

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 739 473**

51 Int. Cl.:

C12P 19/04	(2006.01)
C12P 19/14	(2006.01)
B08B 9/08	(2006.01)
A61M 1/28	(2006.01)
A61L 2/00	(2006.01)
C08B 30/18	(2006.01)
B01D 61/14	(2006.01)
C11D 11/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.04.2010 PCT/FR2010/050815**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.11.2010 WO10125315**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2010 E 10727063 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 2424899**

54 Título: **Procedimiento de purificación de polímeros de glucosa destinados a soluciones de diálisis peritoneal**

30 Prioridad:

30.04.2009 FR 0952879

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.01.2020

73 Titular/es:

**ROQUETTE FRÈRES (100.0%)
62136 Lestrem, FR**

72 Inventor/es:

**BIGUET, MARC;
BOURDAIN, STÉPHANE y
DUFLOT, PIERRICK**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 739 473 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 de purificación de polímeros de glucosa destinados a soluciones de diálisis peritoneal

La presente invención se refiere a un procedimiento de purificación de polímeros de glucosa destinados a la fabricación de soluciones de diálisis peritoneal.

5 La diálisis peritoneal es un tipo de diálisis que tiene por objeto eliminar los residuos tales como urea, creatinina, el exceso de potasio o el excedente de agua que los riñones no llegan o no pueden depurar ya del plasma sanguíneo. Este tratamiento médico está indicado en caso de insuficiencia renal crónica terminal.

La diálisis peritoneal utiliza dos principios puestos en acción gracias a la propiedad fisiológica de permeabilidad del peritoneo: la ultrafiltración de líquido y la depuración de los desechos por difusión.

10 El peritoneo es una membrana serosa, con una superficie de 2 m² aproximadamente, compuesta de dos hojas: la hoja parietal que tapiza la cara interna de las paredes (abdomen, pelvis menor, diafragma) y la hoja visceral que rodea los órganos. El flujo de sangre al mismo es muy importante debido al gran número de vasos y capilares sanguíneos, particularmente al nivel de la hoja parietal. La superficie de la red vascular representa aproximadamente 1 m². Entre las dos hojas se encuentra un espacio virtual: la cavidad peritoneal. Para efectuar la diálisis, se introduce en la cavidad peritoneal un líquido artificial, el dializado. Este líquido será evacuado posteriormente después de un tiempo de contacto determinado.

15 Los dializados utilizados más corrientemente se componen de una solución tampón (lactato o bicarbonato) de pH ácido (5,2-5,5) o fisiológico (7,4) a la cual se añaden electrólitos (sodio, calcio, magnesio, cloro) y un agente osmótico (glucosa o un polímero de glucosa, tal como la "icodextrina" presente en la solución para diálisis peritoneal ambulatoria EXTRANEAL® comercializada por la sociedad BAXTER).

20 Los electrólitos y el agente osmótico juegan cada uno un papel en el mecanismo de intercambio, según sus propiedades fisicoquímicas respectivas:

25 - los desechos del metabolismo (tales como la urea o la creatinina) u otros electrólitos sobreabundantes que el riñón ya no elimina o elimina insuficientemente por la vía del aparato urinario y la orina, serán extraídos del plasma sanguíneo por difusión de los elementos hacia el dializado cuyas tasas de concentración de estos mismos elementos son menores;

30 - el excedente de agua, que el riñón elimina normalmente para la regulación del volumen plasmático, será atraído por osmolaridad; este proceso se conoce como ultrafiltración; la tasa de ultrafiltración varía en función de la concentración del dializado en glucosa o en polímero de glucosa: cuanto más concentrada sea la solución, tanto más será capturada el agua presente en el cuerpo por el dializado.

Sin embargo, aun cuando la glucosa tenga la ventaja de ser relativamente segura y poco costosa, presenta cierto número de inconvenientes. Debido a su pequeño tamaño, la glucosa que atraviesa rápidamente el peritoneo conduce a la pérdida de gradiente osmótico y a la pérdida de ultrafiltración en las 2 a 4 horas de infusión.

35 Por otra parte, la introducción cotidiana del dializado puede provocar en el límite un riesgo de alteración de la membrana peritoneal, restringiendo el empleo de este método para una duración limitada en el tiempo, generalmente entre 2 y 10 años.

El catéter implantado en la cavidad peritoneal es una puerta de entrada propicia a los gérmenes. Las numerosas manipulaciones en el catéter durante las fases de infusión y de drenaje aumentan el riesgo de infección local o general.

40 Se ha sugerido que las características de ultrafiltración de las soluciones de diálisis peritoneal podrían ser mejores reemplazando la glucosa por sustancias de alto peso molecular, tales como polímeros de glucosa.

Los polímeros de glucosa estándar se producen por hidrólisis ácida o enzimática de almidón de cereales o de tubérculos.

45 La hidrólisis ácida del almidón, totalmente aleatoria, o su hidrólisis enzimática algo más ordenada, proporcionan mezclas de glucosa y de polímeros de glucosa que comprenden moléculas muy cortas, de pequeño grado de polimerización (o D.P.), así como moléculas muy largas, de D.P. elevado. Los polímeros de glucosa tienen por tanto un peso molecular extremadamente variado.

50 En el dominio más particular de la utilización de los polímeros de glucosa destinados a la diálisis peritoneal continua y ambulatoria, la solicitud de patente europea EP 207676 enseña que se prefieren polímeros de glucosa que formen soluciones claras e incoloras al 10% en agua, que tengan un peso molecular medio ponderal (Mw) de 5.000 a 100.000 Daltons y un peso molecular medio numérico (Mn) inferior a 8.000 Daltons.

Tales polímeros de glucosa comprenden también de manera preferida al menos 80% de polímeros de glucosa cuyo peso molecular está comprendido entre 5.000 y 50.000 Daltons, poco o nada de glucosa o de polímeros de glucosa con

D.P. inferior o igual a 3 (peso molecular 504) y poco o nada de polímeros de glucosa con peso molecular superior a 100.000 (D.P. próximo a 600).

Dicho de otro modo, los polímeros de glucosa preferidos son polímeros de glucosa de bajo índice de polimolecularidad (valor obtenido calculando la relación Mw/Mn).

5 Se concibe de hecho fácilmente para esta aplicación que los monómeros o polímeros de peso molecular bajo atraviesan rápidamente la pared peritoneal y carecen por tanto de interés duradero para la creación de un gradiente de presión osmótica, y que los polímeros de peso molecular muy alto, desprovistos de poder osmótico, deben evitarse e incluso prohibirse dado que son potencialmente peligrosos si llegaran a precipitar como consecuencia de su degradación.

10 Los procedimientos propuestos en esta solicitud de patente EP 207676 para obtener estos polímeros de glucosa de bajo índice de polimolecularidad consisten:

- o bien en efectuar una precipitación fraccionada de una maltodextrina con ayuda de un disolvente miscible con el agua,

- o bien en efectuar una filtración molecular de esta misma maltodextrina a través de diferentes membranas que poseen un umbral de corte o de exclusión adecuado.

15 En ambos casos, estos procedimientos están orientados a eliminar a la vez los polímeros de peso molecular muy alto y los monómeros u oligómeros de peso molecular bajo.

Estos procedimientos no dan sin embargo satisfacción tanto desde el punto de vista de su utilización como desde el punto de vista de los rendimientos y de la calidad de los productos que permiten obtener.

20 Preocupada por poner a punto un procedimiento de fabricación de un hidrolizado de almidón completamente soluble en el agua y de bajo índice de polimolecularidad, preferentemente inferior a 2,5, que tenga con preferencia un Mn inferior a 8.000 Daltons y que posea un Mw comprendido entre 12.000 y 20.000 Daltons, procedimiento que esté desprovisto de los inconvenientes de la técnica anterior, la sociedad Solicitante, se ha dedicado a resolver este problema en su patente EP 667356.

Este procedimiento consiste en:

25 - hidrolizar por vía ácida una lechada de almidón parafinoso (o céreo) hasta un D.E. comprendido entre 8 y 15;

- eventualmente, completar esta hidrólisis ácida por una hidrólisis enzimática con ayuda de alfa-amilasa bacteriana hasta un D.E. comprendido entre 11 y 18;

- cromatografiar sobre resinas catiónicas fuertes macroporosas en forma alcalina o alcalinotérrica este doble hidrolizado ácido-enzima;

30 - recoger el hidrolizado de almidón excluido durante esta etapa de cromatografía.

En esta patente, para obtener un hidrolizado de almidón que presente un índice de polimolecularidad inferior a 2,5, se recoge el hidrolizado de almidón excluido durante esta etapa de cromatografía en un rendimiento ponderal del orden de 60% del hidrolizado utilizado en la etapa de cromatografía.

35 Este hidrolizado de almidón en cuestión confiere entonces con preferencia menos de 3% de glucosa y de polímeros de glucosa con DP inferior o igual a 3 y menos de 0,5% de polímeros de glucosa con DP superior a 600.

Se admite por los expertos del dominio de la diálisis peritoneal que estos polímeros de glucosa, utilizados por su poder osmótico, dan plena satisfacción.

Sin embargo, el tratamiento por diálisis peritoneal presenta cierto número de inconvenientes ligados a los riesgos del procedimiento.

40 Uno de los mayores riesgos es la peritonitis.

La sospecha clínica de la peritonitis se diagnostica durante el desarrollo de un problema en el dializado asociado con las manifestaciones clínicas variables que son dolor abdominal, náusea, vómito, diarrea y fiebre.

Estos episodios de la peritonitis son provocados por infecciones bacterianas intraperitoneales, y el diagnóstico se establece habitualmente con facilidad por los cultivos positivos de dializado.

45 La "peritonitis estéril", descrita igualmente como peritonitis aséptica, química, o cultivo-negativa, es provocada a su vez típicamente por un irritante químico o un cuerpo extraño.

Después de la introducción de la icodextrina para la preparación de soluciones de diálisis peritoneales, se han consignado casos esporádicos de peritonitis aséptica, los cuales pueden ir ligados a causas diversas y particularmente

a la inducción por sustancias pro-inflamatorias potencialmente presentes.

Por otra parte, los tests descritos actualmente en las Farmacopeas para la detección de sustancias pirógenas son los siguientes:

- 5
- el test de detección de las endotoxinas bacterianas, componentes mayoritarios de las bacterias Gram-negativas (test LAL),
 - el test de pirógenos en el conejo.

Aun cuando son generalmente fiables, estos dos tests tienen limitaciones.

10 El test de pirógenos en el conejo está fundado en la detección indirecta de sustancias pirogénicas por la medida de una elevación de temperatura del conejo al que se ha inyectado el producto que contiene dichas sustancias (respuesta febril).

Este test puede dar lugar a resultados negativos falsos, si la sustancia indeseable presenta una actividad biológica demasiado débil o una concentración demasiado baja para inducir una respuesta pirogénica sistémica.

Sin embargo, esta sustancia puede poseer una actividad biológica o concentración suficiente para producir una reacción inflamatoria local.

15 El test LAL, a su vez, detecta únicamente las endotoxinas bacterianas (LPS) así como los β -glucanos, componentes de las paredes de floras fúngicas.

Las otras impurezas biológicas (ADN, ...) no son detectadas. Lo mismo ocurre para los peptidoglucanos, componentes mayoritarios de las membranas celulares de las bacterias Gram-positivas.

20 La manifestación de las peritonitis asépticas observadas con las soluciones de diálisis peritoneal que contienen icodextrina demuestra por tanto, para ciertos casos, el modo en que ciertas sustancias pueden escapar a los tests descritos en las farmacopeas y pueden ser origen de efectos clínicos indeseables.

Para remediar esta situación, la sociedad BAXTER propone realizar esfuerzos en la detección de los contaminantes microbianos Gram-positivos.

25 En particular, en su patente EP 1720999, la sociedad BAXTER propone desarrollar un método basado en la detección de los peptidoglucanos, que son los componentes principales de las membranas de las bacterias Gram-positivas, particularmente en los polímeros de glucosa destinados a la preparación de solución para diálisis peritoneal.

Este método consiste en realizar sobre los polímeros de glucosa:

- 30
- un ensayo de "biocarga" para detectar un microorganismo Gram-positivo termófilo acidófilo particular: *Alicyclobacillus acidocaldarius*, y a continuación
 - una esterilización de dichos polímeros de glucosa, seguida por
 - un test consistente en añadir un reactivo capaz de reaccionar con los peptidoglucanos para inducir una reacción en cascada de serina-proteasa,
 - una cuantificación de dichos peptidoglucanos.

35 Si se determina que la cantidad de estos peptidoglucanos investigada en los polímeros de glucosa es inferior a un cierto umbral (10 ng/ml de una solución con 7,5% de polímero de glucosa, es decir 133 ng/g de polímeros de glucosa), estos polímeros de glucosa se utilizan luego para preparar la solución de diálisis peritoneal propiamente dicha.

Dicho de otro modo, para evitar que puedan sobrevenir estos episodios de peritonitis asépticas, la sociedad BAXTER propone para la fabricación y el uso de las soluciones de diálisis peritoneal, un protocolo de detección de peptidoglucanos en la solución de diálisis peritoneal.

40 Por otra parte, si se contempla en esta patente EP 1720999 el tratamiento aguas arriba de los polímeros de glucosa, ello es sólo por medio de resinas con afinidades susceptibles de capturar los peptidoglucanos como tales.

Así pues, no se contempla modificar el procedimiento de fabricación de los polímeros de glucosa de tal manera que el producto final esté desprovisto de contaminación por bacterias acidotermófilas del tipo *Alicyclobacillus acidocaldarius* o por residuos membranales de estas bacterias particulares.

45 Por consiguiente, existe una necesidad no satisfecha de suministrar, por un procedimiento de preparación y de purificación seguro, sustancias destinadas a la diálisis peritoneal de mejor calidad, en este caso polímeros de glucosa, a fin de asegurar que dichas sustancias estén eficazmente desprovistas de sustancias contaminantes.

Así, la sociedad Solicitante ha encontrado que esta actividad podría ser satisfecha por la puesta en práctica de un procedimiento de purificación notable, que combina cierto número de etapas de tratamiento con carbón activo/negro granular, de filtración (microfiltración y ultrafiltración) y de tratamiento térmico en un dispositivo apropiado para impedir toda contaminación.

5 El procedimiento de purificación de polímeros de glucosa destinados a la fabricación de soluciones de diálisis peritoneal conforme a la invención se caracteriza por que comprende:

- al menos una etapa de tratamiento con carbón activo y/o con negro granular,
- al menos una etapa de filtración esterilizante que consiste en dos filtraciones membranales con un diámetro de poro de 0,45 μm y luego 0,22 μm ,

10 - al menos una etapa de tratamiento térmico que consiste en calentar a una temperatura comprendida entre 100 y 130 °C durante 1 a 5 minutos, y

- al menos una etapa de ultrafiltración presentando la membrana de ultrafiltración un umbral de corte comprendido entre 30.000 y 100.000 Daltons.

15 Es importante indicar que la combinación de estas cuatro etapas garantiza la ausencia casi total de contaminantes de toda naturaleza, cualquiera que sea su tamaño (p. ej., endotoxinas, peptidoglucanos y β -glucanos).

Este procedimiento se aplica a los polímeros de glucosa destinados a la fabricación de soluciones de diálisis peritoneal acabadas, es decir aquéllas que serán utilizadas para la preparación de la solución de diálisis.

20 El carácter seguro de dicho procedimiento permite más particularmente limitar los controles bacterianos en el límite de dicho procedimiento por el ensayo de alta sensibilidad de detección de los peptidoglucanos puesto a punto y validado por la sociedad Solicitante (que se describirá más adelante), y por el ensayo de detección de las endotoxinas (test LAL).

En el sentido de la invención se entiende por "cuasi-ausencia", una cuantificación de umbrales muy inferiores al que se describe en los tests de las Farmacopeas, es decir:

25 - para las endotoxinas (y β -glucanos) por el test LAL (método del coágulo de gel en punto final) utilizando reactivos fabricados por CHARLES RIVER-ENDOSAFE (lisado LAL de sensibilidad 0,015 E.U/ml, ref. OR15015 y endotoxinas CSE 500 ng o 10 ng por matraz ref. E110 o E120): $\leq 0,6$ EU/g

- para los peptidoglucanos (y β -glucanos) por un test de alta sensibilidad puesto a punto con la sociedad Solicitante: < 8 ng/g de polímeros de glucosa (por tanto muy inferior al umbral de referencia descrito en la patente EP 1720999 para los peptidoglucanos).

30 Por "test de alta sensibilidad puesto a punto y validado por la sociedad Solicitante", se entiende un test desarrollado y validado por la sociedad Solicitante, adaptando el kit SLP-HS de un solo envase ref. 293-58301 fabricado y comercializado por la sociedad WAKO Pure Chemical Industries Ltd.

Este test consiste en añadir el reactivo denominado "SLP-HS" (Plasma de Larva de Gusano de Seda de Alta Sensibilidad), reactivo preparado a partir del plasma de gusano de seda, capaz de:

35 - reaccionar con los peptidoglucanos y β -glucanos contenidos en una solución de polímero de glucosa preparada al 5% en agua (agua especial para test LAL, por ejemplo),

- inducir una reacción en cascada de serina-proteasa y

- detectar y/o cuantificar dichos peptidoglucanos y β -glucanos por medio de un lector de tubos TOXINOMETER, fabricado y comercializado por la sociedad WAKO Pure Chemical Industries Ltd de umbrales muy bajos, es decir:

- 40 • un límite de detección (LD) con un umbral de aproximadamente 0,05 ng/ml (es decir 1 ng/g de polímero de glucosa) y
- un límite de cuantificación (LQ) con un umbral de aproximadamente 0,15 ng/ml (3 ng/g de polímero de glucosa).

(LD y LQ se determinan en el producto polímero de glucosa testado).

45 De manera más precisa, el test SLP-HP consiste en:

- preparar el polímero de glucosa a testar en solución al 5% en agua de calidad adecuada (agua especial para el test LAL, por ejemplo),

- construir una escala patrón de peptidoglucanos en agua dentro del dominio de aplicación de 0,04 a 2,5 ng/ml

(valores diana) con el estándar de peptidoglucanos (extracto de *Staphylococcus aureus*) del kit SLP-HS de un solo envase para el establecimiento de una recta de calibrado (regresión lineal en escala logarítmica $T_a = f(\text{contenido de PG})$),

5 - introducir 100 µl de la solución preparada a testar en el tubo HS-SLP después de reconstitución por adición de 100 µl del diluyente (suministrado en el kit citado anteriormente),

- introducir el tubo SLP-HS en el pozo de incubación del lector del tubo TOXINOMETER (WAKO Pure Chemical Ltd) termostatzado a 30°C y parametrado de acuerdo con las condiciones prescritas por el fabricante,

el contenido de PG en la solución a testar se calcula por medio de la recta de calibración establecida.

El resultado se expresa en ng/ml de solución al 5% testada luego en ng/g de polímero de glucosa.

10 Es notable que las cantidades de estos peptidoglucanos/β-glucanos en el polímero de glucosa obtenido al final gracias al procedimiento de acuerdo con la invención se garantizan, siendo muy inferiores a 8 ng/g de polímero de glucosa, es decir al mínimo y aproximadamente 16 veces inferior al umbral descrito en la patente EP 1720999.

15 En el procedimiento de purificación de los polímeros de glucosa destinados a la diálisis peritoneal, como se ha descrito anteriormente, el primero de los cuatro medios utilizados consiste en utilizar carbón activo y/o negro granular en una configuración particular.

La sociedad Solicitante recomienda utilizar este medio en al menos una de las tres variantes siguientes:

- en una primera variante del procedimiento conforme a la invención:

en el caso de la utilización del negro granular, esta configuración está basada en un funcionamiento en contracorriente.

20 El tiempo de residencia en la columna es de aproximadamente 3 horas. La percolación se hace a una velocidad del orden de 2 m/h a una temperatura del orden de 80°C para evitar la contaminación bacteriana.

El contacto entre el hidrolizado de almidón a purificar con el negro granular se hace en contracorriente en el sentido en que el hidrolizado de almidón a purificar entra en primer lugar en contacto con el negro granular saturado en la parte baja de la columna.

25 El hidrolizado de almidón purificado se recupera luego en la cabeza de la columna de negro granular, al mismo tiempo que el negro granular purificado.

De este modo, la última capa de negro granular en la parte superior de la columna sirve como "barrera de seguridad".

Se puede controlar esta disposición utilizando operaciones de "seguimiento" del negro granular. La columna se para, se extrae por abajo el negro granular saturado, que se reemplaza por arriba con negro granular regenerado.

30 El negro granular saturado se somete a desazucarado antes de ser regenerado por tratamiento térmico en un horno de solera.

En la puesta en marcha, y por seguridad, los primeros m³ de hidrolizado de almidón con baja materia seca se desechan.

El seguimiento de la reducción de la tasa de contaminantes (endotoxinas, peptidoglucanos y β-glucanos), puede analizarse haciendo cierto número de extracciones (por ejemplo cinco) desde la parte baja de la columna hacia arriba;

- en una segunda variante del procedimiento conforme a la invención:

35 en el caso de la utilización del carbón activo, esta configuración está basada en un tratamiento con carbón activo "por duplicado".

El hidrolizado de almidón que entra se mezcla con carbón activo (entre 0,5% y 1,5% referido a la materia seca a tratar) a una temperatura comprendida entre 70 y 75°C durante una hora.

El hidrolizado de almidón se filtra y se analiza a continuación.

40 El hidrolizado de almidón sufre luego un tratamiento de la misma naturaleza. Este segundo tratamiento es el tratamiento denominado "de seguridad".

La sociedad Solicitante recomienda utilizar en estos dos escalones carbón activo de porosidad diferente, a fin de tener en cuenta la variabilidad del tamaño de los contaminantes;

45 - en una tercera variante del procedimiento conforme a la invención, se elige combinar un escalón de negro granular y un escalón de carbón activo.

La sociedad Solicitante recomienda entonces disponer la columna de negro granular en cabeza de esta combinación.

Las condiciones de utilización de estos dos escalones están conformes con lo que se ha descrito anteriormente.

El segundo de los cuatro medios utilizados para purificar los polímeros de glucosa destinados a la fabricación de soluciones de diálisis peritoneal conforme a la invención consiste en utilizar una filtración esterilizante.

5 Esta etapa permite retener toda contaminación por microorganismos, y particularmente las bacterias acidotermófilas de tipo *Alicyclobacillus acidocaldarius*, siendo superior su tamaño a los diámetros de los poros de filtración.

10 La filtración se realiza por medio de varios filtros en cartuchos insertados en un cárter vertical hacia el cual se dirige el jarabe. Estos filtros de cartucho son suministrados por las Sociedades PALL o MILLIPORE, por ejemplo. El tamaño de los cartuchos puede ser de 10, 20 ó 30 pulgadas, y el número de cartuchos instalados permite obtener una superficie de filtración suficiente a fin de pasar un caudal de producto entre 1 y 20 l/minuto/m².

Estos filtros de cartucho tienen capacidades de resistencia para un trabajo continuo a alta temperatura, del orden de 75°C y para pasar el caudal citado anteriormente durante un periodo superior a 700 horas.

El hecho de trabajar a una temperatura superior a 75°C permite limitar todo desarrollo microbiológico, particularmente floras termófilas.

15 Su resistencia a la temperatura permite igualmente realizar una esterilización antes de su puesta en servicio. Esta esterilización consiste en hacer pasar vapor de 2 bares a través del cárter durante un periodo de 20 minutos. Esta esterilización va seguida por un lavado con agua purificada (en el sentido de la Farmacopea) durante un periodo de 5 minutos.

20 Estos filtros poseen igualmente capacidades de resistencia a ciertos productos químicos utilizados para las operaciones de limpieza de los equipos, y particularmente al ácido peracético a una concentración de 5‰.

Puede realizarse un test de integridad sobre estos cartuchos con ayuda de un Integritest de la sociedad MILLIPORE, por ejemplo. Este test de integridad se realiza en el momento de la colocación de los cartuchos a fin de comprobar el montaje de los mismos. Este test se realiza a continuación antes de cada limpieza de los equipos y finalmente antes del desmontaje a fin de validar su buen funcionamiento durante la fase de producción.

25 El delta de presión (ΔP) de trabajo de estos filtros no debe sobrepasar los 2 bares a fin de garantizar su integridad. Si ocurre esto, dichos filtros deben ser reemplazados por filtros nuevos.

El tercero de los cuatro medios utilizados para purificar los polímeros de glucosa destinados a la fabricación de soluciones de diálisis peritoneal conforme a la invención consiste en utilizar un tratamiento térmico.

30 Más particularmente, un tratamiento térmico cuyo par tiempo/temperatura se selecciona a fin de reducir la biocarga de microorganismos termófilos susceptibles de contaminar los polímeros de glucosa.

Esta etapa de tratamiento térmico consiste entonces en calentar a una temperatura comprendida con preferencia a una temperatura de 120°C, durante preferentemente 2 minutos.

35 Esta etapa de tratamiento a temperatura elevada durante un periodo de tiempo corto no tiene relación alguna con las horas del tratamiento térmico realizado clásicamente en la técnica anterior por ebullición del medio de reacción a fin, por ejemplo, de desnaturalizar las proteínas (particularmente para desactivar las enzimas).

El tratamiento térmico según la invención se realiza con ayuda de un cambiador tubular en el cual recircula el hidrolizado de almidón cromatografiado recircula, y está rodeado por una calandra alimentada por vapor de 2 bares a fin de regular en ella una temperatura del orden de 120°C.

Este cambiador tubular, que es fabricado por ejemplo por la sociedad ACTINI, está constituido por varias partes:

- 40
- una sección de recuperación de energía producto/producto entre la entrada y la salida de la zona
 - una sección de calentamiento con ayuda de vapor de 2 bares
 - una sección de rebajo integrada y modulable en función del tiempo de residencia deseado.

45 La longitud de este cambiador se calcula a fin de garantizar el tiempo de residencia deseado de acuerdo con el caudal de alimentación. Por ejemplo, el caudal de alimentación puede estar comprendido entre 3000 y 4000 litros/hora para una sección de rebajo del orden de 100 a 130 litros.

Este tratamiento térmico permite una reducción de al menos 2 log de los microorganismos, y particularmente las bacterias acidotermófilas de tipo *Alicyclobacillus acidocaldarius*.

El cuarto de los cuatro medios utilizados para purificar los polímeros de glucosa destinados a la fabricación de

soluciones de diálisis peritoneal conforme a la invención, consiste en utilizar una ultrafiltración.

Más particularmente, el umbral de corte se selecciona a fin de retener los contaminantes eventuales en el producto retenido.

La membrana de ultrafiltración presenta entonces un umbral de corte con preferencia del orden de 50.000 Daltons.

5 La superficie del filtro determina la capacidad de filtración del filtro. Esta superficie se determina en función de la naturaleza del fluido y del caudal a tratar.

El umbral de corte permite retener los microorganismos, y particularmente las bacterias acidotermófilas del tipo *Alicyclobacillus acidocaldarius*, así como una parte de las endotoxinas, peptidoglucanos y β -glucanos, estando comprendido su tamaño entre 1000 y 100.000 Daltons.

10 Las membranas de ultrafiltración pueden ser de tipo cerámico u orgánico. Al tener estos dos tipos de membranas una resistencia diferente a la temperatura, se preferirán las membranas de tipo cerámico que permiten trabajar a temperaturas superiores a 75°C.

15 Su resistencia a la temperatura permite realizar una esterilización con vapor antes de su puesta en servicio. Esta esterilización consiste en hacer pasar vapor de 2 bares a través del cárter durante un periodo de 20 minutos. Esta esterilización va seguida por un lavado con agua purificada durante un periodo de 20 minutos.

Por tanto, conviene igualmente, trabajar a una temperatura superior a 75°C para evitar todo desarrollo microbiológico.

Estos filtros poseen igualmente capacidades de resistencia a ciertos productos químicos utilizados para la limpieza de los equipos, y particularmente al ácido peracético a una concentración de 5% y la sosa a una concentración de 1%.

20 La presión del jarabe de alimentación está comprendida entre 5 y 10 bares y regulada por la bomba que alimenta este módulo. En el caso en que se alcanza la presión máxima, pero que el caudal de jarabe es muy bajo, conviene realizar una limpieza con sosa de las membranas a fin de que las mismas recuperen su eficacia plena.

El seguimiento de la disminución de la tasa de contaminantes (endotoxinas, peptidoglucanos y β -glucanos), puede analizarse realizando extracciones periódicas del filtrado.

25 Este cuarto medio permite con los otros tres medios garantizar en el producto final la presencia de un contaminante eventual de tipo peptidoglucanos, endotoxinas y/o β -glucanos con un valor inferior a los umbrales definidos anteriormente.

Uno de los procedimientos de acuerdo con la invención preferido para la obtención de polímeros de glucosa destinados a la preparación de solución para diálisis peritoneal puede detallarse así por la sucesión de las etapas siguientes:

1) obtener una lechada de almidón parafinoso con una materia seca final comprendida entre 35 y 40%,

30 2) hidrolizar por vía ácida la lechada de almidón parafinoso así obtenida y eventualmente, completar esta hidrólisis ácida por una hidrólisis enzimática con ayuda de alfa-amilasa bacteriana hasta un D.E. comprendido entre 9 y 14, con preferencia entre 10 y 13,

3) realizar sobre el hidrolizado de almidón así obtenido una etapa de tratamiento con carbón activo y/o con negro granular,

35 4) realizar una filtración esterilizante consistente en dos filtraciones membranales de diámetro de poro 0,45 μ m y posteriormente 0,22 μ m,

5) cromatografiar este hidrolizado sobre resinas catiónicas macroporosas fuertes en forma alcalina o alcalinotérrica,

40 6) recoger el hidrolizado de almidón, más precisamente los polímeros de glucosa, excluido durante esta etapa de cromatografía,

7) aplicar sobre estos polímeros de glucosa una etapa de tratamiento térmico a una temperatura de 120°C durante 2 minutos,

8) realizar una etapa de tratamiento con carbón activo y/o con negro granular,

45 9) aplicar una filtración esterilizante consistente en dos filtraciones membranales con diámetro de poro de 0,45 μ m y luego 0,22 μ m,

10) realizar una ultrafiltración con un umbral de corte comprendido entre 30.000 y 100.000 Daltons, con preferencia del orden de 50.000 Daltons.

Se pone de manifiesto que esta sucesión de etapas permite asegurar, paso a paso, la obtención de los polímeros de glucosa destinados a la preparación de solución para diálisis peritoneal.

Se efectúa sobre el hidrolizado de almidón una primera etapa de tratamiento con carbón activo y/o con negro granular.

5 Se efectúa una etapa de filtración esterilizante sobre el hidrolizado de almidón tratado con carbón activo y/o con negro granular, antes de su paso por cromatografía.

Finalmente, el hidrolizado de almidón cromatografiado sufre cuatro etapas de purificación sucesiva:

- tratamiento térmico,
- carbón activo y/o negro granular,
- filtración esterilizante,
- 10 - ultrafiltración.

Estos polímeros de glucosa se utilizan luego para preparar la solución de diálisis peritoneal propiamente dicha.

La invención se comprenderá mejor con ayuda de los ejemplos que siguen, los cuales tienen carácter ilustrativo y no limitante.

Ejemplo de referencia 1:

15 La materia prima para la obtención de los polímeros de glucosa según la invención se produce a partir de almidón de maíz céreo de la manera siguiente:

- limpieza del maíz a fin de retener exclusivamente los granos de maíz entero,
- templado del maíz así limpiado en presencia de ácido láctico a fin de flexibilizar los granos,
- 20 - trituración húmeda, seguida por separación de los diferentes constituyentes, es decir germen, envuelta celulósica, proteínas y almidón,
- limpieza del almidón en contracorriente con agua esterilizada a fin de purificar el almidón tanto fisicoquímica como bacteriológicamente,
- centrifugación y secado del almidón,
- 25 - puesta en suspensión del almidón en agua esterilizada con una materia seca final de 40% y a una temperatura de 45°C a 50°C,
- acidificación de la suspensión de almidón por adición de HCl con un pH < 2, y aumento de la temperatura hasta 115 a 120°C durante 6 a 8 minutos,
- floculación de las proteínas y las materias grasas a este pH,
- neutralización de la suspensión a pH 5,
- 30 - filtración de la suspensión sobre tierra de diatomeas (a fin de retener las proteínas, las materias grasas y la celulosa residuales),
- desmineralización sobre una resina catiónica fuerte y una resina aniónica débil,
- tratamiento con carbón activo a una T_p de 70-80°C y a un pH de 4 a 4,5; lo cual elimina las impurezas coloreadas y reduce el nivel de impurezas microbiológicas.

35 El carbón activo en polvo, añadido a una concentración comprendida entre 0,2 y 0,5% en seco, se retiene sobre un filtro cerámico de 10 µm cargado previamente con un agente filtrante,

- concentración por paso a través en un evaporador de película descendente,
- atomización de la solución concentrada en un atomizador de tipo MSD comercializado por la sociedad NIRO.

Este hidrolizado de almidón está de acuerdo con la monografía de la Farmacopea Europea (ref. Maltodextrinas:1542).

- 40 • pH = 4,0-7,0 para una solución de concentración 10%,
- I.d: conforme,

- pérdida por desecación: 6% máximo,
 - DE: < 20
 - cenizas sulfúricas: 0,5% max,
 - SO₂: 20 ppm max,
- 5
- metales pesados: < 10 ppm,
 - *E. coli*: ausente/g
 - salmonellas: ausente/10 g
 - gérmenes viables totales: 100 CFU/g max (EP 1000 CFU/g)
 - mohos: 100 CFU/g max.
- 10
- Como complemento, los autores de la invención han analizado los lotes producidos en cuanto a los valores de:
- contaminación de levaduras + mohos: 150 CFU/10 g max, es decir 15/g max
 - Gérmenes aerobios: 500 CFU/10 g max, es decir 50/g max
 - endotoxinas (test LAL de coágulo de gel en punto final): 20 EU/g max
 - peptidoglucanos: (test validado SLP-HS): 2700 ng/g max
- 15
- Las condiciones de obtención de los polímeros de glucosa conforme a la invención a partir del hidrolizado de almidón así obtenido son las siguientes:
- 1) preparación del agua/calidad del agua
- purificación del agua por filtración sobre 3 µm; tratamiento sobre carbón activo, desmineralización sobre resinas cambiadoras de cationes y de aniones, y nueva filtración (UA),
- 20
- dos depósitos utilizados:
 - 10 m³ para la disolución del hidrolizado de almidón, las etapas de lavado y limpieza del atomizador,
 - 60 m³ para el proceso principal (limpieza de los depósitos, de las suspensiones de carbón activo y de la cromatografía)
- 2) cromatografía
- 25
- solubilización del hidrolizado de almidón con agua purificada a fin de obtener una MS de 35-45% a una temperatura comprendida entre 60 y 85°C,
 - filtración esterilizante del hidrolizado de almidón por paso a través de 0,45 µm y luego 0,22 µm, realizada con una ΔP < 3 bares,
 - separación cromatográfica por exclusión estérica (SEC) realizada con ayuda de un sistema continuo compuesto de 6 series de platos dobles de 1 m³ de resina cada uno. La resina utilizada es una PCR145K comercializada por la sociedad Purolite.
- 30
- La solución que atraviesa esta resina presente una temperatura comprendida entre 75 y 85°C con 35-45% de MS.
- La duración de cada secuencia define el proceso.
- En el caso presente, la duración de cada secuencia es de 15 minutos.
- 35
- El control se efectúa por un análisis de distribución del peso molecular y el análisis del rendimiento de cromatografía, de manera siguiente: (Cantidad de materia seca de la fracción deseada)/(Cantidad de materia seca de la alimentación).
- Los pesos moleculares más bajos interaccionan con la resina y los pesos moleculares altos se eluyen con el agua purificada:
- la concentración se efectúa por evaporación en película descendente hasta un valor MS de 35-45%;
- 40
- se realiza un tratamiento térmico a una temperatura de 120°C durante 2 minutos,
 - adición de carbón activo entre 0,5 y 1,5% de la masa total del hidrolizado de almidón a 75°C con resinas

catiónicas (1 a 3 l) para controlar el pH (4-4,5) y aniónicas (5 a 10 l) para controlar el pH (5,5-6),

- filtración realizada sobre filtros de manga de polipropileno con $\Delta P < 5$ bares, en 5 a 6 horas por lote;
 - se efectúan a continuación una segunda y tercera filtración sobre 1,5 y 0,45 μm ,
 - a continuación sobre 0,22 y 0,1 μm ,
- 5 - ultrafiltración sobre membrana con un umbral de corte del orden de 40.000 Da.

Para la atomización: alimentación a 500 kg/h con una solución que contiene 40% de MS y a 250°C en un atomizador de tipo MSD comercializado por la sociedad Niro.

El producto atomizado presenta a su salida una humedad inferior a 6%.

10 Se enfría luego el producto en lecho de aire fluidizado que comprende 3 zonas de enfriamiento alimentado por aire a 40, 30 y 20°C. El producto obtenido se tamiza a continuación sobre 800 μm a fin de separar los agregados.

Se obtienen aproximadamente 500 kg de producto acabado a partir de 800 kg de maltodextrinas de partida, es decir un rendimiento del orden de 60%.

La determinación de la contaminación eventual del circuito se realiza por el análisis del contenido de peptidoglucanos y endotoxinas en el producto acabado.

15 Por ejemplo, los contenidos observados y medidos habitualmente sobre los lotes del producto acabado (expresados por g de polímero de glucosa) son para los criterios especificados arriba, los siguientes:

Levaduras y mohos: 0/g

Gérmenes aerobios: 0/g

Endotoxinas (test LAL de coágulo de gel en punto final): \leq a 0,3 EU/g,

20 Peptidoglucanos (test validado SLP-HS): < 3 ng/g

B. acidocaldarius: 1/g

Ejemplo 2

25 Se ha decidido testar la eficacia del procedimiento de purificación de polímeros de glucosa, destinados a la fabricación de soluciones de diálisis peritoneal, de acuerdo con la invención (es decir, caracterizados por la utilización de cada una de las cuatro etapas de tratamiento), con relación a un procedimiento de purificación que utiliza solamente dos, o incluso tres de las cuatro etapas del procedimiento conforme a la invención (una etapa de tratamiento con carbón activo y una etapa de filtración esterilizante en un primer escenario, una etapa de tratamiento con carbón activo, una etapa de filtración esterilizante y una etapa de tratamiento térmico en un segundo escenario).

1) Utilización del procedimiento de purificación en dos etapas.

30 Los detalles de las condiciones operatorias son los definidos en el ejemplo 1 con excepción de las etapas de tratamiento térmico y de ultrafiltración utilizadas en este primer caso.

Se elige un lote "A" de polímeros de glucosa cuyos análisis microbiológicos han dado los resultados siguientes:

Levaduras y mohos: < 50/10 g

Gérmenes aerobios: 50/10 g

Endotoxinas: 19 EU/g (test LAL de coágulo de gel en punto final)

Peptidoglucanos: 1520 ng/g (test validado SLP-HS)

B. acidocaldarius: 1/g

Este procedimiento utiliza carbón activo en polvo de la marca NORIT SX+ con 0,65% seco/seco y el tratamiento se aplica durante un tiempo de contacto de 1 hora.

35 Se aplica a continuación una etapa de filtración esterilizante con filtros de cartucho en serie comercializados por la sociedad MILLIPORE de 0,45 μm y de 0,22 μm .

El producto acabado "B" presenta entonces los resultados microbiológicos siguientes:

Levaduras y mohos:	0/g
Gérmenes aerobios:	0/g
Endotoxinas:	< 0,3 EU/g (test LAL de coágulo de gel en punto final)
Peptidoglucanos:	47 ng/g (test validado SLP-HS)
<i>B. acidocaldarius</i> :	0/g

2) Utilización del procedimiento de purificación en tres etapas

Se aplican al producto acabado "B" las condiciones operatorias siguientes:

- preparación de una solución con 10% de materia seca con agua purificada,
- tratamiento térmico a 120°C durante 2 minutos
- 5 - concentración hasta 30% de materia seca

El producto acabado "C" presenta entonces los resultados microbiológicos siguientes:

Levaduras y mohos:	0/g
Gérmenes aerobios:	0/g
Endotoxinas:	< 0,3 EU/g (test LAL de coágulo de gel en punto final)
Peptidoglucanos:	< 20 ng/g (test validado SLP-HS)
<i>B. acidocaldarius</i> :	0/g

3) Utilización del procedimiento de purificación conforme a la invención

Se aplican al producto acabado "C" las condiciones operatorias siguientes:

- ultrafiltración sobre una membrana con umbral de corte de 40.000 Daltons

10 El producto acabado "D" presenta entonces los resultados microbiológicos siguientes:

Levaduras y mohos:	0/g
Gérmenes aerobios:	0/g
Endotoxinas:	< 0,3 EU/g (test LAL de coágulo de gel en punto final)
Peptidoglucanos:	< 3 ng/g (test validado SLP-HS)
<i>B. acidocaldarius</i> :	0/g

Se pone de manifiesto que el procedimiento de purificación conforme a la invención permite garantizar una tasa de contaminante de peptidoglucanos notablemente baja; no permitiendo el procedimiento de purificación en dos etapas y en tres etapas recuperar, a partir del lote "A", un polímero de glucosa que presente incluso una tasa de contaminante en peptidoglucanos inferior al valor umbral de 8 ng/g que autorizaría su utilización en diálisis peritoneal.

15 Se demuestra así que, incluso si sucediera que uno de los lotes de polímeros de glucosa se encontrase anormalmente cargado con peptidoglucanos, el procedimiento de purificación conforme a la invención permitiría reducir eficazmente el contenido de los mismos, garantizando así un contenido de contaminación muy inferior al límite de tolerancia admitido generalmente.

Ejemplo 3 (de referencia)

20 Para garantizar la calidad de los circuitos utilizados, se procede al lavado regular de los equipos de la manera siguiente.

Se selecciona en este caso la limpieza de un recipiente de disolución de la materia prima (hidrolizado de almidón).

Después de utilización de este recipiente para la producción de 12 lotes de producto acabado, se aplican las secuencias siguientes:

25 - lavado con agua por un sistema de limpieza in situ (NEP) a fin de retirar todas las trazas de producto (hidrolizado de almidón).

ES 2 739 473 T3

La eficacia de este lavado se controla por una medida de lectura refractométrica (LR) en las aguas de lavado a la salida de este recipiente (LR < 0,5);

- introducción de sosa del fabricante Solvay al 1% por el mismo sistema de NEP durante 30 minutos;

5 - lavado con agua para eliminar las trazas de sosa. La eficacia de este lavado se controla por una medida de pH en las aguas de lavado a la salida de este recipiente;

- introducción de ácido peracético Bactipal de la sociedad SEPPIC diluido al 0,05% por el mismo sistema de NEP durante 10 minutos;

- lavado con agua purificada para eliminar las trazas de ácido. La eficacia de este lavado se controla por un test de peróxidos en las aguas de lavado a la salida de este recipiente.

10

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de purificación de polímeros de glucosa destinados a la fabricación de soluciones de diálisis peritoneal, caracterizado por que comprende:
- al menos una etapa de tratamiento con carbón activo y/o con negro granular,
 - 5 - al menos una etapa de filtración esterilizante que consiste en dos filtraciones membranales con un diámetro de poro de 0,45 μm y luego 0,22 μm ,
 - al menos una etapa de tratamiento térmico que consiste en calentar a una temperatura comprendida entre 100 y 130 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 a 5 minutos, y
 - 10 - al menos una etapa de ultrafiltración al menos una etapa de ultrafiltración, presentando la membrana de ultrafiltración un umbral de corte comprendido entre 30.000 y 100.000 Daltons.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que la etapa de tratamiento térmico consiste en calentar a una temperatura de 120 $^{\circ}\text{C}$ durante 2 minutos.
3. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado por que el tratamiento con carbón activo o con negro granular consiste en dos etapas, la primera compuesta de carbón activo, y la segunda compuesta de carbón activo o de negro granular.
- 15 4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que la membrana de ultrafiltración presenta un umbral de corte del orden de 50.000 Daltons.
5. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que consiste en:
- 20 1) obtener una lechada de almidón parafinoso con un contenido final de materia seca comprendido entre 35 y 40%,
 - 2) hidrolizar por vía ácida la lechada de almidón parafinoso así obtenida y, eventualmente, completar esta hidrólisis ácida con una hidrólisis enzimática con ayuda de alfa-amilasa bacteriana hasta un D.E. comprendido entre 9 y 14,
 - 25 3) realizar sobre el hidrolizado de almidón así obtenido una etapa de tratamiento con carbón activo y/o con negro granular,
 - 4) aplicar una filtración esterilizante consistente en dos filtraciones membranales con diámetro de poro de 0,45 μm y luego de 0,22 μm ,
 - 5) cromatografiar este hidrolizado sobre resinas catiónicas macroporosas fuertes en forma alcalina o alcalinotérrica,
 - 30 6) recoger los polímeros de glucosa excluidos durante esta etapa de cromatografía,
 - 7) aplicar sobre estos polímeros de glucosa una etapa de tratamiento térmico a una temperatura de 120 $^{\circ}\text{C}$ durante 2 minutos,
 - 8) realizar una etapa de tratamiento con carbón activo y/o con negro granular,
 - 35 9) aplicar una filtración esterilizante consistente en dos filtraciones membranales con diámetro de poro de 0,45 μm y luego de 0,22 μm ,
 - 10) realizar una ultrafiltración con un umbral de corte comprendido entre 30.000 y 100.000 Daltons.