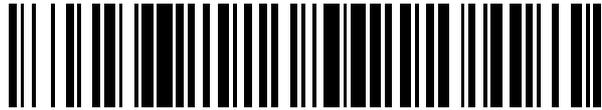


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 826**

51 Int. Cl.:

A61L 2/10 (2006.01)

A61L 2/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2010 E 10763697 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013 EP 2488215**

54 Título: **Procedimiento para la inactivación de contaminantes no deseados en extractos de sanguijuelas**

30 Prioridad:

13.10.2009 EP 09172861

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

28.11.2013

73 Titular/es:

**BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH
(100.0%)
Alfred-Nobel-Strasse 10
40789 Monheim, DE**

72 Inventor/es:

**SCHMIDT, SEBASTIAN;
PETERS, JÖRG y
MICHELS, JÜRGEN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 431 826 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 la inactivación de contaminantes no deseados en extractos de sanguijuelas

5 La invención se refiere al campo de la inactivación de virus y/o bacterias mediante irradiación electromagnética. Es objetivo de la presente invención un procedimiento para la inactivación de virus y/o bacterias en extractos de sanguijuelas.

Las sanguijuelas se usan desde antiguo para la terapia médica. Su gran capacidad de adsorción de sangre se usó ya en la antigua Grecia y especialmente en la Edad Media para la extracción médica de sangre del cuerpo (sangría).

10 Al comienzo del siglo XIX llegaron los extractos de sanguijuelas al mercado que presentaban efectos inhibidores de la coagulación. En el año 1955 se extrajo por vez primera de sanguijuelas un polipéptido con el nombre de hirudina. La hirudina se une a los puntos de unión del fibrinógeno de la trombina e inhibe mediante un estolón el centro activo, con lo que se bloquea este efecto.

Una revisión histórica de los extractos de sanguijuelas e hirudina se da en la siguiente publicación: Nowak, G. & Schrör, K. (2007): Hirudin - the long and stony way from an anticoagulant peptide in the saliva of medicinal leech to a recombinant drug and beyond. A historical piece en: *Thromb. Haemodst.* tomo 98, páginas 116-119.

15 Para la obtención de sustancias terapéuticamente activas a partir de sanguijuelas, se trituran y homogenizan mecánicamente sanguijuelas congeladas (por ejemplo, de *Hirudo medicinalis*, *Hirudo verbana* y especies relacionadas con ellas) o componentes de las mismas. En un procedimiento de extracción y purificación en varias etapas se puede obtener un principio activo, que se puede usar por ejemplo en una crema para el tratamiento de la insuficiencia venosa y dolencias hemorroidales agudas.

20 Debido a que los extractos de sanguijuelas son un producto procedente de materias primas naturales es de gran importancia la seguridad frente a contaminantes no deseados tales como bacterias o virus. En la implementación de un concepto de seguridad frente a virus se prescribe expresamente el uso de técnicas complementarias, por ejemplo técnicas complementarias en el mecanismo de acción (véase, por ejemplo, *Guideline Q5A der International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharma-ceuticals for Human Use (ICH)*).

25 De este modo se asegura que se abarca un amplio espectro de virus.

Procedimientos establecidos para la inactivación de bacterias y virus con envoltura de gran tamaño son tratamiento ácido, tratamiento con disolventes orgánicos, tratamiento con detergentes y pasteurización, que se usan individualmente o preferiblemente en combinación.

30 Sin embargo para virus sin cápside de pequeño tamaño como, por ejemplo, parvovirus, estos procedimientos no son efectivos.

Un procedimiento para la eliminación de virus sin envoltura de pequeño tamaño lo representa la nanofiltración. A este respecto se realiza la separación mediante exclusión por tamaños: una membrana retiene virus, cuyo tamaño se encuentra con seguridad dentro del corte determinado.

35 En la nanofiltración existe no obstante el problema de que pequeños virus sin cápside pueden tener un tamaño similar al de la sustancia terapéutica deseada. Por ello no es posible filtrar de forma segura agentes patógenos pero tampoco la proteína. La consecuencia es una pérdida de producto elevada, inaceptable, que conduce a un procedimiento no económico.

40 En la nanofiltración de extractos de sanguijuelas se evidenció en ensayos propios que la velocidad de flujo que se puede conseguir por superficie de membrana es extremadamente baja. Al mismo tiempo se llegó después de un tiempo de procesamiento muy corto a un bloqueo de las superficies del filtro. Estos bloqueos no eran reversibles. Mediante las medidas habituales como, por ejemplo, lavado en contracorriente, no se pudieron dejar de nuevo los filtros en un estado operativo. Con este rendimiento extremadamente bajo de la nanofiltración al mismo tiempo que con costes altos para una unidad de filtro un procedimiento de nanofiltración para la eliminación de extractos de sanguijuelas se aleja de una aplicación económica en una producción farmacéutica.

45 Un procedimiento adicional para la inactivación de virus es la irradiación con luz ultravioleta (radiación UV). El reto especial en este procedimiento se encuentra en la irradiación homogénea del medio que se va a procesar. El propósito es matar con seguridad y de manera amplia los microorganismos y/o virus al mismo tiempo que se mantiene en gran medida las sustancias valiosas sensibles. De forma particular productos de fuentes de materias

primas naturales presentan una composición compleja, múltiple. En general los distintos componentes de producto muestran una diferente estabilidad frente a la irradiación con UV. Esto dificulta el compromiso entre inactivación de virus y mantenimiento de la calidad de producto.

5 Un criterio importante para la idoneidad del producto es el acortamiento de la exposición del producto en la zona de irradiación. Debido a la duración de tratamiento promedio necesaria se determinan mediante las partículas que atraviesen con la mayor rapidez la zona de irradiación, para la reducción de la duración de tratamiento el requerimiento es una distribución de tiempo de residencia lo más uniforme posible dentro de la corriente de producto. Los problemas en el uso de reactores para la irradiación con luz ultravioleta en medios fluidos resultan de una intensidad de irradiación exponencialmente decreciente con separación creciente de la fuente de radiación en el medio que se va a tratar. Por este motivo, los microorganismos y virus que se encuentran a una mayor distancia de la fuente de radiación son eliminados más lentamente o no se eliminan en absoluto.

15 Este efecto, que se refuerza considerablemente con capacidad de absorción de luz creciente del medio, conduce según el estado de la técnica actual al uso de superficies de irradiación mucho mayores, como se encuentran, por ejemplo, en reactores de capa fina. Los reactores de capa fina que se encuentran en uso pueden transformarse sin embargo solo difícilmente a la escala industrial, ya que mantener constante el espesor de película en la ampliación de escala solo puede realizarse mediante una ampliación del diámetro proporcional al caudal, lo que conduce a escala industrial a reactores de gran tamaño que ya no son manejables.

20 Otra influencia negativa la constituye la progresión desfavorable del tiempo de residencia que se da casi siempre con pequeñas profundidades de penetración de la radiación UV en el medio de retención necesariamente muy finas y con ello películas de líquidos de flujo laminar, en las que decae un intercambio transversal respecto a la dirección de corriente principal. Las capas próximas a la pared permanecen, debido al perfil de velocidad linealmente decreciente hasta cero respecto a la pared, esencialmente más tiempo que las capas alejadas de la pared. Para poder llevar a cabo la dosis de irradiación mínima necesaria para la muerte también en la capa de líquido alejada de la pared que fluye rápidamente, debe elevarse el tiempo de residencia promedio de la película. Sin embargo esto conduce a una carga de radiación elevada y por tanto a un mayor daño de los productos.

25 En la bibliografía (documentos EP 1 339 643A1, EP 1 337 280A1) se describe el comportamiento del tiempo de residencia especialmente favorable en canales de corriente en forma de espiral. Un producto fluye por un canal de corriente en forma helicoidal. Con la conducción de corriente helicoidal se llega en el canal hasta el flujo secundario, las denominadas turbulencias Dean, que garantizan una mezcla intensiva y al mismo tiempo cuidadosa. Mediante el gran efecto de mezcla de la turbulencia se lleva a cabo una distribución estrecha del tiempo de residencia y de la distribución de dosis. De este modo es posible, alcanzar de forma intencionada una dosis de radiación efectiva, que es suficiente para inactivar virus sin cargar fuertemente el producto. Este denominado concepto de dosis es independiente del tamaño del módulo, de modo que se da el aumento de escala de laboratorio a escala de producción.

35 La irradiación con UV en un denominado módulo en espiral se establece principalmente de modo que se lleve a cabo un único paso corriente por el módulo en espiral. Según la turbidez del líquido que se va a procesar se puede variar la velocidad de flujo en el módulo en espiral dentro de determinados límites. Los límites resultan de la formación necesaria de la corriente secundaria y de la pérdida de presión en el módulo. Si no fuera suficiente la velocidad de flujo lo más baja posible y con ello el mayor tiempo de residencia para alcanzar la deseada inactivación de virus, sería imaginable en principio operar varios módulos en serie. Aquí sin embargo la pérdida de presión por la disposición de varios módulos en serie y la estabilidad frente a la presión de los módulos limita el número correspondientemente.

45 En el caso de extractos de sanguijuelas la absorción de líquido es tan alta (la densidad óptica a 254 nm es mayor de 50 cm^{-1}), que la profundidad de penetración de la radiación UV en un extracto de sanguijuelas se limita a la zona de la superficie y pocos micrómetros por debajo de esta. No se asegura una inactivación de virus significativa en el recorrido de un módulo en espiral individual con obtención simultánea de integridad de producto. Esto lo demostraron algunos estudios. También se excluyó la posibilidad potencial de operación de varios módulos conectados unos tras otros por motivos prácticos. Para una inactivación suficiente serían necesarios más de 4 módulos en serie. Esto sería debido a que en la práctica no sería viable la considerable pérdida de presión con la resistencia a presión limitada del equipo.

50 Adicionalmente en particular con las mezclas de principio activo complejas en extractos de sanguijuelas se da el riesgo de la formación de depósitos en la zona de irradiación, que puede amortiguar la entrada de la radiación en el medio que se va a irradiar o incluso puede evitarla por completo.

55 Cabe temer también que una irradiación con UV en extractos de sanguijuelas no constituya un procedimiento efectivo para la inactivación de virus. El problema consiste también en que la formación de un depósito se reconoce

solo con dificultad cuando el medio que se va a irradiar presenta una densidad óptica muy alta. En un caso como este no es posible incorporar un fotosensor en el medio que se va a irradiar y medir la intensidad de la radiación para comprobar la formación de depósito. Existe el riesgo de que el medio que se va a irradiar lo sea de forma insuficiente y por tanto no hay una seguridad de producto suficiente.

- 5 Partiendo del estado de la técnica se plantea el objetivo de proporcionar un procedimiento para la inactivación de virus y/o bacterias, de forma particular de virus de pequeño tamaño sin cápside, en extractos de sanguijuelas. El procedimiento buscado debe conducir a un mayor rendimiento en producto que los procedimientos clásicos como tratamiento ácido, tratamiento con disolvente, tratamiento con detergente, pasteurización y/o nanofiltración y a este respecto asegurar simultáneamente un funcionamiento económico y una alta calidad de producto. Además el
10 procedimiento buscado ofrece una posibilidad de reconocer la formación de depósitos para poder asegurar una seguridad de producto suficiente.

De forma sorprendente se ha encontrado que se puede conseguir de forma efectiva y económica una inactivación de virus y bacterias en extractos de sanguijuelas, conduciendo el extracto de sanguijuelas al circuito entre un tanque con agitador y un dispositivo de irradiación, en el que el extracto de sanguijuelas es expuesto a una irradiación con
15 luz ultravioleta.

Por tanto es objeto de la presente invención un procedimiento para la inactivación de virus y/o bacterias en un extracto de sanguijuelas fluido según la reivindicación 1.

El extracto de sanguijuelas fluido se trata preferiblemente del extracto obtenido mediante el procedimiento citado en el ejemplo 1.

- 20 Por inactivación se entiende un procedimiento que conduce a que se eviten o eliminen las propiedades no deseadas de virus y/o bacterias. La inactivación se realiza mediante irradiación con luz ultravioleta, que como se sabe es adecuada para modificar virus y/o bacterias de modo que no produzcan ya efectos dañinos para seres humanos, animales, plantas y/o medio ambiente.

- 25 Por luz ultravioleta se entiende radiación electromagnética en el intervalo de longitud de onda de 100 nm a 400 nm. Para la inactivación de virus se usa preferiblemente la denominada radiación UV-C en el intervalo de 100 nm a 280 nm, con especial preferencia en el intervalo de 200 nm a 280 nm.

De acuerdo con la invención se conduce el extracto de sanguijuelas al circuito entre un tanque con agitador y un dispositivo de irradiación. El dispositivo de irradiación se compone de uno o varios módulos en espiral conectados preferiblemente en paralelo, que se describen más detalladamente a continuación.

- 30 De forma sorprendente se consigue mediante la forma de proceder en circuito cerrado una inactivación suficiente de virus y bacterias en los extractos de sanguijuelas, sin que se llegue a daños reseñables de las proteínas contenidas en el extracto de sanguijuela. La amplia distribución del tiempo de residencia condicionada por el uso de un reactor con agitador (en comparación con el paso único a través de uno o varios módulos en espiral conectado unos tras otros) y el elevado tiempo de irradiación en el único módulo a consecuencia de la forma de proceder en circuito
35 cerrado no presentan, de forma sorprendente, ningún efecto dañino para las proteínas contenidas en el extracto de sanguijuela. Además, a pesar del tiempo de proceso correspondientemente prolongado en el único módulo en espiral, no se forman depósitos o agregados importantes.

- 40 De forma sorprendente se ha encontrado que en el procedimiento de acuerdo con la invención se pueden inactivar virus y bacterias mediante irradiación con luz ultravioleta incluso en extractos de sanguijuelas con una densidad óptica mayor de 70. Preferiblemente se usan extractos de sanguijuelas con una densidad óptica en el intervalo de 10 a 72, con especial preferencia en el intervalo de 30 a 65, con muy especial preferencia en el intervalo de 40 a 60.

Por densidad óptica OD (también denominada extinción) se entiende el logaritmo decimal de la relación de la intensidad I_0 de la radiación que incide en un medio y la intensidad I de la radiación que sale del medio:

$$OD = \lg (I_0/I)$$

- 45 La densidad óptica depende de la longitud de onda de la radiación usada. En el presente documento se da la densidad óptica con una longitud de onda de 254 nm.

El extracto de sanguijuelas se conduce de acuerdo con la invención en circuito cerrado. La relación de caudal bombeado a volumen total se encuentra en el intervalo de 0,5 a 80 l/h, preferiblemente en el intervalo de 1 a 60 l/h, con especial preferencia en el intervalo de 3 a 45 l/h.

5 La temperatura del extracto se mantiene durante la realización del procedimiento de acuerdo con la invención a una temperatura en el intervalo de 2 °C a 25 °C, preferiblemente en el intervalo de 4 °C a 20 °C, con especial preferencia en el intervalo de 8 °C a 15 °C.

En una forma de realización preferida, antes y/o después de que un preparado se haya irradiado en un circuito cerrado, se hace pasar por uno o varios circuitos cerrados un medio transparente y se registra la intensidad de la radiación que incide en el medio transparente o que atraviesa el medio transparente en la zona de irradiación.

10 La densidad óptica de un extracto de sanguijuelas es demasiado alta para que se pueda medir durante la irradiación del extracto una medida de la intensidad de radiación que penetra en el extracto de sanguijuelas o incluso que pasa por el extracto de sanguijuela. Sin embargo se da el riesgo de que en el transcurso de la irradiación se llegue a una formación de depósitos en la pared interior de un módulo de irradiación. La consecuencia de una formación de depósitos sería una intensidad de radiación reducida que entra en el extracto. De este modo ya no se aseguraría
15 una inactivación completa de virus y/o bacterias. Por tanto se hace pasar antes y/o después de la irradiación del extracto de sanguijuelas un medio transparente por el dispositivo y se mide la intensidad de la radiación que entra en el medio o que pasa por el medio. Si la intensidad de radiación antes y después de la radiación del extracto de sanguijuelas es igual o se aproxima, puede excluirse una formación de depósitos y se irradia la siguiente carga de extracto de sanguijuela. Si se registra una disminución significativa de la intensidad de radiación entonces se puede
20 suponer que se ha formado un depósito en la pared interior de un módulo de irradiación, que se debería separar antes de la siguiente carga. De forma alternativa se puede plantear también aumentar la intensidad de radiación y/o la cantidad de circuitos cerrados para compensar correspondientemente la intensidad de radiación reducida.

Por un medio transparente se entiende un medio que presenta para un campo de longitudes de onda de irradiación aplicado una densidad óptica inferior a 10 (preferiblemente medido a 254 nm).

25 Preferiblemente se usa como medio de transparente agua o una solución tampón acuosa. Como solución tampón es adecuada, por ejemplo, una solución de sal tamponada con fosfato (PBS) u otro sistema tampón orgánico / inorgánico.

Adicionalmente a la formación de depósitos se debe evitar también una formación de agregados condicionada por radiación en el líquido, tanto en lo referente al producto, como también en lo referente a los componentes
30 secundarios o ambos. Sin embargo en la forma de proceder en circuito cerrado del extracto de sanguijuelas apenas se pudo observar de forma sorprendente formación de agregados en la realización de acuerdo con la invención.

El procedimiento de acuerdo con la invención se lleva a cabo en un dispositivo que comprende al menos un tanque con agitador, un dispositivo de irradiación y un medio de transporte para el extracto de sanguijuelas.

35 Por tanque con agitador se entiende un recipiente en el que se puede almacenar el extracto de sanguijuela, y que comprende los medios para mezclar el extracto de sanguijuelas que se encuentra en el recipiente. Por lo general se usan como medios para la mezcla agitadores como, por ejemplo, un agitador de paletas. El recipiente puede estar hecho, por ejemplo, de vidrio, acero inoxidable o un plástico.

40 El medio de transporte sirve para el transporte del medio fluido desde el tanque con agitador, pasando por el dispositivo de irradiación y de vuelta al tanque con agitador. Como medio de transporte es adecuado, por ejemplo, una bomba.

El dispositivo para la realización del procedimiento de acuerdo con la invención se caracteriza porque el tanque con agitador, el dispositivo de irradiación y el medio de transporte están conectados entre sí de modo que el extracto de sanguijuelas se puede conducir desde el tanque con agitador, pasar por el dispositivo de irradiación y volver de nuevo al tanque con agitador.

45 El dispositivo de irradiación comprende uno o varios módulos en espiral preferiblemente conectados en paralelo.

Por un módulo en espiral se entiende un dispositivo que proporciona al menos una fuente de radiación electromagnética y un canal que discurre de modo helicoidal en torno a un eje. Ejemplos de tales módulos de espiral se representan en la publicación WO 2002/038502A1 en las figuras 5, 6, 7, 8, 9 ó 10. El canal que discurre helicoidalmente está dispuesto preferiblemente de modo que está circundado por una fuente de radiación
50 electromagnética. Se puede plantear asociar otras fuentes de radiación electromagnética en torno al canal.

Si se hace fluir por un canal que discurre helicoidalmente de este tipo un medio fluido, entonces se provoca sobre el medio una mezcla transversal intensiva, uniforme que impera en toda la longitud del canal verticalmente respecto a la dirección principal de la corriente de producto. Mediante la mezcla transversal se provoca, a pesar de la característica de corriente laminar que impera en el procedimiento de acuerdo con la invención, una distribución de tiempo de residencia estrecha. Mediante la mezcla transversal se asegura adicionalmente que las capas de fluido alejadas de la fuente de radiación, que especialmente con medios de absorción intensa no contienen ninguna o poca radiación electromagnética, experimentan un intercambio intenso con las capas irradiadas cerca de la fuente de radiación. Esto y la estrecha distribución de tiempos de residencia conducen a que todos los elementos de fluido experimenten una duración y una intensidad de radiación uniformes y homogéneas, que pueden ajustarse mediante la velocidad de corriente y la intensidad de la fuente de radiación a las necesidades respectivas. Entonces se puede asegurar que se realiza una reducción efectiva de microorganismos y/o virus en el medio. En medios en los que una irradiación demasiado fuerte puede conducir a daños, se evita de forma efectiva el riesgo de que mediante una distribución de tiempos de residencia desfavorablemente amplia se llegue a una carga de radiación demasiado intensa y con ello a daños parciales.

Es imaginable que en un módulo en espiral se asocien varios canales adyacentes y discurran helicoidalmente en torno a un eje común. Un canal puede presentar un perfil de sección transversal angular, redondo, oval o semicircular. Se pueden imaginar otros perfiles de sección transversal. Preferiblemente el canal presenta un perfil en sección transversal que está aplanado por al menos una cara. Desde esta cara aplanada preferiblemente se aplica radiación electromagnética al canal. Ejemplos de tales canales se muestran en las figuras 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 en el documento WO 2002/038502A1. El perfil de sección transversal del canal tiene preferiblemente forma de D (es decir, en forma de medio grano de arroz o semielíptica), forma de rombo o forma rectangular.

Como fuente de irradiación electromagnética es adecuada cualquier fuente, que emita radiación con una longitud de onda que sea adecuada para la inactivación de virus y/o bacterias. Preferiblemente se usa una fuente para radiación UV-C como por ejemplo una lámpara de vapor de mercurio que presenta un máximo de radiación con una longitud de onda de 254 nm. Se puede plantear usar varias fuentes de radiación electromagnética.

En una forma de realización especialmente preferida el módulo en espiral comprende un cilindro hueco, sobre el que se aplica un tubo en espiral fijado por fricción o con arrastre de forma. En el cilindro hueco se aplica una fuente de radiación electromagnética sin contacto directo con el producto. Tales módulos en espiral se describen, a modo de ejemplo, en las solicitudes WO 02/38502A1, WO 02/38191A1, WO 07/096057A1, EP 1 464 342 A1 y DE 10 2009 009 108.4.

En el documento WO 07/096057A2 se describe, por ejemplo, un módulo en espiral que se caracteriza porque mediante un tubo soporte interior se coloca con arrastre de forma un tubo en espiral. De este modo se genera entre el tubo soporte y el tubo en espiral un canal, que discurre helicoidalmente desde un extremo del tubo en espiral en torno al tubo soporte hasta el otro extremo del tubo en espiral. Preferiblemente se fija el tubo en espiral por fricción sobre un cilindro hueco, como se describe en la solicitud DE 10 2009 009 108.4. Las corrientes transversales entre vueltas de canal adyacentes se pueden evitar de forma efectiva. Estas corrientes transversales conducirían de otro modo a una ampliación no deseada de la distribución de tiempos de residencia.

Los módulos en espiral se encuentran configurados preferiblemente de modo que al menos los componentes irradiados están realizados como piezas desechables.

La relación en volumen entre el tanque con agitador y el dispositivo de irradiación con uno o varios módulos en espiral se encuentra en el intervalo de 1 a 1000, preferiblemente en el intervalo de 5 a 500, con especial preferencia en el intervalo de 10 a 200. De este modo se puede cumplir un tiempo de proceso que puede incluirse bien en el curso operacional, es decir, por ejemplo en una capa.

El dispositivo para la realización del procedimiento de acuerdo con la invención va provisto preferentemente de uno o varios sensores, por ejemplo, para la irradiación (por ejemplo, sensor de UV), la presión, el estado de llenado del recipiente, la temperatura y el caudal. Adicionalmente el dispositivo está equipado preferiblemente con sensores que vigilan la correcta incorporación de los módulos en espiral y con sensores de derrame que detectan una eventual falta de estanqueidad. En una forma de realización preferida se prevén también dispositivos de seguridad. Estos pueden ser, por ejemplo: medidas para impedir una irradiación no deseada del personal de servicio (por ejemplo, un cerramiento con supervisión de puerta), cubetas de retención para el caso de un derrame, dispositivos de protección en partes de equipos móviles.

Todo el dispositivo se controla y regula preferentemente mediante un sistema de conducción de proceso. Particularmente se supervisan la temperatura, el caudal, la irradiación y el tiempo de proceso.

Los componentes del dispositivo se realizan preferiblemente con capacidad CIP (CIP = limpieza in situ), para asegurar una esterilización para aplicaciones farmacéuticas.

La invención se aclara a continuación más detalladamente en función de los ejemplos, sin que se limite la misma con ellos.

5 Estos muestran:

Figura 1: representación esquemática de un procedimiento para la preparación de un extracto de sanguijuelas bruto

Figura 2: representación esquemática de un procedimiento para la preparación de un extracto de sanguijuelas liofilizado.

10 Figura 3: representación esquemática de una forma de realización de un dispositivo para la realización del procedimiento de acuerdo con la invención.

Figura 4: representación esquemática de un módulo de irradiación.

Figura 5: representación esquemática de un cabezal de módulo de irradiación.

Figura 6: representación esquemática de un canal de flujo helicoidal, en el que se forman turbulencias Dean.

15 Figura 7: representación gráfica de la inactivación de hirudina y virus en un medio como función de la dosis de irradiación.

Ejemplo 1: procedimiento para la preparación de un extracto de sanguijuela

Primera etapa del procedimiento (preparación de extracto bruto)

La primera etapa de procedimiento para la preparación de un extracto de sanguijuelas, la preparación del extracto bruto, se representa esquemáticamente en la figura 1.

20 Se descongelaron sanguijuelas congeladas y se trituraron en dos porciones con un total de 70 a 80 kg en un denominado "cutter". Tras la trituración se diluyó la suspensión con agua purificada calentada y se transfirió al tanque de extracción, en el que se ajustó el volumen mediante adición de agua purificada. Se añadieron sal común y acetona a la primera etapa de extracción, durante la suspensión se agitó y además se reguló la temperatura. Después de la primera etapa de extracción se separó la suspensión mediante centrifugación en una fase que
25 contiene la biomasa y una fase líquida. La fase líquida se reservó. La fase sólida se recogió en agua purificada con la temperatura regulada y de nuevo se extrajo con una concentración creciente de sal común y acetona (segunda etapa de extracción). Después se centrifugó de nuevo y finalmente se llevó a cabo con mayor concentración de sal común y acetona la tercera etapa de extracción. La fase sólida que contiene biomasa se desechó a continuación. Se reunieron las fases líquidas, se filtraron y se ajustaron mediante adición de ácido tricloroacético (TCA) a un pH de 4-
30 5, preferiblemente 4,5 ($\pm 0,1$), antes de que tuviese lugar la precipitación de proteína sobre acetona congelada. El precipitado de proteína sedimenta y a continuación se separó de la fase superior de acetona. El precipitado se lavó tres veces con una mezcla de acetona-agua (80 % en v/v). Entre las etapas de lavado sedimentó el precipitado. A continuación se separó respectivamente la fase superior de acetona. El precipitado lavado se recolectó mediante filtración y se lavó con acetona. A continuación se eliminó la acetona en exceso mediante lavado con gas nitrógeno y se recogió la torta del filtro. Las tortas de filtro húmedas se pueden conservar opcionalmente congeladas. Las tortas de filtro se secaron en estufa de secado a vacío para separar acetona residual. Las tortas de filtro secas que
35 contienen el extracto bruto de sanguijuelas, se conservaron congeladas entre tanto hasta el procesamiento posterior.

Segunda parte del procedimiento (preparación de extracto de sanguijuelas (liofilizado))

40 La figura 2 muestra esquemáticamente la segunda parte del procedimiento para la preparación de un extracto de sanguijuela, la preparación del extracto de sanguijuelas liofilizado.

Se combinaron diversas tortas de filtro secadas que contienen extracto bruto de sanguijuelas y se disolvieron en agua purificada. La solución de proteína que se genera se congeló y se conservó entre tanto en un congelador. Después se descongeló la solución de nuevo y se añadió agua purificada. La solución de proteína diluida se calentó y se pasteurizó a temperatura constante durante un tiempo determinado. A continuación se enfrió la solución de

proteína hasta temperatura ambiente y se ajustó a un pH neutro de 7 a 8, preferiblemente de 7,5 ($\pm 0,1$) con ácido clorhídrico diluido o carbonato de sodio. La solución de pH ajustado se centrifugó y se reunió el sobrenadante y se conservó enfriada. El precipitado separado se lavó mediante adición de agua purificada y de nuevo centrifugación.

5 Los sobrenadantes se combinaron, homogenizaron y filtraron a continuación. En caso de necesidad se puede ajustar adecuadamente la densidad óptica OD (254 nm) mediante adición de agua purificada. Se ha evidenciado como adecuadas densidades ópticas de hasta 72. A continuación se realizó una irradiación con UV a una longitud de onda de 254 nm y una dosis adecuada. Han resultado adecuados valores de dosis de 50 a 1000 J/m², preferiblemente de 100 a 600 J/m², con especial preferencia de 250 a 350 J/m². La solución de proteína irradiada con radiación UV se filtró y concentró a continuación (ultrafiltración) para ajustar la actividad. Se filtró una vez más la solución bruta ajustada a continuación, se llenó en frascos y luego se liofilizó. El extracto de sanguijuelas liofilizado se conservó hasta su procesamiento posterior.

Ejemplo 2: dispositivo para la inactivación de contaminantes no deseados en un medio fluido con una densidad óptica elevada de más de 50

15 Se representa esquemáticamente en la figura 3 un dispositivo para la realización del procedimiento de acuerdo con la invención.

El dispositivo se compone esencialmente de un recipiente 10, por ejemplo, un tanque con agitador con un agitador 40 y uno o varios módulos de irradiación (20, 21). El medio 15 se conduce por conexiones de cable o tubo desde el recipiente 10 a través de los módulos de irradiación 20, 21 y a continuación de nuevo al recipiente 10. Esto se consigue preferiblemente con una bomba 30. Los módulos de irradiación pueden estar conectados en paralelo o en serie o también combinarse en serie y paralelo.

El módulo de irradiación es preferiblemente un módulo en espiral según la definición citada anteriormente, que comprende un espacio de irradiación en forma de espiral que se conduce en torno a una fuente de radiación en forma de varilla, que irradia con una longitud de onda de 254 nm.

25 La fuente de radiación es preferiblemente una lámpara de vapor de mercurio. El espacio de irradiación está realizado, al menos en la cara que se dirige a la fuente de radiación, de un material permeable a la radiación con la longitud de onda de 254 nm, preferiblemente de vidrio de cuarzo. Mediante la corriente conducida en forma de espiral se generan turbulencias secundarias, las denominadas turbulencias Dean 200 (véase la figura 6), que generan una mezcla transversal eficiente y efectiva del líquido también en régimen de corriente laminar. De este modo se irradian todas las partes del líquido en el paso de la corriente del módulo en una capa próxima a la pared.

30 Adicionalmente se provoca con esta conducción de corriente una reducción del tiempo de residencia.

Se muestra en la figura 4 una forma de realización preferida de un módulo en espiral.

En esta forma de realización preferida el módulo en espiral comprende un tubo de teflón 90, que presenta una entalladura en forma de espiral y con ello una espiral remarcada. En este tubo de teflón se incorpora un tubo de cuarzo 100 fijado por fricción. Mediante este diseño se separan las espirales 95 individuales unas de otras y se genera un sistema de conducción por tubo en espiral. En el interior de los tubos de cuarzo 100 se incorpora una lámpara UV 80. Esta posición hace posible que la solución que fluye por las espirales sea irradiada de forma máxima durante todo su paso por el reactor.

40 La entrada de líquido se realiza preferiblemente por una entrada inferior y así es posible una entrada sin burbujas de distintas soluciones. En los extremos inferior y superior del módulo de irradiación se encuentra respectivamente un cabezal de reactor (véase la figura 5), que está destinado a la alimentación de líquido o salida de líquido. Mediante una abertura encastrada 110 se puede comprobar mediante un sensor UV el rendimiento de la fuente de radiación.

En la figura 4 significan:

D = diámetro medio de una espiral

b = anchura del canal de corriente semielíptico

45 L = longitud del tubo de teflón

a = altura media de una espiral

i = distancia entre dos espirales

R_{QR} = mitad del diámetro exterior del tubo de cuarzo

Ejemplo 3: procedimiento para el tratamiento del extracto de sanguijuelas del ejemplo 1 en el dispositivo del ejemplo 2

- 5 Se irradió un extracto de sanguijuelas del procedimiento según el ejemplo 1 con un dispositivo según el ejemplo 2 con un módulo de irradiación. A tal fin se dispuso un volumen de 230 ml de extracto, al que se añadió una pequeña cantidad (>10 %) de solución madre de virus (Minute Virus of Mice). La densidad óptica era de 53,3. Se bombeó el extracto mediante una bomba de manguera con 10 l/h a través de un módulo de irradiación de 24 ml, se irradió ahí con luz UV a 254 nm, y se devolvió al dispositivo (procediendo en circuito cerrado). Después de 0, 10, 20 y 30 minutos se recogió una muestra del dispositivo. Esto corresponde a una dosis de irradiación de 0, 97, 198 o 303 J/m². De cada muestra se determinó mediante un ensayo estándar la actividad del virus y la actividad del principio activo hirudina en el extracto.

- 15 Los resultados se representan gráficamente en la figura 7. La figura 7 muestra la inactivación de hirudina y los virus añadidos como función de la dosis de irradiación. El resultado muestra el claro efecto inactivante de virus al mismo tiempo que el bajo nivel de daño del principio activo. Sin embargo debido a que el daño del principio activo está presente, para una desactivación de virus mínima predeterminada se debe seleccionar una irradiación lo más precisa posible para evitar pérdidas innecesarias.

Referencias

- 10 tanque con agitador
- 20 15 Medio (extracto de sanguijuela)
- 20 Módulo en espiral
- 21 Módulo en espiral
- 30 Medio de transporte (por ejemplo, bomba)
- 40 Agitador
- 25 50 Envoltura de refrigeración
- 80 Fuente de irradiación
- 90 Tubo de teflón
- 95 Espiral
- 100 Tubo de vidrio de cuarzo
- 30 110 Abertura que se puede cerrar para la colocación de un sensor
- 120 Entrada / salida
- 150 Entrada
- 160 Salida

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la inactivación de virus y/o bacterias en un extracto de sanguijuela, caracterizado porque el extracto de sanguijuelas se hace circular entre un tanque con agitador y un dispositivo de irradiación, en el que el medio está sometido a una irradiación con luz ultravioleta.
- 5 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la irradiación con luz ultravioleta se realiza en el intervalo de 100 nm a 280 nm, preferiblemente en el intervalo de 200 nm a 280 nm.
3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque el extracto de sanguijuelas presenta con una longitud de onda de 254 nm una densidad óptica en el intervalo de hasta 72, preferiblemente en el intervalo de 30 a 65, con especial preferencia en el intervalo de 40 a 60.
- 10 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la relación de caudal volumétrico bombeado respecto al volumen total se encuentra en el intervalo de 0,5 a 80 l/h, preferiblemente en el intervalo de 1 a 60 l/h, con especial preferencia en el intervalo de 3 a 45 l/h.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la temperatura del extracto de sanguijuelas se mantiene en el intervalo de 2 °C a 25 °C, preferiblemente en el intervalo de 4 °C a 20 °C, con especial preferencia en el intervalo de 8 °C a 15 °C.
- 15 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque antes y/o después de la irradiación del extracto de sanguijuelas se hace pasar un medio transparente a través de la instalación y se mide la intensidad de la irradiación introducida en el medio o que pasa por el medio.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque la relación de volumen entre el tanque con agitador (15) y el dispositivo de irradiación (20/21) se encuentra en el intervalo de 1 a 1000, preferiblemente en el intervalo de 5 a 500, con especial preferencia en el intervalo de 10 a 200.
- 20 8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque el dispositivo de irradiación está formado por uno o varios módulos en espiral (20/21) conectados preferiblemente en paralelo, siendo un módulo de espiral un dispositivo que proporciona al menos una fuente de irradiación ultravioleta y al menos un canal que discurre de modo helicoidal en torno a un eje.
- 25 9. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado porque el canal que discurre helicoidalmente (95) está dispuesto de modo que pasa en torno a una fuente de irradiación ultravioleta (80).
10. Procedimiento según la reivindicación 8 ó 9, caracterizado porque el canal (90) presenta un perfil en sección transversal que está aplanado al menos por una cara, y preferiblemente por esta cara aplanada se aplica irradiación ultravioleta (80) en el canal.
- 30 11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 8 a 10, caracterizado porque el perfil en sección transversal del canal (90) tiene forma de D, forma de rombo o forma rectangular.
12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 8 a 11, caracterizado porque el módulo en espiral (90) comprende un cilindro hueco (100), sobre el que se monta un tubo en espiral fijado por fricción o en arrastre de forma (90/95) y en el que se introduce una fuente de irradiación ultravioleta.
- 35 13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 8 a 12, caracterizado porque el módulo en espiral está configurado de modo que al menos los componentes irradiados (90/95/100) se realizan como piezas desechables.

Fig. 1

Proceso de extracción de sanguijuelas

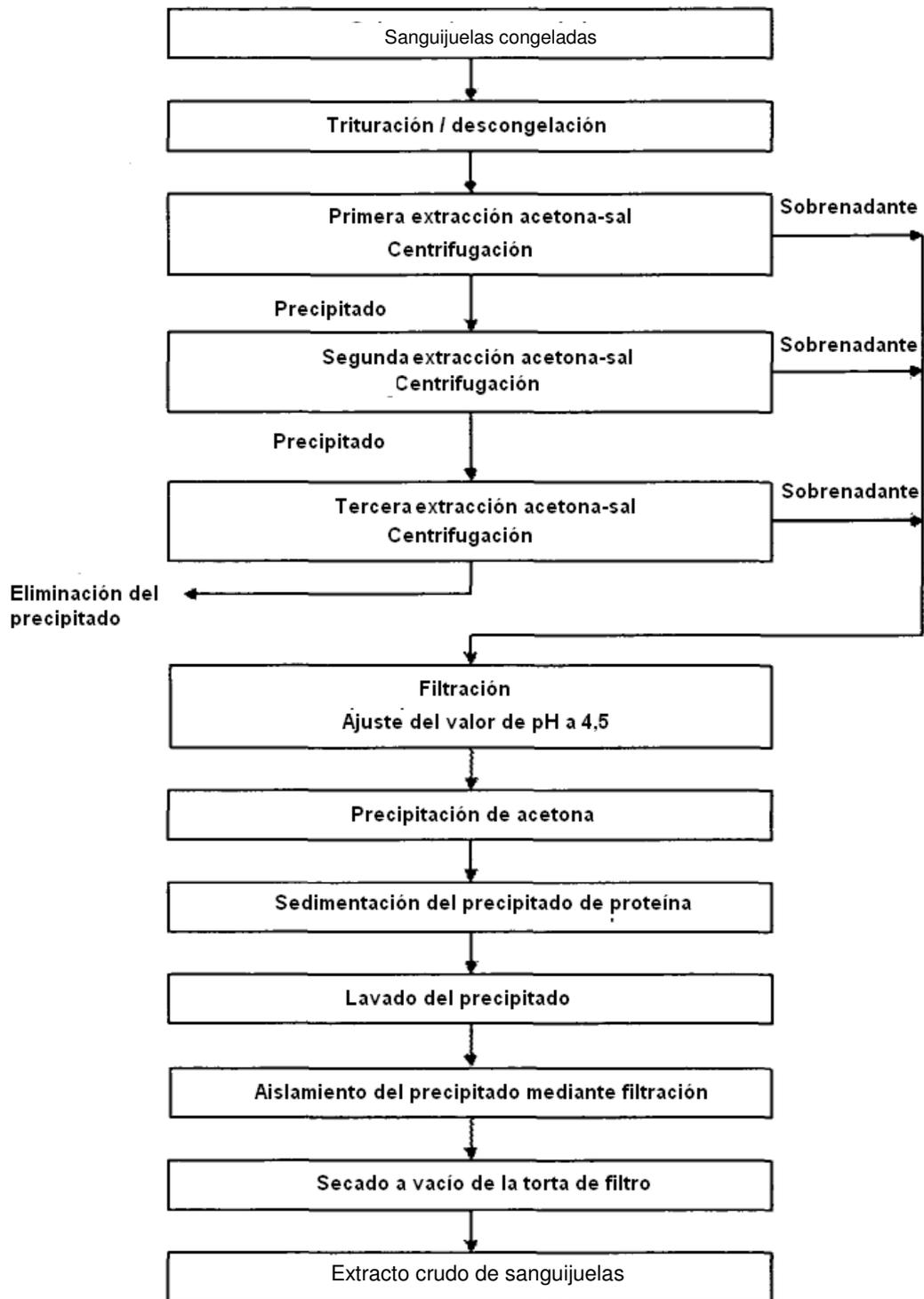


Fig. 2

Preparación de extracto de sanguijuelas (lío­filizado)

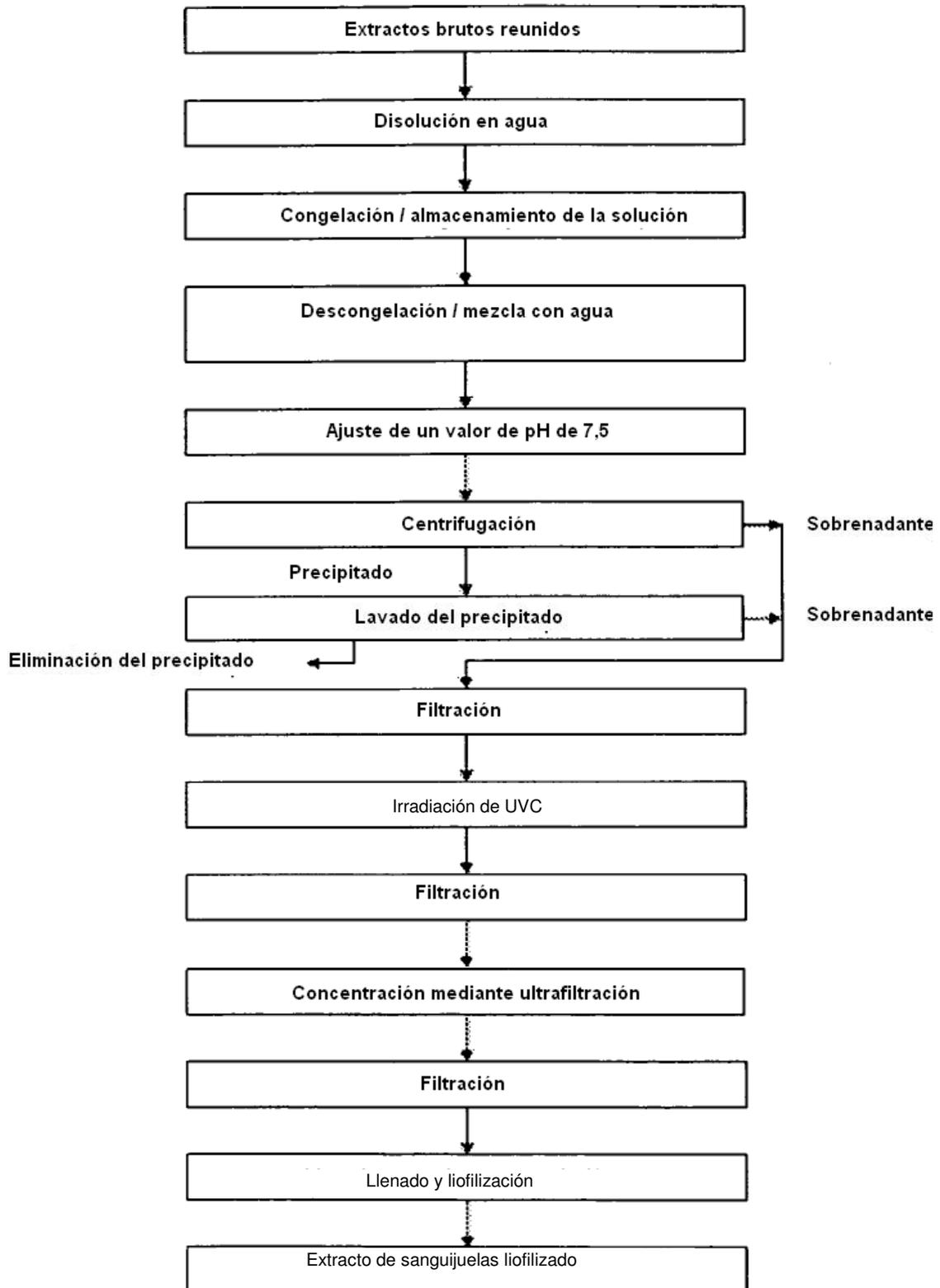


Fig. 3

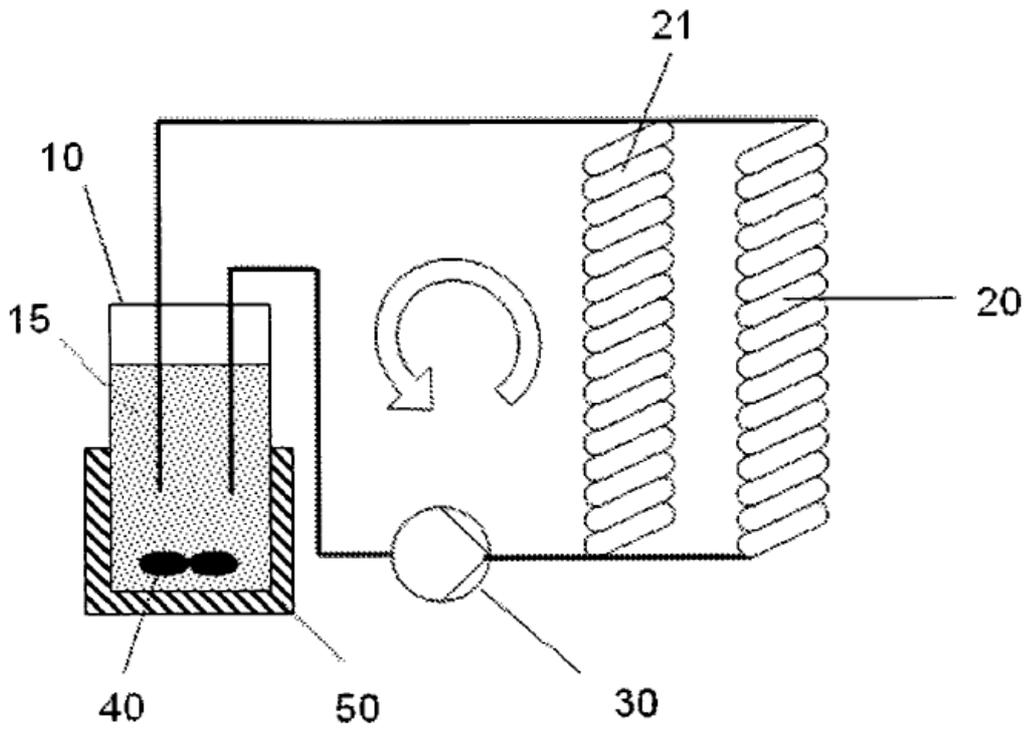


Fig. 4

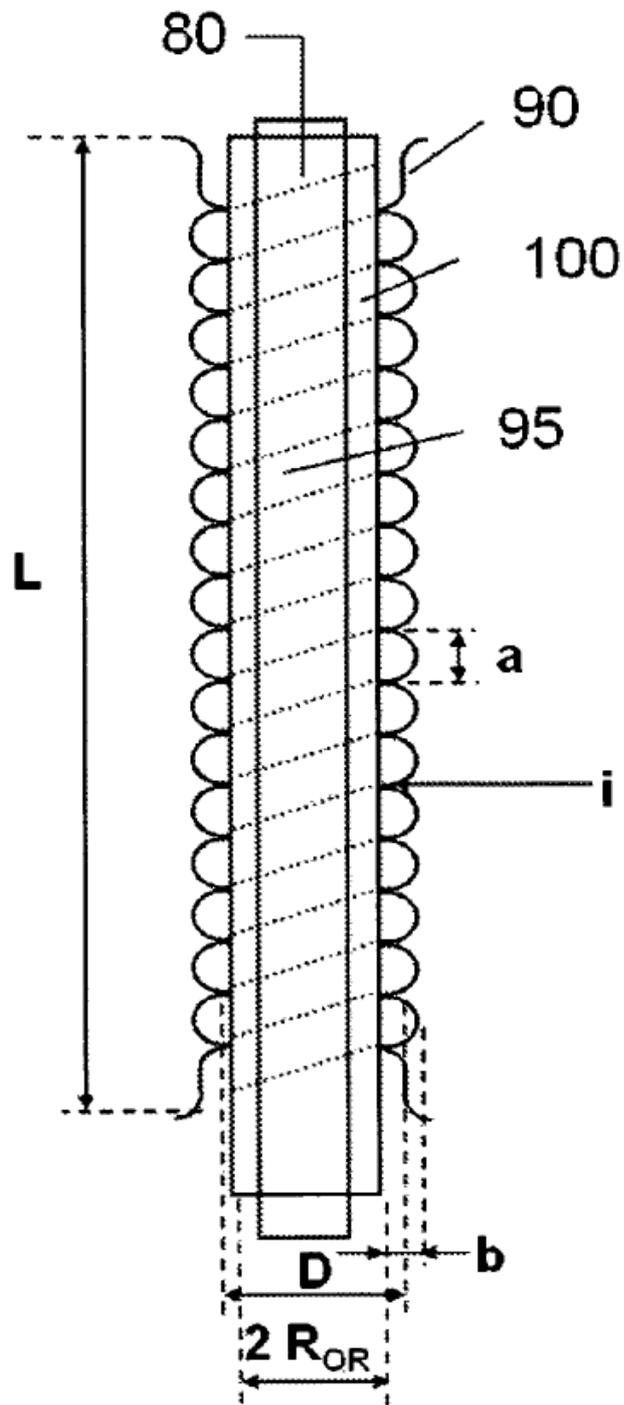


Fig. 5

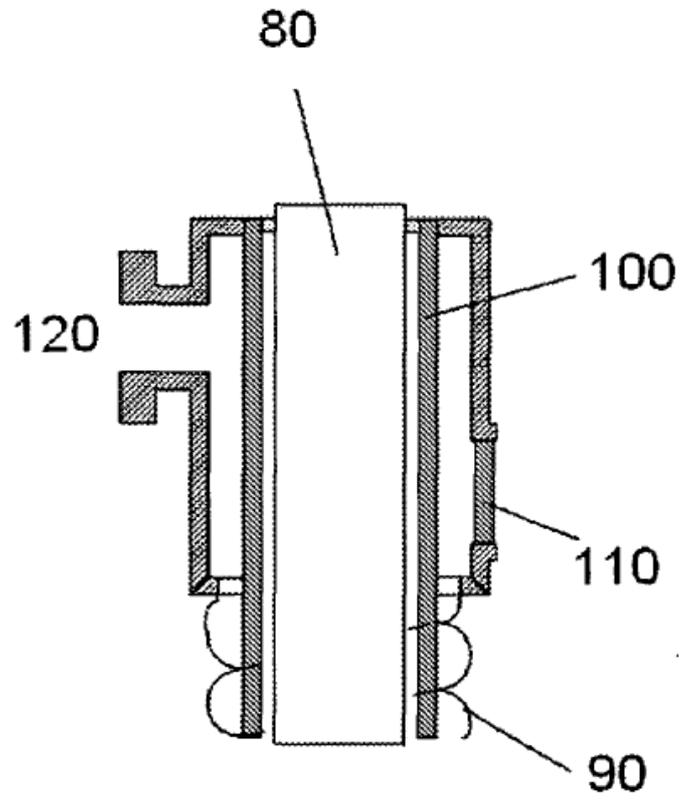


Fig. 6

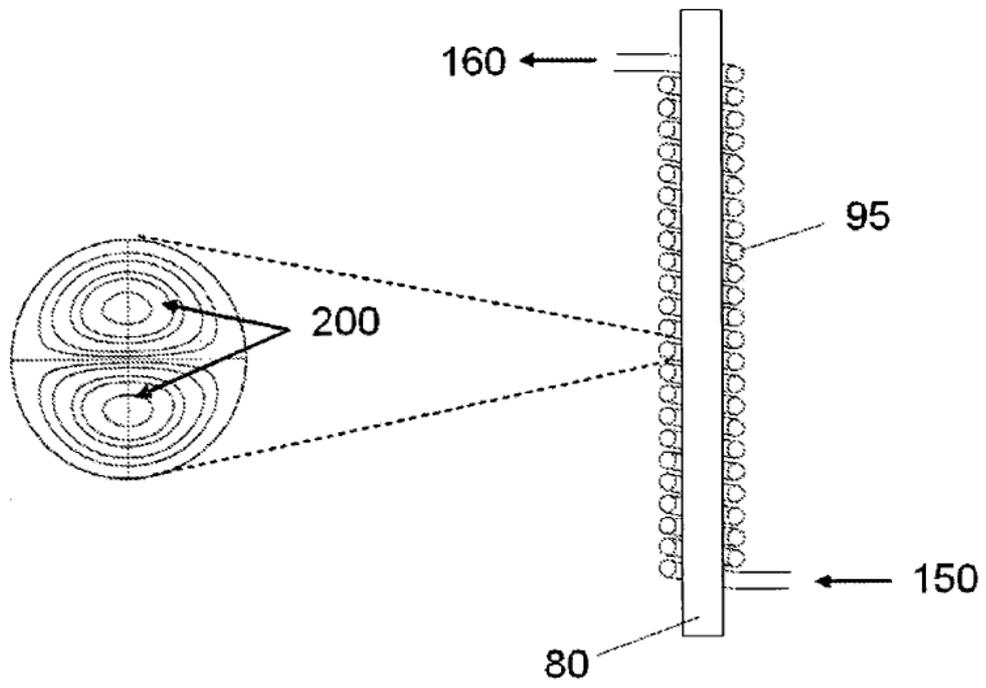


Fig. 7

