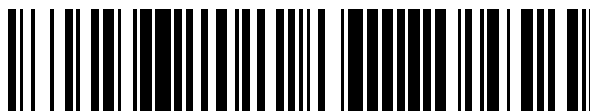


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 637**

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 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.08.2009 E 09805986 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.12.2014 EP 2328623**

54 Título: **Procedimiento para la reducción de la carga vírica y microbiana de extractos que contienen sólidos obtenidos del páncreas de animales**

30 Prioridad:

27.08.2008 DE 102008039860

12.06.2009 EP 09007797

16.06.2009 WO PCT/EP2009/004318

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

30.03.2015

73 Titular/es:

NORDMARK ARZNEIMITTEL GMBH & CO. KG
(100.0%)

Pinnauallee 4
25436 Uetersen, DE

72 Inventor/es:

RÄMSCH, CHRISTIAN;
SCHRÄDER, THOMAS;
MOEST, THOMAS y
KURFÜRST, MANFRED

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 532 637 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 reducción de la carga vírica y microbiana de extractos que contienen sólidos obtenidos del páncreas de animales

Campo de aplicación

- 5 La invención se refiere a un procedimiento para la reducción de la carga vírica y microbiana de extractos biológicos que contienen sólidos, a un extracto biológico que contiene sólidos preparado mediante este procedimiento así como a usos de un extracto biológico que contiene sólidos de este tipo.

Estado de la técnica

10 Los extractos que se obtienen de material de partida biológico pueden presentar una alta carga vírica. Los virus son ácidos nucleicos que están rodeados por una envuelta proteica. A los virus envueltos se le añade además una envuelta lipídica externa. Ya que los virus no se pueden replicar de forma autónoma, dependen de huéspedes. Por consiguiente aparecen en prácticamente todos los seres vivos de la Tierra. Un número pequeño de los virus conocidos son patógenos para el ser humano, ya que poseen una alta especificidad de huésped. Para descartar de antemano una puesta en riesgo de los consumidores, los extractos que están destinados al consumo humano o que se emplean como principio activo en fármacos fundamentalmente deben presentar la menor carga vírica posible o ninguna carga vírica. No siempre el procedimiento de producción en sí conduce a una inactivación o retirada significativa de los virus existentes, de tal manera que, en particular durante la preparación de principios activos farmacéuticos, se tienen que integrar en el procedimiento etapas adicionales de reducción de la concentración o inactivación.

20 El documento WO-A-2007/014896 desvela el tratamiento térmico de un extracto de pancreatina para la reducción de la carga vírica.

25 Para la reducción de la concentración o la inactivación de virus y microorganismos son conocidos numerosos procedimientos. Además de la retirada mecánica mediante, por ejemplo, cromatografía o filtración, estas contaminaciones se pueden inactivar selectivamente mediante la adición de compuestos químicos. Pero el último procedimiento es problemático en el sentido de que se tienen que volver a retirar por completo estos compuestos para que no causen efectos tóxicos en el producto final. Los procedimientos físicos tales como, por ejemplo, tratamiento térmico o irradiación también son procedimientos habituales para la inactivación de virus o microorganismos.

30 Un desafío en particular es la inactivación o la retirada de virus de extractos biológicos complejos, cuya sustancia eficaz son mezclas de enzimas, sin destruir o cambiar a este respecto la actividad enzimática de las proteínas.

Es de interés económico particular el principio activo farmacéutico pancreatina que se obtiene como extracto del páncreas de cerdo y que se aplica en forma seca como agente terapéutico oral, tal como se describe en el documento DE 3248588 A1.

35 Un procedimiento típico para la preparación de pancreatina se describe a continuación con referencia a la Fig. 1. Las glándulas pancreáticas 1 procedentes de cerdos domésticos en primer lugar se trituran 2 y se someten a una autólisis 3. Mediante filtración 4 del producto intermedio obtenido de este modo se obtiene el filtrado de criba 5. Las enzimas que se encuentran en el filtrado de criba a continuación se precipitan 6, la mezcla se filtra 7 y se obtiene la torta de filtro 8. Finalmente, la torta de filtro obtenida se muele 9, se seca al vacío 10 y se vuelve a moler, por lo que se obtiene la pancreatina. Las etapas del procedimiento indicadas con las referencias 2 a 10 conducen respectivamente a productos intermedios que se denominan en los sucesivos pasos intermedios.

45 Las sustancias eficaces en la pancreatina son, entre otras, distintas enzimas que degradan polímeros tales como lipasas, amilasas y proteasas. Una condición para la eficacia del agente terapéutico es que estén presentes todas las enzimas en una determinada proporción y en una forma activa en el principio activo. Una particularidad de la pancreatina es que las enzimas contenidas están presentes parcialmente en solución y parcialmente unidas a partículas y, por tanto, se trata de una suspensión.

50 Las investigaciones con respecto a la carga vírica de pancreatina han mostrado que los virus envueltos, pero no los no envueltos, se inactivan significativamente mediante el procedimiento actual de producción. Básicamente, los principios activos farmacéuticos no deben contener virus infecciosos. Ya que los procedimientos actuales de producción al parecer no están en disposición de eliminar una contaminación potencialmente existente de virus no envueltos con un margen suficiente de seguridad, se tienen que implementar etapas adicionales reductoras de virus.

55 Los procedimientos clásicos de inactivación de virus tales como, por ejemplo, calor seco o húmedo o procedimientos que disminuyen la concentración de virus tales como, por ejemplo, filtración o cromatografía, en la mayoría de los casos no se pueden aplicar en extractos de material de partida biológico y en particular en extractos de órganos sin cambio de la composición y/o elevadas pérdidas de producto. Un problema particular de estos extractos son, frecuentemente, los constituyentes no disueltos que les confieren una propiedad de tipo suspensión. Por ello se

produce el bloqueo de filtros o de columnas de cromatografía. Además, las sustancias eficaces con frecuencia están distribuidas en la fracción disuelta al igual que en la particulada y, por lo tanto, se retiran parcialmente mediante procedimientos de separación mecánicos.

5 Son conocidos otros procedimientos para la inactivación de virus, bacterias y hongos en materiales biológicos. Por ejemplo, el documento WO 02/056824 A2 describe la inactivación de patógenos en materiales biológicos mediante la aplicación de una alta presión. La invención se refiere al tratamiento de plasma sanguíneo, es decir, una solución de sustancias biológicamente activas en agua. Bradley D. W. y col. describen en "Pressure cycling technology: a novel approach to virus inactivation in plasma" (Transfusion, 40, 2000, 193) también un procedimiento para el tratamiento de plasma sanguíneo.

10 El tratamiento a alta presión de alimentos se ha descrito de diversas maneras. Por ejemplo, se pueden tratar mariscos con alta presión para inactivar norovirus o virus de la hepatitis A (Kingsley y col., Inactivation of a Norovirus by High-Pressure Processing, Appl. Environ. Microbiol. 2007, 581; Calci y col., High-Pressure Inactivation of Hepatitis A Virus within Oysters, Appl. Environ. Microbiol. 2005, 339). El tratamiento debe conservar las propiedades organolépticas del alimento. La actividad biológica de enzimas u otros principios activos después del tratamiento a
15 alta presión no se ha examinado. Además, en ambos casos se han examinado sólidos.

Sin embargo, también es sabido que no se puede predecir sin más si mediante tratamiento a alta presión se logra en realidad una inactivación de determinados virus (Grove S. F. y col., Inactivation of Foodborne Viruses of Significance by High Pressure and other Processes, J. Food Prot. 2006, 667). En función de si se trata de muestras líquidas o
20 muestras sólidas, a causa de la distinta compresibilidad de las muestras se tienen que seleccionar diferentes condiciones del procedimiento.

Además, el tratamiento a alta presión puede conducir a un cambio de los alimentos. Por ejemplo, los frutos adoptan un color marrón cuando se someten a un tratamiento de este tipo. Este cambio cromático se debe a una reacción enzimática, lo que deja deducir un cambio de la actividad biológica de estas enzimas.

25 Existe una dificultad particular en muestras biológicas que no están presentes en una forma sustancialmente homogénea. En el caso de un extracto que contiene sólidos en forma de una suspensión se encuentran partes de los principios activos biológicamente activos en la fase líquida, otras partes en las partículas de sólidos dispersadas. Una inactivación de virus en las partes de sólidos, por tanto, puede estar asociada a una destrucción de los principios activos que se encuentran en la fase líquida, ya que la compresibilidad de la fase líquida es mayor que la de las partículas de sólidos.

30 La pancreatina o los pasos intermedios que se producen durante la preparación representan a causa de su carga vírica natural y su carácter de suspensión extractos biológicos que contiene sólidos ilustrativos. En experimentos de adición puntual clásicos añaden a la sustancia correspondiente puntualmente cepas de laboratorio distintas y se determina el título antes y después del tratamiento.

35 Además existe una necesidad de procedimientos en los que se reduzcan las cargas víricas y bacterianas contenidas en un extracto biológico que contiene sólidos por completo o a un mínimo. El procedimiento tiene que ser adecuado del mismo modo para sólidos y suspensiones. El procedimiento debe posibilitar en particular la inactivación de virus no envueltos en la pancreatina.

Objetivo, solución, ventaja

40 El objetivo de la invención es eliminar las desventajas según el estado de la técnica. Debe indicarse en particular un procedimiento para la reducción de la carga vírica y microbiana de extractos biológicos que contienen sólidos que sea adecuado para sólidos y suspensiones, que no reduzca sustancialmente la actividad de las enzimas contenidas en el extracto biológico, que no empeore las propiedades farmacológicamente deseadas y que no genere ningún compuesto químico tóxico.

Además, se deben indicar extractos preparados mediante el procedimiento y usos de tales extractos.

45 Este objetivo se consigue mediante las características de la reivindicación 1. Resultan configuraciones apropiadas de la invención a partir de las características de las reivindicaciones dependientes.

Según la invención está previsto un procedimiento para la reducción de la carga vírica y microbiana de extractos biológicos que contienen sólidos que comprende las etapas

50 (a) facilitación del extracto biológico que contiene sólidos que comprende al menos un principio activo biológicamente activo seleccionado de enzimas, proteínas y péptidos o una mezcla de tales principios activos; y

(b) sometimiento del extracto facilitado en la etapa (a) a un tratamiento a alta presión a una presión en el intervalo de 300 a 600 MPa (de 3000 a 6000 bar);

correspondiéndose la actividad biológica del extracto biológico que contiene sólidos después del tratamiento a alta presión al menos al 50 % de la actividad biológica del extracto biológico que contiene sólidos antes del tratamiento a

alta presión,
caracterizado

por que se ha obtenido el extracto biológico que contiene sólidos del páncreas de animales y

5 por que el extracto biológico que contiene sólidos se facilita como suspensión que comprende una fase líquida y partículas de sólidos dispersas en la misma, estando la mezcla de principios activos biológicamente activos en una parte disuelta en la fase líquida y en otra parte unida a las partículas de sólidos.

En el presente documento, por la expresión "extracto biológico que contiene sólidos" se ha de entender un extracto que comprende un principio activo biológicamente activo seleccionado de enzimas, proteínas y péptidos o una mezcla de tales principios activos. Se prefiere que el extracto biológico que contiene sólidos comprenda una mezcla de los principios activos biológicamente activos mencionados. En lo sucesivo, el extracto biológico que contiene sólidos por motivos de simplicidad se denomina también extracto.

10 El extracto biológico que contiene sólidos preferentemente es un extracto que se ha obtenido como extracto alcohólico o acuoso de órganos animales. El principio activo biológicamente activo contenido o la mezcla de principios activos pueden estar presentes en el extracto tanto en solución como unidos a sólidos. Un extracto biológico que contiene sólidos de este tipo es un extracto complejo. El principio activo biológicamente activo o la mezcla de tales principios activos preferentemente presenta actividad farmacéutica.

Por la expresión "principio activo biológicamente activo" se entiende principios activos farmacéuticos y principios activos terapéuticos. Los principios activos biológicamente activos en el sentido de la presente invención son, por ejemplo, enzimas, proteínas y péptidos.

20 Son ejemplos de extractos biológicos que contienen sólidos de acuerdo con la invención extractos que se obtienen en particular del páncreas del cerdo. Son ejemplos especiales la pancreatina así como los pasos intermedios que se producen durante su preparación. Estos pasos intermedios están indicados con las referencias 2 a 10 en la Fig. 2. Son ejemplos preferentes de estos pasos intermedios el filtrado de criba (referencia 5 en la Fig. 2) y la torta de filtro (referencia 8 en la Fig. 2), después de cuya obtención se lleva a cabo un tratamiento a alta presión, es decir el filtrado de criba y/o la torta de filtro se pueden someter a un tratamiento a alta presión (referencia 13 o 14 en la Fig. 2). Del páncreas se obtiene pancreatina como principio activo farmacéutico. La pancreatina así como los pasos intermedios que se producen durante la preparación contienen, entre otras, las enzimas lipasa, amilasa y proteasa. Por tanto, son extractos biológicos que contienen sólidos en el sentido de la presente invención. Los extractos se facilitan preferentemente como extractos acuosos-alcohólicos en la etapa (a) del procedimiento de acuerdo con la invención.

30 El procedimiento de acuerdo con la invención se puede aplicar a todas las formas de virus, tales como virus ADN y ARN, virus envueltos y no envueltos, además a viriones y priones o sistemas biológicos similares así como bacterias y hongos. El procedimiento se usa preferentemente para la reducción de la carga de virus no envueltos en la pancreatina del páncreas del cerdo o en pasos intermedios correspondientes que se producen durante la preparación (véase la Fig. 2).

35 El procedimiento de acuerdo con la invención permite la reducción de la carga vírica y de microorganismos de extractos biológicos que contienen sólidos sin que se reduzca sustancialmente su actividad enzimática, empeoren las propiedades farmacológicamente pretendidas o se generen compuestos químicos tóxicos.

40 La actividad biológica del extracto biológico que contiene sólidos después del tratamientos a alta presión debería ascender al menos al 50 % de la actividad biológica del extracto biológico que contiene sólidos antes del tratamiento a alta presión, preferentemente al menos al 80 %, de forma particularmente preferente al menos al 90 %.

45 Si al menos uno de los principios activos biológicamente activos que están contenidos en el extracto es una enzima, entonces la actividad enzimática del extracto biológico que contiene sólidos después del tratamiento a alta presión debería ascender al menos al 50 % de la actividad enzimática del extracto biológico que contiene sólidos antes del tratamiento a alta presión, preferentemente al menos al 80 %, de forma particularmente al menos al 90 %.

50 La capacidad de infección vírica del extracto biológico que contiene sólidos después del tratamiento a alta presión debería haberse reducido en un factor mayor de 1 \log_{10} , preferentemente mayor de 3 \log_{10} , de forma particularmente preferente mayor de 4 \log_{10} , en comparación con la capacidad de infección vírica antes del tratamiento a alta presión. Esto se aplica en particular también a la capacidad de infección vírica de virus no envueltos. Por ejemplo, la capacidad de infección de virus no envueltos en la pancreatina después del tratamiento debería haberse reducido en un factor de mayor de 1 \log_{10} , preferentemente mayor de 3 \log_{10} , de forma particularmente preferente mayor de 4 \log_{10} , en comparación con su capacidad de infección antes del tratamiento. Preferentemente, la carga de gérmenes después del tratamiento a alta presión asciende a no más de 500 UFC/g, preferentemente no más de 100 UFC/g.

55 En el tratamiento a alta presión del extracto no se añaden sustancias químicas, de tal manera que la carga con sustancias tóxicas después del tratamiento no es mayor que antes del tratamiento.

El tratamiento a alta presión se realiza de acuerdo con la invención a presión constante o mediante impulsos de presión y se puede llevar a cabo en el procedimiento continuo o en el procedimiento discontinuo en aparatos correspondientes. El tiempo de acción del tratamiento a alta presión sobre el extracto facilitado en la etapa (a) asciende preferentemente a de 1 a 60 min. El tratamiento a alta presión se lleva a cabo preferentemente a temperaturas entre -20 °C y 30 °C, de forma particularmente preferente entre -10 °C y 20 °C.

La fase líquida del extracto que se somete a un tratamiento a alta presión en la etapa (b) como disolvente puede contener agua o una mezcla de agua y un disolvente orgánico. La parte de disolvente puede encontrarse en el intervalo entre el 1 y el 90 % en peso en relación con el peso de la suspensión. El disolvente usado preferentemente es un alcohol, de forma particularmente preferente isopropanol. La parte de isopropanol se encuentra normalmente entre el 5 y el 85 % en peso en relación con el peso de la suspensión.

Un extracto biológico que contiene sólidos que se ha obtenido mediante el procedimiento de acuerdo con la invención está caracterizado por una reducida carga vírica y microbiana. A pesar del tratamiento previo a alta presión, su actividad biológica, en particular su actividad enzimática no se reduce sustancialmente, sus propiedades farmacológicamente pretendidas no empeoran y no presenta ningún compuesto químico tóxico que se haya añadido durante el tratamiento.

El extracto de acuerdo con la invención obtenido mediante el tratamiento a alta presión o el principio activo biológico preparado a partir del mismo se puede usar para la preparación de fármacos, en particular en el marco de la terapia enzimática oral y como alimento o comestible o suplemento alimenticio.

Breve descripción del dibujo

A continuación se explica en detalle la invención mediante ejemplos que no deben limitar la invención con referencia a los dibujos. A este respecto muestran

- La Fig. 1, un esquema del desarrollo de un procedimiento para la preparación de pancreatina a partir de glándulas pancreáticas de cerdo según el estado de la técnica;
- La Fig. 2, un esquema de desarrollo de un procedimiento acuerdo con la invención para la preparación de pancreatina a partir de glándulas pancreáticas de cerdo;
- La Fig. 3, un diagrama que muestra las actividades enzimáticas relativas después del tratamiento de filtrado de criba del procedimiento de producción de pancreatina con diferentes presiones en porcentaje en relación con la actividad de partida de la muestra no tratada;
- La Fig. 4, un diagrama que muestra las actividades enzimáticas relativas después del tratamiento de la torta de filtro del procedimiento de producción de pancreatina con diferentes presiones en porcentaje en relación con la actividad de partida de la muestra no tratada.
- La Fig. 5, la Fig. 6 y la Fig. 7, diagramas que muestran las actividades enzimáticas relativas después del tratamiento de la torta de filtro del procedimiento de producción de pancreatina con diferentes presiones y diferentes temperaturas en porcentaje en relación con la actividad de partida de la muestra no tratada.

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

Una forma de realización del procedimiento de acuerdo con la invención para la preparación de pancreatina se describe a continuación con referencia a la Fig. 2. Las glándulas pancreáticas 1 procedentes de cerdos domésticos en primer lugar se trituran 2 y se someten a una autólisis 3. Mediante filtración 4 del producto intermedio obtenido de este modo se obtiene el filtrado de criba 5. El filtrado de criba se puede someter antes del tratamiento posterior a un tratamiento a alta presión 13. A continuación, las enzimas que se encuentran en el filtrado de criba se precipitan 6, la mezcla se filtra 7 y se obtiene la torta de filtro 8. La torta de filtro obtenida se puede someter a un tratamiento a alta presión 14. Finalmente, la torta de filtro se muele 9, se seca al vacío 10 y se vuelve a moler, por lo que se obtiene la pancreatina 12.

De acuerdo con el procedimiento representado en la Fig. 2 puede estar previsto (i) un tratamiento a alta presión del filtrado de criba 13 o (ii) un tratamiento a alta presión de la torta de filtro 14 o (iii) un tratamiento a alta presión del filtrado de criba 13 y un tratamiento a alta presión de la torta de filtro 14.

Ejemplo 1

El siguiente ejemplo describe el tratamiento de pasos intermedios del procedimiento de producción de pancreatina como extractos biológicos que contienen sólidos que se han obtenido del páncreas del cerdo a alta presión.

(1) Realización

El tratamiento se llevó a cabo en el procedimiento discontinuo en un aparato de alta presión.

5 a) Un paso intermedio disuelto en isopropanol al 40 % del procedimiento de producción de pancreatina (filtrado de criba con aproximadamente el 5 % en peso de parte de sólidos en relación con el peso del filtrado de criba, véase la referencia 13 de la Fig. 2) se sometió durante 5 min a 15 °C a un tratamiento a alta presión a 400, 500 y 600 MPa (4000, 5000 y 6000 bar).

b) Como alternativa, en las mismas condiciones se llevó a cabo un tratamiento a alta presión con torta de filtro (véase la referencia 14 de la Fig. 2, parte de sólidos aproximadamente el 50 % en peso, parte líquida, compuesta de aproximadamente el 80 % en peso de isopropanol y aproximadamente el 20 % en peso de agua).

10 Para ambas muestras se determinó la actividad de lipasa, amilasa y proteasa en comparación con una muestra no tratada.

(2) Valoración

15 Los resultados representados muestran que las tres actividades enzimáticas medidas en la torta de filtro (Fig. 2) tampoco disminuyen significativamente con un tratamiento a alta presión con 600 MPa (6000 bar) (Fig. 4). La actividad de la lipasa era estable también en el filtrado de criba (Fig. 2) a todas las presiones. A diferencia de esto disminuyó claramente la actividad de la amilasa en el filtrado de criba a presiones > 400 MPa (> 4000 bar) (Fig. 3).

Ejemplo 2

El siguiente ejemplo describe el tratamiento de la torta de filtro del procedimiento de producción de pancreatina que se ha obtenido del páncreas de cerdo a alta presión.

(1) Realización

20 El tratamiento se llevó a cabo en el procedimiento discontinuo en un aparato de alta presión.

La torta de filtro (véase la referencia 14 de la Fig. 2, parte de sólidos aproximadamente el 50 % en peso, parte líquida, compuesta de aproximadamente el 80 % en peso de isopropanol y aproximadamente el 20 % en peso de agua) se sometió a distintas presiones y temperaturas a un tratamiento a alta presión.

25 Para todas las muestras se determinó la actividad de lipasa, amilasa y proteasa en comparación con una muestra no tratada.

(2) Valoración

30 Los resultados representados muestran que la inactivación de las enzimas de la torta de filtro (Fig. 2) depende tanto de la presión como de la temperatura. La actividad de la lipasa presentó la máxima estabilidad y no se inactivó significativamente incluso a presiones de 700 MPa (7000 bar) (Fig. 5). A diferencia de esto, la amilasa mostró la mayor sensibilidad frente a un tratamiento a alta presión. Las temperaturas bajas tuvieron una influencia estabilizante sobre las actividades enzimáticas (Fig. 5).

Ejemplo 3

El siguiente ejemplo describe la inactivación del virus FCV no envuelto mediante alta presión (FCV = calicivirus felino).

35 (1) Realización

El tratamiento se llevó a cabo en el procedimiento discontinuo en un aparato de alta presión.

Una solución madre de FCV en medio de cultivo se sometió a diferentes presiones y temperaturas durante diferentes tiempos a un tratamiento a alta presión. El título del virus se determinó en la muestra de partida y en las muestras tratadas.

40 (2) Valoración

45 Los resultados representados (Tabla 1) muestran que el título del virus mediante el tratamiento a alta presión en todas las muestras, a excepción de la muestra que se había tratado a 20 °C, 5 min con 400 MPa (4000 bar), disminuye hasta por debajo del límite de comprobación de 1,9 log. A partir de la diferencia del título del virus entre la muestra no tratada y las muestras tratadas resulta un factor de reducción de concentración de $\geq 6,3$ log. El FCV se usa como virus modelo para el HEV también no envuelto que se ha detectado en cerdos y que se considera patógeno para el ser humano, pero que por sí mismo no se puede comprobar en el cultivo celular. Una reducción de la concentración de este virus en > pasos 6 log representa una sustancial mejora de la seguridad biológica de la pancreatina.

Tabla 1: título del virus después del tratamiento a alta presión de una solución de FCV

Tratamiento		4000 bar	5000 bar	6000 bar
Tiempo (min)	Temperatura (°C)	(400 MPa)	(500 MPa)	(600 MPa)
0	20	8,2 log		
5	20	3,6 log	< 1,9 log	< 1,9 log
5	20	< 1,9 log	< 1,9 log	< 1,9 log
5	20	< 1,9 log	< 1,9 log	< 1,9 log
5	0	< 1,9 log	< 1,9 log	< 1,9 log
5	0	< 1,9 log	< 1,9 log	< 1,9 log
5	0	< 1,9 log	< 1,9 log	< 1,9 log
5	-5	< 1,9 log	< 1,9 log	< 1,9 log
5	-5	< 1,9 log	< 1,9 log	< 1,9 log
5	-5	< 1,9 log	< 1,9 log	< 1,9 log
15	0	< 1,9 log	< 1,9 log	< 1,9 log
15	0	< 1,9 log	< 1,9 log	< 1,9 log
15	0	< 1,9 log	< 1,9 log	< 1,9 log

Ejemplo 4

El siguiente ejemplo describe la inactivación de los virus no envueltos FCV, EMCV (virus de la encefalomiocarditis) y Reo3 mediante alta presión.

5 (1) Realización

El tratamiento se llevó a cabo en el procedimiento discontinuo en un aparato de alta presión.

Los tres virus se añadieron puntualmente a la torta de filtro del procedimiento de producción de pancreatina y se sometieron a diferentes temperaturas y durante diferentes tiempos a 600 MPa (6000 bar) a un tratamiento a alta presión. Se determinó el título del virus en las muestras de partida (muestras de carga), en las muestras tratadas y en las muestras no tratadas después de la realización del tratamiento a alta presión (muestras de retención).

10 (2) Valoración

Los resultados representados (Tabla 2) muestran que se redujo significativamente el título de todos los virus examinados mediante el tratamiento a alta presión. Para FCV resulta un factor de reducción de 3,82 log. Los otros dos virus se redujeron hasta un título por debajo del límite de comprobación de 1,5 log. A partir de los títulos de carga correspondientes resultan factores de reducción de $\geq 4,98$ log para EMCV y $\geq 3,78$ log para Reo3. Una reducción de los títulos de estos tres virus zoonóticos (FCV = modelo para HEV) en más de 3,5 pasos log representa una mejora sustancial de la seguridad biológica de la pancreatina. Con este ensayo se ha podido mostrar que el título de distintos virus en intermedios de procedimiento del procedimiento de producción de pancreatina se puede reducir significativamente mediante un tratamiento a alta presión. Una inactivación óptima del virus se consigue en las condiciones que garantizan al mismo tiempo una máxima estabilidad de las enzimas presentes en la pancreatina (temperaturas ≤ 0 °C).

Tabla 2: título del virus después del tratamiento a alta presión de FCV, EMCV y Reo3 en la torta de filtro de pancreatina.

Tratamiento		Título (log DICT ₅₀)		
Temperatura (°C)	Duración (min)	FCV	EMCV	Reo3
Muestra de carga		6,97	6,48	5,28
0	5	4,76	2,97	2,97

ES 2 532 637 T3

(continuación)

Tratamiento		Título (log DICT ₅₀)		
0	15	5,77	< 1,5	2,88
-10	5	4,35	< 1,5	< 1,5
-10	15	3,15	< 1,5	< 1,5
Muestra de retención		6,79	6,73	5,05

Los ejemplos de realización son asimismo objeto de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la reducción de la carga vírica y microbiana de extractos biológicos que contienen sólidos, que comprende las etapas
- 5 (a) facilitación del extracto biológico que contiene sólidos que comprende al menos un principio activo biológicamente activo seleccionado de enzimas, proteínas y péptidos o una mezcla de tales principios activos; y
(b) sometimiento del extracto facilitado en la etapa (a) a un tratamiento a alta presión a una presión en el intervalo de 300 a 600 MPa (de 3000 a 6000 bar);
correspondiéndose la actividad biológica del extracto biológico que contiene sólidos después del tratamiento a alta presión al menos al 50 % de la actividad biológica del extracto biológico que contiene sólidos antes del tratamiento a alta presión,
- 10 **caracterizado por que** se ha obtenido el extracto biológico que contiene sólidos del páncreas de animales y **por que** el extracto biológico que contiene sólidos se facilita como suspensión que comprende una fase líquida y partículas de sólidos dispersas en la misma, estando la mezcla de principios activos biológicamente activos en una parte disuelta en la fase líquida y en otra parte unida a las partículas de sólidos.
- 15
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el extracto que contiene sólidos es un extracto del páncreas del cerdo.
3. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores 1 o 2, **caracterizado por que** el tratamiento a alta presión se lleva a cabo a una presión constante o con presiones por impulsos.
- 20 4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores 1 a 3, **caracterizado por que** el extracto biológico que contiene sólidos antes del tratamiento a alta presión se somete a una etapa de filtración, por lo que se obtienen un filtrado y una torta de filtro, sometiéndose la torta de filtro al tratamiento a alta presión.
5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado por que** la torta de filtro presenta una parte de sólidos de al menos el 40 % en peso en relación con el peso de la torta de filtro.
- 25 6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores para la producción de pancreatina, que comprende las etapas:
- (i) trituración de glándulas pancreáticas de cerdos domésticos;
(ii) a continuación se someten las glándulas pancreáticas trituradas a una autólisis;
(iii) el producto intermedio obtenido de este modo se criba y se obtiene el filtrado de criba;
- 30 (iv) precipitación de las enzimas que se encuentran en el filtrado de criba;
(v) la mezcla se filtra y se obtiene la torta de filtro;
(vi) finalmente se muele la torta de filtro;
(vii) después de la molienda se seca al vacío y
(viii) se muele nuevamente, por lo que se obtiene la pancreatina,
- 35 **caracterizado por que** la torta de filtro obtenida en la etapa (v) se somete al tratamiento a alta presión.
7. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores 1 a 6, en el que el tiempo de acción del tratamiento a alta presión asciende a de 1 a 60 min.
8. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores 1 a 7, en el que el tratamiento a alta presión se lleva a cabo a temperaturas en el intervalo de -20 °C a 30 °C.
- 40 9. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores 1 a 8, en el que el tratamiento a alta presión se lleva a cabo a temperaturas en el intervalo de -10 °C a 20 °C.
10. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores 1 a 9, **caracterizado por que** la actividad biológica del extracto biológico que contiene sólidos después del tratamiento a alta presión se corresponde al menos al 90 % de la actividad biológica del extracto biológico que contiene sólidos antes del tratamiento a alta presión.
- 45 11. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores 1 a 10, **caracterizado por que** durante el tratamiento a alta presión del extracto biológico que contiene sólidos no se añaden sustancias químicas.

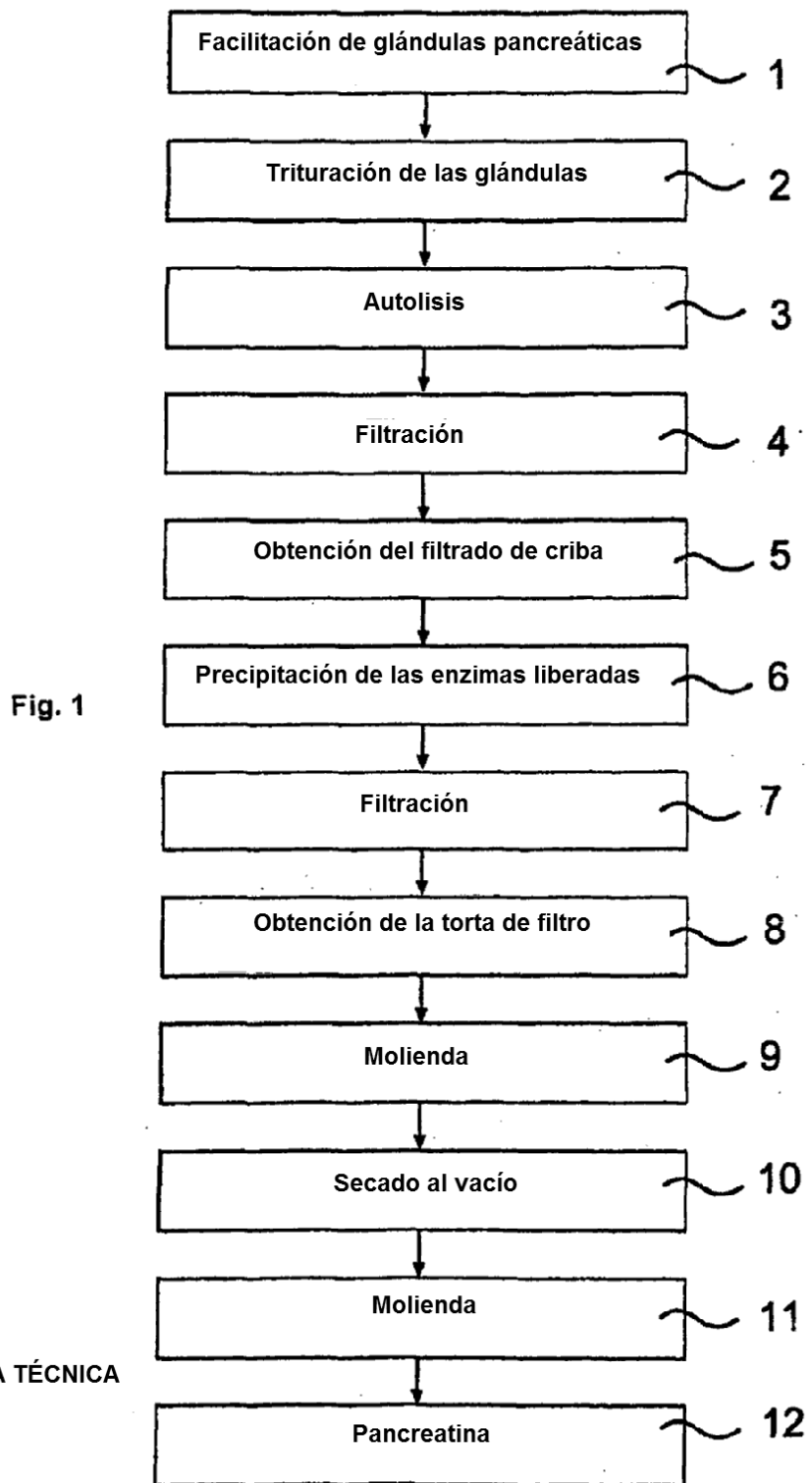


Fig. 1

ESTADO DE LA TÉCNICA

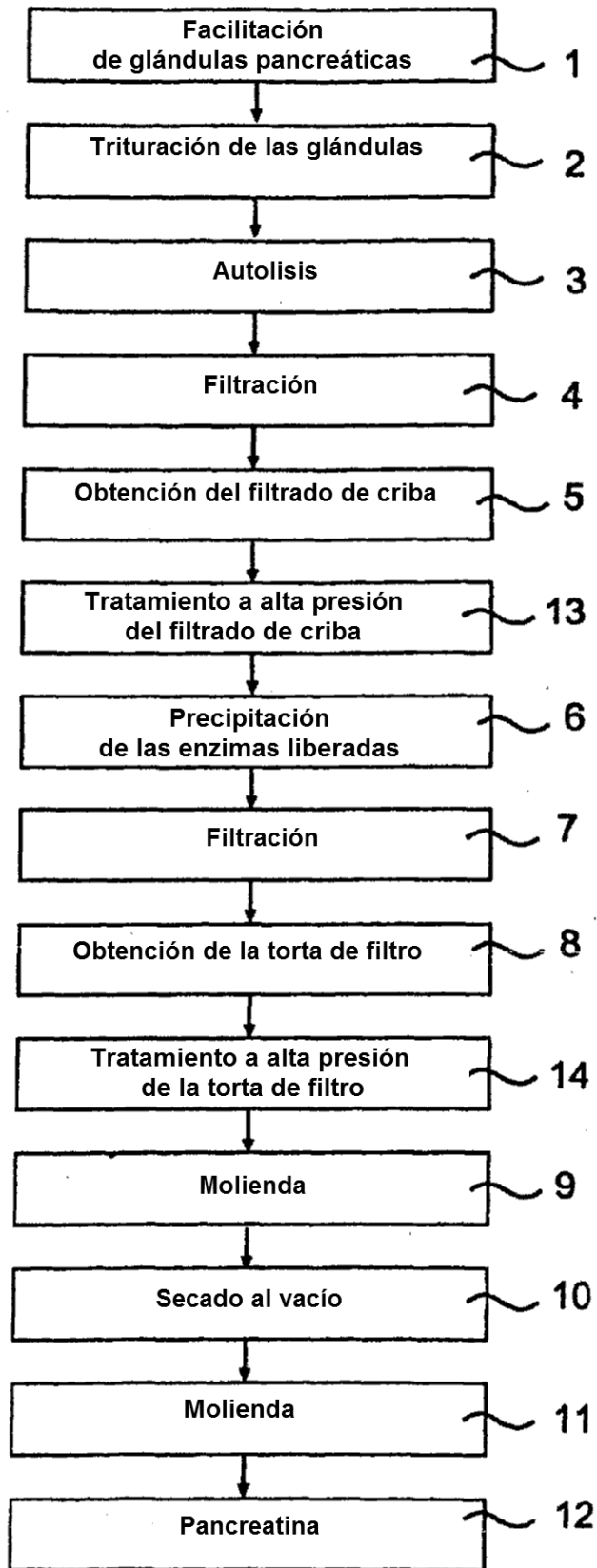


Fig. 2

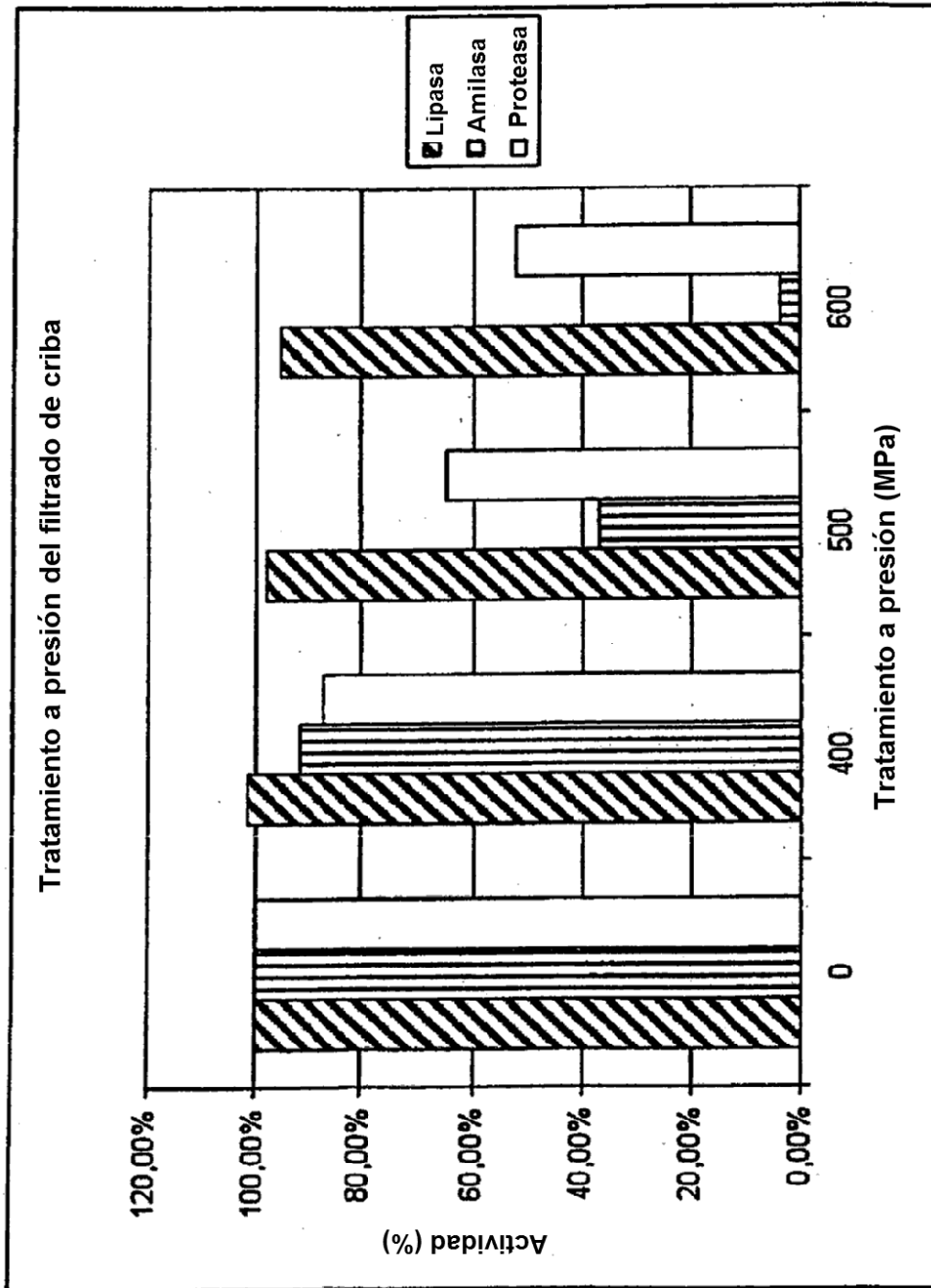


Fig. 3

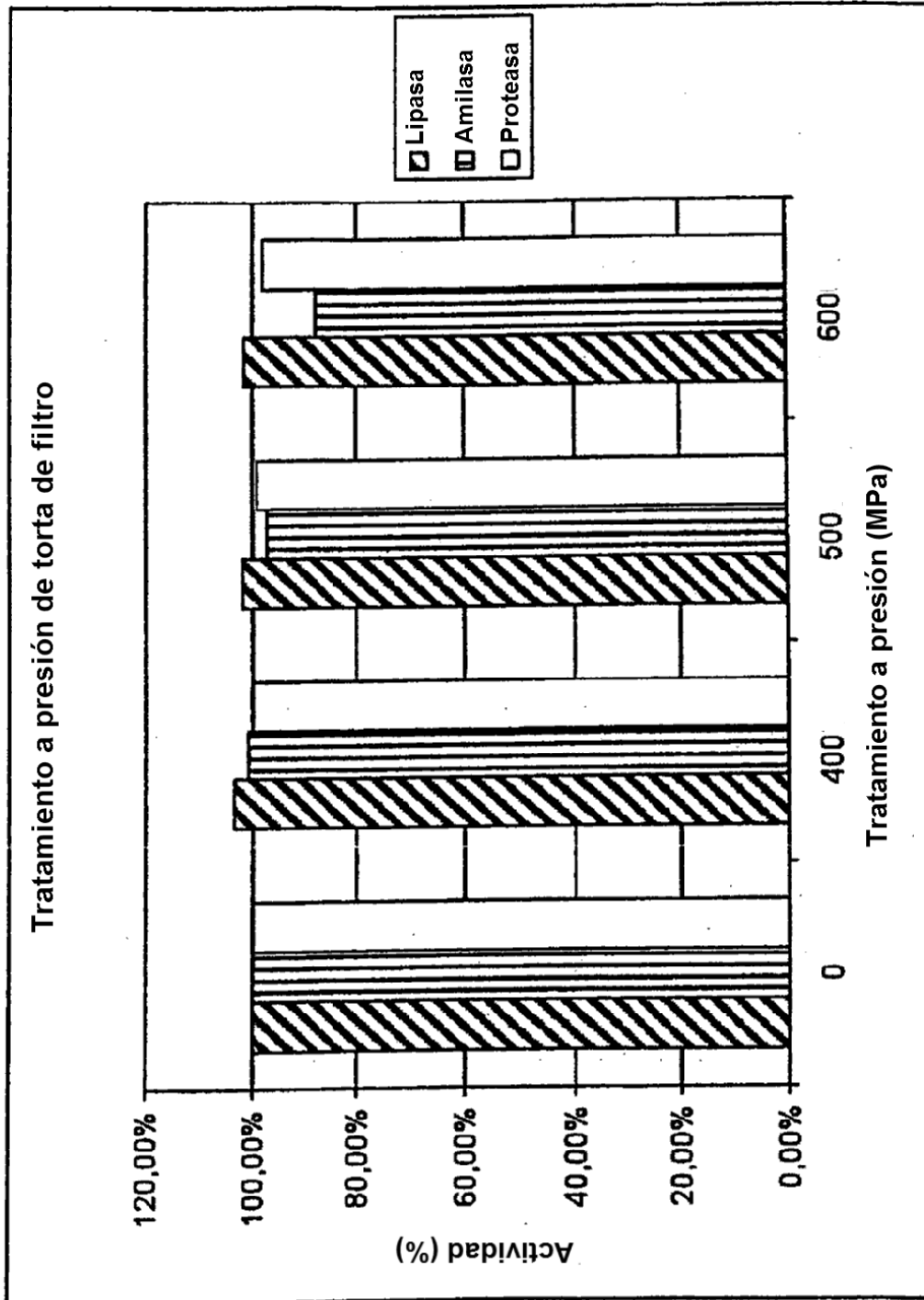


Fig. 4

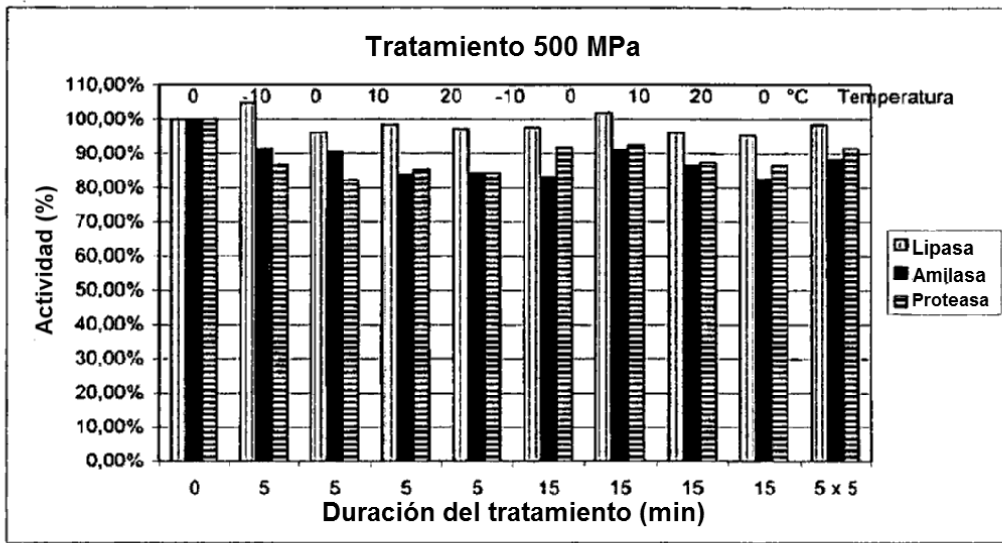


Fig. 5

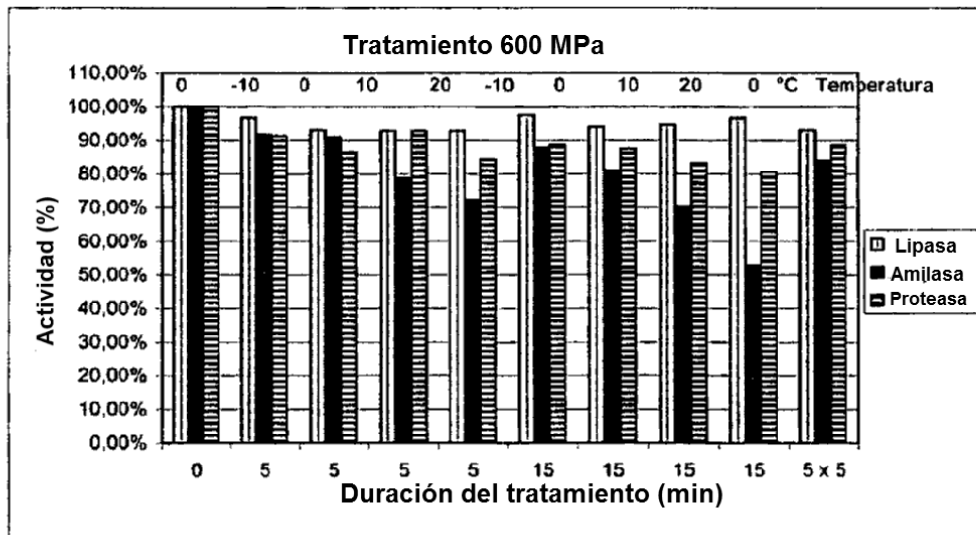


Fig. 6

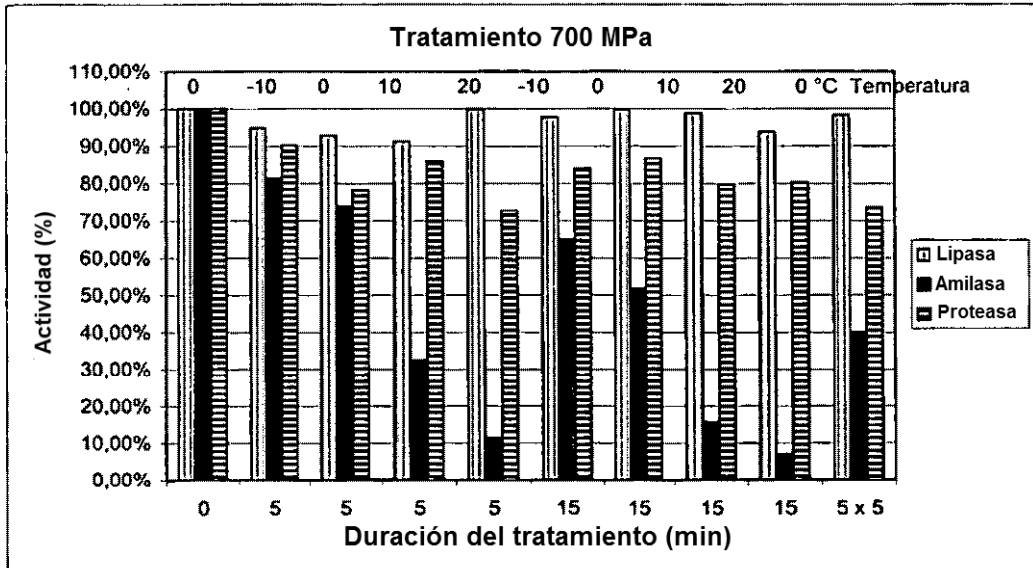


Fig. 7