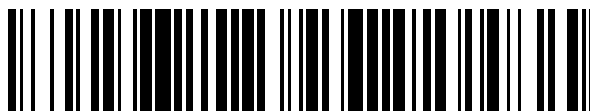


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 455**

51 Int. Cl.:  
**B01D 15/36** (2006.01)  
**B01J 41/00** (2006.01)  
**C07C 231/24** (2006.01)

12

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **10160979 .0**  
96 Fecha de presentación: **26.04.2010**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2286887**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.02.2011**

54 Título: **Eliminación de endotoxinas en medios de contraste**

30 Prioridad:  
**21.07.2009 US 227107 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**12.04.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**12.04.2012**

73 Titular/es:  
**GE Healthcare AS**  
**Nycoveien 1-2 P.O. Box 4220 Nydalen**  
**0401 Oslo, NO**

72 Inventor/es:  
**Hagelin, Gunnar y**  
**Wistrand, Lars-Göran**

74 Agente/Representante:  
**Carpintero López, Mario**

**ES 2 378 455 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

Eliminación de endotoxinas en medios de contraste

### Referencia a solicitudes relacionadas

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad conforme a 35 U.S.C. §119(e) de la Solicitud Provisional de Estados Unidos 61/227,107 presentada el 21 de julio de 2009.

### Campo técnico

La presente invención se refiere a la fabricación de medios de contraste, y más específicamente a la eliminación de endotoxinas en dichos medios de contraste.

### Antecedentes de la invención

10 Un problema general en la producción de diversos medios de contraste se refiere a la presencia de endotoxinas que son producidas por la proliferación bacteriana durante la manipulación de grandes cantidades de soluciones acuosas. Si bien las mismas bacterias son eliminadas o destruidas fácilmente en diversos procedimientos de esterilización, las endotoxinas a veces quedan intactas.

15 Las endotoxinas se han conocido y estudiado durante muchos años, particularmente con respecto a las reacciones patofisiológicas en animales. Durante muchos años se creyó que el material de endotoxinas estaba contenido dentro de células de bacilos gram-negativas y solamente era liberado con la desintegración de las paredes celulares. Por consiguiente, el material se denominó endotoxina. Estudios recientes, sin embargo, sugieren que la endotoxina está localizada en la superficie celular de los bacilos gram-negativos y puede estar presente con células viables y muertas así como en una forma libre dentro de un medio líquido.

20 Las endotoxinas son conocidas por causar diversas y variadas reacciones patofisiológicas y han sido identificadas como causas directas y contributivas de muerte de muchos pacientes hospitalizados. Las endotoxinas son conocidas por causar reacciones febriles en animales con síntomas de fiebre extremadamente alta, vasodilatación, diarrea, y similares, y, en casos extremos, shock fatal. También se sabe que las endotoxinas causan leucocitosis, cambios nocivos en el metabolismo de carbohidratos y proteínas y coagulación intravascular diseminada por formación de fibrina.

25 Debido a que los medios de contraste a menudo son inyectados en pacientes en hospitales en grandes cantidades, los medios de contraste primero deben ser purificados de la contaminación de endotoxinas.

30 Los procedimientos comunes para la eliminación de endotoxinas de soluciones son ultra-filtración, matrices absorbentes como resinas cromatográficas y resinas de intercambio iónico. Se han identificado diversos problemas con estos procedimientos tales como obstrucción de filtros, pérdida sustancial de sustancia y tratamiento posterior difícil, costoso y que requiere tiempo.

El documento US 5972225 describe un procedimiento para eliminar endotoxinas de medios de contraste yodados no iónicos, a granel que comprende disolver el medio en una solución de partida acuosa y pasar la solución a través de una zona de filtrado que contiene carbón activado.

35 Se necesitan formas rápidas y más rentables de eliminar endotoxinas en medios de contraste. Más específicamente, existe la necesidad de desarrollar un procedimiento tal que proporcione valores de endotoxinas menores que aproximadamente 1 UE/ml con efecto mínimo en la concentración del agente de contraste, el contenido de diferentes cationes, el pH y resistencia iónica de la formulación.

### Sumario de la invención

40 La presente invención proporciona un procedimiento para la purificación de medios de contraste formulados por eliminación de endotoxinas mediante la utilización de filtración con membrana de intercambio aniónicos.

De ese modo, visto desde otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para eliminar endotoxinas de medios de contraste formulados que comprende pasar dichos medios a través de una membrana de intercambio aniónico.

45 El procedimiento en conformidad con la invención es simple de realizar, altamente eficiente y tiene impacto despreciable en el pH de y los otros parámetros de la formulación.

### Descripción detallada de la invención

50 Generalmente, la fabricación de medios de contraste implica la producción de la sustancia farmacológica química (denominada producción primaria) seguida por la formulación generando el producto farmacológico (denominada producción secundaria).

- 5 Se proporciona un procedimiento para eliminar endotoxinas de dichos medios de contraste. En este sentido, el término "medios de contraste" según lo utilizado en la presente memoria quiere significar cualquier sustancia utilizada para potenciar el contraste de estructuras o fluidos dentro del cuerpo en imágenes médicas, excepto por los medios de contraste iónicos con carga negativa. En el procedimiento de la presente invención, el medio de contraste es un producto después de la formulación en la producción secundaria.
- Un problema importante con algunos procedimientos para la eliminación de endotoxinas en conformidad con la técnica anterior es que el proceso de purificación no puede manejar medios de contraste formulados con alta viscosidad. Aún más importante, las endotoxinas no pueden ser eliminadas sin alterar también la composición de los medios de contraste.
- 10 Con el fin de solucionar este problema y también cumplir con los criterios mencionados más arriba, la presente invención proporciona a procedimiento para eliminar endotoxinas de medios de contraste formulados que comprende pasar dichos medios a través de una membrana de intercambio aniónico.
- Los medios de contraste formulados utilizados en conformidad con la presente invención preferentemente pueden ser medios de contraste para imágenes por resonancia magnética (MRI), por ejemplo medios a base de Gd, o para imágenes de rayos X.
- 15 Los medios de contraste de rayos X preferentes utilizados en conformidad con la presente invención son medios de contraste yodados no iónicos. Más preferentemente dichos medios de contraste son latamente viscosos, preferentemente con viscosidades de aproximadamente 20-35 mPas.
- Más preferentemente el medio de contraste no iónico comprende 1,3-bis(formilamino)-N,N'-bis[3,5-bis(2,3-dihidroxi-propilaminocarbonil)-2,4,6-triyodofenil]-2-hidroxi-propano. Mucho más preferentemente el medio de contraste no iónico es Visipaque™, que es uno de los más utilizados en procedimientos de diagnóstico de rayos X. Iodixanol es el nombre no patentado de la sustancia química farmacológica química de Visipaque™.
- 20 La solución a ser tratada en conformidad con la presente invención tendrá ventajosamente la sustancia farmacológica yodada presente en una concentración suficiente para proporcionar entre aproximadamente 50 miligramos y 500 miligramos de yodo orgánicamente unido por mililitro de solución (mg l/ml), más preferentemente aproximadamente 100-400 mg/l ml.
- 25 Además, en conformidad con la invención, la solución previamente a la purificación normalmente contendrá endotoxinas en un nivel que excede 0,2 UE por 50 mg l (0,2 UE/50 mg l), y que a menudo excede aproximadamente 5 UE/50 mg l.
- 30 La membrana de intercambio aniónico proporciona la eliminación rápida y efectiva de endotoxinas de los medios de contraste disponibles. La separación se produce como resultado del intercambio selectivo de iones en los medios de contraste con contraiones en la membrana. El medio de contraste esencialmente no exhibe ninguna afinidad con la membrana, y de ese modo la endotoxina es separada efectivamente de las soluciones de medio de contraste. La endotoxina con carga negativa se adsorberán en los grupos con carga positiva en el intercambiador iónico y de ese modo serán eliminadas de la solución. Cuando el intercambiador se equilibra con la misma fuerza iónica del tampón utilizado para la formulación, un contraión de tampón negativo será intercambiado por cada molécula de endotoxina adsorbida.
- 35 En una escala industrial la solución preferentemente pasará a través de la membrana de intercambio aniónico a una velocidad que optimizará no solo la cantidad de endotoxina que es eliminada de la solución que pasa a través de la membrana, sino también el volumen de solución que es pasado a través de la membrana en una cantidad dada de tiempo. Las velocidad de flujo de entre 1 y 10 l/min., más preferentemente entre 2 y 5 l/min., será típica para os procesos de la invención.
- 40 El sistema preferentemente será operado a una presión de entre 6894 Pa y 689475 Pa (1 psig y 100 psig) más preferentemente entre 34473 Pa y 103421 Pa (5 psig y 15 psig), mucho más preferentemente aproximadamente 68947 Pa (10 psig). Además, el sistema mantendrá una temperatura de solución que permitirá la separación deseada y que está por debajo de la temperatura de descomposición de la sustancia farmacológica involucrada. Preferentemente, los procesos de la invención serán operados a una temperatura de solución de entre aproximadamente temperatura ambiente y aproximadamente 4 °C.
- 45 El sistema de purificación se permitirá deseablemente que se desarrolle dentro de los parámetros anteriores durante una duración suficiente para lograr la reducción de endotoxina deseada hasta niveles aceptables. Típicamente, dichos desarrollos durarán entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 10,0 horas, más preferentemente entre aproximadamente 1,5 y aproximadamente 2,5 horas. Las muestras pueden tomarse periódicamente y pueden ensayarse para controlar los niveles de endotoxinas, y los procesos pueden interrumpirse una vez que se alcanzan los niveles aceptables.
- 50 El producto final estará compuesto de una solución de medio de contraste que contiene esencialmente la totalidad del medio de contraste de la solución inicial. La solución del producto contendrá endotoxina en un nivel
- 55

sustancialmente reducido en comparación con la solución de partida, y más preferentemente estará esencialmente libre de endotoxina (es decir, conteniendo endotoxina en un nivel menor que aproximadamente 1 UE/ml).

La invención además se ilustra mediante los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitantes del ámbito de la invención a los procedimientos específicos o productos descritos en los mismos.

- 5 Tal como puede observarse en el ejemplo 1, el procedimiento de la presente invención logró una reducción en el nivel de endotoxina hasta menos que 1 UE/ml en un período de tiempo relativamente corto, comercialmente factible. Al mismo tiempo la potencia de Visipaque™ M y Prohance™ permanecieron sin cambios. Los procesos de la invención proporcionan de ese modo medios extremadamente rentables para reducir la contaminación de endotoxinas en medios de contraste.
- 10 El ejemplo 2 muestra la eliminación de endotoxinas de una solución que comprende 1,3-bis(formilamino)-N,N'-bis[3,5-bis (2,3-dihidroxi-propilaminocarbonil)-2,4,6-triyodofenil]-2-hidroxi-propano. Puede observarse que el nivel de endotoxinas disminuye drásticamente hasta un nivel menor que 0,5 UE/ml, y también, lo que es importante, uno puede observar que la concentración de iones de sodio e iones de calcio en la solución esencialmente no cambian.

### Ejemplos

#### 15 Ejemplo 1

Muestras.

- a) El compuesto de rayos X aromático yodado Visipaque™ M (Iodixanol 320 mg de yodo/ml en tampón TRIS 10 mM, pH 7,4, osmolalidad ajustada hasta 290 mmol/kg con NaCl libre de endotoxinas, estéril, viscosidad = 24 mPa).
- 20 b) El medio de contraste a base de Gd-quelato para MR Prohance™ (Gd-DOTA, 0,8 M en tampón TRIS 10 mM, pH 7,4, osmolalidad ajustada hasta 290 mmol/kg con NaCl libre de endotoxinas, estéril).

Preparación de solución madre de endotoxina de E. Coli.

A un vial (10 mg, 10 e 7 UE, Sigma Corp., EE.UU.) se añadieron 9 ml de agua para inyectables (WFI) y 1 ml de acetonitrilo para dar una concentración de 9,1 e6 UE/ml = 9.1 e3 UE/ µl.

- 25 La preparación de la solución de trabajo de LPS de E. Coli: 0,1 ml de la solución madre se diluyó hasta 10 ml con WFI (factor de dilución = 100) para dar 91 UE/ µl.

Inoculación de formulaciones con endotoxina.

A alícuotas de 10 ml de Visipaque™ y Prohance™ se añadieron 3 y 6 µl de solución de trabajo de LPS de E. coli hasta una concentración teórica final de 270 y 550 UE de endotoxina respectivamente.

#### 30 Procedimiento de despirogenación

- a) Dispositivo de filtro: membranas Sartobind Q15™ integradas en unidades listas para usar con tamaño de poros de 3-5 µm, fabricadas a partir de celulosa modificada con grupos de amonio cuaternario con carga positiva.
- b) Equilibración y esterilización de Sartobind™ Q15.

- 35 Cada filtro se eluyó con 50 ml de TRIS 10 mM, pH 7,4, seguido por 5 ml de etanol al 70% que se dejó que reposara en el filtro durante 3 minutos y finalmente con 50 ml de TRIS 10 mM, pH 7,4 (estéril).

- c) Eliminación de endotoxinas

Las formulaciones se pasaron a través de las unidades de filtro en un flujo de aproximadamente 1-2 gotas por segundo.

#### 40 Muestreo para análisis de endotoxinas.

Debido a la alta viscosidad, la formulación se mezcló completamente después de la elución a través del intercambiador aniónico Sartobind™ Q15 antes del muestreo para el análisis de endotoxinas.

Análisis de contenido de endotoxinas

- 45 El procedimiento utilizado para la determinación del contenido de endotoxinas, fue el procedimiento cromogénico descrito en la farmacopea europea y estadounidense con una sensibilidad de 0,005 UE/ml. Se preparó una dilución 1:200 diluyendo 50 µl de formulación en 9,95 ml de WFI (agua para inyectables) y la muestra se analizó en el instrumento cinético QCL junto con un control positivo. Si el control positivo era positivo, el ensayo era considerado

válido y los resultados eran calculados automáticamente por software. Ninguna endotoxina presente daría un resultado de NMT 1 UE/ml.

Los valores de resultado de endotoxina, pH y concentración de yodo y gadolinio se muestran en la Tabla 1. Obsérvese que los valores de endotoxina son los medidos, y difieren de los valores teóricos proporcionados en la sección experimental. \* El valor de referencia es 80,4 mg Gd/ml; \*\* El valor de referencia es 320 mg I/ml.

5

Tabla 1

Muestra	Endotoxina previa a la filtración (UE/ml)	Endotoxina posterior a la filtración (UE/ml)	pH de la formulación	Contenido de Gd (mg/ml)	Contenido de yodo (mg I/ml)
Visipaque 320 mg I/ml	220	< 0,5	7,2	-	326**
Visipaque 320 mg I/ml	460	< 0,5	7,3	-	318**
Prohance 80,4 mgGd/ml	185	< 0,5	7,2	80,0*	-
Prohance 80,4 mgGd/ml	417	< 0,5	7,2	78,9*	-

## Ejemplo 2

Se prepararon muestras de una solución que comprendía 1,3-bis(formilamino)-N,N'-bis[3,5-bis(2,3-dihidroxi-propilaminocarbonil)-2,4,6-triyodofenil]-2-hidroxi-propano mediante la disolución del compuesto puro en agua estéril que contenía tampón tris 10 mM y 0,1 mg/ml de CaNa<sub>2</sub>EDTA hasta una concentración de aproximadamente 320 mg I/ml. Se añadió cloruro de calcio a las concentraciones proporcionadas más abajo y la osmolalidad de las soluciones se ajustó hasta isotonicidad (290 mOsm/kg) mediante la adición de cloruro de sodio. Finalmente, las soluciones se esterizaron por autoclavado a 120 °C durante 30 minutos. Las muestras después se prepararon para que contuvieran endotoxinas y se purificaron como en el Ejemplo 1 con la excepción de que se utilizó Sartobind Q100™. Los niveles de endotoxina y los niveles de Ca<sup>2+</sup> y Na<sup>+</sup> antes y después de la purificación se muestran en la Tabla 2.

15

Tabla 2

Muestra	Endotoxina previa a la filtración (UE/ml)	Endotoxina posterior a la filtración (UE/ml)	Ca <sup>2+</sup> previo a la filtración (mM)	Ca <sup>2+</sup> posterior a la filtración (mM)	Na <sup>+</sup> previo a la filtración (mM)	Na <sup>+</sup> posterior a la filtración (mM)
1	14,80	0,3	0,368	0,353	44,5	45,1
2	19,55	0,7	0,570	0,545	45,5	44,6
3	17,29	1,4	0,946	0,926	44,7	43,8

20

25

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para eliminar endotoxinas de medios de contraste formulados que comprende pasar dichos medios a través de una membrana de intercambio aniónico.

5 2. El procedimiento según lo que se reivindica en la reivindicación 1 en el que el medio de contraste es un medio de contraste yodado no iónico.

3. El procedimiento según lo que se reivindica en la reivindicación 1 en el que los medios de contraste tienen viscosidades de aproximadamente 20-35 mPas.

4. El procedimiento según lo que se reivindica en la reivindicación 1 en el que el medio de contraste comprende 1,3-bis(formilamino)-N,N'-bis[3,5-bis(2,3-dihidroxiopropilaminocarbonil)-2,4,6-triyodofenil]-2-hidroxi-propano.

10