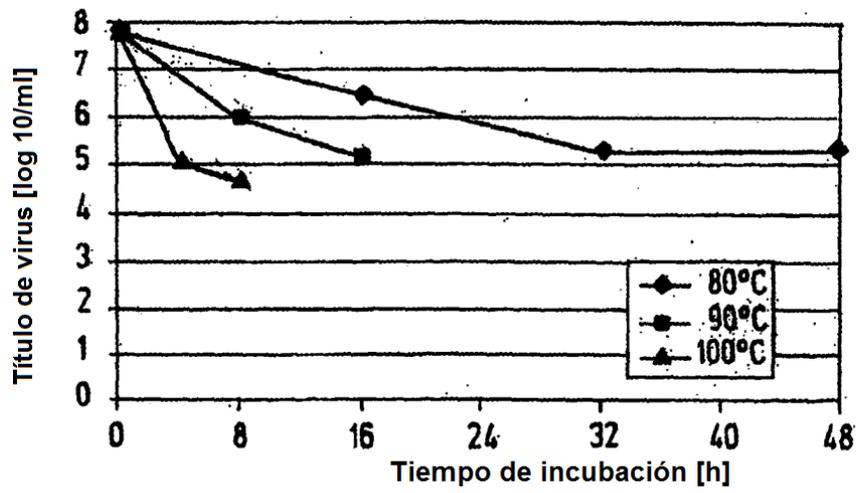


Fig. 3

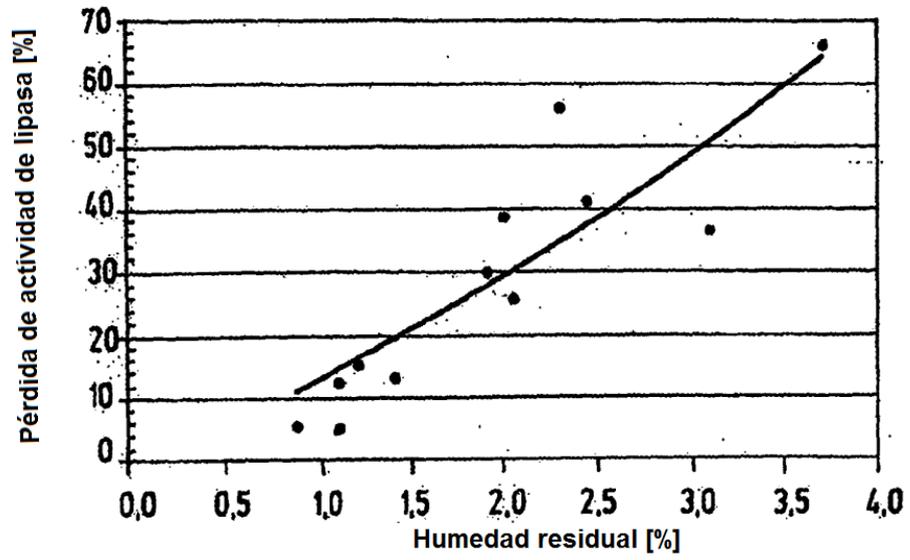


Fig. 4

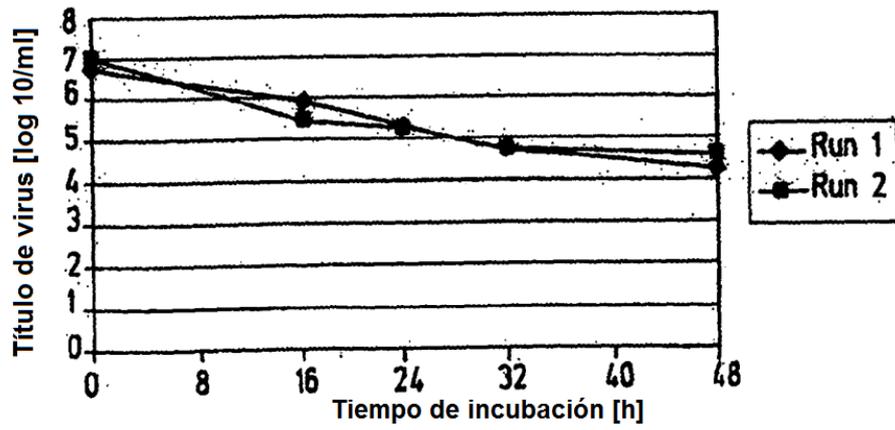


Fig. 5

**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

5 *Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.*

**Documentos de patentes citados en la descripción**

10

- DE 3248588 A1 [0005]
- US 3956483 A [0009]
- US 20070148151 A1 [0010] [0011] [0012]
- WO 2007014896 A [0013]
- US 3844891 A [0015]
- DE 2106706 A [0017]

15

**Literatura diferente de patentes citadas en la descripción**

- **K.H. Wallhäuser.** Praxis der Sterilisation Desinfektion Konservierung. Thieme Verlag, 1995 [0003]
- Bundesanzeiger, Mai 1994, 4 [0042]