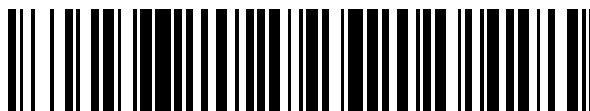


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 452**

51 Int. Cl.:

C08B 37/00 (2006.01)

A61L 24/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.06.2008 PCT/NL2008/050396**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2009 WO09154440**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2008 E 08766819 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017 EP 2294092**

54 Título: **Método para retirar impurezas de material biopolimérico**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.07.2017

73 Titular/es:
BENDER ANALYTICAL HOLDING B.V. (100.0%)
Parksesteeg 8
6611 KH Overasselt , NL

72 Inventor/es:
BENDER, JOHANNES CASPAR MATHIAS
ELIZABETH y
VERMEULEN, PIETER, SEBASTIAAN

74 Agente/Representante:
TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 621 452 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

Método para retirar impurezas de material biopolimérico

5 Campo técnico de la invención

[0001] La presente invención se refiere a un método para eliminar endotoxinas, tales como lipopolisacáridos, a partir de material biopolimérico, donde el material biopolimérico es un alginato.

10 El método de la presente invención permite la producción de materiales biopoliméricos que contienen niveles extremadamente bajos de lipopolisacáridos.

El presente método es muy sólido y no requiere equipos sofisticados, intensivos en capital.

Antecedentes de la invención

15 [0002] Los lipopolisacáridos son endotoxinas potenciales, es decir, compuestos tóxicos, naturales encontrados dentro de patógenos internos tales como bacterias.

Clásicamente, una "endotoxina" es una toxina, que a diferencia de una "exotoxina", no se segrega en forma soluble por bacterias vivas, sino que es un componente estructural de las bacterias que se libera principalmente cuando las bacterias son lisadas.

20 [0003] El lipopolisacárido (LPS) o lipo-oligo-sacárido (LOS) es un ejemplo prototípico de una endotoxina que se encuentra en la membrana externa de varias bacterias gram-negativas.

El término LPS se usa a menudo de forma intercambiable con endotoxina, debido a su descubrimiento histórico.

25 En el siglo XIX se entendió que las bacterias podrían segregar toxinas en su ambiente, lo que se conoció ampliamente como "exotoxina". El término endotoxina vino del descubrimiento de que partes de bacterias gram-negativas en si mismas pueden causar toxicidad, por lo tanto la nombrada endotoxina. Estudios sobre la endotoxina de los siguientes 50 años revelaron que los efectos de "endotoxina" eran de hecho debido a los lipopolisacáridos. La única bacteria gram-positiva conocida que produce endotoxina es la *Listeria monocytogenes*.

30 [0004] LPS consisten en una cadena de polisacáridos (azúcar) y una fracción lipídica, conocida como lípido A, que son responsables de los efectos tóxicos.

La cadena polisacárida consiste en bacterias muy variables diferentes.

LPSs son de aproximadamente 10 kDa en tamaño pero puede formar agregados grandes de hasta 1000 kDa.

35 Los seres humanos son capaces de producir anticuerpos a LPSs después de la exposición pero generalmente se dirigen a la cadena de polisacáridos y no protegen contra una amplia variedad de endotoxinas.

La inyección de una pequeña cantidad de LPS en seres humanos voluntarios produjo fiebre, una reducción de la presión sanguínea, y activación de inflamación y coagulación.

40 LPSs son en parte grande responsables de las manifestaciones clínicas dramáticas de infecciones con bacterias gram-negativas patógenas, tales como de *Neisseria meningitidis*, el patógeno que causa meningitis fulminante.

[0005] En la producción farmacéutica, es necesario eliminar LPSs de contenedores de medicamentos, puesto que incluso cantidades pequeñas de esta endotoxina provocarán padecimientos, que no enfermedad, en seres humanos.

Normalmente, se usa para este propósito un homo de depirogenación.

Se requieren temperaturas de aproximadamente 400 °C para descomponer esta sustancia.

45 Con base en material de embalaje primario como jeringas o viales, una temperatura de vidrio de 250°C y un tiempo de retención de 30 min es normal para conseguir una reducción de 3log en los niveles de endotoxina.

[0006] Asimismo, se debe asegurar que las endotoxinas sean retiradas de biopolímeros de calidad farmacéutica, tales como alginato, goma xantana y gelatina.

50 Con este fin, se han propuesto diferentes métodos en el estado de la técnica.

[0007] El documento WO 93/13136 describe un proceso para la purificación de polisacáridos que comprende:

- La filtración de una solución de polisacáridos que tiene una concentración inferior a 1% a través de un primer filtro de nitrocelulosa con un tamaño de poros de al menos 45 micras;
- 55 • La filtración de la solución resultante a través de un segundo filtro de nitrocelulosa con un tamaño de poros inferior a 12 micras;
- La filtración de la solución resultante a través de una membrana con un tamaño de poros inferior a 12 micras, donde dicha membrana se modifica con polipéptidos para enlazar impurezas hidrofóbicas; y

60 Dializar la solución resultante con una membrana con un tope de peso molecular inferior a la primera membrana de ultrafiltración.

[0008] El proceso descrito en el documento WO 93/13136 no es adecuado para el tratamiento de soluciones viscosas y no es muy sólido.

65 [0009] El documento US 5,589,591 describe un método para hacer una composición de arabinogalactano altamente

purificada, sustancialmente sin endotoxina, que comprende las etapas de:

(i) La eliminación de una preparación que contiene arabinogalactano por ultrafiltración, materiales de un peso molecular que son inferiores al peso molecular de la composición de arabinogalactano, y recoger la fracción que contiene arabinogalactano de la misma;

(ii) a partir de ahí, eliminación de la fracción que contiene arabinogalactano por ultrafiltración, endotoxina y materiales de un peso molecular que son mayores que el peso molecular de arabinogalactano; y

(iii) recoger la fracción resultante que contiene arabinogalactano, que ha resultado sustancialmente sin endotoxina.

[0010] Lo que se ha dicho anteriormente en relación al documento WO 93/13136 se aplicable igualmente a esta Patente de EE.UU.

[0011] El documento WO 00/09566 describe un método para obtener alginato ultrapuro, donde dicho método comprende las etapas de:

- Extracción de un material disuelto consistente en algas o alginato crudo que utiliza un agente complejante tal como EDTA o carbón activado;
- Filtración de la solución;
- Precipitación del alginato contenido en la solución; y
- Recuperación del alginato precipitado.

[0012] El documento WO 00/09566 describe también una forma de realización donde antes de la filtración los componentes celulares y partículas se sedimentan con la ayuda de agentes aglutinantes porosos tales como diatomita, celulosa o materiales de reciclaje a partir de fuentes renovables. El proceso descrito en la solicitud de patente internacional tiene el inconveniente de que los agentes aglutinantes porosos son difíciles de precipitar a partir de fluidos viscosos, incluso a fuerza centrífuga aumentada. Si tales fluidos viscosos muestran adicionalmente una alta densidad específica, es casi imposible separar el material insoluble de la fase acuosa.

[0013] El documento US 6,451,772 divulga un método para la preparación de una composición de biopolímero que comprende una sal de un biopolímero con un contenido de endotoxina menor que aproximadamente 100 unidades de endotoxina por gramo, que comprende las etapas de

(i) contactar una solución acuosa de una sal de biopolímero con un material hidrofóbico, tales como poliestireno, polipropileno o polímeros de fluorocarbono, para adsorber endotoxina sobre dicho material; y

(ii) precipitación de la sal de biopolímero que tiene un contenido de endotoxina inferior a aproximadamente 100 unidades de endotoxina por gramo a partir de la solución mediante la mezcla de un solvente orgánico mezclable con agua con la solución.

[0014] La patente de EE.UU. también describe un método donde la etapa de precipitación se sustituye por una extracción líquido-líquido utilizando un solvente no mezclable con agua. Además, se menciona que en el caso de alginatos, la solución de biopolímero acuosa se puede contactar con carbón activado para eliminar polifenoles. Inconvenientes importantes del método descrito en el documento US 6,451,772 son que (i) es imposible prácticamente evitar la coprecipitación de la sal de biopolímero y el material hidrofóbico después de la adición del fluido orgánico mezclable con agua y (ii) poca transferencia de masa durante la extracción líquido-líquido.

[0015] El documento EP-A 0 072 513 describe un proceso para la preparación de un polisacárido bacteriano capsular antigénico a partir de un medio de cultivo o una solución que comprende al menos un paso de precipitación por formación de un complejo entre un derivado poliiónico del medio - siendo el derivado poliiónico al menos dicho polisacárido - y una sal de amonio cuaternario, donde al menos una precipitación del complejo se realiza en un soporte poroso inerte constituido por celulosa, una sal de metal alcalinotérreo sustancialmente insoluble en agua, hidróxido u óxido aluminico, óxido de silicón, un silicato o un aluminosilicato.

En el ejemplo 1 de la solicitud de patente europea Celite® 545 (diatomita) y CetaVlon® (un surfactante catiónico) se agregan a una masa fermentada que contiene polisacárido bacteriano.

Después de 5 horas, un complejo de polisacárido/CetaVlon® y de Celite® 545 se aíslan por la decantación del sobrenadante.

[0016] O. Adam et al. (Anal.Biochem 225 (1995), 321-327 describe un método para eliminar endotoxinas de exopolisacáridos por una separación de fase inducida por la temperatura con Tritón X-114. D. Petsch & F.B. Anspach, Journal of Biotechnology 76 (2000), 97- 119 describe también un método para eliminar endotoxinas basado en Tritón X-114. Los procesos descritos en estos papeles tienen diferentes desventajas. Debido a la naturaleza heterogénea de la endotoxina y la distribución de equilibrio de LPS en los sistemas de líquido de 2 fases, la reducción de la endotoxigenidad final del alginato está limitada. Además, el método no es adecuado para el tratamiento de fluidos viscosos a menos que se apliquen fuerzas centrífugas muy altas para separar las fases.

Finalmente, es muy difícil separar de forma cuantitativa la fase líquida superior de la fase líquida inferior, causando que el proceso no sea muy sólido.

Resumen de la invención

[0017] Los inventores han desarrollado un método particularmente sólido para la reducción de niveles de LPS en

alginatos. El método de la presente invención se puede poner en práctica en equipo estándar.

Además, el presente método se puede usar ventajosamente para conseguir reducciones de 4log en exceso en los niveles LPS, dando como resultado niveles de endotoxina que son suficientemente bajos (bastante debajo de 30 unidades de endotoxina /g) para hacer posible el uso de biopolímeros tratados en la cirugía, incluyendo cirugía craneal y espinal. El método de la presente invención se caracteriza por que comprende las etapas sucesivas de:

- a) proporcionar una solución acuosa que contiene 0,05-50 % en peso de material biopolimérico que contiene LPS disuelto; 0,001-10 % en peso de un surfactante; 0,05-15 % en peso de sólido adsorbente y al menos 50 % en peso de agua;
- b) permitir que el adsorbente adsorba LPS;
- c) separar el adsorbente sólido que contiene LPS adsorbido de la solución acuosa restante; y
- d) recuperación del material biopolimérico con un nivel reducido de LPS de la solución acuosa separada.

[0018] Los implantes craneales y espinales tienen que cumplir los estándares más altos en cuanto a los niveles de LPS puesto que cualquier LPS presente en estos implantes puede filtrarse en el fluido intratecal, que está en contacto directo con el cerebro (barrera cerebral sin sangre).

En EE.UU los implantes y fármacos craneales y espinales pueden contener no más de 14 unidades de endotoxina (EU) por dispositivo.

El contenido ultrabajo de LPS de los biopolímeros obtenidos por el presente método hace posible emplear estos biopolímeros en dispositivos médicos (por ejemplo sellantes) para cirugía espinal (por ejemplo, procedimientos de laminotomía o laminectomía lumbar posterior para reducir la formación de cicatriz epidural postoperatoria) o cirugía craneal (por ejemplo sellado de la dura después de la cirugía por aplicación de sellante sobre suturas para prevenir la fuga de fluido cerebroespinal).

Dispositivos médicos que contienen biopolímeros ultrapuros (por ejemplo, alginatos) obtenidos por el presente método se pueden aplicar a la cirugía espinal o craneal sin el riesgo de superar el límite superior anteriormente mencionado de 14 unidades de endotoxina.

[0019] Aunque los inventores no desean estar atados por la teoría, se cree que el surfactante empleado en el presente método causa disolución de agregados de LPS que típicamente tienen un tamaño de aproximadamente 1 MDa. La disolución de estos agregados facilita inmensamente el aislamiento eficaz de los LPSs conforme a la presente invención.

Además, a diferencia de los sistemas de extracción de líquidos de 2 fases de la técnica anterior, el presente método emplea un sistema de extracción de 3 fases en el que el equilibrio se empuja hacia la fase sólida, permitiendo así que se consigan reducciones extraordinarias de los niveles de LPS.

[0020] En el presente método, el aislamiento de LPS del material biopolimérico se consigue usando un adsorbente sólido para adsorber los LPSs que han llegado a dispersarse en la fase acuosa. El aislamiento de desagregados de los LPSs del biopolímero y la fase acuosa se consigue de una manera muy eficaz, permitiendo que los LPSs sean adsorbidos por el adsorbente y sean eliminados posteriormente por el adsorbente mediante, por ejemplo, sedimentación, centrifugación o filtración. Se descubrió que el adsorbente sólido no sólo retiró eficazmente los LPSs de la solución biopolimérica, sino también el surfactante.

[0021] Para conseguir reducciones muy altas en los niveles de LPS, la secuencia anteriormente mencionada de las etapas a) hasta c) se puede repetir varias veces hasta que el contenido de LPS del biopolímero se haya reducido hasta el nivel deseado.

Descripción detallada de la invención

[0022] Por consiguiente, la presente invención se refiere a un método de la reducción de los niveles de LPS en un material biopolimérico que contiene LPS, donde el material biopolimérico es un alginato, que comprende las etapas consecutivas de:

- a) proporcionar una solución acuosa que contiene 0,05-50 % en peso de material biopolimérico que contiene LPS disuelto; 0,001-10 % en peso de un surfactante; 0,05-15 % en peso de sólido adsorbente; y al menos 50 % en peso de agua;
- b) permitir que el adsorbente adsorba LPSs;
- c) separar el adsorbente sólido que contiene los LPSs adsorbidos de la solución acuosa restante; y
- d) recuperación del material biopolimérico con un nivel reducido de LPS de la solución acuosa separada.

[0023] El término "biopolímero" como se utiliza en este caso se refiere a alginatos

[0024] En el presente método los LPSs se pueden adsorber directa y/o indirectamente por el adsorbente sólido.

La adsorción indirecta puede ocurrir, por ejemplo, si una fase surfactante que contiene LPS se liga por el adsorbente sólido. Debido a la naturaleza anfífilica de surfactantes y muchos LPSs, el presente método puede emplear adecuadamente adsorbentes hidrofílicos (por ejemplo arcillas) así como adsorbentes hidrofóbicos (por ejemplo carbón activado) para eliminar los LPSs,

[0025] Están disponibles varios ensayos biológicos para medir los niveles de LPS, tal como la prueba de pirógeno de conejo (Farmacopea de EEUU (1960) 16ª revisión, p. 887. (Farmacopea de EE.UU. (1960) 16ª revisión, p. 887. Mack Printing Co., Easton, Pa.) y el ensayo sobre el lisado de amebocitos de Limulus (LAL) (F.C. Pearson et al., J. Clin Microbial. 21 (1985), 865-868), y el ensayo sobre la mortalidad de embrión de pollo (R.T. Smith, and L. Thomas, J. Exp. Med. 104 (1956) 217-231), y la prueba de mortalidad de ratones cebados de galactosamina (C. Galanos et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979), 5939-5943.). El ensayo LAL es muy sensible y económico. Se puede conseguir con este ensayo una sensibilidad de 0,02 EU ml⁻¹ (método de punto final). El ensayo turbidimétrico cinético LAL se puede usar adecuadamente incluso si se requiere sensibilidad más alta (J.F. Remillard et al., Prog Clin Biol Res. 231 (1987) 197-210), y particularmente se aplica a criba de placa.

[0026] Según una forma de realización particularmente preferida de la presente invención, el surfactante empleado en el presente método es un surfactante líquido de formación de micela, más particularmente un surfactante de formación de micela que se puede usar adecuadamente para llevar a cabo una separación de fase micelar o extracción en punto de nube (CPE) para eliminar los LPSs de la solución biopolimérica acuosa.

Por consiguiente, el presente método emplea ventajosamente una solución acuosa que contiene un surfactante de formación de micela en una concentración superior a la concentración de micela crítica, donde esta fase acuosa provoca la separación de fase en una fase acuosa y una fase surfactante antes de la separación del adsorbente sólido de la fase acuosa restante.

El uso de extracción en punto de nube en el presente método ofrece la ventaja importante de que se retiene una cantidad pequeña o ningún residuo de surfactante en el material biopolimérico recuperado libre de LPS.

Los inventores han descubrieron que si se usa una cantidad adecuada de adsorbente sólido, no solo se elimina el surfactante de fase separada (dispersada) sino sorprendentemente también se eliminaron eficazmente los surfactantes disueltos por el adsorbente. Por tanto, no son necesarias operaciones adicionales de limpieza para eliminar restos de surfactante del material biopolimérico recuperado.

[0027] La extracción en punto de nube hace uso del hecho de que a bajas concentraciones de surfactante por encima de la concentración de micela crítica, las soluciones micelares de por ejemplo surfactantes no iónicos o ligeramente polares pueden existir como fases de líquido isotrópico homogéneo.

La separación de fase se puede producir en este rango de concentración, por ejemplo, mediante el aumento temperatura a la temperatura en la que el surfactante suelta su hidrosolubilidad ("punto de nube").

En muchas de estas separaciones de fase, la fase micelar isotrópica única se separa en dos fases isotrópicas, donde ambas pueden contener surfactante, pero difieren en la concentración total de surfactante.

En la fase surfactante rica en micelares se concentrará cualquier componente orgánico hidrofóbico originalmente presente en la muestra sometida a la etapa de separación de fase.

[0028] La "concentración crítica de micela", a menos que se indique lo contrario, se define como la concentración en la que los surfactantes en la solución libre están en equilibrio con surfactantes en forma agregada. La autoorganización de las moléculas de un surfactante depende de la concentración del surfactante presente en la solución. Por debajo de la concentración crítica de micela, los surfactantes forman una capa única en la superficie líquida y están dispersados en la solución.

A la primera concentración crítica de micela (CMC-I), el surfactante se organiza en micelas esféricas, en la segunda concentración crítica de micela (CMC-II) en tuberías alargadas, y en el punto laminar (LM o III de CMC) en láminas apiladas de tuberías.

[0029] En el método de extracción en punto de nube de la presente invención se puede usar cualquier surfactante de formación de micela, suponiendo que resultara factible provocar la separación de fases de la solución micelar.

Ventajosamente, el presente método emplea un surfactante de formación de micela que después de la separación de fase, forma gotitas con una densidad que excede la densidad de la fase de biopolímero acuoso. Por tanto, se puede asegurar que bajo la influencia de la fuerza de gravedad y/o centrifuga tanto la fase de surfactante como el adsorbente sólido se acumularán como un sedimento que se puede separar fácilmente mediante por ejemplo simple decantación.

Por consiguiente, conforme a una forma de realización preferida, en la "temperatura en punto de nube", el surfactante de formación de micela tiene una densidad de más de 1,03 g/ml, preferiblemente más de 1,05 g/ml.

[0030] La separación de fase de la solución acuosa micelar en una fase acuosa y una fase surfactante se produce preferiblemente sometiendo la solución a aumento de temperatura, adición de sal, cambio de pH y/o estrés osmótico.

De la forma más preferible, la separación de fase se consigue mediante el aumento de temperatura de la solución acuosa.

Según una forma de realización particularmente preferida del presente método, la solución acuosa micelar tiene una temperatura en el rango de 0-99 °C, más preferiblemente en el rango de 5-95 °C y la separación de fase se produce mediante el aumento de temperatura de al menos 5 °C, preferiblemente de al menos 10 °C.

[0031] Preferiblemente, el surfactante empleado en el presente método es un polisacárido no iónico o aniónico. Según una forma de realización particularmente preferida, el surfactante es un surfactante no iónico. Los surfactantes no iónicos ofrecen la ventaja de que la separación de fase se puede conseguir de forma relativamente fácil, por ejemplo, mediante el aumento temperatura.

Ejemplos de surfactantes no iónicos de formación de micela que se pueden usar adecuadamente son:

- 5 • Alquilfenol etoxilados representados por la fórmula $C_xH_{2x+1}-C_6H_4-O-(C_2H_4O)_nH$, donde:
 - x está en la gama de 4-12; y
 - n está en la gama de 4-12
- 10 • Nonilfenoxi polietoxietanoles representado por la fórmula $C_{15}H_{24}O(C_2H_4O)_n$, donde n está en la gama de 3-40, preferiblemente en la gama de 4-30
- Monoésteres de sorbitano de polietilenglicol de ácidos grasos con una longitud de cadena de 12-18 átomos de carbono (TWEEN), preferiblemente $CH_3(CH_2)_{10}CO_2$ (laureato) o $CH_3(CH_2)_7C_2H_2(CH_2)_7CO_2$ (oleato)
- 3-([3-Cholamidopropil]dimetilamonio)-2-hidroxi-1-propanosulfonato (CHAPSO)

15 [0032] En cuanto a los nonilfenoxi polietoxietanoles (nonoxinoles), nonoxinol-4 (n=4), nonoxinol-15 (n=15) y nonoxinol-30 (n=30) son particularmente preferidos.

[0033] De la forma más preferible, el surfactante de formación de micela es un alquilfenol etoxilado tal y como se ha definido aquí anteriormente, donde $x=8$ y $7 \leq n \leq 10$.

Ejemplos de tales alquilfenol etoxilados son octilfenol etoxilados, tales como Tritón X-114 y Tritón X-100.

20 [0034] La cantidad de surfactante empleada en la solución acuosa de inicio está típicamente en la gama de 0,01-10 % en peso.

Preferiblemente, el surfactante se emplea en la solución acuosa en una concentración en la gama de 0,1-5 % en peso, de la forma más preferible en la gama de 0,5-2 % en peso.

25 [0035] Una ventaja importante del presente método reside en el hecho de que se puede usar para procesar soluciones biopoliméricas acuosas altamente viscosas, concentradas.

Por consiguiente, en una forma de realización preferida del presente proceso, la fase acuosa separada tiene una viscosidad cinemática de al menos 100 cSt a 20 °C.

Aún más preferiblemente, la viscosidad cinemática a 20 °C es de al menos 500 cSt.

30 De la forma más preferible, dicha viscosidad es de al menos 2500 cSt.

Normalmente, la viscosidad cinemática de la fase acuosa separada no excede de 15000 cSt a 20 °C.

La viscosidad cinemática puede estar determinada adecuadamente con un viscosímetro de flujo inverso de tubo en U o un viscosímetro rotativo Synchro-Lectric.

35 [0036] El adsorbente sólido empleado en el presente proceso es insoluble en la solución acuosa y tiene que ser capaz de adsorber LPS directa o indirectamente. Preferiblemente, el adsorbente sólido es capaz de adsorber el surfactante que se usa en el presente método puesto que esto ayudará a evitar la contaminación del material biopolimérico tratado con restos de surfactante. Ejemplos de adsorbentes sólidos que se pueden emplear adecuadamente incluyen carbón activado, arcillas adsorbentes y combinaciones de los mismos. Ejemplos de arcillas adsorbentes incluyen: aluminio filossilicato, montmorillonita (y otros minerales del grupo de esmectita), sepiolita, dicalita, perlita, diatomita, caolinita, illita, zeolita, tierra diatomácea y combinaciones de los mismos.

De la forma más preferible, la arcilla adsorbente es aluminio filossilicato adsorbente.

45 [0037] Resultados particularmente buenos se obtienen en el caso de que un adsorbente hidrofóbico, tal como carbón activado, se emplee como el material adsorbente. Por lo tanto, según una forma de realización preferida, el adsorbente sólido comprende carbón activado. Aún más preferiblemente, el adsorbente es carbón activado.

50 [0038] Según otra forma de realización preferida, el adsorbente sólido es una arcilla (por ejemplo un aluminio filossilicato adsorbente). Las arcillas ofrecen la ventaja de que sedimentan rápidamente y que prácticamente ningún adsorbente residual permanece en suspensión. Además, los inventores han observado que estos minerales son un adsorbente muy eficaz de tanto el surfactante disperso como disuelto. Esta observación se confirma por las conclusiones de A.G. Epantaleón et al., Use of activated clays in the removal of dyes and surfactants from tannery waste waters, Applied Clay Science 24 (2003) 105-110.

55 [0039] Otra propiedad ventajosa de las arcillas es su capacidad para arrastrar gotitas dispersadas y/o partículas dispersadas.

Así, cuando una capa de estos adsorbentes es introducida cerca de la superficie de la solución de biopolímero acuoso, dicha capa adsorbente descenderá gradualmente al fondo del contenedor que retiene la solución mientras simultáneamente filtra cualquier material disperso, tales como partículas de carbón activado o gotitas de surfactante.

60 [0040] Se ha observado que el uso combinado de un adsorbente hidrofóbico y una arcilla adsorbente, tal como aluminio filossilicato, permite una eliminación muy eficaz del surfactante.

Aunque los inventores no desean estar atados por la teoría, se cree que, especialmente si se consigue separación del adsorbente sólido por centrifugación prolongada, la arcilla adsorbente forma la capa superior del sedimento y aísla el adsorbente hidrofóbico subyacente al igual que el surfactante adsorbido sobre dicho adsorbente hidrofóbico.

65 Como resultado, se minimiza eficazmente la contaminación del sobrenadante durante por ejemplo la decantación.

[0041] En una forma de realización preferida, el adsorbente sólido empleado en el presente método es un adsorbente microporoso. El uso de un adsorbente microporoso ofrece la ventaja de que se obtiene un área de superficie excepcionalmente alta, que se requiere para agrandar las relativamente débiles "fuerzas de dispersión de London".

El adsorbente sólido microporoso empleado en el presente método tiene preferiblemente una microporosidad (MPV) de al menos $0,02 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$, de la forma más preferible de al menos $0,25 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ y un área de superficie BET (S_{BET}) de al menos $100 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, de la forma más preferible de al menos $800 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$.

[0042] El uso de una cantidad excesiva de sólido adsorbente ofrece la ventaja importante que, en caso de extracción en punto de nube, la fase surfactante es esencialmente adsorbida completamente sobre el material adsorbente, formando así una masa sólida que se puede separar muy fácilmente por técnicas de separación sólido-líquido bien conocidas para un experto en la técnica. Preferiblemente, el adsorbente sólido que contiene la fase surfactante adsorbida es más pesado que la fase de biopolímero acuoso, de modo que sedimentará bajo la influencia de fuerza de gravedad y/o centrifuga.

[0043] En el presente método la concentración de surfactante en la solución acuosa restante después de la separación del adsorbente sólido es de al menos 50 veces, preferiblemente al menos 2500 veces inferior a la concentración de surfactante en la solución acuosa de inicio.

Típicamente la concentración de surfactante en la solución acuosa restante después de la separación es inferior a 200 mg/kg, de la forma más preferible menos de 4 mg/kg.

[0044] Los inventores han observado que el material adsorbente sólido, después de haber adsorbido la fase de surfactante, forma una especie de sedimento de pastel que puede retirarse fácilmente mediante, por ejemplo, centrifugación o filtración.

Sin embargo, particularmente si el adsorbente sólido contiene partículas muy pequeñas (por ejemplo en caso de carbón activado) y/o en el caso de que la solución de biopolímero acuoso sea muy viscosa, estas partículas muy finas pueden permanecer suspendidas en la fase acuosa incluso después de la separación de la fase surfactante.

[0045] De forma imprevista, se descubrió que el carbón activado se puede retirar de forma cuantitativa añadiendo una arcilla adsorbente antes de la separación de la fase acuosa de la fase surfactante. Se consigue la eliminación prácticamente cuantitativa de partículas adsorbentes muy pequeñas aunque la fase acuosa es altamente viscosa. En cambio, técnicas de separación sólido-líquido bien conocidas, tales como filtración y centrifugación, no son adecuadas para conseguir la eliminación cuantitativa de partículas adsorbentes de soluciones de biopolímero viscoso.

Además, se ha observado que el uso combinado de carbón activado y arcilla adsorbente permite la eliminación prácticamente completa de LPSs.

Así, según una forma de realización preferida, la separación de la fase acuosa de la fase surfactante comprende la adición de carbón activado y arcilla adsorbente. De la forma más preferible, la arcilla empleada en el presente método es una arcilla expansiva. Las arcillas no hinchables son menos adecuadas, especialmente si se utiliza el presente método para tratamiento de biopolímeros cuya gelificación se desencadena por cationes divalentes o trivalentes.

[0046] La arcilla adsorbente se usa ventajosamente en el presente método en una cantidad que excede al carbón activado.

De la forma más preferible, la arcilla adsorbente se emplea en una cantidad 50% superior en peso al carbón activado.

Expresado de forma diferente, la arcilla adsorbente se emplea preferiblemente en una cantidad de 1-10 % en peso, más preferiblemente en una cantidad de 2-4 % en peso de la solución acuosa.

[0047] En el presente método el adsorbente sólido se puede incorporar en la solución acuosa a etapas diferentes.

En principio, el adsorbente se puede dispersar en el agua incluso antes de añadir el surfactante.

Preferiblemente, sin embargo, el adsorbente se añade a la solución después de haber añadido el surfactante, y en caso de que se use un surfactante de formación de micela, después de que haya tenido lugar la separación de fase en la fase surfactante y la fase acuosa.

[0048] Normalmente, el adsorbente sólido se emplea en el presente método en una cantidad de 50-1000% en peso de la fase surfactante separada. Preferiblemente, el adsorbente se emplea en una cantidad de 100-300% en peso de la fase surfactante separada. Expresado de forma diferente, el adsorbente se emplea ventajosamente en una cantidad de 0.1-10% en peso de la solución acuosa.

De la forma más preferible, la cantidad empleada de adsorbente está en el rango de 1-3% en peso de la solución acuosa.

[0049] Tal y como se menciona aquí, el presente método puede usarse ventajosamente para eliminar LPSs.

[0050] Según una forma de realización preferida, el material biopolimérico es de origen microbiano. Para el propósito de esta invención, los biopolímeros producidos por microorganismos recombinantes se consideran también biopolímeros de origen microbiano.

[0051] Ejemplos de biopolímeros de origen microbiano que puede ser despirogenados adecuadamente mediante el

presente método incluyen alginato.

[0052] Según una forma de realización particularmente preferida, el biopolímero de origen microbiano es una sal de alginato, preferiblemente alginato de sodio.

[0053] El presente método es particularmente adecuado para despirogenar alginatos con un peso molecular particularmente alto. Por consiguiente, en otra forma de realización preferida, al menos el 80 % en peso del alginato que contiene LPS tiene un peso molecular de al menos 10 kDa (es decir, al menos 50 subunidades monoméricas).

[0054] Normalmente, la solución acuosa empleada en el presente proceso contiene de 0.1-50 % en peso de material biopolimérico. Como se ha explicado aquí anteriormente, las ventajas del presente método son particularmente pronunciadas en el caso de que la solución acuosa contenga un nivel alto de material biopolimérico, puesto que el presente método se puede usar adecuadamente para despirogenar soluciones altamente viscosas. Por consiguiente, en una forma de realización particularmente preferida, la solución acuosa contiene al menos 1 % en peso de material biopolimérico.

[0055] En el método según la presente invención la separación de la fase acuosa de la fase surfactante se consigue adecuadamente eliminando el adsorbente sólido que contiene la fase surfactante adsorbida y LPS. Dicho adsorbente se puede retirar de la fase acuosa usando métodos de separación sólido-líquido bien conocidos en la técnica, por ejemplo, centrifugación, sedimentación, filtración etc.

[0056] Después de la eliminación del adsorbente sólido, el material biopolimérico se puede separar de la fase acuosa usando una variedad de métodos incluyendo precipitación, cristalización y secado. Según una forma de realización particularmente preferida, el material biopolimérico es aislado del acuoso separado por medio de precipitación. Aún más preferiblemente, la recuperación del material biopolimérico de la fase acuosa separada implica la precipitación del material biopolimérico añadiendo al menos 10% en peso de agua de un solvente orgánico que es mezclable con agua. Ejemplos de solventes orgánicos que pueden ser usados adecuadamente incluyen alcoholes primarios C₁₋₃, dioles C₂₋₄, trioles C₃₋₄, 2-propanol, cetonas C₂₋₃ y combinaciones de los mismos. Preferiblemente, el solvente orgánico es seleccionado del grupo consistente en etanol, n-propanol, i-propanol, acetona y combinaciones de los mismos. De la forma más preferible, el solvente orgánico empleado es etanol.

[0057] Los inventores han descubierto que el solvente orgánico se puede retirar muy eficazmente del material biopolimérico precipitado por el aislamiento del precipitado y secándolo posteriormente por la extracción de este con un gas licuado, un gas subcrítico o un gas supercrítico.

El término "gas subcrítico", como se utiliza en este caso, se refiere a un gas comprimido que no está ni en un estado supercrítico ni licuado, sino que ha sido presurizado a al menos 10 bar, preferiblemente a al menos 20 bar.

Preferiblemente, el gas supercrítico, subcrítico o licuado tiene una presión de al menos 0.3xP_c y una temperatura de al menos T_c-60 °C, representando P_c la presión crítica del gas y representando T_c la temperatura crítica del gas.

En el presente proceso, el gas usado para extraer el solvente orgánico tiene preferiblemente una presión de al menos 10 bar, aún más preferiblemente de al menos 20 bar

[0058] El gas licuado, subcrítico o supercrítico es seleccionado ventajosamente del grupo consistente en dióxido de carbono, óxido nitroso, etano, etileno propano, ciclopropano, propileno, butano, argón, nitrógeno y combinaciones de los mismos.

De la forma más preferible, el gas empleado para secar el precipitado es dióxido de carbono.

[0059] Como se ha mencionado aquí anteriormente, el presente método puede ser empleado ventajosamente para reducir los niveles de LPS del alginato a niveles de traza o incluso menos.

Normalmente, el alginato recuperado obtenido por el presente proceso contiene menos de 100 unidades de LPS por gramo de alginato, más preferiblemente menos de 10 unidades de LPS por gramo de alginato. La reducción en el nivel de LPS conseguido en el presente proceso excede normalmente de un factor 10^{2.5}. Aún más preferiblemente, la reducción en el nivel de LPS conseguida en el presente proceso excede de un factor 10³. De la forma más preferible, el último factor de reducción excede de 10^{3.5}.

[0060] El presente método es particularmente adecuado para eliminar los lipopolisacáridos que contienen lípido A. Por consiguiente, en una forma de realización preferida de la invención, el contenido de lípido A del material biopolimérico recuperado es al menos 10^{2.5} veces inferior, más preferiblemente al menos 10³ veces inferior y de la forma más preferible al menos 10^{3.5} veces inferior al contenido de lípido A del material biopolimérico de inicio.

[0061] Como explicado aquí anteriormente, la presente invención permite la fabricación de alginatos ultrapuros en los que los niveles de LPS han sido reducidos hasta un nivel tan extremadamente bajo que se pueden usar en dispositivos médicos para cirugía espinal o craneal.

Por tanto, la presente invención permite la preparación de dispositivos médicos, tales como sellantes, que se pueden usar en la cirugía espinal o craneal.

[0062] Según una forma de realización particularmente preferida, el alginato empleado en el presente sistema para

entregar un sellante quirúrgico es un alginato obtenido por un método como se ha descrito aquí anteriormente.

[0063] El alginato contenido en el presente sistema de entrega contiene ventajosamente menos de 50 EU, más preferiblemente menos de 30 EU por gramo.

[0064] La invención se ilustra posteriormente mediante los ejemplos siguientes.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

[0065] El alginato de sodio fue disuelto en agua destilada a una concentración final de 2,5% (p/p) y una viscosidad cinemática de 480 cSt. La viscosidad cinemática fue determinada con un viscosímetro de flujo inverso en tubo U (Poutten Selfe & abrigo BS/IP/RF tamaño 3; $c=0.03023$). La endotoxigenidad fue determinada en 91.000 EU/g utilizando un ensayo turbidimétrico cinético de Associates of Cape Cod, Inc.

[0066] Después de añadir 1 vol.% de Tritón X-114 (un octilfenol etoxilado con un HLB de 12.3 y que contiene de media 7.5 residuos etoxilatos) la suspensión se agitó con un mezclador durante 30 minutos a una temperatura justo por debajo del punto en nube del detergente (es decir 23°C a 1% v/v).

Posteriormente, el 3 % en peso del adsorbente aluminio fillosilicato (Montmorillonite, B-3378, ex Sigma-Aldrich) se dispersó en la suspensión, que fue llevada a 70°C y se agitó durante otros 30 minutos.

[0067] Mil quinientos ml's de la suspensión así obtenida fueron transferidos a botellas de spin seco que fueron colocados en un rotor de ángulo fijo Sorvall GSA precalentado (70°C).

Después del centrifugado durante 60 min a 11.000 r.p.m. (27.000 x g) utilizando una centrifugadora Sorvall RC-5B plus, el sobrenadante fue recogido de forma cuantitativa por decantación. La suspensión se agitó posteriormente durante 30 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó durante 60 minutos a 11.000 r.p.m. La solución resultante fue decantada y llevada a 60% etanol en peso y permitió la sedimentación durante 30 min para dejar que precipitara y decolorara.

[0068] Se recogió el precipitado blanco claro y el fluido se exprimió con una prensa.

El precipitado tipo goma fue triturado y resuspendido en alcohol absoluto con la ayuda de una mezcladora. Después de 30 minutos de compensación, el precipitado fue recogido con una criba y comprimido. El producto comprimido contenía todavía aproximadamente el 75% (p/p) de material líquido.

[0069] A continuación, el producto fue vertido en un autodave de 4,2 litros (UHDE GmbH, Dortmund) que se calentó a 95°C mediante una envoltura, usando aceite de calentamiento. El dióxido de carbono fue presurizado a 150 bar utilizando una bomba de émbolo (Orlita Prominent, Heidelberg) y se calentó a 95°C antes de ser bombeado a través del material tipo gel a 300 g/min durante 45 min. El producto formado de esta manera en el vaso fue recogido en el filtro en el fondo del vaso. El producto presentó una estructura fibrosa como confirmado por S.E.M. y había adquirido 10% de viscosidad (por gramo de producto seco). La recuperación final fue de casi 85%. La endotoxigenidad del producto final fue determinada en 350-400 EU/g, que corresponde a un factor 102.4 de purificación.

Ejemplo 2

[0070] El alginato de sodio fue disuelto en agua destilada a una concentración final de 4,5% (p/p) y una viscosidad cinemática de 2700 cSt. La endotoxigenidad fue determinada en 91.000 EU/g utilizando un ensayo turbidimétrico cinético de Associates of Cape Cod, Inc.

[0071] Después de añadir 1 vol.% de Tritón X-114, la suspensión se agitó con un mezclador para 30 minutos a una temperatura justo por debajo del punto de nube del detergente (es decir 23°C a 1% v/v). Posteriormente, 2 % en peso de carbón activado (Norit SX plus; MPV 0.35 cm³/g; S_{BET} 1051 m²/g) fue dispersado en la suspensión, que fue llevada a 70°C y se agitó durante otros 30 min.

[0072] Mil quinientos ml's de la suspensión así obtenida fueron transferidos a botellas Sorvall de spin seco que fueron colocadas en un rotor Sorvall GSA de ángulo fijo precalentado (70°C). Después del centrifugado durante 60 min a 11.000 r.p.m. (27.000 x g) utilizando una centrifugadora Sorvall RC-5B plus, el sobrenadante se recogió de forma cuantitativa por decantación. En esta fase se descubrió que el producto intermedio, libre esencialmente de carbono, tenía una endotoxigenidad de 600 EU/g.

[0073] Las trazas restantes de carbono en el sobrenadante se retiraron por la suspensión de 3 % en peso de montmorillonita (Sigma B-3378) y 1% de Tritón X-114 en la solución con una mezcladora.

La suspensión fue posteriormente agitada durante 30 minutos a temperatura ambiente y centrifugada durante 60 min a 11.000 r.p.m. La solución resultante fue decantada y llevada a 60% de etanol en peso y se la dejó sedimentar durante 30 min para dejar que el alginato precipitara y decolorara.

[0074] El precipitado blanco claro se recogió y el fluido fue exprimido con una prensa. El precipitado tipo goma fue triturado y resuspendido en alcohol absoluto con la ayuda de una mezcladora. Después de 30 minutos de compensación, el precipitado fue recogido con una criba y se comprimió.

El producto comprimido todavía contenía aproximadamente el 75% (p/p) de material líquido.

5

[0075] El exceso de alcohol se retiró del producto exprimido por extracción con dióxido de carbono supercrítico como realizado en el ejemplo 1, con un tiempo de extracción reducido de 30 minutos.

10

[0076] El producto esencialmente seco se resolubilizó en agua de grado de inyección (estéril y apirogénico, B.Braun, Melsungen AG, Alemania) a una concentración final de 8.0%. El fluido altamente viscoso (15000 cSt) fue transferido a una bomba de jeringa (ISCO 260D, Teledyne Isco, Lincoln USA) a temperatura ambiente y se pulverizó en un autoclave por medio del agujero central de 0.0013 cm² de una boquilla coaxial de dos fluidos a 3.3 ml/min. El dióxido de carbono fue pulverizado alrededor del agujero central a través de una abertura de 0,0122 cm². El dióxido de carbono fue presurizado a 180 bar utilizando una bomba de émbolo (Orlita Prominent, Heidelberg) y calentado a 95°C antes de ser pulverizado a 600 g/min.

15

El autoclave (UHDE GmbH, Dortmund) fue también calentado a 95°C.

[0077] El polvo formado de esta manera en el vaso fue recogido en el filtro en el fondo del vaso. S.E.M. revelaron agregados pequeños de estructuras globales con un diámetro de cruce predominante inferior a 5 µm. La endotoxicidad del producto final fue determinada en 25 EU/g, que corresponde a un factor de purificación 10^{3.6}.

20

Ejemplo 3

[0078] Se repitió el Ejemplo 1, excepto que Tritón X-114 fue sustituido por 0,1 % en peso de sulfato dodecil de sodio (Sigma L6026). Además, como no tiene lugar subdivisión de fase con este sólido, detergente iónico, la temperatura operativa era temperatura ambiente. También, la concentración de alginato tenía que bajar a 1,8% (185 cSt) para facilitar la eliminación por centrifugado del carbón activado.

25

[0079] Después de la precipitación del alcohol, el producto fue secado como se describe en el ejemplo 2. Aunque se obtuvo una reducción 10³ de la endotoxicidad, el producto todavía requería un paso de limpieza adicional para eliminar sulfato dodecil sódico residual.

30

Ejemplo 4 (no de acuerdo con la invención)

[0080] Se preparó una solución acuosa caliente (90°C) de gelatina (13.200 EU/g; 30% p/p). La solución fue helada temporalmente hasta justo debajo del punto en nube de Tritón X-100 (un octilfenol etoxilado que comprende de media 9.5 residuos etoxilados y que tiene un HLB de 13.4). Posteriormente, se añadió 1 % de vol. de volúmenes de Tritón X-100. Después de la agitación durante 5 minutos, la suspensión fue calentada a 90°C para provocar la separación de fase. Posteriormente, se dispersó en la suspensión 2 % en peso de carbón activado prelavado (Norit SX más). El prelavado de Norit servía para la eliminación de las partículas más pequeñas.

35

40

[0081] La temperatura de suspensión fue mantenida a 80°C y agitada durante 30 min. Tres litros de la suspensión fueron transferidos a contenedores que se colocaron en un rotor Beckmann JA-10 de ángulo fijo precalentado (80°C). Después de 30 min de centrifugado a 10.000 r.p.m. (17.700 x g) en una centrifugadora Beckman J2-21 superseed, el sobrenadante se decantó suavemente.

45

Las trazas de carbono fueron retiradas por filtrado de la solución caliente sobre la lana de vidrio apirogénica que fue colocada encima de un filtro cubierto de arena.

[0082] La solución caliente clarificada fue transferida a una bomba de jeringa (ISCO 260D, Teledyne ISCO, Lincoln EE.UU) que soportaba una envoltura de calentamiento. La solución fue pulverizada a 90°C en un autoclave UHDE de 4 litros a través del agujero central de 0.0013 cm² de una boquilla coaxial de dos fluidos a 2.5 ml/min.

50

El vaso fue presurizado con dióxido de carbono a 150 bar utilizando una bomba de émbolo (Orlita Prominent, Heidelberg) y calentado a 90°C antes de ser pulverizado a 500 g/min. El dióxido de carbono fue pulverizado alrededor del agujero central a través de una abertura de 0,0122 cm². El polvo formado de esta manera en el vaso fue recogido en el filtro en el fondo del vaso.

55

[0083] La reducción de endotoxicidad resultó ser un factor 10^{2.1}, como determinado con el ensayo turbidimétrico cinético de Associates of Cape Cod, Inc.

60

Ejemplo 5

[0084] El alginato de sodio (525 KDa, 40 % en peso de guluronato) Danisco Grindsted PHU-156 fue disuelto en agua de ósmosis inversa a una concentración final de 1,9 % (p/p) y una viscosidad cinemática de 5,500 cSt. La viscosidad cinemática fue determinada mediante ajuste de curvas con extrapolación usando un viscosímetro de flujo invertido con tubo en U (Poutten Selfe & Lee BS/IP/RF tamaño 3; c=0.03023).

65

La endotoxicidad fue determinada en 110.000 EU/g utilizando un ensayo turbidimétrico cinético de Associates of Cape

Cod, Inc. (designado a continuación como "el método de coagulación del gel").

[0085] Después de la adición de 1 % en peso de Tritón X-114, la suspensión se agitó con un mezclador durante 30 minutos a una temperatura de 10 grados por debajo del punto de nube del detergente (es decir 23°C a 1% v/v).

5 Después de aumentar la temperatura al menos 10 grados más allá del punto de nube 1,5 % en peso de carbón activado (Norit SX más; MPV 0,35 cm³/g; S_{BET} 1051 m²/g) fue dispersado en la suspensión, que fue llevada a 70°C y agitada durante otros 30 min. Posteriormente 2,25 % en peso de montmorillonita ((Sigma B-3378) fueron dispersados en la suspensión y se continuó con la agitación durante otros 30 minutos a 70°C.

10 [0086] Los 6 litros de suspensión así obtenida fueron transferidos a botellas de polipropileno de 1 litro que fueron colocadas en un rotor de ángulo fijo JLA-8.1000.

15 Después del centrifugado durante al menos 12 horas a 7,000 r.p.m. (12,300 xg) utilizando una centrifugadora Beckman Avanti J-26 XP High Performance, el sobrenadante fue recogido de forma cuantitativa por decantación. La solución resultante fue llevada a 50% de etanol por volumen, se mezcló y se dejó sedimentar durante al menos 1 h para dejar al alginato precipitar y decolorar.

20 [0087] El precipitado blanco claro fue concentrado en una criba. El precipitado tipo goma fue además comprimido por centrifugado a temperatura ambiente durante 30 min. a 5000 r.p.m. en la centrifugadora descrita anteriormente. El precipitado blanco fue triturado y resuspendido en alcohol absoluto con la ayuda de una mezcladora. Después de 30 minutos de compensación, el precipitado fue recogido con una criba y comprimido por centrifugado repetido (30 min a 5000 r.p.m.).

El producto comprimido todavía contenía aproximadamente el 75% (p/p) de sustancia líquida.

25 [0088] A continuación, el producto fue vertido en un autoclave de 4,2 litros (UHDE GmbH, Dortmund) que fue calentado a 95°C mediante una envoltura, usando aceite de calentamiento.

El dióxido de carbono fue presurizado a 150 bar utilizando una bomba de émbolo (Orlita Prominent, Heidelberg) y calentado a 95°C antes de ser bombeado a través del material tipo gel a 300 g/min durante 45 min. El producto formado así en el vaso fue recogido en el filtro en el fondo del vaso.

30 El producto presentaba una estructura fibrosa como confirmado por S.E.M. y había adquirido una viscosidad de 10% (por gramo de producto secado).

[0089] La recuperación final fue casi del 75%. La endotoxicidad del producto final fue determinada como <30 EU/g, que se encuentra por debajo del límite de detección.

35 Ejemplo 6

[0090] El alginato de sodio ISP Manugel DMB (150 Kda, 63 % en peso guluronato) fue disuelto en agua de ósmosis inversa a una concentración final de 2,8 % (p/p) y una viscosidad dinámica de 6.000 mPa.s.

40 La viscosidad fue medida a varias concentraciones de alginato (que varían a partir de 0.4-3%) en la solución salina utilizando un viscosímetro rotativo Synchro-Lectric (Brookfield Engineering Laboratories Inc., MA) puesto en funcionamiento a 20°C. La endotoxicidad fue determinada en $1,1 \times 10^6$ EU/g utilizando el método de coagulación de gel.

45 [0091] La solución fue tratada exactamente como se describe en el ejemplo 5 hasta la fase en que se recogió el precipitado blanco claro y el fluido se exprimió con una prensa. El precipitado tipo goma fue triturado y resuspendido en 6 litros de una mezcla 1:1 de etanol absoluto y agua de grado inyección (estéril y apirogénica, B.Braun, Melsungen AG, Alemania) para decoloración extendida durante otra hora. Después de la compensación repetida en alcohol absoluto, el precipitado fue recogido con una criba y comprimido. El producto comprimido todavía contenía aproximadamente el 75% (p/p) de material líquido. El secado se realizó como se describe en el ejemplo 1.

50 La recuperación final fue de casi el 70%. La endotoxicidad del producto final fue determinada como 60 EU/g, que corresponde a un factor de purificación de 4.3log.

Ejemplo 7

55 [0092] El alginato de sodio ISP Manuacol LD (de bajo PM, 39 % en peso de guluronato) fue disuelto en agua de ósmosis inversa a una concentración final de 24,0 % en peso. La endotoxicidad fue determinada en $4,3 \times 10^4$ EU/g utilizando el método de coagulación de gel.

60 [0093] La solución fue tratada exactamente como se describe en el ejemplo 6 con la excepción de que se usó para la compensación agua de ósmosis inversa (en vez de agua de calidad de inyección).

La recuperación final fue de 72%. La endotoxicidad del producto final fue 2×10^3 EU/g, indicando que debe ser empleada un agua altamente purificada durante la compensación para maximizar los niveles de despirogenización.

65 La muestra purificada fue analizada también en cuanto a posibles trazas de Tritón X-114. Con este fin la muestra fue sometida a mediciones de índice de refracción y TLC (P.Strop & A.T. Brunger (2005) Protein Sci. 14,2207-2211), comparable con la espectroscopia de UV directa. Se detectaron niveles de Tritón X-114 a una concentración de 0,01-0,02 %, que está bastante por debajo de la especificación de 0,1%.

REVINDICACIONES

- 5 1. Método de reducción de los niveles de lipopolisacárido en un material biopolimérico que contiene lipopolisacáridos, comprendiendo dicho método las etapas consecutivas de:
- 10 a. Proporcionar una solución acuosa que contiene 0,05-50 % en peso de material biopolimérico que contiene lipopolisacárido disuelto; 0,001-10 % en peso de un surfactante; 0,05-15 % en peso de sólido adsorbente; y al menos 50 % en peso de agua;
- b. Permitir que el adsorbente adsorba lipopolisacáridos;
- c. Separar el adsorbente sólido que contiene lipopolisacáridos adsorbidos de la solución acuosa restante mediante centrifugación, sedimentación o filtración; y
- 15 d. Recuperación del material biopolimérico que contiene un nivel reducido de lipopolisacáridos de la solución acuosa separada;
- donde el material biopolimérico es un alginato.
- 20 2. Método según la reivindicación 1, donde la solución acuosa contiene un surfactante de formación de micela en una concentración superior a la concentración de micela crítica y donde, antes de la separación del adsorbente sólido de la fase acuosa restante, dicha solución acuosa se provoca para separación de fase en una fase acuosa y una fase surfactante.
- 25 3. Método según la reivindicación 2, donde el surfactante de formación de micela tiene una densidad de más de 1,03 g/ml en la temperatura en punto de nube.
4. Método según la reivindicación 2 o 3, donde el surfactante de formación de micela es un alquilfenol etoxilado representado por la fórmula $C_xH_{2x+1}-C_6H_4-O-(C_2H_4O)_nH$, donde:
- 30 • x está en el rango de 4-12; y
• n está en el rango de 4-12.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la fase acuosa separada tiene una viscosidad de al menos 100 cSt a 20 °C.
- 35 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el adsorbente sólido es seleccionado del grupo consistente en carbón activado, arcillas adsorbentes y combinaciones de los mismos.
- 40 7. Método según la reivindicación 6, donde el adsorbente sólido comprende carbón activado.
8. Método según la reivindicación 6 o 7, donde el adsorbente sólido comprende una arcilla.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2-8, donde la separación de fase se produce por aumento de temperatura, adición de sal, cambio de pH y/o estrés osmótico.
- 45 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el biopolímero es una sal de alginato, preferiblemente alginato de sodio.
- 50 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la recuperación del material biopolimérico de la fase acuosa separada implica la precipitación del material biopolimérico añadiendo al menos 10% en peso de agua de un solvente orgánico que es mezclable con agua.